



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월04일

(11) 등록번호 10-1525896

(24) 등록일자 2015년05월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/57* (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0074285  
 (22) 출원일자 2013년06월27일  
 심사청구일자 2013년06월27일  
 (65) 공개번호 10-2015-0001299  
 (43) 공개일자 2015년01월06일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 강소라. 영남대학교대학원 석사학위논문 (2009년 12월)\*  
 Miguel E. 등. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 66, No. 5, 페이지 175-182 (2005년)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자  
 김현순  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 전재홍  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

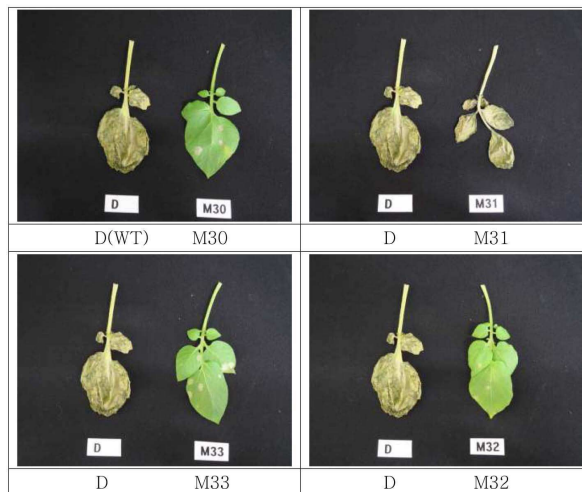
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **역병 저항성을 증가시키는 NMMP1 유전자 및 이의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 역병 저항성을 증가시키는 니코티아나 벤타미아나 NMMP1 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 니코티아나 벤타미아나 유래의 NMMP1 단백질을 코딩하는 유전자는 식물체의 역병 저항성을 증가시키므로, 식물체에서 NMMP1 단백질 코딩 유전자의 발현 조절을 통해, 역병 저항성 및 생산성이 증가된 형질전환 식물체를 개발할 수 있다.

**대표도** - 도5



(72) 발명자

**백광현**

대구 수성구 범어천로 190, 101동 508호 (범어동, 범어동월드메르디앙이스턴카운티)

**최경자**

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 208동 1403호

**최도일**

서울특별시 강남구 논현로 213 역삼럭키아파트 104동 201호

**하장호**

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NTS2321212
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	기초기술연구회
연구사업명	협동연구개발사업
연구과제명	식물-발현 기반 VLP 대량생산 시스템 개발
기여율	1/2
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2012.10.15 ~ 2013.10.14

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM3151312
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	기초기술연구회
연구사업명	주요사업
연구과제명	바이오매스/에너지 세포공장 개발
기여율	1/2
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2013.01.01 ~ 2013.12.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배 유래의 NMMP1 (*Nicotiana benthamiana* matrix metalloprotease 1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 감자 식물세포에 형질전환시켜 NMMP1 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 감자 식물체의 감자 역병 저항성을 증가시키는 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배 유래의 NMMP1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 감자 식물세포에 형질전환시켜 NMMP1 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 감자 역병 저항성이 증가된 형질전환 감자 식물체의 제조 방법.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제3항의 방법에 의해 제조된 감자 역병 저항성이 증가된 형질전환 감자 식물체.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

제5항에 따른 형질전환 감자 식물체의 형질전환된 종자.

**청구항 8**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 담배 유래의 NMMP1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 감자 식물체의 감자 역병 저항성 증가용 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

본 발명은 역병 저항성을 증가시키는 NMMP1 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 담배 유래의 NMMP1 (*Nicotiana benthamiana* matrix metalloprotease 1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물 세포에 형질전환시켜 NMMP1 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 식물체의 역병 저항성을 증가시키는 방법, 상기 NMMP1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용한 야생형에 비해 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 및 담배 유래의 NMMP1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 식물체의 역병 저항성 증가용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

감자는 우리나라에서 오래전부터 재배되어온 대표적인 작물로서, 그에 대한 대표적인 병으로는 바이러스병, 세균병, 진균 및 유사균류(pseudo-fungi)병 등이 다양하게 보고되어 있는데, 그중 우리나라에서 가장 치명적인 것은 유사균류병인 난균류에 의한 역병, 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균성점무늬병 등이 있다. 일반적으

로 파이토프조라 인페스탄스 (*Phytophthora infestans*)에 의해 발생하는 감자 역병은 저온 다습한 재배지역에서 발생하여 감자 재배시에 큰 피해를 주는 병이다. 역병균은 작물 생육기에 감자의 지상부 경엽을 침입하여 지상부 작물을 죽일 수 있으며, 감자 괴경에도 침입하여 포장 및 저장 중에 썩게 한다 (Judelson *et al.*, *Fungal. Genet. Biol.* 22:65-76, 1997). 또한 이 역병은 공기 전염이 가능하여 저온 다습한 기상 조건에서 1-2주 내에 포장의 모든 식물체를 거의 몰살시킬 수 있다. 감자 역병의 원인균이 유주자균류 (*Oomycetes*)인 파이토프조라 인페스탄스라는 것이 밝혀진 이래, 이 병을 방제하기 위한 수많은 연구가 수행되었다.

[0003] 감자 역병을 방제하기 위한 방법으로 무병 씨감자, 저항성 품종, 적기 약제 살포 등이 있으나, 주로 살균제 살포에 의한 화학적 방제에 의존하여 왔다. 저항성 품종은 새로운 레이스 (race)의 출현으로 쉽게 저항성이 무너지므로 약제 살포 횟수를 줄이는 방법 등이 역병 방제에서 보조적인 수단으로 사용되고 있다. 그러나 방제효과가 우수한 침투성 살균제 (metalaxyl, dimethomorph) 등에 대해 저항성을 지닌 균이 발생하고 점차 밀도가 증가하게 되었다. 이 저항성 균을 억제하기 위하여 약제를 과량 살포하게 됨에 따라 환경 문제를 유발하게 되었으며, 최근에는 환경에 대한 관심이 급속히 증가함에 따라 친환경적인 새로운 방제제의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 불량한 환경과 병에 대한 방어 효과를 증진시키기 위해 염류, 냉해 등 환경에 의해 유도되는 스트레스 관련 유전자나, 병원균에 의해 유도되는 병 저항성 (pathogenesis responsive) 유전자를 식물에 도입하는 연구가 수행되고 있다. 그러나 하나의 유전자가 복잡한 자연환경에서 생물적 스트레스 (biotic stress)나 비생물적 스트레스 (abiotic stress)에 대한 저항성을 증진시키기에는 어려움이 많아 효과적인 유전자 발굴 및 연구가 더 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0379143호에는 '자스몬산 메틸화 효소 유전자 및 이를 이용하여 병충해 및 스트레스 저항성 식물체를 제조하는 방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제1997-7002924호에는 '식물의 개선된 질병 내성'이 개시되어 있다. 그러나 본 발명에서와 같이 역병 저항성을 증가시키는 니코티아나 벤타미아나 *NMMP1* 유전자 및 이의 용도에 대해서는 개시된 바가 없다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 니코티아나 벤타미아나 (*Nicotiana benthamiana*) 유래의 *NMMP1* (*Nicotiana benthamiana* matrix metalloprotease 1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 감자 식물체에서 역병 저항성이 야생형에 비해 증진되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 담배 유래의 *NMMP1* (*Nicotiana benthamiana* matrix metalloprotease 1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *NMMP1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 식물체의 역병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 담배 유래의 *NMMP1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *NMMP1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 담배 유래의 *NMMP1* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 식물체의 역병 저항성 증가용 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0011] 본 발명의 니코티아나 벤타미아나 유래의 *NMMP1* 단백질을 코딩하는 유전자는 식물체의 역병 저항성을 증진시키므로, 식물체에서 *NMMP1* 단백질 코딩 유전자의 발현 조절을 통해, 역병 저항성 및 생산성이 증가된 형질전환 식물체를 개발하는데 기여할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0012] 도 1은 *NMMP1* 유전자를 포함하는 식물 형질전환용 벡터의 모식도이다.
- 도 2는 형질전환된 감자 잎에서 추출한 DNA로 PCR을 수행하여 형질전환 여부를 확인한 결과를 나타낸다. N: 일반 감자 식물체 대조구, X: DNA 무첨가 PCR 대조구, P: pCAMIA23001-NMMP1 벡터, 30~33: 형질전환 감자 라인 (Matrixin 30~33).
- 도 3은 형질전환 감자 식물체의 노던 블롯 분석 결과를 나타낸다. D: 일반 감자 식물체 대조구, 30~33: 형질전환 감자 라인 (Matrixin 30~33).
- 도 4는 형질전환 감자 식물체의 서던 블롯 분석 결과를 나타낸다. D: 일반 감자 식물체 대조구, 30~33: 형질전환 감자 라인 (Matrixin 30~33).
- 도 5는 감자 역병균 접종에 의한 형질전환 감자 식물체의 역병 저항성을 확인한 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 담배 유래의 *NMMP1* (*Nicotiana benthamiana* matrix metalloprotease 1) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *NMMP1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 식물체의 역병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명에 따른 *NMMP1* 단백질의 범위는 니코티아나 벤타미아나로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 역병 저항성을 의미한다.
- [0015] 본 발명은 또한 *NMMP1* 단백질의 단편, 유도체 및 유사체 (analogues)를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 본 발명의 *NMMP1* 폴리펩티드와 실질적으로 같은 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 본 발명의 단편, 유도체 및 유사체는 (i) 하나 이상의 보존적 (conservative) 또는 비보존적 아미노산 잔기 (바람직하게는 보존적 아미노산 잔기)가 치환된 폴리펩티드 (상기 치환된 아미노산 잔기는 유전암호에 의해 암호화될 수도, 되지 않을 수도 있다) 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기에서 치환기(들)를 가지는 폴리펩티드, 또는 (iii) 또 다른 화합물 (폴리펩티드의 반감기를 연장할 수 있는 화합물, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜)과 결합된 성숙 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드, 또는 (iv) 부가적인 아미노산 서열 (예를 들면, 선도 서열, 분비 서열, 상기 폴리펩티드를 정제하는데 사용된 서열, 프로테이노젠 (proteinogen) 서열 또는 융합 단백질)과 결합된 상기 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 정의된 상기 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에 잘 알려져 있다.
- [0016] 서열번호 2로 표시되는 성숙 (mature) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 오직 성숙 폴리펩티드만을 암호화하는 코딩 서열; 성숙 폴리펩티드 및 다양한 부가적인 코딩 서열을 암호화하는 서열; 성숙 폴리펩티드 (및 임의의 부가적인 코딩 서열) 및 넌코딩 서열을 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0017] 용어 "폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드"는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 부가적인 코딩 및/또는 넌코딩 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 것과 동일한 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 유사체, 및 유도체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체에 관한 것이다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체 또는 비자연적으로 발생하는 변이체일 수 있다. 상기 뉴클레오티드 변이체는 치환 변이체, 결실 변이체, 및 삽입 변이체를 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 대립유전자 변이체는 폴리뉴클레오티드의 대안 (alternative)이며, 이는 하나 이상의 치환, 결실 또는 삽입된 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 변이체에 의해 암호화된 폴리펩티드에서 실질적인 기능 변화를 초래하지는 않는다.
- [0019] 본 발명의 "역병"은 식물체의 성장 또는 생산성을 저하시키는 생물학적 스트레스 (biotic stress) 요인으로서 유주자균류 (*Oomycetes*)인 파이토프소라 인페스탄스 (*Phytophthora infestans*)에 의해 유발된다. "역병 저항성"이란 상기와 같은 파이토프소라 인페스탄스 의한 식물체의 성장 저하 또는 생산성의 저하가 억제되거나 지연되는 형질을 말한다.
- [0020] 본 발명의 니코티아나 벤타미아나 유래의 *NMMP1* 단백질을 코딩하는 유전자는 DNA 또는 RNA 일 수 있다. DNA는

cDNA, 게놈 DNA 또는 인위적인 합성 DNA를 포함한다. DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. DNA는 코딩(coding) 가닥 또는 넌코딩(non-coding) 가닥일 수 있다.

[0021] 바람직하게는, 본 발명의 상기 NMMP1 단백질 코딩 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다. 서열정렬 방법 및 서열 동일성 또는 상동성을 결정하기 위한 수단(예를 들면, BLAST)은 당업계에 주지되어 있다.

[0022] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0023] 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터는 외래 유전자를 도입한 식물체 내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 일시적(transient) 발현 벡터 및 외래 유전자를 도입된 식물체에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 식물 발현 벡터로 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명에서, 상기 NMMP1 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. "재조합 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지(phage), 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다. 진핵세포에서 이용가능한 번역 조절 요소인 인핸서(enhancer), 리보솜 결합 부위, 종결신호, 폴리아데닐레이션 신호 및 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 상기 발현 벡터는 당업계에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부의 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0026] 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 아그로박테리움 투머파시엔스(A. tumefaciens)의 Ti 플라스미드와 함께 존재 시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB(right border)과 LB(left border)을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101(Cat#: 6018-1, Clontech, 미국), pBIN19(Genbank 수탁번호 U09365), pBI121, pCAMBIA 벡터 등을 사용하는 것이 좋다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식

물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제 (NOS), 베타-아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, 파세올린 (phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토판인 (Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 터미네이터 영역이 식물 세포에서의 유전자 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0029] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트 (glyphosate) 또는 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신 (Bleomycin), 하이그로마이신 (hygromycin), 클로람페니콜 (chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 따른 유전자의 식물로의 도입은 본 발명의 유전자를 포함하는 적합한 벡터를 사용하여 이루어질 수 있으며, 본 발명의 벡터를 식물 숙주세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 유전자총-매개 형질전환 방법 (bombardment), 아그로박테리움-매개 형질전환법, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 DEAE-텍스트란 처리법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 경우에 숙주세포는 바람직하게는 가지과 (*Solanaceae*) 식물세포일 수 있으며, 더 바람직하게는 감자 식물세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 본 발명은 니코티아나 벤타미아나 유래의 NMMP1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *NMMP1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0033] 상기 NMMP1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같으며, 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함할 수 있다. 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식물체는 가지과 (*Solanaceae*) 식물일 수 있으며, 상기 가지과 식물은 흰독말풀 (datura), 가지, 맨드레이크 (mandrake), 고추속 (파프리카, 고추), 감자, 담배, 토마토, 피튜니아 등일 수 있으며, 바람직하게는 상기 역병 저항성이 증가된 형질전환 식물체는 감자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 담배 유래의 NMMP1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 함유하는 식물체의 역병 저항성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함하며, 상기 유전자를 식물에 형질전환함으로써 식물체의 역병 저항성을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1. 재료 및 균주의 준비**

[0040] 본 발명에서 식물 재료는 기내에서 2주 내지 3주 동안 생육시킨 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv Desiree)의 잎 절편을 사용했으며, 배지는 3% 수크로스가 포함된 MS 기본 배지에 비타민과 미오이노시톨 (myo-inositol)을 첨

가하여 사용하였다. *NMMP1* (*Nicotiana benthamiana* matrix metalloprotease 1) 유전자가 도입된 pCAMBIA23001-NMMP1 벡터 (도 1)를 감자에 도입하기 위해서는 바이너리 벡터 시스템을 가지고 있는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 균주를 사용하였다.

[0041]

**실시예 2. 감자 형질전환**

[0042]

기내에서 생육시킨 감자 식물체에서 잎을 채취하여 잎 절편을 준비한 뒤, YEP(Km) 배지에서 키운 아그로박테리움 EHA105 균주 (OD<sub>600</sub>에서 0.6)와 약 15분 동안 공동배양하였다. 공동배양 후 잎 절편을 멸균 종이에서 건조하여 2,4-D가 2.0 mg/L 첨가된 배지에서 2일간 배양하였다. 이때 아그로박테리움의 감자 세포로의 침투를 돕기 위해 항생제는 첨가하지 않았다. 이틀간 배양한 후 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>, 2.0 mg/L 제아틴 (Zeatin), 100.0 mg/L 가나마이신 및 500.0 mg/L 카베니실린이 첨가된 재분화용 배지에 옮겨서 배양하였다.

[0043]

**실시예 3. 형질전환 감자의 선발**

[0044]

재분화 배지에서 배양 4주 이후부터, 잎 절편에서 발생한 캘러스에서 유기되는 싹을 단일 개체로 분리하여 100.0 mg/L 가나마이신 및 500.0 mg/L 카베니실린이 첨가된 MS 배지에서 배양하였고, 뿌리가 내린 개체들을 1차 선발하였다. 게놈 DNA 추출 미니 키트 (RBC)를 이용하여 선발한 독립 개체들의 잎에서 게놈 DNA를 분리한 후, *NMMP1* 유전자에 대한 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하였다 (Matrix\_F: 5'-TTG TCA CGC TGG TCA GAA AG-3' (서열번호 3) 및 Matrix\_R: 5'-ATT TCA GGG CTC CAT TTG TG-3' (서열번호 4)); PCR 산물 크기: 890 bp). PCR 반응은 95°C에서 20초, 63°C에서 30초, 72°C에서 45초 조건으로 총 30회 반복하였다. 실험 결과 Matrixin 30, Matrixin 31, Matrixin 32 및 Matrixin 33번 개체가 형질전환된 것으로 나타났다 (도 2). PCR로 선발한 형질전환 식물체는 호르몬과 항생제가 없는 MS 기본 배지에서 기내 배양하여 증식하였다.

[0045]

**실시예 4. RNA의 추출 및 노던 블롯 분석**

[0046]

형질전환 감자를 MS 기본 배지에 기내 배양하여 증식시킨 후, 잎 절편을 1 g을 채취하고, 총 RNA 분리 시스템을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 정제된 RNA를 정량한 뒤 30 µg을 포름알데히드가 함유된 1% 아가로스 겔에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 아가로스 겔은 나일론 멤브레인 (positively charged nylon membrane; Roche)에 Turbo blotter system을 이용하여 전이시켰고, 전이된 RNA를 고정시키기 위해 UV crosslink (1200×µJ/cm<sup>2</sup>)를 2회 실시하였다. 이 멤브레인은 DIG easy 혼성화 용액 (Roche)으로 65°C에서 1시간 동안 예비-혼성화 (pre-hybridization)한 후, PCR DIG Labeling Mix (Roche)와 제공된 프로토콜에 따라 만들어진 NMMP1 프로브로 50°C에서 밤새 혼성화하였다. 혼성화한 멤브레인은 2×SSC 및 0.1% SDS가 포함된 세척 버퍼로 세척한 다음, DIG detection kit를 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 필름에 현상하였다.

[0047]

노던 블롯 결과, PCR로 선발된 것과 동일하게 *NMMP1* 유전자의 mRNA 전사체가 4가지 형질전환 감자 라인에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0048]

**실시예 5. DNA의 추출 및 서던 블롯 분석**

[0049]

형질전환 감자 잎 2 g을 채취하여, CTAB 버퍼를 이용한 식물 게놈 DNA 추출방법으로 게놈 DNA를 추출하였다. 30 µg의 DNA에 *Bam*HI와 *Xba*I를 처리하고 각각 37°C에서 밤새 반응시킨 후, 정제하여 0.8% 아가로스 겔에서 40 V로 20시간 동안 전기영동하였다. 이어서 변성 (denaturation) 과정을 거친 후 나일론 멤브레인 (positively charged nylon membrane; Roche)으로 전이하였다. 전이된 DNA를 고정시키기 위해 UV crosslink (1200×µJ/cm<sup>2</sup>)를 2회 실시하였다. 이 멤브레인은 PCR DIG Labeling Mix (Roche)와 제공된 프로토콜에 따라 만들어진 NMMP1 프로브로 50°C에서 밤새 혼성화하였다. 혼성화한 멤브레인은 2×SSC 및 0.1% SDS가 포함된 세척 버퍼로 세척한 다음, DIG detection kit를 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 필름에 현상하였다.

[0050]

서던 블롯 결과, 4가지 라인의 형질전환 감자 (Matrixin 30, Matrixin 31, Matrixin 32 및 Matrixin 33)의 염색체에 *NMMP1* 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다 (도 4).



[0051] 실시예 6. 형질전환 감자의 식물병 저항성 검정

[0052] (1) 감자 역병 저항성

[0053] 최종적으로 선발한 형질전환 감자는 역병 저항성을 검정하기 위해, MS 기본 배지에서 2주 동안 기내 배양하여 증식시킨 후 꺼내서 하루 동안 순화시켰다. 원예 상토 하이 (부농)가 담긴 포트에 심어 성장상에서 약 2주 동안 성장시킨 형질전환 감자는 다시 원예용 썬썬이 상토 (농우바이오사)가 담긴 포트에 이식하여 키웠다. 이식 10일 후 역병 병원균 (*Phytophthora infestans*)을 감자의 7~8 엽기 잎 및 9~10 엽기의 잎에 접종하였다. 역병 병원균은  $1 \times 10^4$  sporangia/ml의 농도로 조정된 유주자낭 (sporangia) 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 저온처리하여 유주자(zoospore)를 유출시킨 후에 이를 감자에 충분히 흘러내릴 정도로 살포하여 접종하였으며, 병원균 접종 실험은 총 3회 반복 수행하였다. 병원균 접종 3일 후부터 24시간 간격으로 총 4회 접종한 잎을 채취하여 병반을 확인하였으며, 채취한 잎은 액체 질소로 냉각시킨 후, -70℃에 보관하였다.

[0054] 감자 역병균을  $1 \times 10^4$  sporangia/ml의 농도로 접종하였을 때, Matrixin 31번 개체를 제외한 Matrixin 30, Matrixin 32 및 Matrixin 33번 식물체에서 병반 면적율의 평균이 약 13%로 나타나, 형질전환 감자 식물체가 역병 저항성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다 (표 1).

표 1

[0055] 형질전환 감자 식물의 역병 저항성

형질전환 감자 라인	$1 \times 10^4$ sporangia/ml	
	병반 면적율 (%)	평균
Desiree	50, 40, 40	43
Matrixin 30	5, 5, 20	10
Matrixin 31	50, 50, 40	47
Matrixin 32	20, 10, 5	12
Matrixin 33	30, 10, 10	17

[0056] 반복 실험을 수행한 결과에서도 상기 실험에서 확인한 결과와 마찬가지로 Matrixin 31번 개체를 제외한 형질전환 감자 식물체에서 병반 면적율의 평균이 4.13%로 나타나, 형질전환 감자 식물체가 뚜렷한 역병 저항성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다 (표 2, 도 5).

표 2

[0057] 형질전환 감자 식물의 역병 저항성

라인	$1 \times 10^4$ sporangia/ml	
	병반 면적율 (%)	평균
Desiree	60, 50, 40	50
Matrixin 30	2, 2, 7	3.7
Matrixin 31	50, 50, 30	43
Matrixin 32	5, 7, 2	4.7
Matrixin 33	2, 7, 3	4.0

[0058] (2) 감자 잿빛곰팡이병 저항성

[0059] 최종적으로 선발한 형질전환 감자의 잿빛곰팡이병에 대한 저항성을 검정하기 위해, 감자의 역병 저항성 검정과 마찬가지로 형질전환 감자를 순화한 후에 상토에 이식하여 포트에서 키웠다. 이식 10일 후 잿빛곰팡이병 병원균 (*Botrytis cinerea*)을 감자의 7~8 엽기 잎 및 9~10 엽기의 잎에 접종하였다. 잿빛곰팡이병 병원균은  $1.7 \times 10^5$  spores/ml 및  $5 \times 10^5$  spores/ml의 농도로 접종하였으며, 병원균 접종 실험은 총 3회 반복 수행하였다. 병원균 접종 3일 후부터 24시간 간격으로 총 4회 접종한 잎을 채취하여 병반을 확인하였으며, 채취한 잎은 액체 질소로 냉각시킨 후, -70℃에 보관하였다.

[0060]

감자 잿빛곰팡이병균을  $1.7 \times 10^5$  spores/ml 및  $5 \times 10^5$  spores/ml의 농도로 접종하였을 때, 접종 농도에 상관없이 모든 개체의 병반 면적을 평균이 80%로 나타나, 형질전환 감자 식물체가 역병에는 저항성을 나타내지만, 잿빛곰팡이병균에 대해서는 저항성을 갖지 않는다는 것을 확인할 수 있었다 (표 3).

표 3

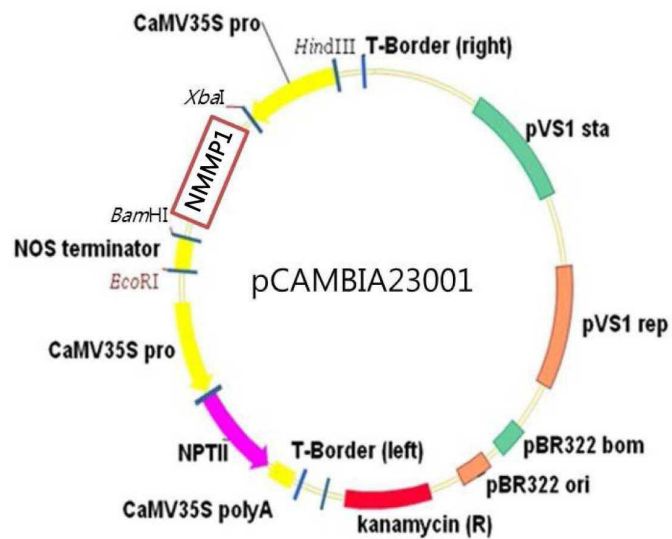
[0061]

형질전환 감자 식물의 잿빛곰팡이병 저항성

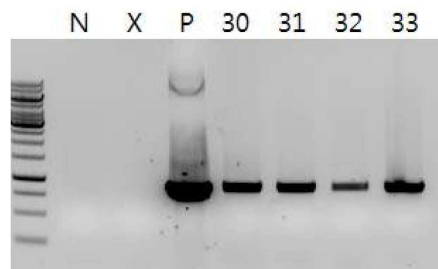
라인	$1.7 \times 10^5$ spores/ml		$5 \times 10^5$ spores/ml	
	병반 면적율(%)	평균	병반 면적율(%)	평균
Desiree	80, 80, 80	80	80, 80, 80	80
Matrixin 30	80, 80, 80	80	80, 80, 80	80
Matrixin 31	80, 80, 80	80	80, 80, 80	80
Matrixin 32	80, 80, 80	80	80, 80, 80	80
Matrixin 33	80, 80, 80	80	80, 80, 80	80

도면

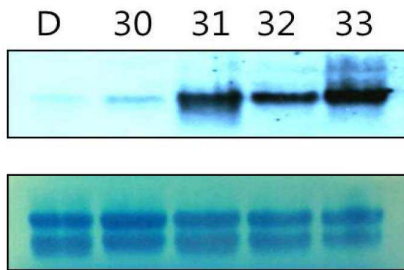
도면1



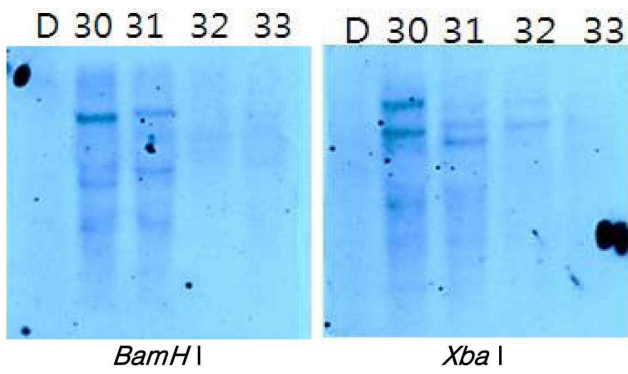
도면2



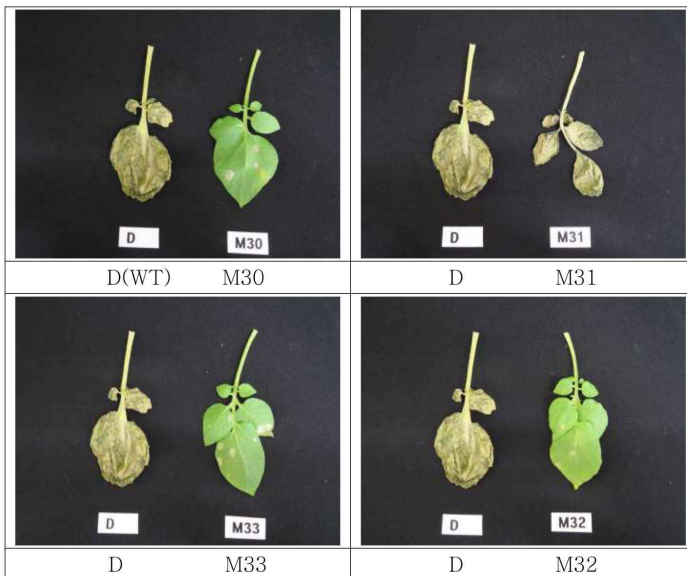
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> NMMP1 gene increasing Phytophthora blight disease resistance and uses thereof

<130> PN13061

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1365

<212> DNA

<213> Nicotiana benthamiana

<400> 1

```

cacagacttt aaagctcaaa tactactaca aatTTTTTct atcttccatt tttgaacaga      60
aaactcgaaa tgaggattcc tttatttate gccattgttt tagttcttag cttatctcca      120
gcttcagctc atttcttccc aaatatctct tcaatccctc ctttattgaa acctaataac      180

actgcttggg atgctttcca caagttattg ggttgtcacg ctggtcagaa agtcgatggc      240
ttagctaaaa ttaaaaaata tttctataat tttgggtata tttcttcttt gagtaacttt      300
acagatgact ttgatgatgc tcttgaatct gctctcaaga cttaccagca aaacttcaac      360
ctcaacacca ccggtgtact cgacgcgccg acgattgagc atctcataag acccagatgt      420
ggaaacgccg atgtagttaa tggcaccagt accatgaact ccggcaagcc atcggcaggt      480
tctcagaata ttcacacagt ggcccccttc tcgttttttc cgggaagacc acggtggccg      540
gagagtaaca gagatttgac atacgcgttt ttaccgcaga acggtctgac ggataacatt      600

aaaagcgtgt tctcacgtgc gtttgaccgg tggtcggaag taacccccgtt gaccttcacc      660
gaaatagctt cgtttcaatc ggccgatatt aagatcgggt ttttcgccgg agaccacaac      720
gacggcgcgac cgtttgatgg tccgatgggg acattagctc acgcgttttc gccgccaggg      780
gggcattttc acttggacgg cgacgagaat tgggtcatcg acggcgcgcc gattgttgaa      840
gggaatttct tttcaatatt atcggcggta gatcttgaat cggttgcggt tcatgaaatc      900
gggcatttat tgggtttggg ccattcatcc gtagaagatt cgattatgtt cccgagttta      960
gcagcgggta cccgaagagt ggagctcgca aatgatgata ttcagggagt ccaggtgtta      1020

tacgggtcta acccaaatTT tactgggccg aacacagttt taactccgac gcacgaaaat      1080
gacacaaatg gagecctgaa atttgggtca ttatgggttc acgtggctgt tgcattcttc      1140
ttatcatttc tccgtttaat ttaaaaaagt tatacttctg tattatttga ttcattttta      1200
aaaattttaga atatcatacg tcattacgtt gtcttttaat taagattgtt tccttgatat      1260
taatttcatt atgcttgtaa atggttatat ttatgtatag ttttaactat tctcttttga      1320
ttgaataaaa taaaaaatcg actctatTTT gagacagata aatca      1365

```

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 2

Met Arg Ile Pro Leu Phe Ile Ala Ile Val Leu Val Leu Ser Leu Ser

1 5 10 15

Pro Ala Ser Ala His Phe Phe Pro Asn Ile Ser Ser Ile Pro Pro Leu

20 25 30

Leu Lys Pro Asn Asn Thr Ala Trp Asp Ala Phe His Lys Leu Leu Gly

35 40 45

Cys His Ala Gly Gln Lys Val Asp Gly Leu Ala Lys Ile Lys Lys Tyr

50 55 60

Phe Tyr Asn Phe Gly Tyr Ile Ser Ser Leu Ser Asn Phe Thr Asp Asp

65 70 75 80

Phe Asp Asp Ala Leu Glu Ser Ala Leu Lys Thr Tyr Gln Gln Asn Phe

85 90 95

Asn Leu Asn Thr Thr Gly Val Leu Asp Ala Pro Thr Ile Glu His Leu

100 105 110

Ile Arg Pro Arg Cys Gly Asn Ala Asp Val Val Asn Gly Thr Ser Thr

115 120 125

Met Asn Ser Gly Lys Pro Ser Ala Gly Ser Gln Asn Ile His Thr Val

130 135 140

Ala His Phe Ser Phe Phe Pro Gly Arg Pro Arg Trp Pro Glu Ser Asn

145 150 155 160

Arg Asp Leu Thr Tyr Ala Phe Leu Pro Gln Asn Gly Leu Thr Asp Asn

165 170 175

Ile Lys Ser Val Phe Ser Arg Ala Phe Asp Arg Trp Ser Glu Val Thr

180 185 190

Pro Leu Thr Phe Thr Glu Ile Ala Ser Phe Gln Ser Ala Asp Ile Lys

195 200 205

Ile Gly Phe Phe Ala Gly Asp His Asn Asp Gly Glu Pro Phe Asp Gly

210 215 220  
 Pro Met Gly Thr Leu Ala His Ala Phe Ser Pro Pro Gly Gly His Phe  
 225 230 235 240  
 His Leu Asp Gly Asp Glu Asn Trp Val Ile Asp Gly Ala Pro Ile Val  
 245 250 255  
 Glu Gly Asn Phe Phe Ser Ile Leu Ser Ala Val Asp Leu Glu Ser Val  
 260 265 270  
 Ala Val His Glu Ile Gly His Leu Leu Gly Leu Gly His Ser Ser Val

275 280 285  
 Glu Asp Ser Ile Met Phe Pro Ser Leu Ala Ala Gly Thr Arg Arg Val  
 290 295 300  
 Glu Leu Ala Asn Asp Asp Ile Gln Gly Val Gln Val Leu Tyr Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Pro Asn Phe Thr Gly Pro Asn Thr Val Leu Thr Pro Thr His Glu  
 325 330 335  
 Asn Asp Thr Asn Gly Ala Leu Lys Phe Gly Ser Leu Trp Val His Val  
 340 345 350

Val Val Ala Phe Phe Leu Ser Phe Leu Arg Leu Ile  
 355 360

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

ttgtcacgct ggtcagaaag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

atttcagggc tccatttgtg

20