



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0036711
(43) 공개일자 2012년04월18일

(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 10-2010-0098532

(22) 출원일자 2010년10월09일

심사청구일자 2010년10월09일

(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 병원균에 대한 저항성반응에 관여하는 고추의 사이토크롬 P 4 5 0 유전자 (C a C Y P 4 5 0 A) 및 이를 이용한 형질전환 병저항성 식물체

(57) 요약

본 발명은 고추식물의 방어 관련, 사이토크롬 p450 유전자 (Pepper cytochrome P450 gene, *CaCYP450A*) 및 이를 이용한 병 저항성에 기여하는 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물체의 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 병원균의 공격에 대한 식물체의 방어반응 및 병저항성 식물체의 효율적이고 효과적인 분자적 육종을 위한 유전체료로서 제공되어 질 수 있으며, 식물병 저항성에 대한 탐색이 가능할 수 있다.

대표도 - 도1

[illegible]

특허청구의 범위

청구항 1

식물병 저항성 관련 유전자로서 사이토크롬 P450A를 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*CaCYP450A*):

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

(b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(*CaCYP450A*).

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(*CaCYP450A*)의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물체는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균을 접종한 식물체인 것을 특징으로 하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 7

제1항 기재의 *CaCYP450A* 유전자를 바이러스-유도 유전자 침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2:: *CaCYP450A*.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 고추의 사이토크롬 P450 유전자 (Pepper cytochrome P450 gene *CaCYP450A*, *CaCYP450A*), 이를 이용한 병저항성 형질전환 식물체 및 그 개발방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 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 *CaCYP450A* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 생물적유도 처리 시 저항성 관련 유전자 *CaCYP450A*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 *CaCYP450A* 유전의 발현을 불능화(knock down)시켜 병저항성에 대한 사이토크롬 P450A 유전자의 기능을 확인하고, 그리고 상기 *CaCYP450A* 유전자를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 형질전환을 통해 도입, 과발현(overexpression)시켜 *CaCYP450A* 유전자의 식물체 병저항성 증대효과를 확인하여, 이를 통한 식물병 저항성 형질전환 식물체를 제조하는 것에 관한 것이다. 이와 더불어 *CaCYP450A* 유전자의 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 오솔로그(ortholog)인 At3g48520 유전자의 발현이 불능화된 식물(knock out)을 이용하여 식물에서의 *CaCYP450A* 유전자의 기능을 탐색한 것에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식물은 각종 병원균의 침입과 외부의 자극에 대하여 스스로를 보호하도록 진화해왔다. 그러나 이러한 보호 장벽이 허물어지고, 식물이 외부의 자극이나 공격으로부터 위협받게 되면, 생산 및 품질의 저하를 가져와 경제적으로 큰 피해를 일으키게 되는데, 이러한 병에 의한 작물생산 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] 병에 감염된 기주 식물은 여러 가지 세포내 대사 경로에서 방어기작을 작동시키게 되며, 기주식물과 식물병원균 간의 상호작용에서 병원균 감염초기에 친화적, 불친화적 반응으로 나뉘어 결정이 된다. 이러한 상호작용에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는 저항성(방어)반응의 여부가 결정되게 된다.
- [0004] 불친화적 상호작용에서, 감염된 식물은 병원균의 침입을 인식(recognition)하고, 인식에 대한 반응으로 감염된 부위의 국부적 세포죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive response), 캘러스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin)과 같은 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리는 방어관련 단백질을 생성하여 저항성 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 이러한 식물들의 방어기작들은 병원균의 침입에서 뿐만 아니라, 살리실산, 메틸자스모네이트 등의 식물호르몬 자극에 의해서도 나타날 수 있으며, 물리적인 상처, 염도, 온도 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타나는 것으로 보고되고 있다. 이러한 방어 반응들은 감염되어진 부위로부터 병원균의 이동이나 성장을 제한함으로써 저항성을 일으키게 된다.
- [0006] 이러한 생물학적/물리적/환경적 스트레스에 대한 식물의 방어 반응 중에서 특히 식물이 병원체에 대하여 방어반응을 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.
- [0007] 병 방어(저항성) 유전자의 기능에 대한 생물학/생화학/세포생물학적인 연구는 식물의 생리 및 저항성에 관련된 기작을 연구하는데 높은 가치를 가지게 되는 것은 물론, 작물의 분자유종을 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 계능 단위로 가능하던 육종기술을 유전자 수준에서 가능하도록 하여 보다 효과적인 육종 효과를 보이며 현재의 육종의 기술을 극대화시킬 수 있다는 장점이 있다.
- [0008] 한편, 사이토크롬 P450은 많은 식물들이 함유하고 있으며 heme를 가지고 있는 효소로서 식물뿐만 아니라, 세균, 곰팡이를 비롯하여 포유동물에서도 발견되어졌다. 특히 사이토크롬 P450은 몇몇 식물에서 전체 게놈(genome)의 약 1%를 차지할 정도로 많은 종류가 보고되어져 있고, 이들은 식물에서 식물 호르몬의 생합성 반응에 참여하거나, 신호전달 분자나 방어반응의 요소로서 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 식물의 생장조절자로서 알려진 auxins, gibberellins, jasmonic acid, brassinosteroids 뿐만 아니라 phenylpropanoids, alkaloids, terpenoids, lipids, cyanogenic glycosides, glucosinolates과 같은 식물 천연물질의 생합성 경로에 참여하고 있는 것으로 보인다. 또한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서만 246개의 사이토크롬 P450 유전자와 26개의 슈도(Pseudo) 사이토크롬 P450 유전자가 보고될 정도로 식물의 많은 반응에서 기여하고 있다. 특히 사이토크롬 P450 유전자는 곰팡이나, 세균, 곤충이나 포유동물의 공격과 같은 외부 자극에 대하여 발현이 증가하게 되고 이는 식물의 방어반응 관련 물질들의 합성을 이끌게 된다. 이러한 발견은 사이토크롬 P450A의 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.
- [0009] 또한 우리나라 식생활에서 가장 많이 이용되어지는 채소류 중에 하나인 가지과에 속한 고추식물은 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 재배되고 있는 작물로 양념류, 김치류, 고추장 등의 가공식품의 재료로서 널리 사용되어지고 있으며 단일 품목으로서의 가장 많은 재배량을 보이는 대표적인 경제작물이다. 이러한 고추작물은 연간 소비량으로서도 약 20만 톤의 규모이고 1조원에 이르는 시장을 형성하고 있다. 이에 농가에서도 높은 의존도를 보

이고 있어, 효율적인 재배와 병충해에 강한 고추식물을 위한 연구와 투자가 요구되어진다.

- [0010] 특히 고추에 문제가 되고 있는 세균병, 진균병, 바이러스병에 대한 피해가 보고되어져 있으며, 난균류에 의한 역병과 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균성점무늬병에 대한 피해가 가장 심각하게 보고되고 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 국가로서 분자유전학적 육종기술을 작물의 육종에 도입하여 기존의 육종기술과 접목한다면 보다 좋은 고추 품종의 육종이 가능한 기반이 되어져 있다. 이러한 기술을 기반으로 한 병충해 및 외부의 자극으로부터 강한 우량 품종의 육종은 농가에게 더 나은 재배 환경을 제공하는 것이 가능하고, 국내 종자시장에서 국내 유전자원을 보호하는 것은 물론 부가가치가 높은 유전자원의 개발로 이어질 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 저항성반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 고추 사이토크롬 P450를 코딩하는 *CaCYP450A* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0012] 또한 본 발명의 목적은 상기 *CaCYP450A* 유전자를 이용하여 식물병 또는 화학물질에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0013] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaCYP450A* 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 집종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 분리한 신규 방어 관련 유전자 *CaCYP450A*를 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 생물적/화학적 처리를 통하여 *CaCYP450A*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaCYP450A* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.
- [0016] 따라서 본 발명은 식물병 방어 관련 유전자로서 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 고추 유래 사이토크롬 P450A 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*CaCYP450A*)를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 사이토크롬 P450A 단백질(*CaCYP450A*)을 제공한다.
- [0018] 또한 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::*CaCYP450A* 또는 TRV2::*CaCYP450A*이다.
- [0019] 나아가, 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; Negutiu 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 감

염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0020] 나아가 본 발명은 식물체로부터 mRNA 분리하여 *CaCYP450A* 유전자의 차별적 발현(differential expression)을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.

[0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0022] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 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 획득하고, 이 클론 중 사이토크롬 P450A (*CaCYP450A*) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, *CaCYP450A*로 명명된 고추 녹광 품종의 *CaCYP450A* 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0023] 본 발명에 의한 상기 획득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaCYP450A* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 사이토크롬 P450A 1(*CaCYP450A*) 유전자로 명명하였다. *CaCYP450A* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 애기장대의 단백질 아미노산 서열과 76%의 상동성을 나타내었고, 벼(*Oryza sativa*), 담배(*Nicotiana tabacum*) 등의 작물의 사이토크롬 P450A와 65%의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다. 또한 *CaCYP450A* 단백질은 heme-binding motif인 PXFXXGXRCXG가 C-terminal 부위에 위치해 있다(도 1 및 도 2 참조).

[0024] 확인된 *CaCYP450A* 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

[0025] 본 발명은 이러한 유전자의 아미노산 염기서열을 기초로 하여 지금까지 연구되어 오거나 기능이 밝혀진 다른 작물들의 사이토크롬 P450의 아미노산을 계통수(phylogenetic tree)를 이용하여 비교하였고, 그 결과 본 발명에 의한 *CaCYP450A* 단백질은 기존에 연구되어진 고추식물의 사이토크롬 P450과는 유사성을 가지지 않은 새로운 고추 사이토크롬 P450A 임이 확인되었다(도 3 참조).

[0026] 다음에, 본 발명은 생물적/화학적 처리를 한 식물체로부터 mRNA 분리하여 *CaCYP450A* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 *CaCYP450A* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaCYP450A* 유전자가 식물병원균에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 4 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaCYP450A* 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기의 *CaCYP450A* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaCYP450A* 유전자가 억제된 식물체의 제작, *CaCYP450A* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.

[0028] 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 *CaCYP450A* 유전자를 TRV2 벡터(참고 문헌: 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::*CaCYP450A*를 제공한다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaCYP450A*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 병감수성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다(도 5 ~ 도 7 참조).

[0029] 나아가 본 발명에 의한 *CaCYP450A* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*CaCYP450A*)를 식물체에 도입하여 본 발명에 의한 *CaCYP450A*이 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제조하여 식물병 저항성의 증대를 확인할 수 있었다(도 8 ~ 도 11 참조). 또한 *CaCYP450A* 유전자의 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 오솔로그(ortholog)인 At3g48520 유전자의 발현이 불능화된 식물(knock out)을 이용하여 식물에서의 *CaCYP450A* 유전자가 저항성에 기여

하고 있음을 확인할 수 있었다 (도 12 ~ 도 16 참조).

[0030]

본 발명에 의한 고추 사이토크롬 P450A 의 기능을 불능화 시킨 고추 식물 및 사이토크롬 P450A 을 과발현 시킨 애기장대 식물을 통하여 식물병원균에 대한 저항성 검정평가를 수행하여 병 저항성 발생여부를 알아 볼 수 있게 되었다. 이러한 본 발명으로 사이토크롬 P450A의 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 생명공학적 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0031]

상술한 바와 같이, 본 발명은 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병에 대한 방어반응에 관여하는 식물병 방어 관련 유전자인 신규 고추의 사이토크롬 P450A 단백질을 코딩하는 *CaCYP450A* 유전자를 분리하여 해독함으로써 이에 대한 서열 정보 및 이에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 더불어 고추 식물의 *CaCYP450A* 유전자가 기여하고 있음을 밝힘으로서, 이러한 정보를 바탕으로 식물체의 저항성 탐색의 방법의 제공이 가능하다. 또한 본 발명인 완성됨으로써 이러한 유전자의 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

[0032]

도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 사이토크롬 P450A (*CaCYP450A*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 고추 사이토크롬 P450A (*CaCYP450A*)의 아미노산 서열을 애기장대, 벼, 담배 등의 식물 아미노산 서열과 비교한 alignment 도면이다.

도 3은 고추 사이토크롬 P450A (*CaCYP450A*)의 아미노산 서열을 식물에서 활발히 연구가 이루어지거나, 저항성에 관여하거나 고추식물에서 연구되어진 사이토크롬 P450과 비교하여 계통수 (系統樹, phylogenetic tree)를 작성한 도면이다.

도 4는 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 *CaCYP450A* 유전자 발현 유도 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaCYP450A* 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 *CaCYP450A* 유전자 발현의 변화 패턴에 대한 결과 및 유전자 침묵이 확인된 것을 나타내었고, 세균생장증대에 대한 검정결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaCYP450A* 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 감수성이 증대되어 감수성 병징 확대, 활성산소 감소(DAB 염색), 과민성세포사멸(트리판블루 염색) 감소에 대한 결과를 나타낸 사진이다.

도 7은 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용하여 *CaCYP450A* 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 활성산소 및 전해질 전도도(이온유출)를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 고추 *CaCYP450A* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaCYP450A* 유전자의 과다발현에 대한 결과 및 애기장대의 저항성 관련 유전자의 발현에 대한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 고추 *CaCYP450A* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바

토마토 DC3000 (에이브이알알피엠티원)을 접종하였을 때, 세균생장 감소로 병저항성 발현결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 고추 *CaCYP450A* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠티원)을 접종하였을 때, 이 병에 대해 저항성을 보이고 있는 애기장대 잎과 식물세포에서 활성 산소(DAB 염색) 및 과민성 세포사멸(트리판 블루 염색)의 증가에 대한 결과를 나타낸 사진이다.

도 11은 고추 *CaCYP450A* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠티원)을 접종하였을 때 이 병에 대해 저항성을 보이고 있는 애기장대 잎과 식물세포에서 병 저항성에 관여하는 활성산소 및 전해질 전도도(이온유출)를 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 *CaCYP450A* orthologs인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물(*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 계통)에서 T-DNA 삽입 위치와 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)을 접종한 후 이 유전자의 무발현 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 *CaCYP450A* orthologs인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물(*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 계통)에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠티원)을 접종하였을 때 이 병에 대한 반응을 보이는 애기장대 잎의 사진을 나타낸다.

도 14는 *CaCYP450A* orthologs인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물(*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 계통)에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠티원)을 접종하였을 때 세균생장의 변화를 나타낸 도면이다.

도 15는 *CaCYP450A*이 과발현된 식물체와 애기장대에서 *CaCYP450A* orthologs인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물(*cyp94B3* 계통)에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스 포라 Noco2(*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco 2)를 접종한 후 떡잎의 병징변화와 병징 확대, 활성산소감소(DAB 염색), 과민성세포사멸 및 균사의 생장(트리판블루 염색)의 변화에 관한 도면이다.

도 16은 *CaCYP450A*이 과발현된 식물체와 애기장대에서 *CaCYP450A* orthologs인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물(*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 계통)에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 Noco2(*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco 2)를 접종한 후 상이한 병원균 분생자경 형성에 대한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 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.

[0034] [실시예 1] *CaCYP450A* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

[0035] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병생성 관련 단백질(PR protein) 중 하나인 사이토크롬 P450A (*CaCYP450A*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0036] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병만인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0037] 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 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브

를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션 (differential hybridization)을 수행하였다.

[0038] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병 방어(저항성)에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 획득하였다.

[0039] 획득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaCYP450A 단백질 코딩 유전자를 확인하고 사이토크롬 P450A 1(CaCYP450A) 유전자로 명명하였다. CaCYP450A 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 애기장대의 단백질 아미노산 서열과 76%의 상동성을 나타내었고, 벼(*oryza sativa*), 담배(*Nicotiana tabacum*)등의 작물의 사이토크롬 P450A와 65%의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다. 또한 CaCYP450A 단백질은 heme-binding motif인 PXFXXGXRXCXG가 C-terminal 부위에 위치해 있다. 확인된 CaCYP450A의 유전자 염기서열(서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.

[0040] [실시예 2] 식물 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 CaCYP450A 유전자의 발현 탐색방법

[0041] 상기 실시예 1에서 획득한 CaCYP450A 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0042] [단계 1]

[0043] 먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)중 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/ml의 농도로 4엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 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 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0044] 다음으로 실시예 1에서 획득한 CaCYP450A 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℃로 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.

[0045] 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩 (loading) 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 4에 나타내었으며 실험의 결과 CaCYP450A 유전자는 고추 세균성점무늬병에 대한 고추식물의 저항성 반응으로 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 모두 발현이 나타났다. 보다 구체적으로 병원성 균주 즉, 친화적 반응에서는 CaCYP450A 유전자의 발현이 5시간 이후에 발현이 증가하여 20시간에 최고의 발현양을 나타낸 후 25시간까지 발현이 관찰되었다. 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주에서는 접종 후 서서히 발현이 시작되어 5시간에서부터 발현이 강하게 나타나게 되고, 10시간 이후부터는 강한 발현을 보인다. 그 이후에도 증가된 발현양이 25시간째까지 유지되었으며 친화적 반응보다 CaCYP450A 유전자 발현이 매우 더 강하였다.

[0046] [실시예 3] CaCYP450A 유전자 발현 억제에 의한 병 감수성 증가

[0047] 고추식물에서 CaCYP450A 유전자의 발현이 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 획득한 CaCYP450A 유전자를 새롭게 개발된 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 CaCYP450A 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::CaCYP450A를 제조하였다. 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2::CaCYP450A를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합 벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추의 떡잎 생육기에 떡잎에 주사기를 사용하여 인필트레이션

(infiltration) 방법을 이용하여 고추식물에 도입함으로써 *CaCYP450A* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[단계 1]

*CaCYP450A*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대해 감수성이 증가되는지를 알아보기 위하여, 상기의 *CaCYP450A* 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 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통하여 관찰하였다.

도 5는 VIGS로 *CaCYP450A*의 발현이 불활성화된 고추식물에 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 결과를 나타냈다.

[단계 2]

*CaCYP450A*의 발현이 억제된 식물체에서 감수성 반응의 결과를 알아보기 위하여, 트리판블루 염색(trypan blue staining) 및 덤 염색(DAB staining)을 수행하였다. 도 6에서와 같이 *CaCYP450A*의 발현이 억제된 식물에서는 고추 세균성 점무늬병의 병원성균주 Ds1을 접종한 후 병의 발생이 더 심해져서 병감수성이 증대됨을 알 수 있으며, 비병원성 균주인 Bv5-4a를 접종한 후에는 건전식물에 비하여 트리판블루 염색 결과 과민성 세포사멸은 큰 차이를 보이지 않았으나, 덤 염색결과 활성산소가 감소되는 것이 관찰되었다. 또한 이러한 결과의 확인을 위하여 상기의 *CaCYP450A* 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 결과 또한 트리판블루 염색과 덤 염색결과와 같이 활성산소의 측정에서 차이를 나타내었다(도 7 참조).

[단계 3]

*CaCYP450A*의 발현이 억제된 식물체에서 병저항성 검정을 위하여 건전식물과 *CaCYP450A*의 발현이 억제된 식물체에 고추 세균성 점무늬병의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주인 Bv5-4a를 접종한 후, 0일, 2일, 4일에 잎을 수거하여 식물 잎의 1 cm² 세균수를 측정한 후 그 결과를 도 5에 나타내었다.

실험결과 *CaCYP450A*의 발현이 억제된 식물체에서 건전식물에 비하여 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주인 Bv5-4a 모두에서 감수성이 접종 후 4일에서 증대되고 있어 *CaCYP450A* 유전자가 병저항성에 관여함을 알 수 있었다(도 5 참조).

[실시에 4] *CaCYP450A* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaCYP450A* 유전자의 과다발현에 의한 병 저항성의 증가

식물체에서 *CaCYP450A* 유전자의 과다발현 시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaCYP450A* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN35S::*CaCYP450A*를 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaCYP450A*를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* 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 *CaCYP450A* 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[단계 1]

CaCYP450A 유전자가 과다발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 먼저 상기 *CaCYP450A* 유전자가 과다발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaCYP450A*의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 8에 나타내었다.

도 8에서 #1, #3, #4는 사용된 형질전환 식물의 계통번호를 나타내고 *CaCYP450A* 유전자의 발현을 양적 리얼타임 피씨알(quantitative RT-PCR)을 이용하여 관찰하였다. 실험결과 애기장대 식물에서 *CaCYP450A*이 과발현됨을 관찰할 수 있었다. 또한 애기장대 식물에서 대표적으로 알려진 방어관련 유전자인 *PR1* 및 *PDF 1.2* (Thomma et al., 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. PNAS 25:15107-15111.)의 발현

을 관찰한 결과 *CaCYP450A*의 과발현이 *PRI*의 발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

[단계 2]

상기와 같이 *CaCYP450A*이 과다발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를 10^5 cfu/ml 농도로 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다(도 9). 또한 *CaCYP450A* 유전자가 과다발현된 식물체에서 저항성 반응이 나타나는 이유를 알아보기 위해 트리판블루 염색(trypan blue staining) 및 뎀 염색(DAB staining)을 수행하였다. 그 결과 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이 *CaCYP450A*이 과다발현된 식물체에서 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 저항성 증가를 나타내고 있음이 관찰되었고, 특히 도 10에서는 트리판 블루 염색결과와 뎀염색 결과를 통하여 *CaCYP450A* 유전자가 과다발현된 식물에서 저항성 식물에서 관찰되는 세포사멸반응과 퍼옥시데이즈 활성에 의한 활성 산소가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 이러한 결과의 확인을 위하여 *CaCYP450A*이 과다발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를 10^5 cfu/ml 농도로 접종하고 각각의 식물에서 18시간과 36시간에 식물을 수거하여 각각 활성산소와 병원균 침입 후 세포사멸 정도를 측정할 수 있는 이온전도도 (ion conductivity)를 측정하였다. 이 결과 또한 트리판블루 염색과 뎀 염색결과와 같이 활성산소와 이온전도도에서 *CaCYP450A*이 과다발현된 식물이 더 높은 수준을 나타내었다.

[단계 3]

*CaCYP450A*이 과다발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원) 균주를 접종하고 식물체의 저항성의 검정을 수행하였다. 접종 후 0일과 3일에 잎을 수거하여 식물잎의 1 cm^2 세균수를 측정한 후 그 결과를 도 9에 나타내었다.

도 9에서와 같이 병원성 균주와 비병원성 균주 모두에서 *CaCYP450A* 유전자가 과다발현된 식물에서 야생형 식물과 비교해서 병원세균의 생장이 유의성 있게 감소하여 병 저항성을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.

[실시예 5] 슈도모나스 시링게 패소바 토마토를 접종한 후에 *CaCYP450A* 오솔로그(orthologs)인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 불능화된 식물에서 병 저항성의 변화

*CaCYP450A*이 과다발현된 애기장대 식물체와 *CaCYP450A* 오솔로그(orthologs)인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 식물(*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 계통)인 애기장대에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원) 균주를 접종하고 식물체의 저항성의 검정을 수행하였다.

[단계 1]

애기장대에서 *CaCYP450A* orthologs인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물체가 At3g 48520 유전자에 T-DNA가 삽입되어져 있는 위치를 확인하였고 이에 대한 위치를 도 12에 나타내었고 T-DNA의 삽입의 위치에 따라 애기장대 계통(line)을 각각 *cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 로 명명하였다.

*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 식물에서 At3g 48520이 발현되지 않는 것을 확인하기 위하여 돌연변이 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를 접종한 후 At3g 48520 유전자의 발현을 관찰하였다. 도 12에서와 같이 실험결과 돌연변이 식물에서 야생식물에서와 달리 At3g 48520의 발현이 나타나지 않음을 관찰 할 수 있었다.

[단계 2]

각각의 식물체에서 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)에 대한 저항성의 여부를 관찰하기 위하여 접종 후 병반을 관찰하였다. 도 13과 같이 돌연변이 식물체에서 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000접종 후에 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 감수성을 나타내고 있음이 관찰되었다.

[단계 3]

접종 후 0일과 3일에 잎을 수거하여 식물잎의 1 cm^2 세균수를 측정한 후 그 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14에

서와 같이 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000접종 후에 *cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 식물에서 야생형에 비하여 병에 대한 감수성을 나타내었다. 그러나 비병원성 균주인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)에 대하여는 큰 변화를 보이지 않았음이 관찰되었다.

[0075] [실시예 6] 하이알로페르노스포라 Noco2의 접종 후에 *CaCYP450A* 유전자의 과다발현된 식물 및 불능화된 *cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 돌연변이 식물에서 병 저항성의 변화

[0076] *CaCYP450A*이 과발현된 애기장대 식물체와 *CaCYP450A* 오솔로그(orthologs)인 애기장대 At3g 48520 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 식물(*cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 계통)인 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로 페르노스포라 Noco2 (*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco 2)를 접종한 후 시험을 수행하였다.

[0077] *CaCYP450A*이 과발현된 애기장대 식물체와 *cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 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.

[0078] [단계 1]

[0079] 각각의 식물체에서 하이알로 페르노스포라균에 대한 저항성 여부를 관찰하기 위하여 접종 후 7일 째에 관찰하였고, 6일에 트리판 블루 염색 및 댁 염색을 수행하였다. 도 16과 같이 *CaCYP450A*가 과다발현된 식물에서 야생형에 비하여 분생자경(sporangiophores)의 형성이 감소되어 저항성 반응을 관찰 할 수 있으며 이에 반하여 *cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 애기장대식물에서 분생자경의 형성에 큰 변화가 없음이 관찰되었다. 또한 *CaCYP450A*이 과다발현된 식물에서 댁 염색을 통한 활성산소가 관찰되었으며 트리판 블루 염색을 통하여 야생형에 비하여 균사의 생장이 덜 발달 되고 있음을 알 수 있었다.

[0080] [단계 2]

[0081] 각각의 식물체에서 하이알로 페르노스포라균의 저항성 검정을 위하여 하이알로 페르노스포라균의 접종 후 형성되는 분생자경의 수를 센 후 0-5, 6-10, 11-15, 15이상으로 그룹을 만든 후 평균값과 전체에 대한 비율(%)로 표시하였다. 도 16과 같이 건전에 비하여 *CaCYP450A*가 과다발현된 식물에서는 평균값과 비율에서도 야생형에 비하여 저항성을 나타냄을 알 수 있었고 *cyp94B3 1-1*과 *cyp94B3 1-2* 애기장대식물에서는 평균값과 비율에서 야생형에 비하여 큰 차이를 보이지는 않았다.

[0082] 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

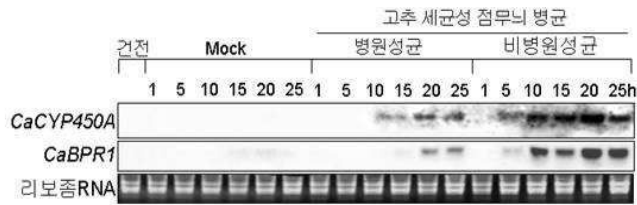
도면1

```

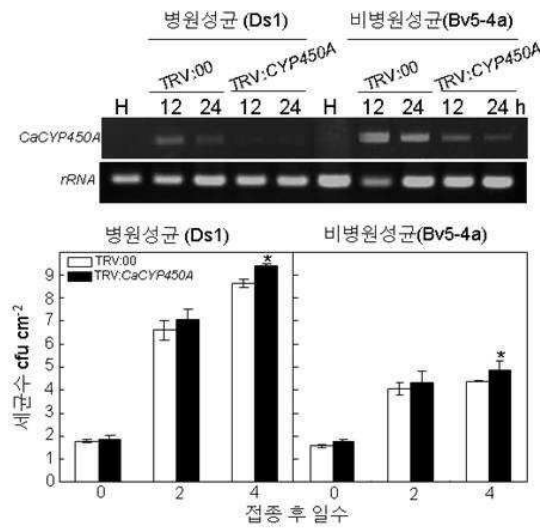
gggggcccgtctaga
actagtggatccccgggctgcaggaattcggcagcaggttaacattcactttgtcaatt
ATGAAAATGTTCTTTCTCTCTTTCTTTCTTCATTTTAGGGTTTCTTTACTTGTCCCTA 60
M K M F L S L F L F F I L G F L Y L S L 20
AAACTGCATCTTCATTTGCGAAAATCACTCCCATTTATGGCOCTTCCCTTTACCCCATC 120
K L H L Q F R K F T P I Y G P S S Y P I 40
GTTGGCTGTCTAATTTCCCTCTACAAAATGCGCATCGGCTATTGGATTGGTACACTCAA 180
V G C L I S F Y K N R H R L L D W Y T Q 60
CTTTTATCGGAGTCCCCACACAGACCATTTCTGTTCAACGCTTCGGTGGCCCTCGAACT 240
L L S E S P T Q T I L V Q R F G A P R T 80
ATAATCACAGCCAATCCGAACAAGCTTGAACACATGCTCAAAACGAACCTTCACTAATTAT 300
I I T A N P N N V E H M L K T N F T N Y 100
CCAAAAGGCCAGCCCTTTACGGAGATTTAGGCGATTTTCTCGGTGCTGGGATCTTCAAC 360
P K G Q P F T E I L G D F L G R G I F N 120
GTGGACGGGGAGCAGTGGAGCGCGCAGCGCAAAATTGGCTAGCCACGAGTTCACTACAAAG 420
V D G E Q W S A Q R K L A S H E F S T K 140
TCACTGAGGGAGTTTGTGGTCAAACTCTAGAAGAAGTAGTCGATACCAGGCTCATCTCT 480
S L R E F V V K T L E E V V D T R L I P 160
TTGTTGAACCATGCTGCTAAATCTGGCAAAAGTTGGACTTGCAAGACGCTCTAGGCGA 540
L L N H A A K S G K V L D L Q D V L R R 180
TTGCGCTTCGATCTATATGCAAGGTGTCCTGGGTACAGACCCGCAATGCTTGGATGAT 600
F A F D T I C K V S L G T D P H C L D D 200
CTCTCAGACGTGCGAGTCTAGTAGATTGCTTTGACACTGCTTCTCAAGCGGGTGGCATG 660
L S D V P S L V D S F D T A S Q A G A M 220
CGTGGGAGGGCTCCAGTCTACGCGATTTGGAAGGGCAAGAGAGCGCTCAATTTAAGATCA 720
R G M A P V Y A I W K G K R A L N L R S 240
GAGAAGAGCTGAAAGAGACGTGAAACGCGTTCACTGTTGCATTAAACGACATCATAGAG 780
E K K L K E N V K R V H C C I N D I I E 260
AAGAAGAACACAGCATCAACGAAATGGAACAAACAGTAAGAACATGGATCTTCTCTCC 840
K K K Q T I N E N G K N S K N M D L L S 280
AGATTATTAATCGCTGGACACGAAGATGAAGTGGTGAGAGATATGGTCATAGCTTCCTC 900
R L L I A G H E D E V V R D M V I S F L 300
ATGCGCGAAGAGACACAACCTCTTCCGCATTACATGGCTTTTGGCTCACTACCAAT 960
M A G R D T T S S A L T W L F W L T T N 320
CACCCGGATGTCAAAATGAATGATCAACGAATAACGTCGATCAACATTTGGCGACAAG 1020
H P D V K N E M I N E I T S I N I G D K 340
GCGCTCGAATTCGACGAATCAAAAGAGATGAAGTACTTGAAGCGTGCTTGAACGAATCA 1080
A L E F D E S K E M K Y L Q A C L N E S 360
ATGAGGCTATATCAACAGTGGCTTGGGACTCAAGCACGCGACACAGACGACATTTTG 1140
M R L Y P P V A W D S K H A A T D D I L 380
CCAGACGGAACAAGGGTTCAAAAGGAATAGAGTTACTTATTTCCAGTACGGAATGGGA 1200
P D G T R V Q K G N R V T Y F Q Y G M G 400
CGGATGGAGGAGATTTGGGGTAAAGACCGGCTCGAATTTAAACCGGACGCTGGATCGAT 1260
R M E E I W G K D R L E F K P D R W I D 420
GAAAATGGATTATTGAAAAGTGTAGTGCTTATRAATTTCCAGTGTTCACGACGGTCCA 1320
E N G L L K S V S A Y K F P V F Q A G P 440
AGGGTGTGTTTGGGTAAAGAAATGGCATTCATGCAGATGAAGTATGTGTTGGCATCAGTA 1380
R V C L G K E M A F M Q M K Y V L A S V 460
TTGAGGCGGTTTCAAAATTAACCGGTGAAAGTAGAAAAACCGGTTTTTATGCOCTCTCTTA 1440
L R R F E I K P V K V E K P V F M P L L 480
ACTGCACATATGCTGCTGATTCATGTGCGAATCTGTACCGCGATAGCTAGctatctat 494
T A H M A G G F N V R I C H R D S * 498
gctattgggtgaaataaaaaatattagtaaatatttggctgattaattagcatttgctgcttg
ttatatatttttgcgaatgcaatatctaatgttcagtgatatgaatatatggcttggaagtt
tgcttctgattaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

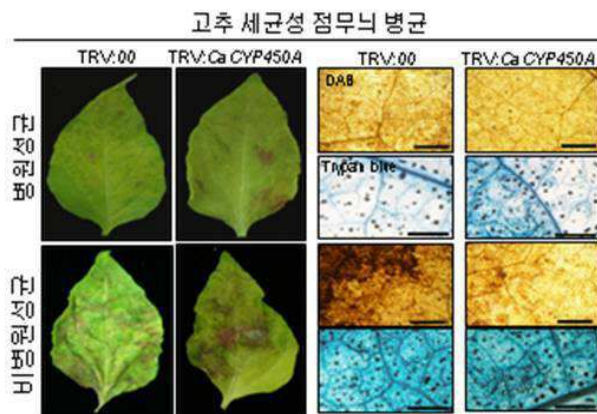

도면4



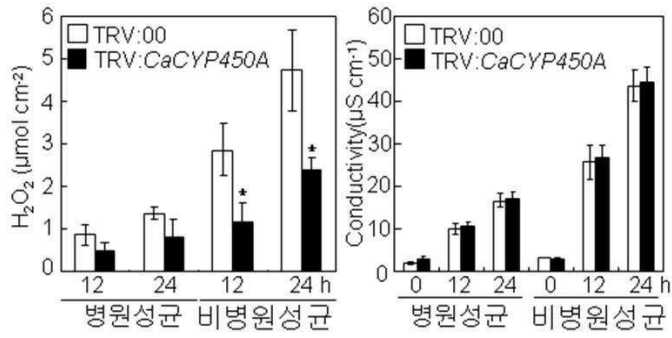
도면5



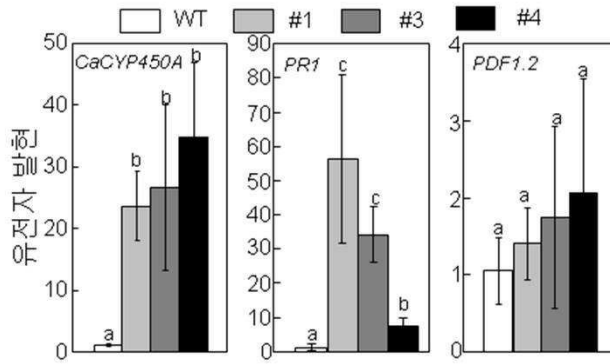
도면6



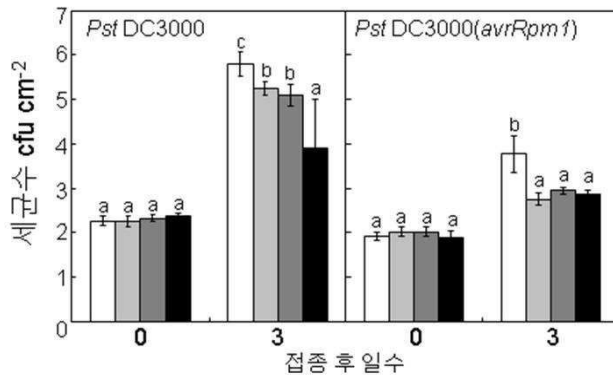
도면7



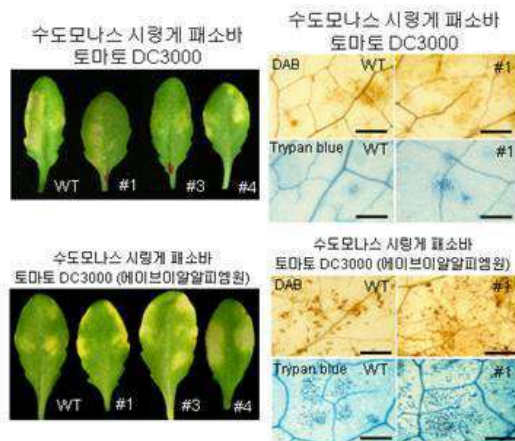
도면8



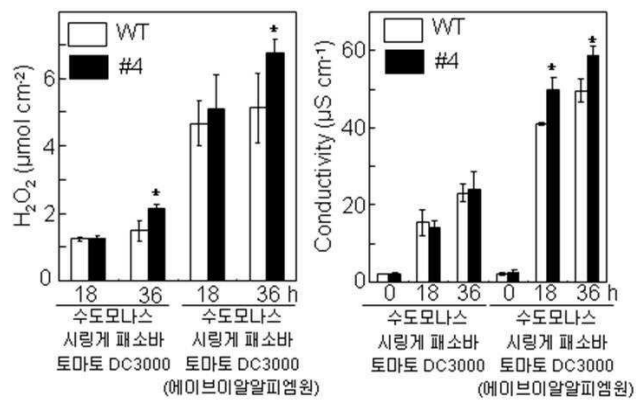
도면9



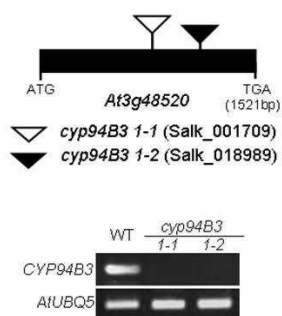
도면10



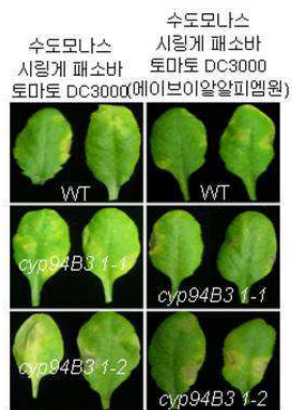
도면11



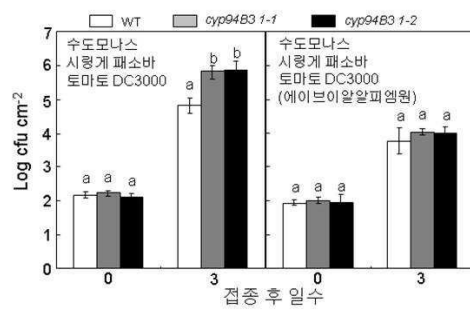
도면12



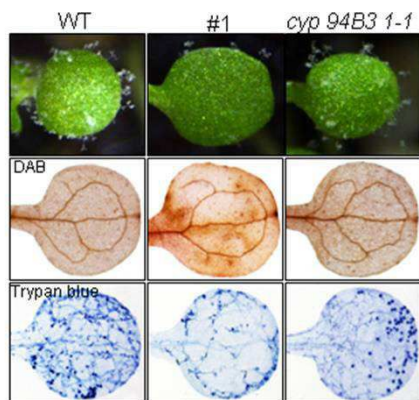
도면13



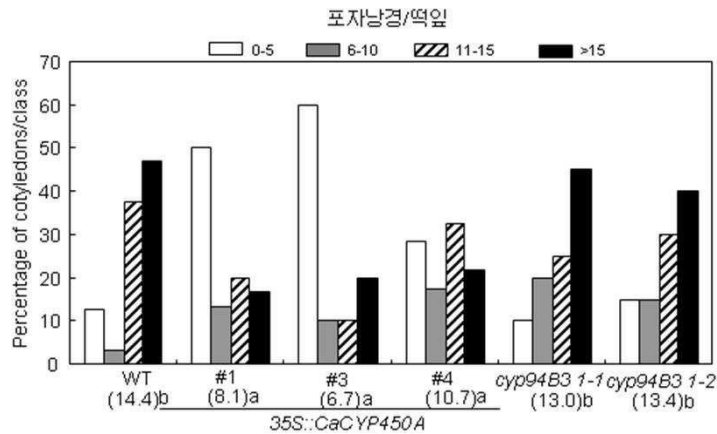
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> The pepper cytochrome P450 gene CaCYP450A in resistance responses against microbial pathogens and transgenic disease resistant plants using the same
- <130> P11-100917-01
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1494
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang
- <400> 1

```

atgaaatgt ttctttctct ctttcttttc ttcatcttag ggtttcttta cttgtccta      60
aaactgcac ttcaatttcg aaaattcact cccatttatg gcccttctc ttaccccatc      120

gttggtgtgc taatttcctt ctacgaaaat cgccatcggc tattggattg gtacactcaa      180
cttttatcgg agtccccac acagaccatt cttgttcaac gtttcggtgc cctcgaact      240
ataatcacag ccaatccgaa caacgttgaa cacatgctca aaacgaactt cactaattat      300
ccaaaaggcc agccctttac ggagatttta ggcgattttc tcggtcgtgg gatcttcaac      360
gtggacgggg agcagtggag cgcgacgagc aaattggcta gccacgagtt cagtacaag      420
tactgagggg agtttgttgt caaaactcta gaagaagtag tcgataccag gtcattcct      480
ttgttgaacc atgctgctaa atctggcaaa gtgttgact tgcaagacgt gcttaggcga      540

ttcgcttcg atactatatg caaggtgtcc ctgggtacag accgcattg cttggatgat      600

```

ctctcagacg tgccgagict agtagattcg tttagactg cttctcaagc gcgtgccatg 660
 cgtgggatgg ctccagtcta cgcgatttgg aaaggcaaga gagcgctcaa tttaggatca 720
 gagaagaggc tgaagagaa cgtgaaacgc gttcactgtt gcattaacga catcatagag 780
 aagaagaaac agacgatcaa cgaaaatgga aaaaacagta agaacatgga tcttctctcc 840
 agattattaa tcgctggaca cgaagatgaa gtggtgagag atatggtcat aagcttcctc 900
 atggccggaa gagacacaac ttcttcgca ttaacatggc ttttttggt cactaccaat 960

cacccggatg tcaaaaatga aatgatcaac gaaataacgt cgatcaacat tggcgacaag 1020
 gcgctcgaat tcgacgaatt aaaagagatg aagtacttgc aagcgtgctt gaacgaatca 1080
 atgaggctat atccaccagt ggcttgggac tcaaagcacg cagccacaga cgacattttg 1140
 ccagacggaa caagggttca aaaaggaaat agagttactt atttccagta cggaatggga 1200
 cggatggagg agatttgggg taaagaccgg ctggaattta aaccggaccg ttggatcgat 1260
 gaaaatggat tattgaaaag tgttagtgtt tataaatttc cagtgtttca agcaggtcca 1320
 aggggtgtgt tgggtaaaga aatggcattc atgcagatga agtatatgtt ggcacagta 1380

ttgaggcggg tcgaaattaa accggtgaaa gtagaaaaac cggtttttat gcctctctta 1440
 actacacata tggctgggtg attcaatgtg cgaatctgtc accgcgatag ctag 1494

<210> 2

<211> 498

<212> PRT

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 2

Met Lys Met Phe Leu Ser Leu Phe Leu Phe Phe Ile Leu Gly Phe Leu

1 5 10 15

Tyr Leu Ser Leu Lys Leu His Leu Gln Phe Arg Lys Phe Thr Pro Ile

20 25 30

Tyr Gly Pro Ser Ser Tyr Pro Ile Val Gly Cys Leu Ile Ser Phe Tyr

35 40 45

Glu Asn Arg His Arg Leu Leu Asp Trp Tyr Thr Gln Leu Leu Ser Glu

50 55 60

Ser Pro Thr Gln Thr Ile Leu Val Gln Arg Phe Gly Ala Pro Arg Thr

65 70 75 80

Ile Ile Thr Ala Asn Pro Asn Asn Val Glu His Met Leu Lys Thr Asn

85 90 95

Phe Thr Asn Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Phe Thr Glu Ile Leu Gly Asp
 100 105 110

 Phe Leu Gly Arg Gly Ile Phe Asn Val Asp Gly Glu Gln Trp Ser Ala
 115 120 125
 Gln Arg Lys Leu Ala Ser His Glu Phe Ser Thr Lys Ser Leu Arg Glu
 130 135 140
 Phe Val Val Lys Thr Leu Glu Glu Val Val Asp Thr Arg Leu Ile Pro
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn His Ala Ala Lys Ser Gly Lys Val Leu Asp Leu Gln Asp
 165 170 175
 Val Leu Arg Arg Phe Ala Phe Asp Thr Ile Cys Lys Val Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Asp Pro His Cys Leu Asp Asp Leu Ser Asp Val Pro Ser Leu Val
 195 200 205
 Asp Ser Phe Asp Thr Ala Ser Gln Ala Arg Ala Met Arg Gly Met Ala
 210 215 220
 Pro Val Tyr Ala Ile Trp Lys Gly Lys Arg Ala Leu Asn Leu Gly Ser
 225 230 235 240
 Glu Lys Arg Leu Lys Glu Asn Val Lys Arg Val His Cys Cys Ile Asn
 245 250 255

 Asp Ile Ile Glu Lys Lys Lys Gln Thr Ile Asn Glu Asn Gly Lys Asn
 260 265 270
 Ser Lys Asn Met Asp Leu Leu Ser Arg Leu Leu Ile Ala Gly His Glu
 275 280 285
 Asp Glu Val Val Arg Asp Met Val Ile Ser Phe Leu Met Ala Gly Arg
 290 295 300
 Asp Thr Thr Ser Ser Ala Leu Thr Trp Leu Phe Trp Leu Thr Thr Asn
 305 310 315 320
 His Pro Asp Val Lys Asn Glu Met Ile Asn Glu Ile Thr Ser Ile Asn
 325 330 335
 Ile Gly Asp Lys Ala Leu Glu Phe Asp Glu Leu Lys Glu Met Lys Tyr

340 345 350
 Leu Gln Ala Cys Leu Asn Glu Ser Met Arg Leu Tyr Pro Pro Val Ala
 355 360 365
 Trp Asp Ser Lys His Ala Ala Thr Asp Asp Ile Leu Pro Asp Gly Thr
 370 375 380
 Arg Val Gln Lys Gly Asn Arg Val Thr Tyr Phe Gln Tyr Gly Met Gly
 385 390 395 400

 Arg Met Glu Glu Ile Trp Gly Lys Asp Arg Leu Glu Phe Lys Pro Asp
 405 410 415
 Arg Trp Ile Asp Glu Asn Gly Leu Leu Lys Ser Val Ser Ala Tyr Lys
 420 425 430
 Phe Pro Val Phe Gln Ala Gly Pro Arg Val Cys Leu Gly Lys Glu Met
 435 440 445
 Ala Phe Met Gln Met Lys Tyr Met Leu Ala Ser Val Leu Arg Arg Phe
 450 455 460
 Glu Ile Lys Pro Val Lys Val Glu Lys Pro Val Phe Met Pro Leu Leu

 465 470 475 480
 Thr Thr His Met Ala Gly Gly Phe Asn Val Arg Ile Cys His Arg Asp
 485 490 495
 Ser Ser