

최 종
연구보고서

신호물질 분해유전자에 의한 무름병 저항성
감자 개발

Development of Soft-rot resistant Potato Using
Quorum Sensing

연구기관

경 상 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “신호물질 분해유전자에 의한 무름병저항성 감자 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005. 11. 15.

주관연구기관명 : 경 상 대 학 교
총괄연구책임자 : 윤 한 대
연 구 원 : 이 신 우
연 구 원 : 김 민 근
연 구 원 : 임 우 진
연 구 원 : 안 창 룡
연 구 원 : 홍 수 영
연 구 원 : 조 계 만
연 구 원 : 이 선 미
협동연구기관명 : 고 령 지 시 협 장
협동연구책임자 : 이 정 윤
연 구 원 : 서 효 원
연 구 원 : 박 영 은

요 약 문

I. 제목

신호물질 분해유전자에 의한 무름병 저항성 감자 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라에서는 그동안 경제성장으로 인한 식생활 변화에 따라 감자류의 소비가 급증되었으며 감자는 고온·다습한 기상환경에서 기회성 병원균 (opportunistic pathogen)인 무름병균이 감자를 무차별 공격하여 무름병이 발병하며 기상환경에 따라 풍흉을 좌우하는 것이 특징이다. 또한 무름병 저항성은 양적 형질로 미동유전자에 의해 지배되기 때문에 저항성 유전자의 감자로의 집적에 어려워 감자에서는 무름병에 대한 저항성 품종이 전무한 실정이다.

본 연구는 무름병 원인의 식물병원균에서 극미량으로 존재하는 신호전달물질 (autoinducer)을 분리하여 그 특성을 조사하고, 식물내생균 및 토양에서 이러한 신호전달물질을 분해할 수 있는 효소 및 유전자를 탐색하며 특성을 확인한 후 무름병 저항성 형질전환 감자를 개발하는 것을 목적으로 한다.

연구의 필요성으로 형질전환 작물 재료로서의 감자 (*Solanum tuberosum* L.)는 4배체인 염색체 특성 때문에 다른 작물에 비해 교배하기가 어려우며 이형접합성이므로 교배 후 후대에서 모두 분리되는 육종상의 어려움을 가지고 있어서 한 개의 품종을 선발하기 위해서는 약 10년의 기간이 소요된다. 그러나 교배에 의한 유전자의 재조합을 통하지 않고 특정한 유전자 하나만을 식물의 핵 내에 도입하는 형질도입 방법을 이용한다면 이와 같은 육종기간을 최소화시킬 수 있을 것이다. 더욱이 감자는 종자가 아닌 영양계 (clone)로 번식하므로 한번 도입된 유전자는 영양계를 통해 그대로 유지되어 대를 거듭해도 형질이 분리되지 않는다는 장점을 가지고 있다. 이와 같은 점들을 감안할 때 감자는 형질전환 재료로서 가장 이상적인 작물 중의 하나임을 알 수 있다. 기술적 측면에서 감자는 세계 4대 식량 작물 중 하나인 저온성 작물로서 국내에

1824년에 전래된 이후 주로 한반도 이북지역에서 주식용으로 재배·생산되어왔으나 최근 들어 감자식품의 다양한 개발과 영양의 균형공급 등 건강식품에 대한 관심이 높아짐에 따라 작물로서의 중요성이 높아졌으며 품질향상을 위한 재배 및 육종연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 수량과 품질을 저하시키는 세균병 등 해결해야 할 문제가 산적한 것도 사실이다. 예를 들면 저장중의 괴경에 무름병을 일으키며, 생육 중에는 흑각병을 일으키는 *Pectobacterium* 종 세균과 풋마름병을 일으키는 *Pseudomonas* 종이 대표적이다. 이러한 세균에 의한 병은 발병 후 주로 식물체내에서 이동하므로 조직을 상하게 하지 않고 감염부위에 처리할 수 있는 약제의 개발이 어려워 그 대처방안이 시급한 실정이다. 그러므로 최근에는 세균병에 저항성을 가진 특정한 유전자의 식물체내 도입이라는 방법을 실용화하려는 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 목적 유전자를 식물체내에 도입하는 연구는 곤충이나 야생식물 등에 존재하는 내병성 유전자를 유연관계가 아주 먼 채소 작물에 옮길 수 있는 등 기존 육종 방법으로는 불가능한 유전자 치환을 가능케 했으며, 단일 유전자에 의해 지배되므로 병 저항성 작물 개발에 있어서 매우 가능성이 큰 것으로 생각된다. 실제로 곤충에서 분리한 cecropin 유전자를 이용한 병원세균에 대한 저항성 작물의 개발이 이루어지고 있으며 대부분이 실험실 내에서 성공하여 포장 실험을 준비하고 있다.

경제·산업적 측면에서 감자는 우리 국민의 식생활에서는 식량자원의 역할과 또 최근의 식생활 구조의 다양화로 인하여 점차 중요한 위치를 차지해 가고 있다. 이와 같은 소비구조의 변화에 따라 감자는 농가의 주요 소득작물로 변화하고 있으나 최근에는 수입 개방에 따라 값싼 외국산 감자가 수입되어 국내 감자시장에서 경쟁해야 하는 어려움에 직면하고 있다. 더욱이 씨감자의 저장시설 미비와 무름병 저항성 품종의 부재로 해마다 감자 파종기의 농가에서는 막대한 양의 씨감자가 무름병 피해로 폐기되고 있는 실정이다. 이는 막대한 경제적 손실과 더불어 감자재배에 대한 의욕을 저하시키는 요인이 되고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석을 위한 실험으로 세균세포는 소위 cell-cell communication system을 통하여 세포농도 (population density)를 감지하며 세포 농도가 일정치 (threshold)에 도달하면 특정 유전자 발현을 촉발한다는 병원균-식물상호작용의 기본 가설인 quorum sensing system에 근거한다. 보고에 의하면

Bacillus sp.에서 분리한 새로운 효소인 acyl-homoserine lactonase (AHL-lactonase)는 quorum-sensing signals 분자의 신호전달물질인 AHL lactone bond를 가수분해함으로써 AHL을 불활성화하였다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 병원균에서 autoinducer (AI)로 생성되는 quorum-sensing signal 물질인 acyl-homoserine lactonone을 분리 정제하여 동정하였다. 분리한 다양한 AHLs 유도체를 분해할 수 있는 광범위 기질 분해 효소를 분리 및 그 유전자를 클로닝하였다. 이 유전자의 특성을 조사하고 이 형질전환체가 병원균의 집단이 식물체를 공격할 때 autoinducer를 식물에 도입된 분해유전자가 이를 인식하여 발현, 분비하여 autoinducer를 직접 분해시키므로 병원균의 공격을 무산시켜 병 방제를 하고자 한다. 이러한 연구개발 목표와 내용을 보면

1차년도

: 감자 품종의 무름병 저항성 평가 및 발병 관련 유전자 탐색과 관련물질 분리

- ▶ 무름병에 감수성인 감자 품종 선발
- ▶ 선발된 감자 품종에 대한 적정 배지 조건 및 배양 방법 구축
- ▶ 식물 분해효소 등과 같이 발병 관련 유전자 분리
- ▶ 병원성 인자 (AHL 유도체) 분리 확인 및 화학적 합성
- ▶ 병원성 인자 분해 균주선별을 위한 bioassay 확립 및 선별

2차년도

: 감자 품종별 최적 형질전환 조건 구축 및 무름병 저항성 유전자의 클로닝

- ▶ 무름병에 감수성인 감자 품종 선발
- ▶ 선발된 감자 품종에 대한 적정 배지 조건 및 배양 방법 구축
- ▶ 식물 분해효소 등과 같이 발병 관련 유전자 분리
- ▶ 병원성 인자 (AHL-lactone 유도체) 분리 확인 및 화학적 합성
- ▶ 병원성 인자 분해 균주선별을 위한 bioassay 확립 및 선별

3차년도

: 무름병 저항성 감자 형질전환체 개발

- ▶ *Agrobacterium*을 이용한 감자형질 전환 및 기내 선발 실시
- ▶ 형질전환 감자 식물체의 유전자 도입 확인

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

무름병 저항성 형질전환감자 개발을 위해 감자에서 무름병을 분리하고 그 특성을 조사하였다. 분리균의 병 발생, quorum sensing 관련 물질, 세포벽 분해효소의 특성도 조사하였다. 그 중에서 새로운 cellulase인 *celC* 유전자 및 3종류의 *bg/TPB*, *ascGFB*, *bg/EFIA*의 β -glucosidase operon을 분리하여 특성을 조사하였다. 분리 선정 균들의 병원성 관련 신호전달물질을 분리하고 bioassay 방법 확립하였으며 물질구조 분석 결과 무름병균의 신호전달물질은 HHL와 OHHL로 판명되었으며 이들을 생성하는 유전자도 클로닝하였다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 무름병 병원성 관련 물질분해인자 분리를 위해 식물 내부 및 토양으로부터 미생물을 분리하여 신호물질분해에 관련하는 5 종류의 저항성 유전자 (*qqe*)를 클로닝하고 구조를 밝혔으며 저항성 유전자 산물이 무름병 신호전달물질인 HHL를 분해하는 기작도 구명하였다. 본 연구의 최종목표인 무름병 저항성 형질전환 감자 생성을 위해 5 종류의 저항성 유전자 *qqe*를 pCAMBIA에 클로닝하여 각각 감자에 형질전환시켰다. 감자형질조건 확립으로 감자의 최적 재분화 조건, 식물체의 형질전환율 향상을 위한 배양 조건, 식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석조건을 분석하였으며. 이를 바탕으로 5 종류의 저항성 유전자를 감자 식물체에 도입하여 하이그로마이신 내성, PCR 및 RT-PCR 검정을 거쳐 형질전환체의 유전적 안정성을 확인하고 최종 형질전환체를 얻었다. 기내 증식을 거친 형질전환체 중에서 2 계통은 집중초기의 병 지연 현상을 보였다. 대조구에 비하여 완벽한 병 저항성을 보이지는 않았다. 지속적인 관찰과 반복시험을 계속하고 있다. 앞으로 형질전환체의 순화 및 필드재배검정 및 얻어진 개체의 교잡육종을 통하여 자연조건에서의 재배조건 하에서 지속적인 병저항성 개체 선발이 필요하다. 지금까지 유전자를 이용한 무름병 저항성 형질전환 식물체 개발 연구가 전무한 현실에서 본 연구의 시도는 의미가 있다고 생각되며 보다 개선된 유전자 구조 구축 및 본 연구에서 얻은 기초적 연구결과와 최근에 밝혀진 새로운 병 방제 기법을 통하여 지속적인 형질전환실험이 필요한 것으로 사료된다.

이상의 얻어진 연구결과를 개조식으로 요약하면 다음과 같다.

1-1. 감자 무름병균 분리

본 실험에서는 무름병 증상이 있는 감자로부터 1,000 여종의 cellulase 활성을 가지는 세균을 분리하였으며 이 중에서 활성이 높은 균주를 선발하였다. 이들 분리, 선정된 식물병원균의 16S rDNA 분석 결과 *Pectobacterium chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* 및 *Erwinia herbicola* 식물병원균으로 분석되었다. 분리병원균 중에서 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 및 *P. chrysanthemi*가 전형적인 무름병균으로 확인되었으며 다양한 세포벽 분해효소도 분비하였다. 무름병균의 식물 접종 실험으로 *P. chrysanthemi* PY35를 감자 및 배추에 접종한 결과 무름병 증상을 잘 나타내었다. 이들 분리균주는 이후의 실험재료로 사용하였다.

1-2. 감자 무름병균의 세포벽 분해효소 유전자 분리

본 시험에서는 무름병균 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34의 세포벽분해효소의 주요 작용인 cellulase 및 섬유소 분해와 연관된 β -glucosidase가 병 발생 및 quorum sensing 기작 작동과 관련될 것이라 생각되어 새로운 cellulase 및 β -glucosidase operon을 클로닝하였다. 클로닝된 *celC* 유전자와 이미 분리된 2종류의 cellulase 유전자 비교하였으며 동일 균주에서 *bglTPB*, *ascGFB*, *bglEFIA*의 β -glucosidase operon을 분리하였다. *celC*의 ORF는 1,116 bp로 371 aa를 암호화하며 그 분자량은 약 39 kDa인 것으로 확인되었으며 *Pcc* LY34의 일부 cellulase-minus mutant는 감자 무름병 병원성 검정 결과 wild type과 유사한 병원성 정도를 가지는 것을 볼 때 *Pcc* LY34 *CelC*는 무름병 발생의 미약한 인자로 생각된다.

3종류의 β -glucosidase operon을 클로닝한 결과 *bglTPB*는 5,557 bp로 세 개의 유전자 *bglT* (antiterminator), *bglP* (EIIBCA), *bglB* (β -glucosidase)가 하나의 operon을 형성하고, *ascGFB*는 5,618 bp로 세 개의 유전자 *ascG* (repressor), *ascF* (EIIBC), *ascB* (β -glucosidase)가 하나의 operon을 형성하며, *bglEFIA*는 세 종류의 PTS를 암호화하는 유전자 *bglE* (EIIB), *bglF* (EIIC), *bglI* (EIIA)가 *bglA* (β -glucosidase) 유전자와 operon을 형성하였다. 유전자 분석 결과 2 종류의 operon (*bglTPB* 및 *ascGFB*)는 regulator를 포함한 β -glucoside utilization system이었는데 이 중에서 *bglT*는 positive regulator로서 antiterminator로 작용하였으며 *ascG*는 negative regulator로서 repressor를 가지 helix-turn-helix 구조로 되어 있었다. 유전자 분석을 한 결과 3 종류 모두 β -glucosidase는 family 1에 속하였다. 최적 활성은 pH 7, 40°C 부근이었으며, 분자량은 *BglA*는 55 kDa, 나머지는 모두 53 kDa에 가깝고, 이러한 효

소들은 Mg^{2+} 존재시 활성이 높아졌으며, Hg^{2+} 존재하에서는 활성이 억제되었다.

1-3. 무름병균의 병원성 관련 신호전달물질 분리

본 실험에서는 제 1절에서 분리한 무름병균이 생성하는 병원성에 관여하는 신호전달물질을 분리하고 물질탐색을 위한 bioassay 방법, 구조분석 및 합성방법을 확립을 하였으며 이들의 생합성에 관여하는 유전자를 클로닝하였다. 무름병균 중의 하나인 *P. chrysanthemi* PY35를 감자에 접종시켜 감자의 ethyl acetate 추출물을 reporter 균주인 *C. violaceum* CV026 동시배양하는 방법으로 bioassay하였다. 정제한 신호물질을 FAB mass로 분석한 결과 해당 물질의 peak를 얻어 MALDI-TOF mass 분석 결과 병원성에 관여하는 신호전달물질인 HHL와 OHHL로 판명되었다. 신호전달물질생성 관련되는 1.8 kb의 유전자를 클로닝하여 *exp*로 명명하였다. *P. chrysanthemi* PY35의 *expI* 유전자는 639 bp이며 212 aa을 암호화하였으며 *expR*는 753 bp, 250 aa를 암호화하였다.

1-4. 무름병 신호전달물질 분해 유전자 분리 식물형질전환 벡터 구축

무름병 신호전달물질 분해 유전자 분리와 식물 형질전환 벡터 구축을 위해 무름병 신호전달물질 분해균의 신속선발을 위한 bioassay법을 확립하였다. 인삼뿌리 내부 및 토양에서 미생물을 분리, 선발하고 병저항성 유전자를 분리하여 형태적, 분류학적 특징을 조사하였다.

1.0 kb 정도 크기의 ORF를 가진 저항성 유전자 (*qqe*) 5종을 클로닝하였다. 먼저 *Bacillus* sp. GK02의 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 1차 구조를 조사한 결과 *qqe*는 ORF가 753 bp로 250 amino acid를 암호화하며 분자량은 28,056 Da 이었다. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 발현 및 효소활성을 위해 고발현벡터에 클로닝하고 유전자 산물을 분석한 결과 Qqe는 약 35 kDa의 분자량을 가진 것으로 확인되었다. 정제된 Qqe는 HHL을 분해하였는데 처리 10분 후 약 70%의 HHL이 분해되었다. Qqe가 AHL-lactonase 혹은 AHL-acylase가 작용하는 기작을 확인하기 위해 HHL의 효소적 분해 후 그 분해산물을 HPLC 및 ESI-MS로 분석한 결과 quasimolecule M+H ion (at m/z 218)을 보여 주었는데 이는 HHL (M+H ion m/z 200)의 효소적 가수분해 결과로 분자량이 18 증가한 것으로 나타났다. 이 결과로부터 AHL의 homoserine lactone ring의 ester bond가 *qqe*-encoded AHL-lactonase에 의해 가수분해되는 것으로 추정된다. 이 유전자 산물의 유용성이 확인되어 무름병 저항성 감자형질전환용 벡터구축을 위해 pCAMBIA 계통의 벡터를 기본으로 5종류를 클

로닝하고 감자의 형질전환용으로 사용하였다.

1-5. 무름병 저항성 형질전환 감자

감자 품종의 최적 재분화 조건을 구축하기 위해 감자 식물체의 잎을 이용한 무름병 저항성 검정에서 자심, 조풍, 수미, 남작, 조원 대상으로 재분화를 실험을 한 결과, 조원이 품종은 93.8%로 가장 높은 재분화율을 보였다. 감자 형질전환 효율 증진을 위해 몇가지 농도의 acetosyringone을 처리해 본 결과, 75 μ M 처리하였을 때 가장 높은 형질전환율을 보였다. 외래 유전자가 감자 식물체로 전이되는 과정에서 재분화를 및 형질전환율이 최고에 이르는 적정 *Agrobacterium*의 접종 농도를 찾아내기 위해서 농도와 접종 시간 변화하여 처리해 본 결과, A₆₀₀에서 0.7의 농도로 접종하였을 때 형질전환율이 가장 높았으며 *Agrobacterium*과 감자 식물체 간의 적정 공배양 시간과 온도는 각각 48시간과 25°C였다.

감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석을 위해 하이그로마이신 농도는 30 mg/L가 최적이었으며 본 실험에서 구축한 5 종류의 저항성 유전자 간의 형질전환율의 차이는 보이지 않았으며, 조원 품종에서 5가지 유전자 구조 모두 24.5-43.6%의 높은 형질전환율을 보여 수미품종에서의 8.6-11.3%의 형질전환율보다 매우 높았다.

PCR과 RT-PCR를 통하여 유전자 도입의 안정성이 확인된 계통들을 기내증식시켜 무름균을 접종해본 결과, #916와 PinII에서 비형질전환 계통보다 병증상이 지연되었다. 본 실험 결과는 기내 증식을 거친 유식물체를 대상으로 무름병 저항성을 검정하였으나 앞으로 순화과정을 거쳐 포장 증식을 거친 후 포장검정을 거친다면 보다 진전된 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 국내 육성 감자의 품종별 최적 재분화율과 형질전환율 조건을 구축하였으며 기내 유식물체의 무름병 저항성 검정법을 체계화하였다. 형질전환된 후 유전적 안정성이 확인된 개체들은 기내계대 배양 후 포장검정을 거쳐 일반적인 농업적 형질을 조사해볼 필요가 있다.

SUMMARY

The object of this study was aimed to develop soft-rot resistant potato by transformation using quorum quenching gene.

This study was planned to be preformed in a time span of 3 years for the purpose of obtaining as many recombinant library as possible and for efficient selection of excellent variants. Firstly, isolation of soft-rot bacteria and cell-wall degrading enzyme genes from soft-rot bacteria were performed (1st year), and isolation of autoinducer from soft-rot bacteria. Cloning of quorum-quenching enzyme (*qqe*) genes and construction of binary vectors were done (2nd year). Finally, soft-rot resistant potato by transformation using quorum quenching gene was developed and investigated (3rd year).

The results subtitled as following :

Section 1. Isolation of soft-rot bacteria and characterization

- Isolation of soft-rot bacteria
- Sequence analysis of 16S rDNA from soft-rot bacteria
- Pairwise similarity between 16S rDNA sequences;
- Virulence test of soft-rot bacteria;

Section 2. Isolation of cell wall degrading enzyme gene from soft-rot bacteria

- Cloning of *celC* from soft-rot bacterium
- Cloning of *bglTPB*, *ascGFB*, and *bglEFIA* operon from soft-rot bacterium

Section 3. Isolation of autoinducer from soft-rot bacteria

- Bioassay of autoinducer
- Analysis of autoinducers
- Synthesis of HHL
- Cloning and characterization of *lux* homologous genes
- Primary structure of *exp* gene
- Comparison of amino acid sequence with those of LuxI and LuxR homologues from other sources

Section 4. Cloning of quorum quenching enzyme (*qqe*) genes and construction of binary vectors

- Isolation of quorum-quenching bacteria
- Virulence assay
- Cloning of *qqe* gene
- Primary structure of *qqe* gene and comparison of amino acid sequence
- Expression of recombinant *qqe* and enzyme activity
- Mechanism of quorum-quenching enzyme
- Construction of binary vectors

Section 5. Soft-rot resistant potato by transformation using quorum quenching gene

- Evaluation of resistance to soft rot of potato varieties
- Establishment of conditions for the highest transformation rate of potato plants
- Introduction of genes to potato plants, genetic analysis and evaluation of resistance to soft rot

The results were as following :

Section 1. Isolation of soft-rot bacteria and characterization

The soft-rot bacteria secrete various cell wall degradation enzymes. Cellulase activity was detected easily on cellulase activity indicator agar plates. From thousands of cellulase activity colonies, cellulase active colonies were isolated from various sources. The soft-rot bacteria, *Pectobacterium chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*, and *Erwinia herbicola* were isolated from potatoes showing soft rot symptoms.

PCR amplification of the total DNA from each soft-rot bacteria with bacteria-specific primers produced a single amplification product of about 1.5 kb. All clones were subjected to sequence analysis followed by online homology searches.

16S rDNA sequence of *P. chrysanthemi* PY35 shared 94.8% to 95.9% with that of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, 94.9% with that of *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* L307, 95.6% with that of *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* L201, 95.5% with that of *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* L312, and 73.5% with that of *Erwinia herbicola* L317. 16S rDNA sequences of four *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* strains are shown to have high similarity to each other.

In the total of nine strains causing soft-rot disease, *P. chrysanthemi* is one of the typical soft-rot bacteria and secretes various cell wall degrading enzymes. Potato was inoculated with *E. coli* or *P. chrysanthemi* PY35. Plants inoculated with *P. chrysanthemi* PY35 showed soft-rot symptoms. However, plants inoculated with *E. coli* did not show soft-rot symptoms.

Section 2. Isolation of cell wall degrading enzyme gene from soft-rot bacteria

We have cloned three novel *celC* genes encoding cellulase and three *bgl*TPB, *asc*GFB, and *bgl*EFIA operons encoding β -glucosidase from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34.

celC gene was characterized as following: the structural organization of the *celC* gene (AY188753) consists of an ORF of 1,116 bp encoding 371 amino acid residues with a signal peptide of 22 amino acids within the NH₂-terminal region of pre-CelC. The predicted amino acid sequence of CelC was similar to that of *Pectobacterium chrysanthemi* Cel8Y (AF282321). The CelC has the conserved region of the glycoside hydrolase family 8. The apparent molecular mass of CelC was calculated to be 39 kDa by CMC-SDS-PAGE. The cellulase-minus mutant of *Pcc* LY34 was as virulent as the wild type in pathogenicity tests on tubers of potato. The results suggest that the CelC of *Pcc* LY34 is a minor factor for the pathogenesis of soft-rot.

bglTPB operon was characterized as following: Sequence analysis of the 5,557 bp cloned DNA fragment (accession number AY542524) showed three open reading frames (*bglT*, *bglP*, and *bglB*) predicted to encode 287,633 bp, and 468 amino acid proteins, respectively. BglT and BglP ORFs show high similarities with that of the *Pectobacterium chrysanthemi* ArbG antiterminator and ArbF permease, respectively. Also, the later contains most residues important for phosphotransferase activity. The amino acid sequence of BglB showed high similarity to various β -glucosidases and is a member of the glycosyl hydrolase family 1. The purified BglB enzyme hydrolyzed salicin, arbutin, *p*NPG, and MUG. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 53,000 Da by SDS-PAGE. The purified β -glucosidase exhibited maximal activity at pH 7.0 and 40°C, and its activity was enhanced in the presence of Mg²⁺. Two glutamate residues (Glu173 and Glu362) were shown to be essential for enzyme activity.

ascGFB operon was characterized as following: Sequence analysis of the 5,618 bp cloned DNA fragment (accession number AY622309) showed three open reading frames (*ascG*, *ascF*, and *ascB*) that are predicted to encode 375,486 bp and 476 amino acid proteins, respectively. The AscG ORF shared a high similarity with the *E. coli* AscG repressor. The AscF ORF shared 81% identity with the *E. coli* AscF PTS enzyme *Iiasc*, while the AscB ORF was highly similar to β -glucosidases and is a member of the glycosyl hydrolase family 1. The purified AscB enzyme hydrolyzed salicin, arbutin, *p*NPG, and MUG. It exhibited maximal activity at pH 7.0 and 40°C, and its activity was enhanced in the presence of

Mg²⁺ and Ca²⁺. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 53,000 Da by SDS-PAGE. Two conserved glutamate residues (Glu182 and Glu374) were shown to be important for AscB activity.

***bglEFIA* operon was characterized as following:** A third *bgl* operon containing *bglE*, *bglF*, *bglI*, and *bglA* was isolated. The sequences of BglE, BglF, and BglI were similar to those of the phosphotransferase system (PTS) components IIB, IIC, and IIA, respectively. BglF contains important residues for phosphotransferase system. The amino acid sequence of BglA showed high similarity to various β -glucosidases and to a member of the glycosyl hydrolase family 1. Sequence and structural analysis also revealed that these four genes were organized in a putative operon that differed from two operons previously isolated from *Pcc* LY34, *bglTPB* and *ascGFB*. The transcription regulator for this operon was not found, and the EII complexes for PTS were encoded separately by three genes (*bglE*, *bglF*, and *bglI*). The BglA enzyme had a molecular weight estimated to be 55,147 Da by SDS-PAGE. The purified β -glucosidase hydrolyzed salicin, arbutin, *p*NPG, *p*NPG6P, and MUG, exhibited maximal activity at pH 7.0 and 40°C, and displayed enhanced activity in the presence of Mg²⁺ and Ca²⁺. Two glutamate residues (Glu178 and Glu378) were shown to be essential for enzyme activity.

Section 3. Isolation of autoinducer from soft-rot bacteria and characterization

The plant pathogenic bacteria *Pectobacterium* (*Erwinia*) species cause soft-rot disease and produce autoinducer such as N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) and its derivative molecules which mediate the cell-density-dependent expression of target genes. The soft-rot bacteria were isolated and the produced AHLs were identified by bioassay. *Pectobacterium chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*, and *Erwinia herbicola* have been isolated through assay of plant cell wall degradation enzyme activity. We

confirmed that some of them secreted two kinds, HHL and OHHL, of AHLs at least using by TLC bioassay with *Chromobacterium violaceum* CV026.

Two prominent spots were visible by charring with *C. violaceum* CV026 and Rf values of these two spots were 0.76 and 0.59. The purified AHLs from soft-rot bacteria were analyzed. The FAB mass spectrum of the purified spots displayed each several [M+H] peaks. Comparison with the mass data of MALDI-TOF mass spectrum indicated that peaks at m/z 200.2 and 214.1 corresponded to the known HHL and OHHL. The HHL was synthesised for next experiment substrate. Also, HHL was synthesised with homoserine lactone and hexanoyl chloride and confirmed by the same method.

To isolate the *lux* homologous genes from each isolated strains, degenerate primers based on amino acids from two high conserved regions in *lux* homologues allowed amplification of approximately 350 bp DNA fragment. Finally, the 1.8 kb fragments were amplified and cloned into pGEM-T Easy vector. *lux* homologous genes from isolated soft-rot bacteria were designated *exp*. The *expI* (*luxI* homologous) of *P. chrysanthemi* PY35 is 639 bp in size and encodes a protein of 212 amino acids with a predicted molecular mass 24,612 Da. The *expR* (*luxR* homologous) of *P. chrysanthemi* PY35 is 753 bp in size and encodes a protein of 250 amino acids with a predicted molecular mass 28,805 Da. *lux* homologous genes from the others isolated soft-rot bacteria were cloned.

For the comparison of amino acid sequence with those of LuxI and LuxR homologues from other sources, the amino acid sequence of the ExpI protein from *P. chrysanthemi* PY35 was compared with the sequence of other LuxI homologues. ExpI of *P. chrysanthemi* PY35 shared 11.5% amino acid homology with LuxI (AAA27552) of *Vibrio fischeri* ATCC 7744, 61.8% with ExpI of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101. The phylogenetic tree showed that the ExpR of *P. chrysanthemi* PY35 is nowhere near the other ExpR. The amino acid sequence of the ExpR protein from *P. chrysanthemi* PY35 was compared with the sequence of other LuxR homologues. ExpR of *P. chrysanthemi* PY35 shared 14.7% amino acid homology with LuxR (AAA27551) of *V. fischeri* ATCC 7744, 58.1% with ExpR of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101.

Section 4. Cloning of quorum-quenching enzyme (*qqe*) genes

and construction of binary vectors

For the isolation of quorum-quenching bacteria, soil and plant samples were serially diluted and spread. Individual colonies with different morphology and size were obtained. Among them, the 16 isolates were able to grow on minimal medium containing HHL. Analysis of 16S rDNA of these strains identified them as *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *Arthrobacter nicotianae*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* etc.

To confirm the quorum-quenching activity, we inoculated *P. chrysanthemi* PY35 as soft-rot bacteria and/or Ginseng endophytic bacterium *Bacillus* sp. GK02. The virulence assay showed that *P. chrysanthemi* PY35 inoculated potato slice macerated, whereas *Bacillus* sp. GK02 treatment succeeded to partly prevent *P. chrysanthemi* PY35 infection. *Bacillus* sp. GK02 inoculated potato slice did not show soft-rot symptoms.

To isolate the quorum-quenching enzyme gene from each isolated strain, it was found that conserved regions in several groups of metallohydrolases including AHLases from *Bacillus cereus* group and *A. tumefaciens*. Based on these observations, a PCR was performed using degenerated primers of the conserved sequences to clone the AHL-degrading enzyme gene from quorum-quenching bacteria. Finally, the 1.0 kb fragments were amplified and cloned and characterized.

aiiA homologous genes from isolated quorum-quenching bacteria were designated *qqe*. The *qqe* of *Bacillus* sp. GK02 is 753 bp in size and encodes a protein of 250 amino acids with a predicted molecular mass of 28,056 Da). Comparison of the quorum-quenching *Bacillus qqe* genes with the *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* gene revealed high homology of 89 to 93% in deduced amino acid sequence.

For expression of Qqe protein, *Bacillus* sp. GK02 *qqe* gene amplified by PCR and subcloned into the 6× His tagging expression vector [pET22b(+)]. Upon induction of *E. coli* BL21 (DE3) (pET22-*qqe*) with IPTG, a His-tagged protein with a molecular mass of about 35 kDa was produced. The purified Qqe protein effectively inactivated the HHL. After ten minutes of reaction time, HHL was degraded to 70%.

To investigate the mechanism of quorum-quenching enzyme, AHLs structural

features suggest that there may be at least four types of enzymes that could degrade AHL signals. Lactonase and decarboxylase could hydrolyze the lactone ring at the positions marked as 1 and 2, while acylase and deaminase might separate the homoserine lactone moiety and acyl side chain at sites 3 and 4, respectively. To determine whether Qqe of AHL-utilizing *Bacillus* sp. GK02 is an AHL-lactonase or AHL-acylase, HHL was digested with Qqe, and the reaction products were analysed by HPLC and ESI-MS. The enzyme digestion of HHL generated one product as determined by the HPLC analysis. The ESI-MS analysis of the enzyme digestion of HHL and HHL revealed a quasimolecule M+H ion at m/z 218, suggesting that the enzymic action with HHL (M+H ion m/z 200) resulted in a mass increase of 18, corresponding to a water molecule. These results suggested that *qqe* encoded an AHL-lactonase that hydrolyzed the ester bond of the homoserine lactone ring of AHLs.

To construct quorum-quenching enzyme (*qqe*) genes into binary vectors, five *qqe* genes containing about 0.65 kb from quorum-quenching bacteria successfully were cloned into pCAMBIA vector controlled by a CaMV35S promoter and the hygromycin phosphotransferase (*hptII*) gene for resistance to hygromycin. These clones were used for the transformation of potato.

Section 5. Soft-rot resistant potato by transformation of quorum quenching gene

In this study, we evaluated resistance to soft-rot in domestic inbred potato varieties and we selected several susceptible varieties. We also established the condition for the best transformation rates. Five gene constructs were introduced to potatoes var. 'Jowon' and 'Superior'. Some clones were selected in the shoot inducing medium containing 30 mg/l hygromycin. Selected clones were analyzed through PCR and RT-PCR. Quorum-quenching enzyme genes were transferred to potato via *Agrobacterium*-mediated transformation. Genetically stably confirmed clones were infected by *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* for evaluating resistance to soft-rot. Some of tested clones did not show the significant resistance to soft-rot compared with non-transformant. Two transgenic

potato was delayed soft-rot symptoms by *Pectobacterium* sp. But, we should cultivate these clones in the field in order to evaluate agricultural trial and field resistance to soft-rot and the other plant disease. In addition to, we can use these clones as a parental stock for potato breeding program. The significant resistance to soft-rot should be improved by next study in future.

Contents

Chapter 1. Introduction of the Research Project	31
Section 1. Aims and necessities of the research and development	31
1. Aims of the research and development	31
2. Necessities of the research and development	31
2-1. Potato as material for transformation	31
2-2. Technical aspects	32
2-3. Economic and industrial aspects	32
Section 2. Range of the research and development	33
Chapter 2. Research Trend in Korea and Oversea	35
Section 1. Pathogenicity and signal molecules of bacteria	35
Section 2. Research trend and problem of Korea and oversea	36
Section 3. Future prospect	37
Chapter 3. Research Constitutions and Representative Results	39
Section 1. Isolation of soft-rot bacteria and characterization	39
1. Introduction	39
2. Materials and Methods	39
2-1. Bacterials, plasmids, and media	39
2-2. Recombinant DNA technique	39
2-3. Extraction of DNA from bacteria	40

2-4. 16S rDNA analysis	40
2-5. Activity assay of cell-wall degrading enzyme from soft-rot bacteria	40
2-6. Virulence test of soft-rot bacteria on potato	41
3. Results and Discussion	41
3-1. Isolation of soft-rot bacteria	41
3-2. Sequence analysis of 16S rDNA from soft-rot bacteria	42
3-3. Pairwise similarity between 16S rDNA sequences	45
3-4. Virulence test of soft-rot bacteria on plant	45
4. Conclusion	46

Section 2. Isolation of cell wall degrading enzyme gene from soft-rot bacteria

bacteria	47
1. Introduction	47

<Experiment I > Cloning of third *celC* gene, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 and its comparison to those of *Pectobacterium* sp.

1. Introduction : Experiment I	48
2. Materials and Methods : Experiment I	49
2-1. Bacterial strains and growth conditions	49
2-2. Extracellular cellulase activity assay and purification	49
2-3. Site-directed mutagenesis	49
2-4. Activity staining on CMC-SDS-PAGE	50
3. Results and Discussion : Experiment I	50
3-1. Isolation and restriction map of the <i>celC</i> gene	50
3-2. Nucleotide sequence of <i>celC</i> gene	52
3-3. Amino acid sequence similarities between CelC and other cellulases	53
3-4. Identification and characterization of <i>celC</i> gene product	57
4. Conclusion : Experiment I	59

<Experiment II > Isolation of three *bgl* operon system in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34

1. Introduction : Experiment II	61
2. Materials and Methods : Experiment II	62

2-1. Media and growth conditions	62
2-2. Construction of cosmid library	62
2-2-1. Determining the approximate number of clones for a complete cosmid library	62
2-2-2. Construction of cosmid library	62
2-3. Screening of β -glucoside utilization systems	64
2-3-1. Screening β -glucoside utilization systems by PCR in cosmid library ..	64
2-3-2. Screening and subcloning	65
2-4. DNA sequencing and analysis	65
2-5. Enzyme assay	65
2-6. Construction high expression clones for the β -glucosidases genes and purification of the enzymes	66
2-7. Identification of β -glucosidase genes products by SDS-PAGE	66

<Experiment II-1> Isolation of *bgl*/TPB operon system in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34

3. Results and Discussion : Experiment II-1	67
3-1. Cloning and nucleotide sequence of putative <i>bgl</i> operon	67
3-2. Structure of the putative <i>bgl</i> operon of <i>Pcc</i> LY34 and comparison to other known <i>bgl</i> operons	70
3-3. Purification and characterization of the BglB	71
3-4. Identification of the <i>bgl</i> B product	71
3-5. Identification of essential residues for β -glucosidase activity	71

<Experiment II-2> Isolation of *asc*GFB operon system in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34

3. Results and Discussion : Experiment II-2	77
3-1. Cloning and nucleotide sequence of putative <i>asc</i> operon	77
3-2. Structure of the putative <i>bgl</i> operon of <i>Pcc</i> LY34 and comparison to other known <i>asc</i> operons	80
3-3. Purification and characterization of the AscB	80
3-4. Identification of essential residues for β -glucosidase activity	81

<Experiment II-3> Isolation of *bgl*/EFIA operon system in *Pectobacterium*

	<i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> LY34	
3. Results and Discussion : Experiment II-3	86	86
3-1. Cloning and nucleotide sequence of putative <i>bglA</i> operon	86	86
3-2. Structure of the putative <i>bglA</i> operon of <i>Pcc</i> LY34 and comparison to other known <i>bglA</i> operons	89	89
3-3. Purification and characterization of the BglA	91	91
3-4. Identification of essential residues for β -glucosidase activity	94	94
4. Conclusion : Experiment II	98	98
Section 3. Isolation of autoinducer from soft-rot bacteria	99	99
1. Introduction	99	99
2. Materials and Methods	99	99
2-1. Isolation of autoinducer from soft-rot bacteria	99	99
2-2. Structural analysis of autoinducer	99	99
2-3. Synthesis of autoinducer	100	100
2-4. Cloning of quorum sensing related gene from soft-rot bacteria	100	100
3. Results and Discussion	101	101
3-1. Bioassay of autoinducer	101	101
3-2. Mass spectrometry analysis	102	102
3-3. Cloning and sequencing of <i>exp</i> genes	104	104
3-4. Structure of autoinducer	104	104
3-5. Comparison of amino acid sequence with those of LuxI and LuxR homologues from other sources	110	110
4. Conclusion	112	112
Section 4. Cloning of quorum quenching enzyme (<i>qqe</i>) genes and construction of binary vectors	113	113
1. Introduction	113	113
2. Materials and Methods	113	113
2-1. Screening of quorum-quenching bacteria	113	113
2-2. Morphological characteristics of bacteria	114	114
2-3. Bioassay of AHL-degrading activity	114	114

2-4. Cloning of the <i>qqe</i> gene	114
2-5. Expression of recombinant <i>qqe</i>	115
2-6. Expression and purification of the protein	115
2-7. Construction of binary vectors	115
3. Results and Discussion	116
3-1. Isolation of quorum-quenching bacteria	116
3-2. Virulence assay	116
3-3. Cloning of the <i>qqe</i> gene	129
3-4. Primary structure of <i>qqe</i> gene and comparison of amino acid sequence ..	135
3-5. Expression of recombinant <i>qqe</i> gene and enzyme activity	135
3-6. Mechanism of quorum-quenching enzyme	135
3-7. Construction of binary vectors	138
4. Conclusion	139

Section 5. Soft-rot resistant potato by transformation using quorum quenching gene

1. Introduction	142
2. Materials and Methods	143
2-1. Screening of potato varieties resistance to soft rot	143
2-2. Establishment of the condition for the highest transformation rate of potato plants	144
2-3. Introduction of genes into potato plants, genetic analysis of transformants and test of resistance to soft rot	144
3. Results and Discussion	148
3-1. Screening of potato varieties resistance to soft rot	148
3-2. Establishment of the condition for the highest transformation rate of potato plants	151
3-3. Introduction of genes into potato plants, genetic analysis of transformants and test of resistance to soft rot	157
4. Conclusion	163

Chapter 4. Aims Achievement and Contribution to Related

Fields	164
Section 1. Attainability of the research goal	164
Section 2. Contribution to related fields	164
Chapter 5. Application Plan of the Research Products	166
Section 1. Necessity of further research	166
1. Transformation in seed plant	166
2. Screening of site-specific expression promoter	166
3. Screening of high expression promoter	167
4. Inhibition of autoinducer synthesis in cell of phytopathogenic bacteria	171
Section 2. Application to other research	171
1. Technical aspects	171
2. Economic and industrial aspects	171
3. Application plan	172
Chapter 6. Overseas Research Materials	173
Section 1. Bacterial speech bubbles	173
Section 2. Signal disturbance through mimics of autoinducer	174
Chapter 7. References	176

목 차

제 1 장 연구 개발 과제의 개요	31
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	31
1. 연구개발의 목적	31
2. 연구개발의 필요성	31
2-1. 형질전환 작물 재료로서의 감자	31
2-2. 기술적 측면	32
2-3. 경제·산업적 측면	32
제 2 절 연구개발의 범위	33
제 2 장 국내외 기술개발 현황	35
제 1 절 세균의 신호전달물질과 병원성	35
제 2 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	36
제 3 절 앞으로 전망	37
제 3 장 연구 개발 수행 내용과 결과	39
제 1 절 감자 무름병균 분리	39
1. 서론	39
2. 재료 및 방법	39
2-1. 사용균주, 플라스미드, 배지	39
2-2. 재조합 DNA 기법	39
2-3. 세균에서의 DNA 추출법	40
2-4. 무름병균의 16S rDNA 분석	40

2-5. 무름병균의 세포벽분해효소활성 측정	40
2-6. 무름병균의 감자접종실험	41
3. 결과 및 고찰	41
3-1. 무름병균 분리	41
3-2. 분리선정된 무름병균의 16S rDNA 분석	42
3-3. 16S rDNA 염기서열의 상호 비교 분석	45
3-4. 무름병균의 식물 접종 실험	45
4. 결론	46
제 2 절 감자 무름병균의 세포벽 분해효소 유전자 분리	47
1. 서론	47
<실험 1> 무름병균에서 새로운 <i>celC</i> 유전자 클로닝과 3종류 cellulase 유전자 상호 비교	
1. 서론 (실험 I)	48
2. 재료 및 방법 (실험 I)	49
2-1. 사용균주 및 배양조건	49
2-2. 섬유소분해효소 정제 및 활성 측정	49
2-3. 부위 돌연변이 실험	49
2-4. 단백질 전기영동법에 의한 섬유소분해효소 직접 활성 측정법	50
3. 결과 및 고찰 (실험 I)	50
3-1. <i>celC</i> 유전자 분리 및 제한지도	50
3-2. <i>celC</i> 유전자의 염기서열	52
3-3. CelC 아미노산서열의 상동성	53
3-4. <i>celC</i> 유전자 산물의 확인과 특성	57
4. 결론 (실험 I)	59
<실험 II> 무름병균에서 3종류 β-glucosidase operon 분리	
1. 서론 (실험 II)	61
2. 재료 및 방법 (실험 II)	62
2-1. 사용배지 및 생육조건	62
2-2. Cosmid library 제작	62

2-2-1. Cosmid library의 검색에 필요한 clone 수 결정	62
2-2-2. Cosmid library 구축	62
2-3. β -glucoside 이용 시스템의 탐색	64
2-3-1. Cosmid library에서 PCR에 의한 β -glucoside 이용 시스템의 탐색	64
2-3-2. 유전자 선발 및 subcloning	65
2-4. DNA 염기서열 및 상동성 분석	65
2-5. 효소의 생화학적 특성	65
2-6. 유전자의 고발현 및 정제	66
2-7. 유전자 산물의 확인	66

<실험 II-1> 무름병균의 *bgl*/TPB operon 분리

3. 결과 및 고찰 (실험 II-1)	67
3-1. <i>bgl</i> operon 클로닝 및 염기서열 분석	67
3-2. <i>bgl</i> operon의 구조분석 및 상동성 비교	70
3-3. BglB 정제와 생화학적 특성	71
3-4. <i>bglB</i> 유전자 산물 확인	71
3-5. β -glucosidase 활성의 필수 아미노산 확인	71

<실험 II-2> 무름병균의 *asc*GFB operon 분리

3. 결과 및 고찰 (실험 II-2)	77
3-1. <i>asc</i> operon 클로닝 및 염기서열분석	77
3-2. <i>asc</i> operon의 구조분석 및 상동성 비교	80
3-3. AscB 정제와 생화학적 특성	80
3-4. β -glucosidase 활성의 필수 아미노산 확인	81

<실험 II-3> 무름병균의 *bgl*/EFIA operon 분리

3. 결과 및 고찰 (실험 II-3)	86
3-1. <i>bglA</i> operon 클로닝 및 염기서열분석	86
3-2. <i>bglA</i> operon의 구조분석 및 상동성 비교	89
3-3. BglA 정제와 생화학적 특성	91
3-4. β -glucosidase 활성의 필수 아미노산 확인	94

4. 결론 (실험 II)	98
제 3 절 무름병균의 병원성 관련 신호전달물질 분리	99
1. 서론	99
2. 재료 및 방법	99
2-1. 무름병균의 신호전달물질 분리	99
2-2. 무름병균의 신호전달물질 구조분석	99
2-3. 무름병균의 신호전달물질의 합성	100
2-4. 무름병균의 신호전달물질 생성 유전자 클로닝	100
3. 결과 및 고찰	101
3-1. 신호전달물질의 bioassay	101
3-2. 신호전달물질 분석	102
3-3. 신호전달 물질 유전자 클로닝	104
3-4. 신호전달 유전자 구조	104
3-5. 신호전달물질 유전자산물의 상호비교	110
4. 결론	112
제 4 절 무름병 신호전달물질 분해 유전자 분리 식물형질전환 벡터 구축	113
1. 서론	113
2. 재료 및 방법	113
2-1. 무름병 신호전달물질 분해 미생물 분리 및 선별	113
2-2. 분리균의 형태적 특징	114
2-3. 무름병 병원성 신호물질분해 측정	114
2-4. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 클로닝	114
2-5. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 발현	115
2-6. 무름병 병원성 신호물질분해효소의 발현과 정제	115
2-7. 무름병 저항성 감자형질전환용 벡터 구축	115
3. 결과 및 고찰	116
3-1. 무름병 신호전달물질 분해 미생물 분리 및 선별	116
3-2. 무름병 신호전달물질 분해 미생물의 발병 억제 실험	116
3-3. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 클로닝	129
3-4. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 1차 구조	135

3-5. 무름병 병원성 신호물질분해유전자의 발현 및 효소활성	135
3-6. 무름병 병원성 신호물질 분해 기작	135
3-7. 무름병 저항성 감자 형질전환용 벡터 구축	138
4. 결론	139

제 5 절 무름병 저항성 형질전환 감자 142

1. 서론	142
2. 재료 및 방법	143
2-1. 감자 품종의 무름병 저항성 검정 및 감수성 품종 선발	143
2-1-1. 감자 품종의 무름병 저항성 검정 및 screening	143
2-1-2. 감자잎을 이용한 무름병 저항성 검정 방법	143
2-1-3. 감자 기내 유식물체를 이용한 품종별 무름병 저항성 검정	143
2-2. 무름병 감수성 감자 품종 선발 및 최적 형질전환 조건 구축	144
2-3. 감자 식물체의 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축	144
2-3-1. 식물재료	144
2-3-2. 배지와 배양방법	144
2-3-3. 감자의 재분화 및 형질전환	144
2-3-4. 선발된 형질전환 감자의 분석	145
2-3-5. 감자 식물체의 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축	145
2-3-6. <i>Agrobacterium</i> 농도, 공배양 시간 및 온도에 따른 재분화율과 형질전환율	146
2-3-7. 형질전환 감자 식물체의 유전자 도입 확인	146
2-4. 감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석	146
2-4-1. 감자 식물체로의 형질전환	146
2-4-2. 형질전환체 선발을 위한 PCR : 2년차 방법과 동일	146
2-4-3. 형질전환체 선발을 위한 RT-PCR	146
2-4-4. 유전적 안정성이 확인된 형질전환체의 순화 및 화분 증식	147
2-4-5. 무름병 저항성 검정	147
3. 결과 및 고찰	148
3-1. 감자 품종의 무름병 저항성 검정 및 감수성 품종 선발	148
3-1-1. 잎을 이용한 무름병 검정	148
3-1-2. 기내유식물체를 이용한 무름병 검정	149
3-1-3. 품종 및 배지 종류에 따른 감자식물체 재분화율	149

3-1-4. 아세트실링곤 농도에 따른 감자 품종별 형질전환율	151
3-2. 감자 식물체의 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축	151
3-2-1. 형질전환율 최대화를 위한 적정 아세트실링곤 농도	151
3-2-2. 형질전환율 최대화를 위한 적정 <i>Agrobacterium</i> 농도	154
3-2-3. 형질전환율 최대화를 위한 적정 공배양 시간 및 온도	154
3-2-4. 형질전환 식물체의 증식 및 보존	156
3-2-5. 선발된 형질전환체의 PCR 분석	156
3-3. 감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석	157
3-3-1. 하이그로마이신 농도에 따른 형질전환율 조사	157
3-3-2. 유전자 구조에 따른 형질전환율 조사	158
3-3-3. 선발된 형질전환체의 PCR 분석 결과	159
3-3-4. 유전적 안정성이 확인된 형질전환체의 기내증식 및 순화	160
3-3-5. 무름병 저항성 검정	161
4. 결론	163

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 종자 식물에서의 형질전환 실험
2. 부위 특이 발현 프로모터 탐색
3. 고발현 프로모터 탐색
4. 식물병원균 세포 내의 신호물질 합성 단계의 저해

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 기술적 측면	171
2. 경제·산업적 측면	171
3. 활용방안	172
제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	173
제 1 절 소낭을 이용한 세균의 커뮤니케이션	173
제 2 절 신호물질 mimics를 통한 신호전달교란	174
제 7 장 참고문헌	176

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

우리나라에서는 그동안 경제성장으로 인한 식생활 변화에 따라 감자류의 소비가 급증되었으며 감자는 고온·다습한 기상환경에서 opportunistic pathogen인 무름병균이 감자를 무차별 공격하여 발병하며 기상환경에 따라 풍흉을 좌우하는 것이 특징이다. 또한 무름병 저항성은 양적 형질로 미동유전자에 의해 지배되기 때문에 저항성 유전자의 감자로의 집적에 어려워 감자에서는 무름병에 대한 저항성 품종이 전무한 실정이며 일부 약제가 공시되어 Ca 살포 및 건전묘 생산 등의 재배법을 권장하나 그 효과는 미지수이다. 병원균 저항성 형질전환 식물체 개발을 위해서 지금까지 시도되어 온 방법은 주로 식물체 자체가 갖고 있는 PR-protein, phytoalexin 합성 pathway 중의 key enzyme 합성 유전자 등을 찾아내고 이들 유전자의 over-expression에 의한 병원균 내성 형질전환 식물체를 개발하는 것이었다.

본 연구는 무름병에서 극미량으로 존재하는 신호전달물질 (autoinducer)을 분리하며, 이러한 autoinducer를 분해하는 효소를 분비하는 미생물을 토양에서 분리하고 해당되는 유전자를 분리하여 그 특성을 조사하고, 이를 감자에 형질전환시켜 무름병 저항성 형질전환 감자를 얻는 것을 목적으로 한다.

2. 연구개발의 필요성

2-1. 형질전환 작물 재료로서의 감자

감자 (*Solanum tuberosum* L.)는 4배체인 염색체 특성 때문에 다른 작물에 비해 교배하기가 어려우며 이형접합성이므로 교배 후 후대에서 모두 분리되는 육종상의 어려움을 가지고 있어서 한 개의 품종을 선발하기 위해서는 약 10년의 기간이 소요된다. 그러나 교배에 의한 유전자의 재조합을 통하지 않고 특정한 유전자 하나만을 식물의 핵 내에 도입하는 형질도입 방법을 이용한다면 이와 같은 육종기간을 최소화시

킬 수 있을 것이다. 더군다나 감자는 종자가 아닌 영양계 (clone)로 번식하므로 한번 도입된 유전자는 영양계를 통해 그대로 유지되어 대를 거듭해도 형질이 분리되지 않는다는 장점을 가지고 있다. 이와 같은 점들을 감안할 때 감자는 형질전환 재료로서 가장 이상적인 작물 중에 하나임을 알 수 있다.

2-2. 기술적 측면

감자 (*Solanum tuberosum* L.)는 세계 4대 식량 작물 중 하나인 저온성 작물로서 국내에 1824년에 전래된 이후 주로 한반도이북지역에서 주식용으로 재배·생산되어왔으나 최근 들어 감자식품의 다양한 개발과 영양의 균형공급 등 건강식품에 대한 사회적 관심이 고조됨에 따라 작물로서의 중요성이 높아졌으며 품질향상을 위한 재배 및 육종연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 수량과 품질을 저하시키는 세균병 등 해결해야 할 문제가 산적한 것도 사실이다. 예를 들면 저장중의 괴경에 무름병을 일으키며, 생육 중에는 흑각병을 일으키는 *Pectobacterium* 종 세균과 풋마름병을 일으키는 *Pseudomonas* 종 세균이 대표적이다. 이러한 세균에 의한 병은 발병 후 주로 식물체내에서 이동하므로 조직을 상하게 하지 않고 감염부위에 처리할 수 있는 약제의 개발이 어려워 그 대처방안이 시급한 실정이다. 그러므로 최근에 와서는 세균병에 저항성을 가진 특정한 유전자의 식물체내 도입이라는 방법을 실용화하려는 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 목적 유전자를 식물체내에 도입하는 연구는 곤충이나 야생식물 등에 존재하는 내병성 유전자를 유연관계가 아주 먼 채소 작물에 옮길 수 있는 등 기존육종 방법으로는 불가능한 유전자 치환을 가능케 했으며, 단일 유전자에 의해 지배되므로 병 저항성 작물 개발에 있어서 매우 가능성이 큰 것으로 생각된다. 실제로 곤충에서 분리한 cecropin 유전자를 이용한 병원세균에 대한 저항성 작물의 개발이 이루어지고 있으며 대부분이 실험실 내에서 성공하여 포장 실험을 준비하고 있다.

2-3. 경제·산업적 측면

감자는 우리 국민의 식생활에서는 식량자원의 역할과 또 최근의 식생활 구조의 다양화로 인하여 점차 중요한 위치를 차지해 가고 있다. 이와 같은 소비구조의 변화에 따라 감자는 농가의 주요 소득작물로 변화하고 있으나 최근에는 수입 개방에 따라 값싼 외국산 감자가 수입되어 국내 감자시장에서 경쟁을 해야 하는 어려움에 직면하고

있다. 더군다나 씨감자의 저장시설 미비와 무름병 저항성 품종의 부재로 인해 해마다 감자 파종기의 농가에서는 막대한 양의 씨감자가 무름병 피해로 폐기되고 있는 실정이다. 이는 막대한 경제적 손실과 더불어 감자재배에 대한 의욕을 저하케 하는 요인이 되고 있다.

제 2 절 연구개발의 범위

감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석을 위한 실험으로 세균 세포는 소위 cell-cell communication system을 통하여 세포농도 (population density)를 감지하며 세포 농도가 일정치 (threshold)에 도달하면 특정 유전자 발현을 촉발한다는 병원균-식물상호작용의 기본 가설인 quorum sensing system에 근거한다. 보고에 의하면 *Bacillus* sp.에서 분리한 새로운 효소인 acyl-homoserine lactonase (AHL-lactonase)는 quorum-sensing signal 분자의 신호전달물질인 AHL lactone bond를 가수분해함으로써 AHL을 불활성화하였다. 결과를 근거로 본 연구에서는 병원균에서 autoinducer (AI)로 생성되는 quorum-sensing signal 물질인 acyl-homoserine lactonone을 분리, 정제하여 동정하였다. 분리한 다양한 AHLs 유도체를 분해할 수 있는 광범위 기질 분해 효소를 분리 및 그 유전자를 클로닝한다. 이 유전자의 특성을 조사하고 이 형질전환체가 병원균의 집단이 식물체를 공격할 때 autoinducer를 식물에 도입된 분해유전자가 이를 인식하여 발현, 분비하여 autoinducer를 직접 분해시키므로 병원균의 공격을 무산시켜 병 방제를 하고자 한다.

연구개발 목표와 내용

목 표	내용 및 범위
감자 품종의 무름병 저항성 평가 및 발병 관련 유전자 탐색과 관련물질분리	<ul style="list-style-type: none"> ▶무름병에 감수성인 감자 품종 선발 ▶선발된 감자 품종에 대한 적정 배지 조건 및 배양 방법 구축 ▶식물 분해효소 등과 같이 발병 관련 유전자 분리 ▶병원성 인자 (AHL-lactone 유도체) 분리 확인 및 화학적 합성 ▶병원성 인자 분해 균주선별을 위한 bioassay 확립 및 선별
감자 품종별 최적 형질전환 조건구축 및 무름병 저항성 유전자의 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ▶재분화율 및 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축 ▶선별균주의 유전자 은행 제조 ▶무름병 저항성 유전자 구조분석 ▶효소 활성 측정 및 생화학적 특성 조사 ▶효소 분해산물 확인
무름병저항성 감자형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶<i>Agrobacterium</i>을 이용한 감자형질 전환 및 기내 선발 실시 ▶형질전환 감자 식물체의 유전자 도입 확인

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 세균의 신호전달물질과 병원성

Quorum sensing 혹은 autoinduction는 세균이 자기 자신의 세포 농도를 계측할 수 있는 environmental sensing system을 설명하기 위해 처음으로 명명되었다. 이 용어의 사용은 상당히 새롭고도 낯설지만 최근에 병원균 신호전달물질로 작용하는 몇몇 화합물이 소개되었다. Gram-negative bacteria에서 대부분은 아니지만 N-acylhomoserine lactones (AHLs) family가 이에 속한다. 이들 분자는 그들의 N-linked side chains의 길이, 3-탄소의 치환, side chain 내의 하나 이상의 불포화 결합의 존재 유무에 따라 상이하다. Quorum sensing은 세포수 농도와 함께 유전자가 발현되는 transcriptional activator protein에 의해 분자량이 작은 분자의 diffusible signal molecule (autoinducer)의 상호작용에 의존한다. 이러한 signal molecule들은 세균 세포에서 확산되어 세포성장의 한 기능으로 주위에 축적된다. 일정한 수에 이르면 (threshold concentration/critical population density) 이러한 signal들은 일련의 target gene들의 전사를 조절하기 위해 co-inducers로 작용한다.

Autoinduction은 marine symbiotic bacterium *Vibrio* (현재 *Photobacterium*) *fischeri*에서 처음 보고되었으며, bioluminescence 조절의 중심적인 역할을 하는 AHLs는 Gram-negative marine bacteria *V. fischeri* 및 *Vibrio harveyi*에서 처음 확인되었다. *V. fischeri*에서, LuxI protein을 통해 합성되는 N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) 축적은 transcriptional activator protein LuxR와 상호작용에 의해 *V. fischeri lux operon*을 활성화한다. Cell-cell communication device로써 필수적으로 기능을 하는 유사 regulatory system들은 상이한 여러 Gram-negative 및 Gram-positive bacteria에서도 발견되었다. Gram-negative bacteria에서 AHL-mediated (cyclic dipeptide-mediated) cell-cell signalling은 antibiotic biosynthesis, virulence factors 생산, exopolysaccharide biosynthesis, bacterial swarming, plasmid conjugal transfer 및 stationary phase로의 전이 등과 같은 세균 기능을 조절하는 역할을 한다. *Pseudomonas aeruginosa*의 cyclic quinolones, *Xanthomonas campestris*의 low molecular weight substances, *Ralstonia solanaracearum*의 fatty acyl methyl ester 및 *Pseudomonas aerofaciens*의 항균성 활성을 가진 butyrolactone 등을 포함한 다른 형태의 signal compound들이 있다. 현재로 quorum sensing을 통한 유전자 조절이 일반적인 현상이라는 것이 잘 인식되고 있

다.

병원성, 비병원성 및 공생세균을 포함한 식물과 상호작용하는 몇몇 세균 중은 AHL 유사 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 식물관련 세균에서 quorum sensing은 growth inhibition, nodulation 및 항생물질 생산 등을 포함한 광범위한 성질을 조절하는 것으로 이용된다. 비교적 그 기작이 잘 알려진 식물병원균 *Pectobacterium* 속은 여러 작물에 무름병 증상을 일으킨다. 이 세균은 pectate lyases, polygalacturonases, cellulase 및 proteases와 같은 여러 가지 식물조직을 파쇄하는 효소를 생성한다. *Pectobacterium* 속에서 quorum sensing에 의해 exoenzyme 생산이 조절되며 충분한 숫자의 병원균 수가 증식한 다음에 비로소 식물방어를 피하게 되어 성공적인 조직파괴가 일어난다. Cell-density 의존 tissue macerating enzymes 발현은 LuxRI homologs, ExpR 및 ExpI에 의해 조절된다. Exoenzyme 조절에서 ExpR 및 발현산물 AHL, OHHL은 명백하게 알려지지 않은 실정이다. Exoenzyme 생성을 못하는 *expI* mutant는 식물 조직을 파쇄할 수 없다. 대조적으로 *expR* mutant는 정상적인 효소 생성 및 *expR* overexpression은 효소 생산의 감소가 일어났는데 ExpR는 exoenzyme synthesis의 repressor일 것이다. Quorum-sensing signal generation (*expI*) 및 response regulation에 책임이 있는 유전들이 클로닝 되었으며 *expI* 유전자가 조사되었다. 이들 유전자들은 *E. carotovora expIR* 유전자와 높은 상동성이 있다. OHHL 존재 하에서 ExpR protein 기능은 *pel* (pectate lyase) 유전자의 활성인자로 작용하는 것으로 암시하였다.

제 2 절 국내 · 외 관련기술의 현황과 문제점

식물 분자생물학의 급속한 발전은 식물이 아닌 다른 종, 즉 미생물, 곤충 등에서 발견되는 유용한 저항성 유전자를 분리하여 전혀 종이 다른 식물체로의 도입 및 새로운 품종으로서의 이용을 가능케 했다. Jaynes 등과 Casteel 등은 곤충에서 발견되는 항균성 활성을 가진 단백질들을 암호화하는 유전자를 사용하여 식물에서 세균병 저항성을 증진시키는 결과를 보고한 바 있다. 대부분의 용균 펩타이드 들은 많은 동물 종에서 항균성 방어기작의 중요한 요소로 생각되어진다. 세균을 용해시키는 기능을 갖고 있는 cecropin 펩타이드를 암호화하고 있는 유전자를 식물체에 형질전환하여 활성을 갖는 펩타이드를 생산하도록 하고자 methionine과 glycine을 amino 말단과 carboxy 말단에 각각 부착되도록 유전자를 조작하여 SB-37이라 명명하고, 담배에 형질전환한 결과 형질전환체의 추출액이 항균성을 나타냈다고 보고된 바 있다. 특히 아미노산의

일부를 변형시켜 만든 새로운 인공합성 펩타이드인 shiva가 SB-37보다 몇배나 강한 용균성을 나타내었다고 보고되었다. 이들의 보고에 의하면 CaMV35S promoter를 사용하여 얻은 형질전환체를 분석한 결과 *P. solanacearum*에 대한 상당한 저항성이 확인되었다. 또한 인공합성한 유전자로부터 생산된 shiva 단백질은 본래의 cecropin B와 같이 여러 가지 식물병원 세균에 대해 같은 수준의 활성을 보여주었을 뿐만 아니라 *Rhizoctonia solani*와 *Phytophthora cinnamoni*를 포함한 경제적으로 중요한 식물병원 진균들에 대하여도 성장억제 활성을 보였다. Fraley 등은 cecropin 유전자를 식물에 도입하여 활성을 갖는 펩타이드를 생산할 수 있도록 조작한 SB-37 유전자를 pBI121 벡터에 클로닝하여 *Agrobacterium tumefaciens* GV 3111 SE (pTiB6S3SE)로 도입한 후 담배에 형질전환시켰는데, 이때 분석한 8 계통 중 5 계통에서 SB-37 유전자가 1개 이상의 복제수로 존재함을 확인하였으며 항체를 이용한 western blot으로 단백질의 발현도 확인할 수 있었다고 보고하였다. 보다 활성이 뛰어난 shiva-1 펩타이드는 천연 cecropin B와 비교할 때 염기서열의 54%가 차이를 갖도록 제작되었으나 발현된 펩타이드의 구조는 cecropin과 비슷한 charge distribution, amphipathy, 및 천연 펩타이드의 소수성 특성 등을 갖도록 하였으며 SB-37보다 활성이 6-7배나 높았고 특히 다양한 식물병원 진균에 대해서도 상당한 활성을 보였다.

세균저항성 유전자를 이용한 분자생물학적 작물육종에 있어서 shiva-1은 매우 큰 잠재력을 제공하는 것으로 보였으며, SB-37 유전자를 포함한 감자 형질전환체에서도 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (흑각병과 저장중예 발생하는 연부병원균)을 감염시킨 예비실험에서 고무적인 결과를 얻었다고 한다.

제 3 절 앞으로 전망

우리나라는 선진국에 비해 정밀화학분야 연구개발이 낙후되어 있는 실정이므로 향후 개발 확률이 낮고 많은 개발비용과 기간이 소요되는 유기합성 농약보다는 상대적으로 단기간에 개발이 용이한 생물농약에 중점을 두는 것이 바람직하다고 전망된다. 이러한 대책의 일환으로 미생물 개발에 대한 연구가 권장되었다. 그러나 미생물 농약 개발에 가장 큰 문제점은 시용하는 미생물이 작물의 작용처에서 장기간 생존하여 계속적인 활성을 유지시키는 것이다. 활성이 높은 미생물이라도 시용하는 작물의 근권이나 엽권 혹은 식물조직 내에서 생존하여 장기간 그 효과를 유지해야 하기 때문이다. 작물의 근권이나 엽권에서는 기존의 다수 미생물이 존재하여 어느 정도 균형 및 경쟁을 이루기 때문에 시용하는 특정 미생물이 서식처에서 존재하여 생물상의 균형을

깨는 것은 용이한 일이 아닐 것이다. 따라서 이들의 생존을 부양하기 위해 시용미생물의 생존에 유리한 영양조건, 물리적 조건을 조성하여야 하지만 자연생태계에서는 인위적으로 특정미생물에 독점적인 환경조건을 만들어 준다는 것이 용이하지 않다.

문제의 효과적 타개책으로 동식물에 외래 유전자를 인위적으로 직접 도입시켜 새로운 내병성 형질전환체를 만드는 기술이 개발되었다. 내병성 및 내충성 작물이 개발될 경우 그 파급효과는 엄청난 규모가 될 뿐만 아니라 종자 시장 규모만도 연간 16조 원에 이를 전망이다. 이를 증명하듯 세계적인 대기업체인 Monsanto, Novatis, DuPont, CibagGeigy, Dow Chemical, Agrevo 뿐만 아니라 벤처회사급인 Calgene, CropGenetics, DNA Plant Technology, EcoScience, Ecofer, Mogen International 등 민간기업체 연구소에서 이 분야 연구에 집중투자를 하고 있으며 Novatis와 Monsanto 사에서는 1998년부터 미국 San Diego 및 Saint Louis에 5억불을 각각 투자하여 Plant Technology Research Institute를 설립하여 이 분야 연구에 대대적인 투자를 하고 있는 것이 선진국에서의 보편적인 실정이다. 더욱이 미국의 USDA 산하 연구소 및 각 대학연구실, 독일의 Max-Planck 식물육종 연구소, Max-Planck 식물분자생리연구소, 영국의 John Innes Center 등 국가 차원에서도 이 분야 연구에 대대적인 투자를 하고 있다. 이 분야 연구는 엄청난 파급효과가 예상되기는 하나 우리나라 사정으로 보면 연구 결과가 영세규모의 농민들에게 이익이 돌아가기 때문에 기업체보다는 정부차원에서의 지원으로 이루어져야 할 공익적 성격의 연구과제이기도 하다.

현재 개발되어 상업적으로 가장 널리 사용되는 대표적인 내충성 형질전환식물로 Bt-toxin 유전자를 이용한 것과 토양미생물에서 분리한 제초제 분해성 *bar* 유전자를 도입한 제초제 저항성 형질전환식물이 대표적이라고 할 수 있다. 무름병 연구는 현실적으로 이에 상응하는 탁월한 내병성 형질전환 식물체개발이 없는 실정을 고려할 때 최근 실용적인 측면에서 대두되고 있는 병원균-식물 상호작용기작인 quorum sensing system에 기초한 새로운 외래 도입유전자에 의한 무름병 저항성에 대한 보다 심도 있는 연구와 일 바탕으로 한 형질전환체 개발이 촉구된다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용과 결과

제 1 절 감자 무름병균 분리

1. 서론

본 실험에서는 우리나라 채소류에서 서식하는 무름병균 분리를 위해 무름병 증상이 있는 감자로부터 식물병원균을 분리하기 위해 세포벽분해효소 분비력에 의하여 1차 분리 선정하고 이들 선정균을 16S rDNA 분석법에 의하여 분류학적 조사를 하였으며 최종적으로 감자접종법에 의하여 무름병균을 확인하여 이후 실험 재료로 사용할 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 사용균주, 플라스미드, 배지

무름병균은 무름병 증상이 있는 감자로부터 TY 혹은 LB 배지에서 28℃ 배양하여 분리하였다. *Escherichia coli* DH5 α , BL21 (DE3)와 recombinant *E. coli*는 37℃, LB 배지 및 적당한 항생제를 첨가하여 배양하였다. 모든 항생제는 Sigma로부터 구입하였으며 다음과 같은 농도로 사용하였다 : ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 배지는 Difco (Detroit, Mich), pBluescript II SK+ (Stratagene), pGEM-T Easy vector (Promega) 및 pET22b(+) vector (Novagen)을 사용하였다.

2-2. 재조합 DNA 기법

Plasmid DNA는 alkaline 처리방법 및 QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 사용하였으며 제한효소 처리, 전기영동법, DNA 정제, DNA ligation 및 클로닝 기법 등의 방법은 일반적인 방법 (Sambrook and Russel)에 준하였다. 제한효소, DNA modifying enzyme는 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA) 및

Promega (USA) 제품을 사용하였다.

2-3. 세균에서의 DNA 추출법

세균세포를 원심분리하여 genomic DNA extraction kit (iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)를 사용하여 분리하였다.

2-4. 16S rDNA 분석

분리한 무름병균 16S rDNA 분석을 위해 16S rDNA specific primer 및 PCR 법에 의해 분석하였다. 사용한 2종류의 primer는 5'-CGG AGA GTT TGA TCC TGG-3' 및 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG AC-3' 였으며 1.5 kb fragment를 생성하였다. PCR은 thermal cycler (DNA engine PTC-100, MJ research, Watertown, MA, USA), Super-Therm DNA polymerase (JMR, Side Cup, Kent, UK) 및 다음 조건하에서 수행하였다 (1 cycle of 5 min at 94°C for denaturation, 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 60 sec at 72°C, and a final cycle of 72°C for 5 min). 얻어진 PCR 산물은 0.7% agarose gel에서 분리하였으며 gel extraction kit (NucleoGen, Seoul, Korea)를 사용하여 분리한 후 DNA sequencing 하였다.

2-5. 무름병균의 세포벽분해효소활성 측정

분리된 무름병균의 세포벽분해효소인 extracellular cellulases 및 pectate lyase 활성을 agar diffusion 방법에 의해 분석하였다. 분리균의 cellulase 활성은 cellulase activity indicator medium [LB medium containing, 15% (w/v) Cellomix (RNA, Seoul, Korea) and 1.5% agar (w/v)] 상에서 확인하였으며 pectate lyases는 pectate lyases activity indicator medium [LB medium containing 0.7% (w/v) sodium polypectate and 1.5% agar (w/v)] 상에서 확인하였다. 활성을 육안으로 관찰하기 위해 cellulase는 Congo red 용액을 pectate lyase는 포화 10% copper acetate 용액을 30 분간 처리하였다.

2-6. 무름병균의 감자접종실험

무름병균의 감자접종 실험은 분리균을 감자절편을 무균적으로 자른 후 감자 표면에 분리균을 접종하고 항온기에서 배양한 후 병징 정도를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 무름병균 분리

무름병 증상이 있는 감자로부터 1,000 여종의 cellulase 활성을 가지는 세균을 분리하였으며 이 중에서 활성이 높은 9 균주를 선발하였다 (Fig. 1-1). 이들 일부는 pectate lyase 활성도 있었다.

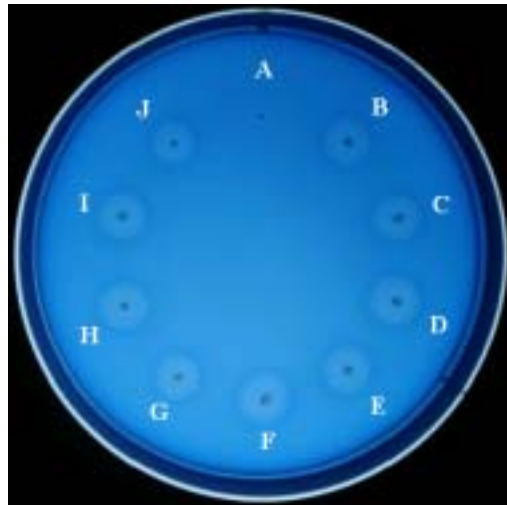


Fig. 1-1. Detection of cellulase activity colonies by agar diffusion method on the cellulase activity indicator medium. The cells were incubated at 28°C for overnight. A, *E. coli* as a negative control; B, isolate L101; C, isolate L201; D, isolate L305; E, isolate L307; F, isolate L312; G, isolate L313; H, isolate L317; I, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 as a positive control; J, *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 as a positive control.

3-2. 분리선정된 무름병균의 16S rDNA 분석

이들 분리된 9종의 무름병균으로부터 total DNA를 분리하고 bacteria-specific primer들을 사용하여 PCR 증폭한 결과 약 1.5 kb DNA 단편을 얻었다. 이들 단편을 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 DNA sequencing한 결과는 Table 1-1 및 Fig. 1-2, 1-3과 같다. 이들의 DNA를 BLAST algorithm (Madden et al.) RDP database (SIMILARITY_RANK program)로 분석한 결과 *Pectobacterium chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* 및 *Erwinia herbicola* 식물병원균으로 분석되었다.

Table 1-1. List of the isolated soft-rot bacteria

Bacterial name	Strain	16S rDNA
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	PY35	Fig. 1-2
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	LY34	Fig. 1-3
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	L101	Data not shown
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	L305	Data not shown
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	L313	Data not shown
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	L307	Data not shown
<i>P. carotavorum</i> subsp. <i>betavasculorum</i>	L201	Data not shown
<i>P. carotavorum</i> subsp. <i>wasabiae</i>	L312	Data not shown
<i>Erwinia herbicola</i>	L317	Data not shown

```

1   OGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGGGGCA GGCCTAACAC ATGCAAGTCG
61  AGCGGCAGCG GGGGAAGCT TGCTTCCCGG CCGGCGAGCG GCGGACGGGT GAGTAATGTC
121 TGGGGATCTG OCTGATGGAG GGGGATAACT ACTGGAAACG GTAGCTAATA CCGAATAACG
181 TCGCAAGACC AAAGTGGGGG ACCTTCGGGC CTCACGCCAT CGGATGAACC CAGATGGGAT
241 TAGCTAGTAG GTGAGGTAAC GGCTCACCTA GGGGACGATC CCTAGCTGGT CTGAGAGGAT
301 GACCAGCCAC ACTGGAACTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA
361 TATTGCACAA TGGGGGAAAC CCTGATGCAG CCATGCCCGG TGTGTGAAGA AGGCCTTGGG
421 GTTGTAAGC ACTTTCGGG GGGAGGAAGG GAGCAGGGTT AATAACCCGT TTCATTGACG
481 TTACCCGCGA AAGAAGCAAC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGGAGGGTG
541 CAAGCGTTAA TCGGAATGAC TGGGCGTAAA GCGCACGCAG GCGGTCTGTT AAGTTGGATG
601 TGAAATCCCC GGGCTTAACC TGGGAACTGC ATTCAAAACT GACAGGCTAG AGTCTCGTAG
661 AGGGGGGTAG AATTCAGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATCTGGAGG AATACCGGTG
721 GCGAAGGGCG CCCCTGGAC GAAGACTGAC GCTCAGGTGC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA
781 GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCAAGCTGTA AACGATGTCG ATTTGGAGGT TGTGCCCTTG
841 AGGCGTGGCT TCCGGAGCTA ACGCGTAAA TCGACCGCCT GGGGAGTACG GCCGCAAGGT
901 TAAAACTCAA ATGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTGGA
961 TGCAACGCGA AGAACCTTAC CTACTCTTGA CATCCAGCGA AGCCTGTAGA GATACGGGTG
1021 TGCCCTTGGG AGCGCTGAGA CAGGTGCTGC ATGGCTGTCG TCAGCTCGTG TTGTGAAATG
1081 TTGGGTTGAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTATCCTCTG TTGCCAGCAC TACGGGTGGG
1141 AACTCAGGGG AACTGCGCGG TGATAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA
1201 TGGCCCTTAC GAGTAGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG CATACAAAGA GAAGCGACCT
1261 GCGGAGAGCA AGCGGACCTC ATAAAGTGGG TCGTAGTCCG GATTGGAGTC TGCAACTCGA
1321 CTCCATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGT AGATCAGAAT GCTACGGTGA ATACGTTCCC
1381 GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCAAAAAGA GTAGGTAGCT
1441 TAACCTTCGG GAGGGCGCTT ACCACTTTGT GATTCATGAC TGGGGTGAAG TCGTAACAAG
1501 GTAGCCGTA

```

Fig. 1-2. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35.

1 OGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGGGGCA GGCCTAACAC ATGCAAGTGG
61 AGCGGTAGCA CAGAGAGCTT GCTCTCGGGT GACGAGCGGC GGACGGGTGA GTAATGTCTG
121 GGAAACTGCC TGATGGAGGG GGATAACTAC TGGAAACGGT AGCTAATAAC GCATAACGTC
181 TTGGACCAA AGAGGGGGAC CTTCGGGCTT CTTGCCATCA GATGTGCCA GATGGGATTA
241 GCTAGTAGGT GAGGTAATGG CTCACCTAGG CGACGATCC TAGCTGGTCT GAGAGGATGA
301 CCAGCCACAC TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAAATA
361 TTGCACAATG GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TGTGAAGAAG GCCTTCGGGT
421 TGTAAGCAC TTTCAGCGGG GAGGAAGCGG GTGAGATTAA TACTCTCATC GATTGACGTT
481 ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA
541 AGCGTTAATC GGAATGACTG GCGTAAAGC GCACGCAGGC GGTTTGTTAA GTCAGATGTG
601 AAATCCCCGA GCTTAACTTG GGAAGTGCAT TTGAAACTGG CAAGCTAGAG TCTTGTAGAG
661 GGGGGTAGAA TTCCAGGTGT AGCGGTGAAA TCGGTAGAGA TCTGGAGGAA TACCGGTGGC
721 GAAGGGGCC CCTGGACAA AGACTGACGC TCAGGTGCGA AAGCGTGGG AGCAAACAGG
781 ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCTGTAAG CGATGTCGAT TTGGAGGTTG TGCCCTTGAG
841 GCGTGGCTTC CGGAGCTAAC GCGTTAAATC GACCGCCTGG GGAGTAAGGC CGCAAGGTTA
901 AAATCAAAT GAATTGACGG GGGCCCCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTGATG
961 CAACGGGAAG AACCTTACCT ACTCTTGACA TCCACAGAAT TCGGTAGAGA TACCTTAGTG
1021 CCTTCGGGAA CTGTGAGACA GGTGCTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTG GTGAAATGTT
1081 GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCCT ATCCTTTGTT GCCAGCGGTT CGGCCGGGAA
1141 CTCAAAGGAG ACTGCCAGTG ATAACTGGA GGAAGGTGGG GATGACGTC AGTCATCATG
1201 GCCCTTACGA GTAGGGCTAC ACAAGTGTCA CAATGGCGTA TACAAAGAGA AGCGACCTCG
1261 CGAGAGCAAG CGGACCTCAT AAAGTACGTC GTAGTCCGGA TTGGAGTCTG CAACTCGACT
1321 CCATGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGTAG ATCAGAATGC TACGGTGAAT ACGTTCCCGG
1381 GCCTTGACA CACCGCCGT CACACCATGG GAGTGGGTTG CAAAAGAAGT AGGTAGCTTA
1441 ACCTTCGGGA GGGCGCTTAC CACTTTGTGA TTCATGACTG GGGTGAAGTC GTAACAAGGT
1501 AGCCGTA

Fig. 1-3. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34.

3-3. 16S rDNA 염기서열의 상호 비교 분석

16S rDNA sequence 분석 결과 *P. chrysanthemi* PY35는 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*에 비교하여 94.8%-95.9%의 유사성을 가지고 있었으며, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* L307와는 94.9%, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* L201와는 95.6%, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* L312와는 95.5%, *Erwinia herbicola* L317와는 73.5%의 유사성을 가지고 있었다 (Table 1-2). *P. chrysanthemi* PY35는 4 균주의 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 와 유사성이 매우 높았다.

Table 1-2. Pairwise similarity between 16S rDNA sequences

Strain	Similarity (%) with 16S rDNA sequence								
	PY35	LY34	L101	L305	L313	L307	L201	L312	L317
<i>Pch</i> PY35	100.0	94.8	95.6	95.6	95.9	94.9	95.6	95.5	73.5
<i>Pcc</i> LY34		100.0	97.7	97.9	97.9	97.2	97.0	97.9	73.8
<i>Pcc</i> L101			100.0	99.3	99.1	97.6	97.2	98.0	73.7
<i>Pcc</i> L305				100.0	99.1	97.5	97.6	98.1	73.7
<i>Pcc</i> L313					100.0	97.4	97.3	98.0	74.1
<i>Pca</i> L307						100.0	97.7	98.6	74.1
<i>Pcb</i> L201							100.0	97.9	73.9
<i>Pcw</i> L312								100.0	74.0
<i>Ehe</i> L317									100.0

Pch, *Pectobacterium chrysanthemi*; *Pcc*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Pca*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*; *Pcb*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculorum*; *Pcw*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae*; *Ehe*, *Erwinia herbicola*.

3-4. 무름병균의 식물 접종 실험

분리병원균 9 균주 중에서 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 및 *P. chrysanthemi*가 전형적인 무름병균으로 확인되었으며 다양한 세포벽분해효소도 분비하였다. 무름병균의 식물접종실험으로 *P. chrysanthemi* PY35를 감자 및 배추에 접

중한 결과는 Fig. 1-4과 같다. 실험균주는 무름병 증상을 잘 나타내었으나 대조균으로 사용한 *E. coli*는 전혀 병징을 나타내지 않았다.

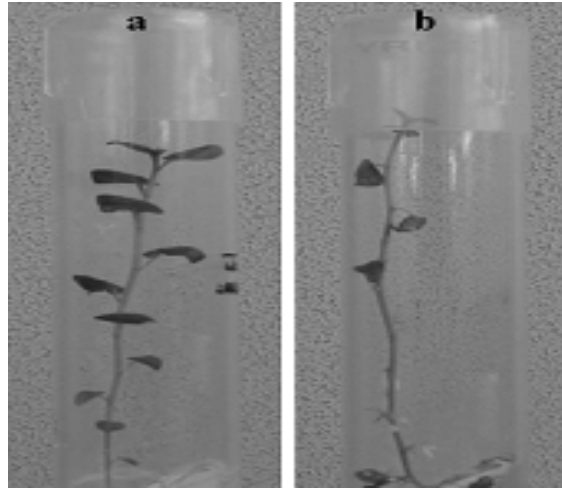


Fig. 1-4. Comparison of healthy potato (a) infected with *E. coli* and the plant infected with *P. chrysanthemi* PY35 (b) showing soft-rot.

4. 결론

무름병 증상이 있는 감자로부터 1,000 여종의 cellulase 활성을 가지는 세균을 분리 하였으며 이중에서 활성이 높은 9 균주를 선발하였다. 이들 분리 선정된 식물병원균의 16S rDNA 분석 결과 *Pectobacterium chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* 및 *Erwinia herbicola* 식물병원균으로 분석되었다. 분리병원균 9 균주 중에서 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 및 *P. chrysanthemi*가 전형적인 무름병균으로 확인되었으며 다양한 세포벽분해효소도 분비하였다. 무름병균의 식물접종실험으로 *P. chrysanthemi* PY35를 감자 및 배추에 접종한 결과 무름병 증상을 잘 나타내었다. 이들 분리균주는 이후의 실험재료로 사용하기에 적합하였다.

제 2 절 감자 무름병균의 세포벽 분해효소 유전자 분리

1. 서론

다양한 부류의 많은 세균들은 적정 세포밀도 인식 (quorum sensing) 기작을 통하여 세포 밖으로 신호물질을 분비하여 개체의 밀도 변화를 감지한다. 세균의 밀도가 증가함에 따라 축적된 신호물질은 세포 안으로 들어와 조절 단백질과 결합하여 기주의 병발과 관련된 다양한 유전자들의 발현을 조절한다. 이처럼 세균의 밀도에 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 적정 세포밀도 인식 기작은 신호물질의 합성과 감지가 필수적이다. 기회성 무름병균인 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34의 적정 세포밀도 인식 기작에는 acylhomoserine lactone (AHL) 계열의 HHL, OHHL이 관여한다. 이 과정에서 복잡한 조절 네트워크를 작동하여 전체 유전자들 중 병원성에 관련된 유전자를 포함한 약 5% 유전자의 발현을 조절한다. 이에 신호물질과 세포벽분해효소 발현과도 관여될 것으로 추정된다.

이 방면의 최근의 연구 결과를 보면 많은 세균들은 화학적 신호물질의 자유로운 확산을 통하여 상호간의 커뮤니케이션을 하며 개체의 집단 행위를 조절한다. 그러나 몇몇 신호물질은 극소수성의 성질을 가지고 있어 물에 거의 녹지 않는다. 지금까지 세균들이 어떻게 소수성의 신호물질을 동료 또는 적에게 전달하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다. 같은 종의 다른 세균에게 메시지를 전달하기 위해 소수성의 신호물질을 단순히 분비하는 것이 아니라 거품 같은 소낭 (vesicle)으로 방출시켜 수용성 상태의 세포질에서 유기용매성 신호물질이 물에 거의 녹지 않아 수용성 환경에서 멀리까지 이동 될 수 없거나 세포질 내의 효소 공격을 받아 분해되는 것을 방지할 수 있을 것이다.

무름병균인 *Pectobacterium* sp.에서는 8종류의 pectate lyases PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL가 분비된다는 것을 보고한 바가 있다. 무름병균에서 지금까지의 대부분의 연구는 pectic enzyme에 대한 연구가 주류를 이루어 왔으며 cellulase, hemicellulase에 대한 연구는 적은 편이다. 그리고 *Pectobacterium* sp.에서의 β -glucosidase operon에 대한 연구는 아주 적은 실정이다. 따라서 본 실험에서는 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 genomic DNA로부터 cosmid library 제조한 후 새로운 cellulase인 *celC* 유전자 클로닝과 3종류의 β -glucosidase operon을 분리하여 그 특성을 조사하였다.

본 연구에서는 무름병의 세포벽분해효소의 주요 작용인 cellulase 및 섬유소 분해와 연관된 β -glucosidase가 병 발생 및 quorum sensing 기작 작동과 관련될 것이라

생각되어 무름병균에서 존재하는 전 cellulase 및 β -glucosidase 유전자를 클로닝하는 것이 앞으로의 무름병 저항성에 관련되는 기초적 연구 자료를 확보하는 것이 중요하다고 사료된다.

따라서 본 2절에는 실험 I과 실험 II로 나누고 실험 II에서는 3 part로 구분하여 실험하였다.

<실험 I> 무름병균에서 새로운 *celC* 유전자 클로닝과 3종류 cellulase 유전자 상호 비교

<실험 II> 무름병균에서 3종류 β -glucosidase operon 분리

<실험 II-1> 무름병균의 *bgl*TPB operon 분리

<실험 II-2> 무름병균의 *asc*GFB operon 분리

<실험 II-3> 무름병균의 *bgl*EFIA operon 분리

<실험 I> 무름병균에서 새로운 *celC* 유전자 클로닝과 3종류 cellulase 유전자 상호 비교

1. 서론 (실험 I)

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (*Pcc*)는 종전의 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*)로 분류되었으며 *Pectobacterium chrysanthemi* (*Pch*)과 함께 식물의 무름병 발병 중요 원인균이다. 이 세균들은 식물세포벽 구조를 와해시킬 수 있는 능력이 있는데 이러한 능력은 일련의 pectinolytic enzyme, cellulolytic enzyme 등의 세포벽 분해효소를 대량 분비할 수 있는 능력에 기인한다. 이러한 효소들은 multiple enzymatic form으로 분비되어 상호복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며 효율적으로 식물세포벽을 분해할 수 있다.

Erwinia chrysanthemi (*Ech*) 3937는 8종류의 pectate lyases PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL을 분비한다. 무름병균에서 지금까지 대부분의 연구는 pectic enzyme에 대한 연구가 주류를 이루어 왔으며 cellulase and hemicellulase에 대한 연구는 적은 편이다. 지금까지 *Pch* 3937에서 2종류의 cellulase CelZ와 CelY가 보고되었으며 *Pcc* SCC3193에서는 2종류의 CelV (family 5), CelS (family 12)가 보고되었다.

본 연구에서는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34에서 본 연

구자들이 분리한 *celA*와 *celB* 이외에 새로운 cellulase 유전자 *celC*를 클로닝하고 그 특성을 보고한다.

2. 재료 및 방법 (실험 I)

2-1. 사용균주 및 배양조건

E. coli XL1-blue와 recombinant *E. coli* cell은 적당한 항생물질을 함유한 (ampicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; kanamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; tetracycline, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) LB에서 생육시켰다.

2-2. 섬유소분해효소 정제 및 활성 측정

Cellulase gene를 함유한 *E. coli*에서 그 활성을 측정하기 위해 세균 콜로니를 cellulase activity indicator medium [LB agar plates containing appropriate antibiotics and 15% (v/v) Cellomix (RNA, Suwon, Korea)]에서 생육시켰다. 37°C에서 24시간 생육시킨 다음 푸른색 바탕에 백색의 halo를 형성하는 것을 양성균으로 선정하였다.

효소정제를 위해 pRY100를 함유한 *E. coli* XL1-Blue를 생육시킨 다음 10,000 g, 10 min, 4°C 조건에서 원심분리시켰다. 상등액을 70% ammonium sulfate 용액으로 침전시켰으며 침전물을 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 투석한 다음 urea 존재 하에서 Q-sepharose에서 fraction하였다. 다시 활성이 가장 좋은 fraction을 다시 투석시켜 phenyl-sepharose column에서 정제하였다. 정제된 1 unit의 효소활성을 37°C에서 1분당 유리되는 1 mole의 reducing sugar를 환산하였다. 효소활성은 dinitrosalicylic acid 법에 의하여 정량적인 측정을 하였다. 단백질 농도는 Bradford 법에 준하였다.

2-3. 부위 돌연변이 실험

Pcc LY34의 endo-1,4- β -D-glucanase를 암호화하는 *celC* gene (1.9 kb)를 site-directed *in vitro* mutation 실험에 사용하였다. 사용한 primer는 E57A는 27-mer

synthetic oligonucleotide primers 5'-ATC ACC ACG TCC GCA GGG CAA AGC TAC-3' (forward)와 5'-GTA GCT TTG CCC TGC GGA CGT GGT GAT-3' (reverse)를, D118A는 28-mer primers 5'-CAA CTC CGC TTC CGC TGC CGA CCT GTG G-3' (forward)와 5'-CCA CAG GTC GGC AGC GGA AGC GGA GTT-3' (reverse), D245A는 28-mer 5'-CAT CAG CAG CTA CGC CGC CAT CCG CGT C-3' (forward)와 5'-GAC GCG GAT GGC GGC GTA GCT GCT GAT G-3' (reverse)를 각각 사용하였다. 50 μ l의 반응 혼합물에는 pRY100 DNA 1 μ l, 10 μ mol의 각 primer 1 μ l, 2 mM dNTP 혼합액 5 μ l, 10x Pfu DNA polymerase buffer (20 mM MgCl₂ 포함) 5 μ l, 2.5 U의 cloned Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 1 μ l를 첨가하였다. PCR 산물을 ice에서 5 분간 반응시킨 후 1 μ l의 *DpnI* restriction enzyme (10 U/l)을 가하고 가볍게 혼합한 다음 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 *DpnI* treated plasmid를 *E. coli* XL1-blue에 형질전환시켰다 (Site-directed mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, CA).

2-4. 단백질 전기영동법에 의한 섬유소분해효소 직접 활성 측정법

CMC-SDS-PAGE (carboxymethylcellulose-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 *celC* gene을 함유한 *E. coli* XL1-blue cell들을 sonication한 후 상등액을 sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol, and 2% SDS)와 1:1 (v/v)으로 혼합하고 95°C에서 3분간 처리한 다음 CMC가 함유된 SDS-PAGE에 전기영동 후 Congo red에 발색시킨 다음 gel 상에서 활성 band를 직접 확인하였다.

3. 결과 및 고찰 (실험 I)

3-1. *celC* 유전자 분리 및 제한지도

Cosmid library에서 cellulase 양성균을 선발하고 subcloning한 결과 1.9 kb fragment (pRY100)을 함유한 *cel* gene을 최종 선발하였다. 이 clone의 DNA size, orientation, 제한효소 절단부위를 확인하였다. pRY100 함유 clone은 *BalI*, *BamHI*, *SalI*, *ClaI*, *BstXI*, *SacI*의 제한효소 부위를 가지고 있었으며 최종 1.7 kb fragment (pRY200)를 함유한 clone을 기 보고한 clone *celA*, *celB*와 구별하여 *celC*로 명명하였

다 Fig. 2-1). 이들의 활성 비교한 것은 Fig. 2-2에 있다.

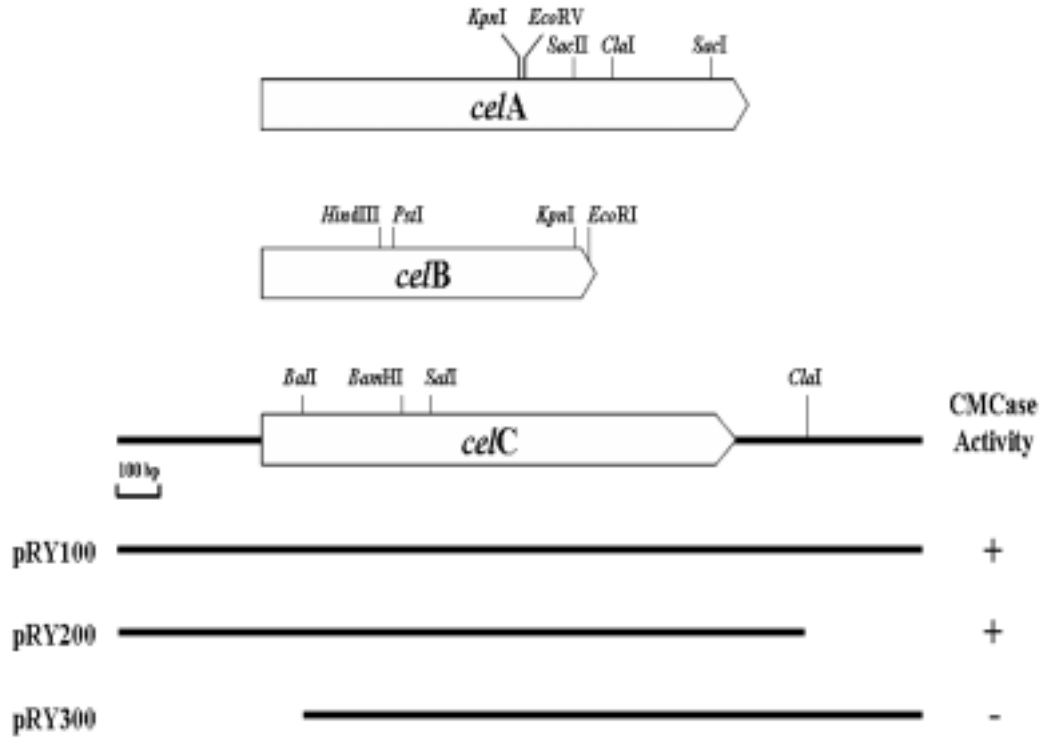


Fig. 2-1. Restriction map of *celA*, *celB*, and *celC* (pRY100) gene from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. The cleavage sites of restriction enzymes *BalI*, *BamHI*, *SalI*, *ClaI*, *BstXI*, and *SacI* are shown in pRY100. pRY100 was constructed by cloning a 1.9 kb *Sau3AI* fragment of *Pcc* LY34 DNA into the *BamHI* site of pBluescript II SK⁺ vector. pRY200 (*celC*) was derived by subcloning of the 1.7 kb fragment into the corresponding sites of pBluescript II SK⁺. (+) and (-) represent the result of the test for CMC-degrading activity.

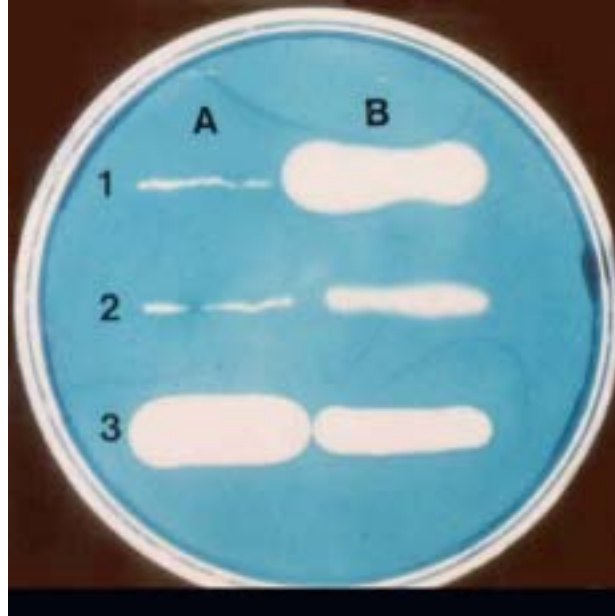


Fig. 2-2. Detection of CMCase positive clones by the agar diffusion method. The cells were incubated at 37°C for 1 day. 1A, *E. coli* XL1-blue harboring pBluescript II SK+ for negative control; 2A, pRY300; 3A, *E. coli* XL1-blue harboring *cel5Z* of *Pch* PY35 for the positive control [21] 1B, *E. coli* XL1-blue harboring *celA* of *Pcc* LY34 for the positive control [23] 2B, *E. coli* XL1-blue harboring *celB* of *Pcc* LY34 for the positive control [22] 3B, *E. coli* XL1-blue harboring *celC* of *Pcc* LY34.

3-2. *celC* 유전자의 염기서열

1.9 kb inserted fragment를 함유한 pRY100를 dideoxy chain-termination 방법에 의해 분석한 결과 하나의 open reading frame (ORF)을 가지고 있었다. Figure 2-3은 *celC* 유전자의 염기서열을 나타내며 1,116 bp로 371 amino acid residue를 암호화하며 그 분자량은 41,580 Da이었다. ATG initiation codon은 nucleotide position 347에 있었으며 그 앞에는 putative Shine-Dalgarno sequence인 GGGA의 존재가 확인되었다. ORF는 position 1,459에서 TAA stop codon이 존재하였다. First 22 amino acids (in front of Ala23)에 전형적인 prokaryotic signal peptide가 존재하였다 (NH₂-terminal

region of pre-CelC, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). *celC* gene이 확실히 *Pcc* LY34 chromosome에서 유래한 것인가를 확인하기 위해 internal primer (set from the ORF region of *celC*, 5'-GCA CCA CGC AAC GCC TGC TGT TGG-3' (forward) and 5'-GCA CGA GGT CGT CTT TGT TGC TGG-3' (reverse)를 이용하여 PCR 증폭한 결과 해당되는 DNA fragment를 확인할 수 있었다. 즉, 해당되는 0.6 kb fragment DNA의 염기서열을 분석한 결과 정확하게 일치하였다 (accession number AY188753).

3-3. CelC 아미노산서열의 상동성

Pcc LY34 CelC의 아미노산 염기서열과 *Pch* PY35 Cel8Y, *E. coli* BcsC, *Cellulomonas uda* Cel과 상동성 염기서열을 분석한 결과 각각 27%, 61%, 28% identity를 보여 주었다. *Pcc* LY34의 CelA, CelB, CelC의 상동성 조사를 한 결과 동일 균주에서 유래한 *cel* 유전자임에도 불구하고 그 상동성이 낮았다.

Pcc LY34의 CelA, CelB, CelC의 아미노산 서열 상동성 비교 결과 각각은 *Pch* PY35 (family 8)의 Cel5Z, *Pch* PY35 (family 5)의 Cel8Y, *Rhodothermus marinus* (family 12)의 CelA와 유사하였다. 따라서 *Pcc* LY34는 3종류의 상이한 family를 가지는 섬유소분해효소 유전자를 가지는 것으로 생각된다 (Table 2-1). SwissProt 및 GenBank database, NCBI Blast search를 통해 상이한 cellulase family의 35 종의 cellulase들의 phylogenetic tree를 작성한 결과는 Fig. 2-4와 같다. 결과에서와 같이 CelC protein은 *E. coli* K12의 BcsC (P37651)와 가장 유사하였다. 따라서 CelC는 family 8에 속하는 것으로 확인하였다.

```

1   TCTCCGTATCACBACCAGCBTAGCBTTGTTCGCCCTGCTGGCCBATAGCCACAGGGCTATACGCTGCTCAATAAC
76  GCGCTGATCGACAGCGAAAAAAGAGCCTCGCTGTTCCGTTCCGTTCCGTCATCCGCGAATCGGGTATTAATAAT
151 CTCCGCBTGGAGACATTTATTACGTCGGCCATCTGCCGTGGTGGBAACGCATCTGGCACGCATTGGCGCAGCAT
226 CCCGTCGGCTAGCCATCATCTCGACGCTTACCBTGCTATTGTTGCTTGCCTGGCTGCTGTGGCGTGGCCGAAATTC
                                     -35                               -10
301 TTCAGTCGCCGTCGCTGTGCGCCGATGAAAAGGACTAACGCACCATGCCACGCBTGTGCACTACCTGATCCCC
1   SD                               M P R V L H Y L I P
376 ACGTTGCTGTGGCTATGGGCTTCCCAGGCCACCCGCCBCTGCBACTGGCCAGCCTGGGAGCAGTACAAACAG
11  T L L M L M A S Q A T A A Y C D M P A M E Q Y K Q
451 CATTACATCAGTGCGBAAGGACGGGTGATTGATACCTCTACCCCAACAAAATCACCACGTCGAAAGGGCAAAAGC
36  H Y I S A E G R Y I D T S T P N K I T T S E G Q S
526 TACGCCATGTTCTTTGCTCTGGTCCCAACGATCAGCGTGTGTTGATCGGCTGCTGCAATGGACGGAACAACAAC
61  Y A M F F A L Y A N D R Y M F D R L L Q M T E N N
601 CTGTCCBACGGCBATTTACGTGCGCATCTGCCCGCCTGGCTGTGGGGAGAAAAACAAGATAAGCAGTGGACGGTG
86  L S A G D L R A H L P A M L M B E N K D K Q M T Y
676 CTGGATCCCAACTCCGCTTCCGATGCCGACCTGTGGATCGCCTACAGCCTGCTTGAGGCTGGTCCGACTGTGGAAA
111  L D P N S [A S D A D L M I A Y S L L E A G R L M] K
751 GAGGCGCGCTATCAGACAGTTGGCACCGCCTGCTGCCCCGATCGCCAAAGAAAGAGGTCGTCATATTTCCAGGA
136  E A R Y Q T Y G T A L L A R I A K E E Y Y N I P G
826 CTGGGCGTGTGTTGCTGCCCGGCAAGTAGGCTTCGACAGAGAAAGAGAGCTGGCGATTAAATCCAGTTACCTT
161  L G Y M L L P G K Y G F A E K E S M R L N P S Y L
901 CGGCCACAGTGTGCTGGCTGCTTTGCGCCACTGAGCGAGACGTTGGAAAGCGATGACAGCGACCCACGCAACGCTG
186  P P Q L L A R F A P L S E T M K A M Q R T T Q R L
976 CTGTTGAAACCGCGCCAAAAGGCTTCTCGCTGATTTGGTTCATCTGGCAAAAAGATAAGGGCTGGCAGCCTGAT
211  L L E T A P K G F S P D M Y I M Q K D K G M Q P D
1051 ACCACCAAACCCAAACATCGGCAGCTACGACGCCATCCGCBTCTATCTGTGGGCAGGGATGATGGCCBACAGCAGC
236  T T K P N I G S Y D A I R Y Y L M A G H H A D S S
1126 AAAGGGAAAACCBATCTGATCAAACAGTTTCAGCCAAATGGTTCAGCAGACGATAAAGCAAGGTCGCCGCCBAA
261  K G K T D L I K Q F Q P H Y Q Q T I K Q G L P P E
1201 AAAACCBACACCBCGACAGGCACCGTCACTGGACAGGGATCGGTTGGGTTTCCGCTTCGCTGCTCCGATGCTT
286  K T D T A T G T Y T G Q G S Y G F S A S L L P M L
1276 TCTCGTCAGTGGATGCACTGGCTACCCAACGACAGCGGCTGGCCBACAACCCCTCCGGGGATGATGCGTATTTTC
311  S R Q S D A L A T Q R Q R L A D N P P G D D A Y F
1351 TCCGCTCTCTGACGCTCTTTGGTCAAGGATGGATCAGAAAGCBCTATCGCTTCACTTACAAGGCCAACTTTTA
336  S A S L T L F G Q G M D Q K R Y R F T S Q G Q L L
1426 CCGTCTCGGGCAGCCAATGCATAAACACCGTAAACTGGCTGCGCTTCTCCCGTTATTACTGGTGTGCTGCGC
361  P S R G S Q C I T T P *
1501 CCGAGGCATACAGTGCAGAAATCGCATCGCCAGAGCAATTTTGTATGGAGCAGGTGCBTCTGGGAGAAAGCCAGCA
1576 ACAAGAGCAGCCTCGTGCBCAAATCGCTTTATCGACTGGAGCTTATCGATCCAACAACCCCGAGTTATCGCCG
1651 CCCGATTGCGGCTGGCGCTGCGTCAAGGCGATCAGGCCAGGCTCGTCAGCAACTGGACAAGCTGAAGGCGGTGG
1726 CTCCGACTCTGCCACCTACCATCAGTCAGCCACCAGCTGGCACTGACGCGAGGATGCCGCTGCCAGCAATTAC
1801 AGCAGGCGCGCTTGTGTCTACGCGGGGCGCTATGCTGAAGCCAAAGTGCAGTACGATGCGCTCTTTCACGCGC

```

Fig. 2-3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *celC* gene of *Pcc* LY34 with its flanking region. The putative Shine-Dalgarno (SD) box is indicated. -10 region and -35 region were underlined. The underline indicates signal peptide. The conserved region of the glycoside hydrolase family 8 was boxed. Arrowheads indicate exchanged residues by site-directed mutagenesis.

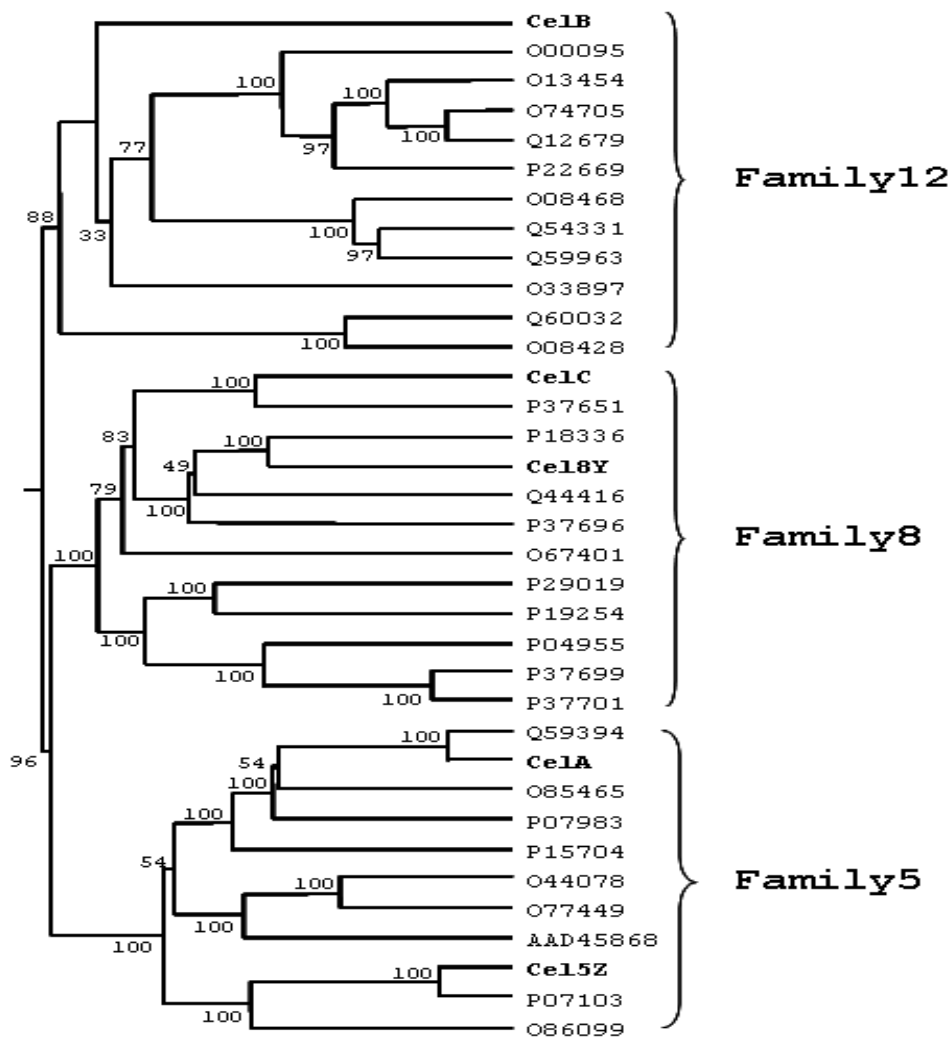


Fig. 2-4. Phylogenetic tree showing the evolutionary relatedness and levels of homology between the CMCase amino acid sequences. The estimated genetic distance between sequences is proportional to the lengths of the horizontal lines connecting one sequence to another. Bootstrap values of the major branch points are shown; they represent the number of times the group consisting of the species to the right of that branch occurred among 100 trees. The sequences are of the following proteins: CelB, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 (AF025769); O00095, *Trichoderma reesei* O13454, *Aspergillus oryzae* O74705,

Aspergillus niger Q12679, *Aspergillus kawachii* P22669, *Aspergillus aculeatus* O08468, *Streptomyces halstedii* Q54331, *Streptomyces lividans* Q59963, *Streptomyces rochei* A2; O33897, *Rhodothermus marinus* Q60032, *Thermotoga maritima* O08428, *Thermotoga neapolitana* CelC, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 (AY188753) P37651, *Escherichia coli* K12; P18336, *Cellulomonas uda* Cel8Y, *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 (AF232821); Q44416, *Agrobacterium tumefaciens* P37696, *Acetobacter xylinus* ATCC 23769; O67401, *Aquifex aeolicus* P29019, *Bacillus* sp. KSM-330; P19254, *Bacillus circulans* WL-12; P04955, *Clostridium thermocellum* NCIB 10682; P37699, *Clostridium cellulolyticum* P37701, *Clostridium josui* Q59394, *Erwinia carotovora atroseptica* CelA, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 O85465, *Bacillus agaradherans* P07983, *Bacillus subtilis* DLG; P15704, *Clostridium acetobutylicum* O44078, *Globodera rostochiensis* O77449, *Heterodera glycines* AAD45868, *Meloidogyne incognita* Cel5Z, *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 (AF208495); P07103, *Erwinia chrysanthemi* 3937; O86099, *Alteromonas haloplanktis*.

Table 2-1. Pairwise similarity between CMCase amino acid sequences of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium chrysanthemi*

CMCase amino acid sequences ^b	Similarity (%) with CMCase amino acid sequences ^a				
	1	2	3	4	5
1. CelC	100.0	8.4	5.0	17.5	30.9
2. CelA		100.0	20.3	34.4	7.4
3. CelB			100.0	11.7	5.0
4. Cel5Z				100.0	11.7
5. Cel8Y					100.0

^aCalculated with CLUSTAL W and the PAM250 residue weight table.

^bThe sequences are from the following sources: CelC, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 (this study); CelA, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 (AF025768); CelB, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 (AF025769); Cel5Z, *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 (AF208495); Cel8Y, *Pectobacterium chrysanthemi* PY35(AF282321).

3-4. *celC* 유전자 산물의 확인과 특성

celC 유전자 산물의 단백질 분자량을 측정하기 위해 CMC-SDS-PAGE 방법으로 측정하였다. Active protein band는 약 39,000 Da 정도로 확인되었는데 predicted *celC* gene product는 349 amino acids로 구성되어 있어 39,064 Da의 estimated molecular mass로 계산되는데 signal peptide 부분을 제외하면 실제 단백질 질량과 잘 일치되었다 (Fig. 2-5 & Table 2-2). 실제 *Pcc* LY34의 CelA, CelB와 비교하여 를 포함하여 zymogram을 표시하였다 (Fig. 2-5).

CelC의 효소 정제가 실험 재료 및 방법에 기술한 방법에 따라 정제하여 SDS-PAGE 전기영동한 결과 약 39 kDa로 나타났다. 최적 효소 활성 pH는 7 부근이었으며 최적온도는 40°C였다. 이 정제효소의 pNPG, avicel에 대한 효소 활성은 없었다. β -cellulose fibers에 대한 활성도 보이지 않았다.

Pcc LY34 CelC protein의 predicted primary structure는 *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelA와 유사하였는데 catalytic amino acid를 포함하고 있었다. *C. thermocellum* CelA에서 catalytic residue의 위치가 high-resolution X-ray crystallography에 의해 확인되었는데 Glu95의 carboxylate group이 β -1,4-linking oxygen에 수소결합을 하고 있어 proton donor 역할을 하는 것으로 확인되었다. Scissile glycosidic bond에 인접한 Asp152 혹은 Asp278의 carboxylate group이 일반적인 가수분해반응에 관여하는 base로 추정된다. 이러한 아미노산에 해당하는 *Pcc* LY34 CelC에서 Glu57, Asp118, Asp245로 각각 확인되었다. 단백질 구조-기능 연구와 관련하여 *Pcc* LY34 CelC의 single-point mutant, E57A, D118A, D245A를 제작하여 그 활성을 측정한 결과 그 활성이 없거나 미약해지는 것을 알았다. 따라서 *Pcc* LY34 CelC의 Glu57, Asp118, Asp245는 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다.

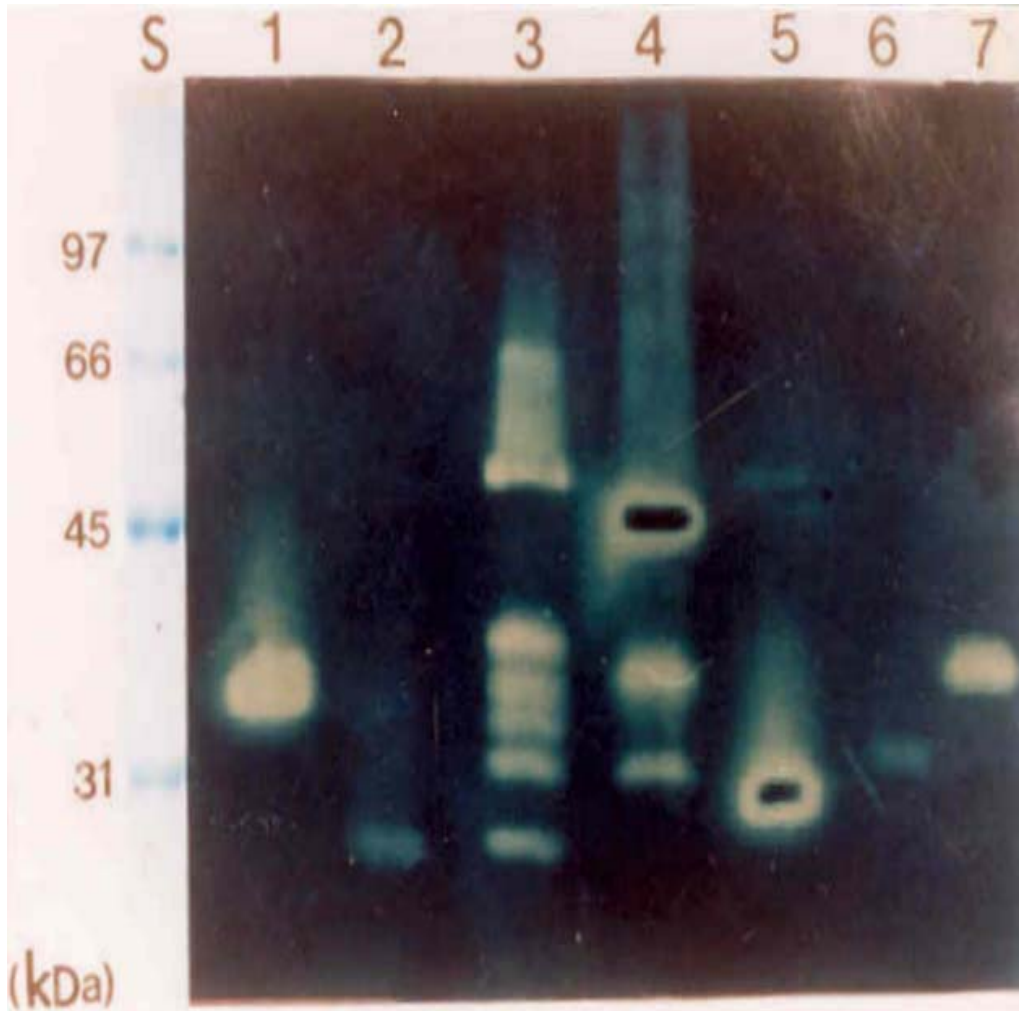


Fig. 2-5. Detection of CMCCase activities of *Pectobacterium* sp., CelC, and other *cel* gene products of *Pectobacterium* sp. by CMC-SDS-PAGE. The sonicated extract of cells for the intracellular cellulase and the supernatant of the culture for the extracellular cellulase after centrifugation were loaded on a CMC-SDS PA gel. After electrophoresis and protein reaction, cellulase activities were detected by staining with Congo red and HCl solution. Lane 1, *E. coli* XL1-blue harboring *celC* of *Pcc* LY34; lane 2, *E. coli* XL1-blue harboring *celB* of *Pcc* LY34; lane 3, the sonicated extract of cells for the intracellular cellulase plus the supernatant of the culture for the extracellular cellulase *Pcc* LY34; lane 4, cell extract of *Pch*

PY35; lane 5, the supernatant of culture of *Pch* PY35; lane 6, *E. coli* XL1-blue harboring *cel8Y* of *Pch* PY35, lane 7, *E. coli* XL1-blue harboring *cel5Z* of *Pch* PY35, and lane S, the molecular weight standard marker, molecular weight markers used were phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), and lysozyme (14,400).

Table 2-2. Comparison of molecular weights of the pre- and the processed forms of CelA, CelB, CelC, Cel5Z, and Cel8Y of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium chrysanthemi*

	Molecular mass of protein form (Da)/number of amino acids ^a				Family member	Accession number
	Precursor M.W. ^b	Signal peptide M.W. ^c	Calculated M.W. ^d	Apparent M.W. ^e		
CelA	42,003/387	3,495/31	38,525/336	39,000/500/-	5	AF025768
CelB	29,890/264	3,921/36	25,988/228	26,000/500/-	12	AF025769
CelC	48,210/430	2,652/23	45,576/407	46,000/500/-	8	AY188753
Cel5Z	46,473/426	4,450/41	42,041/385	42,000/500/-	5	AF208495
Cel8Y	37,627/332	2,755/23	34,872/309	35,000/500/-	8	AF282321

^aMolecular weight was calculated with the PC/GENE program.

^bProtein of the primary gene product before signal modification.

^cHydrophobicity analysis of the signal peptide was determined with the PC/GENE program.

^dProtein after post-translation modification of the primary gene product.

^eActual protein electrophoresed by using CMC-SDS-PAGE.

4. 결론 (실험 I)

식물 병원균 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) LY34는 3종 류의 cellulase를 분비하였다. *celC* gene (AY188753)의 유전자 구조는 open reading

frame (ORF)로 1,116 bp로 371 amino acid를 암호화하며 pre-CelC의 NH₂-terminal region에서 22 amino acid의 signal peptide를 가지고 있었다. CelC의 predicted amino acid sequence는 *Pectobacterium chrysanthemi* Cel8Y (AF282321)와 가장 유사하였다. CelC는 그 conserved region의 상동성 분석 결과 glycoside hydrolase family 8에 속하였다. 그 분자량은 CMC-SDS-PAGE 방법에 의거하여 약 39 kDa인 것으로 확인 되었으며 *Pcc* LY34의 일부 cellulase-minus mutant는 감자 무름병 병원성 검정 결과 wild type과 같은 병원성을 가지는 것을 볼 때 *Pcc* LY34 CelC는 무름병 발생에 minor factor로 추정된다.

<실험 II> 무름병균에서 3종류 β -glucosidase operon 분리

<실험 II-1> 무름병균의 *bgl*TPB operon 분리

<실험 II-2> 무름병균의 *asc*GFB operon 분리

<실험 II-3> 무름병균의 *bgl*EFIA operon 분리

1. 서론 (실험 II)

섬유소의 효소적 분해는 일련의 상이한 가수분해를 필요로 한다. 식물 세포벽 분해에 관련하여 endoglucanase와 β -glucosidase가 공동으로 작용하는 일련의 가수분해 효소 작용이다. 분해의 첫 단계에서 polysaccharide chain은 extracellular endoglucanases와 exoglucanase의 공역 작용에 의해 분해되며 마지막 단계에서 β -glucosidase가 섬유소를 cellobiose, cellodextrin을 거쳐 최종적으로 glucose로 분해한다. cellulose의 이러한 동시 분해는 end product inhibition에 의해 cellulase가 저해되는 것을 막아준다. 또한 세균에서는 arbutin, salicin과 같은 aromatic glycoside도 분해할 수 있다.

Polymeric carbon source의 이용에 있어 oligomer는 specific uptake system에 의하여 세포내로 이동된다. 세균은 일반적으로 phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS)를 이용하여 탄소 이용을 조절한다. PTS system은 substrate translocation을 위해 기질의 transport과 phosphorylation 반응을 한다. 또한 PTS는 다른 대사의 조절 기능도 한다. PTS는 cytoplasmic proteins, enzyme I (EI), histidine containing protein (HPr), substrate-specific enzyme II (EII) 등의 인자를 구성한다. PTS permeases (EII complex)는 1-4 종류의 구별되는 polypeptide chains과 protein domain에 융합된 subunit로 구성되어 있다. 일반적으로 탄수화물은 세포막에서 안으로 이동될 때 PTS transfer protein에 의해 phosphoenolpyruvate로부터 phosphoryl group을 얻은 후에 이동된다.

본 실험에서 사용한 *Pcc* strain LY34는 3종류의 상이한 cellulase인 CelA, CelB, CelC를 생성하며 이들과 연관되어 상이한 종류의 β -glucosidase가 작용할 것이다. 무름병균에는 상당한 종류의 β -glucosidase가 존재할 것으로 추정되며 우선 3종류의 β

-glucosidase operon을 *bgl*TPB, *asc*GFB, *bgl*EFIA operon을 분리하고 그 구조적 특성을 조사하여 앞으로 무름병 방제를 위한 기초 자료를 삼고자 한다.

2. 재료 및 방법 (실험 II)

2-1. 사용배지 및 생육조건

무름병균 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34는 LB 배지에서 28°C 생육시켰으며 recombinant *E. coli* cell은 LB broth에서 37°C 배양시켰다.

2-2. Cosmid library 제작

2-2-1. Cosmid library의 검색에 필요한 clone 수 결정

아래 식에 의거하여 cosmid library로부터 검색해야할 clone 수를 계산하였다.

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

P : probability (expressed as a fraction)

f : the proportion of the genome contained in a single clone

N : the required number of cosmid clones

Erwinia sp. *atroseptica* (genome = 4.7 Mb) 및 40 kb insert로 계산하여 99% 확률로 검색해야할 clones 수를 계산하면 약 863 clone이었다.

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1-[4 \times 10^4 \text{ bases} / 5.064 \times 10^6 \text{ bases}]) = -4.61 / -0.0053 = 863 \text{ clones}$$

2-2-2. Cosmid library 구축

pCC1FOSTM 벡터를 이용하여 *Pcc* LY34 genomic DNA로부터 cosmid library를 다음과 같이 제작하였다. 먼저 genomic DNA를 주사기로 shearing한 다음 DNA (100

μg) 농도로 하여 12 ml tube (12.5-45% sucrose gradient in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 10 mM EDTA / 50 mM NaCl 조건)에 loading한 다음 원심분리조건 (22 hrs at 22°C in 25k rpm using SWi-41 rotor (Beckman))에서 분리하였다. 크기별로 분획한 다음 agarose gel에서 그 크기를 확인하였다 (Fig. 2-6). 각 fraction에서 약 40 kb의 크기의 DNA 단편을 함유한 것을 insert용 DNA로 사용하였다. pCC1FOSTM 벡터와 insert DNA와 ligation 반응 후 lambda phage용 *in vitro* packaging에서 packaging한 후 *E. coli* EPI300TM host strain에 감염시켰다. Plate 상의 white colony를 선발하여 384-well microtiter plate에 picking하여 보존하였다. Cosmid library에서 860 clone을 선발하고 *Bam*HI-digested fragment를 조사한 결과는 Fig. 2-7이다. 결과에서 보는 것과 같이 약 38 kb 크기의 insert DNA를 관찰할 수 있었다.

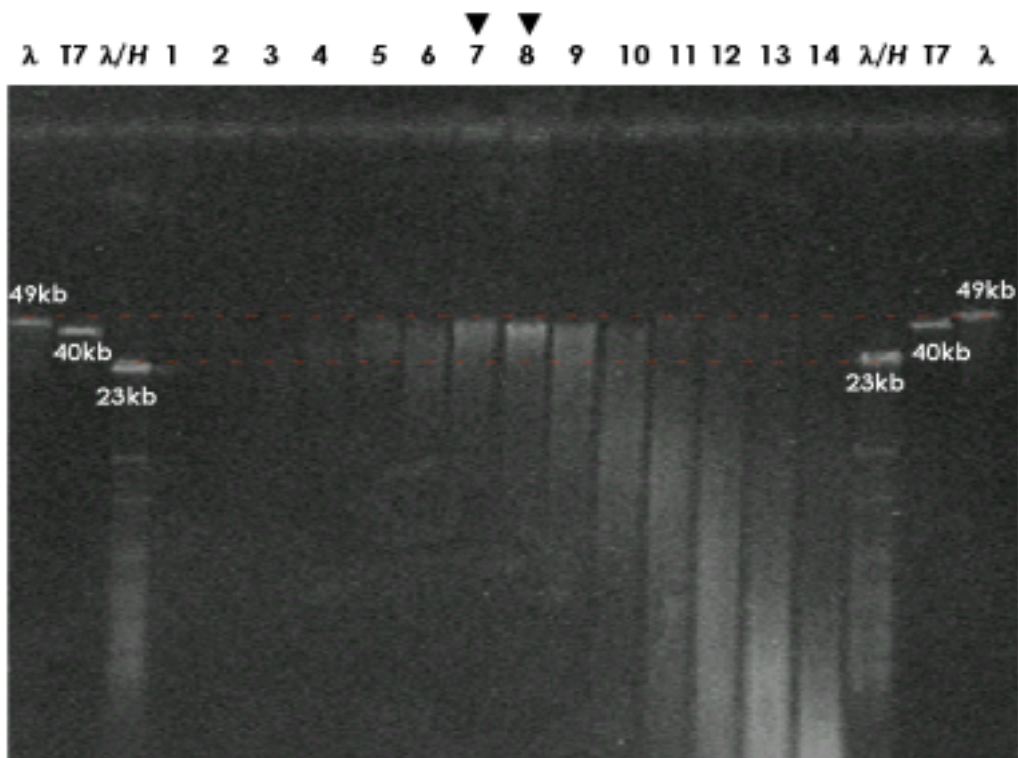


Fig. 2-6. Agarose gel electrophoresis size fractionation of sucrose gradient DNA using 0.7% agarose gel. The gel was electrophoresed for 13 h in 0.5× TBE buffer at 40V.

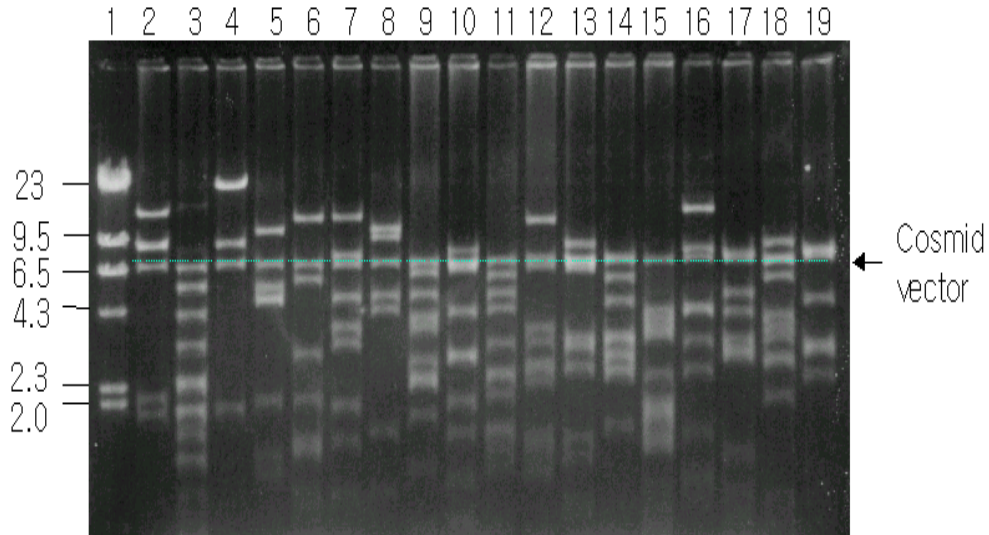


Fig. 2-7. Agarose gel electrophoresis of randomly selected cosmid clones digested with *Bam*HI restriction enzyme. The gel was electrophoresed for 13 h in 0.5 × TBE buffer at 40V. Lane 1, λ DNA digested with *Hind*III (Promega).

2-3. β -glucoside 이용 시스템의 탐색

2-3-1. Cosmid library에서 PCR에 의한 β -glucoside 이용 시스템의 탐색

384 well deep plate의 매 수직 well에 있는 clone들을 conical tube에 모아 배양 후 cosmid DNA를 분리하였다. 마찬가지로 수평 well에 있는 clone들도 분리하였다. 모든 수직, 수평 well 집합체의 DNA를 template로 하여 PCR 증폭하였다. 이 때 사용한 primer는 family 1 β -glucosidase region에 해당하는 degenerate oligonucleotide primer 5'-GCM AAY CAG GTK GAA GGH GC-3' (sense)와 5'-TTB GCV CCY AVN CCG TTY TC-3' (antisense)을 제작하여 사용하였다. 이 primer들은 database에서 β -glucosidase의 high conservation regions I and II에 기초를 하였다. 증폭 조건 (50 ng of *Pcc* LY34 genomic DNA, Super-Therm DNA polymerase (JMR, Side Cup, Kent, UK), 1.5 mM MgCl₂, and 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 2 min 30 sec)에서 행하였으며 약 1 kb의 DNA fragment를 분리하여 염기서열을 분석하고 BLAST search를

통하여 부분적인 family 1 β -glucosidase 유전자를 확인하였다.

2-3-2. 유전자 선별 및 subcloning

Cosmid library를 M9 minimal media에 1 mM 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG)를 함유한 배지에서 양성 콜로니는 형광성을 가진다. Cosmid clone 선별 후 subcloning 방법으로 cosmid DNA를 *Sau3AI* partial digestion으로 2-5 kb DNA fragment로 절단하고 SK+를 *Bam*HI 및 CIP로 처리하고 cloning하였다. 이 subclone 집단을 1 mM 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG)를 함유한 M9 minimal media에서 형광성을 가지는 콜로니를 선별하였다.

2-4. DNA 염기서열 및 상동성 분석

Subcloning된 plasmid DNA를 dideoxy-chain termination method 방법에 의해 염기서열을 분석하고 BLAST network을 통하여 분석하였다.

2-5. 효소의 생화학적 특성

β -glucosidase activity는 *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NPG), 4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside (arbutin), 2-(hydroxymethyl) phenyl β -D-glucopyranoside (salicin), 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG)를 기질로 하여 활성을 측정하였다. β -glucosidase activity는 기질로 *p*NPG를 사용하였으며 1 unit는 1분에 1 mole의 *p*-nitrophenol이 β -glucosidase에 의해 생성되는 양으로 하였다. 모든 분석조건은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 40°C에서 행하였다. 기질로 salicin을 사용시 β -glucosidase genes을 함유한 *E. coli* cell 적당량을 0.8 ml의 30 mM salicin (in 50 mM phosphate buffer)에 넣고 30분간 반응 시킨 다음 0.5 ml의 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 중단시킨 다음 salicin에서 saligenin으로 변화되는 양을 측정하였다. 기질로 arbutin을 사용할 때는 0.1 ml의 10 mM Mg²⁺와 0.1 ml의 30 mM arbutin을 첨가하여 반응시키며 0.5 ml의 1 M Na₂CO₃를 처리하여 반응을 중단시킨 다음 분석한다.

효소반응의 최적온도 및 최적 pH는 β -glucosidase를 정제한 다음 사용하며 pH 범

위는 pH 4.0-9.0에서 온도의 범위는 20-50°C에서 측정하였으며 효소의 thermostability도 측정하였다. 각종 금속 이온에 대한 영향은 각종 농도에서 측정하였으며 Km, Vmax도 측정하였다.

2-6. 유전자의 고발현 및 정제

분리 유전자의 고발현을 위해 해당되는 specific primer를 제작하고 C-terminal (His)₆ tag을 가지는 expression vector pET-21a(+) (Novagen)에 클로닝한 후 발현시켰다. 발현은 0.5 mM의 IPTG를 첨가하여 유도하였으며 6시간 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리하고 세포를 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 2회 세척하였다. 세척한 세포를 4°C에서 sonication한 후 수용액 상태의 recombinant β -glucosidase (β -glucosidases-His)를 HisTrap kit (Amersham)에 loading하고 100 mM imidazole로 용출하였다. 다시 active fraction을 ion exchange chromatography (Q-Sepharose column/Pharmacia)에 통과시켰으며 투석 후 다시 20 mM MOPS buffer (pH 6.5)로 pre-equilibrated한 Mono Q HR (Pharmacia) column에 통과시켜 정제하였다. 분리된 효소를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 분석한 결과 β -glucosidase activity를 가진 fraction은 single protein로 나타났다. 이때 사용한 표준단백질은 β -galactosidase (116,000), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), lactate dehydrogenase (35,000), restriction endonuclease Bsp 981 (25,000), β -lactoglobulin (18,400), lysozyme (14,400)를 사용하였다.

2-7. 유전자 산물의 확인

SDS-PAGE는 Bio-Rad Mini-PROTEIN 3-Cell electrophoresis unit (Bio-Rad, California, U.S.A)을 사용하였다 (0.75 mm gel in a vertical slab unit). Separating gel 농도는 10% acrylamide와 0.5% bisacrylamide를 사용하였으며 sonicated sample 은 sample buffer solution (1:1 (v/v))로 하였으며 100V에서 전개하였다. *bgIB* gene product는 MUG-SDS-PAGE에 의하여 확인하였는데 acrylamide gel에 1 mM MUG and 15 mM Mg²⁺ 농도로 첨가하여 40°C에서 15-60 분간 buffer와 조심스럽게 흔들면서 반응시키고 활성이 있는 fluorescent band를 transilluminator (312 nm)에서 확인하였다.

<실험 II> 무름병균에서 3종류 β -glucosidase operon 분리

<실험 II-1> 무름병균의 *bgl*TPB operon 분리

3. 결과 및 고찰 (실험 II-1)

3-1. *bgl* operon 클로닝 및 염기서열 분석

Pcc LY34 genomic DNA의 cosmid library로부터 1 mM MUG를 함유한 M9 배지에서 β -glucosidase activity를 보이는 clone을 선발하였다. Subcloning하여 5.6 kb insert를 가지는 clone을 pAY100라 명명하였다. 이 pAY100을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 5,557 bp (accession number AY542524)였으며 3개의 ORF를 포함하고 있는 operon 구조였다. 이들 각각을 클로닝하기 위한 primer로 5'-CGA TTC TTG TAA CGG CTG GCA-3' (sense), 5'-ATG ATG TGG CGA AAG AAC GG-3' (antisense), and 5'-GAA GAG GGA GCC GAG GTG CTG ATT C-3'(sense), 5'-ATA ATT CGA GTT ACA GGA AGG CGG C-3' (antisense), and 5'-CGA TTG CCT GGA CGC GTA TTT TC-3' (sense), 5'-GGT AGT TCT GAT TAA TCG ATG GAG G-3' (antisense)를 사용하였으며 PCR 증폭 결과 각각 1.3 kb, 2.8 kb, 1.8 kb fragment가 증폭되었고 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 이들을 각각 *bgl*T, *bgl*P, *bgl*B로 명명하였다. 이들 모두 동일한 translational reading frame을 가지고 있었다 (Fig. 2-8).

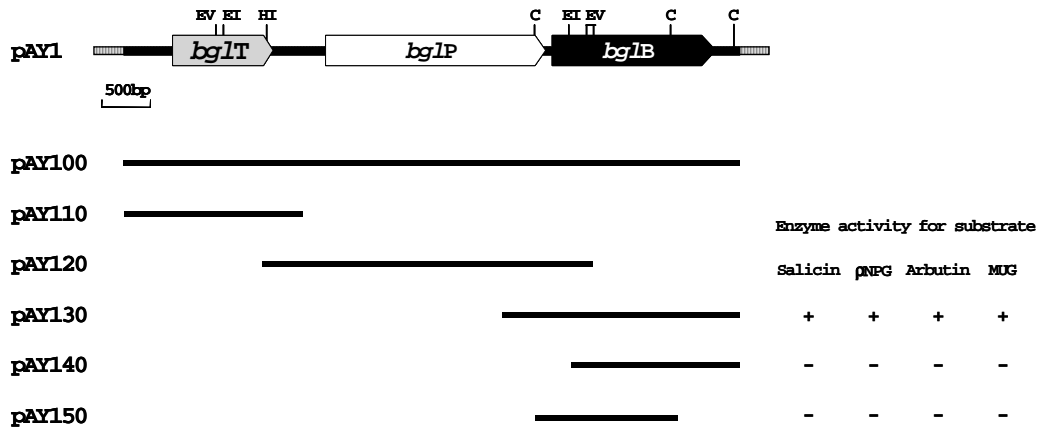


Fig. 2-8. Physical map of recombinant DNA pAY100 carrying *bglT*, *bglP*, and *bglB* genes of the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. The start of ORFs are showed by arrows. The cleavage sites of restriction enzymes EI (*EcoRI*), C (*ClaI*), EV (*EcoRV*), and H (*HpaI*) are shown. pAY100 was constructed by cloning a 5.6 kb fragment of cosmid DNA (pAY1) into the pBluescript SK+ vector. pAY110, pAY120, and pAY130 were derived by cloning the PCR products into the pGEM-T easy vector. β -glucosidase activity (BglB/pAY130) was determined using *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG), 4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside (arbutin), 2-(hydroxymethyl) phenyl β -D-glucopyranoside (salicin), and 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG).

sequences for each ORF are placed below the nucleotide of corresponding codon. Putative Shine-Dalgarno sequences for ribosomal binding (RBS) are underlined and labeled. Proteins are labeled at their respective start codons. The ribonucleic antiterminator (RAT)-like sequences upstream of *bglT* and *bglP* are indicated. The signature sequence for PTS regulation domains (PRD1 and PRD2) of BglT and for EIIA, EIIB of BglP are underlined and labeled. The family 1 hydrolase signature sequences are also underlined and labeled.

3-2. *bgl* operon의 구조분석 및 상동성 비교

National Center for Biotechnology Information BLAST e-mail server를 이용하여 Bgl protein에 유사성이 있는 단백질을 조사하였다. *Pcc* LY34 *bgl* operon은 *P. chrysanthemi arb* operon, *E. coli bgl* operon, *B. subtilis bgl* operon과 유사성이 높았으며 이들 모두 β -glucoside 이용과 이동에 관련되었다 (Table 2-3).

첫번째 ORF (*bglT*)는 852 bp로 구성되어 283 amino acid를 암호화하며 (Fig. 2-9) 뚜렷한 ORF 앞에 ribosome-binding site가 없었다. 이 ORF 54 bp 전방에 putative ribonucleic antiterminator (RAT) sequence가 존재하였다. 이것은 terminator 역할을 할 것으로 추정되며 BglG/LicT family의 antiterminator에 의해 조절되는 인자인 것으로 추정된다. 상동성 분석에 의해 다른 2 region은 PTS regulatory domain (PRD1 및 PRD2)을 나타내고 있다.

두번째 ORF (*bglP*)는 1,902 bp로 구성되어 633 amino acid를 암호화하며 (Fig. 2-9) 이 ORF의 start codon은 *bglT* 끝으로부터 후방 *bglT*에서 시작되며 start codon 전방 8 bp에 putative ribosome-binding site, ATTAAG가 있었다. 이 단백질은 *P. chrysanthemi*, *E. coli*, and *B. subtilis*의 ArbF, BglF, BglP와 높은 상동성을 가지고 있었다 (Table 2-3 & 2-4). BglP protein는 2곳 (residues 26 and 555)의 potential phosphorylation site를 가지고 있으며 둘다 phosphorylation에 관여하는 cysteine와 histidine residue를 가지고 있었다. C-terminus (His555) 근방 putative phosphorylation site는 ArbF, BglF와 매우 유사하였는데 histidine residue 후방 양전하의 6 amino acid residue 존재도 확인되었다 (Table 2-4). 상동성 분석법에 의거하여 *bglT* 후방 155 bp에 putative RAT sequence 존재도 확인되었다.

세번째 ORF (*bglB*)는 *bglP* 후방 35 bp에서 시작하여 1,407 bp로 구성되어 468 amino acid를 암호화하며 (Fig. 2-9) Start codon 전방 8 bp에 putative ribosome-binding site, TGGGAG가 있었다. BglB protein는 다양한 β -glucosidase와

높은 상동성을 가지며 glycosides hydrolase family 1에 속하였다 (Table 2-3). *P. chrysanthemi* ArbB와 *E. coli* BglB protein과 약 70의 identity를 가지는 것으로 나타났다.

3-3. BglB 정제와 생화학적 특성

BglB의 고발현을 위해 5'-GGA TCC ATG AGC CAT CAG TTT CCG A-3' (sense, containing a *Bam*HI site as underlined) and 5'-AAG CTT GCT CTT TCG CAG ATG TCA A-3' (antisense, containing a *Hind*III site as underlined, C-terminal (His)₆tag)의 primer를 이용하여 expression vector pET-21a(+)에 클로닝하였다. 재료 및 방법에 의거하여 column filtration, SDS-PAGE하여 하나의 single band를 확인하였으며 pNPG를 기질로 한 이 효소의 최적온도는 40°C 부근이었으며 최적 pH는 7 근방이었다 (Fig. 2-11B). 효소의 thermostability data는 여러 온도에서 preincubating하여 측정하였다. 효소의 금속양이온에 대한 영향으로 Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺는 효소활성을 저해하였으나 Mg²⁺와 Ca²⁺는 효소활성을 증가시켰다 (Table 2-5). 15 mM Mg²⁺의 첨가가 pNPG에 대한 최대활성을 보여 주었다 (Fig. 2-11D). 정제효소는 salicin와 arbutin substrate도 분해하였다.

3-4. bglB 유전자 산물 확인

β-glucosidase 활성을 신속하게 확인하기 위해 MUG-SDS-PAGE 방법을 사용하였다. crude cell extraction을 polyacrylamide slab gel에 loading하여 전기영동한 후 4-methylumbelliferyl β-D-glucoside (MUG)에 incubation하여 transilluminator (312 nm) 하에서 나타나는 fluorescent band를 확인하였다 (Fig. 2-10A). Predicted *bglB* gene product는 468 amino acid를 구성하고 있어 estimated molecular mass는 53,494 Da으로 계산된다. 본 실험결과는 약 53,000 Da 정도로 나타나 이론적인 사실과 잘 부합되었다 (Fig. 2-10B).

3-5. β-glucosidase 활성의 필수 아미노산 확인

In vitro site-directed mutagenesis 방법을 통하여 β-glucosidase 활성의 essential

residue를 확인하였다. 현재까지 *Agrobacterium* β -glucosidase의 구조결정이 되어 있다. 이 효소의 Glu358 residue가 nucleophile로 작용하여 glycosidic bond cleavage에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 이러한 사실을 바탕으로 BglB의 two conserved Glu residue를 alanine으로 대체하는 실험을 수행하였다. Site-directed mutagenesis를 위한 primer로 E173A를 위해 5'-GGC TGA CGT TCA ACG CAA TTA ACT GCG CAT T-3' (sense)와 5'-AAT GCG CAG TTA ATT GCG TTG AAC GTC AGC C-3' (antisense), E362A를 위해 5'-GCT GTT CAT TGT GGC AAA CGG TTT GGG TG-3' (sense)와 5'-CAC CCA AAC CGT TTG CCA CAA TGA ACA GC-3' (antisense)를 사용하여 클로닝하였다. 즉, E173A 및 E362A (E, glutamic acid; A, alanine. E173A and E362A; two glutamic acid of the 173rd, and 362nd position of BglB amino acid sequence were changed to alanine)를 실험하였다. 그 결과 이러한 mutant들은 pNPG를 기질로 했을 때 그 효소활성이 소실되어 glutamic acid가 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다 (Table 2-4 & 2-6).

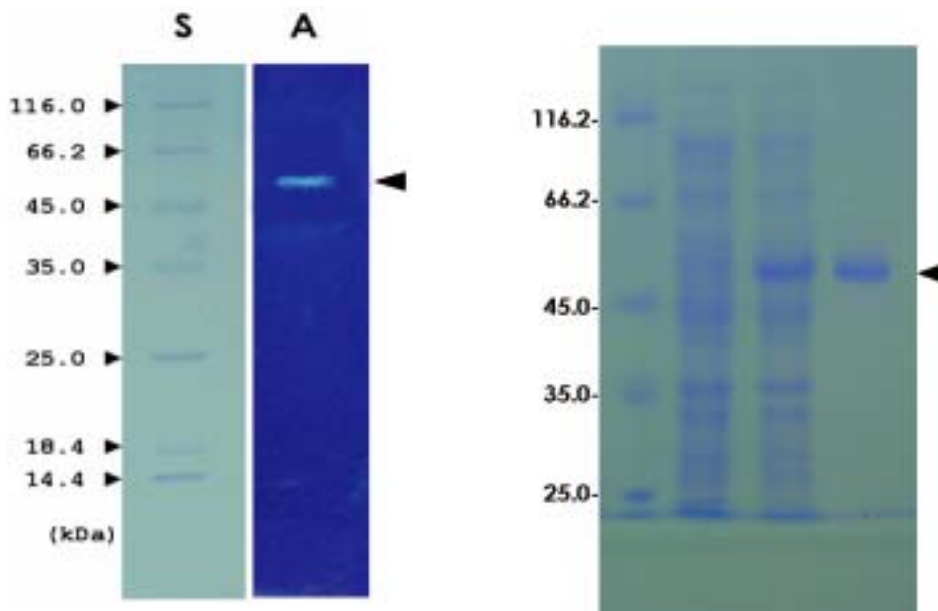


Fig. 2-10. (A) Detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. β -glucosidase in *E. coli* by SDS-PAGE. *E. coli* DH5 α harboring pAY130 was

grown in LB medium. The sonicated extract of the culture was loaded on a SDS-polyacrylamide gel at room temperature. After electrophoresis and protein reaction, β -glucosidase activity was detected by using 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUG) as substrate. (B) Electrophoretic analysis of the expressed β -glucosidase enzyme at various stages of purification. Separation was performed on a 12.5% (W/V) SDS-polyacrylamide gel. Lanes: 1; Marker, 2; crude extract from BL21 (DE3) containing pAY130, 3; crude extract from IPTG-induced BL21 (DE3) containing pAY130, 4; purified β -glucosidase from HisTrap chromatography. The gel was stained with 0.025% Coomassie blue R-250. Molecular weight markers used were phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), and lysozyme (14,400).

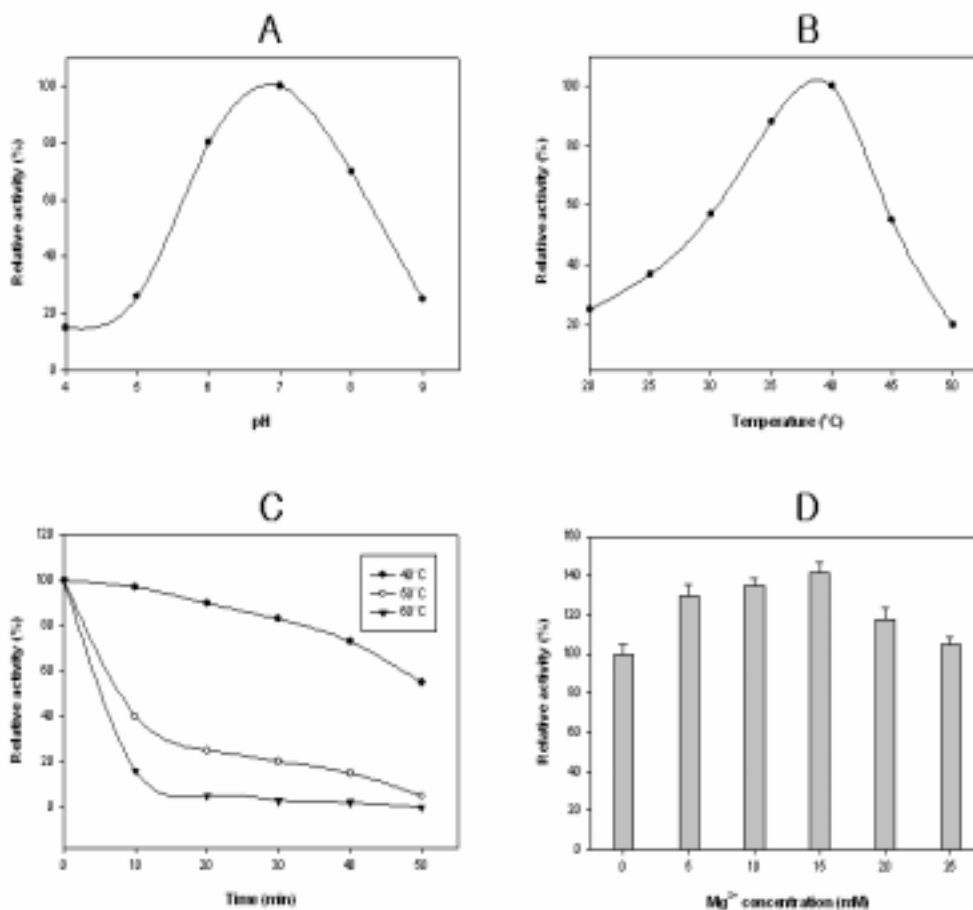


Fig. 2-11. (A) Effect of pH on the relative activity of BglB. Enzyme activity was assayed at 37°C for 30 min in sodium phosphate buffers of indicated pH. (B) Effect of temperature on the relative activity of BglB. Enzyme activity was assayed at pH 7 for 30 min at the indicated temperature. (C) Effect of time and temperature on the relative activity of BglB. Enzyme activity was assayed at 37°C, pH 7 for 60 min at the indicated reaction time. (D) Effect of metal ions and chemical reagents on the relative activity of BglB. Enzyme activity was assayed at 37°C.

Table 2-3. Pairwise similarity (%) between *bgl* operon protein consisted of antiterminator, PTS, and β -glucosidase

Sequence ^a	Antiterminator (BglT)				PTS (BglP)				β -glucosidase (BglB)					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
BglT	100	76.4	52.7	52.4	BglP	100	76.1	52.0	42.0	BglB	100	80.8	71.3	65.8
P26211		100	54.6	53.8	P26207		100	55.7	39.3	P26207		100	73.0	65.6
P11989			100	42.3	P08722			100	38.2	P11988			100	64.9
BAA11696				100	BAA06652				100	BAA06653				100

^aCalculated with CLUSTAL W and the PAM250 residue weight table.

The sequences are from the following sources, BglT, BglP, and BglB from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 (1); P26211, P26207, and P26206 from *Pectobacterium chrysanthemi* (2); P11989, P08722, and P11988 from *Escherichia coli* K12 (3); BAA11696, BAA06652, and BAA06653 from *Bacillus subtilis* 168 (4).

Table 2-4. Regions conserved among *bgl* operon

	Antiterminator (BglT)		PTS (BglP)		β -glucosidase (BglB)	
	PRD1	PRD2	EIIB	EIIA	Acid/base	Nucleophile
A	I <u>S</u> L <u>T</u> O <u>H</u> C <u>H</u> E <u>F</u> A	R <u>F</u> Y <u>T</u> H <u>L</u> A <u>F</u> F <u>A</u>	N <u>V</u> T <u>S</u> <u>M</u> H <u>C</u> A <u>T</u> R <u>L</u> E <u>F</u> N <u>L</u> K <u>D</u>	G <u>A</u> E <u>V</u> L <u>I</u> H <u>G</u> I <u>D</u> T <u>V</u>	F <u>L</u> N <u>G</u> G <u>A</u> T <u>A</u> A <u>N</u> D <u>N</u> E <u>G</u> A	L <u>F</u> I <u>V</u> E <u>N</u> G <u>L</u> G
B	I <u>S</u> L <u>T</u> O <u>H</u> C <u>H</u> E <u>F</u> A	R <u>F</u> Y <u>T</u> H <u>L</u> A <u>F</u> F <u>A</u>	N <u>T</u> I <u>S</u> <u>V</u> H <u>C</u> A <u>T</u> R <u>L</u> E <u>F</u> N <u>L</u> R <u>D</u>	G <u>A</u> E <u>V</u> L <u>I</u> H <u>G</u> I <u>D</u> T <u>V</u>	F <u>L</u> N <u>G</u> G <u>A</u> T <u>A</u> A <u>N</u> D <u>N</u> E <u>G</u> A	L <u>F</u> I <u>V</u> E <u>N</u> G <u>L</u> G
C	I <u>S</u> L <u>T</u> O <u>H</u> C <u>H</u> E <u>F</u> A	R <u>L</u> V <u>T</u> H <u>L</u> K <u>F</u> L <u>S</u>	N <u>V</u> T <u>S</u> <u>M</u> H <u>C</u> A <u>T</u> R <u>L</u> E <u>F</u> N <u>L</u> K <u>D</u>	G <u>V</u> E <u>I</u> L <u>I</u> H <u>G</u> I <u>D</u> T <u>V</u>	F <u>L</u> N <u>G</u> G <u>A</u> T <u>A</u> A <u>N</u> D <u>N</u> E <u>G</u> A	L <u>F</u> I <u>V</u> E <u>N</u> G <u>L</u> G
D	V <u>S</u> L <u>T</u> O <u>H</u> I <u>N</u> F <u>A</u>	R <u>F</u> Y <u>T</u> H <u>L</u> A <u>F</u> F <u>A</u>	N <u>Q</u> R <u>V</u> <u>I</u> H <u>C</u> A <u>T</u> R <u>L</u> E <u>F</u> N <u>L</u> H <u>D</u>	G <u>A</u> E <u>I</u> L <u>I</u> H <u>I</u> G <u>L</u> D <u>T</u> V	F <u>L</u> N <u>G</u> G <u>A</u> A <u>A</u> A <u>N</u> D <u>N</u> E <u>G</u> A	L <u>F</u> I <u>V</u> E <u>N</u> G <u>L</u> G
	*****	** * *****	*, ..** ***** *	** ,***, *, ***	***** *****	*****

A, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 B, *Pectobacterium chrysanthemi* C, *Escherichia coli* K12; D, *Bacillus subtilis* 168; PRD1, N-terminal PTS regulation domain of BglT; PRD2, C-terminal PTS regulation domain of BglT; PTS, phosphotransferase system of BglP; EIIB, N-terminal region of BglP; EIIA, C-terminal region of BglP. The underlined amino acids "histidine" are conserved residues in BglT. The underlined amino acids "cysteine" and "histidine"

in RIIB and EIIA of BglP, respectively. The glutamate (acid/base) and glutamate (nucleophile) in BglB, which are shown in bold characters. Those highlighted with an asterisk are conserved among all the proteins among all type of *bgl* operon listed here. The accession numbers can be found in the legend of Table 1.

Table 2-5. Effect of metal ions on BglB

Ion (2 mM)	Relative activity ^a
Mg ²⁺	121
Ca ²⁺	105
Cu ²⁺	5
Co ²⁺	15
Mn ²⁺	72
Hg ²⁺	0
Zn ²⁺	5

^aThe β -glucosidase (4 mU) was exposed for 30 min at room temperature to 2 mM concentrations of metal ions and then measured under standard conditions and expressed relative to the activity measured on 5 mM *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (100) without added ion.

Table 2-6. Specific activity and kinetic parameters for hydrolysis of β -glucosidase by BglB, E362A, and E21A mutant

	Kinetic parameter		Specific activity ^a
	<i>Km</i> (mM)	<i>Vmax</i> (mol min ⁻¹)	
BglB	0.25	35	553
E21A	-	-	-
E362A	-	-	-

^aMicromoles of *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NPG) hydrolyzed min⁻¹ mg protein⁻¹.

E, glutamic acid; A, alanine. E21A and E362A; two glutamic acid of the 21st, and 362nd position of BglB amino acid sequence was changed to alanine.

<실험 II> 무름병균에서 3종류 β -glucosidase operon 분리

<실험 II-2> 무름병균의 *ascGFB* operon 분리

3. 결과 및 고찰 (실험 II-2)

3-1. *asc* operon 클로닝 및 염기서열분석

Pcc LY34 genomic DNA의 cosmid library로부터 1 mM MUG를 함유한 M9 배지에서 β -glucosidase activity 보이는 또 다른 clone을 선발하였다. Subcloning하여 5.6 kb insert를 가지는 clone을 pAY200라 명명하였다. pAY200의 insert DNA는 single *EcoRI* restriction site, 다른 restriction sites (*HpaI*, *EcoRV*, *ClaI*, *SacII*)를 가지고 있었다 (Fig. 2-12). 이 pAY200을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 5,618 bp (accession number AY622309)였으며 3개의 ORF를 가진 operon 구조였다. 이들 각각을 클로닝하기 위한 primer로 *ascG*, *ascF*, *ascB* 각각에 대해 5'-TCT GCA ACC TTA TGC TAC GGT GG-3' (sense), 5'-CAA CAC ACC GCT TAT CGC CTT CAG-3' (antisense)와 5'-GGA CAT CCT GAC ACG TTG AAC ACC-3' (sense), 5'-CAG TTT CAC CGG CAG CAC GAT TCA CAC-3' (antisense), 및 5'-TGT TTA CCA GCG TGC AAT TCT TCG-3' (sense), 5'-GAA GGC AAT ATC GGG AAG CAA CTG-3' (antisense)를 사용하였으며 PCR 증폭 결과 각각 2.1 kb, 2.2 kb, 1.9 kb가 증폭되었고 이들을 각각 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 *ascG*, *ascF*, *ascB*로 명명하였다. (Fig. 2-12).

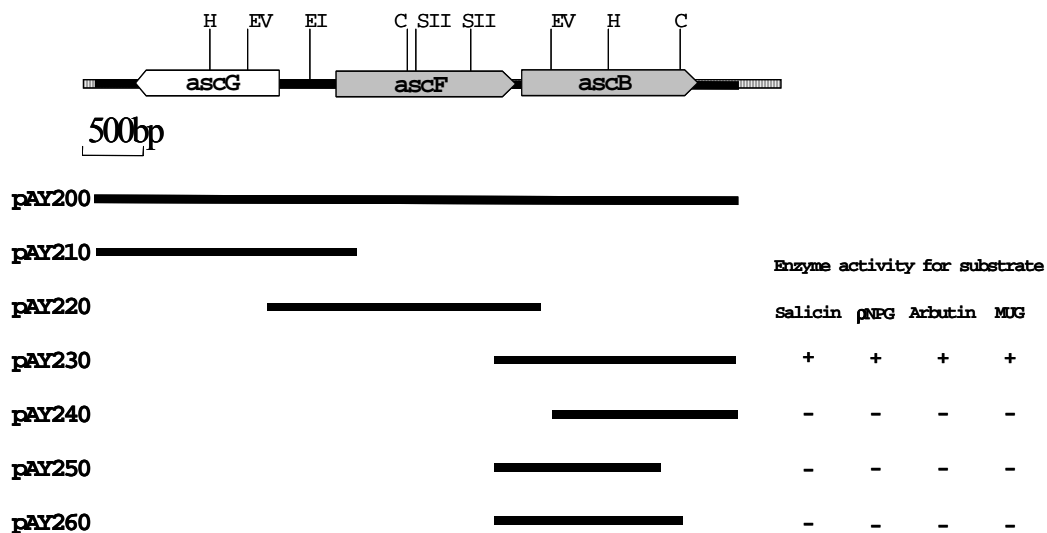


Fig. 2-12. Physical map of recombinant DNA pAY200 carrying *ascG*, *ascF*, and *ascB* genes of the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. The ORFs are shown by arrows. The cleavage sites of restriction enzymes H (*HpaI*), EV (*EcoRV*), EI (*EcoRI*), C (*ClaI*), and SII (*SacII*) are shown. pAY200 was constructed by cloning a 5.6 kb fragment of cosmid DNA (pAY2) into the pBluescript SK+ vector. pAY210, pAY220, and pAY230 were derived by cloning the PCR products into the pGEM-T Easy vector. β -glucosidase activity (AscB/pAY230) was determined using *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG), 4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside (arbutin), 2-(hydroxymethyl) phenyl β -D-glucopyranoside (salicin), and 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG).

3-2. *asc* operon의 구조분석 및 상동성 비교

National Center for Biotechnology Information BLAST e-mail server를 이용하여 Asc protein에 유사성이 있는 단백질을 조사하였다. *Pcc* LY34 *asc* operon은 *E. coli asc* operon과 유사성이 높았으며 *Pcc* LY34 AscF 및 AscB protein은 PTS EII enzymes과 6-phospho- β -glucosidase과 각각 상동성이 있었다 (Table 2-7).

첫번째 ORF (*ascG*)는 1,128 bp로 구성되어 375 amino acid를 암호화하며 (Fig. 2-13) ORF start codon 전방 12 bp에 ribosome-binding site, CCTGAA가 있었다. 상동성 분석에 의하면 *Pcc* LY34 AscG protein은 *E. coli* AscG, *Shigella flexneri* AscG, *Salmonella typhimurium* STM3012의 repressor protein과 67.2%, 65.5%, 37.8%였다 (Table 2-7).

두번째 ORF (*ascF*)는 1,461 bp로 구성되어 486 amino acid를 암호화하며 이 ORF는 *ascG*의 start codon 전방 466 bp에서 시작되며 start codon 8 bp 전방에 putative ribosome-binding site, AGAGATT가 있었다 (Fig. 2-13). 상동성 분석법에 의하면 *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus agalactiae*의 EII PTS protein과 유사하였다 (Table 2-7 & 2-8). AscF 단백질의 N-terminal phosphorylation site로 cysteine의 존재가 확인되었다 (Table 2-8). 그리고 AscF는 similarity와 hydrophobicity pattern 분석으로 N terminus 내의 hydrophilic IIB domain에 둘러싸인 central membrane-spanning IIC domain를 가지는 것으로 보인다.

세번째 ORF (*ascB*)는 *ascF* 후방 30 bp에서 시작하여 1,431 bp로 구성되어 476 amino acid를 암호화하며 start codon 전방 8 bp에 putative ribosome-binding site, GAAGGAG가 있었다 (Fig. 2-13). AscB protein은 다양한 6-phospho- β -glucosidase와 높은 상동성을 가지며 glycosides hydrolase family 1에 속하였다 (Table 2-7). *E. coli* AscB와 *Clostridium acetobutylicum* CAC1408 proteins과 높은 상동성을 가지고 있었다.

3-3. AscB 정제와 생화학적 특성

AscB의 고발현을 위해 5'-GGA TCC ATG TCT GCA TCA ACA TTT C-3' (sense, containing a *Bam*HI site as underlined) 및 5'-AAG CTT GGC TCA GAT CGG CAC CGT T-3' (antisense, containing a *Hind*III site as underlined, C-terminal (His)₆tag)의 primer를 이용하여 expression vector pET-21a(+)에 클로닝 하였다. 재료 및 방법에 의거하여 column filtration, SDS-PAGE하여 하나의 single

band를 확인하였으며 (Fig. 2-14) *p*NPGlu6P를 기질로 한 이 효소의 최적온도는 40°C 부근이었으며 최적 pH는 7 근방이었다 (Fig. 2-15B). 효소의 thermostability data는 여러 온도에서 preincubating하여 측정하였다. 60°C에서 10분간 열처리하였을 때 효소 활성이 39%로 감소하였다 (Fig. 2-15C). 효소의 금속양이온에 대한 영향으로 Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺는 효소활성을 저해하였으나 Mg²⁺와 Ca²⁺는 효소활성을 증가시켰다 (Table 3-3). 5 mM Mg²⁺의 첨가가 *p*NPG에 대한 최대활성을 보여 주었다 (Fig. 2-15D). 정제효소는 *p*NPGlu6P, salicin, arbutin 기질도 분해하였다.

3-4. β-glucosidase 활성의 필수 아미노산 확인

In vitro site-directed mutagenesis 방법을 통하여 β-glucosidase 활성의 essential residue를 확인하였다. 현재까지 *Agrobacterium* β-glucosidase의 구조결정이 되어 있다. 이 효소의 Glu358 residue가 nucleophile로 작용하여 glycosidic bond cleavage에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 이러한 사실을 바탕으로 AscB의 two conserved Glu residue를 alanine으로 대체하는 실험을 수행하였다. Site-directed mutagenesis를 위한 primer로 E182A, 5'-GGC TAA CGT TCA ACG CAA TCA ATA TTT TGC-3' (sense)와 5'-GCA AAA TAT TGA TTG CGT TGA ACG TTA GCC-3' (antisense); E374A, 5'-CTG TTT CTG GTA GAG CAC GGG CTA GGT GCG-3' (sense)와 5'-CGC ACC TAG CCC GTG CTC TAC CAG AAA CAG-3' (antisense)를 사용하여 클로닝하였다. 즉, E182A 및 E374A (E, glutamic acid; A, alanine. E182A and E374A; two glutamic acid of the 182nd, and 374nd position of AscB amino acid sequence were changed to alanine)를 실험하였다. 그 결과 이러한 mutant들은 *p*NPG를 기질로 했을 때 효소활성이 소실되었는데 이 amino acid가 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다 (Table 2-8 & 2-10).

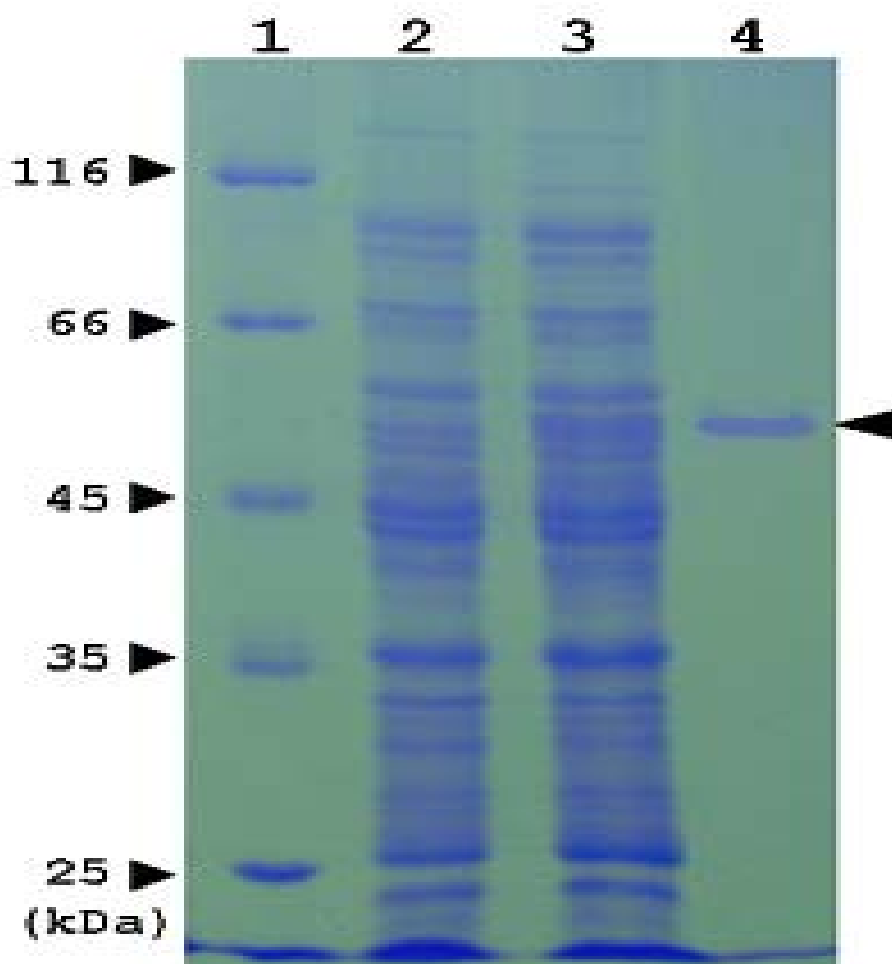


Fig. 2-14. Electrophoretic analysis of the purified β -glucosidase. Separation was performed on a 12.5% (W/V) SDS-polyacrylamide gel. Lane 1; marker, Lane 2; crude extract from BL21 (DE3) containing pET-21a(+)/AscB, Lane 3; crude extract from IPTG-induced BL21 (DE3) containing pET-21a(+)/AscB, Lane 4; purified β -glucosidase from HisTrap kit (Amersham). The gel was stained with 0.025% Coomassie blue R-250. Molecular weight markers used were β -galactosidase (116,000), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), lactate dehydrogenase (35,000), restriction endonuclease Bsp 981 (25,000), β -lactoglobulin (18,400), and lysozyme (14,400).

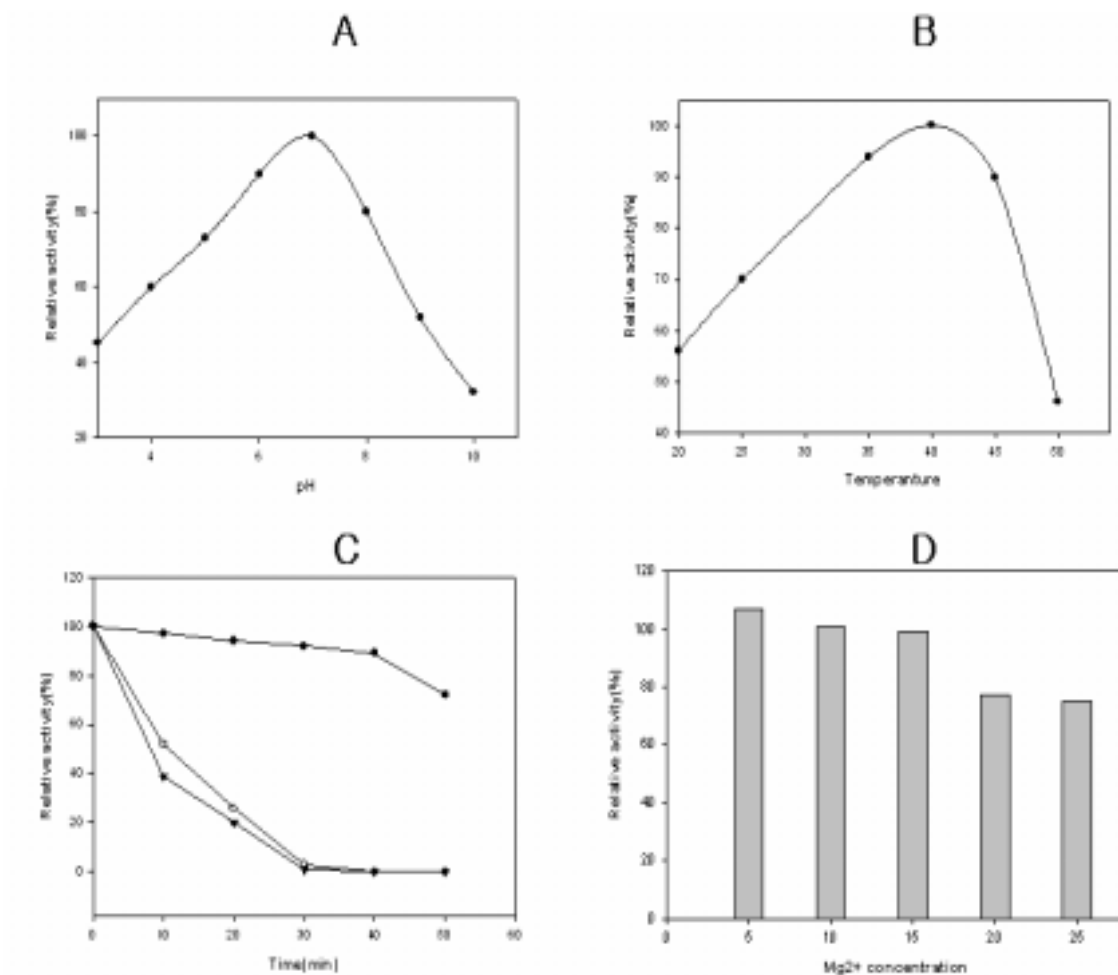


Fig. 2-15. (A) Effect of pH on the relative activity of AscB. Enzyme activity was assayed at 40°C for 30 min in sodium phosphate buffers of indicated pH. (B) Effect of temperature on the relative activity of AscB. Enzyme activity was assayed at pH 7 for 30 min at the indicated temperature. (C) Effect of time and temperature on the relative activity of AscB. Enzyme activity was assayed at 40°C (●), 50°C (○), and 60°C (▲), pH 7.0 for 60 min at the indicated reaction time. (D) Effect of concentration of Mg²⁺ on the relative activity of AscB. Enzyme activity was assayed at 40°C.

Table 2-7. Pairwise similarity (%) of AscG, AscF, and AscB

Sequence ^a	AscG					AscF					AscB			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
AscG	100.0	67.2	65.5	37.8	AscF	100.0	81.1	38.7	36.8	AscB	100.0	82.1	61.9	61.8
AAA69224		100.0	97.9	40.4	AAA69225		100.0	38.2	37.2	AA69226		100.1	62.1	60.3
AAN44228			100.0	40.1	AAM79011			100.0	81.6	AAK79376			100.0	67.3
AAL21888				100.0	AAM99677				100.0	AAM99984				100.0

^aCalculated with CLUSTAL W and the PAM250 residue weight table.

The sequences are from the following sources, AscG, AscF, and AscB from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 AAA69224, AAA69225, and AAA69226 from *E. coli* AAN44228 from *Shigella flexneri* 2a str. 301; AAL21888 from *Salmonella typhimurium* LT2; AAM99677 and AAM99984 from *Streptococcus agalactiae* 2603V/R; AAM79011 from *Streptococcus pyogenes* MGAS315; and AAK79376 from *Clostridium acetobutylicum*.

Table 2-8. Alignment of the regions surrounding the similar region of AscG, conserved regions of AscF, and putative acid/base of some typical representatives of glycosyl hydrolase family 1

AscG	AscG (Hydrolase)	AscF	AscF (PTS)	AscB	AscB (β-glucosidase)	
	Conserved region		E11B		Acid/Base	Nucleophile
AscG	MDEVAKKAGVSKATYSRVL	AscF	NIQAVTHCITLRFVLEK	AscB	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
AAA69224	MDEVAKKAGVSKATYSRVL	AAA69225	NIQAVTHCITLRFVLEK	AAA69226	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
AAN44228	MDEVAKKAGVSKATYSRVL	AAM79011	NIQAVTHCITLRFVLEK	AAK79376	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
AAL21888	MDEVAKKAGVSKATYSRVL	AAM99677	NIQAVTHCITLRFVLEK	CAC95250	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
AAF94711	INDVCKLAGVSKATYSRVL	CAB15963	NVQAVTHCITLRFVLEK	BAB04315	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
AAC22480	INDVAKLAGVSKATYSRVL	CAD65296	NINSLIHCITLRFVLEK	AAM99984	NLTFNEINMLH	MFLVENGGL
AAM25700	IKDVAKKAGVSKATYSRVL	CAD00985	NVNEVYHCITLRFVLEK	AAK05769	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
AAM86733	IKDVAKKAGVSKATYSRVL	AAK79375	NVNSLTHCITLRFVLEK	Q48409	NLTFNEINMLH	LFLVENGGL
	, . @, . @, @, . @@@@,		@, . @@ @@@,		@, @@@@, @@	, @, @@@@

The sequences are from the following sources, AscG, AscF, and AscB from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 AAA69224, AAA69225, and AAA69226 from *E. coli* AAN44228 from *Shigella flexneri* 2a str. 301; AAL21888 from *Salmonella typhimurium* LT2; AAF94711 from *Vibrio cholerae* O1 biovar *eltor* str. N16961; AAC22480 from *Haemophilus influenzae* Rd KW20; AAM25700 from *Thermoanaerobacter tengcongensis*; AAM86733 from *Yersinia pestis* KIM; AAM79011 from *Streptococcus pyogenes* MGAS315; AAM99677 and AAM99984

from *Streptococcus agalactiae* 2603V/R; CAB15963 from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168; CAD65296 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1; CAD00985 from *Listeria monocytogenes* AAK79375 from *Clostridium acetobutylicum* AAK79376 from *Clostridium acetobutylicum* AAK05769 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CAC95250 from *Listeria innocua* BAB04315 from *Bacillus halodurans* Q48409 from *Klebsiella oxytoca*.

Table 2-9. Effect of metal ions on AscB

Ion (5 mM)	Relative activity ^a
Mg ²⁺	107
Ca ²⁺	111
Cu ²⁺	92
Co ²⁺	88
Mn ²⁺	86
Hg ²⁺	0
Zn ²⁺	87

^aThe β -glucosidase (4 mU) was exposed for 30 min at room temperature to 5 mM concentrations of metal ions and then measured under standard conditions and expressed relative to the activity measured on 5 mM *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (100) without added ion.

Table 2-10. Specific activity and kinetic parameters for hydrolysis of β -glucoside by AscB, E374A, and E182A mutant

	Kinetic parameter		Specific activity (U/mg)
	<i>Km</i> (mM)	<i>Vmax</i> (mol min ⁻¹)	
AscB	0.21	37	565
E182A	ND	ND	ND
E374A	ND	ND	ND

ND, no detectable

<실험 II> 무름병균에서 3종류 β -glucosidase operon 분리

<실험 II-3> 무름병균의 *bglEFIA* operon 분리

3. 결과 및 고찰 (실험 II-3)

3-1. *bglA* operon 클로닝 및 염기서열분석

Pcc LY34 genomic DNA의 cosmid library로부터 1 mM MUG를 함유한 M9 배지에서 β -glucosidase activity를 보이는 또 다른 clone을 선발하였다. Subcloning하여 3.7 kb insert를 가지는 clone을 pAY300라 명명하였다. pAY300의 insert DNA는 single *EcoRI* restriction site, 다른 restriction sites (*HpaI*, *EcoRV*, *ClaI*, *SacII*)를 가지고 있었다 (Fig. 2-16). 이 pAY300을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 3,738 bp (accession number AY769096)였으며 4개의 ORF를 가진 operon 구조였다. 이들 각각을 클로닝하기 위한 primer로 *bglE*, *bglF*, *bglI*, and *bglA*로 각각에 대해 5'-TTC CCC GAT TGC GCT ATT TAT G-3' (sense)와 5'-GAT GGA GCG CAG ATG AGC AGA AC-3' (antisense), 5'-CGC TGT TGA GAT AAA AGC CGT AG-3' (sense)와 5'-CAC AGA AGC CGC GTT CAG CAG TTC-3' (antisense), 5'-CTG ATT GTC GTC TCA TCC TTA ATC-3' (sense)와 5'-CTC CAG CTC ATC GCC ATT GGG GAA AAT ACG-3' (antisense), 5'-ATC CAG ACT GCT TTG ATT GGT GCC-3' (sense)와 5'-AAC CCC GCT TAC ACA CTA CAT TCT-3' (antisense)를 사용하였으며 PCR 증폭하여 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 이들을 각각 *bglE*, *bglF*, *bglI*, *bglA*로 명명하였다 (Fig. 2-16).

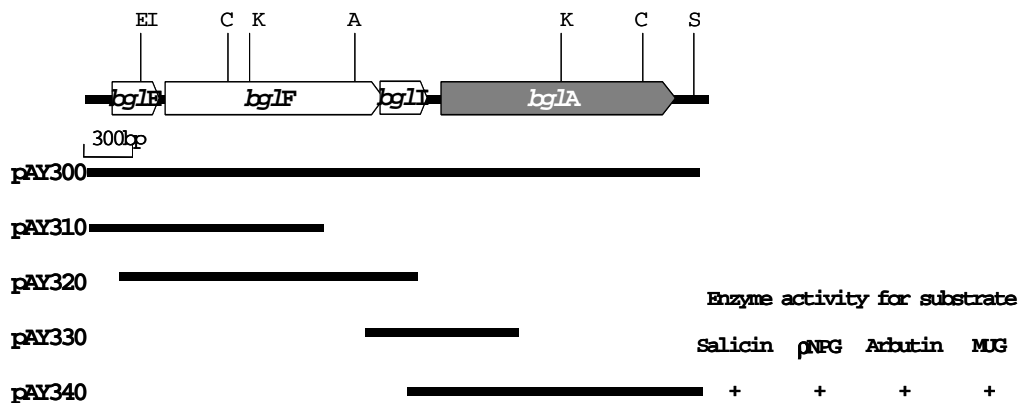


Fig. 2-16. Physical map of recombinant DNA pAY300 carrying *bgIE*, *bgIF*, *bgII*, and *bglA* genes of the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. The ORFs are shown by arrows. The cleavage sites of restriction enzymes EI (*EcoRI*), C (*Clal*), K (*KpnI*), A (*ApaI*), and S (*SacI*) are shown. pAY300 was constructed by cloning a 3.7 kb fragment of cosmid DNA (pAY3) into the pBluescript SK+ vector. pAY310, pAY320, pAY330, and pAY340 were derived by cloning the PCR products into the pGEM-T Easy vector. β -glucosidase activity (BglA/pAY340) was determined using *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG), 4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside (arbutin), 2-(hydroxymethyl) phenyl β -D-glucopyranoside (salicin), and 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG).


```

1      CCTCCTTTTTATCACCAATAACCGGTGTAAGGATAAAAAATTTCCCGGATTGGCGTATTTATGATGCCTTCAAAAAAAGTAAAAAATATGAAACCGGTG
106     CATATATTTTTTCGCTTCTGTAATAAAAAACACAGCGGTGAGTGCAGTATGAATAAGATTTTACTCTGTTGCCAGCAGGAATGTCTACAGCATGGCTG
211     GTACAGCGGATGAAAAAGTCCCGGAGCAAAAAGCGCATCGCTGTTGAGATAAAGCGGTAGGTTTTGAAGAGTTTAGTGAACGATGTTGATGAATATGACCTGTGT
18     V Q R M E K V A E Q K A I A V E I K A V G P E E P S E L I D E Y D C C
316     CTTTTGGGCGCCAGATTAAGTATAAAGTCCCTGATTCAAAGTGTAGCTGACGAGAAAGAAAGCGGATTCGGGTTAATAATGCTGATACGGCATGATG
53     L L G P Q I K Y K L P E F K V I A D E K E K P I A V I N M V D Y D Y G M M
421     AATGGGAGAAAGTCCCTAACGATGCCCTGGCGATGATCGCGTAATAATAACCGGAGGAATAAGTAAATTAACCGAGTCATTATTCAGGCTTATCGAAAACCG
88     N G E K V L N D A L A M I A RBS bgIF>> M S K K L T E S L F S V I E N R
526     TATTAGCCCAATCGCGCGAAACTTCCAGCCAGCGTCATGTTGTCGCAATAAAGATGGGTTTCATTGGCCTCAATGCCCTTTTAAATGTCGGCTCTTTATGAT
16     I S P I A A K L S S Q R H V V A I K D G P I A S M P F L I V G S F M M
631     GTTATTCGCTCATCGCCTTTAGCCCGAATAGTGAATGGGCTTTGCGCAGTGGTGGCTCGGATGGTGGAAACGCCAGCGGAAACAAATCATGATGCCCTACAA
51     L F A H P P F S P N S E W A F A Q W W L G M V E R H G E Q I D M M P Y N
736     TATGACGATGGGCTTATGGCGGTGATATACACAGCGCTATCGCTATAAAGTGGCAGAGCTATAAAATGAACGGTTTATGGCCGACGCTGGCGCTGAT
86     M T M G I M A V Y I T S A I A Y N L A Q S Y K M N G F M A A S L L A L M
841     GTCGTTATGTCGCTTCCAGCCGCGCAAAATCGATAAAGTCTCGCGTGGGTCGCTGGTGGCGAGGGGATTTTACCAGCGATTCATCGTGGCATCTATTCGAC
121     S F M V V A A P Q I D K S L P V G S L G G E G I F T A I I V A I Y S T
946     GGAGGTGATGATTTTGGAGAAGCAATATTGGCATTGCGCTGCCAGAACAGGTACCGCGAAATCCCGCAGTCTTCGATCTGCTATCCCGGATTTTCG
156     E L M H F L Q K H N I G I R L P E Q V P P K I R Q S F D L L I P I L A
1051    CATTTCCGACCGCTTCCCGCTTAGCCTGTTTCATGACAGAGCTGCGCATGCTGTTGCCGAGCGGATCATGGCCGCTTCCCGCGGATTTATCCGCGATC
191     I F L T L F P L S L F M Q S Q F G M L L P Q A I M A V F A P I I S A S
1156    CGAATCCCGCCGCTTGTATAGCGGTGCTGCTCGCCAGCTGCTGGTGGTGGCGGATTCACGGTGGCGTTATCGTGGCGGCTTTTGCAGGGCTTCTG
226     D S L P A T L L A V L L C H L L W P A Q I H G A V I V G G I L Q A F W
1261    GCTGACCAACTAGGAATCAATCAGGAAGCGTTAACCGGGCGCCCGATCACCAAAATTTTCAATGAGCCTTCTGGCAGTCTCTCATCTGGCGGCGGATC
261     L T N L G I N Q E A F N A G A P I T K I F I E P F W Q F F I T V G G S
1366    GGGGCGACCATGGGCTGGTTTTCTCTATCTGCGCAGCTTCTGCTCATCTGCGCTCCATCGGCAAGTGGCGGCTGGTGGCGGATGTTTCAACATCAAGA
296     G A T M G L V F L Y L R S R S A H L R S I G K L A V N V P S M E N I N E
                                                                                               Disaccharide
1471    ACCCGTATTTTTGGTTCACCCGCTGATGAACCCGCTGCTTTCATCCCATTTATTACCAGCGCGCTGGTGAACGCCACCCCTTGCCTATATCGCGTAAAAAC
331     P V I F G S E V V M N P L L F I P F I T A P L V N A T L A Y I A L K T
binding site
1576    CGATTTGGTGCATCGCTCATTTTCGCTTGGCGCTTGACAAACCGCGGCGGATTTGGCGAGCGCTGTTACGGGGTGGGACTGGCTGGCAGTGGTCTGGTGGG
366     D L V H R V I S L A P W T P G F I G A A W S T G M D N R A V V L V G
1681    GGGAGTATTCGCTCATCCTTAATCTATACCCTTCTTCAAATGTATGAAGCTCAGTGTATCGAAACAAGATGGGCAAGTAGAGAGGACAGTCAAGTGA
401     G L I Y V S S L I Y Y P F F K M Y E R Q L I E Q E V G T V E A V S D
                                                                                               bgII>>
1786    TGCTCGATGAAACCAGATAATGGAATGATTATTTATCGGGAGAGGCGCGCTCCAGCTCAATGGAGCGCTGAGCGCCGCAAAAATGACTGGGCAAGG
436     A R
1891    M L D E E T T I M E L I I Y A G E A R S S S M E A L S A A R K Y D W D K
1891    CTGAAGAACTCGTAAACCGGCTTCTGGCGCGCGCAAGCCATCAAACTCAGACTGCTTTGATGGTGGCGATGAGGCGAGCGAAAATCCGATCAATC
36     A E E L L N A A S V A A R K A H Q I Q T A L I G A D E G S G K I P I N
1996    TATTGGTTCACCGCAAGATCACCTGATGAACCGGATGCTATGGTGGAGGAGCTGATCAACTGCATCGGAAATCTCCCTCCCGAAGACG
71     L I L H A A Q D H L M N A M L C R E L V E E L I Q L H R E I S S L K Q
2101    TTATAAATTAATAATGCAAACTGAATAAGAGGAAACAAGATGCTGTTCAACAATTACCGAAAGACTTCTGTGGGCGCGCGGATGGCGGATCAAGT
106     L I N RBS bgIA>> M S V Q Q L P K D F L W G G A V A A H Q Y
                                                                                               Family 1 hydrolase signature sequence
2206    TGAAGTGGTGGGATCAAGGTGGCAAAAGCGCTCAGCATCTGCGATGCTCCTGTCGGCGCGCCCGCCAGCGGTTGATCGTGTGATTACCGATGGTACAGCCTG
22     E G G W D Q G G K G V S I C D V L S G G A H G V D R V I T D G V Q Y P G
2311    TGTCAAGTATCCGAATCATCAGCGGCTGGAGTCTTACTCCCATATAAGCAGGAGCTGGCCCTGTTCCGCGAAATGGGCTTAAATGCTTCCGATACCTCGATTG
157     V M K R Y Q S K V K Y W H T F N E I N N Q R H W Q Y P V F G Y C C S G
2416    CTGACCGGATTTTCCCAATGGCAGTGGCTGGAGCCGAATGAGCGAGGCTGCAATCTATGATGACCTGTTCCGATGAGCTGGAATAACAATCCAGGAC
92     W T R I F P N G D E L E P N E A G L Q F Y D D L F D E L L K Y N I E P
2521    AGTATACGCTGCTCACTTCAGATGCGCATCATTTGGTAAAGCAGTACCGTGGTGGCTGAAACCGTAAAGTGGTGGATTCTTTGTTGCTACAGCAAGT
127     V I T L S H F E M P H L V K Q Y G G W L N R K V V D F F V R Y S E V
2626    GGTATGAAACGTTACAGTCCAAAGTGAATCTGGATGACTTCAATGAGATCAACAACCGGTAAGTGGCAGTATCCGGTGTGGCTTATGCTGTTCCGG
162     V M K R Y Q S K V K Y W H T F N E I N N Q R H W Q Y P V F G Y C C S G
2731    CTTGATTTTACCGATCAGCAACCGAGCAGGCGATGTACCAACCGTGCACCCAGTGTGTCGCAAGTGGTAAAGTGGTAACTGGGCTAGAGATTA
197     V I F T D H D K P E Q A M Y Q T L H H Q F V A S A K V V K L G H E I N
2836    CCCGAATCAAAATTTGGCTGATGCTGGCGCTGGTACCGATCTACCCGCTGATGCCACCGGATGACGTGATGTTGCACAGGAAGCGATCGGTAAGCTCA
232     P N F K I G C M L A L V P I Y P W S C H P D D V M F A Q E A M R E R H
2941    CTTGTCGCGAGCTGCAAGTCCCGGTTACTATCCGCTTACATCTGAAAGAGTGGGCGGAAAAGCTATCAGATGATATGACGCGGAAAGCAGCAACAG
267     L F G D V Q L R G Y Y P S Y I L K E W A R K G Y Q I D H Q P E D E Q T
3046    GCTGCGGATGGTTCACCGACTATCTGGCTTCACTACTACAGCAGCGGCTGACGCTGGCGGCAAAAGCGGAAAGAAAGAGATCAATACCGGCTT
302     L R D G C T D Y L G F S Y Y M S S A V Q L A A K G Q K K E D S I T G F
3151    TGACGCGCGGTAAGAAACCGCATGTGAAGCATCGAAATGGGCTGGCAGATGACGACCGGTTGGCCTGCTTATACGCTGAATAGCTTACGAACTTATCA
337     D G G V K N P H V K A S E W G W Q I D P V G L R Y T L N S F Y E R Y Q
3256    GAAACCAATGTTCACTCGTGAAGCGTTTTGGCGCGGTAGACAAGGTGGAAGCCGAGCGAGCATTATGATGATTACCGCATCGAGTACCTCAAGAGCGCAT
372     K P M F I V E N G P S A V D K V E A D G S I N D D Y R I E Y L K A H I
                                                                                               Family 1 hydrolase signature sequence
3361    CGATCAGATGAAGAAGCCGCTGTTGAAGATGGCGTGGAGCTGATGGGCTATACCCCGTGGGCTGATCAGCTGTTGTCGTTACCCACCGGCGAGTACAGCAA
407     D Q M K K T V V E D G V E L M G Y T P W G C I D C V S F T T G Q Y S K
3466    ACCTACCGTTTCAATTCAGTGGATAAACACGACGATGGCAACCGCACCTTCAAGCGCTCGAAGAAAAGAGCTTGAATGATGATGACGCGGAAAGGATTTCCAGCAA
442     R Y G F I Y V D K H D D G T G T F K R S K K K S F D W Y K K V I S N
3571    CGTGGCAGCTATAACCGGATTCAGAAAACGTTAGCCCAAAAGCGGCTTAAACCGCAGCGCTTTTCTTGGTCAAGTGTATCTCTTCCCAAGATGAGCTC
477     G A E L
477     TATACACAAAGATGATGTTGTAAGCGGGGTTGCGCTTATCCCGAGCGTAAGAAATATGCG

```

Fig. 2-17. Nucleotide sequence of the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 *bgIEFIA* genes and the flanking regions. The deduced amino acid sequences for each ORF are placed below the nucleotide of corresponding codon. Putative Shine-Dalgarno sequences for ribosomal binding (RBS) are underlined and labeled. Proteins are labeled at their respective start codons. The disaccharide binding site for PTS of BglF is underlined and labeled. The family 1 hydrolase signature sequences are also underlined and labeled.

3-2. *bglA* operon의 구조분석 및 상동성 비교

National Center for Biotechnology Information BLAST e-mail server를 이용하여 Asc protein에 유사성이 있는 단백질을 조사하였다. *Pcc* LY34 BglE, BglF, and BglII protein는 각각 *Vibrio cholerae* (D82219) phosphotransferase system component IIB, *Vibrio vulnificus* YJ016 (BAC95664) phosphotransferase system component IIC 및 *E. coli* (Q46829) phosphotransferase system IIA과 상동성이 있었다.

Pcc LY34 BglA는 β -glucoside의 이동과 이용에 관련된 *Yersinia pestis* KIM의 BglA 및 *E. coli* BglA와 유사성이 있었다 (Table 2-11). 이러한 similarity에 의거하여 *Pcc* LY34 protein은 기능적으로 *Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii* TTO1와 *E. coli*의 BglA와 연관성을 수가 있었다 (Table 2-12). Putative operon *bglEFIA*는 앞서 분리한 *Pcc* LY34의 *bglTPB*과 *ascGFB* operon과는 상이함을 알 수 있었다 (Fig. 2-16).

첫번째 ORF (*bglE*)는 306 bp로 구성되어 101 amino acid를 암호화하며 (Fig. 2-17) ORF start codon 전방 6 bp에 ribosome-binding site, GAGG가 있었다. 상동성 분석에 의하면 *Pcc* LY34 BglE protein은 *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 CelA, *V. cholerae* phosphotransferase system IIB component, *Clostridium acetobutylicum* phosphotransferase system IIB component과 각각 55.0, 54.0, 51.5% similarity를 가지고 있었다 (Table 2-11).

두번째 ORF (*bglF*)는 1,314 bp로 구성되어 437 amino acid를 암호화하며 이 ORF는 *bglE* 말단 후방 16 bp에서 시작되며 start codon 3 bp 전방에 putative ribosome-binding site, GGAGGA가 있었다 (Fig. 2-17). 상동성 분석법에 의하면 *V. vulnificus* YJ016 phosphotransferase system components IIC, *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 CelB, *Bacillus cereus* ATCC 14579 diacetylchitobiose-specific IIC와 상동성이 있었다 (Table 2-11 & 2-12). 그러나 single protein BglF는 *Pcc* LY34 BglP와 AscF처럼 hydrophilic IIB and IIA domains에 둘러싸인 central membrane-spanning IIC domain이 관찰되지 않았다 (Fig. 2-18A, B).

세번째 ORF (*bglI*)는 terminator *bglF*. *bglI*의 전방 11 bp에서 시작하여 327 bp로 구성되어 108 amino acid를 암호화하며 (Fig. 2-17) start codon 전방에 putative ribosome-binding site가 관찰되지 않았다, *Pcc* LY34 BglII protein는 *E. coli* CFT073, *Yersinia pestis* KIM CelC, *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 CelC의 phosphotransferase system components IIA와 각각 52.9, 51.5, 49.5% similarity를 가지고 있었다 (Table 2-11 & 2-12).

네번째 ORF (*bglA*)는 *bglF* 후방 348 bp에서 시작하여 1,443 bp로 구성되어 480

amino acid를 암호화하며 이 ORF는 start codon 8 bp 전방에 putative ribosome-binding site, TAAGAAG가 있었다 (Fig. 2-17). 상동성 분석법에 의하면 *Y. pestis* KIM BglA, *E. coli* BglA, *S. typhimurium* LT2 BglA protein과 약 76% 상동성이 있었으며, β -glycosyl hydrolases family 1에 속하였다 (Table 2-11 & 2-12).

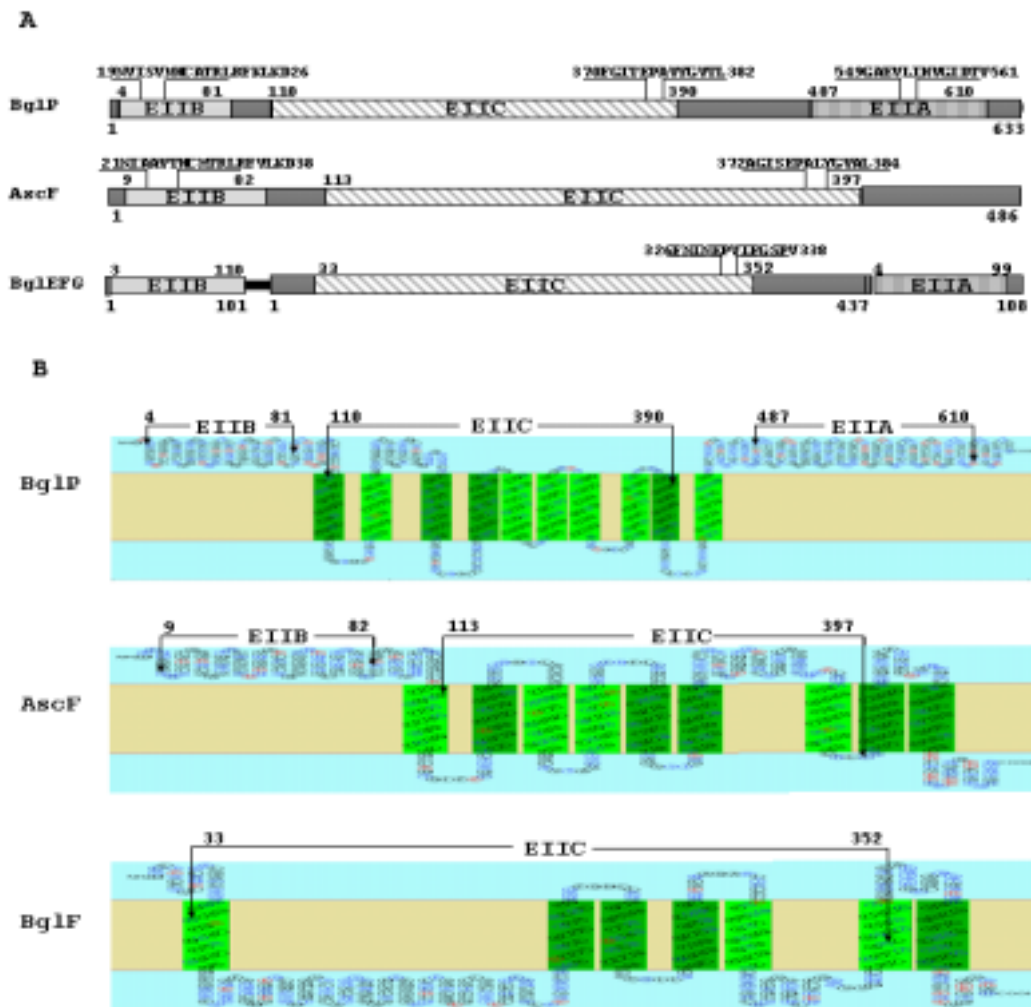


Fig. 2-18. (A) PTS EII Domains of BglP, AscF, and BglEF1 from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. Three EII complexes of BglP, AscF, and BglEF1 were from pAY100, pAY200, and pAY300, respectively. The numbers at

the extremes of the putative EIIC domain represent the first and last amino acid residues of the putative transmembrane region (EIIC). Disaccharide-binding sites in EIIC domains were designated above the regions of the polypeptide chains. Residues corresponding by homology to those important for phosphoryl transfer (EIIA and EIIB) and the putative disaccharide-binding site (EIIC) are indicated. (B) Maps of the putative transmembrane proteins across membranes by SOSUI of proteomics tool (http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_subunit.html). Respective domains of EII complexes were shown. Designated numbers indicate the position of the corresponding amino acid.

3-3. BglA 정제와 생화학적 특성

BglA의 고발현을 위해 5'-GGA TCC ATG TCT GTT CAA CAA TTA CCG-3' (sense, containing a *Bam*HI site as underlined) and 5'-AAG CTT GTA GCT CGG CAC CGT TGC T-3' (antisense, containing a *Hind*III site as underlined, C-terminal (His)₆tag)의 primer를 이용하여 expression vector pET-21a(+)에 클로닝하였다. 재료 및 방법에 의거하여 column filtration, SDS-PAGE하여 하나의 single band를 확인하였으며 (Fig. 2-19) pNPG를 기질로 한 이 효소의 최적온도는 40°C 부근이었으며 최적 pH는 7 근방이었다 (Fig. 2-20B). 효소의 thermostability data는 여러 온도에서 preincubating하여 측정하였다. 60°C에서 10분간 열처리 하였을때 효소활성이 38% 감소하였다 (Fig. 2-20C). 효소의 divalent cations에 대한 영향으로 Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Co²⁺는 효소활성을 저해하였으나 Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺는 효소활성을 증가시켰다 (Table 2-13). 15 mM Mg²⁺의 첨가가 pNPG에 대한 최대활성을 보여 주었다 (Fig. 2-20D).

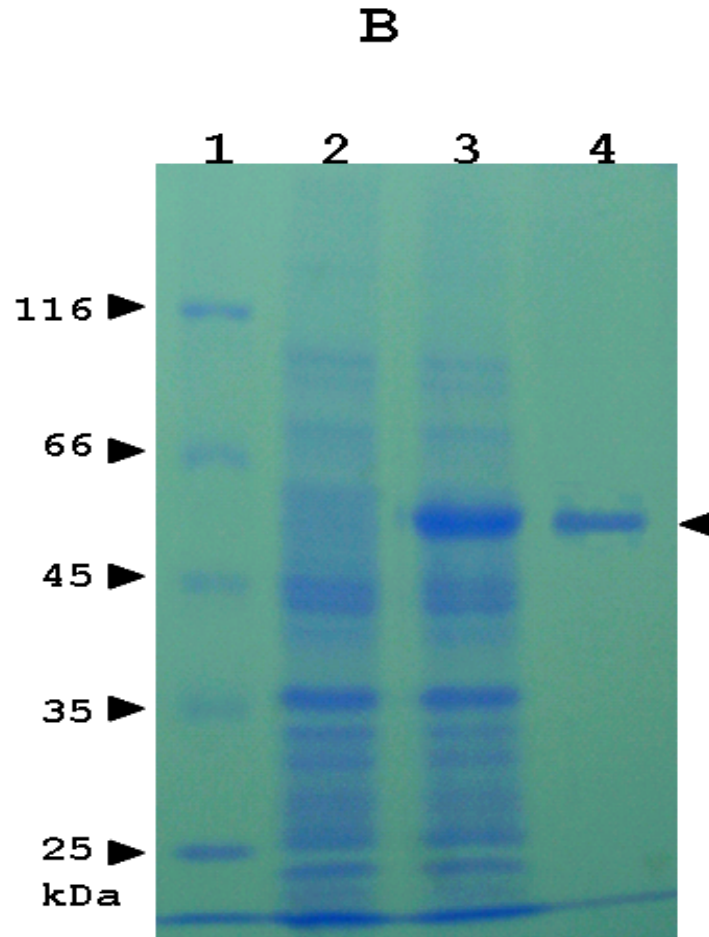


Fig. 2-19. Electrophoretic analysis of the purified β -glucosidase. Separation was performed on a 12.5% (W/V) SDS-polyacrylamide gel. Lane 1, marker; Lane 2, crude extract from BL21 (DE3) containing pET-21a(+)/BglA; Lane 3, crude extract from IPTG-induced BL21 (DE3) containing pET-21a(+)/BglA; Lane 4, purified β -glucosidase from HisTrap kit (Amersham). The gel was stained with 0.025% Coomassie blue R-250. Molecular weight markers used were β -galactosidase (116,000 Da), bovine serum albumin (66,200 Da), ovalbumin (45,000 Da), lactate dehydrogenase (35,000 Da), restriction endonuclease Bsp 981 (25,000 Da), β -lactoglobulin (18,400 Da), and lysozyme (14,400 Da).

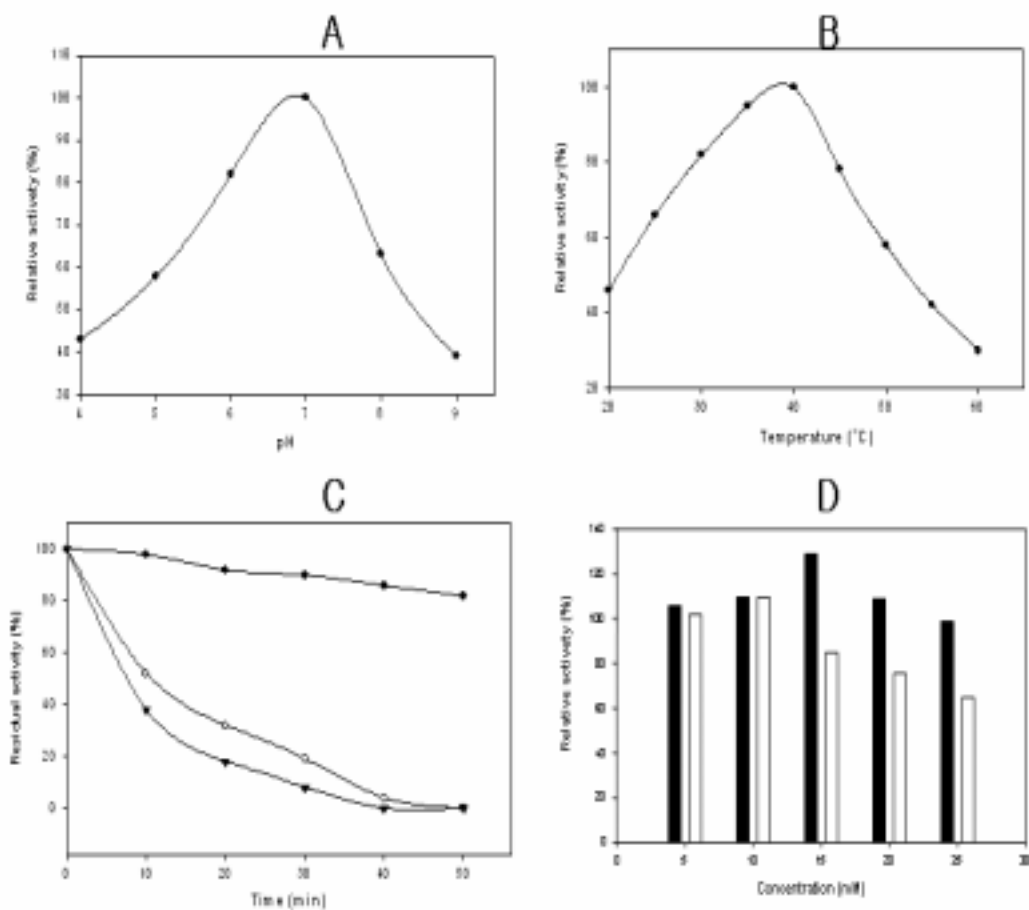


Fig. 2-20. Effect of pH, Temperature, Thermal Stability, and Magnesium/Calcium Ion on the Activity of BglA. (A) Effect of pH on the relative activity of BglA. Enzyme activity was assayed at 40°C for 30 min in sodium phosphate buffers of indicated pH. (B) Effect of temperature on the relative activity of BglA. Enzyme activity was assayed at pH 7.0 for 30 min at the indicated temperature. (C) Effect of time and temperature on the relative activity of BglA. Enzyme activity was assayed at 40°C (●), 50°C (○), and 60°C (▲), pH 7.0 for 60 min at the indicated reaction time. (D) Effect of concentration of Mg²⁺ (■) and Ca²⁺ (□) on the relative activity of BglA. Enzyme activity was assayed at 40°C.

3-4. β -glucosidase 활성의 필수 아미노산 확인

In vitro site-directed mutagenesis 방법을 통하여 β -glucosidase 활성의 essential residue를 확인하였다. 현재까지 *Agrobacterium* β -glucosidase의 구조결정이 되어 있다. 이 효소의 Glu358 residue가 nucleophile로 작용하여 glycosidic bond cleavage에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 이러한 사실을 바탕으로 BglA의 two conserved Glu residue를 alanine으로 대체하는 실험을 수행하였다. Site-directed mutagenesis를 위한 primer로 E178A, 5'-TGG ATG ACT TTC AAT GCG ATC AAC AAC CAG C-3' (sense) and 5'-GCT GGT TGT TGA TCG CAT TGA AAG TCA TCC A-3' (antisense) E378A, 5'-CAA TGT TCA TCG TCG CAA ACG GTT TTG GCG C-3' (sense) and 5'-GCG CCA AAA CCG TTT GCG ACG ATG AAC ATT G-3' (antisense)를 사용하여 클로닝하였다. 즉, E178A 및 E378A (E, glutamic acid; A, alanine. E178A and E378A; two glutamic acid of the 178nd, and 378nd position of BglA amino acid sequence were changed to alanine)를 실험하였다. 그 결과 이러한 mutant들은 pNPG를 기질로 했을 때 효소활성이 소실된 것으로 보아 이 amino acid가 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다 (Table 2-12 & 2-14).

Table 2-11. Pairwise similarity (%) of BglE, BglF, BglI, and BglA of *Pcc* LY34

Sequence ^a	1	2	3	4
BglE	100.0	55.0	54.0	51.5
CAE15128		100.0	47.5	42.6
D82219			100.0	43.6
A96947				100.0
BglF	100.0	53.6	51.1	41.2
BAC95664		100.0	55.3	38.0
CAE15129			100.0	36.9
AAP09357				100.0
BglI	100.0	52.9	51.5	49.5
AAN80414		100.0	49.5	50.0
AAM84827			100.0	42.5
CAE15130				100.0
BglA	100.0	80.7	76.2	76.1
AAM86483		100.0	79.0	79.5
Q46829			100.0	95.4
AAL21926				100.0

^aCalculated with CLUSTAL W and the PAM250 residue weight table.

The sequences are from the following sources, BglE, BglF, BglI, and BglA from *Pcc* LY34; CAE15128, CAE15129, and CAE15130 from *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1; D82219 from *Vibrio cholerae* A96947 from *Clostridium acetobutylicum* BAC95664 from *Vibrio vulnificus* YJ016; AAP09357 from *Bacillus cereus* ATCC 14579; AAN80414 from *E. coli* AAM84827 and AAM86483 from *Yersinia pestis*KIM; Q46829 from *E.coli* AAL21926 from *Salmonella typhimurium* LT2.

Table 2-12. Alignment of the regions surrounding the homologous region of BglE and BglI, conserved regions of BglF, and putative acid/base and nucleophile of some typical representatives of glycosyl hydrolase family 1

	BglE		BglF		BglG		BglA (β-glucosidase)	
	E118		E11C		E11A		Acid/base	Nucleophile
BglE	CCAGQSTS	Bgl F	FNINEPVIFGSPV	BglG	VHQQHLMN	BglA	TFNEINNQ	MFIVENGFG
CAE15128	CCAGQSTS	BAC95664	FQINEPVIFGSPV	AAN80414	IHQQHLMN	AAM86483	TFNEINNQ	LFIVENGFG
D82219	CCAGQSTS	CAE151229	FNINEPLIFGSPV	AAM84827	VHQQHLMN	Q46829	TFNEINNQ	LFIVENGFG
A96947	FCSAGQSTS	AAP09357	FNINEPVIFGLP1	CAE15130	VHQQHLMN	AAL21926	TFNEINNQ	LFIVENGFG
AAL00638	VCSAGQSTS	AAO81318	FNINEPVIFGVP1	CAG21150	THQQH1MT	AAN44371	TFNEINNQ	LFIVENGFG
AAP29103	CCAGQSSS	H70216	FNINEP1MFGAP1	AAL20239	VHQQH1MT	H82185	TFNEINNQ	IFIVENGLG
CAD00451	VCSAGQSTS	BAC12654	FNISEPT1FGAPV	AAF94442	VHQQH1MT	CAE14566	TFNEINNQ	IFIVENGLG
AAC66322	VCSAGQSTS	AAM23871	FNINEP11FGAP1	AAN43082	VHQQH1MT	P42973	TFNEINNQ	LFIVENGFG
	* * * * *		* * * * *		* * * * *		* * * * *	* * * * *

The sequences are from the following sources, BglE, BglF, BglI, and BglA from *Pcc* LY34; CAE15128, CAE15129, CAE15130, and CAE14566 from *Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii* T101; D82219 from *Vibrio cholerae* A96947 from *Clostridium acetobutylicum* AAL00638 from *Streptococcus pneumoniae* R6; AAP29103 from *Bacillus anthracis* str. Ames CAD00451 from *Listeria monocytogenes* AAC66322 from *Borrelia burgdorferi* B31; BAC95664 from *Vibrio vulnificus* YJ016; AAP09357 from *Bacillus cereus* ATCC 14579; AAO81318 from *Enterococcus faecalis* V583; H70216 from *Borrelia burgdorferi* BAC95664 from *Vibrio vulnificus* YJ016; AAM23871 from *Thermoanaerobacter tengcongensis* AAN80414 and Q46829 from *E. coli* AAM84827 and AAM86483 from *Yersinia pestis* KIM; CAG21150 from *Photobacterium profundum* AAL20239 and AAL21926 from *Salmonella typhimurium* LT2; AAF94442 from *Vibrio cholerae* 01 biovar eltor str. N16961 AAN43082 and AAN44371 from *Shigella flexneri* 2a str. 301; H82185 from *Vibrio cholerae* P42973 from *Bacillus subtilis*.

Table 2-13. Effect of metal ions on BglA

Ion (5 mM)	Relative activity
Mg ²⁺	106
Ca ²⁺	102
Cu ²⁺	90
Co ²⁺	69
Mn ²⁺	101
Hg ²⁺	0
Zn ²⁺	56

^aThe β -glucosidase (0.05 nkat in 200 mL of 50 mM phosphate buffer, pH 6.2) was exposed for 30 min at room temperature to different concentrations of metal ions. The activity was then measured under standard conditions and expressed relative to the activity measured on *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (100) without added ion.

Table 2-14. Specific activity and kinetic parameters for hydrolysis of β -glucosidase by BglA, E378A, and E178A mutant

	Kinetic parameter		Specific activity (u/mg)
	K _m (mM)	V _{max}	
BglA	0.25	35	553
E178A	ND	ND	ND
E378A	ND	ND	ND

^aThe parameters were determined at 40°C (pH 7.0).

^bMicromoles of *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NPG) hydrolyzed min⁻¹ mg protein⁻¹.

^cMicromoles per minute per milligram of protein.

ND, no detectable.

4. 결론 (실험 II)

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* LY34 genomic DNA로부터 cosmid library 제조한 후 β -glucoside utilization operon 및 *bgl* gene에 관련되는 3 종류의 clone을 선발하였다.

각 clone들을 염기서열 및 유전자분석을 한 결과 *bgl*TPB는 5,557 bp로 세 개의 유전자 *bgl*T (antiterminator), *bgl*P (EIIBCA), *bgl*B (β -glucosidase)가 하나의 operon을 형성하고, *asc*GFB는 5,618 bp로 세 개의 유전자 *asc*G (repressor), *asc*F (EIIBC), *asc*B (β -glucosidase)가 하나의 operon을 형성하며, *bgl*EFIA는 세 종류의 PTS를 암호화하는 유전자 *bgl*E (EIIB), *bgl*F (EIC), *bgl*I (EIIA)가 *bgl*A (β -glucosidase) 유전자와 operon을 형성하였다. *bgl*HDJ도 세 개의 유전자로 하나의 operon을 형성하는데 특이한 것은 *bgl*D (β -glucosidase) 유전자가 *bgl*H (EIIBCA)와 *bgl*J (antiterminator) 사이에 배치되었다. 유전자 분석 결과 2 종류 operon (*bgl*B, *asc*B)는 regulator를 포함한 β -glucoside utilization system이었는데 이 중에서 *bgl*B는 positive regulator로서 antiterminator로 작용하였으며 N-terminal region에 conserved region VVMGRG의 RNA binding region이 확인되었으며, 세포내의 glucose 양에 의해 β -glucosidase 생성을 조절하는 dimeric enzyme 형성에 관여하는 PTS regulator domain인 PRD1, PRD2 region 및 phosphorylation에 관여하는 histidine의 존재도 확인하였다. 1 종류 operon (*asc*B)에서는 negative regulator로서 repressor를 가지고 있었으며 helix-turn-helix 구조로 되어 있었다.

유전자분석을 한 결과 3 종류 (*bgl*B, *asc*B, *bgl*A)의 PTS를 함유한 β -glucoside utilization system이 확인되었는데 이 중 *bgl*EFIA는 분할된 유전자에 의하여 PTS complex가 암호화되었으며 PTS complex에 EIIA domain이 존재하지 않았으며 2 종류 operon (*bgl*B, *asc*B)에서는 하나의 유전자에 의해 PTS complex가 암호화되었다. 이들 유전자들의 유전적 유연관계를 분석한 결과 3종류의 β -glucosidase는 모두 family 1에 속하였다.

유연분석에 의하면 *Pcc* LY34의 *bgl*B, *asc*B, *bgl*A 유전자들은 *E. coli*에서는 아직도 cryptic 유전자로 존재하는 것으로 확인되었다. 분리 정제된 대부분의 β -glucosidase들은 기질로 *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NPG), 4-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside (arbutin), 2-(hydroxymethyl) phenyl β -D-glucopyranoside (salicin), 및 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUG)를 분해하였으며 최적활성은 pH 7, 최적활성 온도는 40°C 부근이었으며, 분자량은 BglA는 55 kDa, 나머지는 모두 53 kDa에 가깝고, 이러한 효소들은 Mg^{2+} 존재시 활성이 높아졌으며, Hg^{2+} 존재하에서는 활성이 억제되었다.

제 3 절 무름병균의 병원성 관련 신호전달물질 분리

1. 서론

본 실험에서는 제1절에서 분리한 우리나라 채소류에서 서식하는 무름병균을 분리하여 이들이 생성하는 병원성에 관여하는 신호전달물질을 분리하고 물질탐색을 위한 bioassay 방법 확립, Mass spectrometry 분석을 통한 구조분석 및 효소기질을 사용을 위해 합성방법 확립을 하였으며 병원성에 관여하는 신호전달물질 생성에 관여하는 유전자를 클로닝하여 유전자 구조를 분석하였으며 무름병 상호간의 유전적 연관관계를 분석하였다. 이러한 실험자료를 바탕으로 이후 실험에서 병원성에 관여하는 신호전달물질 분해를 위한 전략을 수립하는 기초를 마련하는 것을 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 무름병균의 신호전달물질 분리

분리균을 LB 배지, 28°C에서 배양 후 원심분리하여 여액을 paper discs (dia. 0.8 cm, Toyo Roshi Kaisha, Japan) 상에 분주하였다. Disc를 *Chromobacterium violaceum* CV026 및 HHL이 함유된 soft agar(0.8%) 표면에 옮겼다. Overnight 배양 후 자주색 바탕에 환이 생성되는 것을 활성을 나타내는 양성으로 하였다. 배양액과 동량의 50 µM N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL)를 혼합한 후 28°C에서 저속으로 진탕하면서 배양하였다. 반응 혼합액의 반응을 멈추기 위해 95°C에서 5분간 끓인 후 적당한 농도로 희석한 후 반응혼합액을 paper disc 상에 분취하였고 지시 균주인 *C. violaceum* CV026이 함유된 soft agar 표면에 놓았다.

2-2. 무름병균의 신호전달물질 구조분석

1차적으로 methanol:water (7:3, v/v)의 전개용매로 C18-reverse-phase TLC plate 을 이용하여 신호물질 (autoinducer)을 분리하였다. 물질확인용 bioassay법으로 *Agrobacterium tumefaciens* NT1 혹은 *C. violaceum* CV026 균주를 지시 균주로 사용하였다. 확인된 fraction을 flow rate of 2.5 ml/min, acetonitrile/water 1:1 (v/v) 조

건으로 하여 analytical reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC; ODS Hypersil 5 μ m C18 column, 200 \times 4.6 mm, Hewlett Packard)를 이용하여 분리하였다. 정제된 autoinducer를 methanol에 녹인 후 gas chromatography (GC-MS) 및 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF Mass, Perspective Biosystems)를 이용하여 구조분석을 하였다. 분해된 신호물질의 구조동정을 위해 정제된 분해효소와 50 μ l HHL (2 mM final concentration)를 28°C에서 1시간 처리하였다. 처리 후 반응액을 ethyl acetate로 추출 후 건조하였다. 분해산물을 상기 방법에 준하여 구조를 분석하였다.

2-3. 무름병균의 신호전달물질의 합성

이후의 신호물질분해 실험을 위한 기질의 대량확보를 위해 HHL 합성을 하였다. 합성 HHL은 one-step 과정으로 L-homoserine lactone (1 mmol) in pyridine (10 ml) 과 hexanoyl chloride (1.5 mmol)을 혼합하여 130°C에서 45 분간 반응시켰다. 그 다음 ethyl acetate를 가하여 용해시켰다. 잔존한 pyridine은 증발시켰다. 얻어진 crude product는 silica gel chromatography에서 정제하였으며 그 수율은 50% 정도였다.

2-4. 무름병균의 신호전달물질 생성 유전자 클로닝

신호전달물질 생성 유전자 클로닝을 위해 무름병균에서 *luxI*-R homologue를 이용하였다. 즉, *luxI*-R 유전자의 conserved amino acid sequence를 바탕으로 degenerate oligonucleotide primer를 제작하였다. Sense 및 antisense degenerate oligonucleotide primer들은 각각 5'-CGS GTS GAY GCB GTK GCB TC-3' (sense) 및 5'-TGD ACC ACT TCR TCR TGV GA-3' (antisense)로 제작하였다. PCR 증폭 [soft-rot bacteria genomic DNA, Super-Therm DNA polymerase (JMR, Side Cup, Kent, UK) under 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 50°C for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec] 후 약 350 bp의 DNA 단편을 얻었다. 이 단편을 염기서열분석 BLAST search를 통하여 확인하였다. 이러한 초기 DNA 염기서열을 바탕으로 primer walking 방법을 통하여 upstream 및 downstream의 unknown region을 확인하였다. 완전한 open reading frame이 확인된 후 specific primer로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 신호전달물질의 bioassay

분리 무름병균 *P. chrysanthemi* PY35을 감자에 접종시켰다. 감자의 ethyl acetate 추출물을 지시균주인 *C. violaceum* CV026와 bioassay하였다. Fig. 3-1는 무름병에 감염된 감자 ethyl acetate 추출물의 bioassay를 나타낸다. 이러한 무름병 감염여부는 bioassay를 통하여 쉽게 관찰되며 *P. chrysanthemi* PY35가 quorum-sensing에 관여하는 신호물질을 분비한다는 것을 의미한다. 분리 선정된 *P. chrysanthemi*와 *P. carotovorum* 계통은 이러한 quorum-sensing system을 가진다는 것을 알 수 있었다.

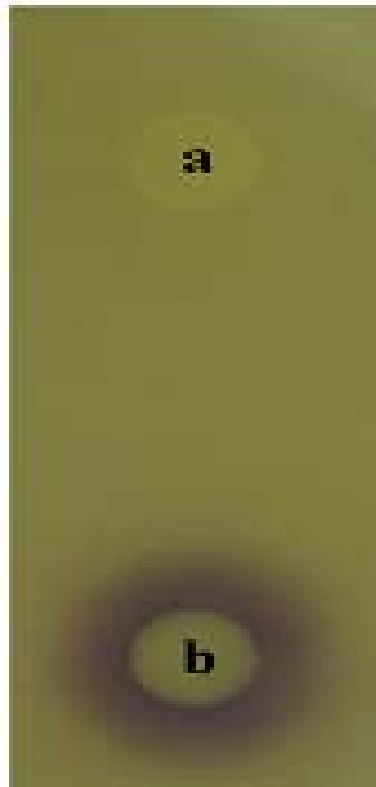


Fig. 3-1. Plate bioassay of potato extract with *C. violaceum* CVO26.
a, *E. coli*; b, *P. chrysanthemi* PY35.

3-2. 신호전달물질 분석

The TLC bioassay은 AHL 신호물질 확인 유용하였다. TLC bioassay에서 *P. chrysanthemi* PY35의 ethyl acetate 추출액을 먼저 7:3 methanol and water (v/v) 혼합액에서 C18-reverse-phase thin-layer gel에 먼저 전개를 시킨 다음 신호물질은 고유물질의 특성에 따라 이동하였다. 체외로 분비되는 이러한 신호물질은 reporter strain인 *C. violaceum* CV026로 처리로 쉽게 육안으로 관찰이 가능하였다 (Fig. 3-3).

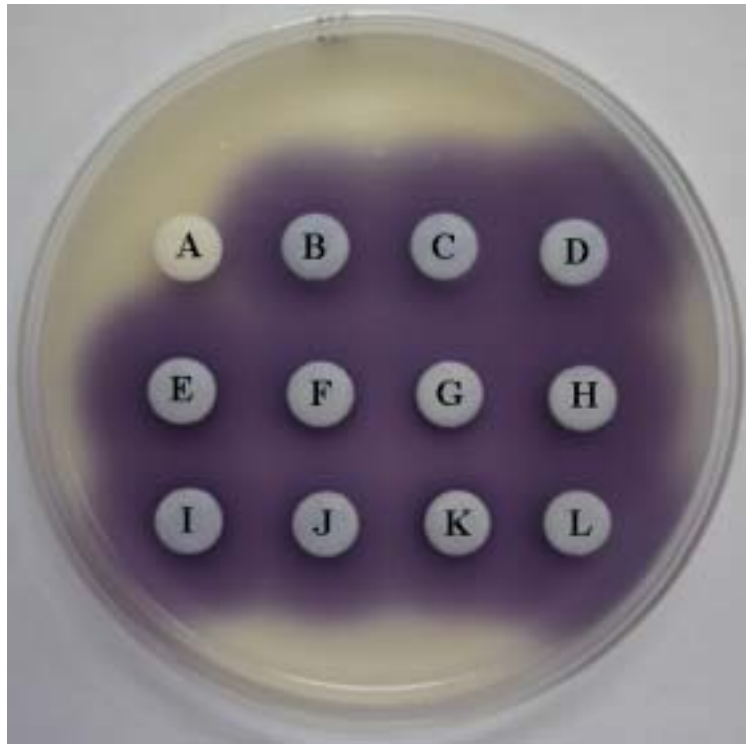


Fig. 3-2. Plate bioassay of autoinducers with *C. violaceum* CVO26. A, negative control; B, *P. chrysanthemi* PY35; C, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34; D, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101; E, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L305; F, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L313; G, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* L307; H, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* L201; I, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* L312; J, *Erwinia herbicola* L317; K, HHL; L, OHHL.

2종류의 뚜렷한 spot이 *C. violaceum* CV026로 육안 관찰이 가능하였으며 Rf는 각각 0.76 및 0.59였다 (Fig. 3-3). 이들 각각의 spot를 methanol에 추출한 다음 reversed-phase HPLC에 재분리하였다. 정제한 신호물질을 FAB mass spectrum로 분석한 결과 몇몇의 [M+H] peak를 보여 주었다. MALDI-TOF mass spectrum이 Fig. 3-4와 3-5에 있으며 peaks at m/z 200.2 및 214.1이 HHL와 OHHL에 해당하는 것으로 나타났다.

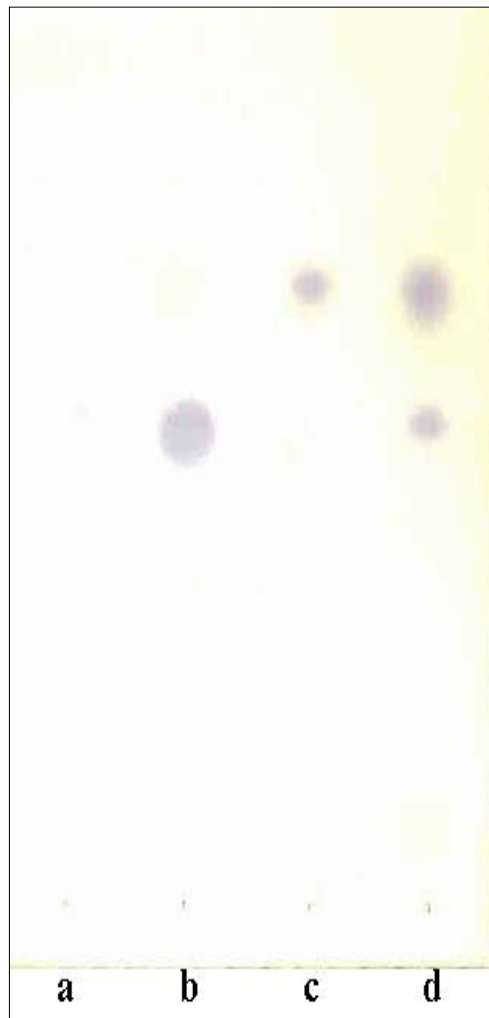


Fig. 3-3. TLC bioassay of autoinducers with *C. violaceum* CVO26. a, negative control; b, HHL; c, OHHL; d, an ethyl acetate extract of the culture supernatant of *P. chrysanthemi* PY35.

3-3. 신호전달 물질 유전자 클로닝

신호물질관련 유전자를 분리하기 위해 *lux* homologous gene를 바탕으로 한 degenerate primer를 사용하여 PCR 증폭한 결과 350 bp DNA fragment를 분리하였으며 실험방법에서 언급한 방법대로 1.8 kb의 완전한 유전자를 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 그 염기서열을 분석한 결과는 Table 3-1과 같다.

3-4. 신호전달 유전자 구조

분리한 유전자를 *exp*로 명명하였다. *P. chrysanthemi* PY35의 *expI* (*luxI* homologous)의 크기는 639 bp이며 212 amino acid를 암호화하였으며 predicted molecular mass는 24,612 Da이었다. *ExpI*의 calculated pI는 5.62였다. *P. chrysanthemi* PY35의 *expR* (*luxR* homologous)는 753 bp이며 250 amino acid를 암호화하며 predicted molecular mass는 28,805 Da이었다. *ExpR*의 calculated pI는 2.2였다. 다른 분리 무름병균의 *lux* homologous gene은 Table 3-2와 3-3에 요약하였다.

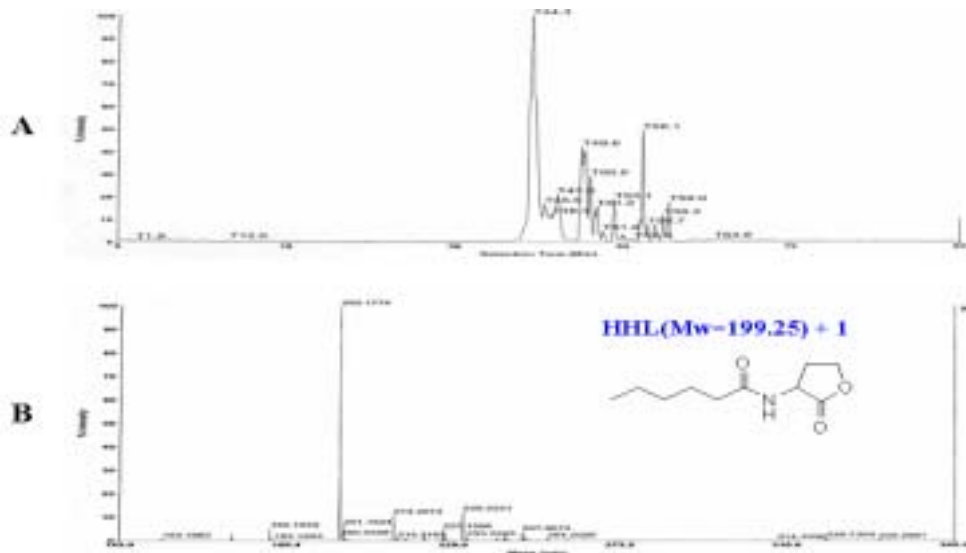


Fig. 3-4. Total ion chromatogram of the LC-MS (A) and spectrum of TOF-MS (B) of the HHL.

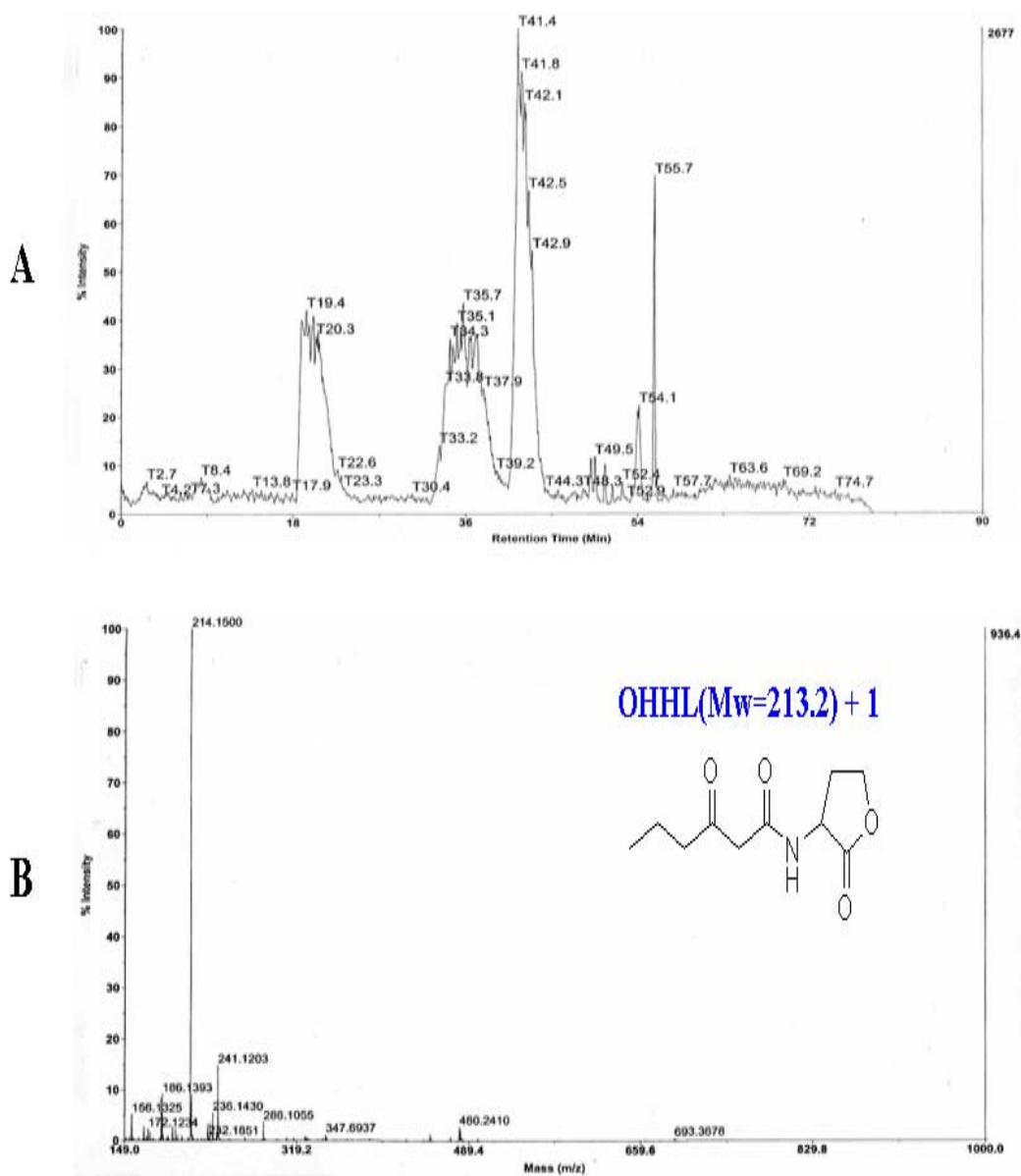


Fig. 3-5. Total ion chromatogram (A) of the LC-MS and spectrum of TOF-MS (B) of the OHHL.

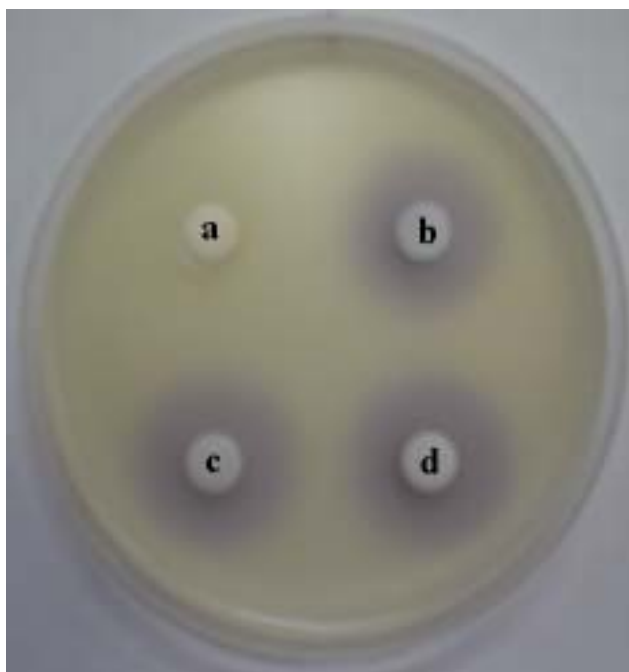


Fig. 3-6. Plate bioassay of AHLs with *C. violaceum* CVO26. a, negative control; b, synthesized HHL; c, positive HHL; d, positive OHHL.

Table 3-1. List of *lux* homologous genes from isolated soft-rot bacteria

Bacterial name	Strain	Genes	Sequence
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	PY35	<i>expI-expR</i>	Fig. 3-7
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	LY34	-	-
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	L101	<i>expI-expR</i>	Fig. 3-8
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	L305	<i>expI-expR</i>	Data not shown
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	L313	<i>expI-expR</i>	Data not shown
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	L307	<i>expI-expR</i>	Data not shown
<i>P. carotavorum</i> subsp. <i>betavascularum</i>	L201	-	-
<i>P. carotavorum</i> subsp. <i>wasabiae</i>	L312	<i>expI-expR</i>	Data not shown
<i>Erwinia herbicola</i>	L317	-	-

Table 3-2. List of *expI* genes from the isolated soft-rot bacteria

Strain	ORF	Amino acids	pI	Mw
<i>Pch</i> PY35	639	212	5.62	24,612
<i>Pcc</i> LY34	-	-	-	-
<i>Pcc</i> L101	651	216	5.36	25,094
<i>Pcc</i> L305	651	216	5.23	25,187
<i>Pcc</i> L313	651	216	5.23	25,166
<i>Pca</i> L307	651	216	5.09	25,069
<i>Pcb</i> L201	-	-	-	-
<i>Pcw</i> L312	654	217	5.05	25,436
<i>Ehe</i> L317	-	-	-	-

Table 3-3. List of *expR* genes from the isolated soft-rot bacteria

Strain	ORF	Amino acids	pI	Mw
<i>Pch</i> PY35	753	250	8.89	28,805
<i>Pcc</i> LY34	-	-	-	-
<i>Pcc</i> L101	726	241	6.59	27,754
<i>Pcc</i> L305	726	241	6.59	27,754
<i>Pcc</i> L313	726	241	7.76	27,750
<i>Pca</i> L307	729	242	8.40	28,073
<i>Pcb</i> L201	-	-	-	-
<i>Pcw</i> L312	735	244	6.06	48,478
<i>Ehe</i> L317	-	-	-	-

```

1 ATGTTAGAAATATTTGATGTGAGTTTTAGCTTAATGTCAAATAACAAGCTGGATGAGGTG
1 M L E I F D V S F S L M S N N K L D E V
61 TTTACACTACGCAAAGGGACATTTAAGGACCGTCTGGACTGGACCGTCAACTGTATTAAC
21 F T L R K G T F K D R L D W T V N C I N
121 GGGATGGAAATTTGACGAGTATGATAATGAACACACCACCTACTTGTAGGTGCAAGGAA
41 G M E F D E Y D N E H T T Y L L G V K E
181 GGGAAAATAATATGTAGTGTGAGATTTATAGAAATGAAATATCCCAACATGATTACTGGC
61 G K I I C S V R F I E M K Y P N M I T G
241 ACGTTTTTTTCTTATTTGACGGTATCAACATCCCGAAGGGAATTACATCGAATCCAGC
81 T F F S Y F D G I N I P E G N Y I E S S
301 CCGTTTTTGTGACCGGATCGGGTGAGAAATTTGATTGGCACCGTAACCCAGCTTGC
101 R F F V D R D R V R N L I G T R N P A C
361 CTGACATTATTTCTTGCCATGATCAATTAAGCCAGAAAATGTCAATTATGACGGGATACTC
121 L T L F L A M I N Y A R K C H Y D G I L
421 ACGATTGTGAGTACCCGATGCTGACCTTGTAAAAAGTTTCAGGCTGGCGCATTTCCATT
141 T I V S H P M L T L L K R S G W R I S I
481 ATTACAGCAGGGTTATCGGAAAAACAGGAGAAAATTTATCTGCTGCATCTGCCCACTGAC
161 I D D G L S E K D E K I Y L L H L P T D
541 GATGAAAGCCGATACCGCTGATCGAGCCATTACACAGATAACCAACGCGAATCCGAG
181 D E S R Y A L I E R I T Q I T N A E S E
* S R A K A P G V P K I L N M E V G L 233
601 CAGCTTACGACCTTGCTTTGCTGGTCCCCTGCTTGTATCAGGTTCAATTCACGCGGA
201 Q L T T L P L L V P L A *
R I A H K A N L V G L K K V V N G I H F 213
661 GCCGGATAGCATGTTTGGCATTACAGCAGCCAGTTTTTTCACAACGTTGCCGATATGAA
K V T S T T I G L I L A I E D Y T K G M 193
721 ATTTTACTGTACTGGTGGTGATAACCGAGAATAAGGCAATCTCCTGATAGGTTTTTCCCA
S A W Y L I E N E R O S F L D A E O L K 173
781 TACTGGCCAGTAGAGAATTTGTTTTCTCTTTGTGAGAAAAGATCGGCTTCTGCAACT
S N N R N R S M E R Y L S T L K E H A S 153
841 TGCTGTTGTTTCTGTTTCTACTCATCTCTGGTACAGAGAGGTGAGTTTTTCATGGCTG
I L L M O L K D K N N O I I E E L E E S 133
901 AAATCAACAACATTTGCAATTTATCTTTATTATTCTGAATAATTTCTTCCAATTTCTGGC
R Y E E I M F S L A A L N N G P D H L V 113
961 TCGGGTATTCTTCAATCATAAAAGACAAGGGCGCCAGATTGTTACCCGGATCGTGCAGCA
F T Y G N V I D Y E K S L N F I R S F K 93
1021 CAAAGGTATAGCCATTAACAATGTGATTTCTTTGGAGAGATTAATATTTCTGGAAAAC
L K S S I V L D D W S F P S I K N I A 73
1081 TCAACTTTGAACGTGATGACCAGATCATCATCCAGGAAAAGGAGAAATCTTGTGATAG
T L I V P D I H O Y N N N R Y I D V W E 53
1141 CCGTCAGAATTACCGGTCAATATGCTGATAGTTATTATTTCTGTAATATCAACCCACT
T P Y N S I I V V D T P K K K N M I L Y 33
1201 CCGTCGGATAATTGGAGATGATCACAACGTCGGTGGTCTTCTTCTGTTTCATGATCAAAT
A Y K P D G Y G K L K R N L Y N O I T S 13
1261 AAGCGTACTTGGGGTCGCCATAGCCTTTTAACTTTCTGTTAAGATAGTTTTGTATTGTGC
N I F D V N S F S I S M 1
1321 TATTGATGAAGTCAACGTTAGAGAATGATATAGACAT

```

Fig. 3-7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *expI* and *expR* from *P. chrysanthemi* PY35. The start codons are underlined and the stop codons are indicated by asterisk.

```

1 ATGTTAGAGATATTTGATGTAATCACACCTTGTTGTCAGAAAACGAAATCAGAAGAGCTA
1 M L E I F D V N H T L L S E T K S E E L
61 TTTACCCCTCAGAAAAGAGAAGCTTTAAAGATCGACTGAATTGGGCCGTGCAATGACTGAT
21 F T L R K E T F K D R L N W A V Q C T D
121 GGAATGGAATTTGATCAGTATGATAATAATAACACGACTTATCTTTTTGGCATCAAAGAT
41 G M E F D Q Y D N N N T T Y L F G I K D
181 AACACCGTTATCTGTAGTTTGAGATTTATTGAAACAAAATACCCTAACATGATTACCGGG
61 N T V I C S L R F I E T K Y P N M I T G
241 ACGTTTTTTCCTTACTTCAAGGAGATAAATATCCCTGAAGGTAATTATCTGGAATCGAGT
81 T F F P Y F K E I N I P E G N Y L E S S
301 AGGTTCTTTGTAGATAAATCACGAGCGAAAGATATTCTCGGTAATGAATACCCAATTAGT
101 R F F V D K S R A K D I L G N E Y P I S
361 TCGATGTTGTTTCTTTTCGATGATTAATTAATCAAGGGACAAAGGTTATGATGGAATATAT
121 S M L F L S M I N Y S R D K G Y D G I Y
421 ACGATAGTGAAGTCAACCCATGCTGACGATATTAACCGCTCTGGCTGGGGAATTCGGGTG
141 T I V S H P M L T I L K R S G W G I R V
481 GTCGAAACAAGTTTGTACAGAAAAGGAAGAAAGAGTCTATTTGGTTTTTCTTCCCGTTGAT
161 V E Q G L S E K E E R V Y L V F L P V D
541 GATGAGAATCAGGAAGCGTTGGCTCGTCTGATTAACCGTAGCGGGACATTTATGAGCAAT
181 D E N Q E A L A R R I N R S G T F M S N
* Q V P K I L Q L 235
601 GAATTGAAGCAGTGGCCCTCAAGGGTACCTGCGCTATTGCACAGGCTTGATGAGCTGTA
201 E L K Q W P L R V P A A I A Q A *
E V G L R I A H K A N L V G L K K V V N 215
661 ACTCAAGCCGAGCCTGATTGTCATGCTTGGCATTCAAGGACGCAAGTTTTTTCACAAGCT
G I H F K V T S T K I G L I I A V E L Y 195
721 TGCCGATATGAAATTTTACCGTACTGGTTTTGATACCGAGAATAATCGCAACTCCAGAT
T K G M S A W Y L I E N G R Q S F I E K 175
781 AGGTTTTACCCATACTGGCCAGTAAAGGATTTTCATTTCCCTGCTGAGAGAATATTCTT
N N L Q K K S E I M E R C L S I I K E Y 155
841 TATTGTTAATGTTTTTTACTTTCAATCATCTCTCTGCAAAGGGAGATGATTTTTTCAT
A D I L L M O F T D K K E E I F T D V D 135
901 ATGCATCAATTAATAGCATCTGAAAGGTGCTTTTTTCTCTCAATGAATGATCAACAT
D P Y S S D V I I S L M A L N D G H D H 115
961 CATCTGGATATGAGCTGTCCACGATAATTGATAGCATAGCCAGATTGTGCCATGATCGT
L V F T Y G N I I N Y K K S L D F I K A 95
1021 GAAGTACAAAAGTATATCCGTTGATAATATTATATTTTTAGAGAGGTCGAATATCTTGG
L Q L R T N I V L S K E W S F P S I K N 75
1081 CAAGCTGTAGTCGTGTGTTAATAACCGACTTTTTCTCCCAAGAGAAAGGCGATATTTTAT
F S A L V V P D I H Q Y K N E K Y L N V 55
1141 TAAATGAGGCAAGAACAACAGGATCAATATGCTGGTATTTGTTTTCTTTGTAGAGGTTAA
W E D P Y S S I I I M E S P N K K N L V 35
1201 CCCATTCATCGGGATAACTGGAAATAATGATCATTTCAGAGGGGTTTTTCTTATTCAAAA
M F S F K I G D Y H D L N E N F H G K I 15
1261 CCATAAATGAGAATTTGATGCCATCGTAGTGATCCAGGTTTTTCATTAATAATGACCTTTGA
V R S I I E S S S F L P S M 1
1321 TTACCCCTGCTTATTATTTGCTGCTGGAGAATAATGGCGACAT

```

Fig. 3-8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *expI* and *expR* from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* L101. The start codons are underlined and the stop codons are indicated by asterisk.

3-5. 신호전달물질 유전자 산물의 상호비교

P. chrysanthemi PY35의 ExpI 단백질 염기서열을 LuxI 계통 단백질과 상호비교를 하였다. *P. chrysanthemi* PY35의 ExpI는 *Vibrio fischeri* ATCC 7744 LuxI (AAA27552)와 11.5%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101 ExpI와는 61.8%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L305 ExpI와는 61.3%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L313 ExpI와는 61.8%, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* L312 ExpI와는 57.5%의 단백질 상동성을 가지고 있었다. 그리고 ExpI homologous protein의 phylogenetic tree를 그린 결과는 Fig. 3-9A와 같다.

P. chrysanthemi PY35 ExpR의 phylogenetic tree를 다른 ExpR과 비교하여 작성 하였다. *P. chrysanthemi* PY35 ExpR는 *V. fischeri* ATCC 7744 LuxR (AAA27551)와 14.7%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101 ExpR와 58.1%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L313 ExpR와 57.7%, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* L30 ExpR와 59.1%, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* L312와는 61.9%의 단백질 상동성을 가지고 있었다. 그리고 ExpR homologous protein의 phylogenetic tree를 그린 결과는 Fig. 3-9B와 같다. *P. chrysanthemi* PY35 ExpR는 다른 ExpR와는 근연관계를 가지고 있었다.

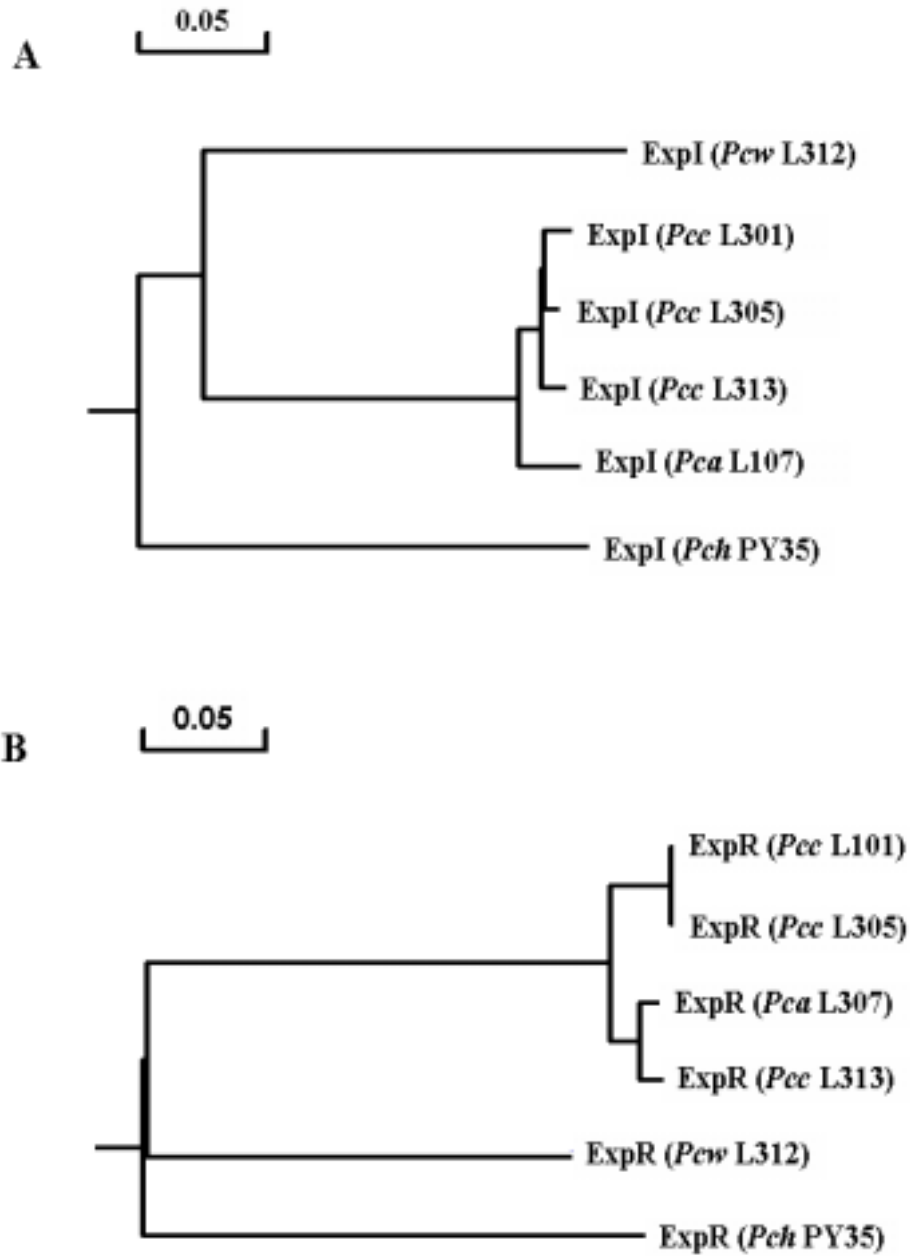


Fig. 3-9. Phylogenetic tree showing the relationship of the ExpI (A) and ExpR (B) amino acids from the isolated soft-rot bacteria.

4. 결론

이전의 실험에서 무름병 증상이 있는 감자로부터 1,000 여종의 cellulase 활성을 가지는 세균을 분리하였으며 이 중에서 활성이 높은 9 균주를 선발하였다. 이들 분리선 정된 무름병균의 여러 가지 특성을 조사하였다. 신호전달물질의 bioassay 확립을 위해 분리 무름병균 중의 하나인 *P. chrysanthemi* PY35를 감자에 접종시켜 감자의 ethyl acetate 추출물을 지시균주인 *C. violaceum* CV026로 bioassay하였다. 이렇게 무름병 감염여부는 bioassay를 통하여 쉽게 관찰되었으며 무름병균들이 quorum-sensing에 관여하는 신호물질을 분비한다는 것을 확인하였다. 무름병균이 생성하는 신호전달물질 분석을 위해 TLC bioassay에서 *P. chrysanthemi* PY35의 ethyl acetate 추출액 혼합액을 전개를 시킨 다음 신호물질을 분리하였다. 추가로 분비되는 이러한 신호물질은 reporter strain인 *C. violaceum* CV026로 처리로 쉽게 육안으로 관찰이 가능하였다. 분리 결과 2종류의 뚜렷한 spot의 육안 관찰이 가능하였으며 Rf는 각각 0.76 및 0.59였다. 정제한 신호물질을 FAB mass spectrum로 분석한 결과 몇몇의 [M+H] peak를 보여 주었다. MALDI-TOF mass 분석 결과 HHL와 OHHL에 해당하는 것으로 병원성에 관여하는 신호전달물질로 판명되었다. 신호전달물질 유전자 클로닝을 위해 *lux* homologous gene를 바탕으로 degenerate primer를 사용하여 1.8 kb의 완전한 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하였다. 신호전달 유전자 구조를 분석하고 분리한 유전자를 *exp*로 명명하였으며 *P. chrysanthemi* PY35의 *expI* (*luxI* homologous)는 639 bp이며 212 amino acid를 암호화하였으며 predicted molecular mass는 24,612 Da이었다. ExpI의 calculated pI는 5.62였다. 또한 *P. chrysanthemi* PY35의 *expR* (*luxR* homologous)는 753 bp이며 250 amino acid를 암호화하며 predicted molecular mass는 28,805 Da이었다. ExpR의 calculated pI는 2.2였다. 다른 분리 무름병균의 *lux* homologous gene도 분석하였다. 신호전달물질 유전자산물의 상호비교 실험으로 *P. chrysanthemi* PY35의 ExpI 단백질 염기서열을 *Vibrio fischeri* ATCC 7744 LuxI (AAA27552)와 11.5%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101 ExpI와는 61.8%의 단백질 상동성을 가지고 있었으며 *P. chrysanthemi* PY35 ExpR는 *V. fischeri* ATCC 7744 LuxR (AAA27551)와 14.7%, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* L101 ExpR와 58.1%의 단백질 상동성을 가지고 있었다.

이러한 실험결과를 바탕으로 이후 실험에서 병원성에 관여하는 신호전달물질 분해를 위한 전략을 수립하는 기초를 마련할 수 있었다.

제 4 절 무름병 신호전달물질 분해 유전자 분리 식물형질 전환 벡터 구축

1. 서론

무름병 신호전달물질 분해 유전자 분리와 식물 형질전환 벡터 구축을 위해 인삼 뿌리 내부, 토양 및 식물에서 미생물을 분리하였으며 분리균의 형태적 특징도 조사하였다. 무름병 신호전달물질 분해균을 신속히 선별하기 위해 bioassay법을 확립하였다. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자 클로닝을 위해서는 AHLase homologues로부터 degenerate oligonucleotide primer를 제작하여 클로닝하였다. 초기 DNA 염기서열을 바탕으로 primer walking 방법을 통하여 upstream 및 downstream의 unknown region을 확인하였다. 완전한 open reading frame이 확인된 후 specific primer로 증폭한 후 클로닝하였다. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 발현을 위해 His tagging expression vector를 사용하였으며 이들의 유전자산물 생성 및 정제를 거쳐 유용 유전자를 확인하였다. 유용성 확인 후 본 연구의 최종목표인 무름병저항성 형질 전환감자 개발을 위한 벡터를 구축하였다. 그 방법으로는 식물형질전환 binary vector 인 pCAMBIA1301와 pCAMBIA1302을 사용하여 클로닝하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 무름병 신호전달물질 분해 미생물 분리 및 선별

무름병균에 저항성을 나타내거나, 무름병 병원성 인자를 분해하는 균주의 식품 안정성을 위하여 인삼재배지역인 강화, 금산, 진안지역의 인삼 뿌리 내부, 토양 및 식물에서 미생물을 분리하였다. N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL)을 함유한 LB 배지에서 28℃에서 배양하여 순수분리하였다. 배양 상등액을 paper discs (dia. 0.8 cm, Toyo Roshi Kaisha, Japan)에 분취하고 agar (0.8%), *C. violaceum* CV026, HHL 함유한 soft agar 표면에 옮겼다. Overnight 배양 후 paper disc 주위에 나타나는 purple color를 배경으로 하여 나타나는 환을 띠는 것을 선별하였다.

2-2. 분리균의 형태적 특징

분리균의 형태적 특징은 광학현미경 (Axiostar, ZEISS)에서 관찰하였으며 1% phosphotungstic acid을 사용한 Gram-staining 검경 및 transmission electron microscope (JEM 1010, Jeol)을 사용하였다.

2-3. 무름병 병원성 신호물질분해 측정

분리선정한 무름병 신호전달물질 분해 미생물을 함유한 LB 배지, 28°C에서 배양한 후 배양 상등액과 동량의 50 µM N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL)을 paper discs (dia. 0.8 cm, Toyo Roshi Kaisha, Japan)에 분취하고 *C. violaceum* CV026을 함유한 soft agar (0.8%) 표면에 옮겼다. Overnight 배양 후 paper disc 주위에 나타나는 purple color를 배경으로 하여 나타나는 환의 생성 여부를 확인하여 무름병 병원성 신호물질분해 정도를 측정하였다.

2-4. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 클로닝

무름병 병원성 신호물질 분해 유전자 클로닝을 위해 세균 게놈 DNA에서 AHLase homologues로부터 degenerate oligonucleotide primer 5'-CAC YTR CAT YTT GAY CAY GC-3' (sense) 및 5'-ATC RAA TCC HGA VRA YGG C-3' (antisense)를 제작하여 클로닝하였다. 예상 DNA fragment는 300 bp였다. PCR 증폭 [soft-rot bacteria genomic DNA, Super-Therm DNA polymerase (JMR, Side Cup, Kent, UK) under 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 50°C for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec] 후 약 300 bp의 DNA 단편을 얻었다. 이 단편을 염기서열분석 BLAST search를 통하여 확인하였다. 이러한 초기 DNA 염기서열을 바탕으로 primer walking 방법을 통하여 upstream 및 downstream의 unknown region을 확인하였다. 완전한 open reading frame이 확인된 후 specific primer로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후 확인하였다.

2-5. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 발현

무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 ORF는 EPF, 5'-TCA TAT GAC AGT AAA GAA GCT TT-3' 및 EPR, 5'-AAA GCT TTA TAT ATT CAG GGA TC-3' (the *NdeI* and *HindIII* sites are underlined)를 이용하여 증폭하였으며 증폭 후 *E. coli* BL21 (DE3)를 host strain으로 하여 *NdeI*, *HindIII*로 절단한 다음 6× His tagging expression vector pET22b(+) (Novagen)의 *NdeI*와 *HindIII* 부위에 subcloning하였다.

2-6. 무름병 병원성 신호물질분해효소의 발현과 정제

재조합 DNA *qqe*를 함유한 *E. coli* cell을 30°C에서 IPTG induction한 후 4시간 배양하였다. SDS-PAGE 분석을 위해 세포를 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)에서 sonication한 다음 단백질을 전기영동하였다. IPTG-induced recombinant cells의 AHL-degrading activity는 상기 언급한 bioassay 방법에 의해 분석하였다. pET22-*qqe*를 함유한 *E. coli* strain BL21 (DE3)을 50 µg/ml ampicillin 함유 LB 배지에서 37°C, mid-log phase까지 배양하였다. 발현은 최종농도 0.5 mM IPTG로 유도하였으며 6시간 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리 (6,000 g for 10 min)하였다. 수용성 His-tag을 가진 recombinant Qqe를 HisTrap kit (Amersham)에 분취하였다. 100 mM imidazole 용액으로 Qqe를 elution하였다. 효소액을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)으로 분석하였다. Active fraction을 분획하여 다시 ion exchange chromatography on a Q-Sepharose column (Pharmacia)로 정제하였다. 최종 정제단계로 투석된 시료를 anion exchange Mono Q HR (Pharmacia) column (pre-equilibrated with 20 mM MOPS buffer, pH 6.5.)에 loading하였다. Qqe 활성을 가진 fraction을 single protein peak로 하여 SDS-PAGE에 의해 순도를 검정하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법에 준하였다.

2-7. 무름병 저항성 감자형질전환용 벡터 구축

감자의 형질전환실험은 *gusA* (pCAMBIA1301) gene과 *gfp* (pCAMBIA1302) gene, CaMV35S promoter, hygromycin에 저항성을 갖는 hygromycin phosphotransferase (*hptII*) gene을 가지는 binary vector pCAMBIA1301과 pCAMBIA1302를 기본벡터를

사용하였다. 상기 실험의 *Bacillus* sp. GK02에서 분리한 0.65 kb의 *qge* 유전자가 확인되었다. 이 유전자를 클로닝하기 위해 먼저 중간단계 클로닝을 위해 pBIN35S도 사용하였다. Binary vector는 sense orientation으로 구축하여 electroporation (Gene Pulser II Electroporator, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법으로 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다. 이 때 *A. tumefaciens*은 형질전환 전에 YEP medium에 overnight 배양하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 무름병 신호전달물질 분해 미생물 분리 및 선별

인삼, 토양 및 식물 시료로부터 상이한 콜로니 형태를 가진 미생물을 분리하였다. 특히 강화, 금산, 진안 3지역에서 분리한 인삼내생균의 균 다양성 분석을 위한 16S rDNA 유사성 분석 결과는 Table 4-1과 같다. 이들 분리균들의 cell-wall-degradation enzymatic activity는 Table 4-2, *Rhizoctonia solani*에 대한 anti-fungal activity와 hemolytic activity는 Table 4-3과 같다. Fig. 4-1는 지역별 인삼내생균의 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통도 분석결과이고 Fig. 4-1A는 강화인삼뿌리에서 분리한 내생균 계통도이며 Fig. 4-4B는 금산인삼뿌리에서 분리한 내생균 계통도이며 Fig. 4-4C는 진안인삼뿌리에서 분리한 내생균 계통도이다. 특히 인삼내생균에는 다양한 세균이 분포되어 있었는데 특히 무름성과 관련이 되어 있는 식물 세포벽분해효소를 분비하는 다수의 세균이 분포되어 있었다. 또한 이들 특성은 토양에 잔존하여 있던 세균들이 식물세포벽 내부로 침투시 필요한 기능일수도 있을 것이다. 주목할 만한 사실은 인삼 내생균 중에는 항균성물질을 분비하는 세균도 분포하고 있었는데 무름병 관련 세균과 항균성 물질세균의 공존은 기주식물의 병 발생을 조절하는데 관련이 있을 것으로 추정된다. 특히 산삼과 같이 장시간 인삼뿌리가 토양에 노출되어 수십 내지 수백년을 견딜 수 있는 것은 이러한 내생세균의 작용과 관련이 있을 것으로 추정되며 향후 이러한 연구의 필요성이 있다. 특히 인삼내생균을 이용한 무름병저항성 유전자 분리시 식품에 내생하는 미생물을 사용함으로써 향후 식품의 안정성 문제에 유리할 것으로 사료된다.

따라서 1차 분리균주를 대상으로 재료 및 방법에 기술한 대로 HHL를 함유한 배지에서 2차 선별하였다. 이 중 16 균주가 HHL 함유 최소배지에서 생육이 가능하였다. 이들 분리균주를 LB 배지에서 2일간 배양 후 배양액을 paper disc 상에 분취하였다. 그 다음 agar (0.8%), *C. violaceum* CV026, HHL 함유 배지 표면에 옮겼다. 다시

overnight 배양 후 육안으로 생성되는 환의 유무를 관찰하였다 (Fig. 4-2). Table 4-4은 AHL-degrading bacteria의 목록이다. 이들의 16S rDNA 분석 결과 *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *Arthrobacter nicotianae*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* (Table 4-4)로 동정되었다.

3-2. 무름병 신호전달물질 분해 미생물의 발병 억제 실험

분리선정균의 무름병 신호전달물질 분해 미생물의 발병억제실험을 위해 즉, quorum-quenching activity 유무를 조사하기 위해 무름병균 *P. chrysanthemi* PY35를 인삼내생세균인 *Bacillus* sp. GK02과 단독 및 혼합처리하여 병 발생 정도를 관찰하였다. 이 세균의 특징은 Gram-positive, rod-shaped로 길이가 약 3-4 μm 정도였으며 생육적온 28 $^{\circ}\text{C}$ 였다 (Fig. 4-4). *P. chrysanthemi* PY35를 감자절편에 단독 접종하였을 때는 병이 발생하였으나 *Bacillus* sp. GK02와 혼합처리하였을 때는 병징이 잘 나타나지 않았다 (Fig. 4-3). 이러한 결과는 분리한 무름병 신호전달물질 분해 미생물이 무름병균 *P. chrysanthemi* PY35가 감자의 감염과정에서 분비하는 병원성 신호전달물질을 분해함으로써 병 발생 촉진기작인 quorum sensing 기작을 억제시키므로 병을 유발하지 않는 것으로 추정된다.

Table 4-1. Similarity values of 16S rDNA sequences retrieved from the interior of ginseng roots (Ganghwa, GeumSan and Jinan).

Group	Isolates	Phylum	Closest relativespecies in the 16S rDNA sequence database (Accession NO ^c)	Similarity (%)
GangHwa				
GH I	GH1, GH7, GH13	HGCGPB ^a	<i>Arthrobacter</i> sp. AN4 (AJ551144)	98
GH II	GH2, GH18	LGCGPB ^b	<i>Bacillus</i> sp. FP1/2002 (AY124766)	99
GH III	GH3, GH16	LGCGPB	<i>Bacillus sphaericus</i> 205y (AF435435)	99
GH IV	GH4, GH11, GH20	HGCGPB	<i>Kocuria carniphila</i> CCM132T (AJ622907)	98
GH V	GH5, GH9	Proteobacteria	<i>Rahnella</i> sp. 3 (U90758)	99
GH VI	GH6, GH14, GH17	HGCGPB	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM13468 (AJ277840)	98
GH VII	GH8	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3 (AY247063)	99
GH VIII	GH10, GH19	HGCGPB	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM20419 (X77440)	99
GH IX	GH12, GH21	LGCGPB	<i>Bacillus megaterium</i> OM-B1551 (AF142677)	99
GH X	GH21	LGCGPB	<i>Bacillus</i> sp. R-6782 (AY422984)	99
GeumSan				
GS I	GS1	LGCGPB	<i>Paneibacillus polymyxa</i> DSM36T (AJ320493)	99
GS II	GS2, GS10	HGCGPB	Uncultured soil bacterium clone 1245 (AF423215)	99
GS III	GS3, GS6, GS9	LGCGPB	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 (AE017013)	99
GS IV	GS4, GS18	Proteobacteria	<i>Erwinia persicinus</i> LMG11254 (Z96086)	99
GS V	GS5	LGCGPB	<i>Bacillus</i> sp. KSM-P358 (AB073167)	99
GS VI	GS7, GS15	LGCGPB	<i>Bacillus</i> sp. Bch1 (AF411118)	99
GS VII	GS8	LGCGPB	<i>Bacillus megaterium</i> KL-197 (AY030338)	99
GS VIII	GS11, GS17	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3 (AY247063)	99
GS IX	GS12, GS20	Proteobacteria	<i>Unidentified bacteria</i> (AB004762)	99
GS X	GS13, GS21	Proteobacteria	<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540 (AJ233433)	99
GS XI	GS14, GS19	LGCGPB	<i>Bacillus flexus</i> (AB021185)	99
GS XII	GS16, GS22	HGCGPB	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM20419 (X77440)	99
JinAn				
JA I	JA1, GS14, GS15	Proteobacteria	<i>Pseudomonas poae</i> DSM14936T (AJ492829)	99
JA II	JA2, GS7	LGCGPB	<i>Bacillus cereus</i> G9667 (AY138273)	99
JA III	JA3, GS18	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3 (AY247063)	99
JA IV	JA5, GS12	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20106 (AF364844)	99
JA V	JA6	Proteobacteria	<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540 (AJ233433)	98
JA VI	JA8, GS17	HGCGPB	<i>Kocuria</i> sp. oral clone AW006 (AF385532)	98
JA VII	JA9, GS11, GS19	Proteobacteria	<i>Pantoea agglomerans</i> LMG2565 (AF373196)	99
JA VIII	JA10, GS14	LGCGPB	<i>Bacillus</i> sp. Bchl (AF411118)	99
JA IX	JA16	LGCGPB	<i>Bacillus</i> sp. FP1/2002 (AY124766)	99
JA X	JA20	Proteobacteria	<i>Pectobacterium crotovora</i> LMG2466 (Z96091)	99
JA XI	JA21	Proteobacteria	<i>Unidentified bacteria</i> (AB004762)	99

^aHGCGPB: high G+C Gram-negative bacteria (Actinobacteria)

^bLGCGPB: low G+C Gram-positive bacteria (Firmicutes)

^cAccession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

Table 4-2. Identification of cell-wall-degradation enzymatic activity by ginseng endophytic bacteria (Ganghwa, Geumsan and Jinan).

Group	Closest relative species in the 16S rDNA sequence database (Accession NO)	ASPM ^a		CDEA ^b			
		AFA	HEA	Cel	Xyl	Pel	Prt
GangHwa							
GH I	<i>Arthrobacter</i> sp. AN4 (AJ551144)	- ^c	-	-	-	-	+
GH II	<i>Bacillus</i> sp. FP1/2002 (AY124766)	++	+	+	-	-	++
GH III	<i>Bacillus sphaericus</i> 205y (AF435435)	-	-	-	-	-	-
GH IV	<i>Kocuria carniphila</i> CCM132T (AJ622907)	-	-	-	-	-	+
GH V	<i>Rahnella</i> sp. 3 (U90758)	-	-	-	-	-	-
GH VI	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM13468 (AJ277840)	-	-	-	-	-	-
GH VII	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3 (AY247063)	+	-	-	-	-	+
GH VIII	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM20419 (X77440)	-	-	-	-	-	-
GH IX	<i>Bacillus megaterium</i> OM-B1551 (AF142677)	+	+	-	-	-	+
GH X	<i>Bacillus</i> sp. R-6782 (AY422984)	-	-	-	-	-	+
GeumSan							
GS I	<i>Paneibacillus polymyxa</i> DSM36T (AJ320493)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GS II	Uncultured soil bacterium clone 1245 (AF423215)	-	-	-	-	-	-
GS III	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 (AE017013)	++	+	+	-	-	+
GS IV	<i>Erwinia persicinus</i> LMG11254 (Z96086)	-	-	-	-	-	-
GS V	<i>Bacillus</i> sp. KSM-P358 (AB073167)	-	-	-	-	-	-
GS VI	<i>Bacillus</i> sp. Bchl (AF411118)	+++	++	++	++	++	+++
GS VII	<i>Bacillus megaterium</i> KL-197 (AY030338)	-	-	-	-	-	+
GS VIII	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3 (AY247063)	++	-	-	-	-	+
GS IX	Unidentified bacteria (AB004762)	-	-	-	-	-	-
GS X	<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540 (AJ233433)	-	-	-	-	-	+
GS XI	<i>Bacillus flexus</i> (AB021185)	+	+	+	-	-	+
GS XII	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM20419 (X77440)	-	-	-	-	-	-
JinAn							
JA I	<i>Pseudomonas poae</i> DSM14936T (AJ492829)	+++	+	-	-	-	++
JA II	<i>Bacillus cereus</i> G9667 (AY138273)	++	+	+	-	-	++
JA III	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3 (AY247063)	+	-	-	-	-	+
JA IV	<i>Pantoea ananatis</i> LMG20106 (AF364844)	-	-	-	-	-	-
JA V	<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540 (AJ233433)	-	-	-	-	-	-
JA VI	<i>Kocuria</i> sp. oral clone AW006 (AF385532)	-	-	-	-	-	+
JA VII	<i>Pantoea agglomerans</i> LMG2565 (AF373196)	-	-	-	-	-	-
JA VIII	<i>Bacillus</i> sp. Bchl (AF411118)	++	+	++	++	+	+++
JA IX	<i>Bacillus</i> sp. FP1/2002 (AY124766)	+	+	-	-	-	+
JA X	<i>Pectobacterium crotovora</i> LMG2466 (Z96091)	-	-	++	+	+	+
JA XI	Unidentified bacteria (AB004762)	-	-	-	-	-	-

^aASPM, Antifungal substances produced by microorganisms: AF, Antifungal activity; HE, Hemolytic activity

^bCDEA, Cell-wall-degradation enzymatic activity: Amy, Amylase; Cel, Cellulase; Xyl, Xylanase; Pel, Pectinase; Prt, Protease

^cSymbols: -, +, ++, +++ indicate no, presence, moderate and strong activity, respectively

Table 4-3. *In vitro* inhibitory activity against root pathogens by ginseng endophytic bacteria (Ganghwa, Geumsan and Jinan) a

Isolates	Closest relative species in the 16S rDNA sequence database	<i>Rhizoctonia solnai</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phythium ultimum</i>	<i>Phytophthora capsica</i>
GH2	<i>Bacillus</i> sp. FP1/2002	14.8	12.2	8.0 ^b	8.0
GH8	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3	11.0	11.9	8.2	9.6
GH12	<i>Bacillus megaterium</i> OM-B1551	10.7	11.4	8.0	8.0
GS1	<i>Paneibacillus polymyxa</i> DSM36T	17.5	17.2	14.8	13.2
GS3	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14567	15.1	15.3	11.0	8.0
GS7	<i>Bacillus</i> sp. Bch1	17.9	17.6	13.2	8.4
GS11	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3	11.8	9.6	8.0	8.6
GS14	<i>Bacillus flexus</i>	12.4	12.0	8.0	8.0
JA1	<i>Pseudomonas poae</i>	16.9	13.2	12.5	8.8
JA2	<i>Bacillus cereus</i> G9667	14.9	14.8	10.6	8.0
JA3	<i>Pseudomonas</i> sp. AEBL3	11.4	12.0	8.8	8.5
JA10	<i>Bacillus</i> sp. Bch1	14.5	14.8	12.3	8.0
JA16	<i>Bacillus</i> sp. FP1/2002	11.7	12.0	8.6	8.0

^aThe antifungal activity was estimated by measuring the diameter of the clear zone (including paper disks, 8mm diameter) of growth inhibition.

^bEight (8.0) means only paper disk diameter.

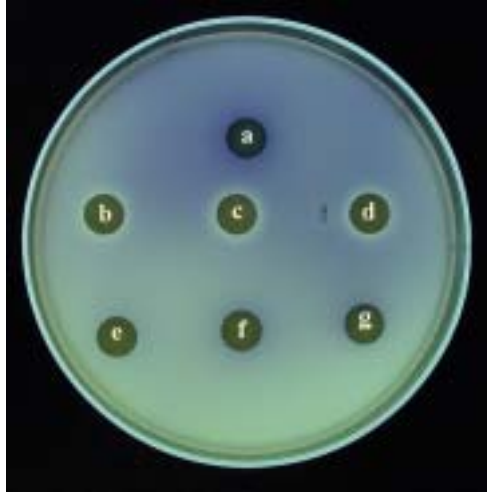


Fig. 4-2. HHL-degrading activity of various isolated species from soils and plants. Top agar (0.8%) contained *C. violaceum* CV026 and HHL.

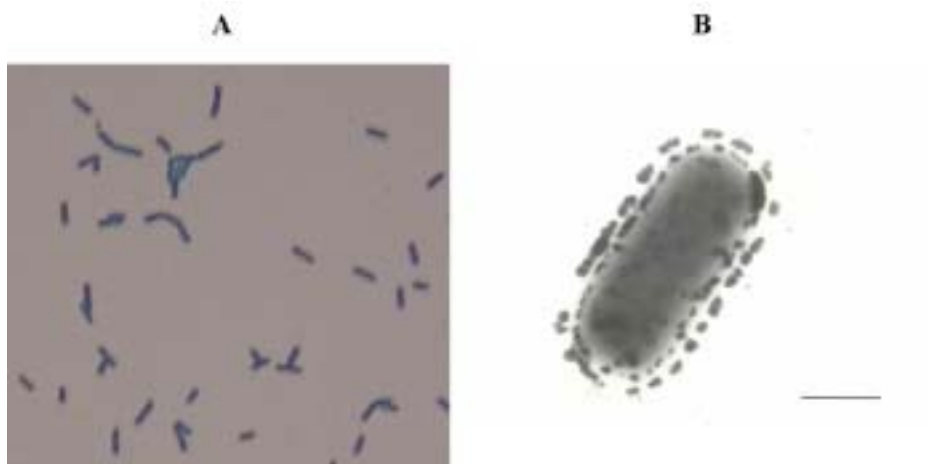


Fig. 4-3. Microscopy of *Bacillus* sp. GK02 isolated from ginseng interior. A, Optical micrograph after Gram-staining; B, Transmission electron micrograph. Scale bar = 1 μ m.

Table 4-4. List of the isolated quorum- quenching strains

Bacterial name	Strain	Source	16S rDNA
<i>Bacillus cereus</i>	SB09	Soil	Data not shown
<i>Bacillus cereus</i>	SB10	Soil	Fig. 4-6
<i>Bacillus cereus</i>	SB12	Soil	Fig. 4-7
<i>Bacillus anthracis</i>	SB16	Soil	Fig. 4-8
<i>Bacillus thuringiensis</i>	SB17	Soil	Fig. 4-9
<i>Bacillus cereus</i>	SB19	Soil	Data not shown
<i>Bacillus cereus</i>	PB29	Plant	Data not shown
<i>Bacillus cereus</i>	PB30	Plant	Data not shown
<i>Bacillus cereus</i>	PB35	Plant	Data not shown
<i>Bacillus cereus</i>	PB37	Plant	Data not shown
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	GK01	Ginseng	Data not shown
<i>Bacillus thuringiensis</i>	GK02	Ginseng	Fig. 4-5
<i>Bacillus cereus</i>	GG03	Ginseng	Data not shown
<i>Bacillus cereus</i>	GJ02	Ginseng	Data not shown
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	SB25	Soil	Data not shown
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	SB28	Soil	Data not shown

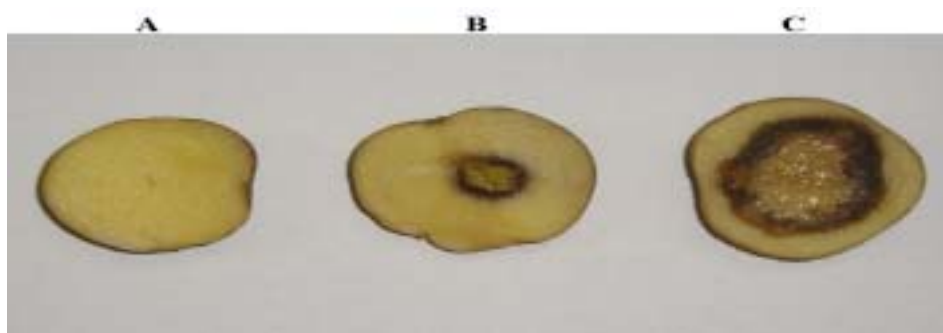


Fig. 4-4. Soft-rot symptoms after treatment with *Bacillus* sp. GK02. A, The slice was inoculated with 2 μl *Bacillus* sp. GK02; B, *Bacillus* sp. GK02 and *P. chrysanthemi* PY35 were mixed treatment; C, *P. chrysanthemi* PY35 infection on potato slice. Inoculation suspension containing cells to 1×10^6 CFU and 48 h incubation.

1 TTTACTCGAG AGTTTGATCC TGCCTCAGGA TGAACGCTGG CCGCGTGCCT AATACATGCA
61 AGTOGAGCGA ATGGATTAAG AGCTTGCTCT TATGAAGTTA GCGGGGACG GGTGAGTAAC
121 ACGTGGGTAA OCTGCCATA AACTGGGAT AACTCCGGGA AACCGGGGCT AATACCGGAT
181 AACATTTTGA ACTGCATGGT TCGAAATTGA AAGGGGGCTT CCGCTGTAC TTATGGATGG
241 ACCCGCGTCG CATTAGCTAG TTGGTGAGGT AACGGCTCAC CAAGGCAACG ATCGGTAGCC
301 GACCTGAGAG GGTGATCGGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG
361 CAGCAGTAGG GAATCTTCCG CAATGGACGA AAGTCTGACG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA
421 TGAAGGCTTT CCGGTCGTAA AACTCTGTTG TTAGGGAAGA ACAAGTGCTA GTTGAATAAG
481 CTGGCACCTT GACGGTACCT AACGAGAAAG CCAAGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGGG
541 TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATCGGGCG TAAAGCGCGC GCAGGTGGTT
601 TCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC AACCGTGGAG GGTCAATTGA AACTGGGAGA
661 CTTGAGTGCA GAAGAGGAAA GTGGAATTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATATG
721 GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT GGTCTGTAAC TGACACTGAG GCGCGAAAAGC
781 GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT GAGTGCTAAG
841 TGTTAGAGGG TTTCGGCCCT TTAGTGCTGA AGTTAACGCA TTAAGCACTC CCGCTGGGGA
901 GTACGGCCGC AAGGCTGAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCGCACAAG CCGTGGAGCA
961 TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC TCTGAAAACC
1021 CTAGAGATAG GGCTTCTCCT TCGGGAGCAG AGTGACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC
1081 TCGTGTGCTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCCTGAT CTTAGTTGCC
1141 ATCATTAAAGT TGGGCACTCT AAGGTGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG
1201 ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTATGACCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGACGGTACA
1261 AAGAGCTGCA AGACCGGAG GTGGAGCTAA CCTCATAAAA CCGTTCTCAG TTCGGATTGT
1321 AGGCTGCAAC TCGCTACAT GAAGCTGGAA TCGCTAGTAA TCGGGATCA GCATGCC

Fig. 4-5. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Bacillus* sp. GK02.

1 OGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGGGGGG TGCCTAATAC ATGCAAGTGG
61 AGCGAATGGA TTAAGAGCTT GCTCTTATGA AGTTAGCGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG
121 GGTAACCTGC CCATAAGACT GGGATAACTC CGGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATAACAT
181 TTTGAACCGC ATGGTTGAA ATTGAAAGGC GGCTTGGGCT GTCAC TTATG GATGGACCCG
241 CGTCGCATTA GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CAACGATGG TAGCCGACCT
301 GAGAGGGTGA TGGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
361 GTAGGGAATC TTCCGCAATG GACGAAAGTC TGACGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGATGAAG
421 GCTTTCGGGT CGTAAAAC TC TTGTTAGG GAAGAACAAG TGCTAGTTGA ATAAGCTGGC
481 ACCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA
541 CGTAGGTGGC AAGCGTTATC CGGAATTATT GGGCGTAAAG CGCGCGCAGG TGGTTTCTTA
601 AGTCTGATGT GAAAGCCAC GCTCAACCG TGGAGGGTCA TTGGAAACTG GGAGACTTGA
661 GTGCAGAAGA GGAAAGTGA ATTCCATGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATATGGAGGA
721 ACACCAGTGG CGAAGGGAC TTTCTGGTCT GTAAC TGACA CTGAGGGCG AAAGCGTGGG
781 GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA
841 GAGGGTTTCC GCCCTTAGT GCTGAAGTTA ACGCATTAG CACTCCGCT GGGGAGTACG
901 GCCGCAAGGC TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG
961 TTTAATTGGA AGCAACGGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA AAACCCTAGA
1021 GATAGGGCTT CTCCTTGGG AGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTG TCAGCTCGTG
1081 TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACC TTGATCTTAG TTGCCATCAT
1141 TAAGTTGGGC ACTCTAAGGT GACTGCCGGT GACAAACCG AGGAAGGTGG GGATGACGTC
1201 AAATCATCAT GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGACG GTACAAAGAG
1261 CTGCAAGACC GCGAGGTGGA GCTAATCTCA TAAAACCGTT CTCAGTTCCG ATTGTAGGCT
1321 GCAACTCGCC TACATGAAGC TGGAAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA
1381 TAOGTTCCCG GGCCTGTAC ACAACGGCCG TCACACCAAG AGAGTTTGTA ACACCCGAAG
1441 TCGGTGGGGT AACCTTTTTG GAGCCAGCCG CCTAAGGTGG GACAGATGAT TGGGGTGAAG
1501 TCGTAACAAG GTAGCCGTA

Fig. 4-6. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Bacillus* sp. SB10.

1 OGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGGGGGG TGCCTAATAC ATGCAAGTGG
61 AGCGAATGGA TTAAGAGCTT GCTCTTATGA AGTTAGCGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG
121 GGTAACCTGC CCATAAGACT GGGATAACTC CGGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATAACAT
181 TTTGAACCGC ATGGTTGAA ATTGAAAGGC GGCTTGGGCT GTCAC TTATG GATGGACCCG
241 CGTCGCATTA GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CAACGATGG TAGCCGACCT
301 GAGAGGGTGA TGGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
361 GTAGGGAATC TTCGGCAATG GACGAAAGTC TGACGGAGCA ACGCCGGGTG AGTGATGAAG
421 GCTTTCGGGT CGTAAAAC TC TTTGTTAGG GAAGAACAAG TGCTAGTTGA ATAAGTGGC
481 ACCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTGATA
541 CGTAGGTGGC AAGCGTTATC CGGAATTATT GGGCGTAAAG CGCGCGCAGG TGGTTTCTTA
601 AGTCTGATGT GAAAGCCAC GGTCAACCG TGGAGGGTCA TTGGAAACTG GGAGACTTGA
661 GTGCAGAAGA GGAAAGTGA ATTCCATGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATATGGAGGA
721 ACACCAGTGG CGAAGGGAC TTTCTGGTCT GTAAC TGACA CTGAGGGCG AAAGCGTGG
781 GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA
841 GAGGGTTTCC GCCCTTAGT GCTGAAGTTA ACGCATTAG CACTCCGCT GGGGAGTACG
901 GCCGCAAGGC TGAAACTCAA AAGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG
961 TTTAATTGGA AGCAACGGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA AAACCCTAGA
1021 GATAGGGCTT CTCCTTGGG AGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTG TCAGCTGTG
1081 TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACC TTGATCTTAG TTGCCATCAT
1141 TAAGTTGGGC ACTCTAAGGT GACTGCCGGT GACAAACCG AGGAAGGTGG GGATGACGTC
1201 AAATCATCAT GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGACG GTACAAAGAG
1261 CTGCAAGACC GCGAGGTGGA GCTAATCTCA TAAAACCGTT CTCAGTTGG ATTGTAGGCT
1321 GCAACTCGCC TACATGAAGC TGGAAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA
1381 TAOGTTCCCG GGCCTGTAC ACAACGGCCG TCACACCAAG AGAGTTTGTA ACACCCGAAG
1441 TCGGTGGGGT AACCTTTTTG GAGCCAGCCG CCTAAGGTGG GACAGATGAT TGGGGTGAAG
1501 TCGTAAACAG GTAGCCGTA

Fig. 4-7. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Bacillus* sp. SB12.

1 OGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGGGGGG TGCCTAATAC ATGCAAGTGG
61 AGCGAATGGA TTAAGAGCTT GCTCTTATGA AGTTAGCGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG
121 GGTAACCTGC CCATAAGACT GGGATAACTC CGGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATAACAT
181 TTTGAACCGC ATGGTTGAA ATTGAAAGGC GGCTTGGGCT GTCAC TTATG GATGGACCCG
241 CGTCGCATTA GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CAACGATGG TAGCCGACCT
301 GAGAGGGTGA TGGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
361 GTAGGGAATC TTCGGCAATG GACGAAAGTC TGACGGAGCA ACGCCGGGTG AGTGATGAAG
421 GCTTTCGGGT CGTAAAAC TC TTTGTTAGG GAAGAACAAG TGCTAGTTGA ATAAGCTGGA
481 ACCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA
541 CGTAGGTGGC AAGCGTTATC CGGAATTATT GGGCGTAAAG CGCGCGCAGG TGGTTTCTTA
601 AGTCTGATGT GAAAGCCAC GCTCAACCG TGGAGGGTCA TTGGAAACTG GGAGACTTGA
661 GTGCAGAAGA GGAAAGTGA ATTCCATGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATATGGAGGA
721 ACACCAGTGG CGAAGGGAC TTTCTGGTCT GTAAC TGACA CTGAGGGCG AAAGCGTGGG
781 GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA
841 GAGGGTTTCC GCCCTTAGT GCTGAAGTTA ACGCATTAG CACTCCGCT GGGGAGTACG
901 GCCGCAAGGC TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG
961 TTTAATTGGA AGCAACGGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA CAACCCTAGA
1021 GATAGGGCTT CTCCTTGGG AGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTG TCAGCTCGTG
1081 TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACC TTGATCTTAG TTGCCATCAT
1141 TTAGTTGGGC ACTCTAAGGT GACTGCCGGT GACAAACCG AGGAAGGTGG GGATGACGTC
1201 AAATCATCAT GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGACG GTACAAAGAG
1261 CTGCAAGACC GCGAGGTGGA GCTAATCTCA TAAAACCGTT CTCAGTTGG ATTGTAGGCT
1321 GCAACTCGCC TACATGAAGC TGGAAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA
1381 TAGTTCCCG GGCCTGTAC ACAACGCCC TCACACCAAG AGAGTTTGTA ACACCCGAAG
1441 TCGGTGGGGT AACCTTTTTG GAGCCAGCCG CCTAAGGTGG GACAGATGAT TGGGGTGAAG
1501 TCGTAACAAG GTAGCCGTA

Fig. 4-8. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Bacillus* sp. SB16.

1 OGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGGGGGG TGCCTAATAC ATGCAAGTGG
61 AGCGAATGGA TTAAGAGCTT GCTCTTATGA AGTTAGCGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG
121 GGTAACCTGC CCATAAGACT GGGATAACTC CGGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATAACAT
181 TTTGAACTGC ATGGTTGAA ATTGAAAGGC GGCTTGGGCT GTCAC TTATG GATGGACCCG
241 CGTCGCATTA GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CAACGATGGG TAGCCGACCT
301 GAGAGGGTGA TGGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACA GGAGGCAGCA
361 GTAGGGAATC TTCCGCAATG GACGAAAGTC TGACGGAGCA ACGCCGGGTG AGTGATGAAG
421 GCTTTCGGGT CGTAAAAC TC TTTGTTAGG GAAGAACAAG TGCTAGTTGA ATAAGCTGGC
481 ACCTTGACGG TACCTAACCA GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA
541 CGTAGGTGGC AAGCGTTATC CGGAATTATT GGGCGTAAAG CGCGCGCAGG TGGTTTCTTA
601 AGTCTGATGT GAAAGCCAC GCTCAACCG TGGAGGGTCA TTGGAAACTG GGAGACTTGA
661 GTGCAGAAGA GGAAAGTGA ATTCCATGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATATGGAGGA
721 ACACCAGTGG CGAAGGGAC TTTCTGGTCT GTAAC TGACA CTGAGGGCGG AAAGCGTGGG
781 GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTTA
841 GAGGGTTTCC GCCCTTAGT GCTGAAGTTA ACGCATTAG CACTCCGCT GGGGAGTACG
901 GCCGCAAGGC TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGTG GAGCATGTGG
961 TTTAATTGGA AGCAACGGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA AAACCCTAGA
1021 GATAGGGCTT CTCCTTGGG AGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCA TCAGCTCGTG
1081 TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACC TTGATCTTAG TTGCCATCAT
1141 TAAGTTGGGC ACTCTAAGGT GACTGCCGGT GACAAACCAG AGGAAGGTGG GGATGACGTC
1201 AAATCATCAT GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGACG GTACAAAGAG
1261 CTGCAAGACC GCGAGGTGGA GCTAATCTCA TAAAACCGTT CTCAGTTCGG ATTGTAGGCT
1321 GCAACTCGCC TACATGAAGC TGGAAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA
1381 TAAGTTCCCG GGCCTGTAC ACAACGGCCG TCACACCAAG AGAGTTTGTA ACACCCGAAG
1441 TCGGTGGGGT AACCTTTTTG GAGCCAGCCG CCTAAGGTGG GACAGATGAT TGGGGTGAAG
1501 TCGTAACAAG GTAGCCGTA

Fig. 4-9. Nucleotide sequence of 16S rDNA from *Bacillus* sp. SB17.

3-3. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 클로닝

무름병 병원성 신호물질 분해 유전자 클로닝을 위해 분리 선정된 세균 게놈 DNA에서 AHLase homologues에 기초한 degenerate oligonucleotide primer 5'-CAC YTR CAT YTT GAY CAY GC-3' (sense) 및 5'-ATC RAA TCC HGA VRA YGG C-3' (antisense)를 사용하여 PCR 증폭한 결과 약 300 bp의 DNA 단편을 얻었다. 이 단편을 염기서열분석 BLAST search를 통하여 확인한 결과 *Bacillus cereus* group의 AHLase (*aihA* gene)와 같은 계통으로 판명되었다. 이러한 초기 DNA 염기서열을 바탕으로 primer walking 방법을 통하여 upstream 및 downstream의 unknown region을 확인하였다. 완전한 약 1.0 kb의 open reading frame이 확인되었으며 specific primer로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하였다.

Table 4-5. List of *qqe* genes from quorum-quenching bacteria

Strain	ORF	Amino acids	pI	Mw	Sequence
<i>Bacillus</i> SB09	753	250	4.93	28,060	Data not shown
<i>Bacillus</i> SB10	753	250	4.83	28,121	Fig. 4-11
<i>Bacillus</i> SB12	753	250	4.89	28,220	Fig. 4-12
<i>Bacillus</i> SB16	753	250	4.81	28,030	Fig. 4-13
<i>Bacillus</i> SB17	753	250	4.88	28,019	Fig. 4-14
<i>Bacillus</i> SB19	753	250	4.89	28,190	Data not shown
<i>Bacillus</i> PB29	753	250	4.83	28,117	Data not shown
<i>Bacillus</i> PB30	753	250	4.89	28,226	Data not shown
<i>Bacillus</i> PB35	753	250	4.83	28,125	Data not shown
<i>Bacillus</i> PB37	753	250	4.89	28,227	Data not shown
<i>Arthrobacter</i> GK01	753	250	4.74	28,046	Data not shown
<i>Bacillus</i> GK02	753	250	4.74	28,056	Fig. 4-10
<i>Bacillus</i> GG03	753	250	4.89	28,161	Data not shown
<i>Bacillus</i> GJ02	753	250	4.88	28,193	Data not shown

```

1   ATGACAGTAAAGAAGCTTTATTTTGGTCCCAGCAGGTOGTTGTATGTTAGATCACTCTTCT
1   M T V K K L Y F V P A G R C M L D H S S

61  GTTAACAGTACATTAACACCAGGGAATTATTAGACTTACCGGTTTGGTGTATCTTTTG
21  V N S T L T P G K L L D L P V W C Y L L

121 GAGACTGAAGAAGGAOCTATTTTAGTAGATACAGGTATGCCAGAAAGTGCAGTTAATAAT
41  E T E E G P I L V D T G M P E S A V N N

181 GAAGGTTTGTTTAACGGTACATTTGTGGAAGGACAGGTTTTAACAAAAATGACTGAAGAA
61  E G L F N G T F V E G Q V L P K M T E E

241 GATAGAATCGTGAATATTTTAAAGCGGTTGGTTATGAGCCGGAAGACCTCTTTATATT
81  D R I V N I L K R V G Y E P E D L L Y I

301 ATTAGTTCTCACTTGCATTTTGATCATGCAGGAGGAAATGGGGCTTTTATAAATACACCA
101 I S S H L H F D H A G G N G A F I N T P

361 ATCATTGTACAGCGTGCTGAATATGAGGGGGCACAACATAGTGAAGAATATATGAAAGAA
121 I I V Q R A E Y E A A Q H S E E Y M K E

421 TGTA AATTGCCAATTTAAACTACAAAAATCATTGAGGGGGATTATGAAGTCGTACCAGGA
141 C K L P N L N Y K I I E G D Y E V V P G

481 GTTCAATTATTGTATACACCAGGACATACTCCGGGGCATCAGTCGCTATTTCATTGAGACA
161 V Q L L Y T P G H T P G H Q S L F I E T

541 GAGA ACTCTGGTCCAGTGTATTAAACAATOGATGCACCGTATACAAAAGAAAATTTTGAA
181 E N S G P V L L T I D A P Y T K E N F E

601 GATGAAGTGCCATTTGCGGGATTTGATCCAGAATTAGCTTTATCTTCAATTAAGGTTTA
201 D E V P F A G F D P E L A L S S I K R L

661 AAAGAAGTTGTGATAAAAGAGAAGCCAATTGTTTTCTTTGGGCATGATATAGAGCAGGAA
221 K E V V I K E K P I V F F G H D I E Q E

721 AAGGGATGTAAGTGATCCCTGAATATATATAG
241 K G C K V I P E Y I *

```

Fig. 4-10. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *qqe* gene from *Bacillus* sp. GK02. The start codon is underlined and the stop codon is indicated by asterisk.

```

1  ATGACAGTAAAGAACTTTATTTCATCCCAGCAGGTGGTTGCATGTTGGATCATTGGTCT
1  M T V K K L Y F I P A G R C M L D H S S

61  GTTAAACAGTGGTTAACACCGGGGAAACTATTAAACTTGCCGGTGTGGTGTATCTTTTG
21  V N S A L T P G K L L N L P V W C Y L L

121  GAGACGGGAAGAAGGTCCTATTTTAGTAGACACAGGTATGCCAGAAAGTGCAGTTAATAAT
41  E T E E G P I L V D T G M P E S A V N N

181  GAAGGGCTTTTAAACGGTACATTTGTTGAAGGACAGATCTTACCGAAAATGACTGAAGAA
61  E G L F N G T F V E G Q I L P K M T E E

241  GATAGAATCGTGAATATATTAAGCGTGTAGGGTATGAGCCGGACGACCTTTTATATATT
81  D R I V N I L K R V G Y E P D D L L Y I

301  ATTAGTTCTCACTTACATTTTGTATCATGCAGGAGGAAACGGTGCCTTTTACAAATACACCA
101  I S S H L H F D H A G G N G A F T N T P

361  ATTATTGTGCAGCGAAACGGAATATGAGGCAGCACTTCATAGAGAAGAATATATGAAAGAA
121  I I V Q R T E Y E A A L H R E E Y M K E

421  TGTATATTACCGCATTGAACTACAAAATTATTGAAGGGGATTATGAAGTGGTACCAGGT
141  C I L P H L N Y K I I E G D Y E V V P G

481  GTTCAATTATTGTATAAGCCAGGTCATTCTCCAGGCCATCAGTGGCTATTCAATTGAGACG
161  V Q L L Y T P G H S P G H Q S L F I E T

541  GAGCAATCCGGTTCAGTTTTATTAACGATTGATGCATCGTACAAGAAAGAGAATTTTGAA
181  E Q S G S V L L T I D A S Y T K E N F E

601  GATGAAGTGGCGTTCCGAGGATTGATCCAGAATTAGCTTTATCTTCAATTAACGTTTA
201  D E V P F A G F D P E L A L S S I K R L

661  AAAGAAGTTGTGAAAAAAGAGAAAACCAATTATTTTCTTTGGTCATGATATAGAGCAGGAA
221  K E V V K K E K P I I F F G H D I E Q E

721  AAGAGTTGTAGAGTGTCCCGGAATATATATAG
241  K S C R V F P E Y I *

```

Fig. 4-11. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *qqe* from *Bacillus* sp. SB10. The start codon is underlined and the stop codon is indicated by asterisk.

```

1  ATGACAGTAAAGAAGCTTTATTTCATCCCAGCAGGTGGTTGTATGTTAGATCATTCTTCT
1  M T V K K L Y F I P A G R C M L D H S S

61  GTTAATGGTACACTCGCGCGGGGAATTTATTGAACTTACCTGTATGGTGTATCTTTTG
21  V N G T L A P G N L L N L P V W C Y L L

121  GAGACAGAAGAGGGGCTATTTTAGTAGATACAGGTATGCCAGAAAGTGCAGTTAATAAT
41  E T E E G P I L V D T G M P E S A V N N

181  GAAGGGCTTTTAAACGGTACATTTGTTGAAGGACAGATTTTACCGAAAATGACTGAAGAA
61  E G L F N G T F V E G Q I L P K M T E E

241  GATAGAATCGTGAATATATTTAAAGCGTGTAGGGTATGAGCCGGACGACCTTTTATATATT
81  D R I V N I L K R V G Y E P D D L L Y I

301  ATTAGTTCTCACTTACATTTTGTATCATGCAGGAGGAAACGGTGTTTTTACAAAATACACCG
101  I S S H L H F D H A G G N G V F T N T P

361  ATTATTGTGCAGCGAAACGGAATATGAGGCAGCACTTCATAGAGAAGAATATATGAAAGAA
121  I I V Q R T E Y E A A L H R E E Y M K E

421  TGTATATTACCGCATTGAACTACAAAAATTATTGAAGGGGATTATGAAGTGGTACCAGGT
141  C I L P H L N Y K I I E G D Y E V V P G

481  GTTCAATTATTGTATAAGCCAGGTCATTCTCCAGGCCATCAGTGGTTATTCAATTGAGACG
161  V Q L L Y T P G H S P G H Q S L F I E T

541  GAGCAATCCGGTTCAGTTTTATTAACGATTGATGCATCGTACAAGAAAGAGAATTTTGAA
181  E Q S G S V L L T I D A S Y T K E N F E

601  GATGAAGTGCCTTCGCAGGATTGATCCAGAATTAGCTTTATCTTCAATTAACGTTTA
201  D E V P F A G F D P E L A L S S I K R L

661  AAAGGAGTTGTGGCGAAAGAGAAAACCAATTGTTTTCTTTGGTCATGATATAGAGCAGGAA
221  K G V V A K E K P I V F F G H D I E Q E

721  AAGGTTGTAGAGTGTCCCTGAGTATATATAG
241  K G C R V F P E Y I *

```

Fig. 4-12. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *qqe* from *Bacillus* sp. SB12. The start codon is underlined and the stop codon is indicated by asterisk.

```

1  ATGACAGTAACGAAACTTTATTTTCATCCCAGCAGGTGGTTGTATGTTGGATCATTGGTCT
1  M T V T K L Y F I P A G R C M L D H S S
61  GTTAACAGTGGTTAACACCGGGAAAACCTATTAAACTTGCCGGTTTGGTGTATCTTTTG
21  V N S A L T P G K L L N L P V W C Y L L
121  GAGACGGGAAGAAGGTCCTATTTTAGTAGACACAGGTATGCCAGAAAGTGCAGTTAATAAT
41  E T E E G P I L V D T G M P E S A V N N
181  GAAGGGCTTTTAAACGGTACATTTGCAAAAGGACAGATTTTACCGAAAATGACTGAAGAA
61  E G L F N G T F A K G Q I L P K M T E E
241  GATAGAATTGTAACTATTTTAAAACGTGCAGGGTATGAGCCAGATGATCTCCTATATATT
81  D R I V T I L K R A G Y E P D D L L Y I
301  ATTAGTTGGCACTTGCATTTTGTATCATGCAGGAGGAAATGGTGCTTTTTTTGAATACGCCA
101  I S S H L H F D H A G G N G A F L N T P
361  ATCATTATACAACGTGCTGAATATGAGGCAGCGCAGCATAGAGAGGAATATTTGAAAGAG
121  I I I Q R A E Y E A A Q H R E E Y L K E
421  TGCATACTACCAGATTTAAACTACAAAATTATTGAAGGTGATTATGAAGTGGTACCTGGT
141  C I L P D L N Y K I I E G D Y E V V P G
481  GTTCGGTTATTGTATACACCAGGACATTCTCCAGGGCATCAGTCATTATTAATTGAGACG
161  V R L L Y T P G H S P G H Q S L L I E T
541  GAAAAATCCGGTCTGTATTATTAACGATTGATGCATCTTATAACGAAAGAGAATTTTGAA
181  E K S G P V L L T I D A S Y T K E N F E
601  GATGAAGTACCGTTTGGCGGATTGATTCCGGAATTAGCCTTATCTTCAATTAACGTTTA
201  D E V P F A G F D S E L A L S S I K R L
661  AAAGAAGTTGTGATGAAAGAGAAAACCGATTGTTTTCTTTGGACATGATATAGAACAGGAA
221  K E V V M K E K P I V F F G H D I E Q E
721  AAGGGATGTAAAGTGTTCCTGGAATATATATAG
241  K G C K V F P E Y I *

```

Fig. 4-13. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *qqe* from *Bacillus* sp. SB16. The start codon is underlined and the stop codon is indicated by asterisk.

```

1  ATGACAGTAAAGAACTTTATTTCATCCCAGCAGGTGGTTGTATGTTGGATCATTGGTCT
1  M T V K K L Y F I P A G R C M L D H S S

61  GTTAAACAGTGGTTAACACCGGGGAAACTATTAAACTTGCCGGTGGTGGTTATCTTTTG
21  V N S A L T P G K L L N L P V W C Y L L

121  GAGACGGGAAGAAGGTCTATTTTAGTAGACACAGGTATGCCAGAAAGTGCAGTTAATAAT
41  E T E E G P I L V D T G M P E S A V N N

181  GAAGGGCTTTTAAACGGTACATTTGTTGAAGGACAGATCTTACCAAAAATGACTGAAGAA
61  E G L F N G T F V E G Q I L P K M T E E

241  GATAGAATCGTGAATATATTAAGCGTGTAGGGTATGAGCCGGACGACCTTTTATATATT
81  D R I V N I L K R V G Y E P D D L L Y I

301  ATTAGTTCTCACTTACATTTTGTATCATGCAGGAGGAAACGGTGCCTTTTACAAATACACCG
101  I S S H L H F D H A G G N G A F T N T P

361  ATTATTGTGCAGCGAAACGGAATATGAGGCAGCACTTCATAGAGAAGAATATATGAAAGAA
121  I I V Q R T E Y E A A L H R E E Y M K E

421  TGTATATTACCGCATTGAACTACAAAATTATTGAAGGGGATTATGARGTGGTACCAGGT
141  C I L P H L N Y K I I E G D Y E V V P G

481  GTTCAATTATTGTATAAGCCAGGTCATTCTCCAGGCCATCAGTGGCTATTCAATTGAGACG
161  V Q L L Y T P G H S P G H Q S L F I E T

541  GAGCAATCTGGTTCAGTTTTATTAACGATTGATGCATCATACAAGAAAGAGAATTTTGAA
181  E Q S G S V L L T I D A S Y T K E N F E

601  GATGAAGTGGCGTTTCGCAGGATTGATCCAGAATTAGCTTTATCTTCAATTAACGTTTA
201  D E V P F A G F D P E L A L S S I K R L

661  AAAGAAGTTGTGAAAAAAGAGAAAACCAATTATTTTCTTTGGTCATGATATAGAGCAGGAA
221  K E V V K K E K P I I F F G H D I E Q E

721  AAGGCTGTAGAGTGTCCCGGAATATATATAG
241  K G C R V F P E Y I *

```

Fig. 4-14. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *qqe* from *Bacillus* sp. SB17. The start codon is underlined and the stop codon is indicated by asterisk.

3-4. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 1차 구조

aiiA homologous gene인 quorum-quenching bacteria에서 분리된 유전자를 *qqe*로 명명하였다. *Bacillus* sp. GK02의 *qqe*는 ORF가 753 bp로 250 amino acid를 암호화하며 분자량은 28,056 Da, calculated pI는 4.74였다. quorum-quenching bacteria에서 분리한 *qqe* gene이 Table 4-5에 있다. *Bacillus qqe* gene을 *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* gene과 상동성을 비교한 결과 89-93% 범위에 있었다.

3-5. 무름병 병원성 신호물질분해유전자의 발현 및 효소활성

무름병 병원성 신호물질분해유전자 ORF 바깥의 부분인 EPF, 5'-TCA TAT GAC AGT AAA GAA GCT TT-3' 및 EPR, 5'-AAA GCT TTA TAT ATT CAG GGA TC-3' (the *NdeI* and *HindIII* sites are underlined)를 이용하여 증폭하였으며 증폭 후 *E. coli* BL21 (DE3)를 host strain으로 하여 *NdeI*, *HindIII*로 절단한 다음 6× His tagging expression vector pET22b(+) (Novagen)의 *NdeI*와 *HindIII* 부위에 subcloning 하였다. His-tagged protein (Qqe)는 약 35 kDa의 분자량을 가진 것으로 확인되었다. 정제된 Qqe protein은 HHL을 분해하였는데 처리 10분 후 약 70%의 HHL이 분해되었다 (Fig. 4-15).

3-6. 무름병 병원성 신호물질 분해 기작

AHL의 구조적 특성은 적어도 4종의 효소에 의해 분해될 것이다. Fig. 4-21은 이들 효소가 분해지점을 표시한다. 그 중에서 lactonase와 decarboxylase는 lactone ring의 positions 1과 2을 공격할 것이며 acylase와 deaminase는 homoserine lactone moiety와 acyl side chain의 sites 3과 4를 각각 공격할 것이다. 연구결과 (Dong and Zhang, 2005)에 의하면 lactone bond와 amide linkage를 가수분해하는 acyl-homoserine lactonase (AHL-lactonase)와 acyl-homoserine lactone acylase (AHL-acylase)가 AHL 기질을 효소적으로나 구조적으로 분해한다. AHL-utilizing *Bacillus* sp. GK02의 Qqe가 AHL-lactonase 혹은 AHL-acylase 작용하는가를 확인하기 위해 HHL의 효소적 분해 후 그 분해산물을 HPLC 및 ESI-MS를 통하여 분석

하였다.

HHL과 HHL 효소분해산물의 ESI-MS 분석결과 quasimolecule M+H ion (at m/z 218)을 보여 주었는데 이는 HHL (M+H ion m/z 200)의 효소적 가수분해 결과로 분자량이 18 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 4-17). 이 결과로 미루어 보아 AHL의 homoserine lactone ring의 ester bond가 *qqe*-encoded AHL-lactonase에 의해 가수분해되는 것으로 확인되었다.

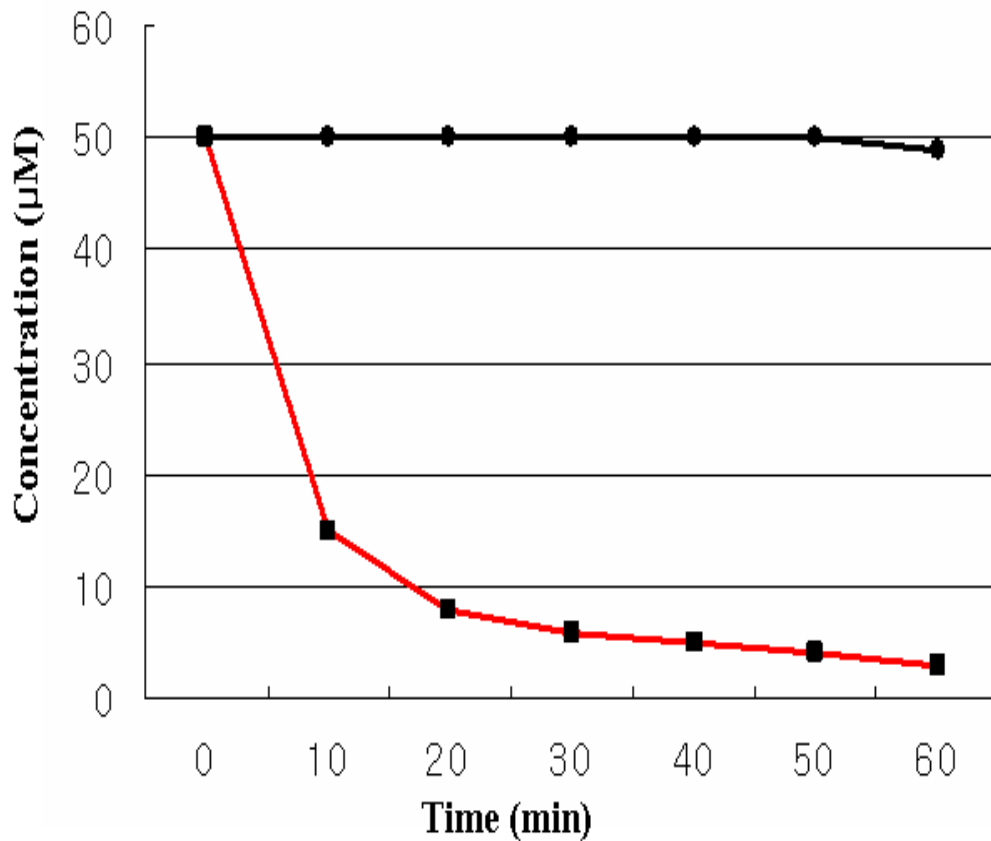


Fig. 4-15. Time course inactivation of autoinducers by Qqe from *Bacillus* sp. GK02. The diluted protein and 50 µM HHL (■). The same volume of the inactivated protein and HHL 50 µM (●).

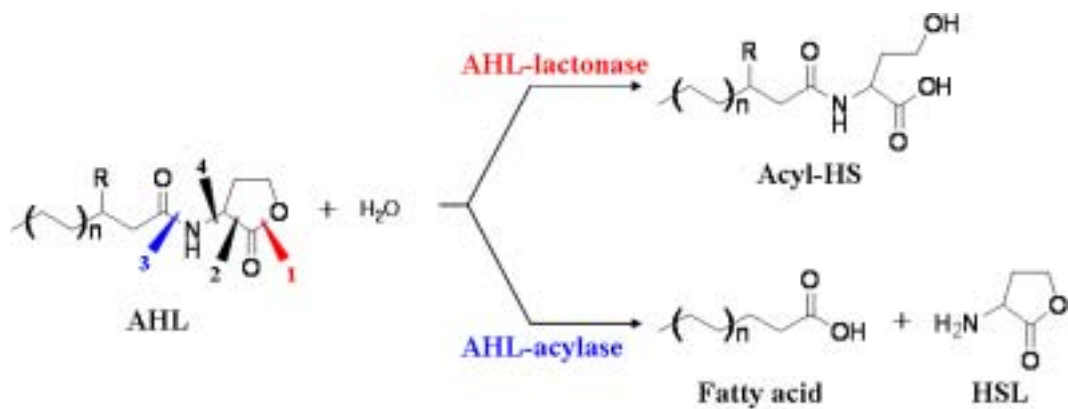


Fig. 4-16. Enzymatic inactivation of AHLs. AHL-lactonase hydrolyzed the lactone ring of AHLs. AHL-acylase hydrolyzed AHLs to release the acyl side chain moiety and homoserine lactone.

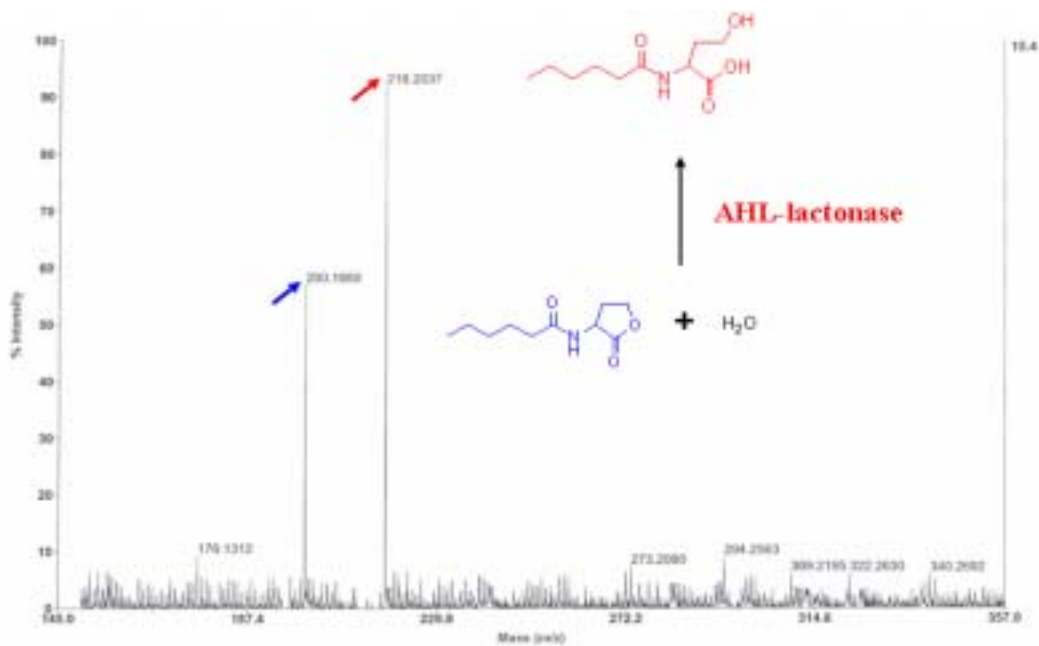


Fig. 4-17. Analysis of HHL degradation product.

3-7. 무름병 저항성 감자 형질전환용 벡터 구축

무름병 저항성 감자 형질전환을 위한 벡터 구축을 위해 *gusA*를 가진 pCAMBIA1301와 *gfp*를 가진 pCAMBIA1302 벡터를 기본으로 클로닝하였다. 이들 모두 CaMV35S promoter, hygromycin에 저항성을 갖는 hygromycin phosphotransferase (*hptII*) gene을 가지는 binary vector이다 (Fig. 4-18 & 4-19). 상기 실험의 *Bacillus* sp. GK02에서 분리한 1 kb의 4종의 *qqe* 유전자를 pCAMBIA에 클로닝하기 전에 각각을 제한효소의 용이한 선택을 위해 중간단계 클로닝으로 pBIN35S 벡터에 클로닝하였다. Binary vector는 sense orientation으로 구축하여 electroporation (Gene Pulser II Electroporator, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법으로 YEP medium에 overnight 배양한 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환한 결과는 Fig. 4-20와 같다

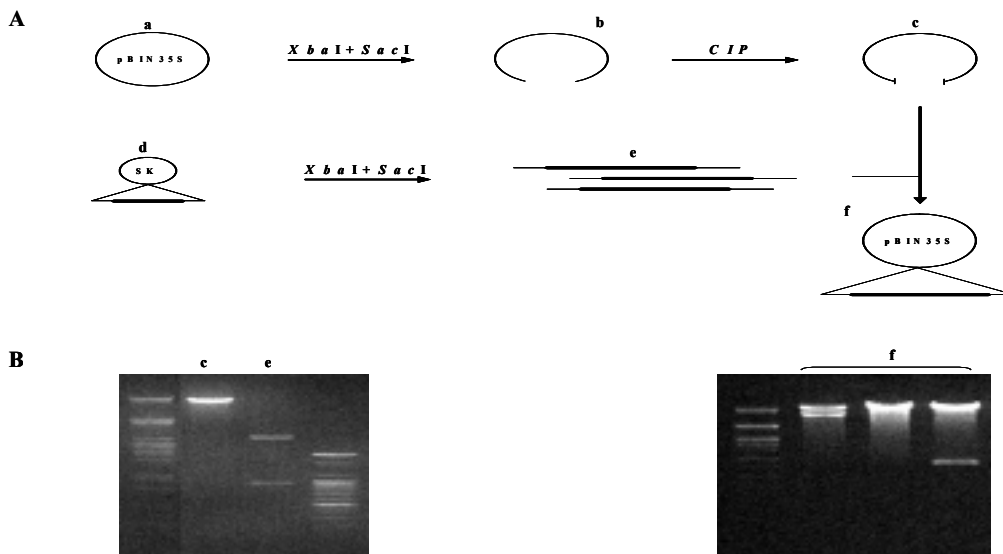


Fig. 4-18. Strategy of *qqe* gene into pBIN35S vector.

Subcloning한 무름병저항성 유전자를 식물용 vector인 pBIN35S vector에 cloning 하기 위해서 Fig 4-18A에서 보는 것과 같이 a, pBIN121 계통의 pBIN35S vector; b, *XbaI*와 *SacI* 제한효소로 절단; c, CIP처리를 통해 *XbaI*와 *SacI* 절단한 말단의 5' -인

산 제거; d, 무름병 저항성 유전자를 포함한 pBluescriptII SK+ vector; e, *Xba*I와 *Sac*I로 절단하여 무름병 저항성 유전자 분리; f, 식물형질전환용 pBIN35S vector에 무름병 저항성 유전자 ligation 과정을 표시하며 Fig 4-18B에서는 각 단계별 실험결과로 각각의 그림으로 f의 전기영동결과 중, 첫 번째 lane은 size marker, 두 번째 lane은 무름병 저항성 유전자를 포함한 pBIN35S의 uncut, 세 번째 lane은 무름병 저항성 유전자를 포함한 pBIN35S를 *Xba*I로 절단, 네 번째 lane은 무름병 저항성 유전자를 포함한 pBIN35S를 *Xba*I와 *Sac*I로 절단한 것을 나타낸다.

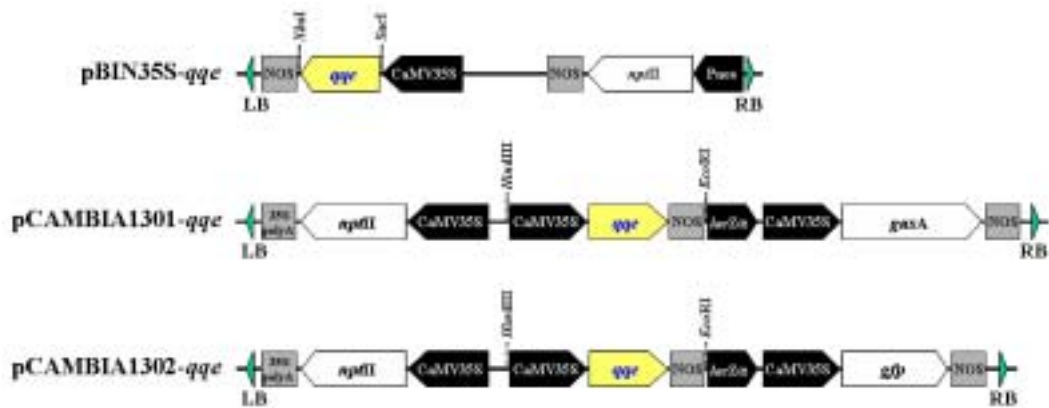


Fig. 4-20. Construction of T-DNA containing *qqe* gene for potato and Chinese cabbage. The *qqe* gene is regulated by the CaMV35S promoter. LB, left border; RB, right border; *nptII*, hygromycin phosphotransferase gene; CaMV35S, CaMV35S promoter; Nos, 3' termination signal of nopaline synthase. *lacZα*, *lacZα* fragment; *gusA*, β-glucuronidase; *gfp*, green fluorescence protein.

4. 결론

무름병 신호전달물질 분해 미생물 분리 및 선별을 위해 인삼, 토양 및 식물 시료로부터 상이한 콜로니 형태를 가진 미생물을 분리하였다. 특히 강화, 금산, 진안 3지역에서 분리한 인삼내생균의 균 다양성 분석을 위한 16S rDNA 유사성 분석, cell-wall-degradation enzymatic activity 측정, *Rhizoctonia solani*에 대한

anti-fungal activity를 분석하였다. 특히 인삼내생균에는 다양한 세균이 분포되어 있었는데 특히 무름성과 관련이 되어 있는 식물 세포벽 분해효소를 분비하는 다수의 세균이 분포되어 있었다. 또한 이들 특성은 토양에 잔존하여 있던 세균들이 식물세포벽 내부로 침투시 필요한 기능일수도 있을 것이다. 주목할 만한 사실은 인삼내생균 중에는 항균성물질을 분비하는 세균도 분포하고 있었는데 무름병 관련 세균과 항균성 물질세균의 공존은 기주식물의 병 발생을 조절하는데 관련이 있을 것으로 추정된다.

따라서 1차 분리균주를 대상으로 재료 및 방법에 기술한 대로 HHL를 함유한 배지에서 2차 선별하였다. 분리균주를 LB 배지에서 2일간 배양 후 배양액을 paper disc 상에 분취하였다. 그 다음 agar (0.8%), *C. violaceum* CV026, HHL 함유 배지 표면에 옮겼다. 다시 overnight 배양 후 육안으로 생성되는 환의 유무를 관찰하여 AHL-degrading bacteria인 *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *Arthrobacter nicotianae*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum*을 분리선정하였다.

무름병 신호전달물질 분해 미생물의 발병 억제 실험으로 무름병균 *P. chrysanthemi* PY35를 혼합처리하여 병 발생 정도를 관찰하였다. *Bacillus* sp. GK02와 혼합처리하였을 때는 병징이 잘 나타나지 않았다. 이러한 결과는 분리한 무름병 신호전달물질 분해 미생물이 무름병균 *P. chrysanthemi* PY35가 감자의 감염과정에서 분비하는 병원성 신호전달물질을 분해함으로써 병 발생 촉진기작인 quorum sensing 기작을 억제시키므로 병을 유발하지 않는 것으로 추정된다. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 클로닝을 위해 AHLase homologues에 기초한 degenerate oligonucleotide primer를 사용하여 PCR 증폭한 결과 약 300 bp의 DNA 단편을 얻었다. 이러한 초기 DNA 염기서열을 바탕으로 primer walking 방법을 통하여 upstream 및 downstream의 unknown region을 확인하였다. 완전한 약 1.0 kb의 open reading frame이 확인되었으며 specific primer로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하고 *aiiA* homologous gene인 quorum-quenching bacteria에서 분리된 유전자를 *qqe*로 명명하였다. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 1차 구조를 조사한 결과 *Bacillus* sp. GK02의 *qqe*는 ORF가 753 bp로 250 amino acid를 암호화하며 분자량은 28,056 Da, calculated pI는 4.74였다. *Bacillus qqe* gene을 *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* gene과 상동성을 비교한 결과 89-93% 범위에 있었다. 무름병 병원성 신호물질 분해 유전자의 발현 및 효소활성을 위해 ORF 바깥의 부분의 primer를 제작하여 증폭 후 DNA 단편을 *E. coli* BL21 (DE3)를 host strain으로 하여 *NdeI*, *HindIII*로 절단한 다음 6× His tagging expression vector pET22b(+) (Novagen)의 *NdeI*와 *HindIII* 부위에 subcloning하였다. His-tagged protein (Qqe)는 약 35 kDa의 분자량을 가진 것으로 확인되었다. 정제된 Qqe protein은 HHL을 분해하였는데 처리 10분 후

약 70%의 HHL이 분해되었다. 무름병 병원성 신호물질 분해 기작 연구로 AHL-utilizing *Bacillus* sp. GK02의 *Qqe*가 AHL-lactonase 혹은 AHL-acylase가 작용하는가를 확인하기 위해 HHL의 효소적 분해 후 그 분해산물을 HPLC 및 ESI-MS를 통하여 분석하였다. HHL과 HHL 효소분해산물의 ESI-MS 분석결과 quasimolecule M+H ion (at m/z 218)을 보여 주었는데 이는 HHL (M+H ion m/z 200)의 효소적 가수분해 결과로 분자량이 18 증가한 것으로 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 AHL의 homoserine lactone ring의 ester bond가 *qqe*-encoded AHL-lactonase에 의해 가수분해되는 것으로 확인되었다. 이 유전자 산물의 유용성이 확인되어 무름병 저항성 감자형질전환용 벡터구축 실험으로 *gusA*을 가진 pCAMBIA1301와 *gfp*를 가진 pCAMBIA1302 벡터를 기본으로 클로닝하였다. 상기 실험의 *Bacillus* sp. GK02에서 분리한 1 kb의 *qqe* 유전자를 pCAMBIA에 클로닝하기 전에 제한효소의 용이한 선택을 위해 중간단계 클로닝으로 pBIN35S 벡터에 클로닝하였다. Binary vector는 sense orientation으로 구축하였다. 이상 클로닝된 유전자를 무름병 저항성 형질전환 감자 개발을 위한 이후 실험을 진행하였으며 5 종류의 *qqe* 유전자를 식물벡터에 클로닝하여 앞으로의 실험에 대비하였다.

제 5 절 무름병저항성 형질전환감자

1. 서론

앞에서도 언급한 바와 같이 감자의 무름병은 감자재배 시기 중 포장에서 뿐 아니라 저장고 내에서 치명적인 수량의 감소를 가져오기 때문에 특히, 씨감자의 경우에는 다음해의 수량에도 막대한 영향을 끼치는 중요한 식물병이다. 그러나 약제 방제가 어렵고 예방이 어려울 뿐 아니라 전염을 또한 매우 강해 저항성 품종의 육성이 매우 시급한 실정이다. 그러나 기존의 감자 (*S. tuberosum*)의 경우, 4배체 ($2n=4x$)에 이형접합성인 영양 번식작물로 교잡을 통한 육종이 타 작물에 비해 매우 어렵다 (Bradshaw and Mackay 1994). 따라서 반수체 (haploid)를 유기하여 육종에 이용하거나 (Ross 1986), 형질전환 기술을 통한 육종이 활발하게 이루어지고 있다. 특히 감자는 식물학적으로 줄기에 해당하는 괴경으로 증식되는 작물로 형질전환체의 유전적 안정성 확보 측면에서 다른 작물에 비해 매우 유리하다 (Ghislain et al. 1997). 감자는 형질전환 연구의 초기세대부터 재료로 많이 이용되어왔고 (An et al. 1988; De Block 1988), 비교적 형질전환이 잘 이루어지는 것으로 알려져 있지만 실제로 형질전환 연구재료로 이용되는 감자 품종은 많지 않다. 이는 연구재료로 재분화와 형질전환이 용이하게 이루어지는 감자 품종들을 이용했기 때문으로 실제 감자의 품종과 조직에 따라 호르몬의 조성 등 재분화의 조건이 많은 차이를 보이는 것으로 알려져 있다 (D'Amato 1975; De Block 1988; Dobigny et al 1996). 감자의 경우 잎 조직 (De Block 1988)이나 괴경 조직 (Sheerman and Bevan 1988; Stiekema et al. 1988) 등을 재료로 이용하여 형질전환에 이용하고 있으나 사용되는 조직에 따라 재현성과 형질전환율 등이 다를 뿐만 아니라 품종에 따라서도 많은 차이를 보이고 있음을 보고한 바 있다. 우리나라에서도 최근까지 감자를 이용한 형질전환 연구들이 많이 보고되고 있으나 (Choi et al. 1996; Jung et al. 1996; Youm et al. 2002) 극히 일부 품종에 제한되고 있고 품종별로 다르게 나타날 수 있는 감자의 재분화 조건이나 형질전환 조건을 규명한 보고는 확인되지 않고 있다. 최근까지 국내외에서 형질전환 연구재료 (Youm et al. 2002)로 많이 이용되고 있는 'Desiree'와 같은 일부 품종의 경우 재분화나 형질전환 효율이 다른 감자 품종에 비해 탁월한 것으로 알려져 있지만 (Choi et al. 1996), 현재 우리나라에서는 재배되고 있지 않는 품종으로 형질전환 이후 실용화 등에 문제가 있다. 형질전환체의 유전적 고정을 위한 별도의 육종 과정을 거치지 않아도 되는 감자의 경우 개발된 이후 실용화를 위해서는 우리나라에서 재배가 가능한 품종을 재료로 이용하는 것이

필요하다.

또한, 형질전환 감자는 일찍부터 선진국을 중심으로 여러 차례 이루어져 왔고 우리나라에서도 몇몇 대학과 연구소를 중심으로 다양한 유용유전자를 감자 식물체에 도입한 바 있으나, 대부분 바이러스 저항성이나 제초제 저항성이 대부분이고 세균병저항성을 목표로 한 것은 전무한 실정이다. 한편, 2004년 이 등에 의하면 곤충에서 분리한 항균성 cecropin 유전자의 염기서열을 일부 변형한 shiva 유전자를 도입한 형질전환 감자가 무름병에 저항성을 보였다고 한다. 그러나 이번 연구에서는 이와는 다른 전략으로 무름병 병원성 관련 물질분해인자 분리를 위해 식물 내부, 토양으로부터 미생물을 분리하여 신호물질분해에 관련하는 5 종류의 저항성 유전자 (*qqe*)를 클로닝하고 구조를 밝혔으며 본 연구의 최종목표인 무름병 저항성 형질전환 감자 생성을 위해 5 종류의 저항성 유전자 *qqe*를 pCAMBIA에 클로닝하여 각각 감자에 형질전환하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 감자 품종의 무름병 저항성 검정 및 감수성 품종 선발

2-1-1. 감자 품종의 무름병 저항성 검정 및 screening

사용한 감자품종은 국내재배 감자품종 7종으로 ‘수미’, ‘남작’, ‘조풍’, ‘남서’, ‘추백’, ‘자심’, 및 ‘자서’ 였다. 무름병 검정방법은 기내 및 pot 검정 방법을 모두 사용하였다.

2-1-2. 감자잎을 이용한 무름병 저항성 검정 방법

접종에 이용된 병원균은 감자에서 분리한 무름병원균 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)이었으며, 밀도는 10^5 cfu · ml⁻¹이었다. 배양온도는 23±1℃, 접종대상으로 이용된 식물체는 pot에 정식한 후 50일된 감자잎을 사용하였다.

2-1-3. 감자 기내 유식물체를 이용한 품종별 무름병 저항성 검정

접종에 이용된 병원균은 감자에서 분리한 무름병원균 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)이었으며, 밀도는 10^4 cfu · ml⁻¹이었다. 배양온도 : 23±1℃,접종대상으로 이용된 식물체는 기내에서 감자 증식배지를 이용하여 4주간 배양한 기내 유식물체를 이용하였다.

2-2. 무름병 감수성 감자 품종 선발 및 최적 형질전환 조건 구축

무름병에 감수성인 감자 품종을 이용하여 식물호르몬 종류와 농도 및 조합, 아세토실링곤 농도 등 감자 재분화에 최적인 배지조성과 배양조건을 구축하였다.

2-3. 감자 식물체의 형질전환을 향상을 위한 배양 조건 구축

2-3-1. 식물재료

국내 장려품종으로 지정된 감자 ‘추백’ (Chubaek), ‘남서’ (Namsuh), ‘자심’ (Jasim), ‘조풍’ (Jopung), ‘조원’ (Jowon) 등 5 품종을 재료로 이용하였다.

2-3-2. 배지와 배양방법

감자의 품종별 재분화 조건 규명을 위하여 7가지 배지를 사용하였다. 이들 배지의 기본은 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)이며, M1부터 M5배지는 캘러스 형성 과정 없이 직접 싌초를 유기시키기 위해 이용한 것으로 단계를 구분하지 않고 동일배지에서 연속하여 계대배양하였다. M6와 M7배지는 indirect 재분화에 이용한 것으로 감자조직을 14일간 캘러스 유기 배지에서 배양하여 캘러스 유기시킨 다음 재분화된 싌초를 유기하기 위해 이용하였다. 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 은 30±1℃에서 진탕 배양하였으며, 감자 식물체는 23±1℃에서 16시간 일장 조건으로 배양하였다.

2-3-3. 감자의 재분화 및 형질전환

감자의 형질전환은 Visser 등 (1989)의 방법과 Joung 등 (1996)의 방법을 응용하여 수행하였다. 감자 잎은 기내에서 증식시킨 어린 감자 식물체를 펠라이트에서 순화시킨 후 온실 내 수경 재배상에서 50일간 생육시킨 다음 채취하여 사용하였다. 채취한 잎은 Tween-20으로 계면활성화된 유효염소농도 0.5% (v/v)의 sodium hypochlorite (NaOCl) 용액으로 15분간 흔들면서 소독한 후 멸균수로 5-6회 세척하였다. 이때 모든 작업은 무균상에서 실시하며 이후 멸균한 여과지를 사용하여 소독된 잎의 수분을 제거하고 1 cm²의 크기로 절단하여 전배양 배지 (PPM)에 24시간 동안 배양하였다. 감자 줄기의 경우 무균상태의 기내 액체 진탕배양으로 급속 증식시킨 감자 식물체로부터 절취하여 사용하였다. 사용된 줄기는 결눈을 포함하지 않은 절간부위를 약 0.5 cm의 길이로 절단하여 사용하였다. 멸균된 감자 조직을 형질전환용 운반체 pBI121 (Clontech, USA)로 형질전환된 *Agrobacterium*으로 10분간 감염시켰다. 이때 감자의 형질전환효율에 미치는 페놀 화합물 acetosyringone의 효과를 조사하기 위하여 처리

별로 각각 0, 25, 50, 75과 100 μ M씩 첨가하였다. *Agrobacterium* 감염을 시킨 감자조직 절편들은 공동배양 배지 (PCM)에서 48시간 동안 배양한 후 선발배지 (PSM)에 옮겼다. 재분화된 신초들은 kanamycin이 첨가된 선발배지에 배양하여 생존하는 것들을 선발하였다. 선발된 신초들은 0.1 mg/ ℓ GA₃ 호르몬이 첨가된 액체증식배지 (MUM)에 옮겨서 120 rpm으로 진탕 배양기에서 증식시켰다. 액체증식배지에서 증식된 감자 신초들은 호르몬이 없는 MS 고체배지에서 발근시켰으며, 뿌리가 발생된 후 멸균된 펠라이트에서 묘를 순화시킨 다음 멸균된 버미큘라이트와 펠라이트를 1:1로 혼합시킨 포트에 심어 온실에서 순화시켰다.

2-3-4. 선발된 형질전환 감자의 분석

감자 잎으로부터 total DNA 분리하는 Teresa 등 (1995)이 이용한 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 약 0.1 g의 어린 감자 잎 조직을 1.5 ml micro centrifuge tube에 넣고 -80 $^{\circ}$ C 초저온냉동고에서 동결시킨 다음 일회용 tissue grinder로 조직을 파쇄하였다. 이후 0.7 ml의 감자 DNA 추출용 완충용액 [DNA extraction buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris base, 5 mM EDTA (pH 7.5) : nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB : 5% (w/v) sarkosyl = 2.5 : 2.5 : 1)]을 가하여 잘 섞은 다음 65 $^{\circ}$ C 수조에서 60분간 반응시켰다. 이후 0.7 ml의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 채워 vortex한 다음 10,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액의 투명한 부분을 회수하여 2/3배의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 RNase를 처리하고 정량한 후 농도를 200 ng/ μ l로 맞춘 후 PCR 반응의 주형으로 이용하였다. 선발된 감자의 형질전환 여부를 확인하기 위해 항생제 저항성 선발 마커인 NPTII 유전자에 특이적인 2개의 primer sets (5' -CTG AAT GAA GTG CAG GAC GAG G-3' 와 5' -GCC AAC GCT ATG TCC TGA TAG C-3')를 사용하였다. PCR 증폭반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation한 후 94 $^{\circ}$ C에서 20초간 denature, 50 $^{\circ}$ C에서 20초간 annealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 expansion하여 45 cycle 처리하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 full extension시켰다. 이후 1.2% (w/v) agarose gel에서 전기영동하고 사진으로 기록하였다.

2-3-5. 감자 식물체의 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축

적정한 acetosyringone 처리 농도를 설정하기 위하여 25, 50, 75, 100 μ M의 acetosyringone을 *Agrobacterium*을 식물조직체에 감염시킬 때 처리하였으며, 처리 후 식물 조직체의 재분화율 (재분화된 개체수/치상한 개체수 \times 100)과 형질전환율 (형질전환된 개체수/치상한 개체수 \times 100)을 조사하였다.

2-3-6. *Agrobacterium* 농도, 공배양 시간 및 온도에 따른 재분화율과 형질전환율

사용된 감자품종은 1차년도 결과에서 가장 높은 재분화율을 보인 '조원' 품종이었다. 접종한 *Agrobacterium* 농도는 A₆₀₀에서 0.5, 0.7, 1.0, 1.3 등 4가지였으며 공배양 시간은 24, 48, 36 시간, 공배양 온도는 23, 25, 27, 30°C 처리를 하였다. 또한, 모든 처리구에서 acetosyringone 75 µM을 공히 첨가하였다.

2-3-7. 형질전환 감자 식물체의 유전자 도입 확인

형질전환체 선발을 위하여 PCR 분석을 하였다. primer 염기서열은 CaMV35S(S)의 경우, GCT CCT ACA AAT GCC ATC A, CaMV35S(AS)의 경우, GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA였다. Terminator로 사용한 NOS의 detect를 위해 NOS(S)의 경우, GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG, NOS(AS)의 경우, TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA의 염기서열을 사용하였다. PCR 반응 시 조건은 2쌍의 primer 반응 시 공히, pre-denaturation을 위하여 94°C, 5분 반응시킨 후, denaturation을 위하여 94°C, 20초, annealing, 50°C, 20초, 그리고 extension을 위하여 72°C, 1분의 조건으로 45회 반복하였다. 그리고 72°C, 5분의 조건으로 full extension시켰다.

2-4. 감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석

2-4-1. 감자 식물체로의 형질전환

사용한 감자품종은 무름병에 심한 감수성으로 밝혀진 조원, 수미 품종을 이용했으며 형질전환 배지는 2년차에서 사용한 배지와 동일한 조성의 배지를 이용하였으며 형질전환 방법 역시 2년차에서 구축된 방법을 사용하여 형질전환을 수행하였다.

2-4-2. 형질전환체 선발을 위한 PCR : 2년차 방법과 동일

2-4-3. 형질전환체 선발을 위한 RT-PCR

RNA 분리는 QIAGEN사의 kit를 이용하였다. 먼저, sample을 간 후 (Sample powder 100 mg) RLT buffer를 450 µl 첨가한 후 아주 세게 vortexing해 주었다. QIA shredder spin column 2 ml collection tube set에 앞에서 만들어 놓은 lysate를 넣고 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. Column을 통과한 용액을 새 튜브에 옮기는데 이 때 침전물이 섞이지 않게 조심하여 pipetting하였다. 95-100% ethanol 0.5X volume을 위에서 떠낸 lysate에 첨가한 후 잘 섞었다. 이러한 혼합물을 RNeasy mini

spin column collection set에 넣은 후 원심분리를 13,000 rpm에서 15초하였다. RW1 buffer 700 μl 를 RNeasy column에 넣은 후 13,000 rpm에서 15초간 원심분리하였다. RPE buffer 500 μl 를 RNeasy column에 넣은 후 원심분리를 13,000 rpm, 15초간 하였다. RPE buffer 500 μl 를 RNeasy column에 넣은 후 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. RNeasy column을 1.5 ml 새 튜브에 넣은 후 50 μl 의 RNase-free water를 RNeasy column에 넣은 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 더 높은 RNA 수율을 위해 한번 더 반복하였다. (이때, 30 μl 의 RNase-free water 추가)

RT-PCR은 INTRON Biotechnology pre-mix 사용법에 따라 수행하였다. RT-PCR 반응을 위한 반응액의 조성은 8 μl 의 RT-PCR pre-mix, 0.5 μl 의 pimer NOS (forward), 0.5 μl 의 primer NOS (reverse), 1 μl 의 template, 및 10 μl 의 ddH₂O 이었다. RT-PCR의 조건은 cDNA 합성을 위해 45°C에서 30분 반응시켰으며 PCR 반응을 위하여 95°C, 3분간 pre-denaturation시킨 후, 95°C에서 40초간 denaturation, 54°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 30초간 annealing시키는 조건에서 40회 반복한 후, 72°C에서 3분간 elongation 시켰다.

2-4-4. 유전적 안정성이 확인된 형질전환체의 순화 및 화분 증식

계대배양 배지에서 4-6 주 정도 키운 기내 식물체를 뿌리를 상하지 않도록 수돗물에 잘 씻은 후 멸균 버미큘라이트와 펠라이트를 1:1로 혼합시킨 배양토를 담은 포트에 심어 온실에서 순화시킨다. 이 때 온실 내이지만 기내에서 나온 유식물체는 태양 광선과 건조에 매우 취약하므로 차광막 이용하여 순화시킨다. 온실에서 30일 정도 순화된 묘는 육묘용 상토와 발효를 1:1로 혼합한 포트에 심어 증식한다.

2-4-5. 무름병 저항성 검정

감자로부터 분리한 *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*를 20±1°C에서 현탁배양 하여 증식한 후 멸균 증류수로 희석하여 10⁴ cfu · ml⁻¹의 농도로 형질전환된 감자 기내유식물체에 접종하였다. 기내 유식물체는 증식배양 배지에 형질전환 감자의 유식물체 마디를 약 4주간 배양한 것을 사용하였다. 기내에서 균일하게 배양된 감자 유식물체의 줄기에 멸균 해부용 칼로 상처를 낸 후 10⁴ cfu · ml⁻¹ 농도로 희석한 세균을 멸균 플라스틱 팁을 이용하여 20 μl 씩 접종하였다. 접종된 유식물체는 접종 24시간, 48시간 및 72시간 후 병징 정도를 병원균에 의해 무른 조직의 길이를 측정함으로써 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 감자 품종의 무름병 저항성 검정 및 감수성 품종 선발

3-1-1. 잎을 이용한 무름병 검정

정식 후 50일된 감자 식물체의 잎을 이용한 무름병 저항성 검정에서 자심, 조풍 등의 품종이 저항성을 보인 반면, 수미, 남작, 조원 등은 무름병원균에 상당히 감수성임을 알 수 있었다. 또한 자서와 추백도 약한 편이었다. 또한, 감염율이 높은 품종일수록 전체 감염된 잎 중 심하게 감염 (severe)된 비율이 높았다.

Table 5-1. Test of resistance to soft rot of potato varieties by using leaves

Varieties	a) Rates of infection(%)	b) Rates of infection according to the degree of infection (%)		
		c)S	d)M	e)W
Superior	89	45	32	12
Jopung	44	-	11	33
Jowon	89	56	22	11
Irish Cobbler	99	67	22	10
Jasim	43	6	15	22
Jaseo	78	41	28	9
Chubaek	67	34	11	22

a) Rates of infection : Number of infected leaves/Total number of treated leaves×100

b) Rates of infection according to the degree of infection : Number of infected leaves/Total number of treated leaves×100

c)S : Severe

d)M : Medium

e)W : Weak



Fig. 5-1. Resistance to soft rot of potato leaves

Inoculated leaves were incubated in growth chamber of $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours. Especially in the case of 'Superior' and 'Jowon', their leaves were very susceptible to soft rot.

3-1-2. 기내유식물체를 이용한 무름병 검정

기내 증식배지에서 4주간 배양한 기내 유식물체를 이용한 무름병 저항성 검정에서도 자심, 조풍 품종은 저항성을 보인 반면, 수미, 남작, 조원, 자서 등은 매우 약한 편이었으며 추백은 중간 정도의 저항성을 보였다.

3-1-3. 품종 및 배지 종류에 따른 감자식물체 재분화율

무름병원균에 감수성인 것으로 확인된 수미, 남작, 자서, 조원의 재분화 조건을 구축하기 위해 서로 다른 호르몬 조합을 가진 7종의 배지를 사용하여 배양한 결과, 배지5에서 4품종 모두 높은 재분화율을 보였다. 특히, 조원 품종은 93.8%의 매우 높은 재분화율을 보였으므로 무름병 형질전환 재료로 바람직할 것으로 생각되었다.

Table 5-2. Test of resistance to soft rot of potato varieties by using plantlets *in vitro*

Varieties	^{a)} Rates of infection (%)	Degree of infection
Superior	91±5.6	^{b)} S
Jopung	37±4.6	^{c)} W
Jowon	89±7.1	S
Irish Cobbler	95±2.7	S
Jasim	38±5.3	^{d)} W
Jaseo	85±9.1	S
Chubaek	64±3.4	M

^{a)}Rates of infection : Number of infected leaves/Total number of treated leaves×100

^{b)}S : Severe

^{c)}M : Medium

^{d)}W : Weak

Table 5-3. Regeneration rates of potato plants according to varieties and media

Varieties	⁷⁾ Rates of shoot formation (%)						
	Medium1	Medium2	Medium3	Medium4	Medium5	Medium6	Medium7
Superior	0	0	0	11.8±4.3	48.6±9.3	0	0
Irish Cobbler	0	0	0	18.7±3.1	78.4±6.4	0	0
Jaseo	0	0	0	0	27.9±3.1	0	0
Jowon	15.9±2.3 ⁴⁾	29.7±3.4	28.8±2.9	22.7±2.7	93.8±7.8	0	0

⁷⁾Rates of shoot formation : Number of shoots/Number of explants×100

⁴⁾Standard deviation

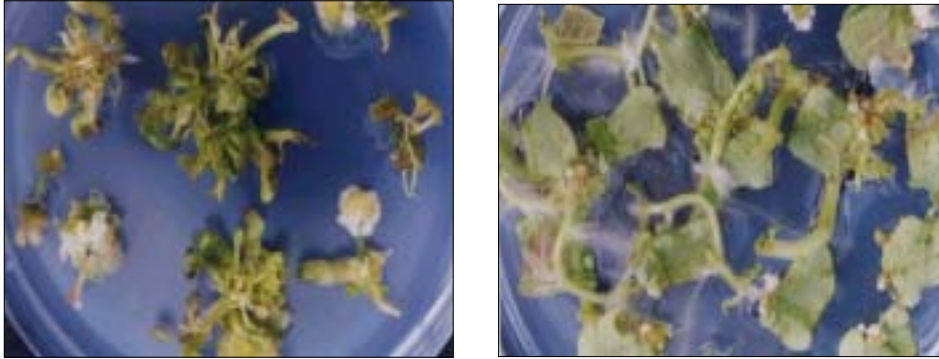


Fig. 5-2. Regeneration of potato plant 'Jowon'

재분화 실험 시에는 pot에 정식한 후 50일 된 감자 식물체의 잎을 채취하여 이용하였다. 채취한 잎은 Tween-20으로 계면활성화된 유효염소농도 0.5% (v/v)의 sodium hypochlorite (NaOCl) 용액 속에 넣은 후 15분간 흔들면서 소독한 후, 멸균된 증류수로 5-6회 세척하였다. 이때 모든 작업은 무균상에서 실시하였으며 이 후 멸균한 여과지를 사용하여 소독된 잎의 수분을 제거하고 사방 1 cm²의 크기로 절단하여 배지5에 치상하였다. 배양실의 온도는 23±1℃로 광주기는 18/6의 조건으로 약 6주 이상 배양하였다.

3-1-4. 아세트실링곤 농도에 따른 감자 품종별 형질전환율

페놀물질의 일종인 아세트실링곤 (acetosyringone)은 *Agrobacterium*의 병원성 유전자를 활성화시켜서 형질전환 효율을 높이는 것으로 알려져 있는데 재분화 실험의 결과에 따라 가장 재분화율이 좋은 배지5를 이용하여 0-100 μM의 아세트실링곤을 처리한 결과, 4품종 모두 75 μM에서 가장 높은 형질전환율을 보였다.

3-2. 감자 식물체의 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축

3-2-1. 형질전환율 최대화를 위한 적정 아세트실링곤 농도

페놀물질의 일종인 아세트실링곤 (acetosyringone)은 *Agrobacterium*의 병원성 유전자를 활성화시켜서 형질전환 효율을 높이는 것으로 알려져 있는데 25, 50, 75, 100 μM의 아세트실링곤을 처리한 결과, 4품종 모두 형질전환율에 있어서는 75 μM 첨가 시 가장 높은 수준을 보였다.

Table 5-4. Effect of acetosyringone concentration on the transformation rates of potato plants

Varieties	Rates of transformation (%)				
	Conc. of acetosyringone (μM)				
	0	25	50	75	100
Superior	^{a)} 30.7 \pm ^{b)} 3.4	35.9 \pm 5.7	44.3 \pm 7.3	58.3 \pm 5.7	41.7 \pm 5.3
Irish Cobbler	19.3 \pm 3.5	27.9 \pm 4.3	48.9 \pm 5.4	65.9 \pm 6.3	49.8 \pm 6.3
Jaseo	4.8 \pm 1.7	7.2 \pm 2.1	18.9 \pm 2.9	28.9 \pm 4.8	13.6 \pm 3.7
Jowon	31.4 \pm 3.6	54.6 \pm 6.9	47.3 \pm 4.8	87.9 \pm 5.3	67.8 \pm 5.9

^{a)} Number of shoots/Number of explants \times 100

^{b)} Standard deviation

Table 5-5. Rates of regeneration and transformation from potato leaves according to acetosyringone concentration

Conc. of AS (μM)	Rates of regeneraton ^{a)}	Rates of transformation ^{b)}
1	43.8 \pm 7.5 ^{c)}	31.4 \pm 3.6 ^{c)}
25	58.3 \pm 4.3	54.6 \pm 6.9
50	53.1 \pm 6.4	47.3 \pm 4.8
75	91.1 \pm 2.9	87.9 \pm 5.3
100	72.5 \pm 4.0	67.8 \pm 5.9

^{a)}Rates of regeneraton : Number of regenerants/Number of explants \times 100

^{b)}Rates of transformation : Number of transformants/Number of explants \times 100

^{c)}Standard deviation

* Conc. of infection : *Agrobacterium* A₆₀₀ 0.7

* Temperature of co-culture : 23°C

* Temperature of selection culture : 25°C

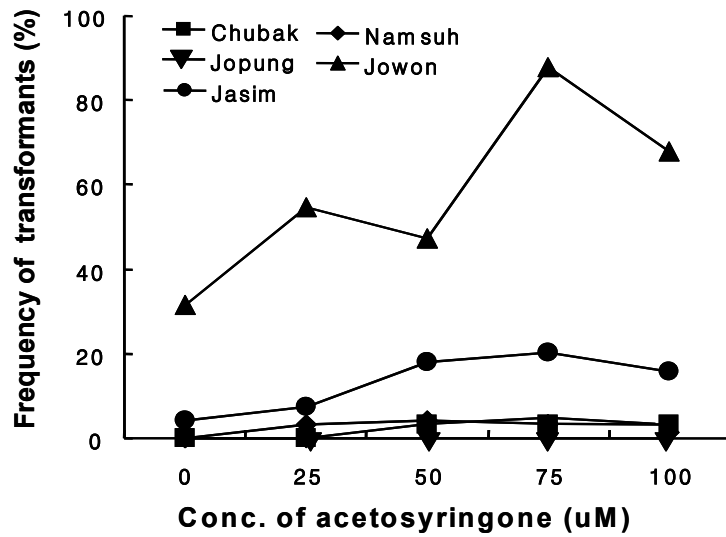


Fig. 5-3. Effect of acetosyringone concentration on the transformation rates of potato plants

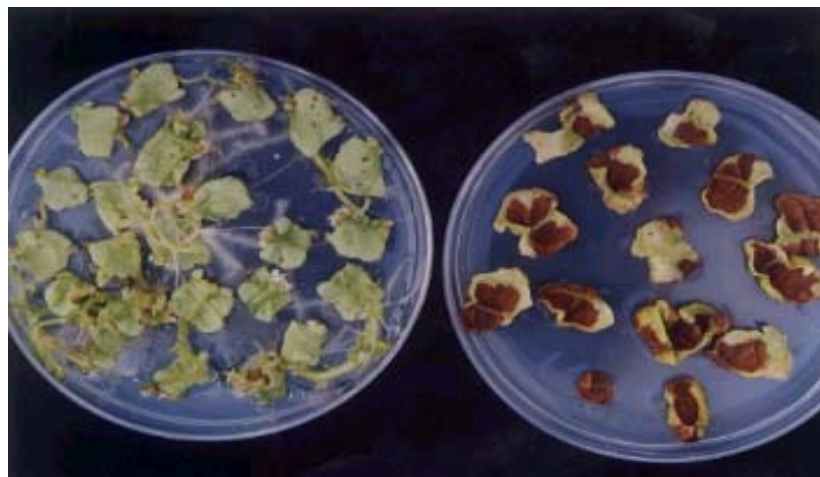


Fig. 5-4. Comparison of potato transformants on the media with and without acetosyringone

Left : Transformants on the meidum with 75 μM acetosyringone

Right : Transformants on the meidum without acetosyringone

3-2-2. 형질전환을 최대화를 위한 적정 *Agrobacterium* 농도

외래 유전자가 감자 식물체로 전이되는 과정에서 재분화율 및 형질전환율이 최고에 이르는 적정 *Agrobacterium*의 접종 농도를 찾아내기 위하여 실험을 수행한 결과, A₆₀₀에서 0.7의 농도로 접종하였을 때 가장 높은 재분화율과 형질전환율을 보였다.

Table 5-6. Rates of regeneration and transformation according to *Agrobacterium* concentration ('Jowon')

Conc. of <i>Agrobacterium</i> (A ₆₀₀)	Rates of regenerants ^{a)}	Rates of transformation ^{b)}
0.5	88.2±4.7 ^{c)}	9.4±2.6
0.7	91.1±2.9	87.9±5.3
1.0	67.4±1.9	56.3±3.7
1.3	45.3±3.2	33.3±1.8

^{a)}Rates of regeneraton : Number of regenerants/Number of explants × 100

^{b)}Rates of transformation : Number of transformants/Number of explants × 100

^{c)}Standard deviation

* Conc. of acetosyringone : 75 μM

* Temperature of co-culture : 23°C

* Temperature of selection culture : 25°C

3-2-3. 형질전환을 최대화를 위한 적정 공배양 시간 및 온도

형질전환 시 *Agrobacterium*과 감자 식물체 간의 공배양 시간과 적정 온도를 찾아내기 위하여 실험을 수행한 결과, 각각 48시간과 25°C에서 가장 높은 재분화율과 형질전환율을 보였다.

Table 5-7. Rates of regeneration and transformation according to co-cultivation time

Time of co-cultivation (hours)	Rates of regeneration ^{a)}	Rates of transformation ^{b)}
24	95.3±7.2 ^{c)}	31.4±3.6
48	91.1±2.9	87.9±5.3
36	57.1±6.1	40.8±2.9

^{a)}Rates of regeneraton : Number of regenerants/Number of explants × 100

^{b)}Rates of transformation : Number of transformants/Number of explants × 100

^{c)}Standard deviation

* Conc. *Agrobacterium* : A₆₀₀ 0.7

* Conc. of acetosyringone : 75 μM

* Temperature of co-culture : 23°C

* Temperature of selection culture : 25°C

Table 5-8. Rates of regeneration and transformation according to co-cultivation temperature

Temperature of co-cultivation (°C)	Rates of regeneration ^{a)}	Rates of transformants ^{b)}
23	93.8±7.3 ^{c)}	47.4±2.5
25	91.1±2.9	87.9±5.3
27	78.0±2.6	67.5±6.8
30	55.3±3.8	33.7±2.8

^{a)}Rates of regeneration : Number of regenerants/Number of explants × 100

^{b)}Rates of transformation : Number of transformants/Number of explants × 100

^{c)}Standard deviation

* Conc. *Agrobacterium* : A₆₀₀ 0.7

* Conc. of acetosyringone : 75 μM

* Temperature of selection culture : 25°C

3-2-4. 형질전환 식물체의 증식 및 보존

감자 식물체에 3년차에 도입할 유전자 대신 control로 외래 유전자를 도입하여 형질전환하였으며 현재 기내에서 계대배양, 증식배양, 선발배양의 상태로 증식하여 보존하고 있다.

가. 형질전환 후 기내 선발 개체 현황

Table 5-9. Status of transformants number *in vitro*

Gene constructs	Selection culture	Sub-culture	Multiplication culture
	Number of plants		
Shiva-PAL	34	36	10
Shiva-35S	78	43	10
RS3	45	27	10

나. 형질전환 개체의 기내 증식



Fig. 5-5. *In vitro* propagation of putative transformants (Left : sub-culture, Right multiplication culture)

3-2-5. 선발된 형질전환체의 PCR 분석

기내에서 선발된 형질전환체는 GMO detect용 PCR primer를 이용하여 PCR한 후 전기영동하여 유전자 도입을 확인하였다.



Fig. 5-6. PCR analysis of putative transformants

3-3. 감자식물체로의 유전자 도입 및 형질전환체 분석

3-3-1. 하이그로마이신 농도에 따른 형질전환율 조사

형질전환시 적정 하이그로마이신 농도 결정할 결정하기 위해 0-30 mg/ℓ의 하이그로마이신을 포함한 선발배지를 조제하여 재분화율을 조사한 결과, 30 mg/ℓ의 농도에서 기주식물체가 전멸하였으므로 30 mg/ℓ가 선발최적 농도임을 확인하였다.

Table 5-10. Rates of regeneration from potato leaves according to hygromycin concentration

Varieties	Hygromycin(mg/L)	Rates of regeneration ^{a)} (%)	Degree of shoot growth	Degree of callus formation
Jowon	0	91.1±2.9 ^{b)}	+++++	+++++
	10	54.3±3.1	+++	++++
	20	32.6±2.1	++	+
	30	0	-	-
Superior	0	43.2±2.9	+++++	+++++
	10	23.1±2.7	+++	+++
	20	9.6±1.3	+	+
	30	0	-	-

^{a)}Rates of regeneration : Number of regenerants/Number of explants × 100

^{b)}Standard deviation

3-3-2. 유전자 구조에 따른 형질전환율 조사

Lactonase를 포함한 서로 다른 5가지 식물형질전환 벡터를 분양받아 감자 식물체로 형질전환하였으며 대상 감자 품종은 ‘조원’과 ‘수미’였다. 형질전환 배지는 2년차에서 사용한 배지와 동일한 조성이었으며 형질전환 방법 또한 2년차와 동일한 방법을 사용하였다. 사용된 5가지 유전자 구조에 따른 감자 형질전환율 조사는 유전자 구조 중 어느 것을 사용하였을 때 형질전환율이 가장 높은지 조사하는데 목적이 있다. 그러나 사용한 5가지 유전자 구조간 형질전환율에 있어서 의미있는 차이는 보이지 않았으며, 품종 간의 차이에 있어서는 ‘조원’ 품종에서 5가지 유전자 구조 모두 24.5-43.6%의 높은 형질전환율을 보여 ‘수미’ 품종에서의 8.6-11.3%의 형질전환율보다 훨씬 높았다.

Table 5-11. Rates of regeneration from potato leaves according to gene constructs

Varieties	Gene constructs	Rates of regeneration ^{a)} (%)	Degree of shoot growth	Degree of callus formation
Jowon	#904	24.5±1.7 ^{b)}	++	++
	#916	32.9±1.9	+++	++
	InV	30.9±2.2	+++	+++
	PinII	31.1±1.7	++	++
	AMV	43.6±2.8	+++	+++
Superior	#904	11.3±1.1	++	++
	#916	8.6±3.2	+	++
	InV	9.5±2.1	++	+
	PinII	8.9±1.8	++	+
	AMV	9.7±1.5	++	++

^{a)}Rates of regeneration : Number of regenerants/Number of explants × 100

^{b)}Standard deviation

3-3-3. 선발된 형질전환체의 PCR 분석 결과

선발된 감자 형질전환체의 유전자 분석을 통하여 실제로 목표 유전자가 도입되었는지의 여부를 여러 가지 방법을 이용하여 조사하였다. 이는 외래 유전자가 감자 식물체로 전이된 후 실제로 DNA와 RNA 등의 수준에서 발현하는지의 여부를 조사하는데 그 목적이 있다.

가. CaMV35S promoter를 이용한 PCR 분석

사용한 유전자의 promoter 부위인 CaMV35S promoter부위에서 primer를 제작하여 PCR 반응을 시킨 결과, 선발된 대부분의 계통에서 기대하는 약 189 bp의 밴드를 얻을 수 있었다.

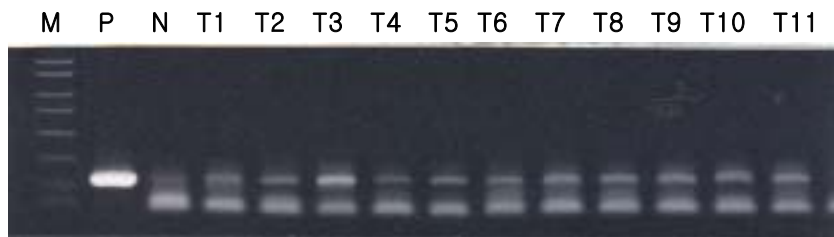


Fig. 5-7. Analysis of PCR of transformants by using CaMV35S promoter

나. NOS primer를 이용한 PCR 분석결과

사용한 유전자의 terminator 부위인 NOS terminator 부위에서 primer를 제작하여 PCR 반응을 시킨 결과, 선발된 대부분의 계통에서 기대하는 약 195 bp의 밴드를 얻을 수 있었다.

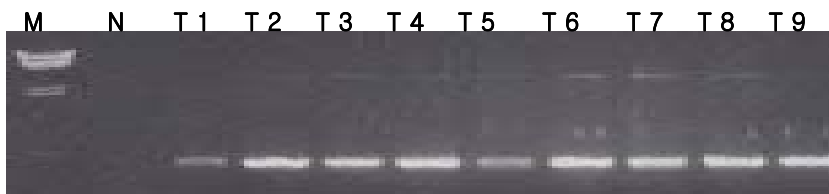


Fig. 5-8. Analysis of PCR of transformants by using NOS terminator

다. Electrophoresis of RT-PCR products (NOS)

PCR 분석에 의해 유전자의 도입이 확인된 형질전환체들은 계대배양을 거쳐 기내 증식 후 total RNA 분리 후 Intron Biotechnology 사의 pre-mix를 이용하여 RT-PCR 후 전기영동하여 유전자 전사 여부를 확인하였다. 확인 결과, 비형질전환체에서는 발견할 수 없는 약 195 bp의 밴드를 대부분의 형질전환체에서 발견할 수 있었다.



Fig. 5-9. Electrophoresis of RT-PCR (NOS) of transformants confirmed by PCR

3-3-4. 유전적 안정성이 확인된 형질전환체의 기내증식 및 순화

PCR 및 RT-PCR을 통해 유전자의 발현이 확인된 형질전환 개체들은 기내 증식과 순화를 거쳐 온실에서 화분 증식을 거쳐야 한다. 기내 보존은 고체상태의 계대배양 배지를 이용하였으며 신초의 급속증식은 액체상태의 신초증식 배지를 사용하였다. 기내유식물체는 배양실에서 배양기 뚜껑을 열어 순화시킨 후 온실에서 차광막을 이용하여 순화시키고 있다.



Fig. 5-10. *In vitro* propagation of transformants

3-3-5. 무름병 저항성 검정

PCR과 RT-PCR를 통하여 유전자 도입의 안정성이 확인된 계통들을 기내증식시켜 무름병원균을 접종해 보았다. 무름병원균 (*Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*)을 계대배양하여 농도를 10^4 cfu/ml로 맞춘 후 액체증식배지에서 약 3주간 생육시킨 감자유식물체 신초 3-4개에 상처를 준 후 멸균 팁으로 20 μ L씩 접종하였다. 감자 유식물체는 비교적 증식이 쉽고 생육기간이 길지 않으며 동시에 같은 크기의 유식물체로 새육시킬 수 있을 뿐 아니라 병원균의 접종 등 처리가 간편하고 균일한 접종환경을 제공할 수 있으므로 형질전환체의 병저항성 screening에 좋은 방법으로 생각되었다. 접종 결과, #916와 PinII에서 비형질전환 계통보다 증상의 지연이 보였다. 접종 24시간 후에 이 2계통을 제외한 형질전환체에서 줄기의 심한 괴사증세가 나타나는 것에 비해 이 2계통에서는 이러한 증세의 지연 관찰되었으며, 접종 48시간 및 72시간이 되자 무름병 증상이 나타났으나 다른 계통들에 비해 확연히 증상이 지연됨을 알 수 있었다. 나머지 형질전환 계통들은 접종 48시간 후부터 심한 줄기괴사현상을 보이면서 72시간 후에는 조직이 완전히 녹아버린 듯한 전형적인 무름병 증세를 보였다. 이와 같은 현상은 여러 가지 이유로 설명될 수 있겠으나 다른 종으로부터 분리된 유용 유전자를 이용하여 식물체를 형질전환시킬 경우 식물세포에서의 발현이 정상적으로 이루어질 수 있도록 염기의 일부를 변경시켜 주는 방법이 필요한 경우도 있다. 이는 유전정보의 해독과정에서 종간에 서로 다른 codon usage를 나타낼 수 있다는 보고 (Lafay 등, 1999) 등을 통해서도 그 요인을 찾을 수 있겠다.

기내 접종 실험은 앞에서 언급한 바와 같이 균일한 조건의 접종 환경을 제공할 수

있으나 병을 유도하는 경향이 강하므로 포장조건에서의 병저항성 검정실험이 반드시 필요하다. 또한 형질전환시킨 감자는 국내에서 가장 널리 재배되고 있는 ‘수미’ 품종과 매우 높은 재분화율을 가진 ‘조원’ 품종이므로 향 후 형질전환 감자 품종으로 이용될 가치가 매우 높다. 그러므로 실제로 이들 품종을 대상으로 형질전환한 이들 계통이 포장에서 그들의 농업적 형질을 유지하고 있는지의 여부를 조사하기 위하여 실제로 재배하여 농업적 특성을 조사해볼 필요가 있다. 그러므로 이들 형질전환 계통들은 기내 증식을 거친 후 순화과정을 거쳐 포장 증식을 거친 후 반드시 포장검정을 거쳐서 보다 진전된 결과를 얻을 수 있어야 한다고 생각한다.

Table 5-12. Test of resistance to soft rot by using *in vitro* plantlets

Clones	Length of necrosis ^{a)} (mm)		
	time after infection (hours)		
	24	48	72
Control	43.3±5.64 ^{b)}	55.5±3.67	58.3±4.36
#904	38.5±3.32	54.3±4.53	61.3±6.58
#916	5.4±1.32	16.2±5.63	27.4±1.51
InV	40.3±5.43	59.3±2.34	65.3±2.65
PinII	9.0±4.32	22.4±5.43	29.0±4.32
AMV	37.6±5.30	49.6±2.25	61.4±3.62

^{a)}Length of necrosis

^{b)}Standard deviation



Fig. 5-11. Resistance to soft rot of transformants *in vitro*

1: Non-infection, 2: Control, 3: #904, 4: #916, 5: InV, 6: PinII, 7: AMV

4. 결론

Lactonase를 포함한 서로 다른 5가지 식물형질전환 벡터를 분양받아 감자 식물체로 형질전환하였으며 대상 감자 품종은 ‘조원’과 ‘수미’였다. 사용한 5가지 유전자 구조간 형질전환율에 있어서 의미있는 차이는 보이지 않았으며, 품종 간의 차이에 있어서는 ‘조원’ 품종에서 5가지 유전자 구조 모두 24.5-43.6%의 높은 형질전환율을 보여 ‘수미’ 품종에서의 8.6-11.3%의 형질전환율보다 훨씬 높았다. 선발된 감자 형질전환체의 유전자 분석을 통하여 실제로 목표 유전자가 도입되었는지의 여부를 PCR 및 RT-PCR 방법을 이용하여 조사하였다. PCR 및 RT-PCR을 통해 유전자의 발현이 확인된 형질전환 개체들은 기내 증식과 순화를 거쳐 온실에서 화분 증식을 거치고 있다. PCR과 RT-PCR를 통하여 유전자 도입의 안정성이 확인된 계통 들을 기내증식시켜 무름병원균(*Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*)을 접종해 보았다. 접종 결과, #916와 PinII에서 비형질전환 계통보다 증상의 지연이 관찰되었다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

무름병 원인 유전자 분리 및 이를 조절하는 신호전달물질 (autoinducer)을 분리하며 이 autoinducer를 분해하는 효소를 분비하는 미생물을 토양에서 분리하고 해당 유전자를 분리하여 벡터에 클로닝하고 이를 감자에 형질전환시켜 무름병 저항성 형질 전환 감자를 얻는 것을 최종 목표로 하여 추진한 연구과제는 Table 4-1에 기술한 바와 같이 연도별 목표에 근거하여 성공적으로 수행할 수 있었다.

Table 4-1. Achievement of the research aims based on the annual plan

구분	작 안 사 항	척도	성취 여부
1차년도 (2002)	▶무름병에 감수성인 감자 품종 선발	20점	○
	▶선발된 감자 품종에 대한 적정 배지 조건 및 배양 방법 구축	20점	○
	▶식물 분해효소 등과 같이 발병 관련 유전자 분리	20점	○
	▶병원성 인자 (AHL-lactone 유도체) 분리 확인 및 화학적 합성	20점	○
	▶병원성 인자 분해 균주선별을 위한 bioassay 확립 및 선별	20점	○
2차년도 (2003)	▶재분화율 및 형질전환율 향상을 위한 배양 조건 구축	20점	○
	▶선별균주의 유전자 은행 제조	20점	○
	▶무름병저항성 유전자 구조분석	20점	○
	▶효소활성측정 및 생화학적 특성	20점	○
	▶효소분해산물 확인	20점	○
3차년도 (2004)	▶ <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 감자형질 전환 및 기내 선발 실시	50점	○
	▶형질전환 감자 식물체의 유전자 도입 확인	50점	○

제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

본 연구의 최종 목표인 무름병 저항성 감자 개발에서 제초제 저항성 식물처럼 완벽한 형질전환체를 얻지 못하였지만 일부 형질전환체에서는 발병의 지연현상을 보여 주는 것은 앞으로 이 방면 연구에 대해 고무적이다. 다수 유전자의 무름병관련 유전자

의 성공적인 형질전환기술의 확립은 앞으로 동일분야의 기술발전에 기여할 수 있을 것으로 생각되며 이 방법의 기초적인 제반연구 기술을 확립하게 되었다. 따라서 이를 토대로 하여 관련 유전자의 타 식물 형질전환에 이용될 수 있을 것이며 본 연구를 통하여 클로닝한 유전자는 국내외의 유전자 상호교류를 통하여 협력증대 방안을 모색할 수 있을 것이다. 앞으로 보다 심도 있는 연구를 통하여 고부가 가치성의 기술에 대한 연구기반을 제공함으로써 국내시장 및 세계시장 진출의 교두보를 마련할 수 있을 것이다. 금후 추가적인 연구를 통하여 이미 확립된 기술을 바탕으로 보다 우수한 무름병 저항성 품종 생산이 요구된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 종자 식물에서의 형질전환 실험

본 실험에서는 감자의 괴경을 분리하여 형질전환 결과를 얻은 것이므로 앞으로 종자 검정을 통한 실험이 요구된다. 즉, 형질전환된 종자를 통한 F1 교배, F2 교배를 통하여 형질전환된 유전자의 안정성 및 multi copy insertion을 통하여 병 저항성을 보다 높일 수도 있을 것이다.

2. 부위특이발현 프로모터 탐색

감자의 분자유종에 이용될 조절유전자용 프로모터를 확보하기 위해 우선 식물의 extracellular space로 분비될 수 있으며 그 발현이 유도되는 조절유전자를 스크리닝한다. 이를 위해 감자 및 감자와 근연관계가 가까운 식물에서 extracellular space로 분비하는 시스템을 조사할 필요가 있다. Fig. 1-1에서처럼 본 실험에서의 저항성 유전자 산물인 AHL lactonase는 trafficking target는 cytosol이다. Cytosol 공간에 식물병원균이 있다는 것은 이미 병원균이 식물세포를 분해하여 세포벽을 화해시킨 후이기 때문에 식물이 생성한 신호물질 분해효소가 이를 격퇴하기에는 중과부적일 수도 있을 것이다. 따라서 때문에 식물의 extracellular space로 분비할 수 있는 새로운 system 구축으로 침입하는 식물병원균 혹은 병 발생 신호물질을 전방위적 위치에서 보다 효율적으로 방제할 수 있을 것이다.

여기서 주목할 점은 현재까지 가장 완벽하고 성공적인 제초제 저항성 GMO 작물의 작용기작을 참고할 필요가 있다. 제초제 분해효소를 생성하는 *bar* gene은 본래 토양미생물의 일종인 방선균에서 유래한 것이다. 이 효소의 제초제 저항성 기작은 화학 제초제를 식물에 투여하면 이들이 작물의 세포벽을 통하여 식물내부 cytosol까지 침투하는데 이 때 GMO 작물에서는 *bar* gene의 생산물이 cytosol 내로 들어오는 제초제를 분해하여 완벽한 저항성 기작을 나타내는 것이다. 따라서 이러한 형질전환작물은 재배 중에 고농도의 제초제를 투여하여도 정상적인 생육이 가능하며 선택적으로 저항성이 없는 잡초들은 생육을 하지 못하고 제거되는 것이다.

지금까지 전 세계적으로 많은 식물병 저항성 유전자 및 저항성물질들이 많이 연구, 개발되었지만 제초저항성 유전자처럼 완벽하게 실용화되지 못하는 것은 작용의 완벽성을 기하지 못하거나 식물에 도입된 유전자의 정상적인 발현이나 protein trafficking system이 기주식물과 조화를 이루지 못하기 때문이다. 또 다른 문제점으로 제초제 저항성 기작처럼 방제할 target가 단순한 물질로 생물체에서 직접 생성되지 않은 화학합성물질이기 때문에 기주는 이 target를 비교적 쉽게 처리할 수 있을 것이다. 그러나 무름병 신호물질처럼 생물세포에서 직접 생산되고 생산되는 시기, 방법, 생산양 등이 병원균은 식물의 상태에 따라서 역동적으로 변화할 수 있기 때문에 수동적인 식물은 이에 효과적으로 대처할 수 없는 단점이 있을 것이다. 앞으로 이러한 문제를 극복하기 위하여 생태관련 기초적 연구가 촉구된다.

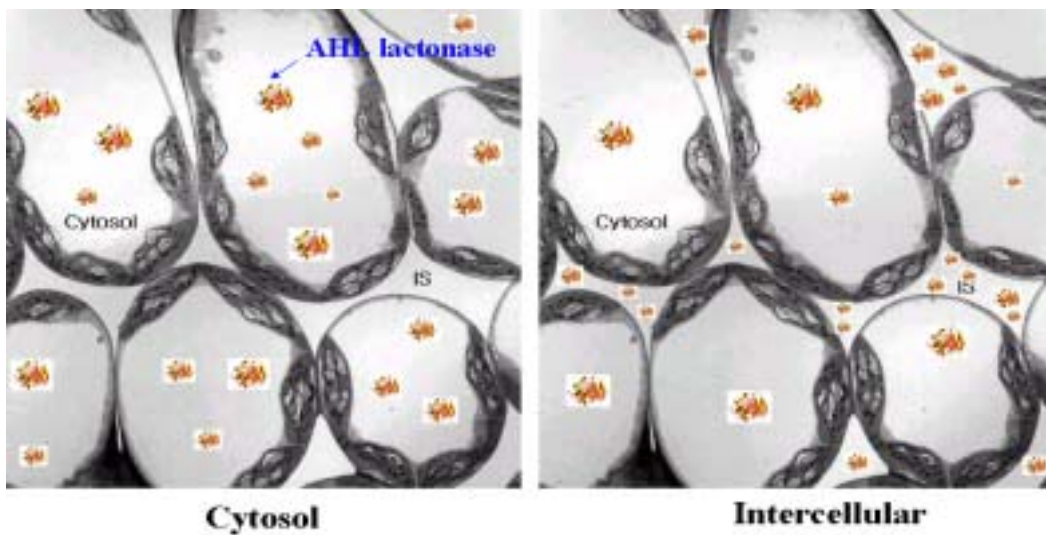


Fig. 1-1. Localization of AHL lactonase

3. 고발현 프로모터 탐색

본 실험에서는 실험기간의 문제로 병 저항성 실험을 기내에서 행하였으나 앞으로 필드실험을 통하여 보다 구체적인 자료를 확보하여 향후 실험에 대비가 가능할 것이다. 형질전환체의 병발생 저항성 실험에서 기내에서의 실험이기 때문에 기내의 조건

에서는 세포 증식에서 매우 유리하다. 다시 말하면 세포가 증식하는 속도는 감자에 비하여 비교되지 않을 정도로 월등히 빠르기 때문에 식물의 대사와 세포증식 속도의 차이로 인하여 신호전달물질을 분해하는 물질생산 균형을 맞출 수가 없을 것이다. 접종하는 병원균의 수와 식물의 세포의 상대적 수가 자연계의 비율과 유사해야 할 것으로 생각된다. 비록 완전하지 못하였지만 약리작용 차별성 원인 등을 통하여 앞으로 이 방면의 연구방향 설정에 발전적인 방향 제시를 해주고 있다.

본 실험의 결과는 아직 만족할 만한 저항성을 보여 주지 못하였지만 2종의 유전자의 감자형질전환체에서는 병 발생 지연의 효과가 있다는 것은 주목할 필요가 있다. 무름병에서는 식물의 제초저항성 유전자처럼 완벽을 기하기 어려울 것으로 사료된다. 그러나 병발생의 지연은 병원체에 대한 저항력의 존재가 있다는 것을 의미한다. 실제적 농업생산에서 무름병에 약한 작물은 감자와 배추를 대표적으로 들 수 있는데 이들 작물들은 공통적으로 고냉지 혹은 겨울재배를 행하고 있다. 이의 주된 이유는 작물과 식물병원균 수의 싸움이다. 즉, 고냉지 혹은 겨울재배를 통하여 저온 상태로 유지되어 병원균이 기주를 침입할 정도의 숫자를 제한함으로써 안전하게 작물을 재배하는 것이다. 그러나 이러한 조건에서 기온의 급상승으로 인한 예기치 못한 무름병 피해를 볼 수 있다. 따라서 무름병의 완벽 방제를 추구하기 보다는 앞으로 병지연의 연구에 초점을 맞추어야 할 것이다. 병지연의 의미는 매우 의미 있는 것으로 생각되는데 앞으로 우리나라도 점차 기후가 아열대화되고 있는 실정이며 이에 대한 문제점이 발생하고 있다. 예를 들면 초창기의 고냉지는 해발 500-600m에서도 작물재배가 가능하였는데 현재는 보다 높은 지역으로 이동해야만 안전하게 작물을 재배할 수 있으며 전남 해남의 겨울재배 지역에서 배추 무름병 피해는 해마다 증가하고 있는 실정이다. 즉, 무름병 발생의 효과적인 지연으로 재배지역의 확산, 재배기간의 연장, 재배지역고도의 해발문제 완화를 의미한다. 다른 세균병의 발생 피해도 이러한 맥락에서 해석될 수 있을 것이다. 즉, 겨울 기간의 단축 및 기온 상승으로 기주 개체의 겨울나기를 용이하게 함으로 이듬해 병 발생이 보다 확산되는 현상이라고도 볼 수 있을 것이다.

Fig. 1-2.에서와 같이 작물과 무름병균은 상호 수적인 싸움일 수도 있다. 병원성의 숫자를 줄이기 위해 신호물질량을 증대시키는 것이다. 그러나 고온기간 중에는 무름병균이 마치 여름철의 게릴라성 호우처럼 작물을 공격하기 때문에 이러한 싸움의 병목점 (threshold)이 어디인가를 결정한다는 것은 용이하지 않을 것이다. 기회적 무름병균이 항상 작물의 근권이나 엽권에서는 서식처에서 존재하며 이들의 생존을 억제하기 위해 이들의 생존에 불리한 영양조건, 물리적 조건을 조성하여 자연생태계에서 인위적으로 특정미생물의 제어적 환경조건을 만들어 준다는 것도 용이하지 않다. 따라서 이후 실험에서 감자 무름병 저항성 유전자의 고발현 즉, transcriptional efficiency를 높이기 위해 promoter downstream region에 각종 leader sequence 및 signal

sequence를 변형하거나 병합하여 고발현 프로모터 시스템 구축도 필요할 것이다.

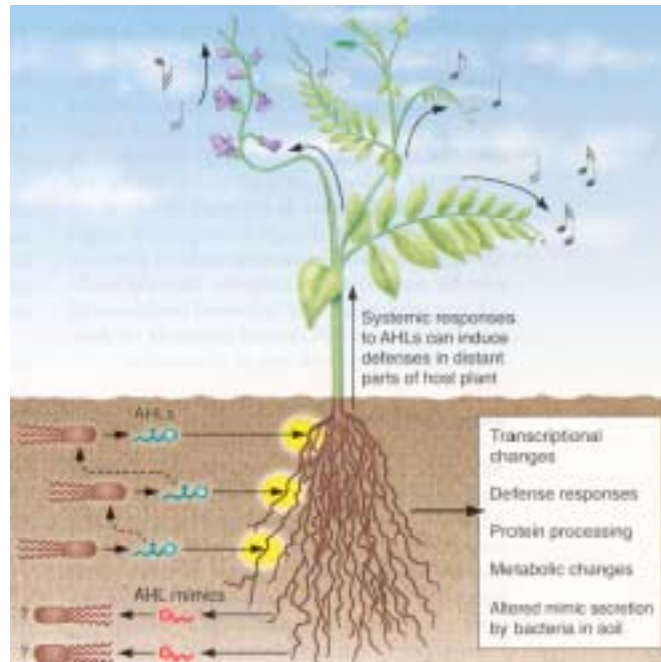


Fig. 1-2. A eukaryotic host listens to bacterial AHL conversations. AHLs produced by associated bacteria are detected by both the host and bacteria. The host responds by altering many functions, including defences, metabolism and production of AHL mimic compound. Systematic responses to the bacterial AHLs can induce defences in distant parts of the host.

4. 식물병원균 세포 내의 신호물질 합성 단계의 저해

최근의 연구 결과로 Whitely 등은 원핵세포도 고등생명체에서 커뮤니케이션을 위해 이용하고 있는 기작과 유사한 vesicle trafficking system을 가지고 있으며, 원핵세포의 vesicle trafficking system이라는 신호물질의 전달에 관한 새로운 기작을 밝혔다. Vesicle의 사용은 특정 환경에서 소수성의 신호물질과 항생물질의 이동이 용이하며, vesicle에 농축된 형태로 이들 물질들을 과량으로 주변의 세균들에게 전달할 수

있다는 연구 결과이다. 앞으로 무름병균에도 이러한 연구가 있어야 되겠지만 이러한 가설이 감자 무름병균에도 적용이 된다면 이에 대한 대책이 필요할 것이다. 다시 말하면 무름병균에서 생성되는 HHL, OHHL 등의 신호물질이 수용성이 아니기 때문에 이들이 cytosol에서 생산되어 밖으로 이동될 때 vesicle trafficking system을 이용할 가능성이 있다.

Fig. 1-3은 신호물질 AHL 합성에 대한 유전적 분석을 통해 AHL 합성단백질이 아미노산 생합성 과정의 S-adenosylmethionine (SAM)과 지방산 생합성 과정의 acyl carrier protein (acyl-ACP)의 결합을 촉매하여 AHL 신호물질을 합성된다는 것을 나타낸 그림이다. 이 때 SAM은 homoserine lactone 부분을 제공하고 acyl-ACP가 다양한 acyl chain의 주요 공급원으로 사용된다. AHL 합성경로는 세균에만 존재하기 때문에 AHL 생합성을 위한 최종효소인 LuxI homologue들은 Anti-QS을 위한 주요 표적이 될 수 있다. AHL 합성을 위한 acyl side chain을 공급하는 지방산 대사의 차단은 anti-quorum sensing을 위한 또 다른 표적이 될 수 있다. 이에 대한 연구로 Hoang과 Schweizer는 FabI (enoyl-ACP reductase)이 *in vitro*에서 AHL 합성을 위한 기질 공급에 주된 역할을 하는 것으로 보고하였다. *P. aeruginosa*의 *fabI* 변이주는 야생주보다 50% 정도 적은 양의 BHL과 OdDHL을 생산하였고, 실제로 enoyl-ACP reductase의 저해제인 triclosan은 AHL 합성을 감소시켰다. 따라서 FabI을 저해하기 위해 디자인된 저해제들은 QS의 신호물질 합성 단계를 차단함으로써 세균의 발병력을 약화시킬 수 있을 것이다. 감자 무름병균에서도 이러한 합성중간단계의 효소를 target로 한 저항성 기작을 연구할 필요가 있다. 한편 기주 식물에 무름병균의 신호전달물질과 유사한 mimics를 생성하여 신호체계를 교란시켜 식물병원균의 밀도를 줄이는 방법도 있을 것이다.

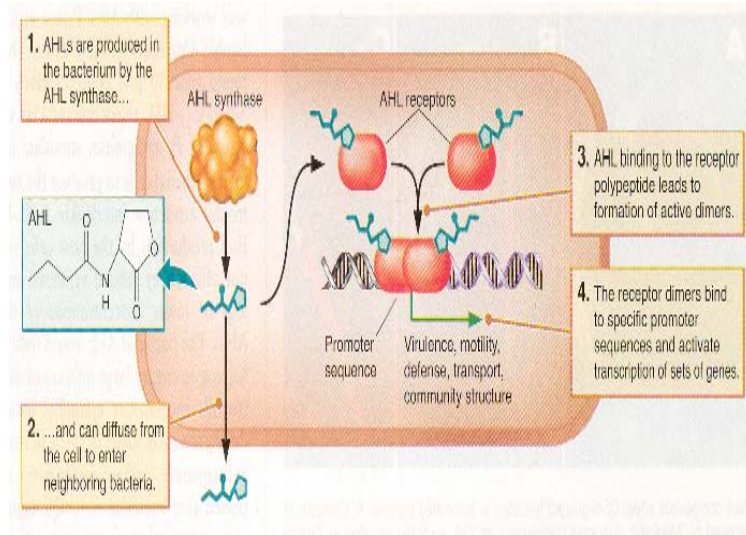


Fig.. 1-3. Molecular mechanics of AHL-mediated QS. AHLs are produced in the bacterium by the AHL synthase and can diffuse from the cell to enter neighboring bacteria. AHL binding to the receptor polypeptide leads to formation of active dimers. The receptor dimers bind to specific promoter sequences in the bacterial genome and activate transcription of sets of genes.

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 기술적 측면

- ▶ 무름병 저항성 품종 육종으로 감자의 안정적 다수확 생산에 기여
- ▶ 우수 내병성 유전자원의 타 작물에 도입가능
- ▶ 생물적 생산 시스템에 기반을 둔 환경친화적 기술로 미래의 청정기술 및 대체기술로 그 중요성은 지속성장을 위한 생명공학의 기본로 강조될 것이다.
- ▶ 인력양성효과: 21세기는 정보산업과 더불어 생명산업이 가장 중요한 산업으로 대두되므로 관련분야의 고급인력을 양성할 수 있는 기반 확보

2. 경제·산업적 측면

- ▶ 농약사용 절감에 의한 환경오염 방지
- ▶ 국민에게 청정 농산물을 공급
- ▶ 고부가가치 기술개발로 유용물질의 유전자원 확보, 지적소유권 확보 가능.

3. 활용방안

- ▶ 기주-병원균간에 있어서 병원성의 발현, 기주특이성, 기주저항성 유전자의 분리 연구로 새로운 병 저항성 형질전환체 창출을 위한 기초 model system 개발
- ▶ 형질전환체에서 병저항성을 위한 기주에서의 발현부위 최적 시스템 구축
- ▶ 새로운 활성을 갖는 효소의 개발로 생물농약개발의 다양화

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 소낭을 이용한 세균의 커뮤니케이션

많은 세균들은 화학적 신호물질의 자유로운 확산을 통하여 상호간의 커뮤니케이션을 하며 개체의 집단 행위를 조절한다. 그러나 몇몇 신호물질은 극소수성의 성질을 가지고 있어 물에 거의 녹지 않는다. 지금까지 세균들이 어떻게 소수성의 신호물질을 동료 또는 적에게 전달하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다. Whitely 등은 병원균인 *Pseudomonas aeruginosa*가 같은 종의 다른 세균에게 메시지를 전달하기 위해 소수성의 신호물질을 단순히 분비하는 것이 아니라 거품 같은 소낭 (vesicle)으로 방출시킨다는 사실을 밝혔다.

*P. aeruginosa*은 어떻게 그들의 언어를 다른 세균의 방해 없이 같은 종의 다른 세균들 사이로 전달할 수 있을까? Whitely 등은 많은 그람 음성세균들이 기주와 다른 세균에게 독소를 전달하기 위해 그들의 막으로부터 직경 50 nm의 작은 vesicles을 분비한다는 사실로부터 신호물질 전달에 대한 단서를 발견하였다. 이들 vesicle은 지질 이중막로 구성되어 있어 액체 core를 싸고 있는 지질 표면에 소수성의 독소를, 액체 core에는 단백질 독소를 함께 전달할 수 있다. *P. aeruginosa*의 신호물질들 중 AHL 계열들은 대부분 배양액에 존재한 반면 PQS와 구조적으로 PQS와 유사한 다른 종류의 quinolone/quinoline이 vesicle에서 발견되었다. 또한 vesicle은 PQS에 의해 조절되는 유전자의 발현 조절과 그람 양성 세균에 대한 항생물질인 quinolone/quinoline의 항균 작용과 같은 생물학적 활성을 보여 주었다. PQS는 단독으로 *P. aeruginosa*의 vesicle 형성을 유도하여 PQS 뿐만 아니라 다른 종류의 quinolone/quinoline을 vesicle로 포장한다는 사실을 알 수 있다.

Whitely 박사팀은 원핵세포도 고등생명체에서 커뮤니케이션을 위해 이용하고 있는 기작과 유사한 vesicle trafficking system을 가지고 있으며, 원핵세포의 vesicle trafficking system이라는 신호물질의 전달에 관한 새로운 기작을 밝혔다. Vesicle의 사용은 특정 환경에서 소수성의 신호물질과 항생물질의 이동이 용이하며, vesicle에 농축된 형태로 이들 물질들을 과량으로 주변의 세균들에게 전달할 수 있으며, 다른 세균들에 의한 PQS의 분해를 막을 수 있다는 장점이 있을 것이다. 반면 연구팀은 vesicle 형성의 저해가 *P. aeruginosa*의 감염에 의한 섬유성낭포증 (cystic fibrosis)의

치료에 도움을 줄 수 있을 것이라고 기대하고 있다.

제 2 절 신호물질 mimics를 통한 신호전달교란

기초적인 연구에 머물러 오던 quorum sensing에 관한 연구가 최근 새로운 개념의 길항제를 개발하기 위한 표적으로 부상하면서, Anti-Quorum Sensing (Anti-QS)을 위한 전략 개발 및 관련 표적들의 발굴과 같은, 세균병 제어를 위한 새로운 접근방법이 시도되고 있다. QS의 신호전달 체계의 교란을 위한 Anti-QS 전략으로서 QS의 신호물질 발생, 신호인식과 신호전달에 관여하는 주된 구성 요소들이 표적이 될 수 있다.

AHL 신호물질은 LuxR 형태의 조절단백질과 결합하여 유전자의 발현을 조절한다. 따라서 AHL과 구조적으로 유사하여 조절단백질의 결합부위에 대해 경쟁적으로 결합할 수 있는 AHL 길항제 (antagonist) 개발은 핵심적 Anti-QS 전략 중 하나이다. AHL 길항제는 AHL을 대신하여 세균의 LuxR 형태의 조절단백질과 결합하여 조절단백질의 안정성과 이량체 형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 대표적인 예로 조류의 일종인 *Delisea pulchra*가 생산하는 대사산물인 halogenated furanone은 AHL을 통해 조절되는 유전자 발현을 저해하여 주위의 병원성 세균에 의한 침입으로부터 자신을 보호할 뿐만 아니라, *E. carotovora*와 *V. harveyi*에서 AHL에 의한 병원성 유발을 억제하였다. AHL은 LuxR 형태의 조절단백질과 안정한 결합체를 이루어 조절단백질이 쉽게 분해되지 않도록 보호하는 반면, halogenated furanone은 오히려 조절단백질의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이러한 연구를 바탕으로 최근에는 furanone 유도체를 합성하였고, 이 중 furanone C-30이라 명명된 화합물은 *P. aeruginosa*에서 발병력 인자의 생성을 감소시켰으며, 생물막 형성에도 영향을 미쳐 SDS와 tobramycin에 대한 감수성을 높였다. Holden 등은 *P. aeruginosa* 배양 상등액으로부터 AHL biosensor를 활성화할 수 있는 두 종의 화합물을 밝혀내었다. 분석결과 이들 화합물은 AHL이 아니라 diketopiperazine (DKP)인 cyclo (ΔAla-L-Val)과 cyclo (ΔPro-L-Tyr) 물질들로서, 동일한 결합부위에 대하여 다른 AHL과 경쟁하여 유전자의 발현을 활성화하거나 억제하였다. 이러한 화합물들의 기능은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 세균들의 신호 전달 기작들 사이에 cross talk의 가능성뿐만 아니라 Anti-QS를 위한 길항제의 개발 가능성을 보여준다. 이와 같이 AHL 길항제의 개발은 세균의 감염을 제어하기 위한 새로운 치료제로서의 가능성을 제시하고 있다. 일부의 조류가 AHL 길항제인 furanone을 생산한다는 사실로부터 다른 종류의 고등식물

이나 동물이 병원성 세균에 대한 방어 기작으로서 세균의 신호전달을 방해하는 물질을 생산할 수 있으리라 추정할 수 있으며, 이것은 앞으로의 새로운 항생제 탐색에 중요한 전략이 될 수 있을 것이다.

제 7 장 참고문헌

Aboulwafa, M., Hvorup, R., and Saier Jr, M. H. Dependency of sugar transport and phosphorylation by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system on membranous phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*: studies with a *pssA* mutant lacking phosphatidylserine synthase. *Arch. Microbiol.* 181, 26-34 (2004)

Agrios, G. N. How plants defend themselves against pathogens. *Plant Pathology* 3rd ed. Academic Press. London. pp. 97-115 (1988).

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)

Alzari, P. M., Souchon, H., and Dominguez, R. The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure* 4, 265-275 (1996)

An, C. L., Lim, W. J., Hong, S. Y., Kim, E. J., Shin, E. C., Kim, M. K., Lee, J. R., Park, S. R., Woo, J. G., Lim, Y. P., and Yun, H. D. Analysis of *bgl* operon structure and characterization of β -glucosidase from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2270-2278 (2004).

An, C. L., Lim, W. J., Hong, S. Y., Shin, E. C., Kim, M. K., Lee, J. R., Park, S. R., Woo, J. G., Lim, Y. P., and Yun, H. D. 2004. Structural and biochemical analysis of the *asc* operon encoding 6-phospho- β -glucosidase in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. *Res. Microbiol.* 156, 145-153 (2004).

An, G., Ebert, P. R., Mitra, A., and Ha, S. B. Binary Vectors. In : Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A., Verma, D. P. S. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publisher, Boston, PMAN-A3, 1-19 (1988).

Arce, P., Moreno, M., Gutierrez, M., Gebauer, M., Dell'Orto, P., Torres, H., Acuna, I., Oligier, P., Venegas, A., Jordana, X., Kalazich, J., and Holuigue, L. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. *Amer. J. Potato Res.* 76, 169-177 (1999).

Asanuma, N. and Hino, T. Molecular characterization of HPr and related enzymes, and regulation of HPr phosphorylation in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Arch. Microbiol.* 179, 205-213 (2003).

Aymeric, J. L., Guiseppi, A., Pascal, M. C., and Chippaux, M. Mapping and regulation of the *cel* genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Gen. Genet.* 211, 95-101 (1988).

Bauer, W. D. and Mathesius, U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 429-433 (2004).

Beguín, P. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 219-248 (1990).

Birch, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 297-326 (1997).

Blosser, R. S., and Gray, K. M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for *N*-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Methods.* 40, 47-55 (2000).

Blosser-Middleton, R. S. and Gray, K. M. Multiple *N*-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *J. Bacteriol.* 183(23), 6771-6777 (2001).

Boman, H. G. and Hultmark, D. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 103-126 (1987).

Boyer, M. H., Cami, B., Koutoujansky, A., Chambost, J. P., Frixon, C., and Cattaneo, J. Isolation of the gene encoding the major endoglucanase of *Erwinia chrysanthemi* homology between *celZ* genes of two strains of *Erwinia chrysanthemi*. FEMS Microbiol. Lett. 41, 351-356 (1987).

Boylan, M., Graham, A. F., and Meighen, E. A. Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*. J. Bacteriol. 163, 1186-1190 (1985).

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).

Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., and Rahme, L. G. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(25), 14613-14618 (2001).

Centiner, S. The introduction into tobacco plants with genes which encode some of the natural components of the humora : immune response of *Hyalopliora cecropia*. Ph. D. Dissertation Louisiana State University. (1990).

Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., and Farrand, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. Mol. Plant Microbe Interact. 11, 1119-1129 (1998).

Chastanet A., Prudhomme, M., Claverys, J. P., and Msadek, T. Regulation of *Streptococcus pneumoniae clp* genes and their role in competence development and stress survival. J. Bacteriol. 183(24), 7295-7307 (2001).

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., and Hughson, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. Nature 415, 545-549 (2002).

Cho, H. S., Cao, J., Ren, J. P., and Earle, E. D. Control of Lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1C* gene. *Plant Cell Rep.* 20, 1-7 (2001).

Cho, S. J., Park, S. R., Kim, M. K., Lim, W. J., Ryu, S. K., An, C. L., Hong, S. Y., Kim, H., and Yun, H. D. Cloning of *cel8Y* Gene from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 and its comparison to *cel* genes of soft-rot *Pectobacterium*. *Mol. Cells.* 13, 28-34 (2002).

Cho, Y. N., Park, S. Y., Noh, T. K., Song, M. J., Park, Y. S., and Min, B. W. Transformation of Chinese cabbage with L-gulonono- γ -lactone oxidase (GLOase)-encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21, 9-13 (2003).

Cooper, V. J. C. and Salmond, G. P. C. Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of *Erwinia carotovora*: evidence for an evolutionary 'mix-and-match' of enzyme domains. *Mol. Gen. Genet.* 241, 341-350 (1993).

Dale, B. E. Biobased industrial products: bioprocess engineering when cost really counts. *Biotechnol. Prog.* 15, 775-776 (1999).

Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B. A., von Dohren, H., and Borner, T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology* 147(Pt 11), 3113-3119 (2001).

Dong, Y. H. and Zhang, L. H. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* 43, 101-109 (2005).

Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., and Zhang, L. H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1754-1759 (2002).

Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., and Zhang, L.

H. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411, 813-817 (2001).

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., and Zhang, L. H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 3526-3531 (2000).

Dunny, G. M. and Leonard, B. A. B. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 527-564 (1997).

During, K. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. *Mol. Breeding*. 2(4), 297-305 (1996).

Engbrecht, J., and Silverman, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81, 4154-4158 (1984).

Engbrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32, 773-781 (1983).

Florack, D., Allefs, S., Bollen, R., Bosch, D., Visser, B. and Stiekema, W. Expression of giant silk moth cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Res.* 4, 132-141 (1995).

Folders, J., Algra, J., Roelofs, M. S., van Loon, L. C., Tommassen, J., and Bitter, W. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. *J. Bacteriol.* 183(24), 7044-7052 (2001).

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Eichholtz, D. A., Flick, J. S., Fink, C. L., Hoffmann, N. L., and Sanders, P. R. The SEV System : A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *BioTechnol* 3, 629-635 (1985).

Frederick, M. A., Roger, B., David, M., Seidmal, J. G., John, A. S., and Kevin,

S. Short protocols in molecular biology, 4th, 2-13 (1999).

Fuqua, C. and Greenberg, E. P. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 685-695 (2002).

Fuqua, C., Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439-468 (2001).

Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275 (1994).

Fux, L., Nussbaum-Shochat, A., and Amster-Choder, O. Interactions between the PTS regulation domains of the BglG transcriptional antiterminator from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 46203-46209 (2003).

Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., and Kjelleberg, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.* 178, 6618-6622 (1996).

Gorke, B. and Rak, B. Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* 18, 3370-3379 (1999).

Gorke, B. Regulation of the *Escherichia coli* Antiterminator Protein BglG by Phosphorylation at Multiple Sites and Evidence for Transfer of Phosphoryl Groups between Monomers. *J. Biol. Chem.* 278, 46219-46229 (2003).

Graf, J. and Ruby, E. G. Host-derived amino acids support the proliferation of symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1818-1822 (1998).

Greenberg, D. B., Stulke, J., and Saier Jr, M. H. Domain analysis of

transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. Res. Microbiol. 153, 519–526 (2002).

Guan, L. L. and Kamino, K. Bacterial response to siderophore and quorum-sensing chemical signals in the seawater microbial community. BMC. Microbiol. 1(1), 27 (2001).

Guerin, D. M. A., Lascombe, M. B., Costtabel, M., Souchon, H., Lamzin, V., Beguin, P., and Alzari, P. M. Atomic (0.94 Å) resolution structure of an inverting glycosidase in complex with substrate. J. Mol. Biol. 316, 1061–1069 (2002).

Guisseppi, A., Aymeric, J. L., Cami, B., Barras, F., and Creuzet, N. Sequence analysis of the cellulase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. Gene 106, 109–114 (1991).

Hall, B. G., and Xu, L. Nucleotide sequence, function, activation, and evolution of the cryptic *asc* operon of *Escherichia coli* K12. Mol. Biol. Evol. 9, 688–706 (1992).

Hardy, K. G. 1987. Purification of bacterial plasmid. p. 1–6, Plasmid IRL Press.

Hassouni, M. E., Henrissat, B., Chippaux, M., and Barras, F. Nucleotide sequences of the *arb* genes, which control β -glucoside utilization in *Erwinia chrysanthemi*: comparison with the *Escherichia coli bgl* operon and evidence for a new β -glycohydrolase family including enzymes from eubacteria, archeobacteria, and humans. J. Bacteriol. 174, 765–777 (1992).

Helfert, C., Gotsche, S., and Dahl, M. K. Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalyzed by a phospho- β -(1,1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. Mol. Microbiol. 16, 111–120 (1995).

Henrissat, B. A. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280, 309–316 (1991).

Henrissat, B. and Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788 (1993).

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., and Givskov, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 148, 87-102 (2002).

Hoang, T. T. and Schweizer, H. P. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J. Bacteriol.* 181, 5489-5497 (1999).

Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S., and Williams, P. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 33, 1254-1266 (1999).

Holster, M. D., De Waele, A., Depicker, E., Messens, M., Montagu, V., and Schell, J. Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163, 181-187 (1978).

Hong, I. P., Jang, H. K., Lee, S. Y., and Choi, S. G. Cloning and characterization of a bifunctional cellulase-chitosanase gene from *Bacillus licheniformis* NBL420. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 35-42 (2003).

Hu, K. Y., and Saier Jr, M. H. Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res. Microbiol.* 153, 405-415 (2002).

Huang, Y. and McBeath, J. H. Bacterial induced activation of an *Arabidopsis*

phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Sci.* 98(94), 25-35 (1994).

Huang, Y., Nordeen, R. O., Di, M., Owens, L. D., and McBeath, J. H. Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tobaci*. *Phytopathology* 87, 494-499 (1997).

Jansky, S. Breeding for disease resistance in potato. In: Janick J (ed) *Plant breeding reviews*. pp. 69-155 (2000).

Jaynes, J. M., Xanthopoulos, K., Destéfano-Beltrán, L., and Dodds, J. Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects from insects. *Bioessay* 6, 263-270 (1987).

Johnvesly, B., Virupakshi, S., Patil, G. N., Ramalingam, and Naik, G. R. Cellulase-free thermostable alkaline xylanase from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 153-156 (2002).

Joung, Y. H., Jeon, J. H., Choi, K. H., Kim, H. S., and Joung, H. Transformation of potato leafroll virus coat protein gene into potato. *Korean J. Plant Tissue Cult.* 23, 77-81 (1996).

Kawai, R., Yoshida, M., Tani, T., Igarashi, K., Ohira, T., Nagasawa, H., and Samejima, M. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1-7 (2003).

Kawamata, S., Shimonarai, K., Imura, Y., Ozaki, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Kunoh, H., and Yamada, T. Temporal and spatial pattern of expression of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene I promoter in transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiol.* 38, 792-803 (1997).

Kim, K. C., Yoo, S. S., Oh, Y. A., and Kim, S. J. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 1-8 (2003).

Kirch, H. H., Berkel, J., Glaczinski, H., Salamini, F., Gebhardt, C., and Berkel, J. Structural organization, expression and promoter activity of a cold stress inducible gene of potato. *Plant Mol. Biol.* 33, 897-909 (1997).

Klein, P., Kanehisa, M., and Delisi, C. The detection and classification of membrane spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 815, 468-476 (1985).

Klimaszewska, K., Lachance, D., Pelletier, G., Lelu, M. A., and Séguin, A. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell Del. Biol. Plant.* 37, 748-755 (2001).

Kotrba, P., Inui, M., and Yukawa, H. A single V317A or V317M substitution in enzyme II of a newly identified β -glucoside phosphotransferase and utilization system of *Corynebacterium glutamicum* R extends its specificity towards cellobiose. *Microbiology* 149, 1569-1580 (2003)

Kotrba, P., Inui, M., and Yukawa, H. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 502-517 (2001).

Kricker, M. and Hall, B. G. Biochemical genetics of the cryptic gene system for cellobiose utilization in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 115, 419-429 (1987).

Lacks, S. A. and Greenberg, B. Constitutive competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* caused by mutation of a transmembrane histidine kinase. *Mol. Microbiol.* 42(4), 1035-1045 (2001).

Lai, X. and Ingram, L. O. Cloning and sequencing of a cellobiose phosphotransferase system operon from *Bacillus stearothermophilus* XL-65-6 and

functional expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175, 6441–6450 (1993).

Lai, X., Davis, F. C., Hespell, R. B., and Ingram, L. O. Cloning of Cellobiose Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase Genes: Functional Expression in Recombinant *Escherichia coli* and Identification of a Putative Binding Region for Disaccharides. Appl. Environ. Microbiol. 63, 355–363 (1997).

Lamarcq, L. H. and McFall-Ngai, M. J. Induction of a gradual, reversible morphogenesis of its host's epithelial brush border by *Vibrio fischeri*. Infect. Immun. 66, 777–785 (1998).

Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T., and Lee, J. K. Genes encoding the *N*-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3919–3924 (2002).

Lengeler, J. W., Titgemeyer, F., Vogler, A. P., and Wohrl, B. M. Structures and homologies of carbohydrate:phosphotransferase system (PTS) proteins. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 326, 489–504 (1990).

Lim, S. T., Park, Y. W., Cho, S. J., and Yun, H. D. Phytopathogenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and production of CMCase isozymes. Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol. 25, 468–476 (1997).

Lim, W. J., Park, S. R., An, C. L., Lee, J. Y., Hong, S. Y., Shin, E. C., Kim, E. J., Kim, J. O., Kim, H., and Yun, H. D. Cloning and characterization of a thermostable intracellular α -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. Res. Microbiol. 154, 681–687 (2003).

Lim, W. J., Park, S. R., Kim, M. K., An, C. L., Yun, H. J., Hong, S. Y., Kim, E. J., Shin, E. C., Lee, S. W., Lim, Y. P., and Yun, H. D. Cloning and sequencing of the glycogen branching enzyme gene responsible for glycogen debranching enzyme gene existing in tandem from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35. Biochem. Biophysic. Research. Commun. 300, 93–101 (2003).

Lin, L. L., Rumbak, E., Zappe, H., Thomson, J. A., and Woods, D. R. Cloning, sequencing and analysis of expression of a *Butyrivibrio fibrisolvens* gene encoding a β -glucosidase. J. Gen. Microbiol. 136, 1567-1576 (1990).

Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., and Zhang, L. H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol. Microbiol. 47, 849-860 (2003).

Madden, T. L., Tatusov, R. L., and Zhang, J. Application of network BLAST server. Methods Enzymol. 266, 131-141 (1996).

Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M., and Tiedje, J. M. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. Nucleic Acids Res. 281, 173-174 (2000).

Manefield, M., Harris, L., Rice, S. A., de Nys, R., and Kjelleberg, S. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2079-2084 (2000).

Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P., and Kjelleberg, S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. FEMS Microbiol. Lett. 205(1), 131-138 (2001).

McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., and Williams, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. Microbiology 143, 3703-3711 (1997).

Mashburn, L. M., M. Whiteley. Membrane vesicles traffic signals and facilitate

group activities in a prokaryote. *Nature* 437, 422–425 (2005)

McGrath, J. M., Williams, C. E., Haberlach, G. T., Wielgus, S. M., Uchytel, T. F., and Helgeson, J. P. Introgression and stabilization of *Erwinia* tuber soft-rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Am. J. Potato Res.* 79, 19–24 (2002).

Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., and Burton, A. L. Measurement of carboxymethylcellulose activity. *Anal. Biochem.* 2, 127–132 (1960).

Miller, M. B. and Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199 (2001).

Min, G. S. and Powell, J. R. Long-distance genome walking using the long and accurate polymerase chain reaction. *Biotechniques* 24, 398–400 (1998).

Montanelli, C., Stefanini, F. M., Chiari, A., Chiari, T., and Nascari, G. Variability in the response to *Pseudomonas solanacearum* of transgenic lines of potato carrying a cecropin gene analogue. *Potato Res.* 38(4), 371–378 (1995).

Montgomery, M. K. and McFall-Ngai, M. Bacterial symbionts induce host organ morphogenesis during early postembryonic development of the squid *Euprymna scolopes*. *Development* 120, 1719–1729 (1994).

More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272, 1655–1658 (1996).

Muller-Hill, B. and Kolkhof, P. DNA recognition and the code, *Nature* 369, 614 (1994).

Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497 (1962).

Nagpala, P. G. The introduction of a gene encoding a novel peptide, into plants to increase plant bacterial resistance. Ph.D. Dissertation. Louisiana State University. (1990).

Nakamura, K., Misawa, N., and Kitamura, K. Sequence of a cellulase gene of *Cellulomonas uda* CB4. J. Biotechnol. 4, 247-254 (1986).

Nealson, K. H. and Hastings, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol. Rev. 43, 496-518 (1979).

Novick, R. P. and Muir, T. W. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 2, 40-45 (1999).

Ozaki, H. and Yamada, K. Isolation of *Streptomyces* sp. producing glucose-tolerant β -glucosidase and properties of the enzyme. Agric. Biol. Chem. 55, 979-987 (1991).

Park, S. R., Cho, S. J., Kim, M. K., Ryu, S. K., Lim, W. J., An, C. L., Hong, S. Y., Kim, H., and Yun, H. D. Activity enhancement of Cel5Z from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removing C-terminal region. Biochem. Biophysic. Reserch. Commu. 291, 425-430 (2002).

Park, S. R., Kim, M. K., Kim, J. O., Bae, D. W., Cho, S. J., Cho, Y. U., and Yun, H. D. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* PY35 *cel* and *pel* gene existing in tandem and rapid identification of their gene products. Biochem. Biophysic. Resear. Commun. 268, 420-425 (2000).

Park, Y. W., Lim, S. T., and Yun, H. D. Cloning and characterization of a CMCase gene, *celB*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and its comparison to *celA*. Mol. Cells. 8, 280-285 (1998).

Park, Y. W., Lim, S. T., Cho, S. J., and Yun, H. D. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 endo-1,4-beta-glucanase genes and rapid

identification of their gene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 636-641 (1997).

Parker, L. L. and Hall, B. G. A fourth *Escherichia coli* gene system with the potential to evolve β -glucoside utilization. *Genetics* 119, 485-490 (1988).

Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. Jr., and Greenberg, E. P. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 4360-4365 (1999).

Patchett, M. L., Daniel, R. M., and Morgan, H. W. Purification and properties of a stable β -glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium. *Biochem. J.* 243, 779-787 (1987).

Pavek, J. J. and Corsini, D. L. Utilization of potato genetic resources in variety development. *Am. J. Potato Res.* 78, 433-441 (2001).

Peitsch, M. C. ProMod and Swiss-model: internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 274-279 (1996).

Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and Palva, E. T. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12, 2467-2476 (1993).

Pissavin, C., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Regulation of *pelZ*, a gene of the *peIBC* cluster encoding a new pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 178, 7187-7196 (1996).

Postma, P. W., Lengeler, J. W., and Jacobson, G. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543-594 (1993).

Prasad, I. and Schaefer, S. Regulation of the β -Glucoside System in

Escherchia coli K-12. J. Bacteriol. 120, 638-650 (1974).

Py, B., Barras, F., Harris, S., Robson, N., and Salmond, G. P. C. Extracellular enzymes and their role in *Erwinia* virulence. Methods Microbiol. 27, 158-168 (1998).

Raghunand, T. R. and Mahadevan, S. The β -glucoside genes of *Klebsiella aerogenes*: conservation and divergence in relation to the cryptic *bgl* genes of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 223, 267-274 (2003).

Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Defago, G., and Haas, D. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology 148, 923-932 (2002).

Reizer, J., Michotey, V., Reizer, A., and Saier Jr, M. H. Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis: unique, putative fructose- and glucoside-specific systems. Protein Sci. 3, 440-450 (1994).

Reynolds, A. E., Felton, J., and Wright, A. Insertion of DNA activates the cryptic *bgl* operon in *E. coli* K12. Nature 293, 625-629 (1981).

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S., and Eberl, L. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiology 147(Pt 12), 3249-3262 (2001).

Robillard, G. T. and Broos, J. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Biochim. Biophys. Acta, 1422, 73-104 (1999).

Rowbury R. J. and M. Goodson. Extracellular sensing and signalling pheromones switch-on thermotolerance and other stress responses in *Escherichia*

coli. Sci. Prog. 84(Pt 3), 205–233 (2001).

Roy, S., Sahu, A., and Adhya, S. Evolution of DNA binding motifs and operators. Gene 285, 169–173 (2002).

Ruby, E. G. The *Euprymna scolopes*-*Vibrio fischeri* symbiosis: a biomedical model for the study of bacterial colonization of animal tissue. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1, 13–21 (1999).

Ryu, S. K., Park, S. R., Lim, W. J., Kim, M. K., An, C. L., Cho, S. J., Park, Y. W., Kim, B. K., Kim, H., and Yun, H. D. Cloning and characterization of the *cel9A* gene of marine bacterium *Pseudomonas* sp. SK38 causing green spot rot of *Porphyra dentata*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 138–145 (2001).

Saarilahti, H. T., Henrissat, B., and Palva, E. T. CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Gene 90, 9–14 (1990).

Saier Jr, M. H. and Reizer, J. Proposed uniform nomenclature for the proteins and the protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. J. Bacteriol. 174, 1433–1438 (1992).

Salunkhe, D. and Desai, R. Postharvest biotechnology of vegetables. Wiley and Sons. NewYork. pp. 232–254 (1984).

Sambrook, J. and Russell, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (2001)

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (1989).

Sawyer, R. L. Potatoes for the developing world. International Potato Center, Lima, Peru. (1984).

Schaefer, S. Inducible system for the utilization of β -glucosides in *Escherichia coli*. I. Active transport and utilization of β -glucosides. *J. Bacteriol.* 93, 254-263 (1967).

Schneider K. B., Palmer, T. M., and Grossman, A. D. Characterization of *comQ* and *comX*, Two Genes Required for Production of ComX Pheromone in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184(2), 410-419 (2002).

Sharma, A., Sharma, R., Imamura, M., Yamakawa, M., and Machii, H. Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Letters.* 484, 7-11 (2000).

Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E. Jr., Rinehart, K. L., and Farrand, S. K. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6036-6041 (1997).

Shevchik, V. E., Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Robert-Baudouy, J. Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* 19, 445-466 (1996).

Simko, I. One potato, two potato: haplotype association mapping in autotetraploids. *Trends Plant Sci.* 9, 441-448 (2004).

Sokurenko E. V., Tchesnokova, V., Yeung, A. T., Oleykowski, C. A., Trintchina, E., Hughes, K. T., Rashid, R. A., Brint, J. M., Moseley, S. L., and Lory, S. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. *Nucleic Acids Res.* 29(22), E111 (2001).

Stulke, J., Arnaud, M., Rapoport, G., and Martin-Verstraete, I. PRD a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol. Microbiol.* 28, 865-874 (1998).

Swiderska A., Berndtson, A. K., Cha, M. R., Li, L., Beaudoin, III, G. M., Zhu, J., and Fuqua, C. Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR Quorum-sensing Regulator. *J. Biol. Chem.* 276(52), 49449-49458 (2001).

Taga M. E., Semmelhack, J. L., and Bassler, B. L. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 42(3), 777-793 (2001).

Tang, W. and Newton, R. J. Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Rep.* 22, 1-15 (2003).

Taniguchi, T., Kurita, M., Ohmiya, Y., and Kondo, T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissue and transgenic plant regeneration in *Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc. *Plant Cell Rep.* 23, 796-802 (2005).

Teplitski, M., Robinson, J. B., and Bauer, W. D. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 637-648 (2000).

Thurston, B., Dawson, K. A., and Strobel, H. J. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2631-2637 (1993)

Thweatt, R., Goldstein, S., and Reis, R. J. S. A universal primer mixture for sequence determination at the 3' ends of cDNAs. *Anal. Biochem.* 190, 314-316 (1990).

Tirumalai, R. R. and Mahadevan, S. The β -glucoside genes of *Klebsiella aerogenes*: conservation and divergence in relation to the cryptic *bgl* genes of *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 223, 267-274 (2003).

Tobisch, S., Stulke, J., and Hecker, M. Regulation of the *lic* operon of *Bacillus*

subtilis and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis. J. Bacteriol. 181, 4995–5003 (1999).

Verwoerd, T. C., Dekker, B. D., and Hoekma, A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Res. 17, 2362 (1989).

Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Hesseling–Meinders, A., Schans, M. J., Witholt, B., and Feenstra, W. J. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. Plant Mol. Biol. 12, 239–337 (1989).

Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R. A. J., and Withers, S. G. Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* β -glucosidase by kinetic analysis of mutants. Biochemistry 34, 14554–14562 (1995).

Warner, J. B. and Lolkema, J. S. A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 220, 277–280 (2003).

Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B., and Churchill, M. E. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. Mol. Cell. 9, 685–694, (2002).

Wild, J., Hradecna, Z., and Szybalski, W. International symposium on molecular biology of bacterial plasmids. Plasmid 45, 142 (2001).

Wilson, G. and Fox, C. F. The β -glucoside system of *Escherichia coli*. IV. Purification and properties of phospho- β -glucosidases A and B. J. Biol. Chem. 249, 5586–5598 (1974).

Winzer, K., Hardie, K. R., and Williams, P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch!. Curr. Opin. Microbiol. 5, 216–222 (2002).

Withers, S. G., Warren, R. A. J., Street, I. P., Rupitz, K., Kempton, J. B., and Aebersold, R. Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue

as a nucleophile in the mechanism of a retaining glucosidase. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5887–5889 (1990).

Wolin M. J. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 1320–1328 (1974).

Wong, W. K. R., Ali, A., Chan, W. K., Ho, V., and Lee, N. T. K. The cloning, expression and characterization of a cellobiase gene encoding a secretory enzyme from *Cellulomonas biazotea*. *Gene* 207, 79–86 (1998).

Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., and Fitzsimmons, K. C. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell*. 7, 1357–1368 (1995).

Wu, L. F. and Saier Jr., M. H. Nucleotide sequence of the *fruA* gene, encoding the fructose permease of *Rhodobacter capsulatus* phosphotransferase system, and analyses of the deduced protein sequence. *J. Bacteriol.* 172, 7167–7178 (1990).

Xavier, K. B. and Bassler, B. L. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 191–197 (2003).

Xiang, Y., Wong, W. K. R., Ma, M. C., and Wong, R. S. C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *Parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ab* and *cry1Ac* genes. *Plant Cell Rep.* 19, 251–256 (2000).

Yi, J. Y., Lee, S. W., and Park, K. W. Introduction of Shiva gene into tobacco and potato using tissue-specific tomato PAL promoter. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* 25, 109–113 (1998).

Yi, J. Y., Seo, H. W., Yang, M. S., Nazar, R. N., Robb, E. J., and Lee, S. W. Plant defense gene promoter enhances shiva-1 gene-induced resistance of soft rot disease in potato. *Planta* 220, 165–171 (2004).

Zenno, S. and Saigo, K. Identification of the genes encoding NAD(P)H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to *Escherichia coli* Fre in four species of luminous bacteria: *Photobacterium luminescens*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio orientalis*. J. Bacteriol. 176, 3544-3551 (1994).

Zhang, H. B., Wang, L. H., and Zhang, L. H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 4638-4643 (2002).

Zhang, L. H. Quorum quenching and proactive host defense. Trends Plant Sci. 8, 238-244 (2003).

Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A., and Tate, M. E. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserine lactones. Nature 362, 446-448 (1993).

Zhou, S. and Ingram, L. O. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanase (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 6-14 (2000).

Zhu, J., Beaber, J. W., Moré, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 180, 5398-5405 (1998).

Zimnoch-Guzowska, E., Marczewski, W., Lebecka, R., Flis, B., Schafer-Pregl, R., Salamini, F., and Gebhardt, C. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. Crop Sci. 40, 1156-1167 (2000).