

(72) 발명자

이부자

대구 달서구 월성동 영남아파트 101-1201

김기정

경북 안동시 서부동 77-3

최수복

서울 성북구 안암동5가 151-18

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 고추식물 (*Capsicum annuum* L.) 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질.

청구항 4

제 3항에 있어서, 고추식물에서 과민반응 (Hypersensitive response, HR)에 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질.

청구항 5

제 3항에 있어서, 정상상태에서 고추열매 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질.

청구항 6

제 3항의 단백질을 유효성분으로 포함하는 고추식물 발병-관련 단백질 5 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 5, CaPR-5) 유전자의 발현 증가용 조성물.

청구항 7

제 3항의 단백질을 유효성분으로 포함하는 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 질병은 TMV 또는 Xcv 병원체로 유발되는 것을 특징으로 하는 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 질병 저항성은 고추식물체의 과민반응을 촉진하는 것을 특징으로 하는 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 10

제 3항의 단백질을 유효성분으로 포함하는 고추식물의 열매 숙성 촉진용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<24>

본 발명은 고추열매에 특이적으로 발현하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 고추식물 (*Capsicum annuum* L.) 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자에 관한 것이다.

- <25> 식물은 국부의 생물적 및 비생물적 스트레스에서 살아남기 위해 다양한 방어기작을 발전시켜왔다. 식물의 방어 반응은 일반적으로 복수유전자 (multiple genes)의 조화된 전사활성화 (orchestrated transcriptional activation)와 2차 대사산물의 축적을 일반적으로 포함하고, 종종 과민반응(HR)의 활성화와 전신획득저항성 (systemic acquired resistance)의 발달을 수반한다 (Ryals et al., 1996; Dangl and Jones 2001). 이들 유도된 반응이 주어진 식물-병원체 상호작용 동안 신속하고 대등하게 일어날 때, 식물은 질병에 대한 저항성을 가지게 된다. 감염되기 쉬운 식물은 방어기작의 개시가 병원체 감염에 대해 더 느리게 반응한다. 따라서, 침입하는 미생물을 적시에 인식하는 것, 그리고 신속하고 효과적으로 방어반응들을 유도하는 것은 저항성의 식물과 감염되기 쉬운 식물사이에서 주요 차이점을 만드는 것으로 보인다 (Yang et al., 1997).
- <26> 담배 모자이크 바이러스 (Tobacco mosaic virus, TMV)는 매우 폭넓은 숙주 범위를 가지는 침입자 중의 하나이다. 감염된 고추식물로부터 분리된 TMV는 저항성 유전자들과 그들의 상호작용에 기초로 하여 증가한 병원성(pathogenecity)의 4개의 하위그룹(subgroups)인 병원형 P₀, P₁, P_{1.2}, P_{1.2.3} 로 분류되어 왔다 (Boukema et al., 1982). 그러나, 발병-관련 (pathogenesis-related, PR) 단백질들은 병을 일으키는 원인균에 의해 또는 이와 관련된 유사한 발병 환경 상태에서 유도되는 식물단백질로 정의되었고 (Van Loon et al., 1994), 저항성 식물이 무독성 병원체에 의해 감염 (challenge)되는 부적합한 상호작용 (incompatible interaction)에서 활성의 식물 방어 레퍼토리의 구성요소로써 더욱 신속하게 대부분이 발현되었다 (Dong et al., 1991).
- <27> 방어반응과 관련된 유전자의 동정과 분석은 식물 방어반응 이면에서 전체 개요를 이해하는데 필수단계이며, 이러한 것은 병-저항성 식물의 생성(generation)을 도와줄 수 있다. 본 발명자는 differential screening을 사용하여 부강 고추식물 (Capsicum annuum cv. Bugang) 과 TMV-P₀ 사이의 부적합한 상호작용 하는 동안 특이적으로 발현되는 몇몇의 cDNA를 분리하였고, UDP-글루코실트랜스퍼라제를 코딩하는 상기 cDNA 클론을 얻었다.
- <28> UDP-글루코실트랜스퍼라제는 특이 공여체(specific donor)로부터 기질/수용체(acceptor)로 글리코실기(glycosyl group)의 전달을 촉진하는 효소의 큰 과(large family)를 구성한다 (Mackenzie et al., 1997). UDP-갈락토스 (UDP-galactose)와 UDP-람노스(UDP-rhamnose)가 어떤 UDP-글루코실트랜스퍼라제에 의해 역시 사용된다고 하더라도, 보통의 glycosyl donor는 UDP-글루코스(UDP-glucose) 와 UDP-글루쿠로네이트(UDP-glucuronate)를 포함한다. 애기장대(Arabidopsis) genome은 120 members 미만의 UDP-글루코실트랜스퍼라제를 코딩한다. 그러나, 지금까지 단지 작은 수만이 클론되고 특성화되어 왔다. UDP 클루코스:플라보놀 3-O-글루코실트랜스퍼라제를 코딩하는 옥수수(maize) Bronze-1 locus를 transposon tagging에 의해 처음 클론되었고 (Fedoroff et al., 1984; Harborne and Williams 1988), 그때부터, 다른 식물 종으로부터 몇몇 유전자들이 상동성(homology)에 기초하여 클론되어 왔다 (Sparvoli et al., 1994; Boss et al., 1996; Ford et al., 1998). 여러 대사산물의 glycosylation과 관련된 몇몇의 UGTs는 다양한 기술들을 사용하여 분리되어 왔다 (Szczeszen et al., 1994; Moehs et al., 1997; Warnecke et al., 1997; Lee and Raskin 1999; Martin et al., 1999; Yamazaki et al., 1999). 이러한 지식에도 불구하고, UDP-글루코실트랜스퍼라제가 고추에서 병원체 공격 또는 식물 발달과 관련이 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.
- <29> 본 발명에서는, 고추(Capsicum annuum)로부터 얻은 cDNA 라이브러리의 differential screening에 의해 CaUGT1 cDNA 클론을 분리하였다. 클론된 이 유전자는 담배 모자이크 바이러스 (TMV) 병원형 P₀ 및 Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Xcv) 감염에 대한 저항성 반응에서 유도되었다. CaUGT1 유전자의 발현은 병원체에 의해 유도되는 방어반응에서 중요한 시그널 분자인 살리실산, 에테폰 및 methyl jasmonate에 의해서 또한 유발되었다. 게다가, 바이러스-유도 유전자 발현억제(virus induced gene silencing, VIGS)를 고추와 담배식물에서 수행하여 녹다운된 표현형과 TMV에 대한 감수성(susceptibility)을 나타내었다.
- <30> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 고추식물 (Capsicum annuum L.) 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자의 경우, 고추식물 병저항성 반응에 발현이 특이적으로 증가되어 기능을 수행함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <31> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 고추식물의 방어반응을 증가시키고 열매의 숙성을 촉진시키는, 고추열매에 특이적으로 발현하는 UDP-글리코실트랜스퍼라제 유전자를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <32> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 고추식물 (*Capsicum annuum* L.) 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자를 제공한다. 본 발명에서는 고추 식물로부터 total RNA를 추출하고, mRNA로부터 cDNA 라이브러리를 구성하였으며, cDNA 라이브러리의 differential screening에 의해 UDP-글루코실트랜스퍼라제와 상동성의 cDNA 클론을 분리하고 이를 CaUGT1 이라고 명명하였다.
- <33> 본 발명의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자에서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 유전자인 것이 바람직하다.
- <34> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질을 제공한다. 본 발명의 CaUGT1은 476 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩하는 1428 bp의 single open reading frame을 포함하고, 52.9 kDa의 추정된 분자량을 가지며, 등전점 (isoelectric point)은 6.2로 측정되었다 (도 4). cDNA의 3'-untranslated regions (UTR)은 250 bp 길이다. 상기 서열분석을 통해 CaUGT1 단백질이 하나의 UDPGT domain을 가지는 것으로 나타났으며, 이 domain은 모든 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질을 사이에서 높게 보존된다.
- <35> 본 발명의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질에서, 상기 단백질은 고추식물에서 과민반응 (Hypersensitivity response, HR)에 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질인 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예에서 CaUGT1 단백질은 병원체 감염된 잎에서 우선적으로 축적되었으며, 과민반응 하는 동안 특이적 유도됨을 증명하였다.
- <36> 본 발명의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질에서, 상기 단백질은 정상상태에서 고추열매 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질인 것이 바람직하다. 본 발명의 도 15에 나타난 바와 같이 CaUGT1 전사체는 뿌리, 줄기, 꽃, 및 잎에서는 사실상 축적되지 않았으며, 열매 조직에서 강하게 축적되었음을 보여준다.
- <37> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질을 유효성분으로 포함하는 고추식물 발병-관련 단백질 5 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 5, CaPR-5) 유전자의 발현 증가용 조성물을 제공한다. 본 발명에서 CaUGT1 유전자가 바이러스-유도 유전자 억제 (virus-induced gene silencing, VIGS)에 의해 고추에서 발현이 녹다운(knocked-down)될 때, 고추식물의 발병-관련 단백질 5 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 5, CaPR-5) 유전자도 역시 감소 조절되었고 과민반응이 지체되었다. 본 발명의 이러한 데이터는 CaUGT1 단백질을 이용하여 CaPR-5 유전자의 발현을 증가시킬 수 있음을 의미한다.
- <38> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질을 유효성분으로 포함하는 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물을 고추식물에 투여 및 형질주입을 통하여, 질병 관련 유전자 CaPR-5의 발현을 증가시킴으로써, 궁극적으로 고추식물의 저항성을 증가시킬 수 있다.
- <39> 본 발명의 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물에서, 상기 질병은 담배 모자이크 바이러스 (TMV) 또는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 병원체로 유발되는 것을 특징으로 하는 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물인 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예에서는 CaUGT1 유전자가 질병 저항성과 관련 있는 programmed cell death의 여러 가지 pathway(경로)상에서 어느 pathway와 관련 있는 지를 CaUGT1에 상동성인 NbUGT1 유전자를 이용하여 담배식물에서 그 관련성을 확인하였다.
- <40> 본 발명의 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물에서, 상기 질병 저항성은 고추식물체의 과민반응 (Hypersensitive response, HR)을 촉진하는 것을 특징으로 하는 고추식물의 질병 저항성 증가용 조성물인 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예에서는 CaUGT1 전사체가 HR specific way로 병원체 접촉시 유도되는지를 확인하였으며, 고추식물에서 CaUGT1의 억제는 발현이 억제되지 않은 식물 또는 벡터 대조군 식물과 비교하여 병원체에 대항하는 HR phenotype을 더 지연시킴을 나타내었다. 이는 상기 CaUGT1 단백질이 고추 식물에서 병원체 감염에 대항하는 HR을 촉진할 수 있음을 자명하게 나타낸다.
- <41> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 고추식물 유래의 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질을 유효성분으로 포함하는 고추식물의 열매 숙성 (fruit development) 촉진

진용 조성물을 제공한다. 본 발명에서 상기 단백질의 발현이 억제된 고추식물의 경우, 고추열매가 ripening 표현형에서 지연됨을 나타내었다 (도 20b). 이는 상기 단백질을 포함하는 조성물을 고추식물체에 투여 및 형질전환 할 경우, 고추 열매의 숙성을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

<42> 고등 식물에서 과민반응 (hypersensitive response, HR)은 병원체 감염에 대항하는 방어 반응의 효율적인 형태 중의 하나이다. 부강 고추 식물체 (*Capsicum annuum* cv. Bugang)는 담배 모자이크 바이러스 (Tobacco mosaic virus, TMV) 병원형 P₀에 의한 감염에 대해 과민반응을 나타낸다. TMV 및 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)에 대항하는 방어 기작과 관련 있는 유전자를 분리하기 위해 마이크로어레이 (5 K 칩)분석을 수행하였다. 이러한 처리에 의해 차등 발현 조절된 클론들에 있어서, RNA-blot 분석은 UDP-글루코실트랜스퍼라제 (UDP-glucosyltransferase)를 코딩하는 CaUGT1 유전자가 TMV 및 Xcv 감염에 의해 증가 조절되었다는 것을 나타내었다. Southern blot 분석은 단일 카피수 CaUGT1 유전자가 고추 식물에 존재하는 것을 보여주었다. 여러 가지 호르몬과 자극으로 처리한 경우 CaUGT1은 살리실산 (salicylic acid, SA), 에테폰 (ethephon), methyl virologene (MV), 및 국부 상처 처리 (local wounding treatment)에 대응하여 유도되었지만, methyl jasmonate (MeJA), ABA, 및 전신 상처 처리 (systemic wounding treatment)에 의해서는 유도되지 않았다.

<43> CaUGT1 유전자가 바이러스-유도 유전자 억제 (virus-induced gene silencing, VIGS)에 의해 고추에서 발현이 녹다운(knocked-down)될 때, 고추식물의 발병-관련 단백질 5 (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 5, CaPR-5) 유전자도 역시 감소 조절되었고 과민반응이 지체되었다. CaUGT1이 담배식물 (*Nicotiana benthamiana*)에서 억제된 후, 병원체 무독성 이펙터 단백질 (pathogen avirulence effector protein, AvrPto)/토마토 R 단백질 (tomato R protein, Pto) 및 pro-apoptotic mouse protein (Bax)로 매개된 programmed cell death가 지체되었다. 추가적으로, CaUGT1 유전자는 고추에서 잎, 줄기, 뿌리, 및 꽃이 아니라 고추열매에서만 발현되었다. CaUGT1 유전자가 고추열매에서 억제될 때, 열매가 익는 것 (ripening)도 또한 지체되었다. 이로 미루어볼 때, 이러한 결과는 열매 특이 유전자 즉, CaUGT1은 고추에서 방어반응과 성숙과정 둘 다와 관련됨을 시사한다.

<44> 식물에서 병원체에 대항하는 방어의 중요한 역할은 과민반응 (hypersensitive response, HR)에서 세포 사멸의 특별한 type과 많은 관련이 있는 질병 저항성의 활성화이다 (Dangl et al., 1996; Greenberg, 1997). HR은 감염된 세포의 붕괴 (collapse)를 초래하는 방어반응을 유도하는 병원체 공격 시 국부적으로 일어난다 (Hammond-Kosak and Jones, 1996). 이러한 국부적인 반응은 정상적으로 질병을 야기시키는 추가적 감염에 대하여 전체 식물체를 면역화 시키는 전신획득저항성 (systemic acquired resistance, SAR) (Ross, 1961)의 획득 (establishment)과 종종 관련되어 있다 (Ryals et al., 1996). 미생물 병원체에 저항성 식물의 과민반응은 국부 및 전신 방어반응의 유도와의 일관된 관련에서 발달상의 (developmental) PCD와 다른 programmed cell death (PCD)의 복합 형태를 포함한다. 과민반응성 세포 사멸은 무독성 병원체 유전자 산물과 식물 저항성 유전자의 산물사이에서 직접적 또는 간접적 상호작용에 의해 보통 조절되고 multiple signalling pathways의 결과가 될 수 있다. 이온 방출 (Ion fluxes)와 활성산소 (reactive oxygen species)의 발생이 보통 세포사멸에 앞서 일어나지만, 후자의 직접적 관련은 식물-병원체 combination에 따라 바뀌는 것으로 보인다 (Michèle, 2000).

<45> 이전의 연구는 대부분의 PR 유전자가 바이러스, 박테리아, 및 곰팡이가 감염된 식물의 부적합한 상호작용에 의해 유도되었음을 보여주고 있다 (van Loon and van Strien, 1999; Kim and Hwang, 2000; Park et al., 2001). 방어반응과 관련되어 있는 유전자를 동정하고 분석하기 위하여, TMV에 의해 유도된 CaUGT1 cDNA 클론을 고추 cDNA 라이브러리로부터 분리하였다. 추가적으로, 유전자가 식물에서 다른 병원체들에 대항하는 방어와 관련이 있는지를 알기 위해 TMV-P₀-유도성의 CaUGT1를 테스트하였고, 고추 잎을 병원성 박테리움 Xcv로 면역성 테스트 하였다. CaUGT1 유전자의 전사 형태와 시간은 CaPR-1 과 매우 유사하였으며, 이는 박테리아 HR-특이적 signal pathway하에서 이러한 유전자의 발현이 조절됨을 나타낸다.

<46> 이전에 보고된 바와 같이, 많은 유도성의 방어 유전자의 발현은 살리실산, 에테폰, 및 MeJA와 같은 낮은 분자량의 몇몇 signal molecules에 의해 조절 된다 (Ecker, 1995; Durner et al., 1997). 이러한 조절인자 (regulators)가 TMV-유도된 CaUGT1의 발현을 역시 유도하는지를 조사하기 위하여, 고추 식물을 살리실산, 에테폰, 또는 MeJA로 처리하였다. CaUGT1은 살리실산 처리에 의해 유도되었으나 MeJA 처리에 의해서는 유도되지 않았다. CaUGT1의 축적은 또한 에테폰에 의해 유도되었다. 거의 모든 경우에서, CaUGT1 유전자의 발현은 방어를 유도하는 조건하에서 CaPR-1의 발현보다 더 먼저 일어났다. 이러한 결과는 CaUGT1이 초기 방어-반응 유전자의 조절에 중요한 역할을 함을 증명한다. 다른 자극에 대한 조사를 위해, CaUGT1 유전자를 또한 ABA, MV, 및 wounding으로 처리하였다.

- <47> UDP-글루코실트랜스퍼라제는 새로운 연구에서 잘-연구된 효소중의 하나이다. 각각 자기 자신의 공여체 (donor), 수용체 (acceptor) 및 결합 특이성 (linkage specificity)을 가지는 많은 글루코실트랜스퍼라제가 있는 것으로 알려져 있다. 생물학적 관점으로부터, 이러한 글루코실트랜스퍼라제의 연구는 박테리아 독성에서 포유동물의 발달 (development)까지의 범위에서 새로운 해석을 내리기 시작하였다. 더욱이, 치료상의 표적으로써 그들의 잠재적 역할 뿐만 아니라 질병의 병인학(etiology)에서 글루코실트랜스퍼라제에 의해 수행되는 역할은 또한 높이 평가되고 있다 (Dennis et al., 1999). 글루코실트랜스퍼라제는 PSI-BLAST 서열분석과 substrate/product stereochemistry 둘 다를 기초로 하여 서로 다른 47 families에서 분류되어 왔다 (Campbell et al., 1998). 글루코실트랜스퍼라제 반응은 활성화된 당 공여체 (sugar donor)에서 당류 (saccharide), 단백질 (protein), 지질 (lipid), DNA 또는 저분자 수용체 (small molecule acceptor)로 단당류 (monosaccharide)의 이동 (transfer)을 포함 한다 (Bill et al., 1998).
- <48> 고추식물에서는, 감염되지 않은 상태에서 열매-특이적으로 발현되는 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 단일 카피수가 있다. 식물이 TMV 또는 Xcv와 같은 외부 침입자에 의해 감염될 때, 병발병 저항성의 pathways에서 몇몇 signal molecules는 축적되기 시작하고, 병원체 저항성 유전자는 활성화되기 시작 한다 (Delaney et al., 1994; Penninckx et al., 1996, 1998; Dong, 1998; Glazebrook, 2001). 이러한 종류의 과정은 downstream PR 유전자 또는 몇몇 결정적인 병원체 저항성 유전자를 활성화하도록 유도한다. CaUGT1이 억제된 RT-PCR 결과는 CaUGT1이 CaPR-5의 upstream에 있다는 것과 CaPR-5의 발현 수준을 조절한다는 것을 보여준다. 이전의 보고에서는, PR-5 단백질은 곰팡이가 활성 (antifungal activity)을 가지는 것으로 나타났다 (Vigers et al., 1992). 이 family의 members는 또한 병원체 감염 동안 역시 유도되며, 이러한 PR-5 member의 매우 높은 수준의 발현은 또한 HR과 관련되어 있을 것이라고 알려져 있다 (Van Loon and Van Strien, 1999; Madge Y. Graham, 2005). CaUGT1의 억제는 CaPR-5를 또한 억제하여 TMV에 대한 낮은 식물-병원체 저항성을 초래할 수 있다. 이는 HR에 직접적 또는 간접적으로 영향을 미치는 것으로 보이며 TMV 복제 역시 그러하다.
- <49> 열매 익음(fruit ripening)은 물리적, 생화학적 변화에 의해 수반되는 발달 과정 (developmental process)이다. 이러한 변화는 열매 착색 (pigmentation), 물러짐 (softness), 및 당 (sugar)과 아로마 (aroma)의 축적을 포함한다 (Giovannomi, 1993). CaUGT1이 억제된 식물의 열매 표현형은 CaUGT1이 열매 숙성과 관련되어 있다는 것을 나타낸다. 이전 연구에서는, thaumatin-like protein (TLP) (PR-5 family)은 고추열매가 익는 동안에 축적된다고 보고되었다 (Kim et al., 2002). 고추 thaumatin-like protein (CaPR-5)는 곰팡이에 감염되었을 때 발현되며, 이러한 감염이 없는 평상시에는 붉은색 열매로 변화한 후의 열매의 당 축적에 관여한다. RNA blot 분석은 CaUGT1이 녹색 열매와 붉은색 열매에서 모두 발현한다는 것을 나타낸다. 고추 thaumatin-like protein이 단지 붉은색 열매에서만 발현한다는 점을 감안한다면, CaPR-5 유전자는 고추열매에서도 CaUGT1에 의해 역시 조절될 수 있다고 예상된다. 결과적으로, CaUGT1 유전자는 고추 열매에서 기능하면서 한편으로는 열매의 당 축적하는 기능을 하는 CaPR-5 유전자를 조절하면서 당 축적에도 관여할 것으로 추정된다. 그러나, CaUGT1이 억제된 열매 표현형의 단지 약 10%만이 부분적으로 녹색을 나타내었다. 이것은 CaUGT1이 열매 착색 (pigmentation)에 기능을 하는 것이 아니라 열매 숙성 (fruit development)의 다른 부분에서 기능을 할 것임을 나타낸다.
- <50> sense 와 antisense 방향 (orientation) 둘 다를 CaUGT1 유전자를 발현시킨 유전자 도입된 고추식물은 CaUGT1이 식물에서의 바이러스 병원체에 대한 방어 또는 열매 숙성에서 기능을 하는 메커니즘을 밝히기 위해서 반드시 필요하다.
- <51> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <52> 실시예 1. 고추 식물체에서 CaUGT1 cDNA 분리
- <53> 고추 RNA는 Ausubel et al. (1995)에 명시된 방법과 같이 TMV-P₀가 처리된 고추 식물체에서 분리되었다. cDNA는 상기 분리된 RNA에서 cDNA amplification kit (CLONTECH, USA)을 이용하여 합성되었다. 두 개의 유전자에 특이적으로 작용하는 primer가 PCR의 방법에 이용되었다 (Kim et al., manuscript in preparation). PCR은 94 °C에서 30초와 72 °C에서 2분 동안 총 5회, 94 °C에서 30초와 70 °C에서 2분 동안 총 5회, 94 °C에서 30초와 68 °C에서 4분 동안 총 25회의 조건으로 수행되었다. 분리된 cDNA 절편의 염기 서열 분석 결과 다른 식물체에서의 UDP-glucosyltransferases (UGT)와 높은 상동성을 보였다. RACE를 수행하기 위하여 상기 cDNA를 주형으로 하고 두 개의 유전자에 특이적으로 작용하는 cDNA primer (CaUGT GSP1 5'-TTCCCATCAAAACCGTTGGTCTCTGTTC-3' 와 CaUGT GSP2 5'-AGGTCCTACATCTAGTGATGTCCAAGGTG-3')를 사용하였다. 두 개의 유전자에 특이적으로 작용하는

primer들은 유전자의 잘 보존된 서열부위에서 제작되어 다른 두 개의 아답터 (adaptor) primer들과 PCR에 사용되었다. RACE PCR은 94 °C에서 30초와 65 °C에서 30초와 72 °C에서 45초 동안 28회의 조건 하에서 수행되었다. PCR 후에 1.2% 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동을 통해 크기 별로 분리한 후 해당 절편을 추출하였고 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)에 삽입하였다. DNA 서열 확인과 데이터 분석은 Lasgene Biocomputing Software (DNASTAR, USA) 와 Vector NTI analysis program (Informax, USA)을 통해 이루어 졌다. 데이터베이스 조사는 및 탐색은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Altschul et al., 1990)을 통해 이루어 졌다.

<54> 실시예 2. 식물 배양 및 병원균 처리

<55> TMV-P₀ 병원형에 대해 저항성이면서 TMV-P_{1,2} 병원형에 대해서는 감수성인 부강 고추 식물체 [hot pepper (*C. annuum* L.) cultivar Bugang]을 실험에 사용하였다. 식물체들은 실내 배양실이나 온실에서 25 °C, 16시간 광주진, 8시간 암조건 하에서 배양되었다. 2달 동안 건강하게 키운 식물체들에 병원균을 처리한 후 핵산을 추출하였다.

<56> cDNA 도서관 (library)와 differential screening 방법은 이전에 기술된 방법을 따랐다 (Park et al., 2002). TMV-P₀와 TMV-P_{1,2}는 CaCl₂가 내포된 배지에서 감염된 담배 (*N. tabacum* cv. Samsun) 잎 상태로 유지되었다. 5 mM EDTA (pH 7.4)가 첨가된 0.25 M phosphate 용액에 TMV-P₀와 TMV-P_{1,2}가 감염된 잎을 갈아서 병원균을 준비하였다. 고추 식물체에 병원균을 감염시키기 위해 활짝 피진 4개에서 5개의 건강한 잎에 병원균이 내포된 수액을 묻힌 후 카보런덤 (Carborundum)으로 문질러 주었다 (Hayashi Chemical, Japan). Mock 식물체들은 phosphate 용액과 카보런덤만 처리되었다.

<57> Early Calwonder (ECW; bs1/bs1, Bs2/Bs2, bs2/bs2, bs3/bs3)와 Early Calwonder-20R (ECW-20R; bs1/bs1, Bs2/Bs2, bs3/bs3)의 2개의 고추 식물 품종은 Xcv를 감염시키는데 이용되었다. Xcv는 yeast extract, dextrose 와 calcium carbonate가 첨가된 배지에서 배양되었다. 세포 용액 (1× 10⁸ cells/ml)이 잎에 주입되었고 감염된 잎에서 RNA를 추출하였다.

<58> 실시예 3. 화학약품과 상처 처리

<59> 2달 동안 키운 고추 식물체에 10 mM 살리실산 (salicylic acid)이나 100 μM MeJA를 스프레이로 처리하였다. SA나 MeJA가 10% EtOH에 용해되었기 때문에 대조군의 식물체에도 10% EtOH가 처리되었다. 에테폰 (ethephon)을 처리하기 위해서 2달 된 고추 식물체에 10 mM 에테폰을 스프레이로 뿌렸다. 그리고 대조군은 물 (dH₂O)로 처리되었다. 잎은 처리 이후에 정해진 시간에 채취하여 재빨리 액체 질소에 얼렸다. 잎 표본들은 -80 °C에 보관되었다. 상처를 처리하기 위해서 면도날을 이용하여 3 mm 간격으로 10개의 평행선으로 상처를 내었다. 같은 식물체의 상처 난 잎과 상처가 나지 않은 상위 잎 부위에서 상처 처리 후 일정 시간에 따라 RNA가 추출되었다.

<60> 실시예 4. 고추에서 genomic DNA 추출

<61> 1 g 의 고추 잎을 액체 질소에 얼리고 균질화 후 6 ml의 urea extraction 용액 (8 M urea, 0.35 M NaCl, 0.05 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.02 M EDTA, pH 8.0, 2% N-lauroylsarcosine)이 담긴 50 ml 튜브로 옮겼다. 동일한 양의 페놀/클로로포름/이소아밀알콜을 첨가 후 조심스럽게 잘 섞어주었다. 그리고 8,000 rpm에서 10분 간 상온의 조건으로 원심 분리하였다. 상등액에 4.4 M 암모늄 아세테이트 (pH 5.2)를 1 ml 첨가하여 염 농도를 높여준 후 2 배 양의 에탄올을 첨가하여 DNA를 분리하였다. DNA를 빠르고 조심스럽게 TE (pH 8.0) 용액에 용해시켰다.

<62> 실시예 5. RNA 추출

<63> 1g의 식물조직을 액체질소에 얼리고 균질화 후 10ml의 RNA추출 용액 (0.2 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.4 M LiCl₂, 25 mM EDTA, pH 8.0 and 1% SDS)를 첨가 하여 잘 섞는다. 10ml의 아쿠아페놀을 첨가 후 오래 섞고 20분 동안 4 °C 10,000g 조건 하에서 원심 분리한다. 상층액을 10 ml의 클로로포름이 담긴 tube로 옮겨 잘 섞은 후 20분 간 4 °C 10,000g 조건 하에서 원심 분리한다. 상층액을 에탄올을 이용하여 RNA를 침전시킨다. 침전물을 75% 에탄올로 씻은 후 2 M LiCl₂에 녹인 후 재 침전시키고 침전물을 DEPC가 처리된 물에 용해시킨다.

<64> 실시예 6. 방사선 동위원소 probe 제작

<65> differential screening으로 얻어진 cDNA 클론들이 probe로 사용되었다. probe제작에 PCR을 이용한 방법이나 random priming을 이용한 방법이 사용되었다. PCR에 사용된 혼합물에는 template (100 ng), 250 μM dATP,

dGTP and dTTP, 50 μ M dCTP, T7 primer (10 pM), T3 primer (10 pM), [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mM) and Taq polymerase (Bioneer, Korea)이 포함되었다. PCR은 처음에 95 °C에서 2분의 조건으로 그 이후에 95 °C에서 30초, 45 °C에서 30초, 72 °C에서 40초의 조건으로 30회를 마지막으로 72 °C에서 5분의 조건으로 작동되었다. random priming으로 사용되는 template는 10분 동안 끓여진 후 재빠르게 얼음에 보관되었다. 그 후에 Klenow polymerase (Boehringer Mannheim, Germany)를 제외한 모든 구성물들이 37 °C에 5분 간 보관되었다. Klenow polymerase를 첨가한 후 37 °C에서 30분 간 배양하였다. 방사선동위원소로 표시된 probe들은 QIAquick nucleotide removal kit (QIAGEN, USA)에 의해 깨끗하게 정제되었다. 마지막으로 probe를 pH 8.5인 50 mM Tris-Cl 용액에 용해시킨다. Hybridization 실험을 하기 위해서 방사선동위원소로 식별되는 probe를 5분 간 끓는 물에서 denaturation시킨 후 얼음에 재빨리 옮겨서 사용한다.

<66> 실시예 7. Southern and northern blot 혼성화 및 분석

<67> Southern blot 분석을 하기 위해 genomic DNA를 EcoRI, HindIII와 XbaI의 제한효소로 잘랐다. 제한 효소로 자르는 과정은 genomic DNA (15 μ g), 10 x reaction buffer와 제한 효소 (50 units)를 총 50 μ l의 양으로 혼합액을 만들어 37 °C에서 16시간 동안 작용 조건을 만들어 수행되었다. DNA 절편들은 0.8% 아가로스 젤 전기영동을 통해 1 x TBE 용액에서 20 볼트 조건으로 크기 별로 분리되었다. Genomic DNA의 크기는 λ HindIII에 의해 측정되었다. DNA를 가시화시키기 위해 10분 동안 gel을 ethidium bromide로 염색하였다. Genomic DNA를 10분 동안 UV를 처리함으로써 퓨린을 제거하였고 45분 간 변성 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)으로 변성 후 30분 간 중화 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl, pH 8.0)으로 중화시켰다. Membrane 이동, random labeled probe, hybridization, 씻기와 감광은 이전에 보고된 바와 같은 조건을 따랐다 (Park et al., 2002).

<68> Northern blot 분석을 위해서 Ausubel et al. (1995) 방법을 따라 RNA를 추출하였다. 15 μ g의 RNA를 6% 포름알데히드와 MOPS 용액 (pH 7.0)이 포함된 1.0% 아가로스 젤에서 전기영동 한 후 nytran plus membrane으로 옮겼다. RNA 분석은 각 처리마다 3번에서 4번씩 반복 실험되었다. 이미 보고된 프로토콜 (Church and Gilbert, 1984)에 따라 hybridization이 수행되었고 membrane들은 상온에서 2 $\times$ SSC 용액으로 10분 간 2번씩 씻어냈으며 상온에서 0.1 $\times$ SSC과 0.1% SDS이 혼합된 용액으로 65 °C에서 5분 간 씻어냈다. Membrane을 살짝 말린 후 X-ray 필름이나 BAS-2500 phosphorimager (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 감광하여 관찰되었다.

<69> 실시예 8. X. campestris pv. vesicatoria 감염

<70> 식물체에 감염시키기 위한 박테리아는 혼들 배양기 (Vision, Seoul, Korea)에서 28 °C, 18시간의 조건으로 액체 배지에서 배양하였다. 4,000 g에서 15분 간 원심 분리하여 균을 침전 시킨 후 멸균된 증류수에 용해시켰다. 스펙트로포토미터 (WPA, Cambridge, UK)를 이용하여 박테리아의 농도를 OD₆₀₀ = 0.3 (2-5 $\times$ 10⁸ CFU/ml)에 맞추었다. 박테리아 용액을 멸균된 증류수상에서 1 $\times$ 10⁵ CFU/ml로 희석한 후에 이전에 보고된 바 (Hibberd et al. 1987)와 같이 고추 식물체 잎에 주사기를 이용하여 주입시켰다.

<71> 실시예 9. ELISA를 이용하여 TMV coat protein 측정

<72> 고추 식물체 잎은 TMV가 처리되고 48시간 후에 채집되었다. 200 μ l의 extraction 용액(0.1 M Tris-HCl with 1% sodium sulfite, pH 7.4)이 들어간 microcentrifuge 튜브에 채집한 잎을 넣고 갈았다. 단백질 총량은 Bio-Rad protein assay reagent (BIO-RAD)을 이용하여 측정되었다. 사용된 60 μ g의 단백질은 ELISA plate에서 4 °C 조건으로 하룻밤 동안 활성화시켰다. Plate는 0.85% NaCl와 0.05% Tween-20 (TBST), pH 7.4가 첨가된 0.01 M Tris-HCl 용액으로 씻어내고 0.85% NaCl (TBS), pH 7.4가 포함된 1% BSA in 0.1 M Tris-HCl 용액으로 blocked되었다. 항원을 활성화시킨 후에는 1:500으로 희석된 anti-TMV 항체를 200 μ l씩 분주하여 2시간 동안 반응시켰다. 이것을 씻어 낸 후에는 alkaline phosphatase goat anti rabbit IgG (Sigma)을 1:2,000으로 희석하여 100 μ l씩 분주하고 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 plate에 0.2 M carbonate 용액 (pH 9.8)에 substrate solution containing p-nitrophenyl phosphate (Sigma) (1 mg/ml)이 첨가된 용액을 100 μ l씩 분주하여 색 변화가 나타나게 하였는데 이는 A405 nm 파장에서 ELISA Reader (Bio-Rad)로 판독하였다.

<73> 실시예 10. 고추 원형질체 내에서의 CaUGT1 위치 확인

<74> In vivo 상에서 UDP-glucosyltransferase가 어디에 위치하는지 알아보는 실험을 수행하기 위하여 2 개의 PCR primer CaUGT1-S (5'-GAGATCTAATGGGATCTAAAGTAAGT-3')와 CaUGT1-AS (5'- GAGATCTAACACACTTCTAACATAGT-3')를 이용하여 PCR로 UDP-glucosyltransferase 절편을 제작한 후 염기서열을 확인하였다. CaUGT1::GFP 혼합체는 35S cauliflower mosaic virus promoter에 의해 조절 받아 pUC 벡터 내에서 발현하였다. CaUGT1::smGFP (초록색 형

광 단백질) 혼합 구성물은 종결 코돈을 제거한 cDNA의 암호화 부위를 GFP 암호화 부위의 N-말단 부위에 접합하여 제작되었다. 플라스미드 DNA는 Qiagen column (Qiagen)을 이용하여 정제하였다. 이 혼합 구성물을 polyethylene glycol-mediated transformation procedure (Jin et al., 2001)을 이용하여 고추 식물체 잎에서 추출한 세포 원형질체에 주입하였다. 24시간이 지난 후에 Zeiss (Jena) Axioplan fluorescence microscope으로 혼합 구성물의 발현 여부를 관찰하고 그 이미지는 cooled charge-coupled device (CCD) camera로 찍었다.

<75> 실시예 11. RT-PCR 분석

<76> 올리고 (dT) primer와 superscript reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 1 mg의 RNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성하였다. RT-PCR은 Liu et al. (2002)에서 보고된 바와 같이 수행되었다. RT-PCR 확인을 위해 silencing에 이용된 부위의 외부부위에서 제작하여 primer가 내부의 관찰하고자 하는 유전자만을 측정할 수 있도록 하였다. CaActin 유전자를 RNA 정량을 보기 위한 대조군으로 사용하였다. Reverse transcriptase가 들어가지 않은 RT 반응 조합물을 RT-PCR 음성 대조군으로 사용하였다. PCR로 생성된 절편들의 강약 정도는 Gel Doc 2000과 Quantity One Version 4.3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 비교되었다.

<77> 실시예 12. Agrobacterium을 이용하여 고추와 담배 식물체에서 유전자 발현 억제

<78> 담배 (N. benthamiana)와 고추 식물체는 실내 배양실에서 25 °C, 60% 습도에서 16시간 광/8시간 암 조건 하에서 배양되었다. VIGS를 위해서 Agrobacterium의 EHA 105종에 pTRV1이나 pTRV2를 삽입하여 주사로 식물체내에 주입하였다. Agrobacterium을 항생제와 함께 5 ml의 액체 배양액에 하룻밤 동안 28 °C에서 배양하였다. 다음 날, Agrobacterium 액체 배양액은 항생제와 10 mM MES와 MgSO₄ 그리고 20 µM acetosyringone가 들어 간 새로운 50 ml LB 배양액으로 재접종되어 하룻밤 동안 28 °C에서 배양되었다. Agrobacterium은 채집하여 주입 용액 (10 mM MgSO₄, 10 mM MES, 100 µM acetosyringone)에 용해시켜 농도를 OD₆₀₀ = 0.3으로 맞춘 후 상온에서 3시간 동안 감염성을 증가시켰다. 바늘이 없는 주사기를 이용하여 고추와 담배 식물체 잎에 Agrobacterium을 주입하고 실내 배양실에서 배양하였다.

<79> 실시예 13. VIGS에 이용되는 플라스미드 제작

<80> VIGS를 실시하기 위해 이전에 Liu et al. (2002)에서 보고 된 pTRV1과 pTRV2 벡터를 이용하였다. pTRV2::CaUGT1 : 5'- GAATCAACTCTAGAAGCACTTTC-3'와 5'- GAATT CACGGCGAAAGAAGTGAGA-3' 두 개의 primer를 이용하여 고추 UGT1 cDNA에서 PCR로 1183 bp에서 1634 bp에 해당하는 451 bp의 UGT1 cDNA 절편을 분리하였다. 이 절편을 제한효소 (EcoRI)을 이용하여 pTRV2 벡터에 삽입하였다. pTRV2::NbUGT1 : 고추에서 사용된 동일한 primer를 이용하여 분리한 보존된 451 bp의 담배 (N.benthamiana) UGT1 cDNA 절편을 분리하여 제한효소 (EcoRI)을 이용하여 pTRV2 벡터에 삽입하였다.

<81> 실시예 14. Agrobacterium을 이용하여 담배 식물체 잎에서 유전자 발현 억제

<82> pBTEX 벡터내의 AvrPtoB는 담배 식물체 (N.benthamiana)에 주입하기 위해 전기 천공법을 이용하여 Agrobacterium tumefaciens의 GV2260종에 주입하였다. 주입하기 위한 Agrobacterium은 LB 배양액에서 하룻밤 동안 배양 시킨 후 주입 용액 (50 mM MES (pH 5.6), 0.5% (w/v) glucose, 1.7 mM NaH₂PO₄, 20 mM NH₄Cl, 1.2 mM MgSO₄, 2 mM KCl, 17 µM FeSO₄, 70 µM CaCl₂, and 200 µM acetosyringone)에 O.D.₆₀₀ = 0.5.의 농도로 희석시킨 후 7-8 주 자란 담배 식물체 잎에 바늘 없는 주사기로 주입하였다.

<83> 실험결과 1. northern blot 분석에 의한 EST 클론들의 마이크로어레이 분석과 스크리닝

<84> cDNA 라이브러리의 대규모 분석 single-pass sequencing과 마이크로어레이 분석은 신규한 유전자를 발견하고 유전자 발현을 연구하는데 유용한 기법이라고 검증되어져 있다. TMV 및 Xcv에 의한 고추식물에서의 방어기작을 밝히는 데 첫 번째 단계로서, 전체 4,861 ESTs (expressed sequence tags)를 만들었고 (Lee et al., 2004), 분석하였다 (Kim et al., manuscript in preparation). TMV-P₀ 에 의해 유도되는 지에 대한 EST 클론들을 스크리닝하기 위해 Northern blot 분석을 수행하였다 (도 2).

<85> 실험결과 2. CaUGT1의 분리

<86> 고추에서 TMV에 의해 유도된 방어 유전자를 동정하기 위하여, 부강 고추식물 (hot pepper cv. Bugang plants)의 TMV-P₀ 감염 24시간과 48시간 후에 수확된 잎으로부터 total RNA를 추출하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 MarathonTM cDNA Amplification Kit (CLONTECH, USA)를 사용하여 mRNA 샘플로부터 cDNA 라이브러리를 구성하였

다 (도 3). 라이브러리의 5'-RACE 와 3'-RACE PCR을 통해 full-length cDNA 클론을 분리하였다. UDP-글루코실트랜스퍼라제와 상동성의 cDNA 클론을 분리하고 이를 CaUGT1 이라고 명명하였다.

<87> 실험결과 3. CaUGT1 cDNA의 서열 분석

<88> CaUGT1은 476 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩하는 1428 bp의 single open reading frame을 포함하고, 52.9 kDa의 추정된 분자량을 가지며, 등전점 (isoelectric point)은 6.2로 추정되었다 (도 4). cDNA의 3'-untranslated regions (UTR)은 250 bp 길이다. CaUGT1의 서열은 여러 식물로부터 얻은 UDP-글루코실트랜스퍼라제와 높은 동일성을 나타냈다 (도 5). CaUGT1과 *Fragaria ananassa*의 UDP-글루코스 글루코실트랜스퍼라제의 아미노산 서열은 64% 동일성을 공유하는 반면, *Lycopersicon esculentum*의 UDP-자일로스 페놀릭 글루코실트랜스퍼라제 (UDP-xylose phenolic glycosyltransferase)와는 단지 약 35% 동일성만 관찰되었다. 서열분석은 CaUGT1 단백질이 하나의 UDPGT domain을 가지는 것으로 나타났으며, 이 domain은 모든 UDP-글루코실트랜스퍼라제 단백질들 사이에서 높게 보존된다.

<89> 실험결과 4. CaUGT1 유전자의 Genomic southern blot 분석

<90> cv. Bugang로부터 고추의 genomic DNA를 분리하였고, EcoRI (E), HindIII (H) 또는 XbaI (X)와 같은 제한효소로 잘랐다. 특이적 CaUGT1 cDNA 프로브 (specific CaUGT1 cDNA probe)로 southern hybridization을 수행하였다 (도 6). 높은 엄격한 조건(65℃)하에서, HindIII 제한효소는 HindIII 제한부위를 포함하지 않는 CaUGT1 cDNA 프로브와 혼성화하는 5.5 kb를 가진 하나의 밴드를 만들어냈다. 같은 조건하에서, 상기 프로브와 혼성화될 때 EcoRI으로의 절단(digestion)은 3.5 kb를 가지는 하나의 밴드를 만들었고 XbaI은 1.7 kb의 밴드를 만들었다 (도 6). 이러한 결과는 고추 genome에서 단일 카피수(single copy)로써 CaUGT1 gene이 존재함을 나타내었다.

<91> 실험결과 5. TMV-P₀에 의한 CaUGT1의 발현형태

<92> CaUGT1 전사체 (transcripts)가 HR specific way로 TMV P₀ 감염시 유도되는지를 확인하기 위하여, TMV-P₀ 감염한 후 부강 식물(Bugang plants)에서 그것의 발현 형태를 모니터하였다. 게다가, TMV-P₀ 감염시 CaUGT1 유전자의 유도가 과민반응 하는 동안 특이 질병 저항성과 관련이 있는지 조사하기 위해, 그것의 발현 형태를 L² 저항성 유전자를 수반하는 고추 변종에서 백화현상 (chlorosis)을 일으키는 병원형인 TMV-P_{1,2}에 민감한 부강 고추 (hot pepper cv. Bugang)에서 모니터하였다 (Boukema, 1982; Park et al., 2002). 카보런덤 (carborundum) 마찰로 인한 상처로부터 일어날 수 있는 CaUGT1유전자 발현을 상쇄 (cancel out)하기 위한 대조군으로써 모의 접종 처리 (mock inoculation treatment)를 사용하였다. 도 7에서 보여지는 바와 같이, 모의 접종된 앞에서 CaUGT1 전사체의 축적은 거의 탐지되지 않았다. 그러나, 상기 전사체는 TMV-P₀ 로 감염한 후 12시간에서 약간 축적하기 시작하였고, 48시간에서 거의 최대 수준에 도달하였으며, 그 후, 72시간까지 증가하였다. 그러나, TMV-P_{1,2}-감염된 앞에서는 축적되지 않았다. TMV-감염에 대한 양성 대조군 (positive control)으로써, CaPR-1 유전자의 발현 형태를 모니터하였다. 초기 접종 48시간 후 CaPR-1 유전자의 강력한 유도가 관찰되었다. 이러한 데이터는 CaUGT1 유전자의 유도 형태가 담배에서 여러 병원체에 의해 유도되는 것으로 알려진 PR 유전자에 속해있는 CaPR-1 유전자의 유도 형태와 거의 동일하고 (Sticher et al., 1997), CaUGT1은 CaPR-1과 같은 HR-특이적 발현 형태를 보여준다는 것을 나타낸다 (도 7).

<93> 실험결과 6. 박테리아에 대한 gene-for-gene 저항성 동안 활성화된 CaUGT1 발현

<94> 식물에서 TMV-P₀ 유도성 CaUGT1 유전자가 또한 다른 병원체들에 대항하는 방어와 관련되어 있는지를 조사하기 위해, 병원성의 bacterium Xcv를 이용하여 고추 잎을 감염 (challenge)시켰다. 민감성 고추 재배종 ECW는 bs2 유전자를 포함하는 반면, 그것의 근접-동질유전자형 계열 (near-isogenic line) ECW-20R은 avrBs2 무독성 유전자를 수반하는 Xcv 균주(strain)에 대항하는 저항성을 부여하는 Bs2 우성 대립유전자 (dominant allele)를 수반한다 (Tai et al., 1999). Xcv 병원형(pathovar)가 침투된 저항성 재배종의 잎은 접종 24시간 내에 어두운 보라색(dark purple)로 변했고, 이어서 necrotic하게 되었다. 대조적으로, 민감성 잎들은 심하게 손상되었고 48 시간 내에 백화현상을 나타내었다.

<95> 3'-UTR gene-specific CaUGT1 cDNA probe로 수행된 northern blot 분석은 CaUGT1의 전사체들이 저항성 잎들에서 우선적으로 축적되는 것을 나타냈으며, 이는 박테리아 감염에 대한 과민반응 하는 동안 특이적 유도를 함을 시사한다 (도 8). CaUGT1에 대한 전사체는 감염 후 24시간에서 축적하기 시작하였고 감염 후 36시간에서 최대 수준에 도달하였다. Xcv 감염 (challenge) 접종 후 전사체가 강하게 축적되는 유전자 발현의 유사한 형태가

CaPR-1 유전자에서 관찰되었다.

- <96> 실험결과 7. 병원체 공격 (pathogen attack)에 대항하는 식물 방어반응을 활성화하는 신호전달체계 (signal transduction cascades)로 처리시 CaUGT1의 발현 형태
- <97> CaUGT1 유전자가 다른 자극에 의해 유도되는지를 시험하기 위해, 다양한 유도인자 (inducers)로 처리하였다. 지시된 시점에서 RNA 분리를 위해 다양한 생물의 유도인자로 처리된 고추 잎을 수확하였다. 살리실 산(SA)는 병원체 공격에 대항하는 식물 방어반응을 활성화하는 신호전달체계의 중요한 구성요소이다 (Durner et al., 1997). 고추식물에 10 mM SA가 뿌려질 때, CaUGT1 과 CaPR-1 전사체들의 발현은 축적되었으나 (도 9), 분석된 2개의 유전자 사이에서 유도의 타이밍(timing)은 서로 달랐다. CaUGT1 전사체는 SA 처리 후 4시간만큼 빨리 축적되었다. 발현은 처리 24시간 후에 최대 수준에 도달되었고 처리 36시간 후에 감소되었다; 그러나, CaPR-1의 최대 발현 수준은 처리 24시간과 36시간에 도달되었으며, 처리 48시간후에 감소되었다 (도 9). 이러한 결과는 양성 대조군으로써 사용된 CaPR-1처럼, CaUGT1 전사체가 축적되었음을 나타낸다 (도 2-6).
- <98> 에틸렌 (ethylene)은 역시 식물 방어반응에서 신호전달체계의 중요한 구성요소이다 (Chang et al., 1999). ethylene-releasing compound인 에테폰 (ethephon)은 방어반응의 유도인자으로써 사용될 수 있다 (Memelink et al., 1990). 고추식물을 10mM 에테폰 용액으로 처리하였고, total RNA 추출을 위해 지정된 시간 간격에서 고추식물을 수확하였으며 반면, 대조 식물을 dH2O로 처리하였다. 도 10은 10 mM 에테폰 처리에 대한 CaUGT1 mRNA 축적의 시간 과정 (time course)을 보여준다. 상기 분사로부터 생길 수 있는 다른 어떤 스트레스 (stress)에 의해 유도된 CaUGT1 유전자 발현을 제외하기 위해 대조군으로써 dH₂O를 사용하여 모의 처리 (mock treatment)를 수행하였다. 비교를 위해, 에테폰 처리에 의해 유도되는 것으로 알려진 CaPR-1 유전자의 반응을 설명하기 위해 같은 RNA blot을 역시 혼성화 하였다 (Brederode et al., 1991). 모의-처리된 잎들에서 CaUGT1 과 CaPR-1의 축적은 탐지되지 않았다 (도 10). CaUGT1 전사체는 에테폰 처리 6시간 후에서 축적하기 시작하였고, 그 후 24시간까지 증가하였다. 에테폰 처리 24시간 후 양성 대조군인 CaPR-1의 강력한 유도가 관찰되었고, CaUGT1이 CaPR-1 발현보다 적어도 6시간 먼저 유도되었음을 나타내었다 (도 10). 이러한 데이터는 CaUGT1 유전자의 유도 형태가 에테폰 처리에 의해 담배에서 유도되는 것으로 알려진 PR 유전자에 속하는 CaPR-1 유전자의 그것과 거의 동일하다는 것을 나타낸다 (Brederode et al., 1991).
- <99> CaUGT1 유전자의 유도가 methyl jasmonate (MeJA)에 대하여 일어나는지를 시험하기 위해, SA 처리에 대한 것과 같은 방법을 이용하여 100 μ M MeJA를 사용하였다 (도 11). MeJA 처리에 의해 유도되는 것으로 보고되어 온 (Shin et al., 2001) proteinase inhibitor II gene (PinII) (Shin et al., 2001)는 양성 대조군으로 사용되었다. northern blot 분석은 CaPinII 전사체가 MeJA 처리에 의해 축적되었음을 보여내었으나, CaUGT1 전사체는 거의 탐지되지 않았다 (도 11).
- <100> 실험결과 8. 다양한 자극으로 처리시 CaUGT1의 발현 형태
- <101> CaUGT1 유전자의 유도가 베인 상처(incision wounding)에 대하여 일어나는지를 조사하기 위하여, 상처-처리된 잎들로부터 RNA를 추출하였다. 국부 상처 처리를 위해 고추 잎에 베인 상처를 내고, 상처의 전신 반응의 테스트를 위해 상부의 잎들을 떼어내었다 (도 12). 국부와 전신 상처에 의해 유도되는 것으로 보고되어 온 proteinase inhibitor II gene (PinII) (Shin et al., 2001)를 양성 대조군으로써 사용하였다 (Green and Ryan, 1972). northern blot 분석은 CaPinII 전사체가 예상대로 국부와 전신 반응 둘 다에서 베인 상처에 의해 유의하게 유도되었다는 것을 나타내었다. 이에 반해서, CaUGT1 전사체는 국부 상처 처리의 1시간 후 축적하기 시작하였고 2시간에서는 최대 수준에 도달하였으나, 전신 상처에서는 거의 탐지되지 않았다 (도 12).
- <102> 일반적으로 제초제로 알려진 herbicide methyl viologen (MV)는 광합성 하는 동안 photosystem I와 II에 손상을 일으키는 superoxide radicals를 발생 한다 (Dodge, 1994). 50 μ M MV solution에 담가둔 뿌리 뽑은 고추식물의 잎에 total RNA 추출 전 다양한 시간 동안 같은 solution으로 분사하였고, 도 13은 처리에 대한 CaUGT1 mRNA의 축적의 시간 과정을 보여준다. Ascorbate peroxidase (APX) 유전자는 H₂O₂ 처리에서 유도되는 것이라고 보고되었고, 고추로부터 분리된 APX (CaAPX1이라고 명명됨)를 MV 처리를 위한 양성 대조군으로써 사용하였다 (Yoo et al., 2002). CaUGT1 유전자의 발현은 처리 12시간 내에 시작되었고 처리 후 24시간까지 유지되었다 (도 13).
- <103> 식물 호르몬의 CaUGT1 전사체에 미치는 영향을 분석하기 위하여, abscisic acid (ABA)를 고추 잎에 적용하였다. 도 14에 보여지는 바와 같이, 대조군과 처리된 샘플에서 CaUGT1 전사체의 축적에 아무런 변화가 없었다.

- <104> 실험결과 9. CaUGT1의 조직-특이적 발현
- <105> 고추식물의 여러 기관에서 CaUGT1의 정상 상태 전사 수준을 시험하기 위하여, total RNA를 레드 (ripe)와 그린 (unripe) 고추열매, 새로 난 잎과 오래된 잎, 뿌리, 줄기, 및 꽃으로부터 추출하였다 (도 15). CaUGT1의 3' untranslated region (UTR)을 특이 프로브(probe)로써 사용하였다. CaUGT1 유전자의 전사체는 그린 고추열매와 레드 고추열매에서 아주 많이 축적되었다. 그러나, 상기 전사체는 뿌리, 줄기, 꽃, 및 잎에서는 사실상 없었다 (도 15). 이러한 결과는 CaUGT1 유전자의 발현 형태가 열매 조직-특이적이라는 것을 보여준다.
- <106> 실험결과 10. 고추에서 CaUGT1 mRNA의 억제
- <107> 바이러스-유도 유전자 억제 (Virus-induced gene silencing, VIGS)는 유전학적으로 식물을 형질전환할 필요없이 유전자의 발현을 녹아웃 (knocking out)하는 데 매력적이고 신속한 대안을 제공한다. 식물에서 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 생물학적 기능을 시험하기 위하여, 고추에서 특이적으로 유전자를 억제하는 것을 TRV를 이용한 VIGS 방법을 사용하였다 (도 16a). pTRV1과 pTRV2 VIGS 벡터들은 (Liu et al., 2002)에서 설명되어 왔다. TRV 클론이 고추식물에서 유전자 억제를 유도할 수 있는 지를 시험하기 위하여, endogenous phytoene desaturase gene (PDS)의 발현을 억제하는 TRV-VIGS 벡터의 능력을 고추식물에서 시험하였다. 고추 PDS (pTRV2::CaPDS)를 수반하는 pTRV2와 pTRV1을 포함하는 아그로박테리움(Agrobacterium) 배양 혼합물은 3-주된-고추식물 (3-week-old-hot pepper)의 아래쪽 잎에 침투시켰다 (도 16b). pTRV2::CaPDS로 감염된 고추 식물은 아크로-침투-10일 후 아래쪽 잎에서 광-표백된 표현형 (photo-bleached phenotype)을 발달시켰고, 적어도 1개월 동안 흰색이 남았다 (도 16c).
- <108> CaUGT1 유전자의 기능을 시험하기 위하여, 고추식물에서 TRV-VIGS assay를 사용하여 VIGS를 수행하였다. 1개월 후, TMV-P₀를 처리하였고, 잎을 36시간에서 샘플로 만들었다. 고추식물에서 CaUGT1의 억제는 발현이 억제되지 않은 식물 또는 벡터 대조군 식물과 비교하여 TMV-P₀에 대항하는 HR phenotype을 더 지연시킴을 보여주었다 (도 17a). HR 부위의 갯수를 조사하기 위하여, TMV-P₀로 처리된지 48시간 후 잎들의 절반을 100% 에탄올로 탈색하였다. CaUGT1의 억제도 또한 HR 부위 형성을 초래하였다. 그러나, CaUGT1이 발현 억제된 고추식물은 발현 억제되지 않은 식물 또는 벡터 대조군 식물보다 더 적은 HR 부위를 나타내었다.
- <109> 고추 잎에서 CaUGT1 유전자가 TMV 저항성과 관련되어 있는지를 더 확인하기 위하여, TMV 외피단백질 (coat protein, CP)의 축적을 테스트하기 위한 ELISA를 수행하였다. 바이러스 복제의 지표 (indicator)로써 TMV 바이러스 외피단백질 (CP)의 축적을 사용하였다 (Asurmendi et al., 2004). 대조군 식물에서 TMV CP의 축적 형태를 위해, 발현 억제되지 않은 wild형 식물과 벡터 대조군 식물을 TMV-P₀ 감염된 후 ELISA에 의해 시험하였다. TMV-P₀로 처리된 후, CaUGT1 발현 억제된 잎을 역시 샘플로 만들고 단백질을 추출하여, total 단백질 중 60 ?g마다 405 nm (A405)에서 흡광도로써 표현되는 ELISA에 의한 TMV CP 축적을 측정하였다 (도 18). TMV CP는 억제된 CaUGT1 식물에서 대부분 축적된 반면, pTRV2 벡터 대조군 식물 및 wild-형 발현 억제되지 않은 식물에서는 TMV CP가 더 낮게 축적되었으며, 이것은 TMV 복제가 CaUGT1 발현 억제된 식물에서 더 높다는 것을 나타낸다.
- <110> 분자 수준에서 CaUGT1 억제를 확인하기 위하여, semiquantitative RT-PCR을 수행하였다. HR 부위를 조사하기 위하여 테스트한 반쪽 잎의 다른 반쪽 잎은 RT-PCR을 위한 RNA 추출을 위해 사용하였다. 도 19은 CaUGT1 유전자가 고추식물에서 발현 억제가 잘됨을 보여준다. 지연되고 감소된 HR 부위 때문에, CaUGT1은 또한 CaUGT1의 억제가 PR 유전자의 발현 수준에 영향을 미칠 수 있는 지를 테스트하였다. 대조군과 비교할 때 CaPR-1, CaPR-2, CaPR-4, 및 CaPR-10의 발현 유도 수준에서는 별 차이가 없었다. 반면에, 단지 CaPR-5가 CaUGT1이 발현 억제된 고추식물에서 (발현 억제된 수준이 더 낮거나 높던 지간에 상관없이 완전히 감소 조절된 것을 보여주었다 (도 19). 이러한 결과는 CaUGT1 유전자가 PR 유전자보다 upstream에 위치하고 HR에 영향을 미칠 수 있는 CaPR-5의 수준을 조절할 수 있음을 나타낸다.
- <111> 실험결과 11. 고추 열매에서의 CaUGT1 mRNA의 억제
- <112> 기관 특이적 RNA 혼성 결과가 CaUGT1 유전자의 발현 형태가 조직-특이적임을 나타내었기 때문에 (도 15), CaUGT1 유전자는 고추 열매에서 발달상의 기능과 관련될 것이라고 추측할 수 있다. CaUGT1 유전자가 고추 열매와 관련되어 있는 지를 확인하기 위하여, CaUGT1 발현 억제된 고추식물로부터 얻은 열매를 열매가 익을 때까지 조사하였다. 벡터 대조군 그린 고추열매가 완전히 레드로 2일에 걸쳐 바뀌었으므로, CaUGT1 억제된 고추열매는 ripening 표현형에서 지연됨을 보여주었다 (도 20a). 대조군이 완전히 레드로 바뀐 후 15일 동안 CaUGT1 억제된 고추열매를 관찰하였고 부분적으로 그린 잎이 남아있었다. 그러나, CaUGT1의 억제는 다른 기관에서 식물 성장 또는

발달에 아무런 영향이 없었다 (도 20b).

<113> 실험결과 12. 담배 식물에서의 CaUGT1와 상동성 유전자인 NbUGT1 mRNA의 억제

<114> *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000은 토마토와 애기장대에 병을 일으키는, 널리 연구된 모델 식물 병원체이다. PstDC3000은 숙주세포에 박테리아 effector 단백질을 직접적으로 전달하기 위하여 type III secretion system (TTSS)을 사용하며, 이는 식물에 병원체에 대항하는 저항성을 위한 programmed cell death (PCD)를 초래한다 (Galan and Collmer, 1999). 식물 면역의 gene-for-gene model에서는, 질병 저항성은 식물 저항성 (R) 단백질에 의한 무독성 병원체 (pathogen avirulence, Avr) effector 단백질의 인식에 의해 시작된다. *N. benthamiana* 앞에서 AvrPto 와 Pto (tomato R protein)의 아그로박테리움-매개된 일시적 동시발현 (Agrobacterium-mediated transient co-expression)이 HR-관련된 세포사멸을 유도하기 때문에, Pta-매개된 PCD (Pto-mediated PCD)에 필요한 signaling components는 wild 담배 종인 *N. benthamiana*에서 보존된다 (Schofield et al., 1996). 쥐의 pro-apoptotic 단백질인 Bax는 식물에서 HR과 유사하게 PCD를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Kawai-Yamada et al., 2001; Lacomme and Santa Cruz, 1999). Bax는 pro-apoptotic 단백질의 Bcl-2 family에 속하며, 미토콘드리아에 위치하고, cytochrome c를 포함하는 pro-apoptotic factors의 분비를 초래함으로써 PCD를 개시하는 것으로 여겨진다 (Jurgensmeier et al., 1998). CaUGT1 유전자가 PCD pathways와 관련있는 지를 테스트하기 위하여, *N. benthamiana*에서 CaUGT1에 상동성인 유전자인 NbUGT1 유전자를 *N. benthamiana*에서 발현 억제하였다. VIGs를 TRV-VIGS assay로 수행하기 때문에, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 및 agrobacterium-containing BAX와 pBTEX::Avr 및 pBTEX::Pto 클론들의 co-expression을 *N. benthamiana* 앞에 접종하였다 (도 21). 접종 시점으로부터 48시간 후, NbUGT1이 억제된 식물 앞에서는 Avr/Pto-mediated PCD가 72시간 후 나타났더라도 단지 PstDC3000-매개된 PCD만을 보여준 반면, 발현 억제되지 않은 wild-형 또는 벡터 대조군 앞들은 PstDC3000-과 Avr/Pto-매개된 PCD를 동시에 보여주었다 (도 22a). 접종으로부터 72시간되는 시점에서, Bax-매개된 PCD는 또한 발현 억제되지 않은 wild-형 또는 벡터 대조군 앞들에서 관찰되었다. 그러나, Bax-매개된 PCD가 NbUGT1 발현 억제된 식물 앞에서는 역시 지연되었다 (도 22a). 분자수준에서 NbUGT1 억제를 확인하기 위하여, semiquantitative RT-PCR을 수행하였다. 앞에서 NbUGT1 발현의 기초 수준 (basal level)이 없기 때문에, NbUGT1을 유도하는 에테폰으로 *N. benthamiana* 식물을 처리하였다. 도 22b에서 보여지는 바와 같이, 대조군과 다르게 *N. benthamiana* 앞에서 NbUGT1 유전자의 발현이 억제되었다. 이러한 모든 결과로써, NbUGT1 유전자가 R gene-매개된 PCD pathway 또는 알려지지 않은 PCD pathway와 관련있을 것이라고 제안한다.

<115> 실험결과 13. CaUGT1::smGFP 단백질의 세포내 위치

<116> CaUGT1의 세포내 분포를 확인하기 위하여, 형광표지 (fluorescent marker)로써 soluble-modified green fluorescent protein (smGFP)와 융합된 CaUGT1을 사용하여 생체내 표적화 실험을 수행하였다 (Davis and Viestra, 1996; Park et al., 2001). CaUGT1 코딩 부위를 smGFP와 융합하고 (도 23a), polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation method를 사용하여 그 구조체(resulting construct)를 고추 원형질체 (protoplasts)에 주입하였다 (Abel and Theologis, 1994). 35S 콜리플라워 모자이크 바이러스 프로모터 (35S cauliflower mosaic virus promoter)의 제어 하에 있는 주입된 융합 유전자는 고추 원형질체에서 강력하게 발현되는 것으로 밝혀졌다 (Reichel et al., 1996). 상기 융합 단백질 CaUGT1::smGFP의 위치는 형광현미경 (fluorescence microscope)으로 가시화함으로써 확인되었다. 도 23에서 보여지는 바와 같이, 상기 융합 단백질은 세포 내부 전체에서 축적되었다. 이는 단백질이 cytosol에서 고농도로 분포하는 것을 나타내며, 대조군 smGFP 또한 세포내부 전체에서 균일하게 확인되었다.

발명의 효과

<117> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 고추식물에서 열매-특이적으로 발현하는 UDP-글루코실트랜스퍼라제가 고추식물의 병저항성 반응에서도 발현이 특이적으로 증가되어 기능을 수행함을 규명하고, 이러한 유전자를 고추식물에 도입함으로써, 고추식물의 방어반응을 증가시키고, 열매의 숙성이 촉진된 형질전환 식물을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

<118>

참고문헌

References

- Abel, S., Theologis, A. (1994) Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: A versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* 5: 421-427.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Stuhl, K. (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley, NY.
- Baunsgaard, L., Fuglsang, A.T., Jahn, T., Korthout, H.A., de Boer, A.H., Palmgren, M.G. (1998) Developmental and Stress Regulation of RCI2A and RCI2B, Two Cold-Inducible Genes of *Arabidopsis* Encoding Highly Conserved Hydrophobic Proteins. *Plant J.* 13: 661-671.
- Bayer, M.H. (1982) Genetic tumors: physiological aspects of tumor formation in interspecies hybrids. In *Molecular Biology of Plant Tumors* (Kahl, G. and Schell, J., eds). New York: Academic Press: 33-67.
- Bill, R.M., Revers, L., Wilson, I.B.H. (1998) *Protein Glycosylation*. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Boss, P.K., Davies, C., Robinson, S.P. (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111: 1059-1066.
- Boukema, I.W. (1982) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsl.* 3: 47-48.
- Boukema, I.W. (1982) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* in *Capsicum* L. *Euphytica* 29: 433-439.
- Brederode, F.T., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol. Biol.* 17: 1117-1125.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., Henrissat, B. (1998) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 329: 719.
- Chang, C., Shockey, J.A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 352-358.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi,

<119>

- K., Hohn, T., Dangel, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002) Expression Profile Matrix of *Arabidopsis* Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. (2000) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical importance. *J. Cell Biochem.* 34: 40-51.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 22: 442-451.
- Dangel, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dangel, J.L., Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- David, S.J., Viestra, R.D. (1996) Soluble derivatives of green fluorescent protein (GFP) for use in *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World* 3: 43-48.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 547-575.
- Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E. (1999) Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays*. 21(5): 412-421.
- Dodge, A.D. (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes; In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. New York; CRC Press.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316-323.
- Dong, X., Mindrinos, M., Davis, K.R., Ausubel, F.M. (1991) Induction of *Arabidopsis* Defense Genes by Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae* Strains and by a Cloned Avirulence Gene. *The Plant Cell* 3: 61-72.
- Durney, J., Shah, J., Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.
- Ecker, J.R. (1995) the ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.
- Fedoroff, N.V., Furtek, D.B., Nelson, O.E. (1984) Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element

<120>

- activator (Ac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3825-3829.
- Finley, D., Chau, V. (1991) Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 25-69.
- Finley, D., Varshavsky, A. (1985) The ubiquitin system: function and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 10: 343-346.
- Ford, C.M., Boss, P.K., Hoj, P.B. (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *J. Biol. Chem.* 273: 9224-9233.
- Galan, J.E., Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Giovannoni, J. (1993) Molecular biology of fruit developmental and ripening. In: J. Bryant (Ed.) *Methods in Plant Molecular Biology*, Academic Press, New York, 253-287.
- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. 2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 301-308.
- Graham, M.Y. (2005) The Diphenylether Herbicide Lactofen Induces Cell Death and Expression of Defense-Related Genes in Soybean. *Plant Physiol.* 2005 Nov 18. preview.
- Green, T.R., Ryan, C.A. (1972) Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves. *Science* 175: 776-777.
- Greenberg, J.T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 525-545.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (1988) Flavone and flavonol glycosides. In *The Flavonoids*, J.B. Harborne, ed. London, Chapman and Hall: 303-328.
- Harner, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Orchestrated Transcription of Key Pathways in *Arabidopsis* by the Circadian Clock. *Science* 290: 2110-2113.
- Hedden, P., Kamiya, Y. (1977) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 431-460.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 20(13): 3901-7.
- Jin, X., Zhang, L., Lou, M. (2001) Hepatocyte targeted DNA carrier L-PEI: the lactosylated polyethyleneimine and transfection in vitro. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 15(4):345-348.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Breiden, D., Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4997-5002.
- Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., Uchimiya, H. (2001) Mammalian Bax-induced plant cell death can be downregulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12295-12300.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K. (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol. Plantarum* 108: 51-60.
- Kim, Y.S., Park, J.Y., Kim, K.S., Ko, M.K., Cheong, S.J., Oh, B.J. (2002) A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol Biol.* 49(2): 125-135.
- Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lelu, M.A., Charest, P.J. (1997) *Larix laricina* (tamarack) somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J. For. Res.* 27: 538-550.
- Lacomme, C., Santa Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7956-7961.
- Lee, H.I., Raskin, I. (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274: 36637-36642.
- Lee, S., Kim, S.Y., Chung, E., Joung, Y.H., Pai, H.S., Hur, C.G., Choi, D. (2004) EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Funct. Integr. Genomics* 4: 196-205.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31(6): 777-786.
- Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., Nebert, D.W. (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7(4): 255-269.
- Mahiga, P. (1995) Biolistic transformation of tobacco cells with nuclear drug resistance genes. In: Mahiga, P., Klessig, D.F., Cashmore, A.R., Grissom, W., Varner, J.E. (eds) *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring

<121>

<122>

- Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 37-54.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W. (1999) Isolation of a cytokinin gene, ZOG, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 284-289.
- Medina, J., Catala, R., Salinas, J. (2001) Developmental and Stress Regulation of RCI2A and RCI2B, Two Cold-Inducible Genes of Arabidopsis Encoding Highly Conserved Hydrophobic Proteins. *Plant Physiol.* 125: 1655-1666.
- Memelink, J., Linthorst, H.J.M., Schilperoort, R.A., Hoge, J.H.C. (1990) Tobacco genes encoding acidic and basic pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.* 14: 119-126.
- Mich'ele, C. Heath (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Moehs, C.P., Allen, P.V., Friedman, M., Belknap, W.R. (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* 11: 227-236.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J., Varshavsky, A. (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* 6: 1429-1439.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., Yoo, J.S., Paek, K.H. (2002) Introduction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* 48: 243-254.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., Yoo, T.H. Paek, K.H. (2001) A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Mol. Cells* 28: 122-127.
- Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R., Paek, K.H. (2001) Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13: 1035-1046.
- Park, M.H., Wolff, E.C. (1988) Cell-free synthesis of deoxyhypusine. Separation of protein substrate and enzyme and identification of 1,3-diaminopropane as a product of spermidine cleavage. *J. Biol. Chem.* 263: 15264-15269.
- Park, M.H., Lee, Y.B., Joe, Y.A. (1997) Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol. Signals* 6: 115-123.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thoruma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., Broekaert, W.F. (1998)

- Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 2103-2114.
- Reichel, C., Maas, C., Schulze, S., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1996) Cooperative binding to nucleic acids by barley yellow mosaic bymovirus coat protein and characterization of a nucleic acid-binding domain. *J. Gen. Virol.* 77: 587-592.
- Roig, P., Gil, M.L., Martinez, J.P., Gozalbo, D. (2000) Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* UBI3 gene coding for a ubiquitin-hybrid protein. *Yeast* 16: 1413-1419.
- ROSS, A.F. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. (1996) Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., Staskawicz, B.J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274: 2063-2065.
- Sepúlveda, P., Cervera, A., López-Ribot, J.L., Chaffin, W.L., Martínez, J.P., Gozalbo, D. (1996) Cloning and characterization of a cDNA coding for *Candida albicans* polyubiquitin. *J. Vet. Med. Mycol.* 34: 315-322.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W., Paek, K.H. (2001) Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Science* 161: 727-737.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niemí, T., Dyer, W.E., Ho, T.D., Qu, R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.* 155: 1-9.
- Smith, H.H. (1972) Plant genetic tumors. *Prog. Exp. Tumor Res.* 15: 138-159.
- Smith, H.H. (1988) The inheritance of genetic tumors in *Nicotiana* hybrids. *J. Heredity* 79: 277-283.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., Tonelli, C. (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 24: 743-755.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Metraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Szerszen, J.B., Szczygłowski, K., Bandurski, R.S. (1994) iaglu, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 265: 1699-

- 1701.
- Tai, H.L., Chen, C.C., Yeh, K.T. (1999). Xanthogranulomatous cystitis associated with anaerobic bacterial infection. *J. Urol* 162: 795-796.
- Van Loon, L.C., Gerritsen, Y.A.M., Ritter, C.E. (1987) Identification, purification and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 9: 593-609.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 245-264.
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Vigers, A.J., Wiedemann, S., Roberts, W.K., Legrand, M., Selitrennikoff, C.P., Fritig, B. (1992) Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci.* 83: 155-161.
- Warnecke, D.C., Baltrusch, M., Buck, F., Wolter, F.P., Heinz, E. (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: Cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* 35: 597-603.
- Yamazaki, M., Gong, Z., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T., Saito, K. (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J. Biol. Chem.* 274: 7405-7411.
- Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11(13): 1621-39.
- Yoo, T.H., Park, C.J., Lee, G.J., Shin, R., Yun, J.H., Kim, K.J., Rhee, K.H., Paek, K.H. (2002) A hot pepper cDNA encoding ascorbate peroxidase is induced during the incompatible interaction with virus and bacteria. *Mol. Cells* 14: 75-84.

<125>

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1는 마이크로어레이 (microarray) 분석을 나타낸다. TMV- 및 Xcv-반응성 전사체를 동정하기 위해서, 마이크로어레이 분석이 수행되었다 (Kim et al., 2006; manuscript in preparation).
- <2> 도 2는 northern blot 분석에 의한 마이크로어레이 분석과 EST 클론을 스크리닝한 것이다. TMV-반응성 전사체를 동정하기 위해서, northern blot 분석을 수행하였고 유전자를 마이크로어레이 칩으로부터 선택하였다 (Kim et al., 2006; manuscript in preparation).
- <3> 도 3는 Marathon procedure 개략도이다. rapid amplification of cDNA ends (RACE)를 이용하여 고추 잎 cDNA 라이브러리로부터 full-length cDNA 클론을 분리하였다. 이 도면은 서로 다른 반응산물이 생성되는 순서를 보여 준다. full-length cDNA를 얻기 위하여, adaptor-ligated double strand cDNA로 long distance (LD) PCR을 수행하기 위해 5'과 3' 유전자-특이적 프라이머를 사용하였다.
- <4> 도 4는 CaUGT1 cDNA의 뉴클레오타이드와 추정되는 아미노산 서열이다. 별표 (*)는 전사 종결코돈을 지시한다.
- <5> 도 5는 CaUGT1의 예상되는 아미노산 서열과 다른 식물 UDP-글루코실트랜스퍼라제와의 alignment이다. *Capsicum annuum*, *Fragaria ananassa* (AAU09443), *Citrus unshiu* (Q9MB73), *Arabidopsis thaliana* (AAU93568), *Nicotiana tabacum* (AAF61647) 및 *Lycopersicon esculentum* (CAI62049)으로부터 얻은 UDP-글루코실트랜스퍼라제의 서열을 비교하였다. alignment는 Lasergene Megalign program (DNASTAR, USA)를 사용함으로써 용이하였다.
- <6> 도 6는 CaUGT1 유전자의 southern blot 분석이다. hot pepper cv. Bugang으로부터 분리된 고추 genomic DNA를 제한효소, EcoRI (E), XbaI (X) 및 HindIII (H)로 절단하였고, 그 단편을 0.8% 아가로스 겔에서 분리하였다. DNA를 nylon membrane에 옮기고 그 blot을 ³²P-표지된 3'-UTR CaUGT1 cDNA probe와 혼성화하였다. Fuji-BAS 2500 phosphorimage analyzer 로 autoradiogram을 가시화하였다. DNA size standards의 이동위치 (migration position)은 왼쪽에 나타내었다.
- <7> 도 7는 TMV-P₀ 또는 TMV-P_{1,2}로 접종시 CaUGT1의 차등 발현 형태를 나타낸다. 접종 후 적어도 0, 6, 12, 24 및 72 시간에서 잎으로부터 total RNA를 추출하였다. 대조군으로써, 접종 buffer와 카보린덤으로만 잎을 mock-접종하였다. 상기 blot을 특이적 probe로써 ³²P-표지된 CaUGT1 cDNA의 3'-UTR 부위를 사용하여 혼성화하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaPR-1 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.
- <8> 도 8는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)를 접종시 시간에 따른 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. Xcv에 대한 저항성 고추 재배종 (ECW-20R)과 감염되기 쉬운 재배종 (ECW)에 병원성 Xcv 배양균을 침투

시켰다. 0, 6, 12, 18, 24, 36 및 48시간에서 앞으로부터 total RNA를 얻었다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaPR-1 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.

- <9> 도 9는 살리실산 (SA)에 의한 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. SA 처리의 분석을 위해, 고추 잎을 10 mM SA로 처리하였고, total RNA를 지시된 같은 시간대에 떼어냈다. 특이적 probe로써 CaUGT1 cDNA의 ³²P-표지된 3'-UTR 부위를 사용하여 65°C 조건에서 혼성화를 수행하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaPR-1 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.
- <10> 도 10은 에테폰 (ethephon)에 의한 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. 에테폰 처리의 분석을 위해, 고추 잎을 10 mM 에테폰으로 처리하였고, total RNA를 위해 지시된 같은 시간대에 떼어냈다. 특이적 probe로써 CaUGT1 cDNA의 ³²P-표지된 3'-UTR 부위를 사용하여 65°C 조건에서 혼성화를 수행하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaPR-1 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.
- <11> 도 11은 MeJA에 의한 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. MeJA 처리의 분석을 위해, 고추 잎을 50 μM MeJA로 처리하였고, total RNA를 위해 지시된 같은 시간대에 떼어냈다. 특이적 probe로써 CaUGT1 cDNA의 ³²P-표지된 3'-UTR 부위를 사용하여 65°C 조건에서 혼성화를 수행하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaPinII 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.
- <12> 도 12는 절개 상처 (incision wounding)에 의한 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. 국부 상처 처리를 위해, 고추 잎을 가위로 절개하였고 상처의 전신반응의 테스트를 위해 위쪽 잎을 떼어냈다. 포름알데하이드-아가로즈 겔에서 RNA를 분리하였고, RNA를 nylon membrane에 옮겼다. 상기 blot을 CaUGT1 cDNA의 ³²P-표지된 3'-UTR 부위를 특이적 probe로써 사용하여 65°C 조건에서 혼성화하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaPinII 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.
- <13> 도 13은 MV에 의한 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. MV 처리의 분석을 위해, 고추 잎을 50 μM MV로 처리하였고, total RNA를 위해 지시된 같은 시간대에 떼어냈다. blot을 CaUGT1 cDNA의 ³²P-표지된 3'-UTR 부위를 특이적 probe로써 사용하여 65°C 조건에서 혼성화하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났고, CaAPX1 유전자는 양성 대조군으로 사용되었다.
- <14> 도 14는 ABA에 의한 CaUGT1 유전자의 발현 형태를 나타낸다. ABA 처리의 분석을 위해, 고추 잎을 100 μM ABA로 처리하였고, total RNA를 위해 지시된 같은 시간대에 떼어냈다. blot을 CaUGT1 cDNA의 ³²P-표지된 3'-UTR 부위를 특이적 probe로써 사용하여 65°C 조건에서 혼성화하였다. ethidium bromide-염색된 겔에서 rRNA 밴드들은 loading control로 나타났다.
- <15> 도 15는 northern blot 분석에 의한 다양한 고추식물 기관에서 CaUGT1의 발현 형태를 나타낸다. 라인들: R, 뿌리; S, 줄기; L, 잎; F, 꽃; GF, 녹색 열매 (unripe); RF, 붉은색 열매 (ripe). ethidium bromide-염색된 겔에서 28S 와 18S rRNA 밴드는 loading control로 나타났다.
- <16> 도 16은 고추식물에서 TRV 클론들을 포함하는 아그로박테리움의 접종 방법을 보여준다. (a)는 VIGS를 수행하기 위해 사용된 TRV 벡터이다 (Liu et al., 2002). TRV cDNA 클론들을 T-DNA 벡터에 있는 2개의 CaMV 35S 프로모터 (2× 35S)와 nopaline synthase terminator (NOST)사이에 도입하였다. RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; 16K, 16 kDa cysteine rich protein; MP, movement protein; CP, coat protein; LB 와 RB, T-DNA의 왼쪽과 오른쪽 경계 (left and right borders); Rz, self-cleaving ribozyme; MCS, multiple cloning site. (b)는 pTRV1을 포함하는 아그로박테리움 배양균과 CaPDS를 운반하는 pTRV2 (pTRV2::CaPDS)를 1:1 비율로 혼합하였고, 1 ml 바늘 없는 주사기를 사용하여 3주된 고추식물에 침투시켰다. (c) TRV1을 포함하는 아그로박테리움 배양균과 CaPDS를 운반하는 pTRV2 (pTRV2::CaPDS)를 1:1 비율로 혼합하였고, 1 ml 바늘 없는 주사기를 사용하여 3주된 고추식물에 침투시켰다.
- <17> 도 17은 CaUGT1이 발현 억제된 고추식물 잎에서 지연되고 감소된 HR을 나타낸다. (a)는 CaUGT1의 발현이 억제된 고추식물과 벡터 대조군 (pTRV2) 고추식물에서 TMV-P₀을 감염시켰다. (b)TMV-P₀로 감염된 지 48시간 후, 잎의 절반을 100% 에탄올로 탈색시켰다. 모든 HR 부위는 갈색으로 나타났다.
- <18> 도 18은 TMV P₀ 감염에 대해 벡터 대조군 식물체들과 wild-형 대조군 식물들, CaUGT1 발현 억제된 고추식물들과 mock 처리된 식물에서 TMV-P₀ 외피 단백질 (CP) 축적을 비교한 것이다. 고추식물체들이 TMV-P₀로 감염된 후,

total 단백질의 매 60 μ g 마다 405 nm (A405)에서 흡광도로써 표현되는 ELISA를 수행하기 위해 TMV-P₀ CP 탐지용 anti-TMV-P₀ IgG antibody를 사용하여 TMV-P₀ CP 축적을 측정하기 위해서 잎을 샘플로 만들었고 단백질을 추출하였다. 에러 바 (error bar)는 표준편차를 지시한다.

<19> 도 19는 CaUGT1 발현 억제된 고추식물에서 다양한 PR-유전자의 발현 수준을 나타낸다. CaUGT1 발현 억제된 고추식물을 TMV-P₀ 로 감염시켰고, 왼쪽 절반을 샘플로 만든 잎으로부터 RNA를 추출하였다. 다른 반쪽은 HR 부위를 측정하기 위해 사용하였다. pTRV2 벡터 대조군과 wild-형 대조군은 양성대조군으로써 사용되었으며, mock 처리된 식물은 음성대조군으로써 사용되었다. RNA의 대조군을 위해 CaActin을 사용하였다.

<20> 도 20은 CaUGT1 발현 억제된 고추 식물의 표현형을 나타낸다. (a)는 CaUGT1 발현 억제된 고추 열매와 pTRV2 벡터 대조군 열매의 숙성 형태 표현형을 나타낸다. 대조군 열매가 모두 붉은색으로 되었을 때 사진을 찍었다. 변화된 시점으로부터 대조군 열매와 같은 시점 또는 5일후 또는 15일후에서 CaUGT1 발현 억제된 열매를 나타내었다. (b)는 pTRV1을 포함하는 아그로박테리움 배양균과 CaUGT1을 운반하는 pTRV2 (pTRV2::CaUGT1) 아그로박테리움 배양균을 1:1 비율로 혼합하였고, 1 ml 마를 없는 주사기를 사용하여 3주된 고추식물에 침투시켰다.

<21> 도 21은 N. benthamiana에서 Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000, agrobacterium-containing BAX의 접종과 pBTX::Avr, pVTEX::Pto 클론들의 co-expression을 나타낸다. 잎들은 표시된 원안에서 agro-infiltrated (아그로박테리움이 접종) 되었고, agro-infiltration (아그로박테리움이 접종된 지) 2일 또는 3일 후에 사진을 찍었다.

<22> 도 22는 NbUGT1 유전자 발현 억제된 N. benthamiana 잎에서 PCD의 AvrPto- 와 BAX-매개된 저해 (inhibition)를 나타낸다. (a)는 NbUGT1 발현 억제된 잎을 wild-형 또는 단지 pTRV2 벡터 대조군만의 잎들과 비교하였다. agro-infiltration(아그로박테리움이 접종된 지)한 지 48시간 또는 72시간에 사진을 찍었다. (b) RT-PCR을 위하여, 10 mM 에테폰으로 담배식물을 처리하여 NbUGT1의 발현을 유도하였다. 양성대조군으로써 wild-형과 벡터 대조군 (pTRV2)을 사용하였고, mock를 음성대조군으로 사용하였다.

<23> 도 23은 CaUGT1::smGFP 융합 단백질의 세포내 위치를 나타낸다. (a)는 CaUGT1::smGFP 융합 유전자의 구조이다. (b)는 PEG-매개된 형질도입에 의해 고추식물 원형질체 세포에 CaUGT1::smGFP 융합 구조체 및 대조군 smGFP 구조체를 주입하였다. 형광 또는 광학 현미경을 사용하여 24시간 후에 주입된 유전자의 발현을 모니터하였다. cytosol 위치 마커로써 GFP를 사용하였다. 왼쪽 panel은 bright field 이미지를 보여준다. 오른쪽 panel은 GFP (green)과 chlorophyll (CH, red)의 오버랩을 보여준다.

도면

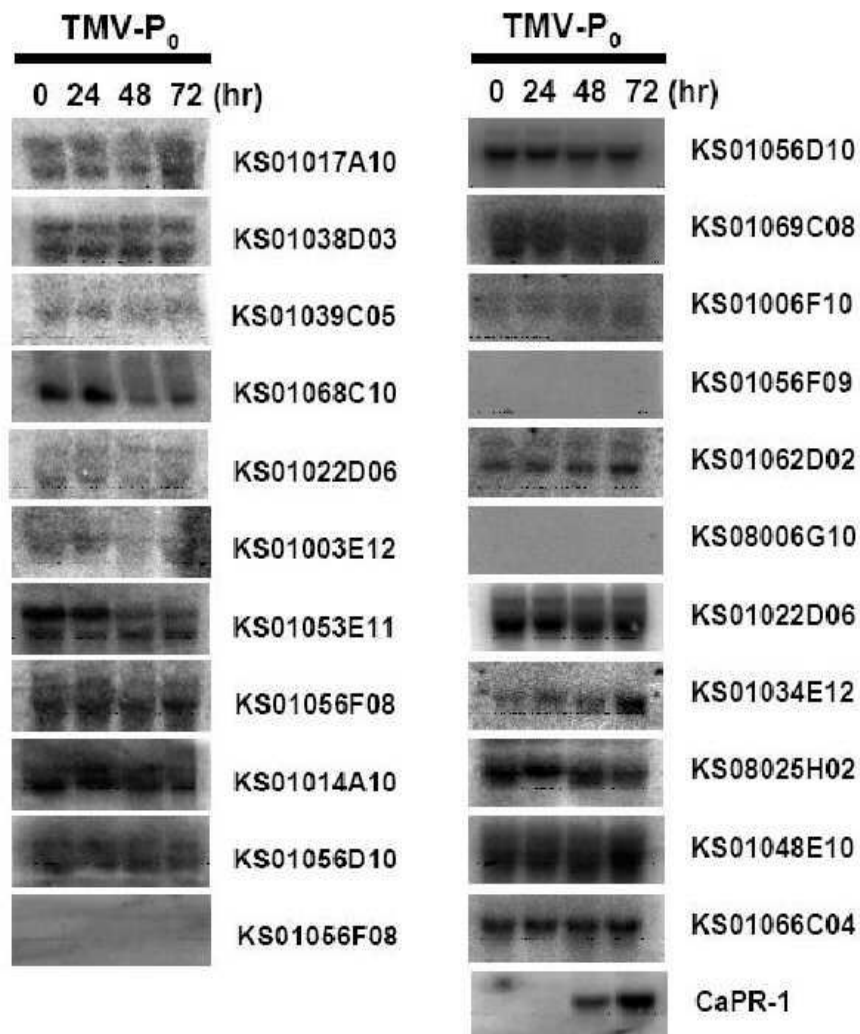
도면1a

		ECW_12 hr	ECW_24 hr	ECW20R_12 hr	ECW20R_24 hr
Name	ID	Log Ratio (635/532)	Log Ratio (635/532)	Log Ratio (635/532)	Log Ratio (635/532)
UDP-Glucosyltransferase	KS01051G11	0.61	0.058	2.844	1.145
Tumor-Related Protein	KS01071C06	-0.605	-0.996	-0.634	-1.35
Stress Related Protein	KS01067B09	0.922	0.527	1.769	0.027
Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A-I	KS01011B06	-0.76	0.516	-0.612	Error
Ubiquitin-Fusion Degradation Protein	KS07006F06	0.467	0.741	0.572	0.86
CaPR-10	CaPR-10	1.782	0.455	3.574	4.863
CaTin2	CaTin2	-0.876	-0.201	-1.278	-1.562

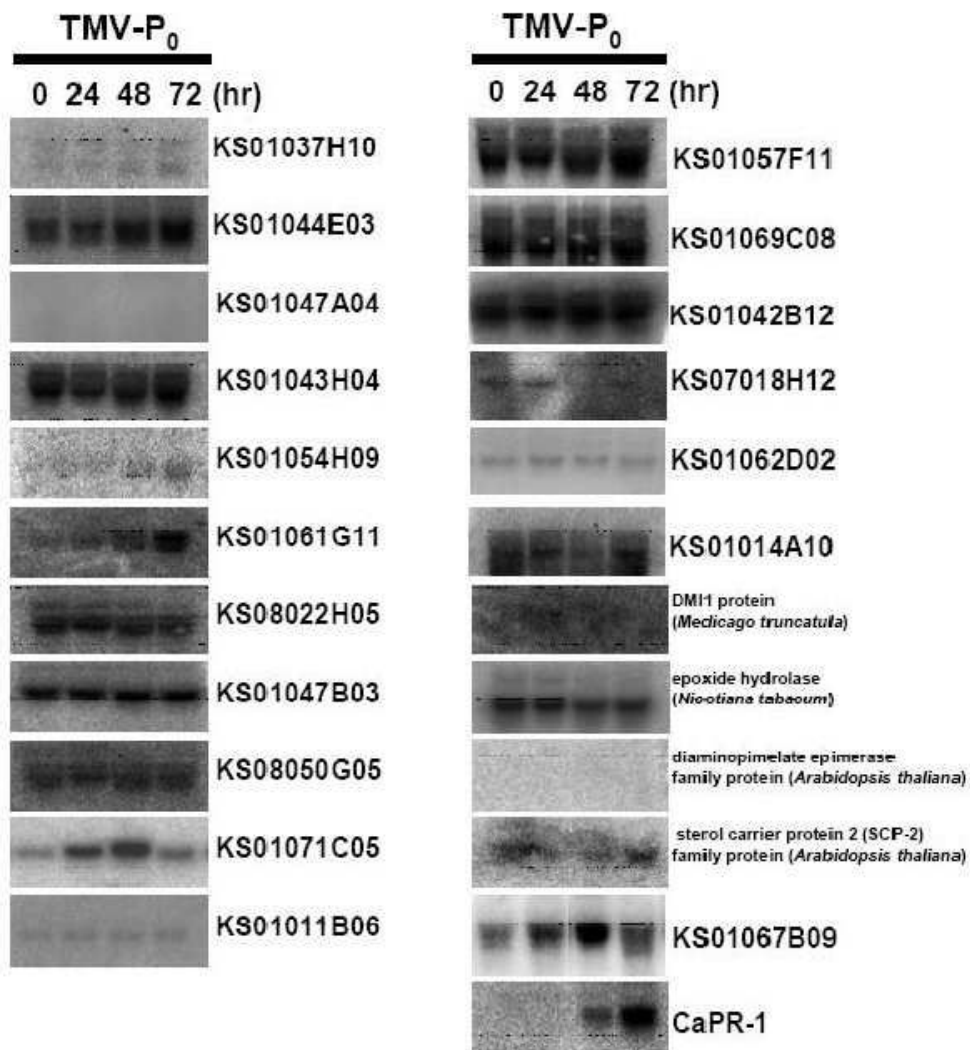
도면1b

		ECW_12 hr	ECW_24 hr	ECW20R_12 hr	ECW20R_24 hr
Name	ID	Log Ratio (635/532)	Log Ratio (635/532)	Log Ratio (635/532)	Log Ratio (635/532)
UDP-Glucosyltransferase	KS01051G11	0.61	0.058	2.844	1.145
Tumor-Related Protein	KS01071C06	-0.605	-0.996	-0.634	-1.35
Stress Related Protein	KS01067B09	0.922	0.527	1.769	0.027
Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A-1	KS01011B06	-0.76	0.516	-0.612	Error
Ubiquitin-Fusion Degradation Protein	KS07006F06	0.467	0.741	0.572	0.86
CaPR-10	CaPR-10	1.782	0.455	3.574	4.863
CaTin2	CaTin2	-0.976	-0.201	-1.278	-1.562

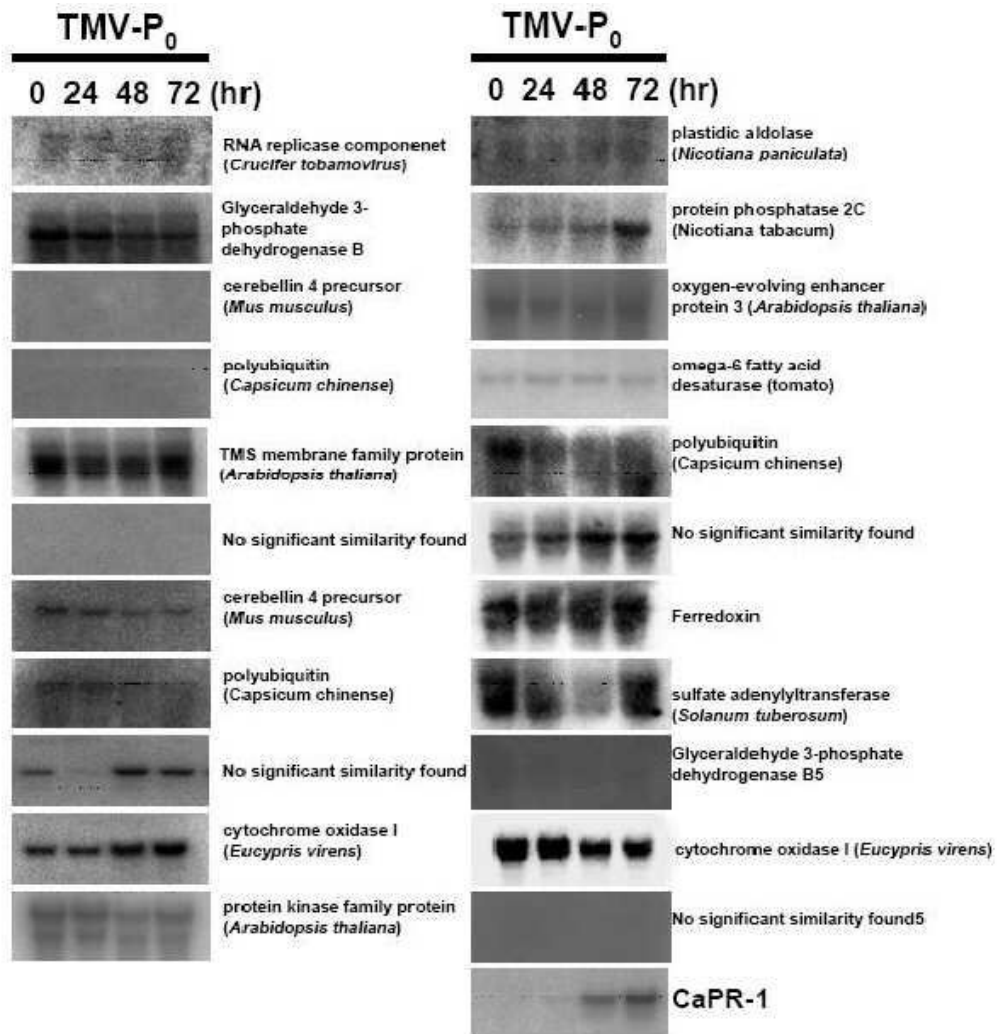
도면2a



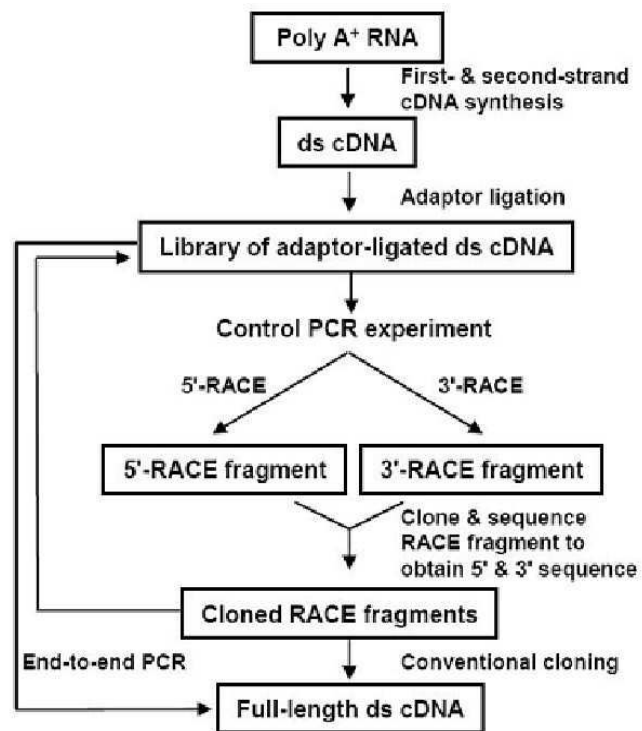
도면2b



도면2c



도면3



도면4a

```

                                     ccaaatccaacta
ttctctctctctatgtgttccctagctgctttcttccactaattttttttcaaaaaaga
atgggacataaagtaagtgagggcgcttcgctcatgctttcttctctctgtttccaggc
M G S K V S E G A L V H A F L V S F P G
caaggacatgttaaacctctaattagacttgctaaacgcctcgcttcgaaaggccttctt
Q G H V K P L I R L A K R L A S K G L L
gtcactttttcagcaccagaaaagttttgggtgccgaaatgaaaggagccaacccaaaaatc
V T F S A P E S F G A E M K G A N P K I
agctgtgaaccactccttatggtagtgggatgatgagatttgatttcttcgaagacgaa
S C E P T P Y G S G M M R F D F F E D E
tgggatcactcgaagcccgatggtaacgatttagagttgtaacttgcaacatcttgagctt
W D H S K P D G N D L E L Y L Q H L E L
atgggcaagaaaaatttacctaaaatgatcaagaaatgacggaacagggcagccctgtt
M G K K I L P K M I K K Y A E Q G S P V
tcgtgtttgattaataatccttttatcccttgggtttgtgatgttgctgagagccttggg
S C L I N N P F I P W V C D V A E S L G
atccctagtgctatgctttgggtacaatctgctgccagcttttcagcttattatcatcat
I P S A M L W V Q S A A S F S A Y Y H H
agtcataagcttagttccatttccctagtgaaatcgcaacctgaaattgatgttcaagtacct
S H S L V P F P S E S Q P E I D V Q V P
tgtatgcctttgttgaagtacgatgaagttccctagtttcttgcacccttcaagtcatat
C M P L L K Y D E V P S F L H P S S P Y
actttcttgaaaaacagccatttttaggccaattcaagaatatatccaaacttacctttata
T F L K T A I L G Q F K N I S K L T F I
cttatggaaactttccaagaacttgaacaagatgttgtaattacctctccaaaaaattt
L M E T F Q E L E Q D V V N Y L S K K F
cccatcaaaaccgttgggtcctctgttcaaatatccaaaagaactaggtcctacatctagt
P I K T V G P L F K Y P K E L G P T S S
gatgtccaaggtgattttatgaaggtagaaaattgcatagattggcttgatgcaaaatca
D V Q G D F M K V E N C I D W L D A K S
ccatcctctgtagtgtacatttcccttggtagtgtggtcataataaaaaagaacaagcg
P S S V V Y I S F G S V V I L K K E Q A
gaggaaatagcatatggattgttgaattcaggtgtgaactttttgtgggtcattaggcca
E E I A Y G L L N S G V N F L W V I R P

```

도면4b

```

cctaccaaactccaaaatfttgattcattattattacctagtgaafttctagaaaaagca
P T K L Q N F D S L L L P S E F L E K A
ggagatagagcgaaaatagtgcaatggtgtccacaagaacaagttttgtcccatccgtca
G D R A K I V Q W C P Q E Q V L S H P S
gtggcttgttttgtgacccactgtggttggaaatcaactctagaagcactttctagtggc
V A C F V T H C G W N S T L E A L S S G
atgcctgttttggcctttctcctcaatgggggtgatcaagtcaccgatgccaagtacatagtc
M P V L A F P Q W G D Q V T D A K Y I V
gatgtttttaaaattggacttggactatgtagaggtagtctgaaaataggattattccg
D V F K I G L G L C R G E S E N R I I P
agagaagaagtggagaaacgtgtaaggaggctatgaatgggccaagacggcagagttta
R E E V E K R V R E A M N G P K T A E L
aaagagaacgcgttgaaatggaagaagaaggcggaggaagcggtggctgcgggtggctcc
K E N A L K W K K K A E E A V A A G G S
tccgagaggaacttgcaaacittttggactatgtagaagtgtgtgatcgacgcacaaa
S E R N L Q T F V D Y V R S V *
acgtacgtgaagaatccatacacatgggtgtataattaatttgtctttatgataattgca
tattactatattcttgtctattattccataaataataagagatctcacttctttccgcgt
attgtaatgggtcaatttttcatcccgtaaatcctgtatcgttatctcaatttcaaaaac
taaataaaaatttgaaattatcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

도면5a

CaUGT1	M G S K V S E G - - - - - A L V H A F L V S F P G O G H V K P L I R L A K R	33
F.ananassa	M G S E S - - - - - L V H V F L V S F I G Q G H V N P L L R L G K R	29
C.unshiu	M G T E S - - - - - L V H V L V S F P G H G H V N P L L R L G R L	29
A.thaliana	M G S I S E M V F E T C P S P N F I H V M L V S F O G O G H V N P L L R L G K L	40
N.tabacum	M T T Q K - - - - - A H C L I L P Y P A Q G H I N P M L Q F S K R	28
L.esculentum	M T T H K - - - - - A H C L I L P Y P V Q G H I N P M L Q F S K R	28
CaUGT1	L A S K G L L V T F S A P S S F G A E M K G A N P K I S C E P T P Y G S G M M R	73
F.ananassa	L A A K G L L V T F C T A B C V G K E M R K S N - G I T D E P K P V G D G F R	68
C.unshiu	L A S K G F F D T L T T P S S F G R Q M R K A G - N F T Y E P T P V G D G F R	68
A.thaliana	I A S K G L L V T F V T T E L W G K K M R Q A N K I V D G E L K P V G S G S R	80
N.tabacum	L Q S K G V K I T I A A T K S F L K T M Q E L S T S V S V E A I S D G - - - -	63
L.esculentum	L R S K R V K I T I A L T K S F L K N M K E L P T S M S I E A I S D G - - - -	63
CaUGT1	F D F F E D E W D H S K P D G N D L E L Y L Q H L E L M G K K I L P K M I K K Y	113
F.ananassa	F E F F K D R W A E D E P M R Q D L D L Y L P Q L E L V G K E V I P E M I K K N	108
C.unshiu	F E F F E D G W D E D D P R R E D L D Q Y M A Q L E L I G K Q V I B K I I K K S	108
A.thaliana	F E F F D E E W A E D D D R R A D F S L Y I A H L E S V G I R E V S K L V R R Y	120
N.tabacum	- - - Y D D G G R E - - - J A G T F V A Y I T R F K E V G S D T L S Q L I G K L	97
L.esculentum	- - - Y D D G G R D - - - J A G T F V A Y I T R F K E I G S D T L S Q L I Q K L	97
CaUGT1	A E Q G S P V S C L I N N P F I P W V C D V A E S L G I P S A M L W V Q S A A S	153
F.ananassa	A E Q G R P V S C L I N N P F I P W V C D V A E S L G L P S A M L W V Q S A A C	148
C.unshiu	A E E Y R P V S C L I N N P F I P W V S D V A E S L G L P S A M L W V Q S C A C	148
A.thaliana	E E A N E P V S C L I N N P F I P W V C H V A E E F N I P C A V L W V Q S C A C	160
N.tabacum	T N C G C P V S C I V Y D P F L P W A V E V G N N F G V A T A A F F T Q S C A V	137
L.esculentum	A I S G C P V N C I V Y D P F L P W A V E V A K O F G L I S A A F F T Q N C V V	137

도면5b

CaUGT1	F S A Y Y H H S H S L V P F P S E S Q P E I D V Q V P C M P L - L K Y D E V P S	192
F.ananassa	L A A Y Y H Y Y H G L V P F P S E S D M F C D V Q I P S M P L - L K Y D E V P S	187
C.unshiu	F A A Y Y H Y F H G L V P F P S E K E P E I D V Q L P C M P L - L K H D E M P S	187
A.thaliana	F S A Y Y H Y Q D G S V S F P T E E P E L D V K L P C V P V - L K N D E I P S	199
N.tabacum	D N I Y Y H V H K G V L K L P P - C D V D K E I S I P G L L T - I E A S D V P S	175
L.esculentum	D N L Y Y H V H K G V I K L P P - C Q N D E E I L I P G F P N S I D A S D V P S	176
CaUGT1	F L H P S S P Y T F L K T A I L G Q P K N I S K L T F I L M E T F Q E L E Q D V	232
F.ananassa	F L Y P T S P Y P F L R R A I L G Q Y G N L E K P F C I L M D T F Q E L E S E I	227
C.unshiu	F L H P S T P Y P F L R R A I L G Q Y E N L G K P F C I L L D T F Y E L E K E I	227
A.thaliana	F L H P S S R P T G F R Q A I L G Q P K N L S K S F C V L I D S F D S L E Q E V	239
N.tabacum	F V S - N F E S S R I L E M L V N Q F S N L E N T D W V L I N S F Y E L E K E V	214
L.esculentum	F V I - S P E A E R I V E M L A N Q F S N L D K V D C V L I N S F Y E L E K E V	215
CaUGT1	V N Y L S K K F P I K T V G P L F R - - - Y P K H L G P T S S D V Q G D F M K V	269
F.ananassa	I E Y M A R L C P I R A V G P L F R - - - N P R A Q N - - - A V R G D F M E A	260
C.unshiu	I D Y M A K I C P I K P V G P L F R - - - N P K A P T L - - - T V R D D C M K P	261
A.thaliana	I D Y M S S L C P V K T V G P L F R - - - V A R T V T S - - - D V S G D I C K S	273
N.tabacum	I D W M A K I Y P I K T I G P T I P S M Y L D K R L P D D K E Y G L S V F K P M	254
L.esculentum	I D W M S K I Y P I K T I G P T I P S M Y L D K R L H D D K E Y G L S M P K P M	255
CaUGT1	E N - C I D W L D A K S P S S V V Y I S F G S V V I L K K E Q A E E I A Y G L L	308
F.ananassa	D D S I I G W L D T K P K S S V V Y I S F G S V V Y L K Q E Q V D E I A H G L L	300
C.unshiu	D E - C I D W L D K K P S S V V Y I S F G T V V Y L K Q E Q V E E I G Y A L L	300
A.thaliana	T D K C L E W L D S R P K S S V V Y I S F G T V A Y L K Q E Q I E E I A H G V L	313
N.tabacum	T N A C L N W L N H Q P V S S V V Y V S F G S L A K L E A E Q M E E L A W G L S	294
L.esculentum	T N E C L N W L N H Q P I S S V L V V S F G S L A K L G S E Q M E E L A W G L K	295

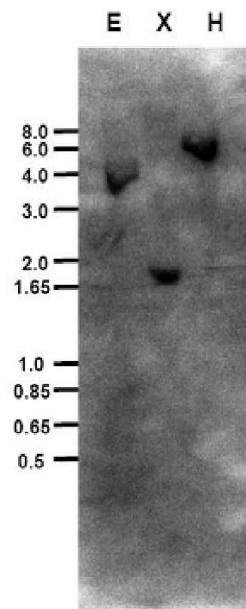
도면5c

CaUGT1	N S G V N F L V V I R P P T K L O N F D S L L L P S E F L E K A G D - R A F I V	347
F.ananassa	S S G V S F I A V M K P P H P D S G F E L L V L P E G F L E K A G D - R G F V V	339
C.unshiu	N S G I S F L V V M K P P E D S G V K I V D L P D G F L E K V G D - K G F V V	339
A.thaliana	K S G L S F L V V I R P P P H D L K V E T H V L P Q E L K E S S A K G K G N I V	353
N.tabacum	N S N K N F L V V R S T E E S K - - - - L P N N F L E E L A S E K G I V V	328
L.esculentum	N S N K S F L V V R S T E E P K - - - - - L P N N F I E E L T S E K G I V V	329
CaUGT1	Q W C P O E Q V L S H P S V A C F V T H C G W N S T L E A L S S G M P V L A F P	387
F.ananassa	Q W S P O E K I L E H P S T A C F V T H C G W N S T M E S L T S G M P V V A F P	379
C.unshiu	Q W S P O E K V L A H P S V A C F V T H C G W N S T M E S L A S G V P V I T F P	379
A.thaliana	D W C P O E Q V L S H P S V A C F V T H C G W N S T M E S L S S G V P V V C P	393
N.tabacum	S W C P O L Q V L E H K S I G C F L T H C G W N S T L E A I S L G V P M I A M P	368
L.esculentum	S W C P O L Q V L E H E S I G C F L T H C G W N S T L E A I S L G V P M V A M P	369
CaUGT1	Q W G D Q V T A A K Y I V D V F R I G L G L C R G E S E N R I I P R E E V E K R	427
F.ananassa	Q W G D Q V T A A K Y L V D E F K Y G V R M C R G E A E D R V I F R D E V E K C	419
C.unshiu	Q W G D Q V T A M Y L C D V F R T G L R L C R G E A E N R I I S R D E V E K C	419
A.thaliana	Q W G D Q V T A A V Y L I D V F R T G V R L G R G A T E R V V P R E E V A E K	433
N.tabacum	H W S D Q P T N A K L V E D V W E H G I R P K Q - - D E K G L V R R E V I E E C	406
L.esculentum	Q W S D Q P T N A K L V K D V W E I G V R A K Q - - D E K G V V R R E V I E E C	407
CaUGT1	V G E A M N G P K T A E L K E N A L K W K K K A E E A V A A G G S S E R N I Q T	467
F.ananassa	L L E A T S G S K A A E M K Q N A L K W K A A A E A A F S E G G S S D R N I Q A	459
C.unshiu	L L E A T A G P K A V A L E E N A L K W K K E A E E A V A D G G S S D R N I Q A	459
A.thaliana	L L E A T V G E K A E E L R K N A L K W K A E A E A A V A P G G S S D K N F R E	473
N.tabacum	I K I V M E E K K G K K I R E N A L K W K E L A R K A V D E G G S S D R N I E E	446
L.esculentum	I K L V M E E D K G K L I R E N A L K W K E I A R N V V N E G G S S D K N I E E	447

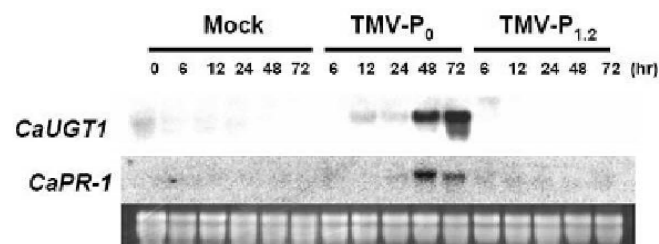
도면5d

CaUGT1	F V D Y V R S V	475
F.ananassa	F V D E V R R I S A S L N S K S S A V G Y V K S K I N G V V E Y V D S K L N G K	499
C.unshiu	F V D E V R R T S V E I I T S S - - - - - K S K S - - - - - I H R V	483
A.thaliana	F V E K L G A G V T K T K D N G Y	490
N.tabacum	F V S R L V T I A S V E S	459
L.esculentum	F V S K L V T I S	456
CaUGT1		475
F.ananassa	A A P V E E A N T R T N G I A K V E Q P K A A N G K V E I A E L T P I N G K V E	539
C.unshiu	K E L V E K T A T A T - - - - - - - - - - A N D K V E L V E S R - - R T R V Q	510
A.thaliana		490
N.tabacum		459
L.esculentum		456
CaUGT1		475
F.ananassa	I A E L K P I N G K V E L V E S	555
C.unshiu	Y	511
A.thaliana		490
N.tabacum		459
L.esculentum		456

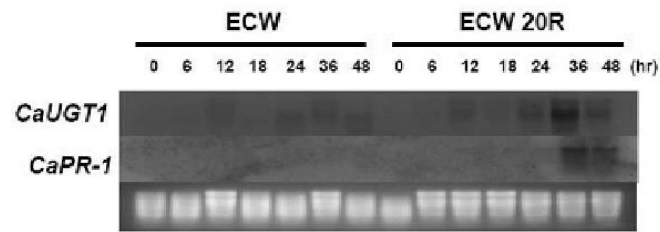
도면6



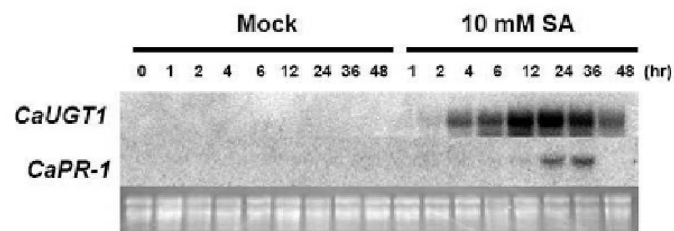
도면7



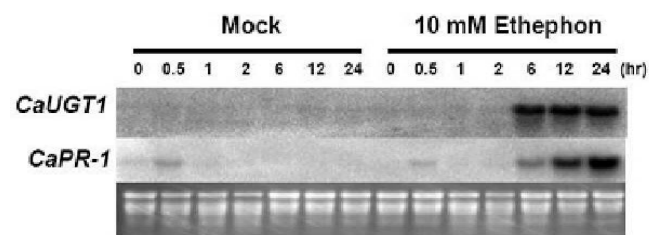
도면8



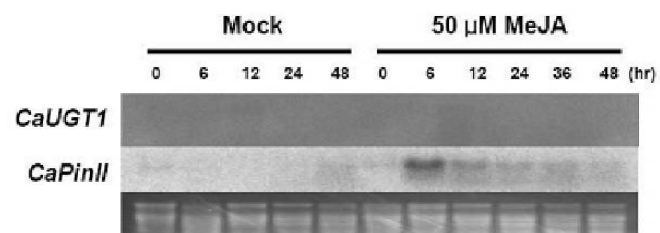
도면9



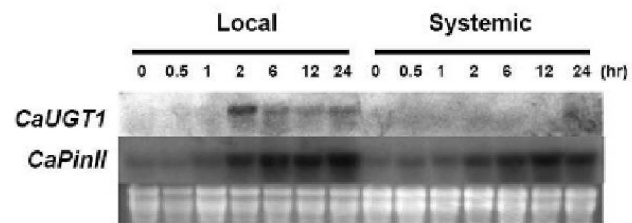
도면10



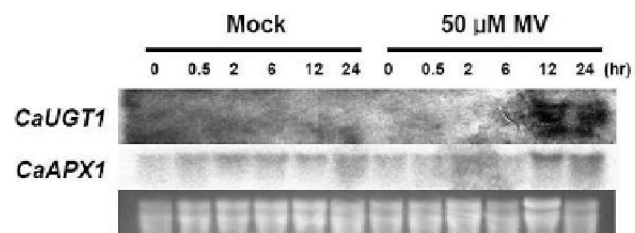
도면11



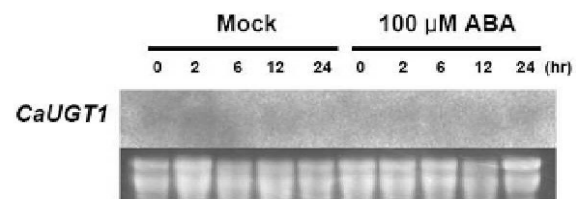
도면12



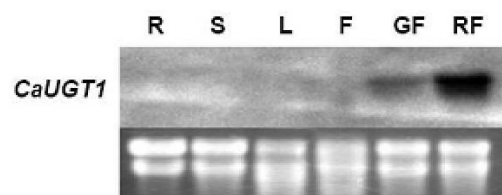
도면13



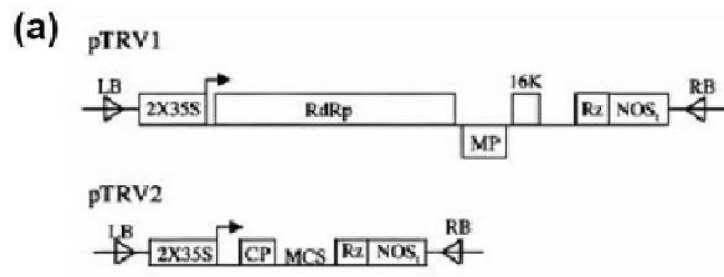
도면14



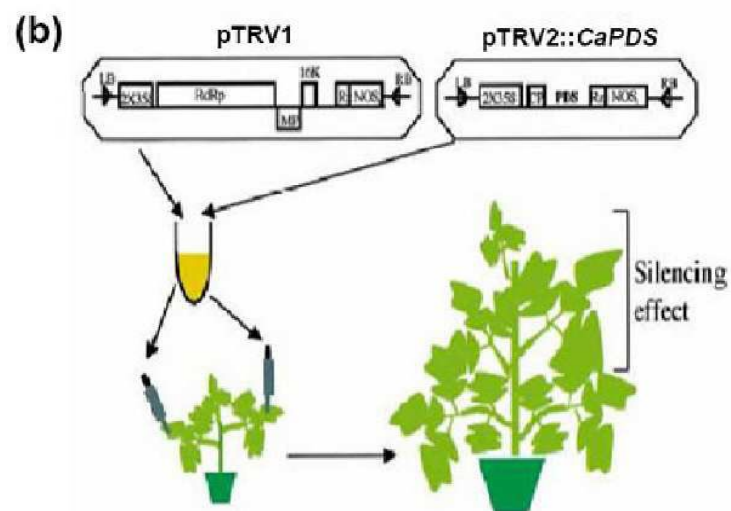
도면15



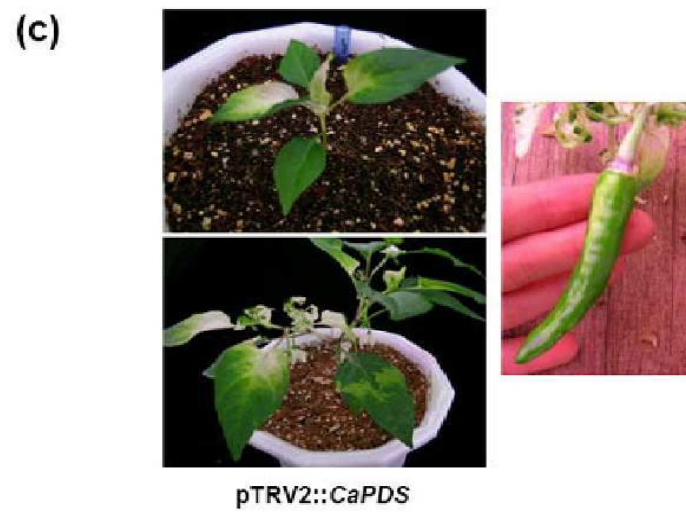
도면16a



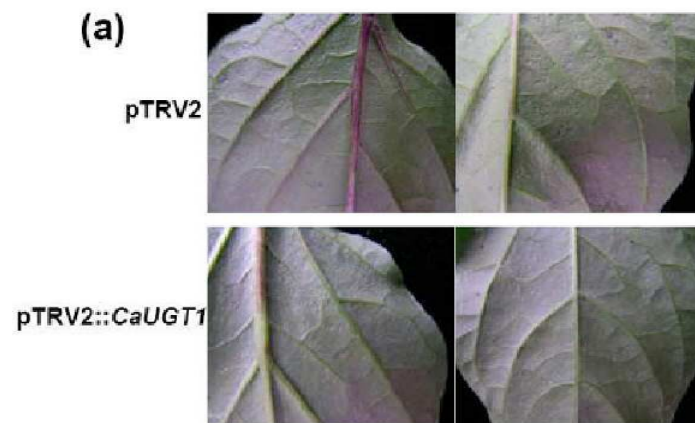
도면16b



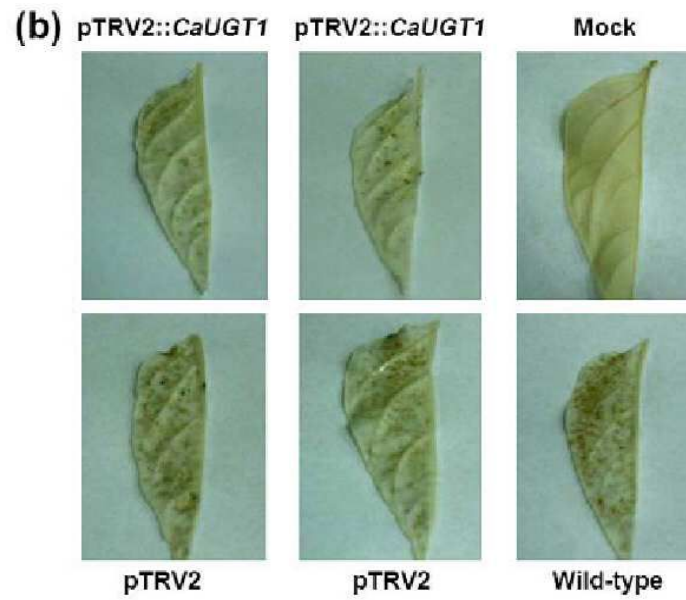
도면16c



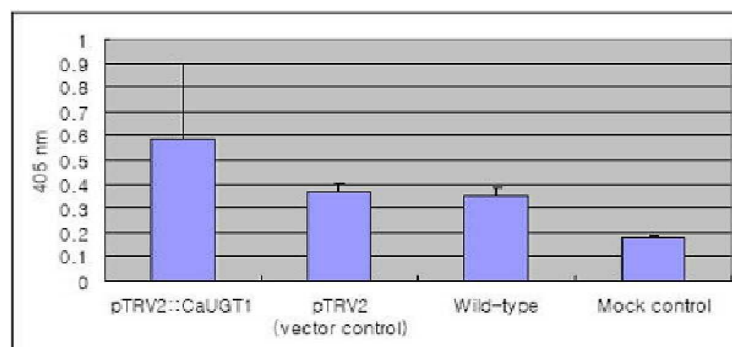
도면17a



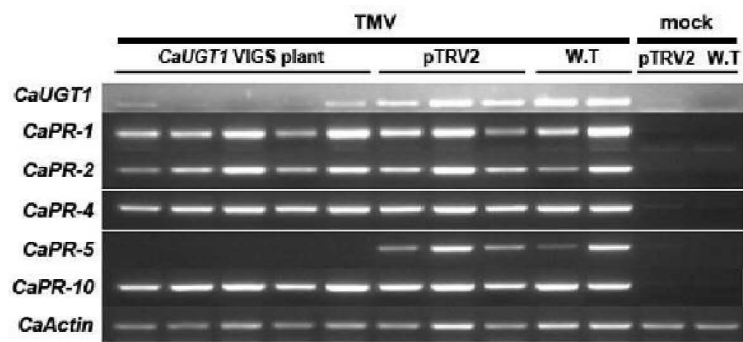
도면17b



도면18



도면19



도면20a

(a)



pTRV2 control



pTRV2::CaUGT1

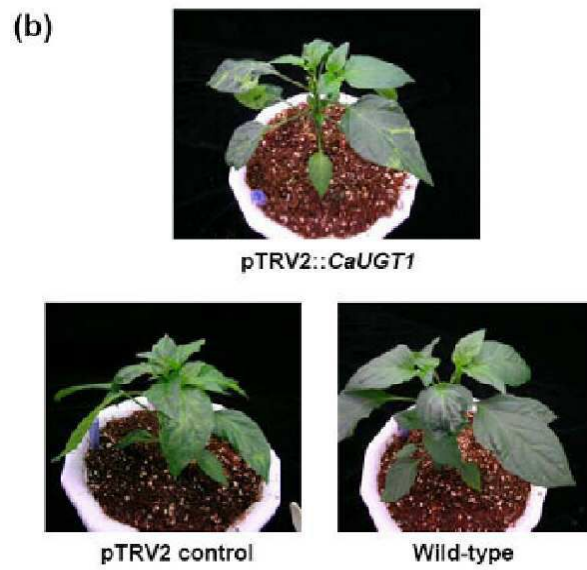


pTRV2::CaUGT1
After 5 days

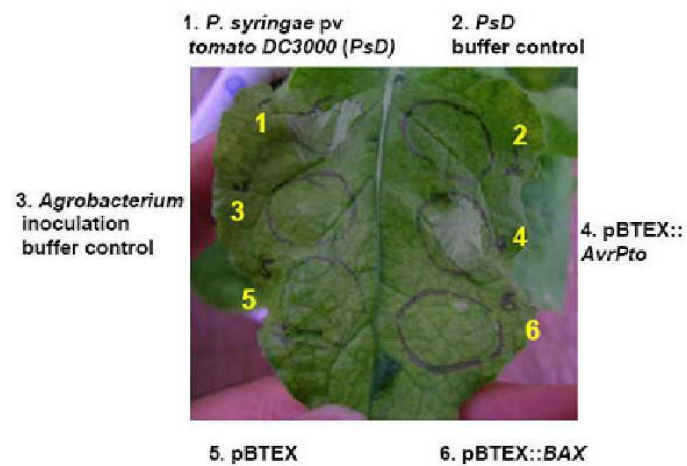


pTRV2::CaUGT1
After 15 days

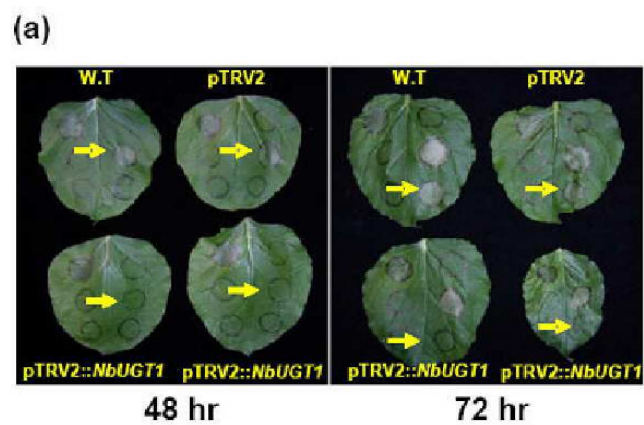
도면20b



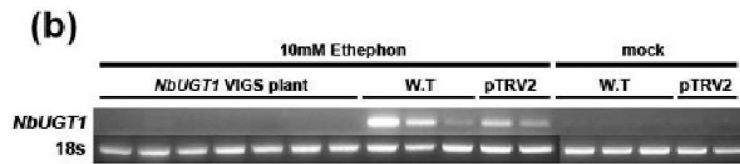
도면21



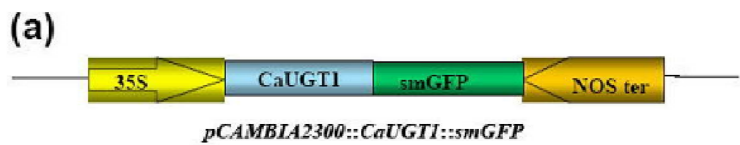
도면22a



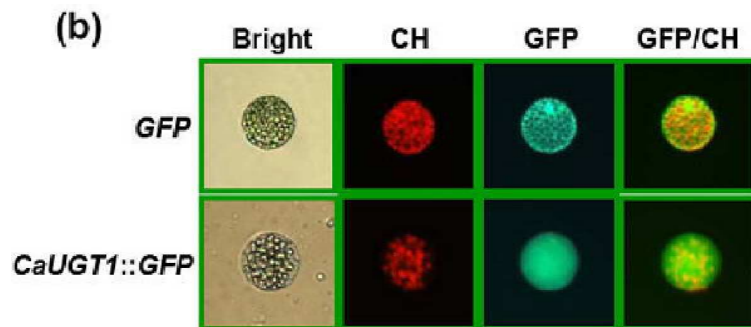
도면22b



도면23a



도면23b



서열목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> Novel gene of UDP-glucosyltransferase expressed specifically in hot pepper fruit
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1751
- <212> DNA
- <213> *Capsicum annuum*

<220>

<221> CDS

<222> (74)..(1498)

<400> 1

ccaaatccaa ctattctctc tectattgtg ttccctagct gctttcttca ctaatttctt 60

ttttcaaaaa aga atg gga tct aaa gta agt gag ggt gca ctc gtt 106
Met Gly Ser Lys Val Ser Glu Gly Ala Leu Val

1 5 10

cat gcc ttt ctt gtc tgc ttt cca ggc caa gga cat gtt aaa cct cta 154
His Ala Phe Leu Val Ser Phe Pro Gly Gln Gly His Val Lys Pro Leu
15 20 25

att aga ctt gct aaa cgc ctc gct tgc aaa ggc ctt ctt gtc act ttt 202
Ile Arg Leu Ala Lys Arg Leu Ala Ser Lys Gly Leu Leu Val Thr Phe
30 35 40

tca gca cca gaa agt ttt ggt gcc gaa atg aaa gga gcc aac cca aaa 250
Ser Ala Pro Glu Ser Phe Gly Ala Glu Met Lys Gly Ala Asn Pro Lys
45 50 55

atc agc tgt gaa ccc act cct tat ggt agt ggg atg atg aga ttt gat 298
Ile Ser Cys Glu Pro Thr Pro Tyr Gly Ser Gly Met Met Arg Phe Asp
60 65 70 75

ttc ttc gaa gac gaa tgg gat cac tgc aag ccc gat ggt aac gat tta 346
Phe Phe Glu Asp Glu Trp Asp His Ser Lys Pro Asp Gly Asn Asp Leu
80 85 90

gag ttg tac ttg caa cat ctt gag ctt atg ggc aag aaa att tta cct 394
Glu Leu Tyr Leu Gln His Leu Glu Leu Met Gly Lys Lys Ile Leu Pro
95 100 105

aaa atg atc aag aaa tat gcg gaa cag ggc agc cct gtt tgc tgt ttg 442
Lys Met Ile Lys Lys Tyr Ala Glu Gln Gly Ser Pro Val Ser Cys Leu
110 115 120

att aat aat cct ttt att cct tgg gtt tgt gat gtt gct gag agc ctt 490
Ile Asn Asn Pro Phe Ile Pro Trp Val Cys Asp Val Ala Glu Ser Leu
125 130 135

ggg atc cct agt gct atg ctt tgg gta caa tct gct gcc agc ttt tca Gly Ile Pro Ser Ala Met Leu Trp Val Gln Ser Ala Ala Ser Phe Ser 140 145 150 155	538
gct tat tat cat cat agt cat agc tta gtt cca ttt cct agt gaa tcg Ala Tyr Tyr His His Ser His Ser Leu Val Pro Phe Pro Ser Glu Ser 160 165 170	586
caa cct gaa att gat gtt caa gta cct tgt atg cct ttg ttg aag tac Gln Pro Glu Ile Asp Val Gln Val Pro Cys Met Pro Leu Leu Lys Tyr 175 180 185	634
gat gaa gtt cct agt ttc ttg cac cct tca agt cca tat act ttc ttg Asp Glu Val Pro Ser Phe Leu His Pro Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Leu 190 195 200	682
aaa aca gcc att tta ggc caa ttc aag aat ata tcc aaa ctt acc ttt Lys Thr Ala Ile Leu Gly Gln Phe Lys Asn Ile Ser Lys Leu Thr Phe 205 210 215	730
ata ctt atg gaa act ttc caa gaa ctt gaa caa gat gtt gtc aat tac Ile Leu Met Glu Thr Phe Gln Glu Leu Glu Gln Asp Val Val Asn Tyr 220 225 230 235	778
ctc tcc aaa aaa ttt ccc atc aaa acc gtt ggt cct ctg ttc aaa tat Leu Ser Lys Lys Phe Pro Ile Lys Thr Val Gly Pro Leu Phe Lys Tyr 240 245 250	826
cca aaa gaa cta ggt cct aca tct agt gat gtc caa ggt gat ttt atg Pro Lys Glu Leu Gly Pro Thr Ser Ser Asp Val Gln Gly Asp Phe Met 255 260 265	874
aag gta gaa aat tgc ata gat tgg ctt gat gca aaa tca cca tcc tct Lys Val Glu Asn Cys Ile Asp Trp Leu Asp Ala Lys Ser Pro Ser Ser 270 275 280	922
gta gtg tac att tcc ttt ggt agt gtg gtc ata tta aaa aaa gaa caa Val Val Tyr Ile Ser Phe Gly Ser Val Val Ile Leu Lys Lys Glu Gln 285 290 295	970
gcg gag gaa ata gca tat gga ttg ttg aat tca ggt gtg aac ttt ttg Ala Glu Glu Ile Ala Tyr Gly Leu Leu Asn Ser Gly Val Asn Phe Leu 300 305 310 315	1018

tgg gtc att agg cca cct acc aaa ctc caa aat ttt gat tca tta tta Trp Val Ile Arg Pro Pro Thr Lys Leu Gln Asn Phe Asp Ser Leu Leu 320 325 330	1066
tta cct agt gaa ttt cta gaa aaa gca gga gat aga gcg aaa ata gtg Leu Pro Ser Glu Phe Leu Glu Lys Ala Gly Asp Arg Ala Lys Ile Val 335 340 345	1114
caa tgg tgt cca caa gaa caa gtt ttg tcc cat ccg tca gtg gct tgt Gln Trp Cys Pro Gln Glu Gln Val Leu Ser His Pro Ser Val Ala Cys 350 355 360	1162
ttt gtg acc cac tgt ggt tgg aat tca act cta gaa gca ctt tct agt Phe Val Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ser Ser 365 370 375	1210
ggc atg cct gtt ttg gcc ttt cct caa tgg ggt gat caa gtc acc gat Gly Met Pro Val Leu Ala Phe Pro Gln Trp Gly Asp Gln Val Thr Asp 380 385 390 395	1258
gcg aag tac ata gtc gat gtt ttt aaa att gga ctt gga cta tgt aga Ala Lys Tyr Ile Val Asp Val Phe Lys Ile Gly Leu Gly Leu Cys Arg 400 405 410	1306
ggt gag tct gaa aat agg att att ccg aga gaa gaa gtg gag aaa cgt Gly Glu Ser Glu Asn Arg Ile Ile Pro Arg Glu Glu Val Glu Lys Arg 415 420 425	1354
gta agg gag gct atg aat ggg cca aag acg gca gag tta aaa gag aac Val Arg Glu Ala Met Asn Gly Pro Lys Thr Ala Glu Leu Lys Glu Asn 430 435 440	1402
gcg ttg aaa tgg aag aag aag gcg gag gaa gcg gtg gct gcg ggt ggc Ala Leu Lys Trp Lys Lys Lys Ala Glu Glu Ala Val Ala Ala Gly Gly 445 450 455	1450
tcc tcc gag agg aac ttg caa act ttt gtg gac tat gtt aga agt gtg Ser Ser Glu Arg Asn Leu Gln Thr Phe Val Asp Tyr Val Arg Ser Val 460 465 470 475	1498
tg atgcgagcac aaaacgtacg ctgaagaatc catacacatg gtgtataatt	1550

aatttgtctt tatgataatt gcatattact atattcttgt ctattattcc ataaataata 1610
 agagaatca cttctttcgc cgtattgtaa tggttcaatt tttcatcccg taaatcctgt 1670
 atcggttatct caatttcaaa aactaaataa aatttgaat tatcagaaaa aaaaaaaaaa 1730
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1751

<210> 2

<211> 475

<212> PRT

<213> Capsicum annuum

<400> 2

Met Gly Ser Lys Val Ser Glu Gly Ala Leu Val His Ala Phe Leu Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Gly Gln Gly His Val Lys Pro Leu Ile Arg Leu Ala Lys
 20 25 30

Arg Leu Ala Ser Lys Gly Leu Leu Val Thr Phe Ser Ala Pro Glu Ser
 35 40 45

Phe Gly Ala Glu Met Lys Gly Ala Asn Pro Lys Ile Ser Cys Glu Pro
 50 55 60

Thr Pro Tyr Gly Ser Gly Met Met Arg Phe Asp Phe Phe Glu Asp Glu
 65 70 75 80

Trp Asp His Ser Lys Pro Asp Gly Asn Asp Leu Glu Leu Tyr Leu Gln
 85 90 95

His Leu Glu Leu Met Gly Lys Lys Ile Leu Pro Lys Met Ile Lys Lys
 100 105 110

Tyr Ala Glu Gln Gly Ser Pro Val Ser Cys Leu Ile Asn Asn Pro Phe
 115 120 125

Ile Pro Trp Val Cys Asp Val Ala Glu Ser Leu Gly Ile Pro Ser Ala
 130 135 140

Met Leu Trp Val Gln Ser Ala Ala Ser Phe Ser Ala Tyr Tyr His His
145 150 155 160

Ser His Ser Leu Val Pro Phe Pro Ser Glu Ser Gln Pro Glu Ile Asp
165 170 175

Val Gln Val Pro Cys Met Pro Leu Leu Lys Tyr Asp Glu Val Pro Ser
180 185 190

Phe Leu His Pro Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Leu Lys Thr Ala Ile Leu
195 200 205

Gly Gln Phe Lys Asn Ile Ser Lys Leu Thr Phe Ile Leu Met Glu Thr
210 215 220

Phe Gln Glu Leu Glu Gln Asp Val Val Asn Tyr Leu Ser Lys Lys Phe
225 230 235 240

Pro Ile Lys Thr Val Gly Pro Leu Phe Lys Tyr Pro Lys Glu Leu Gly
245 250 255

Pro Thr Ser Ser Asp Val Gln Gly Asp Phe Met Lys Val Glu Asn Cys
260 265 270

Ile Asp Trp Leu Asp Ala Lys Ser Pro Ser Ser Val Val Tyr Ile Ser
275 280 285

Phe Gly Ser Val Val Ile Leu Lys Lys Glu Gln Ala Glu Glu Ile Ala
290 295 300

Tyr Gly Leu Leu Asn Ser Gly Val Asn Phe Leu Trp Val Ile Arg Pro
305 310 315 320

Pro Thr Lys Leu Gln Asn Phe Asp Ser Leu Leu Leu Pro Ser Glu Phe
325 330 335

Leu Glu Lys Ala Gly Asp Arg Ala Lys Ile Val Gln Trp Cys Pro Gln
340 345 350

Glu Gln Val Leu Ser His Pro Ser Val Ala Cys Phe Val Thr His Cys
355 360 365

Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ser Ser Gly Met Pro Val Leu
370 375 380

Ala Phe Pro Gln Trp Gly Asp Gln Val Thr Asp Ala Lys Tyr Ile Val
385 390 395 400

Asp Val Phe Lys Ile Gly Leu Gly Leu Cys Arg Gly Glu Ser Glu Asn
405 410 415

Arg Ile Ile Pro Arg Glu Glu Val Glu Lys Arg Val Arg Glu Ala Met
420 425 430

Asn Gly Pro Lys Thr Ala Glu Leu Lys Glu Asn Ala Leu Lys Trp Lys
435 440 445

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Val Ala Ala Gly Gly Ser Ser Glu Arg Asn
450 455 460

Leu Gln Thr Phe Val Asp Tyr Val Arg Ser Val
465 470 475