

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0079699 (43) 공개일자 2012년07월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0001038 (22) 출원일자 2011년01월05일 심사청구일자 2011년01월05일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 황병국 서울특별시 서초구 사임당로17길 116, Apt 103 동1405호 (서초동, 서초삼성래미안) 황인선 서울특별시 성북구 동선동3가 35번지 301호 (74) 대리인 김선애	

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 병저항성 관련 고추 C 3 H 1 형태의 징크핑거 유전자 C a D C 1 및 이를 이용한 식물체의 병저항성 탐색 방법

(57) 요약

본 발명은 고추식물에서 발생하는 병에 대한 방어반응에 관여하는 C3H1 형태의 징크핑거 (pepper DC1 domain-containing CCH-type zinc finger gene 1, *CaDC1*) 유전자 및 이를 이용한 병 저항성에 기여하는 형질전환 식물체 제작 및 식물체 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 본 발명의 상기 유전자는 병원균의 공격에 대한 식물체의 방어 반응 및 병저항성 식물체의 효율적이고 효과적인 분자적 육종을 위한 유전체로서 유용하게 사용될 수 있으며, 식물병 저항성에 대한 탐색 및 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1

```

gtggcggccgctctagaactagtgatcccccgggctcgaggcaagtATGAAGCATTIT 59
AGCCACCCCATGCTTGGAACTCTCTGAAGTTCAACAATCAATGAGACAGTCTGCTCA 119
S H P H A L E L S E V Q Q S N E T V C S
GGTTGTGAGATAAACTTTGTGGCACTTCTTACAATGACAAAACCAATTTGTGAATTC 179
G C E N K L C G T S Y K C T K P N C E F
AGCCTTCAAAATCATGCTTGAATACCAAGAAAATACACACAATTCATCTTAAG 239
S L H K S C F E L P R K I O H N S H L K
CATCTCTCACTTTGTACCTACTTTACCCCAAGCACTGATGATTTGTGTTGCAAT 299
H P L T L Y P T L P O R D S W Y F G C N
GCTTGTGGTGAAGAACCAAAATGCTTTGTCTACGAATGCTCGAATGCAACTTTAGTCTC 359
A C G E E P K C F V Y E C L E C N F S L
CATGCTAAATGTCTACATCTTGGCCTGAATGTGACTCGTGAGGATCATCAACTCT 419
H A K C A T S W P E Y V T R E D H O H S
CTTGACTACAATCAATGGCCATTTCCTATTTATGATTAGTGAATATCTTTTGGAG 479
L V L O Y Q W P P P I Y D Y V N I F C E
GTTTGAATGGACTTTGCAATGATGCCAATTGGCTTTATTATTGTGGCCAGTGAATTA 539
V C N G L C N D A N W L Y Y C A D C K L
GGCACACCTGCAATGGCGACAGTTAAAAAGGAAGATGGTTGAGCTTTGAGAAATGAA 599
G T H L O C A T V K K E D G S S F E N E
GAGGTAGAGATGACTAATGAGCAGAAATTGATGGGACCAATAAGGCCAAGGGCAA 659
E V E M T N E O K L M A T I K A D G O
CAGGCAAGGCTTAATTTCAAGCTCAATGGCTATATGACGCCCAAGCTATAACCAAT 719
Q A R L N F O A O W A Y M N A O A I T N
ATGTGGGAAGCCATCATCATGATTAAacgttccttttttttttgaatataaaa 779
M W R S H H Y D *
taataactccattatgttttaagagtagtgtttgaaggagctgtatgtcgctgtgt 839
attctaccataactgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt 899
tcaaacattatataaataatattgtgtattttcaaaaaaaaaaaaaaaaaa 953

```

특허청구의 범위

청구항 1

고추 유래의 식물병 저항성 관련 징크핑거를 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*CaDC1*):

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자;

(b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 (*CaDC1*).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 5

식물체로부터 mRNA 분리하여 제1항 기재의 유전자(*CaDC1*)의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물체에 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균을 접종하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 7

제1항 기재의 *CaDC1* 유전자의 단백질 발현을 위하여 *CaDC1* 유전자를 pET28a 또는 pMAL 벡터에 각각 도입시켜 제조한 재조합 벡터 pET28a:: *CaDC1* 또는 pMAL:: *CaDC1*로 형질전환된 대장균(*Escherichia coli* strain BL21).

명세서

기술분야

본 발명은 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 고추의 C3H1 형태의 징크핑거 유전자 (pepper DC1 domain-containing CCCH-type zinc finger gene 1, *CaDC1*)와 이를 이용한 병저항성 형질전환 식물체 및 그 개발방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주와 비병원성 균주에 감염될 때 저항성 반응에서 강하게 발현되는 식물병 방어 관련 신규 유전자인 *CaDC1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 생물적 저항성 유도 처리시 저항성 관련 유전자 *CaDC1*의 차별적인 발현여부 및 식물체의 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 고추 식물에서 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing) 현상을 통해 상기 *CaDC1* 유전의 발현을 불능화(knock down)시켜 병저항성에 대한 징크핑거 유전자의 기능을 확인하고, 그리고 상기 *CaDC1* 유전자를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 형질전환을 통해 도입, 과발현(overexpression)시켜 *CaDC1* 유전자의 식물체 병저항성 증대효과를 확인하여, 이를 통한 식물병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다. 이와 더불어 *CaDC1* 유전자가 징크핑거 도메인을 가지는 유전자로서 세포내의 위치를 확인하여 식물에서의 *CaDC1* 유전자의 기능을 탐색한 것에 관한 것이다. 그리고 상기 *CaDC1* 유전자를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 형질전환을 통해 도입, 과발현(overexpression)시켜 *CaDC1* 유전자의 식물체 병저항성 증대효과를 확인하여, 이를 통한 식물병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식물은 병원균의 침입과 외부자극에 대하여 복잡한 조절 기작을 통하여 면역반응을 작동시켜 스스로를 보호하도록 식물은 진화해 왔다. 그러나 식물의 방어반응에 대한 이해는 부족한 현실이다. 이러한 저항성 반응에도, 식물이 외부의 자극이나, 병에 대하여 위협받게 되면, 작물의 생산 및 품질의 저하를 가져와 경제적으로 큰 피해를 일으키게 된다. 이러한 피해를 최소화하기 위하여 고추를 비롯한 다양한 경제작물의 병 저항성 품종의 육종에 대한 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 실제적 응용을 위해 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구를 고추식물을 모델로서 수행하고 있다.
- [0003] 이러한 생물학적/물리적/환경적 스트레스에 대한 식물의 방어 반응 중에서 특히 식물이 병원체에 대하여 방어 반응을 일으키는 데 중요한 역할을 하는 것은 식물과 병원균의 상호작용에 의한 식물의 병저항성의 발현과 이에 관련된 신호전달경로이다. 이러한 식물의 병 방어 기작 및 저항성 반응에 관련된 유전자가 어떻게 병원균을 인식하고, 어떠한 전달경로를 통하여 식물 전체에 반응하게 되는지 중요하게 연구되어져 왔으며, 이와 관련하여 생물학/생화학/세포생물학적인 방법을 이용한 병 방어(저항성) 유전자의 기능에 대한 연구가 이루어져 왔다. 병 방어(저항성) 유전자의 기능에 대한 생물학/생화학/세포생물학적인 연구는 식물의 생리 및 저항성에 관련된 기작을 연구하는데, 높은 가치를 가지게 되는 것은 물론, 작물의 분자유종기술을 통한 저항성 품종의 개발에 기여할 수 있다. 작물의 분자유종기술에서 유전공학적인 기술의 개입은 근래 활발하게 이루어지고 있으며, 병 방어(저항성) 유전자를 통한 작물의 분자유종은 타 식물종의 외래 유전자를 사용할 수 있으며, 기존의 계통단위로 가능하던 육종기술을 유전자 수준에서 가능하도록 하여 보다 효과적인 육종 효과를 보이며 현재의 육종의 기술을 극대화시킬 수 있다는 장점이 있다.
- [0004] 한편, 징크핑거 단백질은 많은 식물에서 함유하고 있으며 병원균이나 그 외의 스트레스에 대한 방어반응을 조절하는 데에서 중요한 역할을 하고 있다. 특히 일반적으로 시스테인 (cystein)과 히스티딘 (histidine)의 개수에 따라서 형태가 나뉘어 지고 있으며, 가장 많이 알려진 형태가 디엔에이 (DNA)에 결합하는 것으로 알려진 시스테인 2/ 히스티딘2 (C2/H2) 형태의 징크핑거 단백질이다. 또한 최근 알렌에이 (RNA)에도 결합하는 시스테인3/ 히스티딘1 (C3/H1) 형태의 징크핑거 단백질에 대한 연구 또한 활발이 이루어지고 있다. 이러한 징크핑거 단백질은 병원균의 감염에 의하여 유도되어지는 것으로 알려져 있으며 특히 핵에 위치하고 있는 것으로 연구되어 졌다. 특히 징크핑거 단백질은 곰팡이나, 세균, 곤충이나 포유동물의 공격과 같은 외부 자극에 대하여 발현이 증가하게 되고 이는 식물의 방어반응 관련 물질들의 합성을 이끌게 된다. 이러한 발견은 징크핑거 단백질의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보의 축적이 가능해져서 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 생명공학적인 식물을 개발하거나 식물의 병저항성 유전자 재료로서 분자유종에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다.
- [0005] 고추는 가지과에 속하는 채소작물로서 열매는 한식요리에서 중요한 조미료로 사용되고 있는 대표적인 경제작물이다. 고추는 세균병, 진균병, 바이러스병이 다양하게 보고되고 있으며 난균류에 의한 역병과 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균점무늬병에 대한 피해가 가장 심각하게 보고되고 있다. 이러한 병원균의 침입은 주로 상품성을 잃게 만들어 농가의 소득에 직접적인 피해를 주고 있다. 고추의 세균성 점무늬병은 잎, 잎자루, 줄기, 과경 및 열매에 나타나며 암갈색의 원형이나 부정형의 작은 점무늬를 형성하여 낙엽을 유발하고 수확량을 감소시키는 병으로서 더듬이병 또는 반점세균병으로도 불리우며 심각한 수준의 피해를 보이고 있다.
- [0006] 이러한 고추 세균성 점무늬병은 농약을 이용한 화학적 방제가 어려우므로 고추 세균성 점무늬병에 대한 피해를 최소화하기 위하여 고추 식물의 재배환경을 조절하여 경종적으로 방제하고 저항성 고추품종의 개발 및 생물학적 방제등을 적절히 사용하는 것이 농민들에게 가장 효율적이고 경제적인 방제방법이다. 이들 방제 방법 중에서 병에 대하여 저항성을 가지고 있는 고추 품종의 개량 및 육종을 위하여 생명공학 기술을 이용한 유용한 고추방어유전자를 이용하는 분자적 육종기술개발이 21세기 고추생산에 가장 바람직하다고 할 수 있다. 이러한 병원균들의 피해는 고추의 수확량 감소 및 질적 저하를 가져오고 있어 이러한 문제들을 해결하기 위하여 안정적인 생산, 농약과 노동력 절감에 따른 생산비의 절감 및 환경을 고려한 고추의 내병성 품종의 육종이 중요한 목표로 인식되어지고 있다. 또한 우리나라는 고추 종자생산에 일대 잡종기술을 사용하는 유일한 국가로 분자유전학적 육종기술을 작물의 육종에 도입하여 기존의 육종기술과 접목한다면 보다 좋은 고추 품종의 육종이 가능한 기반이 되어져 있다. 이러한 우량 품종의 육종은 국내 종자시장에서 국내 유전자원을 보호하는 것은 물론 부가가치가 높은 유전자원의 개발로 이어질 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 방어 관련 유전자의 하나인 고추 징크핑거 유전자를 코딩하는 *CaDC1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한 본 발명의 목적은 상기 *CaDC1* 유전자를 이용하여 식물병에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0009] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaDC1* 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 분리한 신규 방어 관련 유전자 *CaDC1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 생물적처리를 통하여 *CaDC1*의 발현 여부를 조사하고, 고추 식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaDC1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.
- [0012] 따라서 본 발명은 식물병 방어 관련 유전자로서 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추 유래 징크핑거 단백질을 코딩하는 분리된 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaDC1*)를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 C3H1 형태의 징크핑거 단백질(*CaDC1*)을 제공한다.
- [0014] 나아가 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S::*CaDC1* 또는 TRV2::*CaDC1*이다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.
- [0016] 나아가 본 발명은 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaDC1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 본 발명에 의한 *CaDC1* 유전자의 단백질 발현을 위하여 *CaDC1* 유전자를 pET28a 또는 pMAL 벡터에 각각 도입시켜 제조한 재조합 벡터 pET28a::*CaDC1* 또는 pMAL::*CaDC1*로 형질전환된 대장균(*Escherichia coli* strain BL21)를 제공한다.
- [0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

- [0019] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 집중에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병 방어(저항성)에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선별하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 징크핑거 (*CaDC1*) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, *CaDC1*로 명명된 고추 녹광 품종의 *CaDC1* 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다 (도 1 참조).
- [0020] 본 발명에 의한 상기 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaDC1* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 C3H1 형태의 징크핑거 1(*CaDC1*) 유전자로 명명하였다. *CaDC1* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 담배식물의 단백질 아미노산 서열과 비교한 결과 82%의 상동성을 나타내었으나 애기장대, 포플러 나무 (*Populus trichocarpa*), 포도 (*Vitis vinifera*) 등의 작물에서 C3H1 형태의 징크핑거 1와 30% 이하의 상동성을 나타내어 신규임을 알 수 있었다. (도 1 및 도 2 참조).
- [0021] 확인된 *CaDC1* 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.
- [0022] 다음에, 본 발명은 생물적/화학적 처리를 한 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaDC1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병균의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 *CaDC1* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법을 비롯한 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaDC1* 유전자가 식물병원균에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaDC1* 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기의 *CaDC1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaDC1* 유전자가 억제된 식물체의 제작하고 병감수성이 증대되는 것을 확인하고, *CaDC1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.
- [0024] 보다 구체적으로 본 발명은 또한 새롭게 개발된 바이러스 유도 유전자침묵(불능화)기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaDC1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::*CaDC1*을 제공한다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaDC1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 병감수성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다 (도 9 ~ 도 12 참조).
- [0025] 또한 본 발명에 의한 *CaDC1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*CaDC1*)를 식물체에 도입하여 본 발명에 의한 *CaDC1*이 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제조하여 식물병 저항성의 증대를 확인할 수 있었다 (도 13 ~ 도 16 참조).
- [0026] 본 발명에 의한 고추 C3H1 형태의 징크핑거 1의 기능을 불능화 시킨 고추 식물 및 C3H1 형태의 징크핑거 1을 과발현시킨 애기장대 식물을 통하여 식물병원균에 대한 저항성 검정평가를 수행하여 병 저항성 발생여부를 알아 볼 수 있게 되었다. 이러한 본 발명으로 징크핑거의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 생명공학식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

- [0027] 상술한 바와 같이, 본 발명은 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병에 대한 방어반응에 관여하는 식물병 방어 관련 유전자인 신규 고추의 C3H1 형태의 징크핑거 단백질을 코딩하는 *CaDC1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 이에 따라 제공되어진 서열 정보 및 이에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 더불어, 고추 식물의 *CaDC1* 유전자가 식물병에 대한 저항성 반응에 기여하고 있음을 밝힘으로써 이러한 정보를 바탕으로 식물체의

저항성 탐색 방법의 제공이 가능하다. 특히 본 발명의 완성은 단백질 항체를 이용하여 단백질의 발현을 통한 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체의 제작에 기여할 수 있는 효과를 볼 수 있어 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있으며, 더 나아가서 식물의 육종산업의 발전에 기여할 수 있는 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 C3H1 형태의 징크핑거 (*CaDC1*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명에 의한 고추 C3H1 형태의 징크핑거 (*CaDC1*)의 아미노산 서열을 담배, 포도, 애기장대 등의 식물의 징크핑거 아미노산 서열과 비교한 alignment 도면이다.

도 3은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종하였을 때 접종되지 않은 고추잎과 접종된 고추잎에서의 *CaDC1* 유전자와 단백질 발현 유도 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 maltose binding protein (MBP)을 포함하는 제조합 *CaDC1* 단백질의 발현을 확인한 도면이다. 1번은 단백질의 마커 (molecular markers), 2번은 MBP만 있는 발현되어진 단백질, 3번은 maltose binding protein (MBP)을 포함하는 제조합 *CaDC1* 단백질이 발현된 것으로 4번과 5번은 각각 2번과 3번의 단백질을 순화한 것이다.

도 5은 DNA와 RNA의 결합활성을 나타낸 것으로 히스티딘 항체를 이용하여 면역블러팅(immunoblotting)을 통해 검출한 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 녹색형광단백질(Green fluorescent protein)을 이용한 양파식물에서의 세포내 위치확인(subcellular localization)을 위한 *CaDC1* 유전자의 분석도이다.

도 7은 *CaDC1*의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein)을 이용한 양파식물에서의 세포내 위치확인(subcellular localization) 결과를 나타낸 사진이다.

도 8은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종하였을 때 soluble과 microsomal fraction에서의 *CaDC1* 검출을 *CaDC1* 항체를 이용하여 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaDC1* 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 세균생장증대에 대한 검정결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaDC1* 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 고추병 방어(저항성) 관련 *CaDC1* 유전자 발현의 변화 패턴에 대한 결과 및 유전자 침묵을 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

도 11은 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaDC1* 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 병 저항성에 관여하는 활성산소를 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaDC1* 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 병 저항성에 관여하는 전해질 전도도(이온유출)를 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 고추 *CaDC1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaDC1* 유전자의 과다발현에 대한 결과 및 애기장대의 저항성 관련 유전자의 발현에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 *CaDC1*이 과발현된 애기장대에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라

Noco2(*Hyaloperonospora arbidopsidis* Noco 2)를 접종한 후 떡잎의 병징변화와 병징 확대, 과민성세포사멸 및 균사의 생장(트리판블루 염색)의 변화에 관한 도면이다.

도 15는 *CaDC1*이 과발현된 애기장대에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 Noco2(*Hyaloperonospora arbidopsidis* Noco 2)를 접종한 후 병원균 분생자경 형성에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

도 16은 *CaDC1*이 과발현된 애기장대에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 Noco2(*Hyaloperonospora arbidopsidis* Noco 2)를 접종한 후 상이한 포자형성에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] *CaDC1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

[0031] 고추세균성점무늬병에 대한 병생성 관련 단백질(PR protein) 중 하나인 C3H1 형태의 징크핑거 1 (*CaDC1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0032] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0033] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추 식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션 (differential hybridization)을 수행하였다.

[0034] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병 방어(저항성)에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0035] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaDC1* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 고추 징크핑거 1(*CaDC1*) 유전자로 명명하였다. *CaDC1* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 *CaDC1* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 담배식물의 단백질 아미노산 서열과 비교한 결과 82%의 상동성을 나타내었으나 애기장대, 포플러 나무(*Populus trichocarpa*), 포도 (*Vitis vinifera*) 등의 작물에서 C3H1 형태의 징크핑거 1과 30% 이하의 상동성을 나타내어 신규임을 알 수 있었다. 또한 징크핑거 단백질은 포함하고 있는 시스테인 (cystein)과 히스티딘 (histidine)의 개수에 따라서 형태가 나뉘어 지고 있으며, *CaDC1* 단백질은 시스테인3/ 히스티딘1 (C3/H1)형태의 징크핑거 단백질이라는 것을 확인하였다. (도 1 참조)

[실시예 2] 식물 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 *CaDC1* 유전자의 발현 탐색방법

[0037] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaDC1* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[단계 1]

[0039] 먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)중 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/의 농도로 4엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 침투(Infiltration)시켜 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리 하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 RNA를 분리하

고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0040] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaDC1* 유전자를 14-dCTP-비오틴(14-dCTP-biotin)을 이용하여 표지한 후 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 증폭 시킨 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65°C로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 비오틴(biotin)이 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 비오틴(biotin)이 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

[0041] 상기 노던블로팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩 (loading) 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 3에 나타내었으며 실험의 결과 *CaDC1* 유전자는 고추 세균성점무늬병에 대한 고추식물의 저항성 반응은 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 모두 발현이 나타났다. 특히, 친화적 반응에서는 *CaDC1* 유전자의 발현이 1시간부터 점차 증가하기는 하나, 강한 발현을 나타내지는 못하였다. 이에 반하여 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주에서는 접종 후 서서히 발현이 시작되어 5시간에서부터 발현이 강하게 나타나게 되고, 그 이후에도 증가된 발현양이 25시간째까지 유지되었으며 친화적 반응보다 *CaDC1* 유전자 발현이 매우 더 강하였다. 또한 *CaDC1*의 펩타이드를 이용하여 제작된 항체를 통하여 병원균 접종 후의 *CaDC1* 단백질 발현을 관찰한 결과, 병원성 균의 접종에서는 15시간, 25시간에 약한 발현을 보였으나, 비병원성 균의 접종에서는 접종 후 5시간부터 발현이 시작되어 5시간, 15시간에 강한 발현을 유지하였다.

[0042] [실시예 3] *CaDC1*의 DNA와 RNA 결합 활성의 탐색방법

[0043] 대장균에서의 *CaDC1* 유전자를 과발현 시킨 후 발현 산물인 *CaDC1*의 단백질 기능을 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaDC1* 유전자를 pET28a 벡터(참고문헌 : Andon, N. L., Eckert, D., Yates, J. R. and Haynes, P. A. 2003. High-throughput functional affinity purification of mannose binding proteins from *Oryzasativa*. Proteomics 3: 1270-1278)에 도입시켜 재조합백터를 제조하고 도 5에 나타내었다.

[0044] 이렇게 재조합백터를 대장균(*Escherichia coli* strain BL21)에 형질전환시키고 이 재조합백터가 들어가 있는 대장균을 배양하여 얻어진 단백질을 다음 실험에 이용하였다.

[0045] [단계 1]

[0046] 징크핑거 유전자가 DNA와 결합하는 것으로 알려져 있으며, 특히 C3H1 형태의 징크핑거는 RNA와도 결합하는 것으로도 알려져 있어 이를 확인하기 위하여 His-*CaDC1*을 재조합 백터를 통하여 제작하였다. DNA와 RNA의 결합 활성을 실험하기 전에, 이렇게 재조합 백터를 통하여 대장균에서 발현된 His-*CaDC1*이 발현되는 지를 확인하기 위하여, Histidine항체를 이용하여 His-*CaDC1*의 발현이 이루어지고 있음을 확인하였다.

[0047] [단계 2]

[0048] 이렇게 발현이 확인된 단백질을 single stranded DNA와 double stranded DNA를 통하여 DNA 결합 활성을 실험하였고, RNA 결합활성을 위해서는, polyuridylic acid (poly U), polycytidylic acid (poly C), polyguanylic acid (poly G)을 이용하여 binding buffer (150 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7.5), 0.02% nonidet P-40, proteinase inhibitor cocktail) 에서 incubation시켰다. 이렇게 incubation된 단백질은 SDS-폴리아크릴아미드 겔(SDS-polyacrylamide gel) 전기영동법을 이용하여 확인하였다. 이 재조합 단백질을 1xSDS 샘플버퍼(sample buffer)에 녹이고 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔(SDS-polyacrylamide gel)에 전기영동하였다. 단백질의 정확한 크기를 알기 위하여 단백질 마커를 이용하여 검정하였고 그 결과를 도 5에 나타내었다. His-*CaDC1* 단백질은 DNA와 RNA에 강하게 결합하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 아연 (Zn)의 존재가 이들의 결합에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 아연이온으로서 50 μ M의 염화아연 ($ZnCl_2$)을 처리한 후 같은 방법으로 DNA와 RNA의 결합 활성의 변화를 관찰한 결과, 염화아연 ($ZnCl_2$)이 처리된 곳에서 *CaDC1*과 더 강한 결합을 나타내었다.

[0049] [실시예 4] 녹색형광 단백질을 이용한 *CaDC1*의 위치 탐색방법

[0050] *CaDC1* 유전자를 녹색형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)이 표지되어 있는 재조합 백터를 이용하여 식물 내에서 *CaDC1*의 발현위치를 탐색하기 위하여 *CaDC1* 유전자를 326GFP 벡터에 도입시켜 재조합 백터인

smGFP::*CaDC1*을 제조하였다. 또한 *CaDC1* 유전자 중 DC1 도메인만을 도입한 smGFP::DC1 도메인(domain)을 이용하여 입자탄이용 DNA 전이술(particle bombardment)에 의해 양과식물로 도입시켜 *CaDC1*의 위치를 공초점현미경(confocal laser scanning microscope (CLSM))을 이용하여 탐색하였다.

[단계 1]

*CaDC1*이 식물에서 발현되는 위치를 알아보기 위하여 입자탄이용 DNA 전이술을 이용하여 양과식물에 녹색형광 단백질이 표지되어 있는 *CaDC1*을 도입시켜서 공초점현미경을 이용하여 관찰하였다. 도 6은 그 결과를 나타내고 있다. 그 결과 *CaDC1*과 DC1 도메인만을 도입한 양과식물에서는 벡터만을 도입한 대조구와는 달리 핵에서 강하게 형광녹색단백질이 발현되는 결과를 나타내고 있다.

[단계 2]

이러한 양과식물에서의 결과를 바탕으로 병접종 후 고추식물에서의 위치를 알아보기 위하여 병원성 균과 비병원성 균을 고추 식물의 잎에 각각 접종하고 단백질을 추출한 후 펩타이드 합성을 통하여 제작된 *CaDC1* 항체를 이용하여 면역블러팅(immunoblotting)을 수행한 결과, 병원성 균과 비병원성 균을 접종한 식물체 모두에서 microsomal fraction에서 검출되는 것을 확인하였다. 이는 *CaDC1*이 핵에 위치한 단백질이라는 것을 나타내고 있다(도 8 참조).

[실시예 5] *CaDC1* 유전자 발현의 억제에 의한 병 감수성 증가

고추식물에서 *CaDC1* 유전자의 발현이 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaDC1* 유전자를 새롭게 개발된 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaDC1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::*CaDC1*을 제조하였다. 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2::*CaDC1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어있는 GV3101 균주를 고추의 떡잎 생육기에 떡잎에 주사기를 사용하여 인필트레이션(infiltration) 방법을 이용하여 고추식물에 도입함으로써 *CaDC1* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[단계 1]

*CaDC1*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대해 감수성이 증가되는지를 알아보기 위하여, 도 9는 VIGS로 *CaDC1*의 발현이 불활성화된 고추식물에 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 결과를 나타냈다. *CaDC1*의 발현이 억제된 식물체에서 병저항성 검정을 위하여 건전식물과 *CaDC1*의 발현이 억제된 식물체에 고추 세균성 점무늬병균의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주인 Bv5-4a를 접종한 후, 병원성 균주는 접종 후 0일, 1일, 3일, 5일에, 비병원성 균주는 접종 후 0일, 1일, 3일에 잎을 수거하여 식물 잎의 1 cm^2 세균수를 측정하는 후 그 결과를 도 9에 나타내었다.

실험결과 *CaDC1*의 발현이 억제된 식물체에서 건전식물에 비하여 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주인 Bv5-4a 모두에서 감수성이 접종 후에 증대되고 있어 *CaDC1* 유전자가 병저항성에 관여함을 알 수 있었다(도 9 참조).

[단계 2]

*CaDC1*의 발현이 억제된 식물체에서 방어반응과 관련되어져 있는 유전자들의 발현의 변화를 관찰하기 위하여 고추 식물의 방어관련 유전자로 알려져 있는 *CaBPR1*과 *CaDEF1*의 유전자 발현의 양상을 관찰하였다. 병원성 균과 비병원성 균을 접종한 후 각 0, 18, 36시간 후에 관찰하였다. 관찰 결과 두 유전자에서 *CaDC1* 유전자의 발현이 억제된 식물에서 더 감소하는 것이 관찰되었다. (도 10 참조)

[단계 3]

도 9 에서와 같이 *CaDC1*의 발현이 억제된 식물에서는 고추 세균성점무늬병균의 병원성균주 Ds1을 접종한 후 병의 발생이 더 심해져서 병감수성이 증대됨을 알 수 있으며, 이러한 결과의 확인을 위하여 상기의 *CaDC1* 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 건전한 고추 녹광품종에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양하고 접종한 후 각각의 식물에서 12시간과

24시간에 식물을 수거하여 각각 활성산소와 병원균 침입 후 세포사멸 정도를 측정할 수 있는 이온전도도 (ion conductivity)를 측정하였다. 이 관찰의 결과에서 활성산소와 이온전도도는 비병원성 균주를 접종한 후에만 CaDC1의 발현이 억제된 식물에서 줄어드는 것으로 확인되었다.

[실시예 6] *CaDC1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaDC1* 유전자의 과다발현에 의한 병 저항성의 증가

식물체에서 *CaDC1* 유전자의 과다발현 시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaDC1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN35S::*CaDC1*을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaDC1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 형질전환 시켜서 *CaDC1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[단계 1]

CaDC1 유전자가 과다발현된 애기 장대식물체에서 병생성관련 유전자의 변화를 알아보기 위하여 야생형 애기장대 식물과 *CaDC1*이 과발현된 애기장대식물의 잎을 수거하여 *AtPR1*, *AtPDF*, *AtRD29a* 유전자의 발현을 관찰하였다.

세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 먼저 상기 *CaDC1* 유전자가 과다발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaDC1*의 발현을 관찰하였으며 양적 리얼타임피씨알 (quantitative RT-PCR)을 이용하여 결과를 도 13에 나타내었다. 실험결과 애기장대 식물에서 *CaDC1*이 과발현됨을 관찰할 수 있었고, *AtPR1*, *AtPDF*, *AtRD29a* 유전자의 발현에도 영향을 주고 있음을 확인할 수 있었다.

[단계 2]

*CaDC1*이 과발현된 애기장대 식물체에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 *Noco2(Hyaloperonospora arabidopsidis Noco 2)*를 접종한 후 시험을 수행하였다.

*CaDC1*이 과발현된 애기장대식물의 떡잎시기에 하이알로 페르노스포라 *Noco2* 를 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 의 농도로 스프레이를 통하여 뿌려주었다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다. 각각의 식물체에서 하이알로 페르노스포라균에 대한 저항성 여부를 관찰하기 위하여 접종 후 6일 째에 관찰하였고, 5일에 트리판 블루 염색을 수행하였다. 도 14 및 도 16과 같이 *CaDC1*이 과다발현된 식물에서 야생형에 비하여 분생자경(sporangiophores) 및 포자(spore)의 형성이 감소되어 저항성 반응을 관찰 할 수 있으며 트리판 블루 염색을 통하여 야생형에 비하여 균사의 생장이 덜 발달 되고 있음을 알 수 있었다. 각각의 식물체에서 하이알로 페르노스포라균의 저항성 검정을 위하여 하이알로 페르노스포라균의 접종 후 형성되는 분생자경의 수를 센 후 0-5, 6-10, 11-15, 16-20, 20이상으로 그룹을 만든 후 평균값과 전체에 대한 비율(%)로 표시하였다. 도 16과 같이 건전에 비하여 *CaDC1*이 과다발현된 식물에서는 평균값과 비율에서도 야생형에 비하여 저항성을 나타냄을 알 수 있었다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

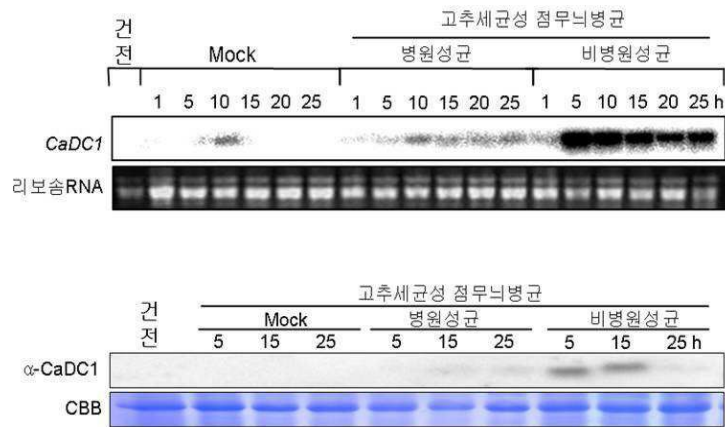
도면1

gtggcggcgctctagaaactagtggatccccgggctgcaggcaagtATGAAGCATTTT	59
M K H F	
AGCCACCCCCATGCCTTGGAACTCTCTGAAGTTCAACAATCAAATGAGACAGTCTGCTCA	119
S H P H A L E L S E V Q Q S N E T V C S	
GGTTGTGAGAAATAAAGTTTGTGGCACTTCTTACAATGCACAAAACCAATTTGTGAATTC	179
G C E N K L C G T S Y K C T K P N C E F	
AGCCTTCAAAATCATGCTTCGAATTACCAAGAAAAATACAACACAATTCCTCATCTTAAG	239
S L H K S C F E L P R K I Q H N S H L K	
CATCCTCTCACTTTGTACCTTACTTTACCCCAAGCAGAGACTCGATGTATTTGGTTGCAAT	299
H P L T L Y P T L P Q R D S M Y F G C N	
GCTTGGTGAAGAACCAAAATGCTTTGTCTACGAATGCCTCGAATGCAACTTTAGTCTC	359
A C G E E P K C F V Y E C L E C N F S L	
CATGCTAAATGTCTACATCTTGGCTGAATATGTGACTCGTGAGGATCATCAACACTCT	419
H A K C A T S W P E Y Y T R E D H Q H S	
CTTGTACTACAATATCAATGGCCATTTCTATTTATGATTACGTGAATATCTTTTGGCAG	479
L V L Q Y Q W P F P I Y D Y V N I F C E	
GTTTGTAAATGGACTTTGCAATGATGCCAATTGGCTTTATTATTTGTGCCAGTGTAATAA	539
V C N G L C N D A N W L Y Y C A Q C K L	
GGCACACCTGCAATGCGCGCAGTATAAAAGGAAGATGGTTCGAGTCTTGAGAATGAA	599
G T H L Q C A T V K K E D G S S F E N E	
GAGGTAGAGATGACTAATGAGCAGAAATTGATGATGGCGACCATAAAGGCACAAGGCCAA	659
E V E M T N E Q K L M M A T I K A Q G Q	
CAGGCAAGGCTTAATTTTCAAGCTCAAATGGCCTATATGAACGCCCAAGCTATAACCAAT	719
Q A R L N F Q A Q M A Y M N A Q A I T N	
ATGTGGCGGAAGCCATCATCATTATGATTAAacgtttccctttttcttttcgaataaaaa	779
M W R S S H H H Y D *	
taaaataactccattatgtttgtaagagtagtgtttgaaggagcttgatgtgcctgtgt	839
attctaccacatactgttatttttatttttttcggttaactgtcttttgtatttcag	899
tcaaacattataaaataaattgtgtatgttccaaaaaataaaaaa	959

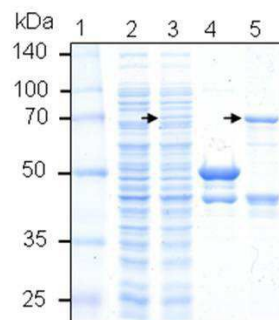
도면2

[illegible]

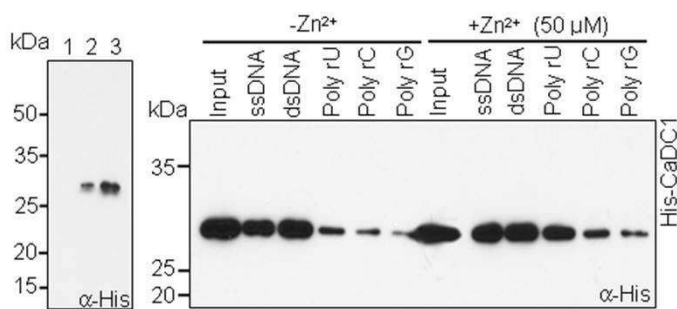
도면3



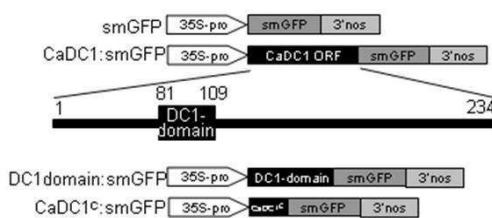
도면4



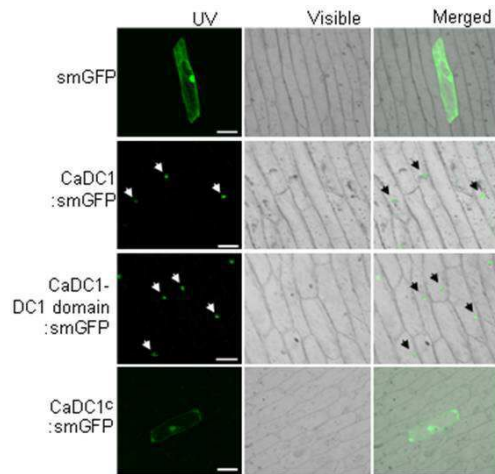
도면5



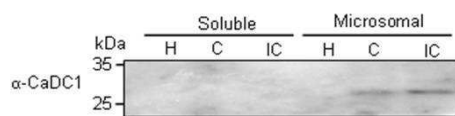
도면6



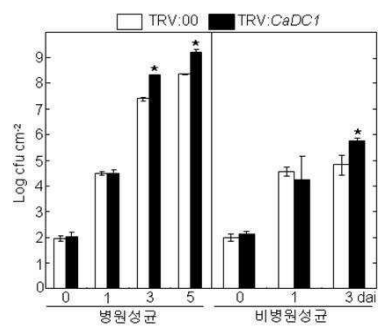
도면7



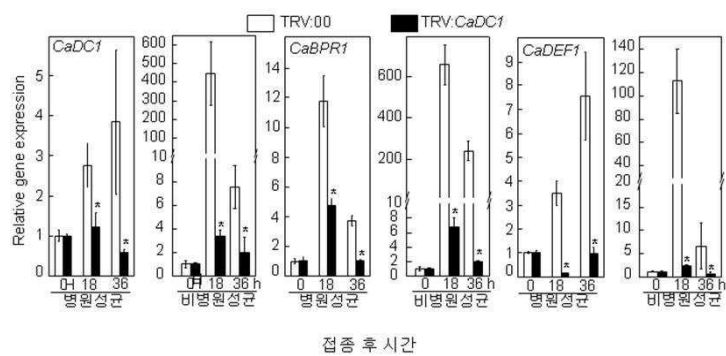
도면8



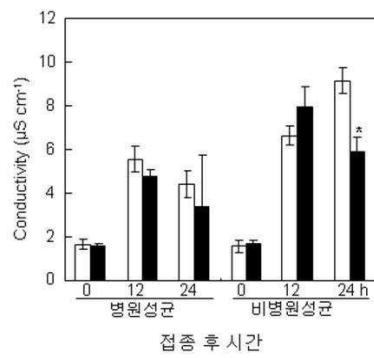
도면9



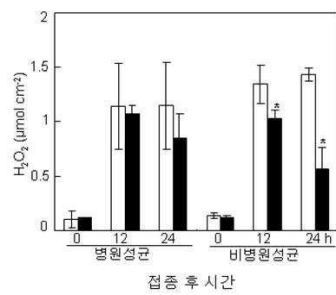
도면10



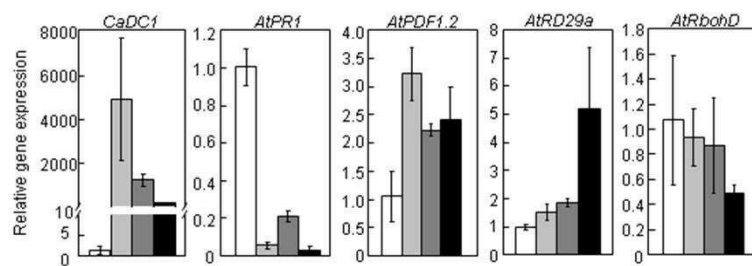
도면11



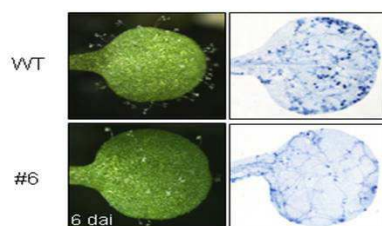
도면12



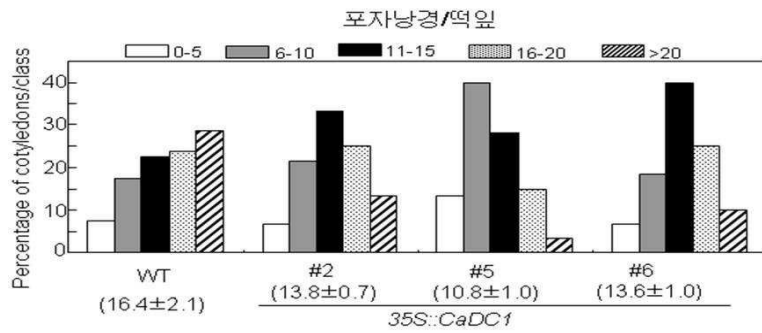
도면13



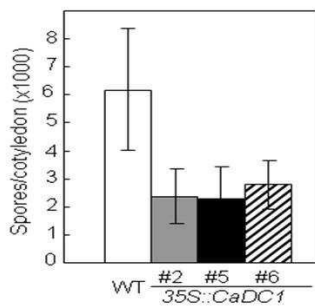
도면14



도면15



도면16



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Pepper DC1 domain-containing CCCH-type zinc finger gene 1 and screening method of plant disease resistance using the same
- <130> P11-101209-01-CaDC1
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 702
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang
- <400> 1

```

atgaagcatt ttagccaccc ccatgccttg gaactctctg aagttcaaca atcaaatgag      60
acagtctgct caggttgtga gaataaactt tgtggcactt cttacaaatg cacaaaaacca      120

aattgtgaat tcagccttca caaatcatgc ttgcaattac caagaaaaat acaacacaat      180
tcccatetta agcatcctct cactttgtac cctactttac cccaacgaga ctcgatgtat      240
tttggttgca atgcttgtgg tgaagaacca aaatgctttg tctacgaatg cctcgaatgc      300
aactttatgc tccatgctaa atgtgctaca tcttggcctg aatatgtgac tcgtgaggat      360
  
```

catcaacact ctcttgtaact acaatatcaa tggccatttc ctatttatga ttacgtgaat 420
atcttttgcg aggtttgttaa tggactttgc aatgatgccca attggcttta ttattgtgcc 480
cagtgtaaat taggcacaca cctgcaatgc gcgacagtta aaaaggaaga tggttcgagc 540

tttgagaatg aagaggtaga gatgactaat gacgagaaat tgatgatggc gaccataaag 600
gcacaagggc aacaggcaag gcttaatttt caagctcaaa tggcctatat gaacgcccac 660
gctataacca atatgtggcg aagccatcat cattatgatt aa 702

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 2

Met Lys His Phe Ser His Pro His Ala Leu Glu Leu Ser Glu Val Gln

1 5 10 15

Gln Ser Asn Glu Thr Val Cys Ser Gly Cys Glu Asn Lys Leu Cys Gly

20 25 30

Thr Ser Tyr Lys Cys Thr Lys Pro Asn Cys Glu Phe Ser Leu His Lys

35 40 45

Ser Cys Phe Glu Leu Pro Arg Lys Ile Gln His Asn Ser His Leu Lys

50 55 60

His Pro Leu Thr Leu Tyr Pro Thr Leu Pro Gln Arg Asp Ser Met Tyr

65 70 75 80

Phe Gly Cys Asn Ala Cys Gly Glu Glu Pro Lys Cys Phe Val Tyr Glu

85 90 95

Cys Leu Glu Cys Asn Phe Ser Leu His Ala Lys Cys Ala Thr Ser Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Val Thr Arg Glu Asp His Gln His Ser Leu Val Leu Gln

115 120 125

Tyr Gln Trp Pro Phe Pro Ile Tyr Asp Tyr Val Asn Ile Phe Cys Glu

130 135 140

Val Cys Asn Gly Leu Cys Asn Asp Ala Asn Trp Leu Tyr Tyr Cys Ala

145 150 155 160

Gln Cys Lys Leu Gly Thr His Leu Gln Cys Ala Thr Val Lys Lys Glu

165								170					175				
Asp	Gly	Ser	Ser	Phe	Glu	Asn	Glu	Glu	Val	Glu	Met	Thr	Asn	Glu	Gln		
180								185					190				
Lys	Leu	Met	Met	Ala	Thr	Ile	Lys	Ala	Gln	Gly	Gln	Gln	Ala	Arg	Leu		
195						200					205						
Asn	Phe	Gln	Ala	Gln	Met	Ala	Tyr	Met	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Thr	Asn		
210				215					220								
Met	Trp	Arg	Ser	His	His	His	Tyr	Asp	Ser								
225				230													