

최 중  
연구보고서

배추 무름병 방제기술 개발을 위한 배추  
무름병균의 genome-wide 병원성 유전자  
클로닝 및 병원성 해석에 관한 연구

충북대학교

농림자료실



0012269

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “배추 무름병 방제기술 개발을 위한 배추 무름병균의 genome-wide 병원성 유전자 클로닝 및 병원성 해석에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 차 재 순

세부연구책임자 : 차 재 순

연 구 원 : 이 성 희

연 구 원 : 정 규 식

연 구 원 : 김 정 희

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 김 영 철

# 요 약 문

## I. 제 목

배추 무름병 방제기술 개발을 위한 배추 무름병균의 genome-wide 병원성 유전자 클로닝 및 병원성 해석

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

우리나라에서 그 피해가 매우 심각하지만 방제가 매우 어려운 배추 무름병의 효과적인 방제기술을 개발하기 위하여 배추 무름병을 일으키는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(*Ecc*)의 병원성을 분자 수준에서 이해하기 위하여 *in vivo*에서 유전자 발현을 측정하는 기술을 이용하여 *Ecc*의 genome 전체에서 병원성에 관여하는 유전자를 찾아 병원성에 관여하는 기능을 확인하고 무름병 방제를 위한 target 및 접근방법을 제시하고자 하였다.

### 2. 연구개발의 필요성

배추(*Brassica pestris* spp. *pekinensis*)는 우리나라에서 가장 중요한 채소로 연중 많은 양의 배추가 생산·소비되고 있다. 이러한 배추 생산에 있어서 병원세균 *Ecc*에 의한 무름병은 매년 많은 경제적 손실을 가져오고 있다. 특히 무름병은 여름철 배추생산의 가장 큰 장애요인이며 여름배추의 주생산지인 강원도 및 경북의 고랭지에서조차 이 병이 발생하지 않는 포장도 없다. 무름병의 많은 피해에도 불구하고 현실적으로 이 병의 방제는 매우 어렵다. 그 이유는 병원균인 *Ecc*가 토양에서 오래 생존할 수 있으며, 농약의 방제효과가 낮고, 이 병에 대한 저항성 품종도 개발되어 있지 않기 때문이다. 현재는 낮은 방제 효과에도 불구하고 이 병의 방제는 완전히 농약에 의존하고 있어 여름배추를

재배하는 청정지역에서 배추 생산은 환경 및 생태적인 문제가 될 소지를 항상 안고 있다. 따라서 효과적이고 친환경적인 새로운 배추 무름병 방제기술개발이 시급하다. 이 병의 효과적인 방제법의 개발을 위해서는 병원세균의 발병기작을 정확하게 이해하는 것이 중요하다. 병원균의 생태 및 기주침입과정에서의 발병기작의 분자수준에서의 이해는 이 병의 방제법 개발의 새로운 target을 제공해 줄 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 현재까지 *Ecc*의 genome sequence가 알려져 있지 않고 그에 따라 microarray 같은 genome-wide한 연구 tool이 없는 상태에서 *Ecc*의 functional genomics 방향의 연구를 위해 IVET(*in vivo* expression technology) tool을 사용하여 *Ecc* genome 전체의 promoter activity를 reporter activity로 추적하여 유전자를 선별하고 그 유전자의 발현을 분석하여 새로운 병원성 관련 기능을 찾는 내용으로 구성되어 있다. 본 연구는 연구목표를 달성하기 위해 크게 두 가지 방향으로 접근하였고, 연구의 실용성을 높이기 위해 작은 두 부분이 추가되었다.

1. IVET를 이용한 genome-wide 병원성 유전자 클로닝 및 기능분석: 본 연구는 *Ecc* 전체의 promoter를 promoterless reporter에 클로닝하여 *in vivo* 조건에 발현이 조절되는 유전자를 선별하여 새로운 병원성 관련 기능유전자를 찾고자 하였다.

가. IVET vector에 *Ecc* promoter library 제작

나. IVET를 이용한 plant up- or down-regulated 유전자의 genome-wide screening

다. plant up- or down-regulated 유전자의 염기서열 결정

라. plant up- or down-regulated 유전자의 blast search 및 기능예측

마. plant up- or down-regulated 유전자의 발현분석

바. 선별 유전자의 marker exchange mutation

사. Marker exchange strain의 병원성 및 특성 분석

2. IVET를 이용한 *hrp* regulon 분석: 본 연구에서는 *Ecc*의 *hrp* 유전자의 발현 조절에 관여하는 *Ecc* 유전자를 IVET 기술로 찾아 그 기능을 해석하고자 하였다.

가. IVET를 이용한 *hrp* regulated 유전자 screening

나. *hrp* regulated 유전자의 염기서열 결정

다. *hrp* regulated 유전자의 blast search 및 기능예측

라. *hrp* regulated 유전자의 클로닝

마. *hrp* regulated 유전자의 발현분석

바. *hrp* regulated 유전자의 돌연변이 및 병원성 분석

3. 박테리오신을 생산하는 비병원성균을 이용한 무름병 방제

가. 박테리오신을 생산하는 *Ecc* 균주 선발

나. 비병원성 균주 선발

다. 박테리오신 생성 비병원균의 무름병 방제효과

4. Homoserine lactone(HSL)을 분해하는 미생물을 이용한 무름병 방제

가. HSL 분해 미생물 분리 동정

나. HSL 분해 특성 분석

다. HSL 분해미생물의 발병억제력

라. Lactonase 유전자 클로닝 및 *Ecc*에서의 기능분석

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

가. 기주 및 토양에서 94개 *Ecc* 균주 분리, 동정 및 특성 분석

나. *Ecc* promoter library 제작(총 51,840 클론)

다. 배추 및 다른 배양조건에서 발현이 차별화되는 105개의 유전자(클론) 확보

라. *filC* 유전자의 새로운 기능 확인

마. 박테리오신을 생성하는 94개 *Ecc* 균주 확보

바. 무름병 방제력을 가진 박테리오신 생성 비병원성 균주 확보

- 사. *Ecc* BAC library 제작(총 750개) 및 BAC end sequencing 확보
- 아. HrpL에 의해 조절되는 24개의 유전자 확보
- 자. HrpL에 조절되는 새로운 기작 확인
- 차. 무름병 방제능을 가진 HSL분해능 균주 확보
- 카. Lactonase의 과다발현에 의한 무름병균 병원성 감소 확인

2. 결과활용에 대한 건의

- 가. 일부 유전자의 기능 확인에 대한 추가적인 연구지원
- 나. 박테리오파지 및 lactonase에 대한 새로운 연구과제 제안
- 다. *Ecc hrpL*의 새로운 조절 기작에 대한 추가적인 연구지원
- 라. *Ecc hrpL*의 병원성과 과민감 반응에 대한 새로운 기작 연구과제 제안
- 바. Lactonase에 의해 조절되는 병원성 발현 관련 신호전달 체계 연구과제 제안

\* 결과 및 결과활용 건의를 잘못 이해했나요? 보고서 제출 후 다시 수정할 예정입니다

## SUMMARY

(영문 요약문)

### I. Title

Cloning and pathogenicity analysis of genome-wide pathogenicity genes from Chinese cabbage soft-rot pathogen for development of effective control strategies of soft-rot disease.

### II. Importance and objectives of the research

Bacterial soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (*Ecc*) is considered one of the most destructive disease of Chinese cabbage (*Brassica pestris* spp. *pekinensis*) in Korea. The exoenzymes such as pectinases are well-known pathogenicity factors of *Ecc*, and recent studies showed that their expression is controlled by quorum sensing signal. Despite of these findings, no effective control pesticides and methods are invented for soft-rot disease in Chinese cabbage. The presence of the potential secondary pathogenesis determinants, hypersensitive reaction and pathogenicity (*hrp*) genes, has been revealed in the soft-rot *Erwinia* species and the mechanism of pathogen-plant interaction at early stage of interaction is not known. Therefore, we try to isolate genome-wide pathogenicity genes using *in vivo* expression technology (IVET) and investigate functions of newly isolated pathogenicity genes, and consequently we attempt to come up with targets and approaches for effective control methods of *Ecc* caused soft-rot disease in Chinese cabbage.

### III. Research content and scope

Because of absence of genome sequence of *Ecc* and genome wide tool such as microarray, this study aims to direct of functional genomic research of *Ecc* using GFP-tagged IVET (in vivo expression technology) tool for selection of pathogenicity related genes, to analyze expression of the genes during plant-microbe interaction and pathogenicity, and to investigate new pathogenicity related functions of the genes. To achieve objectives of this research, two big directions were approached and two little parts were added to enhance practical use of this research.

1. Cloning and functional analysis of genome-wide pathogenicity genes using IVET
  - a. Construction of *Ecc* promoter library into IVET vector
  - b. Genome-wide screening of plant up- or down-regulated genes using IVET
  - c. Determination of nucleotide sequences of the plant up- or down-regulated genes
  - d. Homology search of the plant up- or down-regulated genes
  - e. Transcriptional expression of the plant up- or down-regulated genes
  - f. Marker exchange mutagenesis of the selected genes
  - g. Pathogenicity and phenotypic analysis of the mutants.
  
2. Analysis of *hrpL* regulon using IVET
  - a. Screening of *hrpL* regulated genes using IVET
  - b. Determination of nucleotide sequences of the *hrpL* regulated genes
  - c. Homology search of the *hrpL* regulated genes.
  - d. Cloning of *hrpL* regulated genes.
  - e. Transcriptional expression of the *hrpL* regulated genes.
  - f. Mutational analysis and pathogenicity analysis of the *hrpL* regulated genes



3. Control of bacterial soft-rot disease using bacteriocin-produced non-pathogenic *Ecc* strains.
  - a. Selection of bacteriocin-produced *Ecc* strains.
  - b. Selection of nonpathogenic *Ecc* strains.
  - c. Control effect of bacterial soft-rot disease by the bacteriocin-produced non-pathogenic *Ecc*.
  
4. Control of bacterial soft-rot disease using homoserine lactone degrading microbes.
  - a. Screen and identification of HSL degrading microbes.
  - b. Characterization of HSL degrading activity of the selected microbe.
  - c. Effect of HSL degrading microbe on the pathogenicity of soft-rot
  - d. Cloning of lactonase gene and functional analysis in *Ecc*.

#### IV. Results and suggestion for application of the results

##### 1. Results

- a. Isolation, identification, and chracterization of 94 strains of *Ecc* isolated from host plant and soil
- b. Construction of promoter library of *Ecc* 35R (51,840 clones)
- c. Obtain of the 105 genes (clones) expressed differentially in different culture conditions
- d. Find a new function of *filC*
- e. The 94 strains of bacteriocin-producing *Ecc*
- f. Obtain of the bacteriocin-producing and non-pathogenic *Ecc* strain that has control ability of bacterial soft rot.
- g. Construction of BAC library of *Ecc* and determination of end sequence of the each clone
- h. The 24 genes regulated by HrpL
- j. Find a new regulatory mechanism of HrpL
- k. Obtain of the HSL-degradation *Ecc* strain that has control ability of bacterial soft rot.

1. A new finding of virulence reduction in *Ecc* by over-expression of lactonase
  
2. Suggestion for application of the results
  - a. Support of additional functional study of the selected genes by gene expression study
  - b. A new research project for bacteriocin and lactonase metabolism
  - c. Support of additional research of a new regulatory mechanism of *Ecc* *hrpL*
  - d. A new research project for a new regulatory mechanism of *hrpL* for virulence and hypersensitive response of *Ecc*
  - e. A new research project for the signal pathway of virulence expression controlled by lactonase in *Ecc*

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

<b>Chapter 1.</b> Outlines of Research .....	15
<b>Section 1.</b> purposes and aims of research .....	16
1. Purpose .....	16
2. Aims .....	16
<b>Section 2.</b> Specific aims and description of research .....	19
1. Specific aims and description of research .....	19
2. Methods and strategies .....	21
<b>Chapter 2.</b> Current status of related research developed in Korea and other countries .....	35
<b>Section 1.</b> Related research status in foreign countries .....	36
<b>Section 2.</b> Related research status in Korea .....	36
<b>Chapter 3.</b> Results of research .....	37
<b>Section 1.</b> Construction of <i>Erwinia carotovora</i> sp. <i>carotovora</i> 35R promoter library in IVET vector and selection of clones differentially expressed in culture conditions .....	38
<b>Section 2.</b> Expression study of the selected clones and selection of the target clones .....	55
<b>Section 3.</b> Functional study of the selected genes by marker exchange mutation .....	76
<b>Section 4.</b> Control of bacterial soft-rot disease using bacteriocin- produced non-pathogenic <i>Ecc</i> strains .....	88
<b>Section 5.</b> BAC end sequencing and <i>hrp</i> gene cloning of <i>Erwinia</i> <i>carotovora</i> sp. <i>carotovora</i> 35R, a casual agent of Chinese cabbage soft rot .....	110

<b>Section 6.</b> Isolation of <i>hrpL</i> from <i>Erwinia carotovora</i> sp. <i>carotovora</i> 35R and analysis of its function by IVET .....	168
<b>Section 7.</b> Functional analysis of an alternative sigma factor <i>hrpL</i> in pathogenicity and hypersensitive response of <i>Erwinia carotovora</i> sp. <i>carotovora</i> 35R, a casual agent of Chinese cabbage soft rot .....	188
<b>Section 8.</b> Control of bacterial soft-rot disease using homoserine lactone degrading microbes .....	202
<b>Chapter 4.</b> Achievements of aims and contribution to related areas .....	229
<b>Section 1.</b> Achievements of research aims .....	230
1. Aims, evaluation scores and achievements of the first year research .....	230
2. Aims, evaluation scores and achievements of the second year research .....	230
3. Aims, evaluation scores and achievements of the third year research .....	231
4. Overall evaluation on achievements of the research .....	231
<b>Section 2.</b> Contribution to related areas .....	232
1. Technical aspects .....	232
2. Academic aspects .....	232
3. Economical and industrial aspects .....	234
<b>Chapter 5.</b> Application of results .....	235
<b>Section 1.</b> Necessity of continuing researches .....	236
<b>Section 2.</b> Application of results in other researches .....	237
<b>Section 3.</b> Industrialization .....	237
<b>Chapter 6.</b> Information collected from aboard during the research period .....	239

**Chapter 7. References** .....241

# 목 차

제 1 장. 연구개발의 개요 .....	15
제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성 .....	16
1. 연구개발의 목적 .....	16
2. 연구개발의 필요성 .....	16
제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용 .....	19
1. 연구개발 목표와 내용 .....	19
2. 연구개발 방법 및 설계 .....	21
제 2 장. 국내외 기술개발 현황 .....	35
제 1 절. 국외 관련 기술의 현황 .....	36
제 2 절. 국내 관련 기술의 현황 .....	36
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과 .....	37
제 1 절. IVET vector에 배추 세균성무름병균 <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Ecc)의 genomic library 제작 및 클론 선발 .....	38
제 2 절. 선발된 클론의 발현분석 및 target 유전자의 최종 선발 .....	55
제 3 절. Marker exchange mutation에 의한 선발된 유전자의 기능 분석 .....	76
제 4 절. 박테리오신을 생산하는 비병원성 <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 에 의한 무름병 방제 및 target 제시 .....	88
제 5 절. 배추 무름병균인 <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 35 균주의 BAC end sequencing과 <i>hrp</i> 유전자 클로닝 .....	110
제 6 절. IVET을 이용한 <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 의 <i>hrpL</i> 조절유전자 분리 및 기능 분석 .....	168

제 7 절. 무름병균, <i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> 35균주에서 alternative sigma factor <i>hrpL</i> 의 병원성과 과민감 반응 에서의 기능 분석 .....	188
제 8 절. Homoserine lactone을 분해하는 미생물을 이용한 무름병 방제 및 방제 target 제시 .....	202
<b>제 4 장. 목표 달성 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>229</b>
제 1 절. 목표 달성도 .....	230
1. 제 1 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	230
2. 제 2 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	230
3. 제 3 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	231
4. 최종평가의 착안점 및 달성도 .....	231
제 2 절. 관련분야에의 기여도 .....	232
1. 기술적 측면에서의 기여도 .....	232
2. 학문발전에의 기여도 .....	232
3. 경제, 산업화 측면에서의 기여도 .....	234
<b>제 5 장. 연구개발의 활용계획 .....</b>	<b>235</b>
제 1 절. 추가 연구의 필요성 .....	236
제 2 절. 타 연구에의 응용 .....	227
제 3 절. 기업화 추진 방안 .....	227
<b>제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정도 .....</b>	<b>239</b>
<b>제 7 장. 참고 문헌 .....</b>	<b>241</b>

## 제 1 장. 연구개발과제의 개요



## 제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

○ 본 연구는 우리나라에서 그 피해가 매우 심각하지만 방제가 매우 어려운 배추 무름병의 효과적인 방제기술을 개발하기 위하여 배추 무름병을 일으키는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(*Ecc*)의 병원성을 분자 수준에서 이해하기 위한 연구로 *in vivo*에서 유전자 발현을 측정하는 기술을 이용하여 *Ecc*의 genome 전체에서 병원성에 관여하는 유전자를 찾아 병원성에 관여하는 기능을 확인하고자 한다.

○ 본 연구의 특징은 최근 genome 전체의 염기서열이 밝혀지면서 염기서열의 분석에 의존한 genome-wide 유전자의 탐색이 아니고, 유전자 발현의 추적성을 통한 genome-wide 유전자 탐색이라는 새로운 기술을 사용하는 점이다. 따라서 본 연구에서는 기존의 단편적인 유전자를 이용한 병원성 연구 및 염기서열 분석 통한 유전자 탐색에 의한 연구의 한계를 극복하고, 지금까지 알려지지 않은 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 병원성에 관여하는 중요한 새로운 유전자를 많이 찾을 것이며, 이들은 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 병원성 전체를 분자수준에서의 이해하는데 크게 기여를 할 것이다. 본 연구의 결과는 궁극적으로 보다 효과적인 무름병 방제를 위한 새로운 target를 찾는 데 도움을 줄 것이며, 연구결과로 얻은 많은 새로운 기능의 유전자는 생명공학분야에서 유전자원화가 가능할 것이다.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 기술적 측면

○ 배추에는 여러 병해충이 피해를 주지만 그 중에서도 병원세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(*Ecc*)에 의한 세균성무름병은 매년 그 피해가 막대하다.

○ 배추 무름병의 많은 피해에도 불구하고 이 병의 방제는 매우 어렵다. 그 이유는 병원균인 *E. carotovora* ssp. *carotovora*가 토양에서 오래 생존할 수 있

으며, 농약의 방제효과가 낮고, 이 병에 대한 저항성 품종도 개발되어 있지 않는 점들로 요약될 수 있다.

○ 따라서 이 병의 효과적인 방제법의 개발을 위해서 병원세균의 발병기작을 정확하게 이해하는 중요하다. 병원균의 생태적 차원 및 기주침입과정에서의 발병기작의 분자수준에서의 이해는 그 병의 방제법 개발의 새로운 target을 제공해 줄 것이다.

○ 최근에 DNA sequencing 기술이 발전하면서 많은 생물체의 유전체 genome sequece가 알려지면서 genome 수준에서의 병원균의 병원성에 대한 연구는 기존의 단편적이거나 개별적인 유전자를 이용한 연구에서 찾지 못한 많은 새로운 병원성에 관여하는 유전자의 발견이 이루어지고 있으며, 이들의 연구는 병원세균의 병원성 메카니즘에 대한 새로운 사실들이 활발하게 밝혀지고 있다(Fouts *et al.*, 2002; Guttman *et al.*, 2002; Okinaka *et al.*, 2002; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002).

○ 최근 *Erwinia chrysanthemi*의 microarray을 이용한 연구결과(Okinaka *et al.*, 2002)에 의하면 이 사실이 더욱 명확해진다. 즉 *E. chrysanthemi*는 *E. carotovora* ssp. *carotovora*와 유사한 세균으로 이 병원균의 병원성은 세계의 여러 연구그룹에서 genomewide mutation과 분자수준에서 많은 연구가 이루어진 대표적인 병원균이다. 그런데 이 세균의 genomic library clones의 microarray를 이용한 연구에서 지금까지 알려지지 않은 새로운 여러 개의 병원성 유전자가 발견되었다.

○ 이러한 genome 혹은 functional genome 수준에서의 병원성에 대한 연구는 병원성의 작용기작, 조절기작 뿐만 아니라 병원균의 생태와 병원성과의 관계 등에 대한 보다 깊이 있는 이해를 가능하게 할 것이고, 이러한 병원성의 전체적이면서 분자수준에서의 작동원리에 대한 이해는 궁극적으로 병방제에 이용가능한 병원균의 병원성 억제에 대한 새로운 target를 제공할 것이다.

○ Dong 등의 일련의 연구(2000, 2001, 2002)는 이러한 사실을 잘 보여주고 있다. 즉 그들은 Gram 음성세균에서 흔히 병원성을 유도하는 신호물질로 작용하는 homoserine lactone(HSL)을 분해하는 lactonase을 식물로 도입함으로써 무름병에 대한 새로운 저항성 작물을 개발할 수 있음을 보여주었다. 그러나 이들의 연구결과는 현재의 GMO에 대한 거부감 때문에 당장에 실용화되기는 쉽지 않을 전망이다, 따라서 앞으로 새로운 차원의 무름병 병원균의 병원성에 대한 연구가 요구된다.

○ 병원세균에 의한 토양병의 경우 아직까지도 실용적이고 효과적인 방제법의 개발이 매우 어려운 게 사실이다. 따라서 이들의 병원성을 보다 깊이 있게 이해하는 연구는 병원성을 이해하는 학술적인 측면에서 뿐만 아니라 이들의 이해를 기반으로 한 새로운 방제법의 개발이라는 측면에서도 지금보다 많은 연구가 요구된다.

○ 특히 우리나라의 대표적인 채소작물인 배추에서 무름병의 중요성에 비추어 본다면 무름병의 병원성에 대한 연구가 매우 중요하고 필요한 부분이라 하겠으며, 특히 최근 genomic, 그리고 functional genomics의 기술을 이용한 연구는 이 무름병 병원균의 병원성을 이해하는데 획기적인 기여를 할 것으로 확신한다.

#### 나. 경제·산업적 측면

○ 배추는 우리나라에서 가장 중요한 채소중의 하나로서 연중 막대한 양의 배추가 생산 소비된다.

○ 배추 생산에 있어서 여러 가지 병해충이 피해를 주지만 그 중에서도 병원세균 *E. carotovora* ssp. *carotovora*에 의한 무름병은 매년 막대한 경제적 손실을 가져오고 있다.

○ 특히 무름병은 여름철 배추생산의 가장 큰 장애요인으로 잘 알려져 있으며, 여름철 배추의 주생산지인 강원도 및 경북의 고랭지에서조차 이 병이 발생하지 않는 포장이 없다.

○ 물론 배추가격의 변동에 따라 달라지지만 여름철 배추 재배에 있어서 이 병을 방제를 위해 많은 양의 농약을 사용하고 있지만 아직도 이 병의 효과적인 방제는 매우 어렵다.

○ 또한 배추 무름병은 우리나라 뿐만 아니라 일본, 중국에서도 크게 피해를 주는 병으로 잘 알려져 있으며, *E. carotovora* ssp. *carotovora*에 의한 무름병의 피해는 배추에서 뿐만이 아니라 대부분의 다즙성 채소작물에서 심각한 피해를 주는 병이다.

○ 따라서 이병에 대한 연구결과는 우리나라에서 뿐만 아니라 전 세계적으로 그 경제적 파급효과가 매우 크다.

#### 다. 사회·문화적 측면

○ 배추(*Brassica pestris* spp. *pekinensis*)는 우리나라에서 김치의 주원료로서

가장 중요한 채소이다.

○ 김치는 우리 식단에서 빼 놓을 수 없는 가장 중요한 식품일 뿐만 아니라 최근에는 김치가 우수한 식품으로 알려지면서 세계적으로 한국을 대표하는 식품으로 자리매김하고 있다. 따라서 배추의 중요성은 더욱 증가하고 있다.

○ 배추의 생산 출하량은 배추의 가격에 크게 영향을 미치고, 배추의 생산량의 저하는 배추 가격의 폭등으로 이어져 서민의 식단에 까지 직접적인 영향을 미치기도 한다.

○ 특히 여름철 배추 생산량은 배추 가격에 직접 영향을 미치고 배추가격의 폭등 혹은 폭락은 매년 우리나라의 중요한 단골 뉴스이기도 하다.

○ 따라서 배추에 커다란 피해를 주는 무름병의 연구는 궁극적으로 배추의 연중생산을 안정화하는데 크게 기여할 것이다.

## 제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

#### 가. 연구개발 목표

*In vivo* expression technology(IVET)를 이용하여 배추 무름병 병원균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(*Ecc*) 병원성 유전자를 *E. carotovora* sp. *carotovora*의 genome 전체에서 클로닝하고, 이들 유전자의 기능을 분석하여 *E. carotovora* sp. *carotovora*의 병원성을 분자 수준에서 밝히며, 이것을 바탕으로 배추 무름병 효과적인 방제법 개발을 위한 target를 찾고자 한다.

#### 나. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 현재까지 *Ecc*의 genome sequence가 알려져 있지 않고 그에 따라 microarray 같은 genome-wide한 연구 tool이 없는 상태에서 *Ecc*의 functional genomics 방향의 연구를 위해 IVET(*in vivo* expression

technology) tool을 사용하여 *Ecc* genome 전체의 promoter activity를 reporter activity로 추적하여 유전자를 선발하고 그 유전자의 발현을 분석하여 새로운 병원성 관련 기능을 찾는 내용으로 구성되어 있다. 본 연구는 연구목표를 달성하기 위해 크게 두 가지 방향으로 접근하였고, 연구의 실용성을 높이기 위해 작은 두 부분이 추가되었다.

**1) IVET를 이용한 genome-wide 병원성 유전자 클로닝 및 기능분석:** 본 연구는 *Ecc* 전체의 promoter를 promoterless reporter에 클로닝하여 *in vivo* 조건에 발현이 조절되는 유전자를 선발하여 새로운 병원성 관련 기능유전자를 찾고자 하였다.

가) IVET vector에 *Ecc* promoter library 제작

나) IVET를 이용한 plant up- or down-regulated 유전자의 genome-wide screening

다) plant up- or down-regulated 유전자의 염기서열 결정

라) plant up- or down-regulated 유전자의 blast search 및 기능예측

마) plant up- or down-regulated 유전자의 발현분석

바) 선발 유전자의 marker exchange mutation

사) Marker exchange strain의 병원성 및 특성 분석

**2) IVET를 이용한 *hrp* regulon 분석:** 본 연구에서는 *Ecc*의 *hrp* 유전자의 발현조절에 관여하는 *Ecc* 유전자를 IVET 기술로 찾아 그 기능을 해석하고자 하였다.

가) IVET를 이용한 *hrp* regulated 유전자 screening

나) *hrp* regulated 유전자의 염기서열 결정

다) *hrp* regulated 유전자의 blast search 및 기능예측

라) *hrp* regulated 유전자의 클로닝

마) *hrp* regulated 유전자의 발현분석

바) *hrp* regulated 유전자의 돌연변이 및 병원성 분석

**3) 박테리오킨을 생산하는 비병원성균을 이용한 무름병 방제 및 방제 target 제시**

가) 박테리오킨을 생산하는 *Ecc* 균주 선발

- 나) 비병원성 균주 선발
- 다) 박테리오파지 생성 비병원균의 무름병 방제효과

#### 4) Homoserine lactone(HSL)을 분해하는 미생물을 이용한 무름병 방제 및 방제 target 제시

- 가) HSL 분해 미생물 분리 동정
- 나) HSL 분해 특성 분석
- 다) HSL 분해미생물의 발병억제력
- 라) Lactonase 유전자 클로닝 및 *Ecc*에서의 기능분석

## 2. 연구개발 방법 및 설계

### 가. IVET를 이용한 genome-wide 병원성 유전자 클로닝 및 기능분석

#### 1) 배추 무름병균의 분리 및 실험 균주 선발

본 연구에 사용할 배추 무름병균을 분리 선발한다. 주로 여름배추 재배지인 강원도, 경상북도, 충청북도의 배추, 감자, 양배추, 무의 재배지에서 재배지 토양과 병든 식물체를 수집하여 시료로부터 세균현탁액을 얻고 농화배지에서 *Ecc*생장을 촉진하고 선택배지에서 배양하여 전형적인 무름병균을 얻는다. 이렇게 분리된 균은 병원성을 확인하고, MIDI을 이용하여 동정한다. 분리된 모든 균주의 플라스미드 profile을 조사하여 플라스미드를 가지고 있지 균주를 실험균주로 선발한다.

#### 2) IVET vector에 선발균주의 promoter library 제작

선발된 *Ecc* 균주의 genomic DNA를 분리하고 분리된 DNA를 제한효소 *Sau3AI*으로 부분 절단하여 약 2 kb 크기의 DNA을 얻어 Promoterless GFP vector인 pPROBE-NT에 ligation하여 대장균에 형질전환하여 library 클론을 얻는다. 대장균 형질전환체 일부로부터 플라스미드를 분리하고 insert DNA의 크기 및 DNA 삽입율을 계산하여 library의 완성도를 확인한다.

#### 3) 선발균주에 promoter library clone pool 및 replica plate 제작

*Ecc* 균주의 promoter library clone을 대장균에서 screening 하는 것이

아니고 *Ecc* 균주에서 하므로 대장균에 제작된 library clone을 *Ecc* 균주로 옮겨야 한다. 그런데 대장균에 있는 개별 클론을 하나씩 *Ecc*로 전이시키는 일은 매우 많은 시간과 노력이 필요하므로 대장균으로부터 plasmid pool을 만들어 *Ecc*에 mass로 형질전환하여 옮긴다. 형질전환된 대장균을 선발배지에 도말할 때 선발 배지 한 plate 당 형질전환 된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 의 콜로니가 50-100개 되도록 형질전환체의 밀도를 조정하고, 선발배지에서 자라는 50-100 콜로니의 대장균을 48시간 동안 배양한 후 소량의 멸균수를 넣어 모든 콜로니를 백금으로 잘 모아 플라스미드를 분리한다. 분리한 플라스미드를 정제하고 농축하여 그 일부를 *Ecc* 균주에 electroporation하여 얻어진 *Ecc* 형질전환체를 plasmid pool당 48 콜로니씩 2개의 replica plate를 만들어 보관한다.

#### 4) 배추즙 및 다른 배양조건에서 발현이 달라지는 클론 선발

LB broth에서 발현되는 GFP 양을 기본으로 하고 배추즙(CCJ: Chinese cabbage juice) 배지, 현재 배추 무름병 방제에 가장 효과적인 농약(일품)으로 알려진 일품의 주성분인 oxolinic acid의 sublethal 농도인 0.1ppm이 포함된 LB broth(LB+OX) 배지 그리고 최소배지인 M9 최소배지에서 생성되는 녹색 형광 양을 microplate fluorescence reader(FL500, Biotech, USA, excitation 485, emission 530, sensitivity 30)를 이용하여 측정하여 기준값보다 2배 증가 또는 감소한 클론을 각각 발현증가 또는 발현감소 클론으로 선발한다.

#### 5) 염기서열 결정 및 gene bank에서 homologous gene 검색

GFP 발현 양이 다른 선발된 클론의 플라스미드를 분리하여 염기서열을 결정하고 그 염기서열을 NCBI gene bank의 microbial genome section에서 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*(*Eca*) SCRI1043의 genome sequence에서 우선 blast하여 상동유전자를 검색하고 검색되지 않은 염기서열은 gene bank 전체의 염기서열에서 검색한다. 검색된 유전자는 annotation이 되어 있는 physical을 정리하여 그 유전자의 발현분석에 사용한다.

#### 6) 유전자 발현분석

선발된 유전자(클론)의 발현분석은 Quantitative real-time RT-PCR를 이용하여 분석한다. 먼저 선발된 클론의 염기서열을 이용하여 *Eca*의 homologous 유전자를 찾고 그 부분의 annotation을 찾아 putative orf 및

promoter 위치를 찾아 physical map 만들고 이 physical을 바탕으로 Quantitative real-time RT-PCR위한 프라이머를 제작한다. *Eca*에 homologous 부분이 없는 경우 gene bank search를 통해 homologous gene을 찾고 아예 homologous gene이 검색이 안되는 경우 선발된 클론의 염기서열만을 가지고 프라이머를 제작한다. 이 프라이머를 이용하여 Quantitative real-time RT-PCR을 실시하여 유전자의 발현을 분석한다.

#### 7) 선발 유전자의 marker exchange mutagenesis 및 특성분석

기능분석을 위해 선발된 클론의 marker exchange는 그 클론으로부터 얻은 염기서열과 gene bank에서 얻은 physical map 정보를 이용하여 target 유전자 부분을 정하고 그 유전자를 PCR로 증폭하여 클로닝한다. 클로닝하는 과정에서 그 유전자의 중간에 마커인  $\Phi$ 를 클로닝할 수 있는 cloning site을 만든다. 이 cloning site에  $\Phi$  fragment을 cloning하고, 전체 insert DNA를 marker exchange vector에 옮긴다. 이렇게 제작한 marker exchange vector를 *Ecc*에 형질전환시키고 homologous recombination과 plasmid curing을 유도하여 mutant을 제작한다.

#### 8) Marker exchange mutant의 특성분석

무름병균의 병원성 및 발병력과 관련있는 extracellular enzyme인 pectate lyase(pel), polygalacturonase(peh), cellulase(cel), protease(prt) 활성을 Chatterjee(1995) 방법으로 검정하고 감자와 배추 증류를 사용하여 병원성검정을 하고, 체외 다당류인 EPS 변화를 CPG배지에서 확인한다. 운동성(motility)은 TSA(1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.35% agarose) 배지에서 검정하고, 다른 *Ecc* 균주를 이용하여 bacteriocin activity와 sensitivity을 검정한다. 비기주 식물인 강낭콩에서 현탁액을 주입하여 과민성 반응(HR) 차이를 확인하고, mutant의 형태 차이를 확인하기 위해 전자현미경(EM) 사진을 촬영 한다.

#### 9) 박테리옌 검정 및 비병원성 균주 선발

박테리옌 검정은 먼저 분리세균을 M9 broth 진탕 배양한 후 최종농도가  $0.2 \mu\text{g/ml}$ 의 mitomycin c를 넣어 박테리옌 생성을 유도하고 이 배양액의 상정액을 얻어, Petri dish에 감수성 균주의 현탁액을 넣은 0.35%의 soft agar ( $2 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$ )를 부은 후 그 위에 준비한 상정액  $10 \mu\text{l}$ 씩 점적한 후  $28^\circ\text{C}$ 에서



8-12시간 배양하여 성장 저지환 생성을 관찰하여 박테리오신 생성을 확인한다. 또한 박테리오신 생성 *Ecc*에 존재하는 박테리오신 조절유전자(*brg*)는 Chuang 등의 방법(1999)으로 확인한다. 박테리오신 조절유전자 특이적 프라이머(DY-R1; TGGTGAATT GA CAATACG, DY-F1: TT GTAGTGCATAGGTTGG)로 PCR를 수행하여 *brg* 유전자의 존재를 확인한다. 박테리오신 검정을 통해 선발한 균주의 비병원성 돌연변이체 유도는 Ma의 방법에 따라 수행한다(Ma, 1993).

#### 나. IVET를 이용한 *hrp regulon* 분석

##### 1) *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35균주의 BAC genomic library 조제

*E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 균주의 BAC genomic library는 Epicentre 회사의 pIndigoBAC-5를 클로닝 vector로 하여 회사의 protocol에 준하여 조제하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35균주의 high molecular weight(HMW) DNA를 정제하기 위해 low-melting agarose gel plugs에서 분리하였다. HMW genomic DNA를 함유하고 있는 agar plug를 잘게 부순 후 *Hind*III로 partial digestion하여 pulse-field gel electrophoresis(PFGE)와 Electro elutor를 이용하여 평균 150 kb정도의 *E. carotovora* subsp. *carotovora* *Hind*III DNA 단편을 정제하였다. 정제된 HMW genomic DNA 단편은 같은 제한효소로 절단한 pIndigoBAC-5 vector와 ligation 후 Electroporation-BioRad micropulser(411BR 0751)를 이용하여 *E. coli* DH10B에 형질전환하여 BAC library를 조제하였다. 각 BAC clone들은 384 plate에 chloramphenicol(34 $\mu$ g/ml)이 되게 첨가된 배지에서 증식하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

##### 2) BAC end sequencing

위에서 조제한 384 plate에 보관된 각 BAC clone들을 chloramphenicol이 첨가된 배지에 증식시켜 alkaline lysis mini-prep을 이용하여 recombinant DNA를 분리하여 BAC end sequencing, PCR, 및 subcloning에 사용하였다. 먼저 384 BAC clone의 end sequencing을 실시하기 위해 forward sequencing primer로 5'-GGA TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG-3', reverse sequencing primer로 5'-CTC GTA TGT TGT GTG

GAA TTG TGA GC-3'와 약 0.5 $\mu$ g의 각 BAC clone의 recombinant DNA를 template로 하여 Big Dye Sequencing kit(Perkin Elmer)를 사용하여 (주) 솔젬트에서 실시하였다. BAC end sequencing 결과는 이미 genome sequencing이 끝난 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*와 BLAST search를 통해 상동성이 있는 부위를 찾아 alignment하여 간단한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 균주의 BAC clone의 map을 작성하였다.

### 3) *E. carotovora* subsp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 클로닝

이미 genome project가 진행 중인 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*(*Eca*)의 *hrpL* 유전자 sequence를 이용하여 *E. carotovora* subsp. *carotovora* *hrpL* 유전자를 클로닝하였다. 먼저 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*의 *hrpL* 부근의 nucleotide sequence를 <http://www.scri.sari.ac.uk/tipp/erwinia.htm>에서 얻은 후 <http://kr.expasy.org/tools/dna.htm>에서 translate tool을 이용하여 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* *hrpL* 부근의 유전자를 분석하였다. *hrpL* upstream 쪽에는 *hrpJ* 유전자가 존재하였고, downstream쪽에는 *hrpX*가 존재함을 확인하였다(data not shown). *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrp* 유전자의 gene arrangement도 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*와 같을 것으로 생각되어 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*의 *hrpJ*와 *hrpX*의 open reading frame의 nucleotide를 [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)의 tool을 이용하여 각각의 primer를 조제하였다. *hrpJ*를 forward, *hrpX*를 reverse primer로 디자인하여 PCR를 이용하여 클로닝하였다.

### 4) *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrpL* 유전자의 promoter교체

최근의 연구에 의하면 *hrpL* 유전자는 *hrpRS* transcriptional regulator 들에 조절된다는 보고가 있다. 따라서 *E. carotovora* subsp. *carotovora* *hrpL* 유전자를 *E. coli*에서 발현시키기 위해서는 *hrpL* 유전자의 promoter를 *E. coli*에서 잘 발현되는 *nptII*나 *tac* promoter sequence로 교체하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 open reading frame내에 존재하는 *NsiI* site 부위를 reverse primer (TCG GCA ACG CTC AAA TGC ATG)로 이용하였고, forward primer로 *tac* promoter sequence와 *nptII* promoter sequence를 사용하였다. Forward primer들은 5'말단에 *XbaI* site를 장착하고

있으며 *E. carotovora subsp. carotovora hrpL* 유전자의 첫 9개 아미노산을 암호화하는 nucleotide를 primer sequence로 조제하여 사용하였다. 이렇게 조제된 *nptII*나 *tac* promoter로 장착된 *hrpL* 유전자는 sequencing을 통해 확인하였다. *nptII*가 장착된 *E. carotovora ssp. carotovora hrpL* 유전자를 *E. coli*에 형질전환하여  $\text{CaCl}_2$  방법으로 competent cell을 조제하여 *E. carotovora ssp. carotovora* IVET library를 형질전환하여 *E. carotovora ssp. carotovora hrpL*에 의해 유도되는 IVET clone을 선발하는데 사용하였다.

5) Real time RT-PCR을 이용한 *E. carotovora subsp. carotovora hrpL* 유전자의 발현 분석

상기에서 조제한 promoter를 교체한 *hrpL* 유전자의 *E. coli* 내에서 발현 양상을 확인하기 위해, 각 *hrpL* construct를 지닌 *E. coli* DH5a 균주들을 LB 배지에서 optical density가 600nm에서 0.8이 되게 생육시킨 다음, TRI reagent™ 방법으로 total RNA를 분리하였다. 또한 *E. carotovora ssp. carotovora* 내에서 *hrpL* 유전자가 생육 시기에 따라 발현 양상을 알아보기 위해 *E. carotovora subsp. carotovora* 균주를 hrp-inducing medium(M63 medium containing 0.2 % mannitol)이나 LB 배지에서 생육하면서 600nm에서 0.8 혹은 1.5이상일 때 같은 방법으로 *E. carotovora subsp. carotovora* total RNA를 분리하였다.

분리된 total RNA를 template로 *E. carotovora subsp. carotovora hrpL* 유전자의 발현 정도를 Rotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system(Corbett Research)와 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit(Qiagen)를 사용하여 측정하였다. *E. carotovora subsp. carotovora hrpL* 유전자를 증폭하기 위한 primer는 약 200 bp이하로 증폭되게 하여 조제하여 사용하였다. 각 total RNA의 양은 200ng를 이용하였다. 기기에 장착된 프로그램을 이용하여 결과를 분석하였으며, 전기영동에 의해서도 발현 정도를 확인하였다.

6) Promoterless GFP IVET vector를 이용한 *E. carotovora ssp. carotovora* genomic library 조제 및 *hrp* regulate 유전자 screening

*E. carotovora subsp. carotovora*로부터 total DNA를 mid-log phase 세포에서 분리하고 nebulizer로 blunt end가 되게 partial digest하여 agarose gel에 전기영동한 후 약 2kb 크기의 DNA를 agarose gel로부터 분리하였다.

이 DNA를 promoterless long life GFP를 reporter로 가진 pPROBE-NT를 *Sma*I으로 절단하고 *E. carotovora* subsp. *carotovora* DNA를 삽입하여 library를 조제하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora* library stock을 *E. coli* DH5  $\alpha$ 에 형질전환하여 kanamycin plate에서 약 50개의 colony가 자라도록 조정한 후 멸균수를 LB plate에 부어 1개의 plate에서 자란 모든 *E. coli* 세포를 회수하여 이 세포로부터 plasmid DNA를 분리하고, 분리된 플라스미드를 *E. carotovora* subsp. *carotovora* *hrpL* 유전자를 지니고 있는 *E. coli* XL-blue에 형질전환하는데 사용하였다.

*E. carotovora* subsp. *carotovora*의 *nptII* promoter를 장착한 *hrpL*를 포함한 대장균에 pPROBE-NT에 만들어진 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 library clone를 형질전환하였고, plate에서 자란 single colony로 master plate를 만들었다. Master plate에 있는 대장균을 LB가 들어있는 microtiter plate로 옮겨 24시간 배양 후 녹색형광이 control에 비해 증가한(GFP value가 1,000이상인 것) clone들을 micro plate fluorescence reader에서 GFP를 측정하였다. 선발된 클론들로부터 plasmid를 분리하여 *nptII* promoter를 장착한 *hrpL* 유전자와 *E. carotovora* subsp. *carotovora* IVET clone이 존재하는 지를 확인하고 있고, 다시 plasmid를 *E. coli*에 형질 전환하여 *E. carotovora* subsp. *carotovora* library clone들만을 선발할 수 있는 kanamycin만이 첨가된 plate에 도말하여 *hrpL*에 의해 유도되는 *E. carotovora* subsp. *carotovora* IVET library clone들을 선발하였다. 이렇게 선발된 clone들은 *hrpL*이 없는 조건에서 다시 fluorescence spectrophotometer에서 GFP를 측정하여 *hrpL*에 의해 특이적으로 유도되는 최종 클론을 선발하였다. 이렇게 최종 확인된 clone들은 sequencing을 통해 insert DNA의 염기서열을 결정하였고, 이 염기서열을 이용하여 gene bank와 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* genome sequence와 *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1 partial genome sequence에서 blast를 실시하여 homologous한 유전자를 찾아서 유전자를 동정하였다.

#### 7) *hrpL*에 의해 조절되는 유전자의 클로닝

위에서 조제한 BAC library clone들을 2개의 nylon membrane (saturated with LB)에 멸균된 384-pin plastic replicator를 이용하여 transfer시켰다. Nylon membrane들은 LB agar 배지에서 colony가 자랄 수 있도록 24시간동안 상치한 다음 standard 방법에 의해 DNA를 blotting하였다.

위에서 screening된 *hrpL*에 의해 조절되는 IVET clone들의 partial 유전자 sequence들을 바탕으로 각 *hrpL* regulated 유전자들의 primer set를 조제하였다. 각 primer를 이용하여 384 plate에서 정제된 각 BAC clone DNA나 *E. carotovora* subsp. *carotovora* genomic DNA를 template로 사용하여 PCR를 수행하였다. PCR product는 Zymo clean and concentration kit를 이용하여 정제한 다음 Roche사의 Dig-labeling Kit를 이용하여 probe를 조제한 다음 high stringency하에서 BAC library와 함께 colony hybridization을 실시하였다. 각 primer에 의해 PCR product가 증폭된 BAC clone들 또한 *hrpL* regulated 유전자의 단편을 지닌 BAC clone 선발에 이용하였다. 이렇게 선발된 BAC clone들은 여러 가지 제한 효소를 이용하여 절단한 다음 위에서 조제한 각 유전자의 probe를 이용하여 hybridization된 fragment들을 subcloning하는데 이용하였다. 각 *hrpL*에 의해 특이적으로 조절되는 potential 유전자들의 subclone들은 full length 유전자들의 sequencing의 template로 이용되었다. 각 subclone들의 full length sequencing 또한 (주) 솔젠트에서 수행하였다. 각 클론의 염기서열을 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*(*Eca*)와 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC1의 genome sequence와 NCBI에서 검색하여 가장 유사도가 높은 유전자를 찾았고, BLAST와 alignment tool들을 이용하여 각 유전자의 염기서열을 분석하였다.

8) Real time RT-PCR을 이용한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 발현 분석

*E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 균주의 *hrpL* regulated 유전자들의 발현양상을 밝히기 위해 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35균주를 Hrp-inducing 배지인 M63배지와 nutrient rich 배지인 LB배지에 접종한 다음 OD 값이 0.1인 early log phase cell과 OD 2.0이상인 stationary phase cell에서 TRI reagent<sup>TM</sup> 방법으로 total RNA를 분리하였다 (Molecular Research Center). 분리된 total RNA를 template로 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 *hrpL*과 *hrpJ* 유전자의 발현 정도를 Rotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system(Corbett Research)와 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen)를 사용하여 측정하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35균주의 *hrpL*과 *hrpJ* 유전자를 증폭하기 위한 primer는 약 200 bp이하로 증폭되게 하여 조제하여 사용하였다. 회사에서 제공한 프로그램을 이용하여 RT-PCR결과를

분석하여 정량화하였으며, 전기영동에 의해서도 발현 정도를 확인하였다.

#### 9) *hrpL* 유전자 돌연변이주 분리 및 특성분석

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrpL* 돌연변이주를 조제하기 위해 pCRII에 partial *hrpX*, *hrpJ* 유전자와 full length *hrpL* 유전자를 지닌 plasmid를 *hrpL* open reading frame(ORF)의 unique *MfeI* site에 kanamycin 저항성 유전자를 가진 1 kb *EcoRI* fragment인 plasmid pRL648로부터 분리하여 삽입하여 *hrpL* 돌연변이주에 조제에 사용하였다. Kanamycin marker 유전자를 ORF에 삽입하여 돌연변이시킨 *hrpL* 유전자를 broad host range vector인 pRK415에 옮긴 후 helper plasmid pRK2013을 이용하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에 옮겼다. Kanamycin 저항성 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 transconjugant.을 *hrp* inducing medium에서 생육시키면서 2번 새로운 계대 배양한 다음 kanamycin이 첨가된 LB agar 배지에서 putative 돌연변이주들을 선발하였다. 선발된 putative mutants들은 kanamycin 저항성과 tetracycline에 감수성인 콜로니를 돌연변이주로 간주하여 genomic DNA를 putative mutant들로부터 분리하여 dig-labeled *hrpL* probe로 southern hybridization에 의한 확인하거나 *hrpL* primer를 이용하여 genomic DNA를 template로 이용하여 PCR을 이용하여 최종적으로 *hrpL* 돌연변이주들을 선발하였다.

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 야생균주와 *hrpL* 돌연변이주 균주에서 LB 배지와 *hrp* inducing 배지에서 optical density가 600nm에서 0.1과 0.8이 되게 생육시킨 다음, TRI reagent<sup>TM</sup> 방법으로 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA를 template로 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrp* 유전자의 발현 정도를 Rotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system(Corbett Research)와 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit(Qiagen)를 사용하여 측정하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrp* 유전자, *hrpL*, *hrpN*, *hrpJ*, *hrcN*, *hrpF*와 16S rRNA를 positive control로 사용하였고, 이들 유전자들의 발현양상을 알아보기 위해 각 유전자들의 primer는 약 200 bp이하로 증폭되게 하여 조제하여 사용하였다. 이들 유전자의 promoter부위를 pPROBE-NT vector에 PCR primer를 조제하여 클로닝하였다. 선발된 클론들로부터 plasmid를 분리하여 *nptII* promoter를 장착한 *hrpL* 유전자와 정확한 *E. carotovora* ssp. *carotovora*

promoter sequence가 존재하는 지를 확인하였다. 각 유전자들의 조합을 지닌 대장균들을 LB가 들어있는 microtiter plate로 옮겨 배양하면서 주어진 시간에 GFP값을 측정하였다.

#### 10) 무름병 병원성 검정 및 과민감 반응 검정.

담배(Xanthi 품종) 종자를 70% ethanol로 2분 담그고, 1% sodium hypochlorite에 30분간 담가서 표면 살균하고, 멸균수로 여러 번 세척하여 10 ml 1/2 MS medium이 담긴 microtiter plates에 파종하였다. 종자는 14시간 광조건과 25 - 28°C의 성장상에서 생육시켰다. 파종 후 3주 후에 LB 배지에서 28°C에서 36시간 배양한 식물 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 35균주와 *hrpL* 돌연변이주를 멸균수에 약  $1 \times 10^8$  cfu/ml이 되게 현탁하여 각 담배 잎에 5  $\mu$ l씩 접종하고 2일 후에 식물의 무름 증상 유무를 관찰하여 무름병 발병도를 조사하였다. 또한 시판되고 있는 감자를 70% ethanol로 표면 살균한 다음, 2 cm 정도 두께로 절단한 다음, 중앙에 멸균된 cork borer로 상처를 낸 다음 5  $\mu$ l의 무름병균 현탁액을 떨어뜨린 다음 2일 후에 무름증상의 심각도를 무름 증상이 난 둘레를 측정하여 조사하였다.

본 연구에 사용된 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 과민감 반응 유무를 확인하기 위하여, 상기의 방법으로 살균된 xanthi를 상토에 2달 생육시킨 완전 전개된 담배 잎과 pinto bean를 상토에서 1달 생육시킨 다음 완전 전개된 잎에 멸균된 증류수에 희석된 무름병균을 syringe를 이용하여 infiltration한 다음 1-2일 이내에 일어나는 괴사 증상을 과민감 반응으로 간주하였다.

#### 11) AHLs분해 미생물 screening

*Bacillus* sp. 240B1 strain을 AHL 분해 미생물을 분리하는 positive control로 사용하였다. 여러 토양에서 순수분리된 isolates들은 5 ml LB broth에서 150 rpm, 28°C에서 24시간동안 배양한 다음 세균을 원심분리에 의해 회수하고 멸균수로 현탁하고, *P. chlororaphis* O6의 세균도 동량의 멸균수로 현탁하였다. *P. chlororaphis* O6 현탁액과 분리된 isolate현탁액을 배지 중앙에 떨어뜨리고 28 °C에서 2일 동안 배양하였다. O6 균주의 phenazine 생성 유무를 판단하게 해주는 오렌지 색깔을 내지 않은 균주를 AHL 분해 균주로 선발하였다. AHLs분해 능력이 가장 탁월한 isolate C1010균주의 형태적 특징은 transmission electron microscopy(TEM)에서 관찰하였다. C1010균주의 16S

rDNA sequence 분석을 위해서, 16S rRNA specific primer를 이용하여 PCR에 의해 증폭한 1.4 kb PCR product를 전남대학교 기호과학연구 광주분소에서 ABI1301 DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 dye terminator 방법을 이용하여 분석하였다. 얻어진 sequences GenBank database에서 검색된 다른 16S rRNA sequence와 정렬하였다. Web-based ClustalW program 을 strain C1010균주의 phylogenic tree를 작성하는데 사용하였다.

12) *Acinetobacter* sp. C1010와 *Bacillus* sp. 240B1의 HSL 분해 bioassay.

C1010과 240B1의 AHL-분해 능력은 먼저 *P. chlororaphis* O6와 *B. glumae*로부터 AHLs은 ethyl acetate로 추출하였다. 10 ml LB에서 28°C의 온도에서 24시간 생육시킨 C1010 균주와 240B1균주를 동량의 여러 농도를 첨가한 fresh LB와 혼합하여 최종 농도를 40  $\mu$ l가 되게 조절하였다. 혼합액은 28°C에서 주어진 시간동안 배양하여 60분간 UV등 아래에서 살균하였다. C1010의 AHL 분해 능력은 또한 *P. chlororaphis*와 *B. glumae*와 공동배양에 의해서도 결정하였다. *P. chlororaphis* O6 또는 *B. glumae* 현탁액 10  $\mu$ l를 단독 혹은 *Acinetobacter* sp. C1010 현탁액 10  $\mu$ l와 공동으로 50 ml fresh LB broth에 접종하였다. 주어진 시간에, 세포배양액으로부터 상기의 방법을 통해 동량의 ethyl acetate로 AHLs를 추출하였다.

반응액에 남아있는 AHL의 양을 측정은 멸균된 cell-free 혼합액을 5-bromo-4-chloro -3-indolyl-D-galactopyranoside(X-Gal, 40  $\mu$ g/ml)가 첨가된 minimal agar 배지의 한 쪽 끝에 spotting한 다음, 0.6  $\mu$ l의 지수기까지 키운 AHL-indicator strain인 *A. tumefaciens* NT-1을 연속적으로 spot하였다. Agar strips은 28°C에서 24시간동안 배양한 다음 추출액을 접종한 부위로부터 마지막 blue colony로 변환 부위까지의 거리를 측정하였다. 남아있는 AHLs의 상대적인 양은 이미 알려진 AHL의 양과 색깔이 변환 거리와의 방정식에 의해 측정하였다. AHL분해를 증명하기 위해 ethyl acetate 추출물에서의 AHLs은 C18 reversed-phase silica plates에 전개시키고, TLC plates는 건조시킨 다음에 0.3 % LB agar 배지에 *C. violaceum* CV026첨가한 다음 부었다. TLC plates는 28°C에서 24시간동안 배양한 다음 purple spot를 보인 것을 AHLs로 간주하였다.



### 13) *aiiA* 유전자의 클로닝과 *nptII* promoter 장착

*Bacillus* sp. 240B1 균주의 genomic DNA를 추출하여 *aiiA* 유전자의 PCR 증폭의 template로 사용하였다. 750 bp PCR product를 정제하여 pGEM T-easy vector(Promega, Madison, WI)에 클로닝하였다. PCR product insert는 전남대학교 기호과학연구 광주분소에서 ABI1301 DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 dye terminator 방법을 이용하여 분석하였다. 얻어진 sequences GenBank database에서 *Bacillus* sp. 240B1균주의 *aiiA*와 상동성을 비교하였다.

야생형 *aiiA* 유전자의 promoter는 무름병균에서 잘 발현되기 위해서 constitutive promoter인 *nptII*로 PCR 방법을 통해 교체하였다. 이렇게 조제된 *nptII* promoter로 장착된 *aiiA* 유전자는 sequencing을 통해 확인하였다. *nptII*가 장착된 *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* 유전자를 다시 *EcoR*I으로 절단하여 broad host range vector인 pML122 vector에 transfer한 다음, pRK2013을 helper plasmid로 tri-parental mating을 통해 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주에 옮겼다.

*nptII-aiiA*를 지닌 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 병원성 분석은 상기의 담배를 이용한 병원성 분석 방법에 준하여 실시하여 야생형과 비교하였다. 또한 상기의 방법에 의해 AHLs을 야생형과 *nptII-aiiA*가 과다발현된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 분리하여 TLC와 minimal medium agar slice에서 분비되는 양을 비교하였다.

### 14) 무름병균 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 AHL-regulated protein 분리

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 AHLs에 의해서 조절되는 proteomic분석은 최소한 3번이상의 2-D gel analysis에 의해 지속적으로 발현이 억제된 또는 증가된 단백질 spot을 최종 선정하였다. 24시간 LB배지에서 생육한 wild-type과 AiiA overexpression 무름병균으로부터 sonication에 의해 단백질을 분리하여 Bradford assay에 의해 정량하였다. 200  $\mu$ g 단백질 샘플을 Isoelectric focusing(IEF)을 먼저 16  $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 2차원적 전개를 하기 전에, IEF strips을 SDS-PAGE gels에서 2D gel electrophoresis를 수행하였다.

2-D을 수행한 PAGE gel은 PDQuest software을 이용하여 각 spot의 양은 전체 valid spot의 명암도에 의해 normalize하였다. 대조구의 샘플과 비교

해서 그 발현양이 2배 이상인 단백질 spot들을 최종 선발하였다.

선택된 단백질 spot들은 modified porcine trypsin을 이용하여 in-gel 에서 효소적으로 in-gel digestion하였다. In-gel digestion에 의해 정제된 peptide의 MS/MS는 Q-TOF2 mass spectrometer(Micromass, Manchester, UK)에서 nano-ESI에 의해 분석하였다. 단백질을 동정하기 위해, peptide *de-novo* sequencing program, PepSeq을 이용하여 deduce된 아미노산 서열과 spot으로부터 획득한 tryptic peptides에 기록된 모든 MS/MS spectra는 MASCOT search program ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))과 BLAST을 이용하여 NCBInr과 EST databases의 단백질 서열과 비교하여 찾았다.



## 제 2 장. 국내외 기술 개발 현황

## 제 1 절. 국외 관련 기술의 현황

1. 국외에서는 무름병 병원균 *E. carotovora* sp. *carotovora*(*Ecc*)의 병원성에 대한 연구가 상당히 이루어졌으나 지금까지 genome-wide한 병원성에 대한 연구는 이루어진 바 없다.
2. 최근 *E. carotovora* ssp. *carotovora*와 유사한 *E. chrysanthemi*(*Ech*)와 감자에 무름병을 일으키는 *E. c.* subsp. *atroseptica*(*Eca*)의 genome sequencing이 각각 미국과 영국에서 진행 되었다.
3. *Eca* genome sequencing은 영국에서 Dr. Ian Thoth가 주도하여 그 sequence가 완전 공개되었다(Bell *et al*, 2004)
4. *Ech*는 미국 Wisconsin 대학교의 Dr. Nicole (<http://www.ahabs.wisc.edu/~pernalab/erwinia/>)이 주도하여 *Ech*의 genome sequencing을 수행하고 있으나 아직 완성되지 않았으며 TIGR에서 일부 unfinished genome으로 남아있다.
5. 국외에서는 미국의 Dr. Chatterjee group이 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 병원성에 대한 가장 많은 연구를 하였다. 그렇지만 아직까지 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 genome-wide 병원성에 대한 연구는 이루어진 바 없다.

## 제 2 절. 국내 관련 기술의 현황

1. 국내에서 배추 무름병 병원균 *E. carotovora* sp. *carotovora*의 병원성에 대한 분자수준에서의 연구는 거의 이루어지지 않았다. 국내에서 무름병에 대한 연구는 주로 새롭게 발생하는 병을 보고한 논문이 주를 이루고 있으며, 일부 방제 및 저항성육종에 대한 연구보고가 있다.

### 제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과



발현을 평가하는 새로운 기술을 필요로 하게 되었다.

*In vivo* expression technology(IVET)란 유전자의 *in vivo*에서 발현을 분석하여 유전자의 기능을 탐색하는 기술로 structural genomics 염기서열 분석에 의존한 유전자 기능 탐색의 한계를 극복할 수 있는 연구 방법이다. 처음에 이 연구는 순무 종자에 병을 일으키는 *Xanthomonas campestris*에 positive selection marker를 가진 gene fusion technology를 도입하여 병원성을 연구함으로써 시작되었다(Osvourn *et al.*, 1987). 이 기술은 발전하여 살아 있는 생물체가 환경과 특이적으로 반응하여 발현을 조절하는 유전자들의 선발을 가능하게 했으며 1993년에 이러한 기술은 동물에 병을 일으키는 *Salmonella*의 병원성에 대한 연구에 도입되었다(Mahan *et al.*, 1993). 최근의 연구는 *Vibrio cholerae*의 감염과정에서 발현되는 병원성 유전자의 조절과 일시적인 발현을 탐색하고(Lee *et al.*, 1999), *Pseudomonas syringae*의 식물에서 유도되는 유전자를 동정하거나(Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 functional genome을 분석하여 새로운 *hrp* 조절유전자를 찾는 등의 다양한 연구들이 IVET를 이용하여 이루어졌다. 이러한 IVET는 기존에 사용되고 있는 유전자의 전체 염기서열을 알아야지만 가능한 microarray의 단점을 극복하며 전체 유전자의 염기서열 정보 없이도 전체 genome 수준에서 유전자 기능의 탐색을 가능하게 하는 기술로 유전자의 기능을 밝히는 functional genomics 연구에 적합하다(Marco *et al.*, 2003; Rainey와 Preston, 2000).

본 연구에서는 IVET를 이용하여 배추 무름병균 *Ecc*에서 기주인 배추에서 또는 다른 배양조건에 의해 발현이 조절되는 유전자를 genome-wide 수준에서 선별하고자 IVET vector에 *Ecc* genomic library를 만들고 배추 및 다른 배양조건에서 발현이 조절되는 클론을 선별하였다(Fig. 1-1).



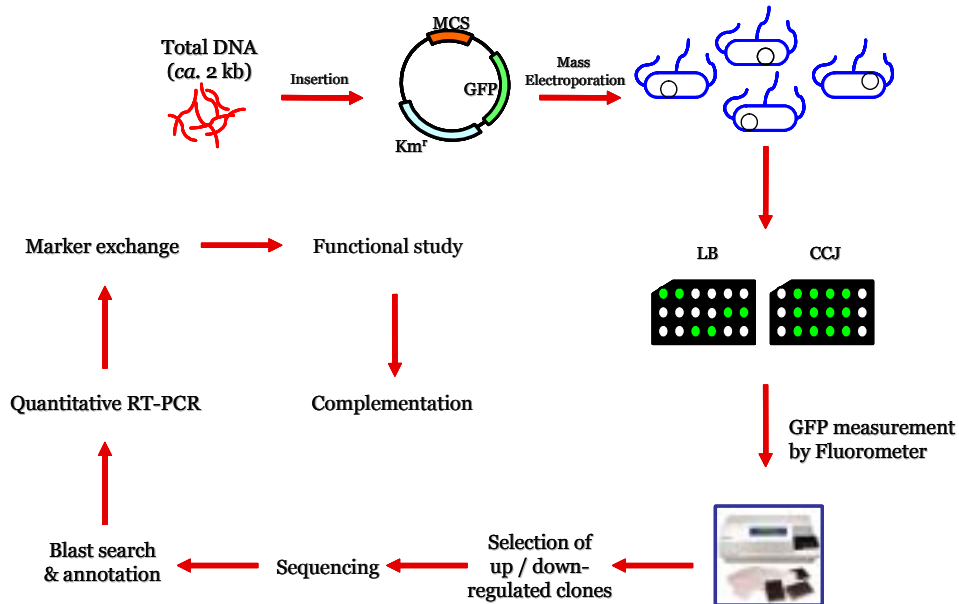


Fig. 1-1. Schematic description of overall research process.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 배추 무름병균의 분리 및 실험 균주 선발

주로 여름배추 재배지인 강원도, 경상북도, 충청북도의 배추, 감자, 양배추, 무의 재배지에서 재배지 토양과 병든 식물체를 수집하였다. 토양에서 병원균분리는 채취한 토양 5 g을 50 ml 멸균수가 들어있는 삼각 플라스크에 넣고 30분 동안 상온에서 150-200 rpm으로 진탕하였고, 병든 식물에서 병원균의 분리는 이병부와 건전부의 경계부위를 잘라 50 ml 멸균수가 들어있는 삼각 플라스크에 넣고 30분 동안 진탕하였다. 이 현탁액 100  $\mu$ l를 5 ml의 농화배지 (Polypectate enrichment medium: sodium polypectate 1.5 g, 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 ml, 10% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 ml, 5% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 ml)에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 3-5일 동안 진탕배양한 후 배양액을 선택배지인 CVP(Crystal violet peptate: 1 N NaOH 4.5 ml, 10% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 3 ml, NaNO<sub>3</sub> 1 g, sodium

polypectate 10 g, 10% SDS 0.5 ml, 0.075% crystal violet 1 ml, agar 1.5 g)에 streak를 한 후 28°C에서 48시간 배양하여 전형적인 무름병균을 얻었다 (Schaad *et al.*, 2001). 이렇게 분리된 균은 배추의 증류를 사용하여 병원성을 확인하였고, MIDI(Miller, 1982)을 이용한 동정하였다.

분리된 모든 균주의 플라스미드 profile을 조사하여 플라스미드를 가지고 있지 *Ecc* 35균주를 실험균주로 선발하였으며, *Ecc* 35의 항생제 Rifampicin(100 µg/ml)에 저항성 자연돌연변이체, *Ecc* 35R를 본 연구의 모든 연구의 실험균주로 사용하였다. 본 연구에 사용한 모든 균주는 기본적으로 Luria Bertani(LB)에서 배양하였으며, 20% glycerol stock을 만들어 -75°C 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

나. IVET vector에 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 35R의 promoter library 제작

#### 1) Insert DNA 제조

Sambrook 등의 방법(2001)에 의해 *Ecc* 35R로부터 genomic DNA를 분리 및 조작하였다. 분리된 DNA를 제한효소 *Sau*3AI으로 부분 절단하여 0.7% agarose gel에 전기 영동하였고, 약 2 kb 크기의 DNA에 해당하는 부분의 gel로부터 Zymo DNA recovery kit(Zymo Research, CA, USA)를 이용하여 DNA를 회수하고 정제 및 농축하였다.

#### 2) Vector plasmid 제조

Promoterless GFP vector인 pPROBE-NT(Miller *et al.*, 2000)을 IVET vector로 사용하였다. 플라스미드를 가진 대장균으로부터 pPROBE-NT를 분리하였고, 분리한 플라스미드를 제한효소 *Bam*HI(Takara)으로 절단한 후 self-ligation이 일어나지 않도록 shrimp alkaline phosphatase(SAP, 1 unit/µl, Promega)를 처리하여 5' 말단 인산기를 제거하였다. 이렇게 처리한 DNA를 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 DNA band를 확인하고 Zymo DNA recovery kit를 이용하여 gel로부터 플라스미드를 회수한 후 정제 및 농축하였다.

#### 3) Ligation 및 transformation

준비된 vector와 insert DNA를 T4 DNA ligase(1 unit/µl, Roche)로 14°C에서 12-16시간동안 ligation시킨 후, *E. coli* DH5α competent cell에 chemical transformation 시켰다. 선발배지에서 자란 형질전환체 일부로부터

플라스미드를 분리하고 insert DNA를 확인하여 DNA 삽입율을 계산하였다.

다. *Ecc* 35R에 promoter library clone 전이 및 replica plate 제작

1) *Ecc* 35R promoter library clone pool 제작

*Ecc* 35R promoter library clone을 대장균에 형질전환하여 선발배지에 도달할 때 선발 배지 한 plate 당 형질전환 된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 의 콜로니가 50-100개 되도록 형질전환체의 밀도를 조정하였다. 선발배지에서 자라는 50-100 콜로니의 대장균을 48시간 동안 배양한 후 소량의 멸균수를 넣어 모든 콜로니를 백금이로 잘 모아 1.5 ml tube에 수집한 후 플라스미드를 분리하였다. 분리한 플라스미드를 Zymo clean & concentration kit (Zymo Research, Orange, CA, USA)를 이용하여 10  $\mu$ l로 정제하였다.

2) *Ecc* 35R 균주로 형질전환

*Ecc* 35R의 electroporation competent cell을 다음과 같이 만들었다. 단일균총을 150 ml SOB(20 g Bacto-trytone, 5 g yeast extract, 0.584 g NaCl, 0.186 g KCl, pH 7.0)가 들어있는 삼각 플라스크에 접종하여 27 $^{\circ}$ C, 200 rpm으로 12-14시간 배양한 다음, 이 배양액 1.5 ml를 150 ml의 새로운 배지에 접종하고, 27 $^{\circ}$ C에서 200 rpm으로 OD<sub>600</sub>값이 0.5-0.7이 되도록 약 4시간 동안 배양하였다. 배양한 삼각 플라스크를 20분 동안 얼음 속에 넣어 차갑게 하고, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 6000 rpm으로 원심 분리하여 세균세포를 얻었다. 얻은 세균세포를 각각 150 ml, 75 ml, 20 ml의 얼음 속에서 미리 차갑게 한 10% 글리세롤로 차례로 세척하였다. 최종 원심분리 후 얻은 세균 세포를 1 ml의 차갑게 한 10% 글리세롤로 현탁하고 얼음 속에 미리 넣어 둔 1.5 ml tube에 40  $\mu$ l씩 담아서, 그 tube를 액체 질소에 넣어 급속 동결시켜 -75 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. Competent cell을 -75 $^{\circ}$ C 초저온냉동고에서 꺼내 얼음 속에 두어 천천히 해동시키고, 정제한 플라스미드 1  $\mu$ l를 넣어 섞은 다음, 얼음 속에서 미리 차갑게 한 electroporation용 cuvet(1 mm, Bio-Rad, USA)에 넣었다. Electroporator (Equibio, USA)에 cuvet을 넣고 전기충격(700 V, 25  $\mu$ F, 1540  $\Omega$ )을 준 다음, 1 ml SOC(980  $\mu$ l SOB, 10  $\mu$ l 2 M MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l 2 M glucose)로 세균현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 14 ml round-bottom tube에 넣고, 27 $^{\circ}$ C에서 200 rpm으로 1시간 배양하였다. 이 배양액을 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)이 함유된 LB agar 배지에 도달하여 *Ecc* 35R 형질전환체를 얻었고 plasmid pool당 48 콜로니씩 2개의 replica plate를 만들어 보관하였다.

라. 배추즙 및 다른 배양조건에서 발현이 달라지는 클론 선발

1) 스크리닝 배지

한 개 Minimal과 세 개 rich media를 가지고 *Ecc* 35R이 자라는 동안 promoter 발현 분석을 위해 사용되었다(Tao *et al.*, 1999). 기본배지로 LB broth가 사용되었고, 배추에서 발현이 달라지는 클론을 선발하기 위한 배추즙 (CCJ: Chinese cabbage juice) 배지, 현재 배추 무름병 방제에 가장 효과적인 농약(일품)으로 알려진 일품의 주성분인 oxolinic acid의 sublethal 농도인 0.1ppm이 포함된 LB broth(LB+OX) 배지 그리고 최소배지인 M9 최소배지 (M9; Sambrook와 Russell, 2001)가 클론 선발에 사용되었다. CCJ 배지는 다음과 같이 조제하였다. 배추 중독을 화염 소독한 칼로 잘라서 흐르는 물로 씻은 후 70% ethanol에 5분 동안 담가 표면 살균을 하였다. 배추 무게의 1/2만큼의 멸균수를 배추와 함께 믹서기에 넣고 갈아서 거즈로 거른 후 얻은 액을 4°C에서 6000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상정액을 얻었다. 이 상정액을 5겹의 여과지(No. 1, 110 mm, TRK Ltd. Japan)로 거르고 kanamycin을 50 µg/ml로 첨가한 후 50 ml Falcon tube에 담아 -75°C에 보관하면서 사용하였다.

2) 균주 배양, 형광 측정 및 클론 선발

*Ecc* 35R promoter library clone을 가진 *Ecc* 35R을 LB agar km<sup>50</sup>에서 27°C에서 48시간 배양하고 그 *Ecc* 35R을 replica plater로 찍어 microtiter plate의 각 well에 들어있는 멸균수 200 µl에 현탁한다. 새로운 96 well microtiter plate의 각 well에 각각의 선별배지를 150 µl씩 넣은 후 *Ecc* 35R 클론으로 만든 세균현탁액 25 µl씩을 선별배지가 들어있는 microtiter plate의 각 well에 접종하였다. 접종한 microtiter plate는 27°C에서 48시간 정지 배양하였다. 48시간 배양 후 microtiter plate의 각 well의 형광량을 microplate fluorescence reader(FL500, Biotech, USA, excitation 485, emission 530, sensitivity 30)를 이용하여 측정하였다. 각각의 배양조건에서 측정한 형광값으로부터 기준 값을 정하고, 기준값보다 2배 증가 또는 감소한 클론을 각각 발현 증가 또는 발현감소 클론으로 선발하였다. LB+OX, M9, CCJ는 LB broth의 형광값과 비교하여 선발하였다.

마. 염기서열 결정 및 gene bank에서 homologous gene 검색

*Ecc* 35R부터 선발한 플라스미드(클론)를 분리하였다. Km<sup>50</sup>이 함유된 5 ml LB broth에서 배양한 후 miniprep법으로 plasmid를 분리하였고, 분리된

플라스미드를 Zymo clean & concentration kit를 사용하여 10  $\mu$ l로 정제 및 농축하였다. pPROBE-NT에서 클로닝 사이트와 GFP structural gene 사이에 있는 염기서열에서 염기서열 결정용 프라이머(5' TCCTCCTTATAAAGTTAATCT 3')를 제작하고 이 프라이머를 이용하여 삽입된 유전자의 GFP structural gene 쪽의 염기서열을 결정하였다. Takara sequencing service에 의뢰하여 수행하였다. 각 클론으로부터 얻어진 염기서열을 이용하여 NCBI gene bank의 microbial genome section에서 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*(*Eca*) SCRI1043의 genome sequence에서 상동 유전자를 검색하고 검색되지 않은 염기서열은 gene bank 전체의 염기서열에서 검색하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 무름병균 분리

무름병균은 강원도에서 60개, 경북에서 43개, 충북에서 2개 균주로 총 105개 균주를 분리하였다. 105개 균주 중 43개 균주가 배추 재배지 토양에서 분리되었고, 62개는 병든 식물체로부터 분리되었는데 배추에서 52개, 무에서 7개, 양배추에서 1개, 감자에서 2개 균주가 각각 분리되었다(Table 1-1). 분리균은 MIDI를 이용하여 동정하였다. MIDI 분석 결과 105개 균주 중 94개의 균주가 *Ecc*로 동정 되었으며 8개 균주는 무름병을 일으키는 *Pseudomonas* sp.로 동정 되었다. 3개 균주는 MIDI에 의해 동정 되지 않았다. Chuang 등의 방법(1999)으로 박테리옌 조절유전자를 PCR(DY-R1; TGGTGAATTGACAATACG, DY-F1: TT GTAGTGCATAGGTTGG)로 확인 결과 *Ecc*로 동정된 94개 균주에는 모든 이 유전자가 존재하였다.

**Table 1-1.** *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from infected plant and soil in this study

Isolate	Source	Location isolated	Identification with MIDI	PCR <i>brg</i>
1	Chinese cabbage	Pyeongchang, Gangwon	<i>Ecc</i> <sup>a)</sup>	+
2	Chinese cabbage	Hoengseong, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
3	Chinese cabbage	Hoengseong, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
4	Chinese cabbage	Hoengseong, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
5	Chinese cabbage	Pyeongchang, Gangwon	- <sup>b)</sup>	+
6	Chinese cabbage	Pyeongchang, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
7	Chinese cabbage	Pyeongchang, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
8	Chinese cabbage	Hoengseong, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
9	Soil	Gangneung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
10	Potato	Backbongryung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
11	Radish	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
12	Chinese cabbage	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
13	Chinese cabbage	Samcheok, Gangwon	<i>P. sp.</i> <sup>c)</sup>	-
14	Chinese cabbage	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
15	Chinese cabbage	Backbongryung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
16	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
17	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
18	Radish	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
19	Radish	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
20	Chinese cabbage	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
21	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
22	Radish	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
23	Chinese cabbage	Backbongryung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
24	Chinese cabbage	Samcheok, Gangwon	<i>P. sp.</i>	-
25	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
26	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeongbuk	<i>Ecc</i>	+
27	Chinese cabbage	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
28	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeongbuk	<i>Ecc</i>	+
29	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeongbuk	<i>Ecc</i>	+
30	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeongbuk	<i>Ecc</i>	+
31	Potato	Jeongseon, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
32	Chinese cabbage	Samcheok, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
33	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
34	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
35	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeongbuk	<i>Ecc</i>	+

<sup>a)</sup>; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. <sup>b)</sup>; not identified. <sup>c)</sup>; *Lactobacillus sp.* <sup>d)</sup>; *Pseudomonas sp.*

continued.

Isolate	Source	Location isolated	Identification with MIDI	PCR <i>brg</i>
36	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>P. sp.</i>	-
37	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
38	Chinese cabbage	Jechon, Chung-buk	<i>Ecc</i>	+
39	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
40	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
41	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	-	+
42	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
43	Cabbage	Backbongryung, Gang-won	<i>P. sp.</i>	-
44	Chinese cabbage	Samcheok, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
45	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
46	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
47	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
48	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
49	Radish	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	-
50	Radish	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
51	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
52	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>P. sp.</i>	-
53	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
54	Chinese cabbage	Jeongseon, Gang-won	<i>P.s</i>	-
55	Chinese cabbage	Backbongryung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
56	Chinese cabbage	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
57	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
58	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>P. sp.</i>	-
59	Chinese cabbage	Samcheok, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
60	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
61	Chinese cabbage	Taebak, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
62	Radish	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
63	Chinese cabbage	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
64	Soil	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
65	Soil	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
66	Soil	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
67	Soil	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
68	Soil	Bonghwa Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
69	Soil	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
70	Soil	Bonghwa Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+

<sup>a)</sup>; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. <sup>b)</sup>; not identified. <sup>c)</sup>; *Lactobacillus* sp. <sup>d)</sup>; *Pseudomonas* sp.

continued.

Isolate	Source	Location isolated	Identification with MIDI	PCR brg
71	Soil	Backbongryung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
72	Soil	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
73	Soil	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
74	Soil	Gangneung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
75	Soil	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
76	Soil	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
77	Soil	Gangneung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
78	Soil	Gangneung, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
79	Soil	Hoengseong, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
80	Soil	Bonghwa, Gyeong-buk	<i>P. sp.</i>	-
81	Soil	Backbongryung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
82	Soil	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
83	Soil	Jechon, Chung-buk	<i>Ecc</i>	-
84	Soil	Taeback, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
85	Soil	Bonghwa Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
86	Soil	Hoengseong, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
87	Soil	Hoengseong, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
88	Soil	Gangneung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
89	Soil	Gangneung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
90	Soil	Gangneung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
91	Soil	Gangneung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
92	Soil	Gangneung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
93	Soil	Gangneung, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
94	Soil	Hoengseong, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
95	Soil	Hoengseong, Gang-won	-	-
96	Soil	Hoengseong, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
97	Soil	Anbanduck, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
98	Soil	Pyeongchang, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
99	Soil	Pyongchang, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
100	Soil	Pyeongchang, Gang-won	<i>Ecc</i>	+
101	Soil	Samcheok, Gangwon	<i>Ecc</i>	+
102	Soil	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
103	Soil	Cheongsong, Gyeong-buk	<i>L. sp.</i> <sup>c)</sup>	-
104	Soil	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+
105	Soil	Yeongyang, Gyeong-buk	<i>Ecc</i>	+

<sup>a)</sup>; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. <sup>b)</sup>; not identified. <sup>c)</sup>; *Lactobacillus* sp. <sup>d)</sup>; *Pseudomonas* sp.

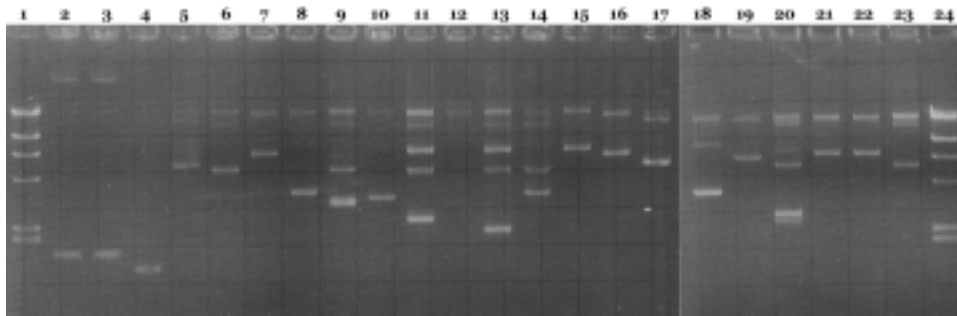


#### 나. 실험균주 선발

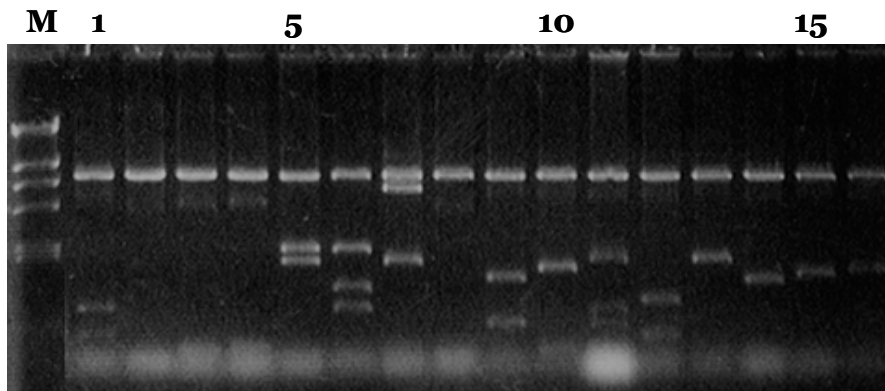
본 연구에서 사용하는 균주는 IVET clone의 기주로 사용되어야 함으로 94개 *Ecc* 균주의 플라스미드를 확인하였다. 플라스미드를 확인한 94개 균주 중 20개 균주가 다양한 플라스미드를 가지고 있었고 74개 균주가 플라스미드를 가지고 있지 않았는데, 그 중에 *Ecc* 35 균주를 본 실험을 위한 공시균주로 선발하였다(Fig. 1-2).

#### 다. *Ecc* 35R promoter library 완성도

*Ecc* 35R 균주의 DNA를 IVET vector인 pPROBE-NT에 ligation하여 얻은 클론 중 삽입된 DNA를 가진 비율과 삽입된 DNA의 크기를 확인하기 위하여 48개의 transformants를 임의로 선정하여 플라스미드를 분리하고 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단하여 agarose gel에서 전기영동하였다(Fig. 1-3). 실험한 48개의 플라스미드 중 40개가 insert DNA를 가지고 있었으며(DNA 삽입 확률 83%) 삽입된 insert DNA의 크기는 0.5-5 kb 범위였다. *E. coli* DH5 $\alpha$  형 질전환체 50-100개로부터 플라스미드를 분리한 plasmid pool를 *Ecc* 35R에 형질전환하여 plasmid pool 당 96개의 *Ecc* 35R 콜로니를 replica plate를 만들어 저장하였으며 총 51,840개의 *Ecc* 35R 콜로니를 library로 저장하였다. 전체 51,840개의 클론 중에서 insert DNA의 orientation이 GFP와 반대로 삽입될 경우를 감안하면 총 클론 수의 반인 25,920 클론이 GFP를 발현시킬 수 있는 방향으로 promoter가 위치하게 된다는 계산이 가능하고, 그 중에 insert DNA를 가지고 있는 확률이 약 83%이므로 전체 21,514개의 클론이 마커인 GFP를 발현시킬 수 있는 클론으로 계산된다. *Erwinia* spp.는 약 4,500 - 5,500개의 ORF를 가지고 있으며 이 중에 상당수의 ORF가 operon형태로 한 개의 promoter로 묶여 있으므로 21,514개의 *Ecc* promoter clone 수는 숫자적으로 *Ecc*의 전체 promoter를 cover하는 클론 수에 해당한다.



**Fig. 1-2.** Plasmid profile of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) isolated to South Korea. Lane 1 & 24; molecular weight marker ( $\lambda$  DNA/*Hind*III), 2 & 3; Ecc KACC10057, 4; Ecc CNUPBL1398, 5; Ecc 3, 6; Ecc 6, 7; Ecc 9, 8; Ecc 14, 9; Ecc 15, 10; Ecc 16, 11; Ecc 18, 12; Ecc 20, 13; Ecc 21, 14; Ecc 22, 15; Ecc 23, 16; Ecc 26, 17; Ecc 27, 18; Ecc 33, 19; Ecc 34, 20; Ecc 45, 21; Ecc 55, 22; Ecc 59, 23; Ecc 60.



**Fig. 1-3.** Agarose gel electrophoresis of plasmids isolated from *E. coli* containing *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 35R promoter library clone and digested with *EcoRI* and *HindIII*. M; Molecular Marker.

라. 배지에 따라 발현이 다른 클론 선발

전체 51,840개의 클론을 LB broth, LB+OX, CCJ, 그리고 M9배지에 접종하여 48시간 배양 후 FL500(Microplate Fluorescence Reader)을 이용하여 각 well의 녹색 형광 값을 측정하였고, 각 처리에서 녹색형광을 측정한 값에서 기초 값(basal value)을 정하였다. 이 기초 값보다 2배 이상인 형광 값을 control인 LB broth에서 보인 형광 값과 비교하여 2배 이상 증가 또는 감소된 클론을 선발한 결과를 Table 1에 정리하였다. 배추 즙에서 324개 클론이(전체 클론의 0.63%), M9배지에서 146개(0.28%), LB+OX(LB배지에 0.1ppm oxolinic acid를 첨가해 준 배지)에서 146개(0.22%)가 up-regulated 클론으로 나타났다. 반면에 배추 즙에서 422개(0.81%), M9배지에서 12개(0.02%), LB+OX 배지에서 17개(0.03%)가 down-regulated 클론이었다(Table 1-2). 이상의 결과는 1차 screening에서 2배 이하인 클론을 제외하고 다시 2차, 그리고 3차 까지 screening한 결과이다. M9과 LB+OX배지에서 screening한 경우 up-/down-regulated 클론들이 재현성이 확실했지만 배추 즙에서 screening한 경우 형광 값의 변이가 컸다. 배추 즙에서 발현이 증가하거나 감소한 클론 수가 M9 또는 LB+OX에서보다 2배 이상 많았으며, M9과 LB+OX에서는 발현이 증가한 클론수가 감소한 숫자보다 8-12배 정도 많았다(Table 1-2).

**Table 1-2.** The number of up- or down-regulated clones at different culture condition

Culture condition	Up/down	No. of clones <sup>a</sup>	Ratio (%) <sup>b</sup>
CCJ (Chinese cabbage juice)	UP	324	0.63
	Down	422	0.81
M9 (Minimal medium)	UP	146	0.28
	Down	12	0.02
LB+OX (LB containing 0.1 ppm oxolinic acid)	UP	146	0.28
	Down	17	0.03
Total		1067	2.05

<sup>a</sup>: Clones showed 2 folds higher (up-regulated) or lower (down-regulated) of green fluorescence than the control culture in Luria broth at 27°C.

<sup>b</sup>: Ratio of the up- or down-regulated clones to the 51,840 screened clones.

마. 선발된 클론과 homologous gene 검색

3차 screening에 의해 선발된 1067개 클론의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열로 *Eca*의 genome sequence와 전체 gene bank에서 homologous gene를 검색한 결과 전체 1067 클론 중에서 55개의 염기서열이 두 개 이상과 동일한 염기서열을 가지고 있었다. 즉 전체의 약 5.2%(55/1067)가 sibling 클론으로 조사되었다(Table 1-3). 이 sibling clone은 형질전환 대장균 50-100개로부터 얻은 plasmid pool를 *Ecc* 35R에 형질전환하여 96개의 형질전환체를 얻었으므로 대장균 한 개의 콜로니로부터 분리된 동일한 플라스미드가 두 개 이상의 *Ecc*에 형질전환되어 나타난 결과로 추정된다. 대장균 선발 배지에서 50-100개의 콜로니로부터 플라스미드를 분리하고자 하였는데 plate당 평균 75개의 콜로니가 배양되었다고 가정한다면 75개 다른 클론의 플라스미드를 *Ecc*에 형질전환하여 96개의 *Ecc* 클론을 얻었으므로 약 20%의 sibling clone이 생기는 결과를 예측할 수 있다. 전체의 72%인 769개 클론이 *Erwinia* spp.의 유전자와 homologous하였으나 5.5%가 sibling이기 때문에 실제로 66.5%인 727개가 유사하다고 할 수 있다. 나머지는 *Erwinia* spp.에 homologous한 유전자 없는 클론이었다.

**Table 1-3.** Blast search results of the up- or down-regulated clones

Screening medium	Regulation	Blast n or Blast x		
		No. of total clone	<i>Erwinia</i> spp.	Others
LB+OX	Up	146	97 (10)*	49 (15)
	Down	17	12 (0)	5 (0)
M9	Up	146	125 (12)	21 (1)
	Down	12	4 (0)	8 (0)
CCJ	Up	324	243 (9)	81 (1)
	Down	422	288 (11)	134 (6)
Total		1067	769 (42)	298 (23)

\*: The number in parenthesis is the number of sibling clone.

## 제 2 절. 선발된 클론의 발현분석 및 target 유전자의 최종 선발

### 1. 서언

제 1절의 연구에서 promoter activity reporter인 GFP의 발현의 차이로 나타나는 형광량을 비교하여 선발한 각 유전자의 발현(expression) 양을 Quantitative real-time RT(reverse transcription)-PCR 방법으로 mRNA의 생성량을 비교하여 최종 target 유전자를 선발하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. Quantitative real-time RT-PCR를 위한 프라이머 제작

NCBI blast search를 통해 찾은 유전자 중에서 배추즙에서 발현이 증가한 314개 클론, M9배지에서 발현이 증가한 133개와 감소한 14개로 147개 클론, LB+OX에서 발현이 증가한 121개와 감소한 17개로 138개 클론을 합한 총 599개 클론을 선발하여 Primer3 프로그램(<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>)을 이용하여 RT-PCR을 위한 프라이머를 찾았고 프라이머들은 Bioneer사에 의뢰하여 제작하였다.

#### 나. Total RNA 분리

선발된 클론을 가진 *E. coli* 35R 균주를 LB broth와 클론 선발에 사용한 배지에서 12시간 배양한(27°C, 200 rpm) 후 배양액 15 ml를 원심분리하여 얻은 세균 pellet에 1 ml의 Trizol reagent(Molecular Research Center, USA)를 넣고 pipetting하여 현탁시키고 10분간 상온에 놓아두었다. 0.2 ml의 chloroform을 넣어 15초간 흔들어준 다음, 다시 5분간 상온에 놓아두었고, 15,000 rpm으로 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상정액 0.5 ml를 새로운 tube에 옮겨서 0.5 ml의 isopropanol을 넣고 흔들어 5분간 상온에 두었다. 이 혼합액을 15,000 rpm, 4°C에서 8분간 원심분리하여 상정액을 버리고, pellet을 1 ml 75% DEPC ethanol로 세척한 후 tube를 3-5분 동안 뒤집어 놓아 ethanol이 날아가도록 하였다. 이 pellet을 20-50 µl의 0.01%



DEPC(diethylpyrocarbonate, Sigma) 멸균수로 용해시키고, 용해되지 않은 잔재물을 5분 동안 원심분리하여 제거하였다.

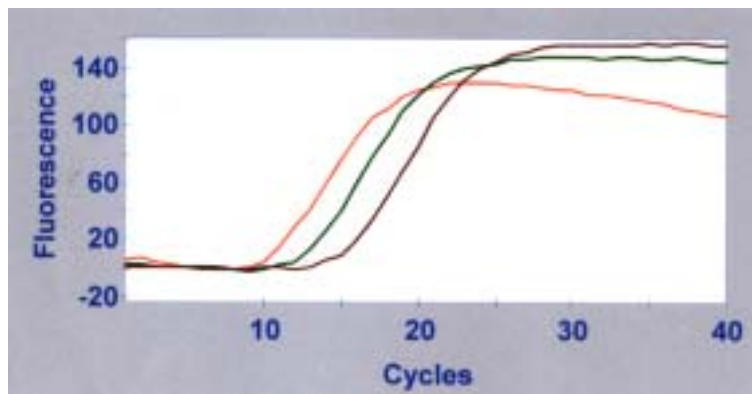
#### 다. Quantitative real-time RT-PCR




Quantitative real-time RT-PCR은 Smart Cycler(Cepheid, USA)를 사용하여 수행하였고, PCR 반응은 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, USA)를 사용하였다. QuantiTect SYBR Green RT-PCR master mix 12.5  $\mu$ l, forward와 reverse 프라이머(12.5 pmol/ $\mu$ l) 각 2  $\mu$ l, QuantiTect RT mix 0.25  $\mu$ l, RNA(0.08 ng/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l, RNase-free water 3.25  $\mu$ l를 혼합하여 25 $\mu$ l RT-PCR tube에 넣어 RT-PCR을 수행하였다. Quantitative real-time RT-PCR조건은 reverse transcription 50°C(30분), initial activation 95°C(15분), denaturation 94°C(15초), annealing 54°C(30초), extension 72°C(30초)로 40 cycle이었다.

### 3. 결과 및 고찰

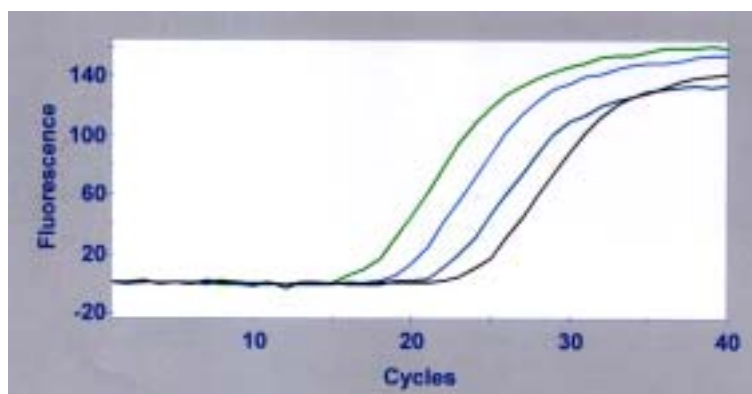
#### 가. PCR 조건 확립





RT-PCR 1 cycle 당 RNA가 균일하게 증폭 범위를 찾기 위해 internal standard로 사용할 알아보기 위하여 16S rRNA의 특이적 primer (forward; 5' CAGCCACACTGGAA CTGAGA 3', reverse; 5' GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG 3')를 가지고 RT-PCR을 수행하였다. 배추즙에서 12시간 배양한 *Ecc* 35R로부터 분리한 RNA를 5,000배, 25,000배, 125,000배로 희석하여 PCR을 수행하여 cycle 당 Ct(cycle threshold) 값을 계산한 결과(Fig. 2-1) 5배씩 희석한 RNA에서 Ct 값의 차( $\Delta$ Ct)가 2-2.5이었다. 또한, 선발된 클론 중 하나인 J1B11의 RNA를 1,000배, 5,000배, 25,000배, 125,000배로 희석하여 RT-PCR을 수행하였는데(Fig. 2-2), 각 희석농도에서 측정된 Ct 값으로 희석배수간의 Ct 값의 변화( $\Delta$ Ct)을 계산한 결과  $\Delta$ Ct 값의 범위는 2.05-2.57이었다. RNA의 각 단계별 희석배수인 5배를  $\Delta$ Ct로 나누면 1 cycle당 약 2배로 RNA가 증폭되는 것으로 계산되었다. 유전자의 발현 정도에 따라 희석배수는 달라지지만 RNA 정량을 위한 RT-PCR 조건을 확립하였다.



Total RNA from <i>Ecc</i> 35R in CCJ culture, 12 hours			
16S rRNA	Dilution	Ct	$\Delta$ Ct
	5,000	12.12	-
	25,000	14.27	2.15
	125,000	16.71	2.44

**Fig. 2-1.** Quantitative real-time RT-PCR carried out with *E. carotovora* subsp. *carotovora* 16S rRNA specific primers and different dilution of RNA isolated from *Ecc* 35R grown into Chinese cabbage juice (CCJ).

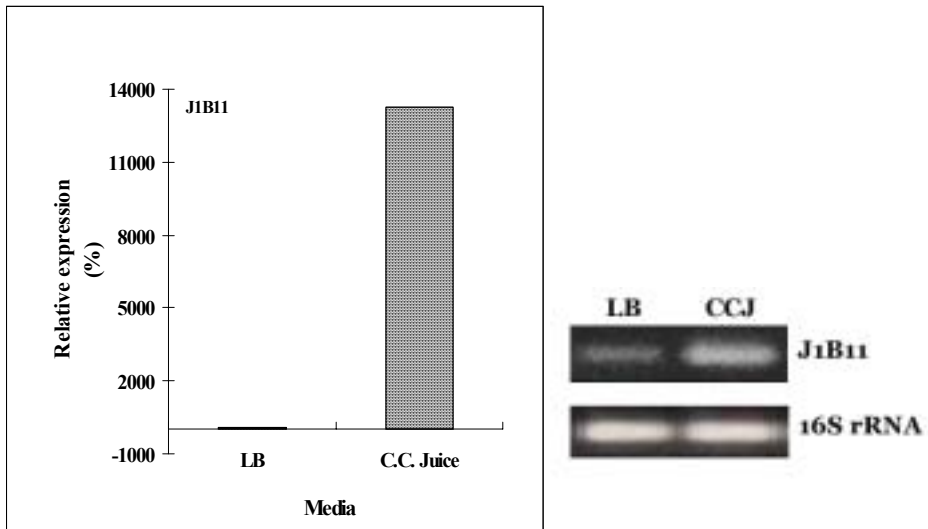


Total RNA from <i>Ecc</i> 35R in CCJ culture, 12 hours			
J1B11	Dilution	Ct	$\Delta$ Ct
	1,000	18.95	-
	5,000	21.33	2.38
	25,000	23.90	2.57
	125,000	25.95	2.05

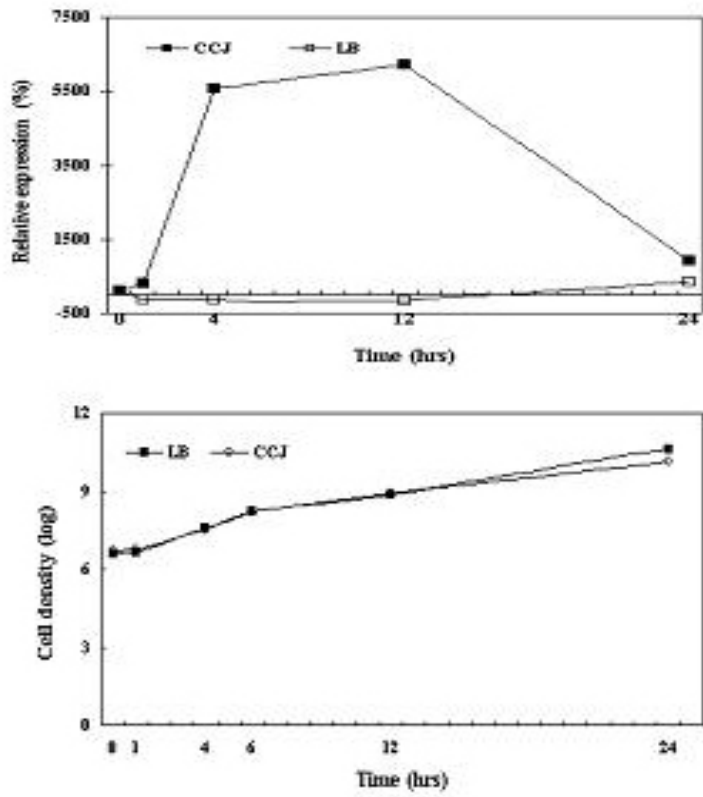
**Fig. 2-2.** Quantitative real-time RT-PCR carried out with primers of J1B11 and different dilution of RNA isolated from *Ecc* 35R grown into Chinese cabbage juice (CCJ).

#### 나. J1B11 클론의 발현분석

배추즙에서 발현이 크게 증가하는 J1B11은 배양 12시간 후에 LB와 배추즙에서 상대적 발현 양을 비교하였을 때 배추즙에서 발현이 LB에서보다 13,251%(132.5배 높음)로 매우 높았다(Fig. 2-3). J1B11 유전자의 배양 시간별 유전자 발현 양상을 조사한 결과 배추즙에서 배양을 시작한 한 시간 후부터 발현이 증가하여 4시간 후에는 큰 폭으로 증가하였고, 그 후 발현양이 유지되다가 배양 12시간 후에는 점차 감소하였다. 한편 대조로 사용한 LB에서는 배양기간 동안 발현이 증가하지 않았다. 배추즙과 LB배지에서 배양시간 별로 *Ecc* 35R cell density의 변화를 조사한 결과 LB배지와 배추즙에서 증식에 대한 양상은 크게 차이가 나지 않았다(Fig. 2-4). J1B11은 blast search에서 기능이 전혀 밝혀지지 않은 유전자로 앞으로 그 기능을 밝히는 것은 매우 *Ecc*를 이해하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.



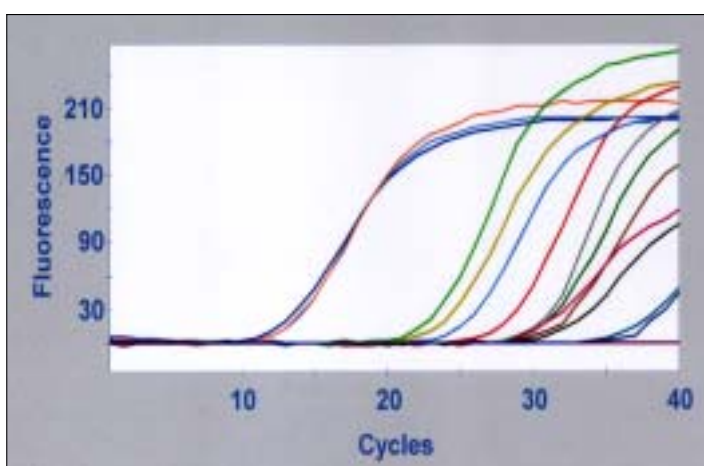
**Fig. 2-3.** Relative expression level of J1B11 in *Ecc* 35R at 12 hour-cultures in LB and Chinese cabbage juice (CCJ).



**Fig. 2-4.** Time course expression of J1B11 in *Ecc 35R* and change of CFU (colony forming units) in LB and Chinese cabbage juice (CCJ).

#### 다. 선발된 클론의 발현분석

항상 발현하는 유전자인 16S rRNA를 동일한 cycle에 증폭이 되도록 농도를 맞추고(시료의 초기 16S rRNA의 양을 동일하게 함) 각 클론으로부터 제작한 primer로 RT-PCR을 수행한 결과의 한 예를 Fig. 2-5에서 보여주고 있다. 이러한 작업을 거쳐 선발된 모든 클론의 발현을 분석한 결과를 table 2-1과 같다. 배추즙(CCJ)에서는 up된 314개 clone들 중 62 clone이 Ct 값이 3 cycle 이상 빠른 것으로 나타났다. 즉 LB에서 배양했을 때보다 mRNA의 양이 약 8배에서 16배(cycle당 2-2.5배) 이상 많은 것으로 나타났다. M9에서는 up되었던 133 clone 중 6개가 RT-PCR 결과 3 cycle 이상 차이를 보였고 up되었던 14 clone 중 12개가 3 cycle 이상 차이를 보였다, LB+OX배지에서 up되었던 121개 중 23개가 up된 것으로 판정되었고 down되었던 17개 중 2개가 down된 것으로 결정되었다. 이렇게 promoterless reporter gene의 활성차이에 의한 선발 결과와 RT-PCR에 의한 선발의 차이가 많은 것은 본 연구에서 매우 실망스런 결과이지만 논리적으로 해석해보면 첫째로 두 가지 선발방식의 민감성의 차이로 생각된다. reporter gene인 GFP의 선발에서는 단지 형광양의 2배 차이를 기준으로 선발하였지만, RT-PCR에서 3 cycle의 차이는 10배 차이를 의미한다. 둘째로는 무름병균이 macergen으로 다른 necrogen 병원균의 경우처럼 식물체를 직접 선발작업에 사용할 수 없는 한계로 매우 인공적인 환경인 즙액을 사용했기 때문으로 판단된다.



Site	Sample ID	Syg Ct	N/A Ct
A1	16S rRNA - LB	12.67	15.55
A2	16S rRNA - CCJ	12.51	16.59
A3	16S rRNA - M9	12.55	15.78
A4	J1B11 - LB	36.70	39.55
A5	J1B11 - CCJ	31.36	34.46
A6	J1B11 - M9	36.31	39.00
A7	J11F7 - LB	28.86	30.29
A8	J11F7 - CCJ	24.69	25.94
A9	J11F7 - M9	25.95	27.40
A10	J21D6 - LB	27.83	29.51
A11	J21D6 - CCJ	27.28	28.34
A12	J21D6 - M9	27.49	29.97
A13	J31A11 - LB	28.54	30.34
A14	J31A11 - CCJ	26.88	28.75
A15	J31A11 - M9	29.66	31.92

**Fig. 2-5.** Result of Quantitative real-time RT-PCR carried out with primers from 16S rRNA and different clones.



**Table 2-1.** Summary to quantitative real-time RT-PCR

Cultivated media	Regulation	Total number tested by quantitative RT-PCR	Number of clones up/down-regulated	
			3 ~ 4 cycles <sup>a)</sup>	5 ~ 7 cycles
LB+OX	Up	121	23	0
	Down	17	1	1
M9	Up	133	5	1
	Down	12	10	2
CCJ	Up	314	40	22
	Down	- <sup>b)</sup>	-	-
Total		597	79	26

<sup>a)</sup>; Gap of ct value between cultivated cells in LB and in the CCJ, M9, and LB plus 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oxolinic acid.

<sup>b)</sup>; Not tested.

라. Quantitative RT-PCR에 의해 선발된 클론의 발현분석

Screening으로부터 quantitative real-time RT-PCR에서도 3 cycle 이상 차이를 보이는 clone들에 대해서 그 유전자의 특성을 파악하기 위해 blast search 및 *Eca* 내에서 blastn 또는 blastx를 실행하였다. 배추즙에서 62 clone(Table 2-2), M9에서 18 clone(Table 2-3), LB+OX의 25 clone(Table 2-4)로 총 105개가 분석되었다.

배추즙(CCJ) up, LB+OX up과 down, M9 up과 down에서 선발된 105개 clone들을 가지고 각 배지별로 발현양상을 분석하였다. J1B11, J4A8, J41F10, J76A6, J87H2, J105C1, J110H3, J134D6, J133E2는 LB보다 CCJ에서 각각 상대적으로 94배, 105배, 45배, 15배, 29배, 8배, 72배, 90배, 12배 빠른 발현을 보였다. S227C8, J133E2는 oxolinic acid 0.1 ppm에서 각각 23배와 27배 차이로 빠르게 발현하였다. J105C1와 J133E2는 M9에서 각각 22배와 35배 빠르게 발현이 되었다. J105C1은 CCJ와 M9 둘 다에서 빠른 발현을 유도하였고 J133E2는 CCJ, LB+OX, M9 모두에서 현저한 발현양상을 보였다(Table 2-5).

유전자 중에 병원성과 관련이 있고 quantitative real-time RT-PCR을 통해 뚜렷하게 차이를 보이는 것에 대해 *Eca*의 genetic map을 찾아 그 유전자의 위치를 추적하였다. Clone J1B11과 유사한 유전자인 *Eca*1474의 기능은 아직 밝혀지지 않았고(Fig. 2-6), J4A8에 대한 유전자 *Eca*2430/2431은 세포막을 구성하는 단백질이라 예측한다(Fig. 2-7).

J41F10은 *Eca*SCRI1043에서 *flk*와 유사한 유전자라고 판명되었다. 최근에 *flk*는 *Salmonella typhimurium*에서 flagellar 유전자의 발현에 있어서 anti-sigma28 factor인 FlgM의 단백질 수준을 조절하는 조절자로서 역할을 한다고 보고되었다(Aldridge *et al.*, 2006). 또한 NCBI에서 blast한 결과 *Yersinia pestis*의 flagellar assembly regulatory protein과 유사한 것으로 보아 flagellin regulator로 생각된다(Fig. 2-8). Nitric oxide (NO)는 높은 활성을 갖는 수용성 기체로서 독성을 갖는데, 세균이 체내에서 NO를 무독화하기 위해서 *norV*를 발현시켜 flavorubredoxin를 만들고 이 flavorubredoxin과 연관된 oxidoreductase와 함께 작용하여 혐기조건하에서 독성의 NO를 nitrous oxide로 무독화한다. 이러한 *norV*의 작용은 *E. coli* 뿐만아니라 *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*에서 보고되고 있다(Mills *et al.*, 2005). J76A6은 *norV*로 transcriptional regulator인 *norR*의 조절하에 체내 대사산물 중 NO를 무독화하는 기능을 *Ecc*에서도 할 것이라 생각한다(Fig. 2-9).

**Table 2-2.** Relative expression level of the selected clones which were up-regulated in Chinese cabbage juice

Clones	Relative expression on Chinese cabbage juice (%) <sup>a</sup>	Blast	
		Gene / protein	e-value
J1B11	9,435	<i>Eca1474</i> (hypothetical protein)	0.0
J1C1	3,967	hypothetical protein <i>Eca1474</i>	2e-58
J1F12	6,765	Unknown	
J1G4	17,245	Unknown	
J2D11	5,021	<i>Eca3624</i> methyl-accepting chmotaxis protein	0.0
J4A8	10,254	<i>Eca2430</i> putative membrane protein	0.0
J11F7	784	<i>Y. pestis</i> cysG gene (transpoter)	4e-09
J13E6	1,656	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroceptica</i> DNA sequence (unknown)	2e-69
J14B2	4,817	<i>Eca0056</i> putative TonB-dependent heme receptor	0.0
J21D6	9,177	Unknown	
J24D6	1,775	Unknown	
J24D8	3,070	<i>Y. pestis</i> y2573 gene (transpoter)	2e-05
J37A6	4,193	<i>S. typhimurium</i> dppA gene (dipeptide transport protein)	3e-04
J37E5	7,004	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> plu0537 gene (unknown)	1e-21
J38E10	2,528	valS valyl-tRNA synthase	0.0
J40B6	840	nrdD anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	0.0
J41F10	4,526	<i>flk</i> (cell division protein)	0.0
J62F8	882	<i>Eca1124</i> putative lipoprotein	0.0
J62G12	1,006	Unknown	
J65C3	971	Unknown	

<sup>a</sup>: Relative expression (%) was determined by quantitative real-time RT-PCR comparing with the level set at 100% for culture in LB medium.

continued.

Clones	Relative expression on Chinese cabbage juice (%) <sup>a</sup>	Blast	
		Gene / protein	e-value
J66A8	823	hypothetical protein <i>Eca1732</i>	7.9
J66C4	1,070	unknown	
J66C9	1,611	<i>Eca3986</i> AraC-family transcriptional regulator	0.0
J68B8	1,524	unknown	
J70A1	925	<i>hecA2</i>	
J71A8	4,341	hemolysin/hemagglutinin-like protein HecA precursor	0.0
J73A12	1,155	<i>Eca0769</i> probable transporter	0.0
J73E12	1,825	<i>srfB</i> putative virulence effector protein	0.0
J76A6	6,955	<i>cysG1</i> siroheme synthase	0.0
J87H2	2,904	<i>norV</i> anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin	0.0
J88H8	811	<i>Eca0476</i> (putative iron transporter)	3e-103
J90F1	1,247	unknown	
J96C9	1,825	<i>iciA</i> chromosome initiation inhibitor	0.0
J101E6	1,048	<i>Y. pestis y2724</i> gene (hypothetical protein)	1e-09
J103D10	1,213	<i>fhuC</i> ferrichrome transport ATP-binding protein	0.0
J105C1	11,456	<i>mpl</i> ud p-N-acetylmuramate <i>E. carotovora metF</i> gene (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase)	0.0
J105H11	7,771	nicotinate phosphoribosyltransferase	1.2
J110A7	3,359	unknown	
J110H3	7,200	<i>Eca3140</i> (ironIII transport ATP-binding protein)	0.0
J110F12	6,139	permease	0.14

<sup>a</sup>: Relative expression (%) was determined by quantitative real-time RT-PCR comparing with the level set at 100% for culture in LB medium.

continued.

Clones	Relative expression on Chinese cabbage juice (%) <sup>a</sup>	Blast	
		Gene / protein	e-value
J111C4	1,715	unknown	
J114A10	2,025	<i>S. typhimurium potF</i> gene (transporter)	8e-45
J120F9	2,141	<i>Eca1017</i> hypothetical protein	0.0
J122D7	1,775	<i>galR</i> galactose operon repressor	0.0
J124E4	10,469	iron(III) dicitrate transport system permease protein	9.7
J124G1	888	<i>Eca4366</i> hypothetical protein	0.0
J125A6	1,851	<i>guaB</i> inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0.0
J126B1	1,751	<i>Eca1187</i> putative carbon starvation protein	0.0
J134D6	8,989	<i>Eca0351</i> (probable nitroreductase)	0.0
S64B4	1,403	single strand binding protein	0.0
S70E4	882	citrate/acetate antiporter	6e-39
S172A5	1,838	<i>budR</i> LysR-family transcriptional regulator	0.0
S196B12	2,082	putative membrane protein	0.88
S199D4	2,141	<i>Eca3538</i> amino acid ABC transporter	2e-23
S209B2	4,817	<i>Eca1474</i> hypothetical protein	0.0
S240E12	840	ABC transporter, ATP-binding protein	2.9
S263E10	1,703	thymidine phosphorylase	4e-08
S286H8	1.013	putative 6-phosphofructokinase isozyme II	6.8
S309E7	863	<i>folA</i> dihydrofolate reductase	0.0
S321G8	875	hypothetical protein <i>Eca0940</i>	1e-35
S342D5	1,027	putative membrane protein	9.8
S362E9	3,245	hypothetical protein <i>Eca4376</i>	4.2

<sup>a</sup>: Relative expression (%) was determined by quantitative real-time RT-PCR comparing with the level set at 100% for culture in LB medium.

**Table 2-3.** Relative expression level of the selected clones which were up-/down-regulated in M9 medium

Clones	Relative expression on M9 medium (%) <sup>a</sup>	Blast	
		Gene / protein	e-value
J14B2	4,817	<i>Eca0056</i> putative TonB-dependent heme receptor	0.0
J26B3	863	excision nuclease subunit A	8.2
J26B5	2,310	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> <i>evf</i> gene (virulence factor)	1e-129
J37D12	-1,956	putative flavodoxin	5.2
J99A11	-1,943	enolase	0.0
J101B4	-2,825	dihydropteroate synthase	2e-15
J101G12	-2,025	dihydropteroate synthase	1e-09
J102H7	-1,403	bacteriophage tail fiber assembly protein	1.9
J104G11	-2,186	putative exported choloylglycine hydrolase	7e-37
J106A2	-1,132	<i>Eca2434</i> hypothetical protein	0.0
J108H4	-4,402	dihydropteroate synthase	1e-15
J125D11	-1,622	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> <i>lysC</i> gene (lysine sensitive aspartokinase)	9e-17
J129A8	1,727	<i>Eca3680</i> hypothetical protein	2.5
J133E2	2,375	<i>fliC</i> (flagellin) <i>metE</i>	0.0
S97B7	1,691	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0.0
S133C11	-888	cation efflux pump	2e-28
S216F3	-1,238	hypothetical protein <i>Eca1669</i>	8.6
S397G3	-4,193	<i>Eca3826</i> putative membrane protein	0.0

<sup>a</sup>: Relative expression (%) was determined by quantitative real-time RT-PCR comparing with the level set at 100% for culture in LB medium.

**Table 2-4.** Relative expression level of the selected clones which were up-/down-regulated in LB broth containing oxolinic acid 0.1 ppm (LB+OX)

Clones	Relative expression	Blast	
	on oxolinic acid 0.1 ppm (%) <sup>a</sup>	Gene / protein	e-value
J6E10	2,617	hypothetical protein <i>Eca2048</i>	3.7
J6F1	811	hypothetical protein <i>Eca4178</i>	3.2
J11C1	1,813	hypothetical protein <i>Eca1862</i>	1.3
J23D7	846	ABC transporter substrate binding protein	3.2
J29H1	-1,255	lysophospholipase L2	9.6
J42A3	978	uracil permease	6.4
J42A12	1,213	putative membrane protein	9.7
J46A1	846	putative signal transduction protein	0.94
J54D1	1,116	methyl-accepting chemotaxis protein	7e-25
J61B11	852	DNA-3-methyladenine glycosylase	2e-31
J68E11	913	glycerol-3-phosphate acyltransferase	8.1
J69G3	1,070	putative signal transduction protein	1.4
J88A5	1,668	sulfate ABC transporter permease protein	3.7
J88A9	1,034	hypothetical protein <i>Eca2048</i>	3.0
J88B1	1,073	putative D-mannonate oxidoreductase	7.7
J88G3	1,093	hypothetical protein <i>Eca1735</i>	9.4
J92F9	925	aspartyl-tRNA synthetase	1.6
J114H1	-3,701	putative DNA-binding protein	5e-13
J116H9	1,364	putative membrane protein	5e-09
J146H8	1,943	nitric oxide reductase sigma-54-dependent transcriptional regulator	4e-27
S19E8	1,374	Trk system potassium uptake protein	2e-33
S28A4	840	hypothetical protein <i>Eca4178</i>	4.8
S227C8	2,263	<i>Eca2758</i> (hypothetical protein)	1e-25
S233C2	823	non-ribosomal peptide synthetase	7.5
S331G7	882	hypothetical protein <i>Eca3223</i>	2e-24

<sup>a</sup>: Relative expression (%) was determined by quantitative real-time RT-PCR comparing with the level set at 100% for culture in LB medium.

**Table 2-5.** Expression pattern of the selected clones

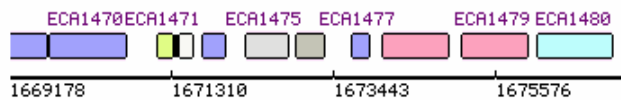
Selected media <sup>a)</sup>	Clone number	Relative expression of quantitative RT-PCR (%)			BlastX in <i>Erwinia carotovara</i> subsp. <i>atroseptica</i> genome	E-value
		CCJ	OX	M9		
	J1B11	9,435 <sup>b)</sup>	NT <sup>c)</sup>	NT	<i>Eca1474</i> (hypothetical protein)	0.0
CCJ	J4A8	10,542	- <sup>d)</sup>	-	<i>Eca2430/2431</i> (putative membrane protein)	0.0
	J41F10	4,526	NT	NT	<i>flk</i> (cell division protein)	0.0
	J76A6	1,452	-	-	<i>norV</i> (anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin)	0.0
	J87H2	2,904	NT	NT	<i>Eca0476</i> (putative iron transporter)	3e-103
	J105C1	828	-	2,156	<i>metF</i> (5,10-methylenetetrahydr ofolate reductase)	0.0
	J110H3	7,200	NT	NT	<i>Eca3140</i> (ironIII transport ATP-binding protein)	0.0
	J134D6	8,989	NT	NT	<i>Eca0351</i> (probable nitroreductase)	0.0
LB+OX	S227C8	NT	2,263	NT	<i>Eca2758</i> (hypothetical protein)	1e-25
M9	J133E2	1,147	2,691	3,526	<i>fliC</i> (flagellin)	0.0

<sup>a)</sup>; Based on results of IVET screening.

<sup>b)</sup>; Ct value was below threshold value.

<sup>c)</sup>; Did not show any significantly homologous gene or sequence.

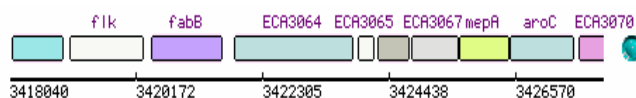




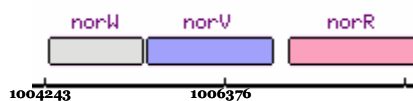
**Fig. 2-6.** *Eca1474* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on J1B11 clone. *Eca1474* encodes hypothetical protein.



**Fig. 2-7.** *Eca2430/2431* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on J4A8 clone. *Eca2430/2431* plays a role of putative membrane protein.



**Fig. 2-8.** *flk* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on J41F10 clone. *flk* plays a role of cell division protein.



**Fig. 2-9.** *norV* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on J76A6 clone. *norV* and *norR* plays a role of anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin and transcriptional regulator, respectively.

J87H2는 유전자 *Eca0476*로 철을 운반하는 transporter로 J110H3은 *Eca3140*로 ironIII transport ATP-binding protein으로 판명되었다(Fig. 2-10과 2-12). Venkatesh 등(2006)은 PhoPQ two-component system에 대하여 연구를 하였다. PhoPQ two-component system은 *Erwinia chrysanthemi*에서 virulence factor를 조절하는데, *phoQ* mutation은 철 대사와 연관된 몇몇 유전자 발현을 높이고 이러한 siderophore는 *E. chrysanthemi*에서 병원성에 필요하다고 보고하였다.

J105C1는 *metF*로 판명되었고 조절자는 *metR*이고 억제자로 *metJ*가 관여할 것이다(Fig. 2-11). 유전자 *metE*가 만드는 homocysteine methyltransferase는 vitamin B12 존재하에서 *E. coli*의 성장을 억제한다. *metF*는 *metE*에 대해 vitamin B12에 의존하여 조절하여 *E. coli*가 vitamin B12 존재 하에서도 성장할 수 있게 한다고 Lundrigan 등(1987)이 보고하였다. 그러므로 *metF*는 vitamin B12와 관련하여 성장에 영향을 미칠 것이라 생각한다.

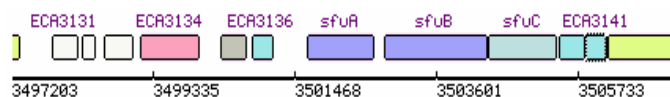
J134D6은 *Eca0351*로 질소환원효소라 예측하고(Fig. 2-13). S227C8은 *Eca2758*로 그 기능이 알려지지 않았다(Fig. 2-14). Flagellin과 유사한 유전자로 판명된 J133E2는 *Eca* cell motility gene으로부터 flagellin gene cluster에 *fliC*에 해당하였다. *fliA*와 *fliZ*는 각각 RNA 중합효소를 활성화시키는 sigma factor와 이것을 조절하는 단백질을 암호화할 것이다(Fig. 2-15).



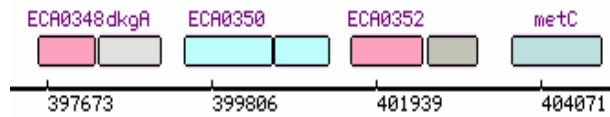
**Fig. 2-10.** *Eca0476* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*SCRI1043 on J87H2 clone. *Eca0476* plays a role of putative iron transporter.



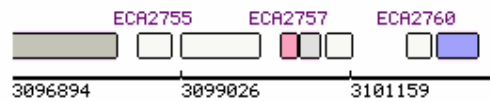
**Fig. 2-11.** *metF* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*SCRI1043 on J88G2 clone. *metF*, *metR*, and *metJ* encodes 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, regulator, and repressor, respectively.



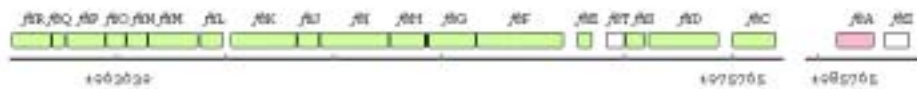
**Fig. 2-12.** *Eca3140* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*SCRI1043 on J110H3 clone. *Eca3140* encodes ironIII transport ATP-binding protein.



**Fig. 2-13.** *Eca0351* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on J134D6 clone. *Eca0351* encodes probable nitroreductase.



**Fig. 2-14.** *Eca2758* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on S227C8 clone. *Eca2758* encodes hypothetical protein.



**Fig. 2-15.** *fliC* of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 on J133E2 clone. From *fliR* to *fliC*, the gene cluster encodes component of flagellum, *fliA* and *fliZ* encode RNA polymerase sigma factor and RNA polymerase sigma factor regulatory protein.

### 제 3 절. Marker exchange mutation에 의한 선발된 유전자의 기능분석

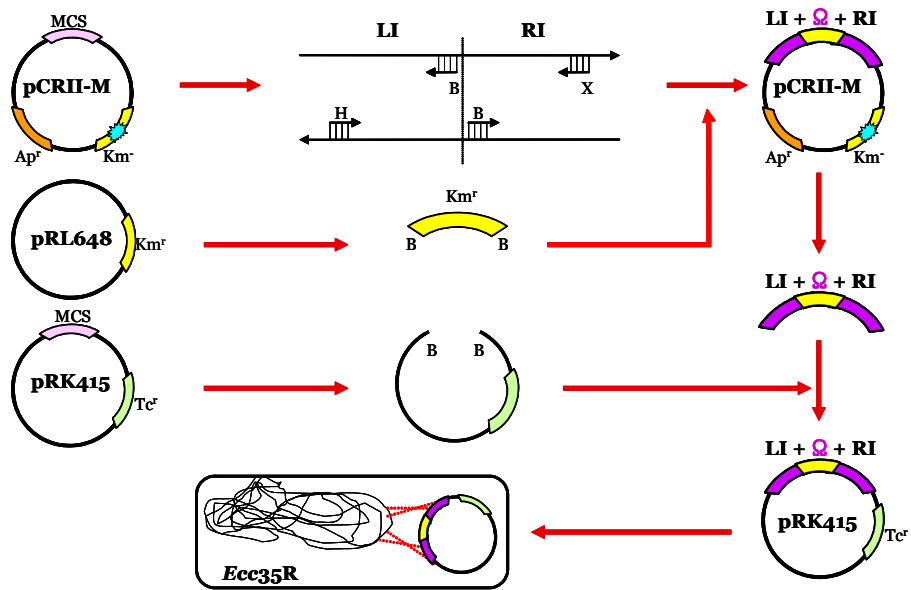
#### 1. 서언

본 연구에서는 quantitative real-time RT-PCR에 의한 발현분석을 통해 최종 선발된 10개의 클론을 marker exchange mutation에 의해 knock-out 시키고 돌연변이체와 야생형의 특성을 비교하여 유전자의 기능을 분석하고자 하였다.

#### 2. 재료 및 방법

##### 가. 선발 유전자의 cloning 및 marker $\Omega$ 삽입

먼저 선발된 10개 clone 중 5개 클론의 DNA를 왼쪽과 오른쪽을 나누어 각각 PCR로 증폭시켰다. 한 쪽은 forward primer에 *Hind*III site와 reverse primer에 *Bam*HI site가 생기도록 프라이머를 제작하여 증폭하였고, 다른 한 쪽은 forward primer에 *Bam*HI site와 reverse primer에 *Xho*I site가 생기도록 제작한 프라이머로 증폭하였다(Fig. 3-1). 왼쪽과 오른쪽의 PCR 산물을 제한효소로 자른 다음  $Km^R$ 을 knock-out하여 변형시킨 pCRII-M cloning vector의 동일한 제한효소 부위에 각각 cloning하였다. Target 유전자의 양쪽을 가진 플라스미드를 *Bam*HI으로 자르고 pRL648로부터 잘라 낸  $Km^R$  omega fragment를 *Bam*HI site에 삽입하였다. 이렇게 target 유전자가 삽입된 플라스미드(pCRII-M::41F10, pCRII-M::J87H2, pCRII-M::J134D6, pCRII-M::S227C8, pCRII-M::J133E2)로부터 전체 insert DNA를 M13 forward primer (5'CAGGAAACAGCTATGAC3')와 reverse primer (5'GTAAAACGACGGCCAG3')로 PCR 증폭하여 marker exchange vector인 pRK415(Keen *et al.*, 1988)로 옮겼다. 모든 DNA 조작에 대해 Zymo gel recovery 와 Zymo gel concentration kit를 사용하였고, end-filling을 위해 Klenow fragment 및 self-ligation을 방지하기 위해 Shrimp Alkaline Phosphatase(SAP)을 처리하였다.



**Fig. 3-1.** Schematic description of target gene cloning for marker exchange.

나. Homologous recombination에 의한 knock-out mutant 선발

Marker exchange을 위한 insert DNA 및  $\Phi$ 을 가진 5개의 plasmid(pRK415::41F10, pRK415::J87H2, pRK415::J134D6, pRK415::S227C8, pRK415::J133E2) 각각을 *Ecc* 35R로 electroporation시켜 다음 LB Km<sup>50</sup> agar에서 선발하였다. 선발한 콜로니를 minimal salts broth medium(MSM: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, glucose 1 g per liter)에서 30°C 온도에서 2번 연속 배양한 후, MSM Km<sup>50</sup>에서 선발하였다 (Chatterjee, 1980). 선발한 콜로니를 LB Km<sup>50</sup> agar와 LB Tc<sup>10</sup> agar에 각각 replica plate 만들어 배양한 후 Tc<sup>10</sup>에서만 자라지 못하는 콜로니를 선발하였다. 이들 균을 mutation 확인을 위한 프라이머로 PCR을 수행하여 mutant를 최종 선발하였다.

다. Knock-out mutant에 대한 특성 분석

무름병균의 병원성 및 발병력과 관련있는 extracellular enzyme인 pectate lyase(pel), polygalacturonase(peh), cellulase(cel), protease(prt) 활성을 검정하였다(Chatterjee, 1995). 감자와 배추 증류를 사용하여 병원성검정을 하였으며, 체외 다당류인 EPS 변화를 CPG(1% Difco peptone, 1% glucose, 0.1% Difco casamino acids) 배지에서 확인하였다(Von Bodman *et al.*, 1998). 운동성(motility)은 TSA(1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.35% agarose) 배지에서 28°C, 2일간 배양후 확인하였고(Vincent-Sealy *et al.*, 1999), 다른 *Ecc* 균주를 이용하여 bacteriocin activity 검정(Nguyen, 2001) 하였다. 비기주 식물인 강낭콩에서 현탁액을 주입하여 과민성 반응(HR) 차이를 확인하였고, mutant의 형태 차이를 확인하기 위해 농촌진흥청에서 투과전자현미경(TEM) 사진을 촬영하였다.

라. Complementation

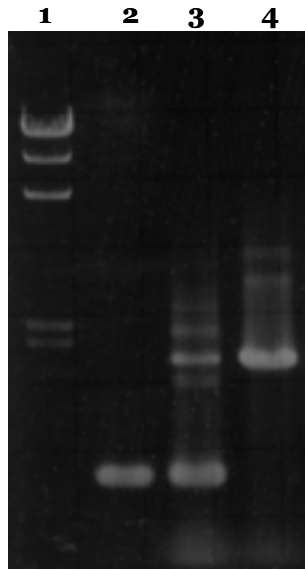
프로모터 부분을 포함한 target 유전자 전체를 PCR로 증폭하여 pGEM-T easy vector에 cloning한 다음 knock-out mutant로 electroporation 하였다. 형질전환체를 선발하여 플라스미드를 확인하고 그 균주의 특성을 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *filC*(J133E2 클론) knock-out mutant 선발

현재까지 marker exchange mutation을 시도한 5개 클론 중 한 개 클론, J133E2(*filC* gene)의 knock-out mutation이 성공하여 그 유전자의 기능 분석이 이루어지고 있으며 다른 클론의 mutation도 진행되고 있다. *Ecc* 35R(pRK415::J133E2)를 minimal salts broth medium(MSM)에서 30°C 온도에서 2회 배양한 다음 MSA Km<sup>50</sup>에 도말을 하여 Km에 저항성 콜로니를 얻고 이들 중 Tc에 감수성인 콜로니를 얻은 후 cell-direct PCR로 target gene의 증폭을 확인한 결과 wild type인 *Ecc* 35R에서는 약 900 bp 밴드가 증폭되었고 *Ecc* 35R(pRK415::J133E2)에서는 900 bp 밴드와 1.8 Kb 밴드가 증폭되었다. Tc에 감수성을 보인 균주에서는 900 bp 밴드 없이 1.8 Kb 밴드만 증폭되었다 (Fig. 3-2). 이 결과는 약 900 bp의 Km<sup>R</sup> fragment가 삽입되었다는 것을 의미하므로 이를 확인하기 위해 증폭된 DNA를 *Bam*HI로 잘랐을 때 예상한 크기의 450 bp 밴드 2개와 900 bp 밴드를 얻어 mutant를 확인하였다.



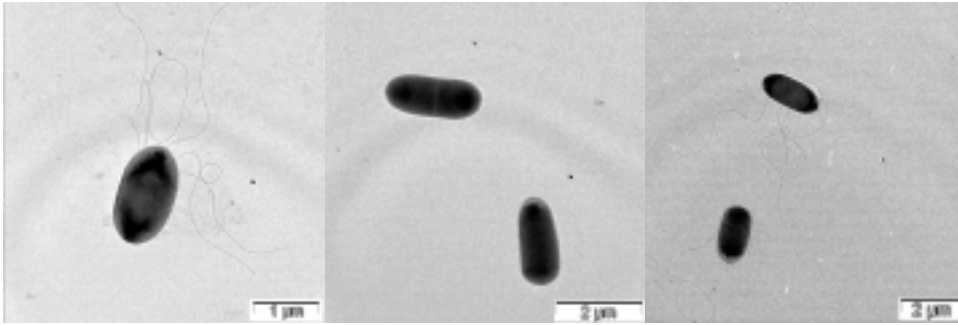


**Fig. 3-2.** Cell-direct PCR of J133E2 (*fliC*) knock-out mutant. Lane 1; molecular weight marker ( $\lambda$ DNA/*Hind*III), lane 2; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) 35R (wild type), lane 3; *Ecc* 35R including pRK415::J133E2, and lane 4; tetracycline sensitive *Ecc* 35R after marker exchange.

#### 나. *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>의 특성

Wild type인 *Ecc* 35R와 *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>의 TEM 사진에서 mutant인 *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>에서는 flagella가 없는 것을 확인하였고 complement한 균주는 flagella를 다시 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-3). Wild type인 *Ecc* 35R와 flagellin mutant *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>의 extracellular enzyme 생산을 비교한 결과 두 균주 간 큰 차이가 없었고, 감자 또는 배추 중독에 접종한 병원성검정 실험에서도 발병도 차이도 나타나지 않았다. 정량적인 측정은 하지 않았지만 CPG 배지에서 생성되는 EPS 양에도 차이가 없었다. *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup> bacteriocin에 대한 감수성과 비기주 식물인 강낭콩에 있어서 HR 유도 실험에서도 wild type인 *Ecc* 35R과 비교하여 거의 차이가 없었다(Table 3-1). Hossain 등(2005)은 *Ecc*에서 *fliC*를 non-polar in-frame deletion을 통해 mutation시킨 연구를 하였다. *fliC* mutant는 편모가 없어졌고 extracellular enzyme에 대한 차이 없이 병원성이 감소하였으며, 담뱃잎에서 HR반응에 대한 차이도 없었다고 보고하였다. Matsumoto 등(2003)은 *Ecc*로부터 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Vibrio cholerae*에서 transcriptional repressor를 암호화하는 *cytR* 유사체를 분리하였다. 유전자 *cytR*의 non-polar deletion mutation은 flagellin 합성 뿐만 아니라 병원성도 감소시켰다. 하지만 본 실험에서 flagellin mutation과 병원성에 뚜렷한 차이를 증명하지 못하였다. 이것은 Hossain 등(2005)의 결과에도 불구하고 flagellin이 병원성에 크게 작용하지 않는다고 생각한다.

*Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>는 minimal medium에서는 kanamycin 저항성이 정상으로 발현되지만 rich medium에서 kanamycin에 의해 생장이 억제되는 현상을 보여주었다. 즉 *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>는 MSA Km<sup>50</sup>에서는 정상적인 콜로니를 형성하지만(Fig. 3-4) NA/CPG Km<sub>50</sub>에서는 생장이 억제되며 2~3가지 형태의 콜로니가 나타난다(정상, 상대적으로 작은 콜로니 그리고 맑고 퍼지는 은 콜로니, Fig. 3-5와 3-6). 이러한 현상은 균주가 순수 분리 되지 않은 경우가 아니고 양분에 의한 type III secretion system에 스트레스를 주었을 것이라 생각한다(Aizawa, 2001). 그러나 mutant를 complementation한 후에는 이 현상이 회복되어 정상적인 콜로니를 형성하였다(Fig. 3-7).



**Fig. 3-3.** Transmission electron micrographs negatively stained the wild type *Ecc 35R* (left), the knock-out mutant, *Ecc 35R fliC<sup>-</sup>* (middle), and the *Ecc 35R* complemented with *fliC* gene (right).

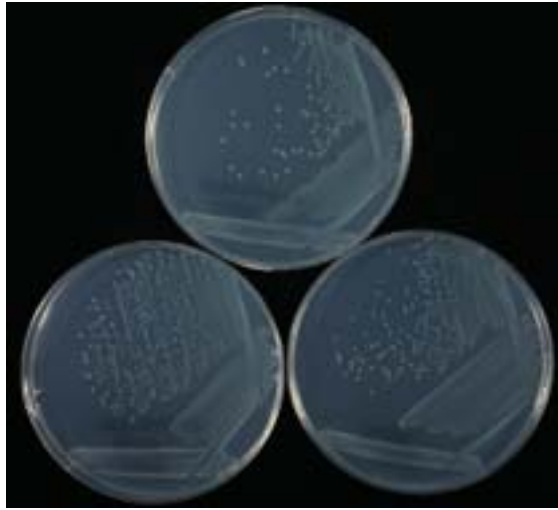
**Table 3-1.** Characteristics of *Ecc* 35R, *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup>, and *Ecc* 35R *fliC*<sup>-</sup> complemented with the *fliC* gene

Characteristics	<i>Ecc</i> 35 strains			
	<i>Ecc</i> 35R	<i>Ecc</i> 35R <i>fliC</i> <sup>-</sup>	<i>Ecc</i> 35R <i>fliC</i> <sup>-</sup> (pGEM-Teasy:: <i>fliC</i> )	
Pathogenicity	Midrib on Chinese cabbage	+	+	+
	Chinese cabbage on MS <sup>a)</sup> medium	+	+	+
	Potato slice	+	+	+
Extracellular enzymes	Pectin lyase	+	+	+
	Polygalacturonase	+	+	+
	Cellulase	+	+	+
HR on <i>Phaseolus vulgaris</i>	+	+	+	
Bacteriocin sensitivity	+	+	+	
EPS on CPG medium	+	+	+	
Flagella production	+	-	+	
Sensitivity to Km <sup>50</sup>	Minimal medium (MSA)	nt <sup>b)</sup>	+	+
	Rich medium	nt	+/- <sup>c)</sup>	+

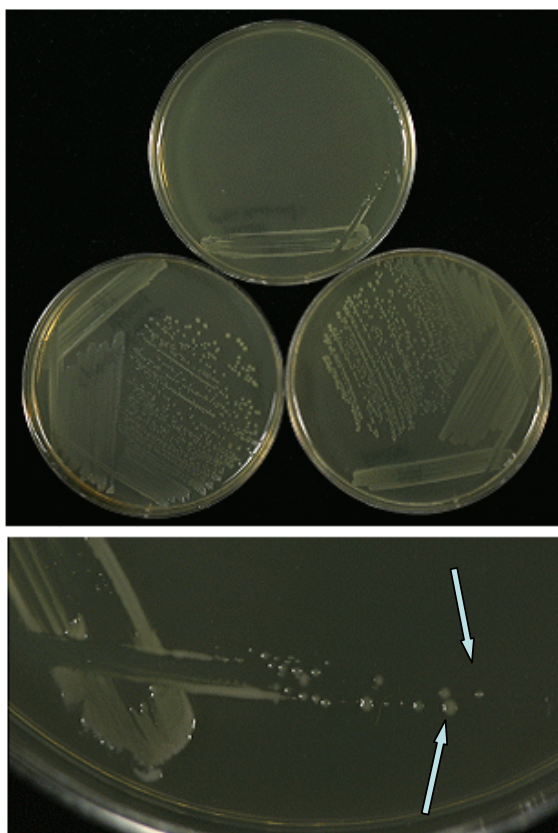
<sup>a)</sup>; Murashige & Skoog basal salts mixture.

<sup>b)</sup>; Not tested.

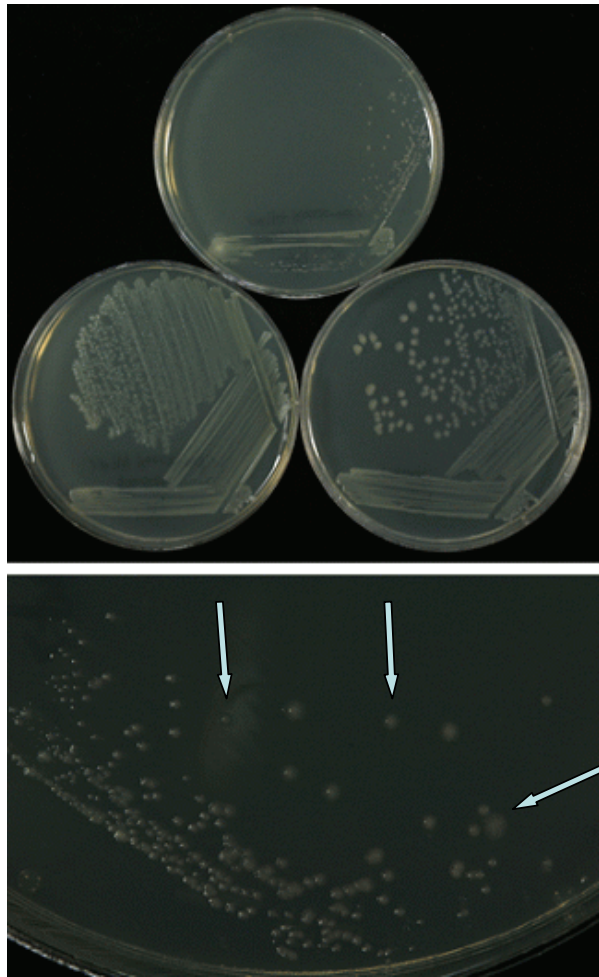
<sup>c)</sup>; Growth inhibited and formed the colony shape by kanamycin (50 µg/ml).



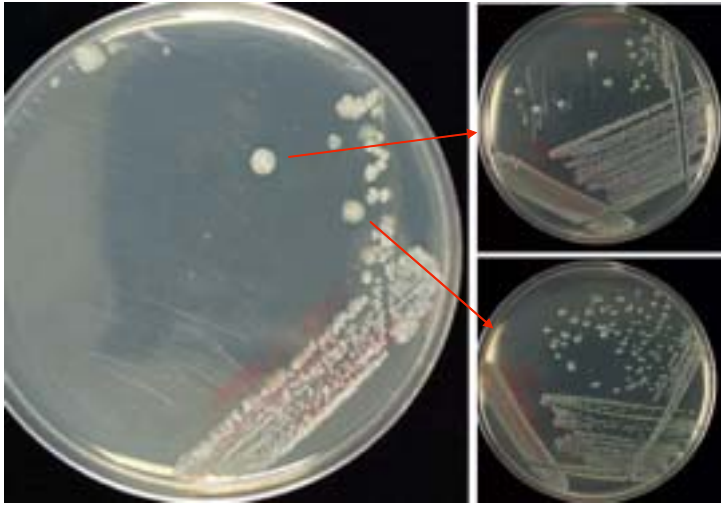
**Fig. 3-4.** Growth of *Ecc 35R filC<sup>-</sup>* on MSM Km<sup>50</sup> (top plate), MSM (bottom and left plate), and *Ecc 35R* on MSM (bottom and right plate).



**Fig. 3-5.** Growth of *Ecc 35R filC*<sup>-</sup> on NA Km<sup>50</sup> (upper and top), NA (upper, bottom, and left), and *Ecc 35R* on NA (upper, bottom, and right). The bottom photo shows the *Ecc 35R filC*<sup>-</sup> on NA Km<sup>50</sup> and the arrows indicate different colony form and size.



**Fig. 3-6.** Growth of *Ecc 35R filC<sup>-</sup>* on CPG Km<sup>50</sup> (upper and top), CPG (upper, bottom, and left), and *Ecc 35R* on CPG (upper, bottom, and right). The bottom photo shows the *Ecc 35R filC<sup>-</sup>* on CPG Km<sup>50</sup> and the arrows indicate different colony form and size.



**Fig. 3-7.** Growth of *Ecc 35R fliC<sup>-</sup>* (pGEM-Teasy::*fliC*) on LB Km<sup>50</sup> Ap<sup>100</sup>. The arrows indicate rescue to normal colony shape of *Ecc 35R*.



## 제 4 절. 박테리오신을 생산하는 비병원성 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 무름병 방제 및 target 제시

### 1. 서언

박테리오신은 근연 관계의 세균을 특이적으로 억제하는 항균성 단백질이다. 일부 세균 종은 근연 관계의 세균을 억제하기 위하여 하나 또는 그 이상의 박테리오신을 생산한다. 본래, 박테리오신은 *E. coli*의 colicin에서 유래하였다. Colicin은 *E. coli*와 근연관계의 균주를 죽이기 위하여 생성·분비하며, 그 후 다른 세균에서도 비슷한 성격의 단백질이 발견되어 박테리오신이라고 하였다. 박테리오신은 1차 대사산물로 2차 대사산물인 독소와 다르며 원연관계의 미생물에 작용하는 항생물질과도 다르다. 박테리오신은 단백질합성을 저해하며, DNA의 안정성을 파괴하고, 세포막을 교란시켜서 그 대상 균을 용균시킨다(Matsumoto *et al.*, 2003). 박테리오신 생산균주는 자신이 생산하는 박테리오신에 대한 특이적 면역성을 갖고 있다. 박테리오신에 감수성인 세균은 그 박테리오신에 대한 수용체가 세균의 세포막에 존재하는데 세균 세포막의 lipopolysaccharide(LPS)는 *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium lupini*를 포함한 여러 세균의 박테리오신 분자의 수용체로 알려져 있다(Badley, 1967).

식물병원 세균에는 *Erwinia carotovora*(Choi와 Kim, 1988)를 비롯하여 *Agrobacterium radiobacter*, *Corynebacterium michiganense*, *Rhizobium japonicum*(Gross와 Vidaver, 1978), *Pseudomonas syringae*(Smidt와 Vidaver, 1982), *Pseudomonas solanacearum*(Cuppels *et al.*, 1978), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xu와 Gonzalez, 1991), *X. compestris* pv. *glycinea*(Fett과 Mahar, 1985)의 박테리오신이 발견되었다. Hamon과 Peron은 *Ecc*가 생산하는 박테리오신을 처음 밝혔는데 이 물질의 단백질적인 성질과 근연 세균에 작용하는 점을 보아 이것을 박테리오신이라 가정하고 carotovoricin이라 명명했다(Hamon과 Peron, 1961). Carotovoricin은 박테리오파지와 유사한 구조를 가졌으며(Crowley와 De Boer, 1980; Itoh와 Taharashi, 1978) 고분자 박테리오신과 저분자 박테리오신의 두 가지 형태가 있다. 고분자 박테리오신은 넓은 생장 저지

환을 형성하고 저분자 박테리오신은 좁은 생장 저지환을 형성한다(Chuang *et al.*, 1999). Carotovoricin은 열에 안정적이고 trypsin에 저항성이며(Crowley와 De Boer, 1980) UV나 mitomycin, nalidixic acid, bleomycin과 같은 여러 화학 물질(Itoh와 Taharashi, 1978)과 온도와 습도 같은 생리적 요인(Nguyen *et al.*, 2002)에 의해 유도 된다.

식물 세균병에 있어 박테리오신은 생물적 방제에서 이용 가치에 있어 중요하다. *Agrobacterium radiobacter* strain 84는 그가 생산하는 agrocin 84를 이용해 많은 식물 종의 뿌리혹병을 효과적으로 방제하는데 사용되고 있다(Kerr, 1978). 박테리오신이 생물적 방제 도구로 사용되는 데는 그의 특이성에 있다. 박테리오신은 대상 세균은 동종이거나 근연 관계에 있기 때문에 다른 유익한 미생물을 억제하지 않고 병원세균만을 죽일 수 있다. 박테리오신 생산 균주가 병원세균과 비슷한 생태 환경을 갖고 있기 때문에 병원세균과의 영양 경쟁에서 박테리오신의 생성·분비는 상승 작용을 일으켜 방제 효과를 높일 수 있다.

식물 세포벽을 분해시키는 효소의 분비와 생산은 *Ecc*의 병원성에 매우 중요하다. 이들 효소의 생산이나 분비에 영향을 받은 돌연변이체는 병원성의 감소로 설명될 수 있다(Matsumoto *et al.*, 2003). 최근 일본에서는 넓은 범위의 박테리오신 활성을 갖고 세포벽 분해 효소 활성을 잃은 비병원성 *Ecc*를 이용한 미생물 농약 Biokeeper(Central Glass Co.)를 개발하여 배추 세균성무름병 방제를 위한 미생물 농약으로 개발되었으며, 배추 뿐만 아니라 감자, 무, 양파, 양배추의 무름병에 대해서도 효과가 인정되었다(Takahara, 2000). 본 연구에서는 국내 주요 여름배추 재배지에서 분리된 무름병균에서 박테리오신의 생산을 확인한 후, 박테리오신 활성이 높은 균주를 선발하여 병원성 상실을 유도하여 비병원성 무름병균을 만들고 이것을 이용하여 배추 무름병 방제효과를 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 사용균주 및 박테리오신 검정

본 연구에는 제 1 절에서 분리한 무름병균을 사용하였다(Table 4-1). 박테리오신 검정은 먼저 분리세균을 L-broth(Bacto-trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7.0)에 접종하여 28℃에서 12-16시간 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 세균 배양액을 M9 broth(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, NaCl 0.5 g, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 M FeCl<sub>3</sub>, 0.2% glucose·casein acid hydrate)에 30배 희석하고 28℃에서 5-6시간 200 rpm으로 진탕 배양한 다음, 최종농도가 0.2 µg/ml가 되게 mitomycin c(from *Streptomyces caespitosus*, Sigma Co., St. Louis)를 첨가하고 28℃에서 6시간 200 rpm 계속 배양하였다. 세균 배양액을 4℃에서 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고 상정액을 얻어 M9 buffer(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, NaCl 0.5 g, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 M FeCl<sub>3</sub>)에 2배 희석하여 4℃에 보관하여 실험에 사용하였다. Petri dish에 감수성 균주의 현탁액을 넣은 0.35%의 soft agar(2X10<sup>7</sup> cfu/ml)를 부은 후 그 위에 준비한 상정액 10 µl씩 점적한 후 28℃에서 8-12시간 배양하여 성장 저지환 생성을 관찰하여 박테리오신 생성을 확인하였다. 또한 박테리오신 생성 *Ecc*에 존재하는 박테리오신 조절유전자(*brg*)는 Chuang 등의 방법(1999)으로 확인하였다. 박테리오신 조절유전자 특이적 프라이머(DY-R1; TGGTGAATT GA CAATACG, DY-F1: TT GTAGTGCATAGGTTGG)로 PCR를 수행하여 *brg* 유전자의 존재를 확인하였다.

**Table 4-1.** Bacteriocin activity and sensitivity of the *E. carotovora* subsp. *carotovora* isolates

Pro <sup>a)</sup>	Sensitive indicator strains																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1		+						+		+					+		+	+								
2									+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+			+		+
3									+	+		+				+			+		+	+		+		+
4		+	+						+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+				+
5		+	+	+	+			+	+		+						+			+	+					+
6			+	+					+	+		+				+		+								
7		+	+						+	+	+	+				+	+	+	+	+	+					+
8		+	+	+				+		+	+									+	+					+
9		+	+	+	+			+	+	+	+	+		+		+				+	+		+			+
10		+							+	+		+				+	+			+						
11									+	+		+									+					
12		+		+						+	+							+	+	+						
13																										
14		+									+					+	+			+						+
15			+						+	+	+	+	+					+		+	+					+
16																		+		+						+
17		+						+			+						+			+	+					+
18		+	+						+	+	+	+								+						+
19		+	+								+				+	+				+			+			+
20									+		+															
21		+					+	+		+	+	+		+						+						+
22		+		+	+				+															+		
23																										
24																										
25											+				+											
26		+	+												+											
27																									+	
28							+											+								
29		+					+																			
30		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+
31		+	+	+					+	+		+		+		+	+			+						+
32		+	+	+	+			+	+	+	+	+			+											+
33		+	+	+	+		+		+	+	+			+			+					+				+
34																										
35			+							+					+											

continued.

Pro	Sensitive indicator strains																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	$\frac{2}{5}$	$\frac{2}{6}$
36																										
37																				+						
38				+	+			+						+	+		+									
39								+						+	+											
40				+			+								+											
41				+						+				+						+						
42								+						+												
43																										
44	+																									
45																										
46				+											+											
47				+						+													+			
48				+																						
49																										
50				+			+								+		+						+			
51				+						+																
52																					+	+			+	
53																		+								
54																		+			+					
55	++	+					+			+					+					+				+	+	
56	+									+										+	+					
57		+	+	+										+			+				+					
58																					+					
59	+	+					++															+			++	+
60	++						+		+					+												
61		+							+												+					
62										+				+								+				
63															+						+					
64									++					+	+					+		+				
65		+					+++		+					+		+								+		
66			+				++		++					+		+					+					
67							+		+						+								+			
68							+		+++					+		++										
69							+			+				+		+				+	+	+	+			+
70	++						+			+				+		+				+	+					+

continued.

Pro	Sensitive indicator strains																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
71									+				+								+					
72			+	+					+				+				+		+			+				
73	+	+							+				+			+	+		+			+				
74	++	+	+			+	+		+				+						+	+						
75	+	+	+	+		+	+		+		+															
76	++	+	+			+			+				+				+									+
77	++	+	+			+	+		+				+		+	+			+							+
78		+	+			+	+		+				+			+		+		+						+
79	++	+	+			+	+		+				+			+		+		+					+	+
80																										
81	+	+	+	+		+	+		+				+				+									+
82	++	+				+	+						+				+		+							
83	++					+	+						+		+											
84		+	+			+	+		+				+			+		+								+
85			+						+								+	+								+
86		+	+			+	+						+				+	+								
87		+				+	+		+																	
88						+	+		+								+							+		
89						+																				
90									+																	
91																										+
92		+	+			+	+		+														+			
93																		+								
94						+	+											+								
95									+																	
96						+			+									+								
97		+				+	+						+				+		+							
98	+	+	+			+	+		+				+				+		+			+				+
99		+	+										+				+		+							
100		+	+			+	+																			+
101		+	+			+	+											+								
102		+	+			+	+						+				+									+
103																				+			+			
104		+	+	+		+	+						+				+		+			+				+
105	+	+	+			+	+		+				+				+			+						+
9-3	+	+	+			+	+		+		+		+			+	+									

*continued.*

pro	Sensitive indicator strains																											
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	
1					+	+	+			+	+									+	+							
2					+	+	+			+	+				+					+	+	+						
3					+	+		+		+	+										+	+						
4	+	+			+	+	+	+		+	+	+									+	+				+		
5		+			+	+		+		+	+										+	+			+			
6										+												+	+			+	+	
7					+	+	+	+		+	+	+									+	+	+					
8		+			+	+	+			+	+	+									+	+			+			
9		+			+	+				+	+	+	+		+						+	+	+		+	+		
10	+	+			+	+	+	+		+	+	+									+				+			
11																												
12		+			+	+		+		+	+	+									+		+					
13																												
14		+				+				+	+	+									+							
15					+	+	+	+		+	+	+										+	+			+		
16																						+	+					
17						+				+	+	+					+						+					
18		+			+	+		+		+	+	+					+				+	+				+		
19	+				+	+				+		+	+		+		+				+	+	+		+	+		
20																												
21					+	+	+			+	+									+	+					+		
22						+	+	+		+	+																	
23																												
24																												
25	+						+			+	+								+									
26						+															+		+					
27																												
28					+	+														+			+					
29					+	+		+		+										+	+							
30	+				+	+	+	+		+	+	+								+			+					
31					+	+		+		+	+														+			
32						+				+										+								
33					+	+		+	+	+	+									+			+					
34						+														+	+		+					
35					+		+			+	+		+	+	+	+	+			+		+						

*continued.*

Pro	Sensitive indicator strains																											
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	
36																												
37								+											+								+	
38								+	+		+				+				+									
39																												
40																												
41																												
42																												
43																												
44																												
45																												
46		+																										
47																												
48																												
49																												
50		+																										
51																												
52																												
53																												
54																												
55																												
56																												
57																												
58																												
59																												
60																												
61																												
62																												
63																												
64																												
65																												
66																												
67																												
68																												
69																												
70																												



continued.

Pro	Sensitive indicator strains																										
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
71	+		+	+				+				+	+							+	+						+
72	+		+					+				+	+								+	+	+				+
73	+							+				+	+	+									+				
74	+		+					+	+			+		+	+						+	+	+				+
75	+		+					+	+	+		+		+	+						+	+					
76	+							+	+			+	+	+					+			+	+				+
77	+	+						+	+			+		+						+							+
78	+							+	+			+	+							+		+					+
79	+							+	+			+	+	+						+							
80																											
81	+	+						+	+			+	+	+						+	+						+
82	+	+						+	+	+		+	+							+							
83	+							+	+																		
84								+	+			+	+	+								+					
85								+																			
86								+	+			+		+						+		+	+				
87	+							+	+			+	+	+						+		+					
88	+							+	+			+		+						+		+					
89	+							+	+			+	+	+	+					+		+	+				
90								+	+			+		+	+									+	+		
91								+	+			+	+	+	+					+		+	+				
92	+		+					+	+			+	+	+						+							
93																											
94													+														
95																											
96	+			+									+														
97	+	+		+				+		+		+	+	+	+						+	+	+				
98	+	+		+				+		+		+	+	+	+					+		+	+				
99	+			+				+		+		+	+	+	+					+		+	+				
100				+				+		+		+	+	+	+					+		+					
101	+	+		+				+		+		+	+	+	+					+		+	+				
102	+			+				+		+		+	+	+	+					+		+	+				
103																											
104	+			+				+		+		+	+	+	+					+							+
105	+			+				+		+				+						+	+		+	+			
9-3								+	+	+		+	+	+					+	+		+	+				+

continued.

Pro	Sensitive indicator strains																											
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+				+			+		+							+
2	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+				+		+	+	+	+					+	+
3	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+						+	+	+	+					+	+
4		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+						+	+	+	+						+
5										+												+						
6										+													+					
7		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+														+	+
8	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+						+		+		+				+	+
9		+					+			+		+					+	+	+	+							+	
10		+	+	+				+	+	+		+						+		+								
11										+							+	+										+
12										+																		
13																												+
14		+	+	+	+	+		+		+	+	+	+									+					+	+
15										+																		
16			+							+												+						
17		+																									+	
18		+								+																		
19	+			+	+	+		+	+	+	+	+	+							+	+	+	+	+			+	
20										+			+									+						
21																							+					
22																		+							+	+		
23																												
24																												
25																												
26																		+										+
27																												
28	+	+		+						+																		+
29		+	+	+						+									+	+	+	+						
30																			+	+	+							+
31																			+	+								
32										+														+				
33		+	+							+	+		+													+	+	+
34																							+					
35																								+				

*continued.*

Pro	Sensitive indicator strains																											
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
36																												
37												+								+								
38	+		+					+	+		+																+	
39	+				+						+	+										+	+				+	+
40																						+	+				+	
41																								+				
42											+	+																
43																												
44																												
45																												
46	+						+				+	+	+									+	+					
47	+		+	+		+		+	+	+		+	+			+		+					+					
48	+		+	+	+	+		+		+	+	+	+			+		+	+	+		+	+					
49																												
50							+						+							+							+	
51									+			+																+
52																												
53																												
54																												
55							+	+		+			+	+								+						+
56								+	+			+	+		+													
57							+	+		+		+									+		+					+
58																												
59								+																				
60	+						+	+	+	+													+					
61							+	+	+		+	+																
62	+						+	+													+							
63												+											+					
64							+		+	+			+								+		+					
65	+						+	+		+			+								+		+					+
66							+																					
67											+																	
68												+										+						
69								+														+					+	
70							+					+										+	+					

*continued.*

Pro	Sensitive indicator strains																											
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
71							+	+					+					+						+				
72	+						+	+	+	+	+	+	+	+					+					+			+	
73							+			+									+	+				+			+	
74							+	+	+	+	+		+	+					+	+								
75							+	+	+	+		+	+						+	+	+							
76							+		+										+	+	+					+	+	
77	+						+	+	+				+	+					+	+	+							
78							+	+	+	+		+	+						+	+								
79							+	+	+	+		+	+											+			+	
80												+												+				
81							+		+	+																	+	
82							+		+	+			+	+					+	+							+	
83							+	+	+	+			+						+	+				+			+	
84		+								+									+					+			+	
85																			+					+			+	
86																								+			+	
87																								+			+	
88					+														+					+			+	
89					+					+									+								+	
90					+					+																	+	
90			+	+						+													+	+			+	
91					+					+														+				
92					+					+													+	+				
93																												
94										+																		
95										+		+																
96							+	+			+	+	+							+			+				+	
97					+	+	+	+			+	+								+		+	+	+			+	
98			+		+	+				+						+			+			+	+	+			+	
99					+	+				+										+							+	
100	+				+	+				+						+				+							+	
101	+		+	+	+	+				+										+				+			+	
102					+	+				+									+								+	
103					+	+				+													+					
104	+		+	+	+	+				+	+	+								+								
105	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+									+	+	+		+	
9-3			+				+	+	+			+	+										+	+	+		+	

#### 나. 비병원성 균주 선발 및 효소활성 검정

박테리오파지 검정을 통해 선발한 균주의 비병원성 돌연변이체를 유도하였다(Chuang *et al.*, 1999). 비병원성 돌연변이체로부터 무름병균의 병원성인자인 polygalacturonase, pectate lyase, cellulase, protease의 활성을 검정하였다. 효소활성 검정은 Chatterjee의 방법에 준했다(Chatterjee, 1995; Matsumoto *et al.*, 2003). 효소활성을 검정하기 위해 pel(pectate lyase: 1% sodium polypectate, 1% yeast extract, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCl pH8.5), peh(polygalacturonase: 1% sodium polypectate, 1% yeast extract, 2.5 mM EDTA, 50 mM sodium acetate pH5.5), cel(cellulase: 0.1% carboxy-methyl cellulose, 50mM sodium phosphate pH7.0), prt(protease: 3% gelatin, 1% nutrient broth) 배지를 사용하였다. 각각의 효소 활성 배지에 0.8% agarose와 0.2% sodium azide를 첨가하였다. 각 배지에 No 2. cork borer를 이용해 홈을 만든 후, 홈에 녹인 0.8% agarose와 0.2% sodium azide의 혼합액을 30  $\mu$ l씩 첨가하여 홈의 밑을 막았다. 비병원성 돌연변이체를 NA배지에서 28°C에서 24시간 배양한 후 배양 세균의 단일 콜로니를 YP배지(1% peptone, 0.5% yeast extract, pH 6.8)에 접종해 28°C에서 12-16시간 200 rpm으로 배양하고, 배양액 1 ml를 15,000 rpm으로 2분 원심분리 하여 상정액을 얻었다. 상정액 30  $\mu$ l를 각 배지의 홈에 넣었다. Pel, peh, cel 배지는 27°C에서 20시간 배양하고, prt 배지는 27°C에서 48시간 배양했다. Pel과 peh 활성은 각각 pel, peh 배지 위에 5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 부어 관찰했고, cel 활성은 cel 배지 위에 0.1% Congo red로 염색하고 1 M NaCl로 여러 번 씻어낸 후 관찰했으며 prt 활성은 아무런 처리 없이 바로 관찰하였다.

#### 다. 선발된 비병원균주의 병원성 검정

분리한 비병원성 무름병균의 배추에서의 병원성 검정을 위해 10<sup>8</sup> cells/ml의 현탁액 8 ml를 미네랄 오일 2 ml와 혼합해 온실에서 키운 6-8 엽기의 배추 중앙 기부에 관주접종 했으며, 대조구로 돌연변이체의 모균주를 동일한 방법으로 접종하였다. 각 처리 당 배추는 30주씩 사용하였다.

라. 비병원균의 무름병 방제효과 검증

1) 실내 및 온실검정

배추를 흐르는 물에 씻은 후 70% ethanol에 2-3분간 담궈 표면살균하고 멸균한 칼로 배추의 증륙을 약 5x5 cm로 절단하였다. 이 배추 증륙 위에 멸균한 이쑤시개로 상처를 낸 후 *Ecc* 33 및 35( $10^4$  cells/ml)균주와 비병원균인 9-3( $10^8$  cells/ml)균주를 50  $\mu$ l씩 혼합접종을 하고 습실처리하였다. 대조구는 *Ecc* 33 및 35( $10^4$  cells /ml)를 동일한 방법으로 접종하였다. 배추 접종부위의 병징 크기와 병징 생성여부를 대조구와 비교하였다.

온실검정은 셋노랑 배추 종자를 파종하여 발아한 유묘를 직경 15 cm의 비닐 포트에 옮겨 심어 유리 온실에서 키워 6-8엽기의 배추를 실험에 사용하였다. 비병원성균 *Ecc* 9-3, 병원균 *Ecc* 33 및 35번 균주를 NA 배지에서 28°C, 24 시간 배양 후 멸균수에 현탁하여 분광광도계로 세균밀도를 측정하였다. 9-3와 병원균의 최종 밀도는  $10^8$  cells/ml로 조정하였다. 배추의 증륙에 막대를 이용해 2군데에 상처를 준 후 9-3( $10^8$  cells/ml)을 먼저 분무하고 물기가 마른 후 병원균 33 및 35( $10^8$  cells/ml)를 각각 분무 접종하였다. 또한, 대조구로 9-3( $10^8$  cells/ml), 33( $10^8$  cells/ml), 35( $10^8$  cells/ml)를 각각 분무하였다. 각 처리 당 배추 15주씩 사용 했으며 3 반복하였다. 접종 후 3일부터 발병 주수를 세어 무름병 억제력을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

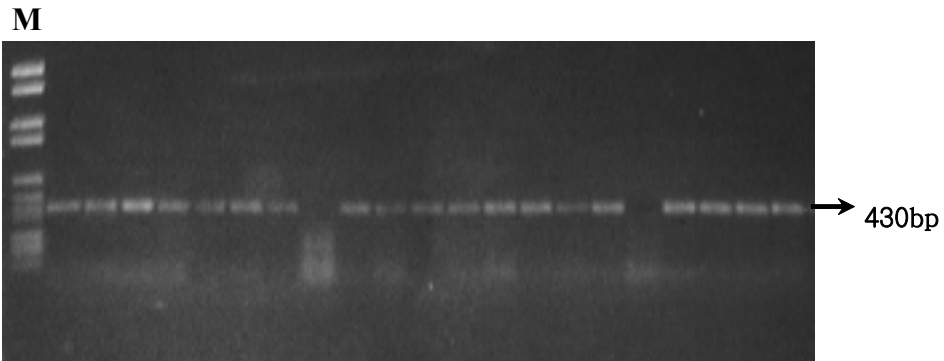
가. 박테리오신 생성

무름병 분리균 중 *Ecc*로 동정된 94개 균주의 박테리오신 생성을 균주 사이에 reciprocal 한 방법으로 확인한 결과 모든 균주가 박테리오신을 생성하는 것으로 나타났다. 균주별 박테리오신 생성을 확인한 결과 감수성이 가장 낮은 균주는 실험한 전체 94개 균주의 9.6%인 9개 균주에만 감수성이었으며, 감수성이 가장 높은 균주는 62.8%인 59개 균주의 박테리오신에 대해 감수성을 보였다. 그리고 박테리오신활성이 가장 높은 균주는 전체 균주의 65%인 61개 균주에 활성을 보였으며 가장 낮은 균주는 3.2%인 3개 균주에 대해 활성을 보였다. 각 균주의 박테리오신 생성 능력과 박테리오신의 감수성은 균주마다 다양한 결과를 보여주었다(Table 4-1). *Ecc*에서 박테리오신 생성을 조절하는 유전자로 보고된 *brg* 유전자를 증폭 하는 primer를 이용하여 PCR을 시행

한 결과 83번 균주를 제외한 *Ecc*로 동정된 모든 균에서 예상했던 430 bp의 DNA가 증폭되었다(Fig. 4-1). MIDI 동정 결과 *Ecc*가 아닌 것으로 동정된 균주도 PCR을 시행하였는데 430 bp의 DNA가 증폭되지 않았다.

#### 나. 비병원성 무름병균의 선발 및 특성

박테리오신 활성이 좋은 6개 균주를 비병원성 무름병균 선발실험에 사용하였다. 이들 균주에 돌연변이원 EMS를 처리하고 펙틴 분해효소 검정용 배지에서 펙틴 분해효소 활성이 감소한 8개의 돌연변이체를 선발하였다. 선발한 돌연변이체를 배추의 증류액에 침적중하여 병원성 검정을 하였고, 병원성이 감소하거나 병원성을 상실한 균을 선발하였다. 선발한 비병원성 돌연변이체들의 세균 상정액을 얻어 *Ecc*의 병원성인자로 알려진 pectate lyase(*pel*), polygalacturonase(*peh*), cellulase(*cel*), protease(*prt*)의 생성을 조사하였다. 이들 4개의 효소의 활성 가장 크게 감소한 9-3을 비병원성 균주로 최종 선발하였다. 모균주인 9번 균주는 4가지의 효소를 모두 생성 하였지만 돌연변이체인 9-3은 *cel*과 *peh*는 생성하지 못했으며, *pel*은 모균주에 비해 크게 감소하였다. 그러나 *prt*의 생성은 모균주와 동일했다(Fig. 4-2). 9-3 균주의 박테리오신의 활성은 모균주 *Ecc* 9와 크게 차이가 없었다.



**Fig. 4-1.** PCR products of DNA from bacterial isolates with primers from *brg*, bacteriocin regulatory gene. M: molecular weight marker.



**Fig. 4-2.** Extracellular enzyme activity of wild type strain *Ecc* 9 and mutant *Ecc* 9-3.

다. 비병원성 선발 균주의 병원성 및 무름병 방제효과

병원성 모균주 *Ecc* 9와 비병원균 9-3균주를 온실에서 미네랄오일과 함께 배추에 접종한 결과 초기에 *Ecc* 9 균주 접종구에서는 100% 발병하였으나 9-3균주 접종구에서는 전혀 발생하지 않았다(Fig. 4-3). 미네랄오일은 무름병을 강하게 유도하는 능력이 있는데 미네랄오일과 함께 접종한 배추에서 병을 일으키지 않는다는 결과는 9-3번 균주가 병원성을 거의 완전히 상실한 것으로 판단된다.

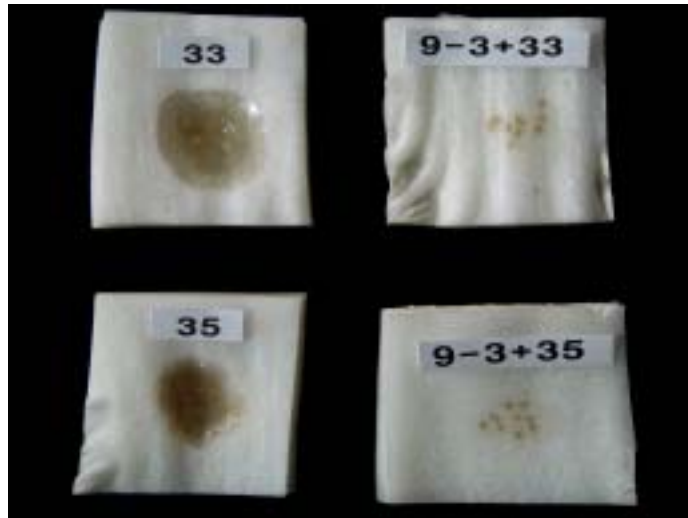
비병원성 균주 9-3의 무름병 방제효과의 배추 앞에서 검정하기 위해 배추 증류에 이쑤시개로 상처를 낸 후 비병원성 *Ecc* 9-3( $10^8$  cells/ml) 현탁액과 병원균 *Ecc* 33 및 35 현탁액( $10^4$  cells/ml)을  $50 \mu\text{l}$ 씩 혼합 접종 하였다. 병원균을 단독 접종 했을 때는 배추에 병반이 형성되었지만 *Ecc* 9-3 현탁액과 *Ecc* 33 및 35번의 현탁액과 혼합 접종 했을 때는 거의 완벽하게 병반이 형성되지 않았다(Fig. 4-4).

온실에서 비병원성 균주 *Ecc* 9-3의 무름병 방제효과를 검정하기 위해 배추의 증류에 상처를 준 후 비병원성 *Ecc* 9-3 균주를 살포 한 후 곧바로 병원성 균주인 *Ecc* 33과 35를 분무 접종 한 후 배추에서 이병주율을 조사한 결과, 9-3은 전혀 병을 발생시키지 않았고, 33번 단독접종의 경우 5일째에는 52%, 11일째에는 77%의 발병율을 보였고, 9-3을 처리하고 33번을 처리한 구에는 5일째에는 6%, 11일째에는 44%로 발병율을 보였다. *Ecc* 35번 단독 접종구는 11일째에는 60%, 9-3을 처리하고 35번을 처리한 구는 35% 이병주율을 나타냈다(Fig. 4-5와 4-6). 접종 10일 후 이병주율을 가지고 9-3 균주의 무름병 방제율을 계산하면 35번 접종구에 대해서 40.2%, 33번 접종구에 대해서 42.7%로 40%이상의 방제 효과를 보였다.

이상의 결과는 박테리오파지를 생산하는 균주 이용하여 효과적인 무름병 방제가 가능하다는 것을 보여주는 것으로 앞으로 이 분야의 좀 더 깊이 있는 연구는 미생물을 이용한 효과적인 방제법을 개발가능하게 할 것으로 판단된다.



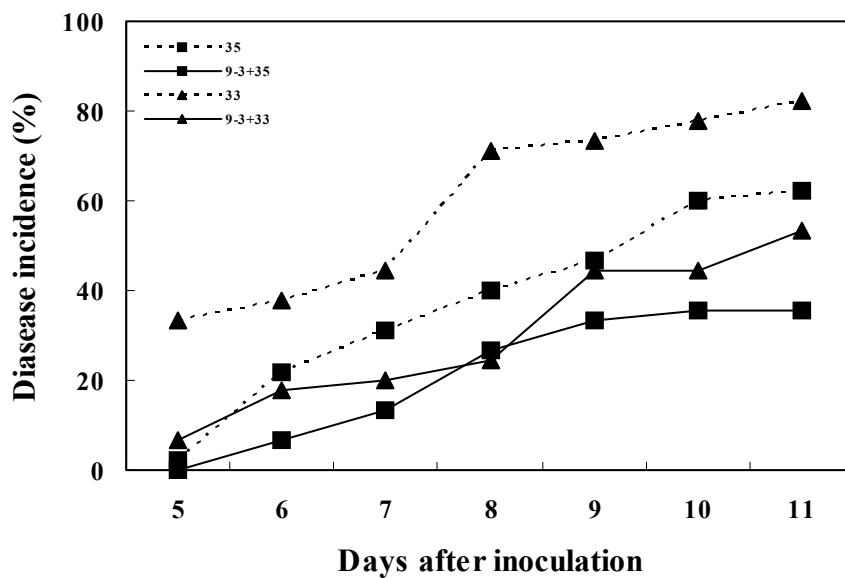
**Fig. 4-3.** Pathogenicity of *Ecc* 9 (left) and its mutant *Ecc* 9-3 (right) on Chinese cabbage. Chinese cabbage was inoculated with the mixture of bacterial suspension ( $10^8$  cells/ml) and sterilized mineral oil, and result was checked 4 days after inoculation.



**Fig. 4-4.** Inhibition of bacterial soft rot by avirulent *Ecc* 9-3 on Chinese cabbage petiole. Inoculum was bacterial suspension (*Ecc* 33 and 35:  $10^4$  cell/ml, 9-3:  $10^8$  cell/ml).



**Fig. 4-5.** Control effect of avirulent *Ecc* 9-3 on soft rot of Chinese cabbage. Inoculated with virulent *Ecc* 35 + mineral oil (left) and Inoculated with mixture of virulent *Ecc* 35, avirulent *Ecc* 9-3, and mineral oil (right).



**Fig. 4-6.** Control efficacy of avirulent *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (*Ecc*) 9-3 on soft rot of Chinese cabbage inoculated with wound in greenhouse trial. Bacterial suspension of each strain ( $10^8$  cells/ml) was sprayed on Chinese cabbage after prick with a sterilized toothpick.

## 제 5 절. 배추 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 35균주의 BAC end sequencing과 *hrp*유전자 클로닝

### 1. 서언

최근 염기서열의 완전 해독은 많은 생물학 분야에 있어서 아주 중요한 정보를 제공하고 있고, 영향을 미치고 있다. 2001년 9월 기준으로 The Institute for Genome Research (TIGR, <http://www.tigr.org>)에 보고된 바에 의하면 40 이상의 진정세균의 게놈 sequence들이 얻어져 공개되었고, 100여개 이상의 다른 진정세균의 게놈 sequencing이 진행 중이다. 그럼에도 불구하고, 완전히 게놈이 분석되어 공개되어 있는 식물병원균으로는 오직 *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia amylovora*에 국한되어 있을 뿐이다. 이와 더불어 여러 대표적인 식물병원균(*Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*)의 게놈 염기서열 분석 프로젝트가 진행 중이나 *Erwinia*속에 대한 게놈 염기서열 분석은 미비한 편이다. *Erwinia*속의 식물병원균에는 사과에 화상병의 원인균인 *E. amylovora*와 다양한 식물체에 무름병을 일으키는 *E. chrysanthemi*와 *E. carotovora*(Alfano and Collmer, 1996)가 있다. *Erwinia*속 균은 모델 미생물인 *Escherichia coli*와 밀접한 관계가 있고 같은 Enterobacteriaceae에 속한다. 이러한 유사성은 16S rDNA sequences 상동성에서도 *E. carotovora*와 *E. coli*는 95%이상임이 이미 분자학적 분류에서도 확인되었다(Hauben *et al.*, 1998). 이미 전체 *E. coli* 게놈 염기서열은 공개되어 알려져 있고 (Blattner *et al.*, 1997), 또한 여러 진정세균들의 genome sequencing이 진행 중이므로, 아직까지 전체 genome sequence분석이 완결되지 않은 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 genome의 구조와 유전자들을 비교해 보는 것이 필요하다. *E. carotovora* ssp. *atroseptica*와 *E. carotovora* ssp. *carotovora*는 전 세계적으로 많은 작물에서 경제적으로 중요한 병원균들이다. *E. carotovora* subsp. *atroseptica*는 기주 범위가 감자에 국한되어 괴경에 무름병과 줄기에 썩음병(blackleg)을 일으키는 반면에, *E. carotovora* ssp. *carotovora*는 blackleg병을 일으키지는 않으나, 많은 작물에 무름병을 일으키는 병원균이다(Perombelon &

Salmond, 1995). *E. carotovora* 병원균은 type I과 type II secretion pathway를 통해서 다양한 extracellular enzymes을 분비하여(특히 pectic enzymes) 식물의 세포벽을 붕괴시킨다(Py *et al.*, 1998). 이러한 능력과 표현형 그리고 *Erwinia*속 내에서의 molecular phylogenetic heterogeneity에 의해 무름병균 *Erwinia* spp.균들은 *Pectobacterium*으로 재분류되는 것이 제안되었다(Hauben *et al.*, 1998).

무름병균은 opportunistic 병원성을 보이는 병원균이나 *E. chrysanthemi*와 *E. carotovora*에서 type III protein secretion system과 extracellular enzyme 합성을 조절하는 다양한 조절 기작이 밝혀져 지금까지 예상했던 것보다는 훨씬 더 복잡한 기작에 의해 무름병원균이 병을 일으킨다고 생각되고 있다(Bauer *et al.*, 1994; Barras *et al.*, 1994; Mukherjee *et al.*, 1997). *hrp* 유전자에 의해 암호화되는 type III secretion system는 pilus like structure을 통해 기주 세포에 직접 단백질을 전달하는 것으로 알려져 있다(Galan & Collmer, 1999). 하지만 *E. carotovora*에서 *hrp* 유전자의 기능은 아직 알려지지 않고 있다. *E. carotovora*에서 거의 대부분의 병원성 관련 유전자들은 직접적인 gene cloning이나 transposon 돌연변이, 그리고 병원성에서 유전자들의 기능은 일반적으로 줄기나 괴경에 접종하는 아주 간단한 식물 assay 방법에 의해 실시되었다(Andersson *et al.*, 1999; Hinton *et al.*, 1989; Perombelon & Salmond, 1995). 비록 이러한 방법이 지난 15년 동안은 아주 성공적으로 사용되어 왔으나, 식물과 *Erwinia*의 상호관계에서 많은 부분이 아직까지도 잘 알려지지 않고 있는 이유는 이러한 고전적인 방법에 의해 분석을 하기 때문에 *Erwinia* 병원성의 다른 면을 연구할 방법이 이루어지지 않았기 때문이다. 예를 들어 식물 감염에 관련된 유전자, 특이적인 병원성 유전자의 유도과 억제와 이에 관련된 유전자의 조절 등 *E. carotovora*의 식물체내에서 발현되는 유전자에 대한 연구는 미비한 편이다. *E. carotovora*의 genome sequencing은 *Erwinia* 병원성을 이해하는 alternative approach를 제공한다. 그러나, 전체 genome sequencing project를 수행하는데 필요한 비용이나 자원은 엄청나다. 이러한 전체 genome sequencing 방법은 주로 multiple coverage random sequencing으로 부터 redundant sequence information과 gap closure에 많은 비용과 노력이 요구된다(Frangeul *et al.*, 1999). 본 연구에서는 Bacterial Artificial Chromosome(BAC) vector를 이용하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 전체 genome을 클로닝하고 BAC end sequencing을 통해 간단한



*Ecc*의 게놈의 유전자 지도를 작성하고 병원성에 관련될 것으로 추정되는 *hrp* 유전자 부위를 full length cloning과 sequencing을 통해 분석하였다. 본 절에서는 이미 게놈이 sequencing된 *Eca*와 비교해서 *Ecc*의 간단한 유전자 지도를 그리고, *Ecc* BAC clone들의 one-fold coverage sample sequencing에 의해 *Eca*의 전체 genome과 비교하였다. 또한 *Ecc*와 *Eca*의 *hrp* 유전자 부위의 분석을 통하여 이들 두 균주간의 *hrp* 유전자의 상동성과 차이점을 분석하고자 하였다. 이러한 가격이 저렴한 BAC end sequencing에 의해 얻어진 *Eca* 유전자 정보에 의해 차후에 전체 유전자 지도를 작성하는 기틀을 마련하는 것이다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시균주 및 배양

본 연구에 사용된 배추 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain 35균주는 충북에서 무름병 증상을 보인 배추에서 분리된 균주로서 충북대학교 식물미학과 식물세균병학 실험실에서 주로 균주의 생태학적 혹은 분류학적 연구가 주로 이루어왔던 균주이다. 배추 무름병균은 30℃에서 *E. coli*균주는 37℃에서 LB 배지(Bacto-trypton 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, distilled water 1L, pH 7.5)에 배양시켰다. BAC clone들은 Luria Bertani broth(LB) 혹은 IPTG, X-Gal, 그리고 12.5 ug chloramphenicol ml<sup>-1</sup>을 첨가한 LB agar에서 생육하였다. 선별 과정에서 배지에 첨가하는 항생물질은 Tetracycline(12.5µg/ml), Ampicillin(50µg/ml), Kanamycin(100µg/ml)을 사용하였다(Sambrook *et al.*, 1989). 본 실험에 사용한 모든 균주는 -80℃에 보관하여 사용하였다.

### 나. DNA 조작

일반적인 DNA 조작방법은 Ausubel 등(1989)과 Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 수행하였다. 제한효소와 modifying 효소의 사용 방법은 제조사의 사용방법에 준하여 실시하였다. Agarose gel에서의 DNA fragments Zymoclean gel DNA recovery kit(Zymo Research Inc., Orange, CA)을 이용하여 분리 정제하였다. Southern 혹은 colony hybridization은 non-radioactive Genius system(Roche Biochem. Inc. Indianapolis, IN)을 사용하여 실시하였다. 다른 genomic이나 plasmid DNA 분리, 및 DNA sequence analysis 등은

Sambrook 등(1989) 방법에 준하였다. Nucleotide 와 deduced amino acid sequences는 University of Wisconsin Genetic Computer Group(GCG) packages와 NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 그리고 Expasy (<http://www.expasy.hcuge.ch/>) 등의 방법을 이용하여 분석하였다. *Ecc* 35균주와 와 다른 병원균과의 hrp cluster와 phylogenetic relationship은 CLUSTAL-W program, WORKBENCH (<http://www.ch.embnet.org>)을 이용하여 수행하였다. Deduced hrp 유전자 sequences의 alignment는 BCM Search Launcher의 Multiple Sequence Alignments를 이용하여 수행하였다 (<http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/>). 본 연구에 사용된 oligonucleotide primers들은 주식회사 Bioneer(대전, 대한민국)에서 주문하여 조제하였다.

다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 high-molecular-mass genomic DNA조제

*Ecc* 35균주를 27°C의 LB broth에서 300 rpm의 shaker에서 OD600 nm 약 0.9가 되게 배양한 30 ml정도 배양하였다. 배양액은 15분간 얼음위에서 보관한 다음 4°C에서 10분간 2500 rpm으로 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 4 ml bufferI(200mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.2, 100 mM EDTA)에 재현탁하였고, 원심분리하여 회수한 다음 1 ml bufferII(200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.2, 10 mM EDTA)에 재현탁하였다. 세균현탁액은 37°C에서 5분간 그리고 42°C에서 5분간 배양한 다음 멸균수에 1.5% low melting point agarose 1.5 ml와 42°C에서 혼합하였다. 혼합액을 100  $\mu$ l plug molds에 분주한 다음, 상온에서 방치하였다. Plugs를 20 ml GET(50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH8.0, 2.5 mg lysozyme ml<sup>-1</sup>)에 4°C에서 24 시간동안 배양하였다. GET는 50 ml EPS(0.5 M EDTA pH 9.2, 1% sarcosyl(w/v), 1 mg proteinase K ml<sup>-1</sup>)로 교체한 다음 50°C에서 gentle shaking을 하면서 24시간동안 배양하였고, EPS에서 씻은 후 다시 50°C에서 24 시간동안 배양하였다. Plugs는 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF에서 상온에서 1시간씩 2회 씻어낸 다음, 30 ml 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA의 50°C에서 4번, 30 ml 0.5 M EDTA pH 9.2에서 50°C에서 한번, 마지막으로 0.05 M EDTA pH 8.0 용액에서 4°C 1시간 한 번 씻었다. Plugs는 0.05 M EDTA pH 8.0 용액에서 4°C에서 사용전까지 보관하였다.

라. BAC library 조제.

*Ecc* 35균주의 BAC genomic library는 Epicentre 회사의 pIndigoBAC-5를 클로닝 vector로 하여 회사의 protocol에 준하여 조제하였다 (Fig. 5-1). 위에서 준비한 5개의 100  $\mu$ l plugs를 면도칼을 이용하여 잘게 자른 다음 1 ml 0.1% Triton X-100으로 씻고 간단하게 원심분리하여 상정액을 버렸다. 50  $\mu$ l 조각난 plugs에 7  $\mu$ l 40 mM spermidine, 7  $\mu$ l 10 X endonuclease buffer, 0.7  $\mu$ l 10 mg BSA ml<sup>-1</sup> 을 첨가한 후 30 분간 얼음에서 보관하였다. *Hind*III(0.05U/tube in 5  $\mu$ l)를 첨가하고 샘플을 얼음위에서 30분간 방치한 다음 37°C에서 30분간 처리하였다. 7  $\mu$ l 0.5 M EDTA pH 8.0을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 전체 샘플을 1% low-melting-point(LMP) agarose gel에 load한 다음 Bio-Rad CHEF Mapper에서 6V cm<sup>-1</sup>, 20초의 switch time에서 high-molecular-mass marker와 같이 전기영동하였다. 100 kb 이상의 DNA fragment를 가진 gel slice를 ethidium bromide나 UV를 처리하지 않은 인접한 부위에서 잘라낸 다음 4°C TE buffer에서 30분간 3번 씻어냈다. 100 mg의 gel slices를 1 ml TES buffer(50 mM NaCl을 함유한 TE)에서 1시간 배양하였다. TES buffer를 제거한 다음 gel slices는 65°C에서 10분동안 처리하고 40°C에서 1시간 처리하여 녹였다. 1  $\mu$ l의  $\beta$ -agarase(New England Biolabs)을 첨가하고 혼합액을 40°C에서 1시간 더 배양하였다. DNA농도는 lambda standard에 비교하여 측정하였다. 마지막으로 *Ecc* 35 DNA는 *Hind*III로 절단하고 dephosphorylated pIndigoBAC-5(100 ng DNA, 10 ng vector, 1  $\times$  ligation buffer[including ATP], 1.33 U DNA ligase, volume 100  $\mu$ l)와 12°C에서 overnight하면서 ligate하였다. Ligations은 drop dialysis에 의해 desalt하였고 1  $\mu$ l씩 Electroporation-BioRad micropulser(411BR 0751)를 이용하여 *E. coli* DH10B에 형질전환하였다. Transformants는 SOC배지로 1 : 20으로 희석하고 X-gal과 IPTG가 첨가된 LB 배지에 도말하기 전에 1시간동안 37°C에서 gentle shaking하였다. Overnight 배양 후에, recombinant(white) colonies를 선발하고 insert size는 *Not*I으로 절단한 다음 CHEF gel analysis에 의해 측정하였다. 각 BAC clone들은 두개의 384 plate에 chloramphenicol(34 $\mu$ g/ml)이 되게 첨가된 70  $\mu$ l freezing medium(LB에 36 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 mM sodium citrate, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 6.8 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.4%, v/v, glycerol) 배지에서 증식하여 -80°C에 보관하였다.

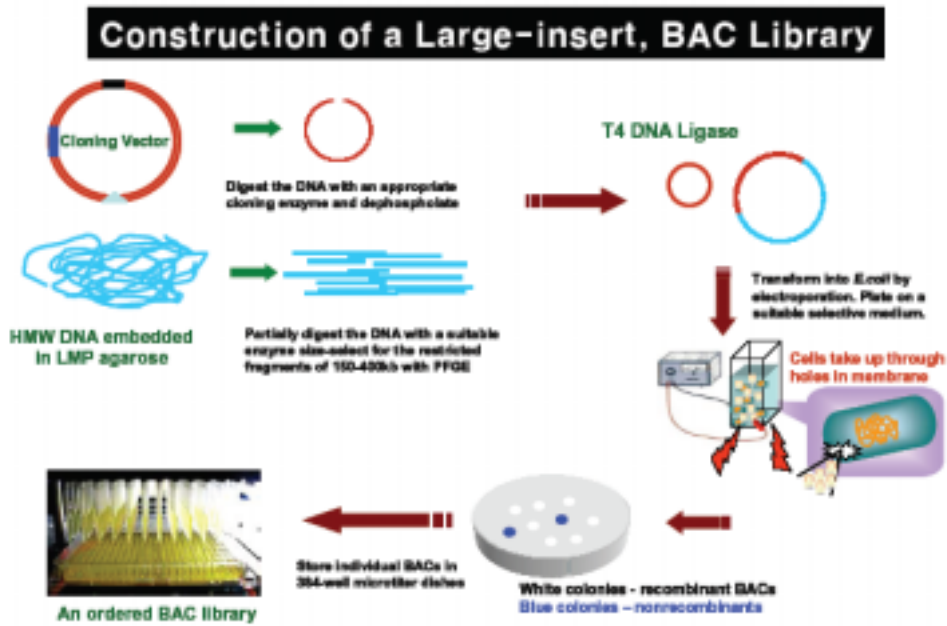


Fig. 5-1. *E. carotovora* ssp. *carotovora* strain 35균주의 Bacterial Artificial Chromosome(BAC) library 조제를 위한 flow chart.

마. BAC library의 hybridization screening

BAC library clone들은 2개의 LB saturated nylon membranes에 멸균된 384 pin plastic replicator를 이용하여 옮겼다. Membrane들을 LB agar배지 위에 상치한 다음 37°C에서 overnight하여 콜로니가 자라게 생육시킨 다음 일반적인 방법에 의해 DNA를 blot시켰다(Sambrook *et al.*, 1989). Primers hrpN1과 hrpN-2를 *E. carotovora* ssp. *carotovora* hrpN 유전자(GenBank accession no. L78834)로부터 선발하여 디자인하였다. PCR은 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 genomic DNA를 주형으로 실시하였다. Boehringer Tag DNA polymerase와 reaction mix를 94°C에서 2분간 denaturing한 다음 94°C 30초, 64°C 30초, 72°C 1분을 설정한 35 cycle을 수행하였다. PCR product는 Promega Wizard PCR preb에 의해 정제하고, Roche의 dig-labeled kit를 이용하여 probe를 조제하였고, BAC library와 high stringency하에서 hybridization 하였다.

바. BAC end sequencing

위에서 조제한 384 plate에 보관된 각 BAC clone들을 chloramphenicol이 첨가된 배지에 증식시켜 alkaline lysis miniprep을 이용하여 recombinant DNA를 분리하여 BAC end sequencing, PCR, 및 subcloning에 사용하였다. 먼저 384 BAC clone의 end sequencing을 실시하기 위해 forward sequencing primer로 5'-GGA TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG-3', reverse sequencing primer로 5'-CTC GTA TGT TGT GTG GAA TTG TGA GC-3'와 약 0.5  $\mu$ g를 template로 하여 Big Dye Sequencing kit(Perkin Elmer)를 사용하여 (주)솔젠티에서 실시하였다. BAC end sequencing 결과는 이미 genome sequencing이 끝난 *Erwinia carotovora* subsp. *astroseptica*와 BLAST search를 통해 상동성이 있는 부위를 찾아 alignment하여 간단한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 BAC clone의 map을 작성하였다.

사. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주 hrp region의 subcloning과 sequencing분석

상기의 hybridization방법에 의해 positive clone으로 동정된 BAC clone들의 BAC DNA를 분리하기 위해 large-scale plasmid preps(Qiagen)을 이용

하여 4L 배양액으로부터 분리하였다. 분리된 DNA는 대장균의 염색체 DNA를 제거하기 위하여 100  $\mu\text{g}$ 당 적어도 20  $\mu\text{l}$  enzyme을 사용하여 Plasmidsafe (Cambiolab)와 overnight동안 배양하였다. 정제된 BAC DNA들은 다양한 제한 효소로 절단한 다음 Southern blot에 의해 nylon membrane에 blot시킨 다음 dig-label된 *hrpN* probe와 hybridization하여 positive band들을 high copy number cloning vector인 pUC19이나 pBluescript KS 등의 vector에 subcloning 하여 *hrp* cluster의 full length sequencing을 하는데 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. BAC clones의 hybridization screening과 BAC end-sequencing

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 genome 구조연구와 유전자를 쉽게 찾을 수 있도록 약 insert size가 평균 150 kb 정도되는 BAC library를 조제하였다. 조제된 BAC library 중에서 인위적으로 10개의 BAC clone들을 선발하여 DNA를 분리한 다음 이들 선발된 BAC clone들의 평균 insert size를 측정하여본 결과 약 150 kb이었다(data not shown). 총 768개의 BAC clone들을 선발하여 최종 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 BAC library를 조제하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 BAC library는 이론적으로 약 80 Mb의 nucleotide를 함유하고 있어서 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1035 균주의 genome 크기가 5.1 Mb에 인 것에 비추어 약 15배 정도의 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 염색체 DNA를 cover할 수 있는 BAC library가 조제되었다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주 genome의 physical map을 작성하기 위해 504개 BAC clone들의 end sequencing을 실시하였다. 자세한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 각 BAC clone들의 end sequencing 결과는 이미 genome sequencing이 끝난 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*와 상동성이 가장 높아 각 clone들의 end sequence 유사성을 BLAST search에 의해 상동성이 가장 높은 유전자를 동정하였다. 각 BAC clone의 end sequence 비교 분석한 결과는 전남대학교 식물병리학 실험실 홈페이지에 게시하였다 (<http://ppmpmi.chonnam.ac.kr>). *E. carotovora* ssp. *carotovora* BAC end sequences의 BLAST를 해본 결과 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*와 가장 유사성이 높아 *E. carotovora* ssp. *carotovora* BAC end sequences를 이용하여 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* genome physical

map과 비교하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 physical map을 작성하였다 (Fig. 5-2). Bell 등(2004)이 보고한 바에 의하면 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1043균주의 전체 genome은 5,064,019 bp로 구성된 한 개의 원형 염색체라고 알려져 있다. *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1043균주의 G+C content는 50.95%, 4,191 predicted CDSs, 7 rRNA operons로 구성되어 있다고 보고되어 있다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 BLAST search결과 BAC end sequence가 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1043 genome sequence 전체와 상동성을 보여 본 연구에서 조제된 BAC library가 *E. carotovora* ssp. *carotovora* genome 전체를 cover할 것으로 생각된다. *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1043 genome sequence와의 coverage를 비교한 결과, *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주도 아마도 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1043 균주와 비슷한 약 5.1 Mb의 크기를 가진 한 개의 원형 염색체를 가지고 있을 것으로 사료된다. 약 35개의 BAC clone의 end sequence는 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 1043 sequence와 homology를 보여주지 않아 아마도 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 염색체가 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 보다 크던지 아니면 염색체 이외에 plasmid를 가질 가능성도 있다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 chromosome physical map은 앞으로 target유전자의 클로닝이나 genome sequence분석에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

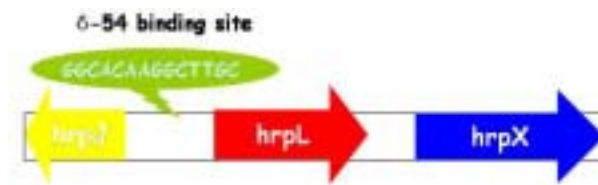




나. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrp* 유전자들의 sequencing.

이미 genome project가 끝난 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*의 *hrpL* 유전자 sequence를 이용하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자를 클로닝하였다. 먼저 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*의 *hrpL* 부근의 nucleotide sequence를 <http://www.scri.sari.ac.uk/tipp/erwinia.htm>에서 얻은 후 <http://kr.expasy.org/tools/dna.htm>에서 translate tool을 이용하여 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* *hrpL* 부근의 유전자를 분석하였다. *hrpL* upstream 쪽에는 *hrpJ* 유전자가 존재하였고, down stream쪽에는 *hrpX*가 존재함을 확인하였다(data not shown). *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrp* 유전자의 gene arrangement도 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*와 같을 것으로 생각되어 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*의 *hrpJ*와 *hrpX*의 open reading frame의 nucleotide를 [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)의 tool을 이용하여 각각의 primer를 조제하였다. *hrpJ*를 forward (5'-TTC CGT CAG TTT CTC GAT CC-3'), *hrpX*를 reverse primer (5'-AAA TCG CAT CCT TGA TAC GG-3')로 디자인하여 PCR를 이용하여 클로닝하였다. 1.8 kb의 PCR product를 분리하여 sequencing을 실시하여 분석하여 본 결과, *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자는 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*와 같이 *hrpJ*와 *hrpX*의 사이에 존재하였다. Down stream의 *hrpL* 유전자에는 최근에 *hrp* 유전자의 tyrosine sensor kinase로 알려진 *hrpX* 유전자가 존재하였다(Fig. 5-3). 또한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 deduced amino acid sequence도 다른 *Erwinia*속에서의 *hrpL* 유전자와 상동성이 높았으며, -10 recognition, -35 recognition, helicase 활성을 지닌 domain을 지닌 alternative sigma factor와 상동성이 높았다(Fig. 5-4). 분리된 *hrpL* 유전자를 함유하고 있는 1.8 kb PCR product를 digoxigeninindm로 표지하여 probe로 이용하여 전체 full length *hrp* cluster를 cloning 혹은 subcloning하는데 사용하였다. 상기의 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 physical map을 이용하여 BAC clone E16이 전체 *hrp* cluster를 지니고 있을 것으로 추정되었다. E16 BAC clone의 insert를 분리 정제하여 여러 제한효소로 절단하여 subcloning과 sequencing에 의해 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrp* cluster 부위의 전체 sequences를 얻었다.

A.



B.

```
GTCGCTATGGCGGTGGCGCGCGCTCCGGCTGCTGGGCGATGTGGCGTC
GGTTCAGCGAT 60
A I A T A R A D P Q Q A I H R R N L S 84
TTGCTTCTTCGTTTCGGCCTGCTCGCCAAACGCCATCGCCACTTCCTCCA
TCGAGGTGGAT 120
K S R R E A Q E G F A M A V E E M S T S
64
AGCGGCGAACCGGGAGGTGCGTGGTGAGAACTTGTCTGCTGCACCGCA
GCCTGCGGCGTG 180
L P S G P P A H H S S T Q Q V A A Q P T
44
GGATCGTCATCCATCACGACAGGGCGCGGCAGGGCGCTACTGGAGGGA
AGAACCGTCGGC 240
P D D D M V V P R P L A S S S P L V T P
24
ATTTTGATCATGATGTCATCCTGAATAAATCGGCTACGTGTCGTGGT
GTGAACGTGCAGC 300
M K I M ←hrpJ 4
GGTATGAATGTATTGCTATGTGGATGCAGAAAAGGATGGGTTCCCCG
ACGTGAAGTCATC 360
GGAGCAGGCCGAATTTGATGGCGGATTGGATTAAATGCCGTTACTTA
TTGCAATTACGGA 420
```

TTGCAATAACTTGCAATTTTCGTGCTGTGGGCGCTGGCAAAAAATGGC  
ACGATAATAGGTG 480

integration host factor

CGATGAAAAATAACTGATTA AAAAATCAGTGTGATAAAAAATTATCCG  
GGCTGGCACAAAGG 540

␣-54 binding site A

→hrpL

CTTGCTCTTCCGTTTTTGCCAAATGGGGCACAAACGGAGAGTCAGC  
AAATGGAAATGT 600

B +1 R.B M E M 3

CTACCCTGAAACACATCGAACAGACCCCTTCGCTTTACCCAGCGTTAT  
CTGTTCGATTGGG 660

S T L K H I E Q T P S L Y P A L S V D W  
23

AACAGGTGTTTCGTCAACACGGAAAGAAATTGCATAACTTTATCCGC  
AAGCGCGTCAGCA 720

E Q V F R Q H G K K L H N F I R K R V S  
43

ACCGTGACGACGTGGAGGATTTACAGCAAATGACCTATCTGGAAGTGC  
TCAAACATCAGG 780

N R D D V E D L Q Q M T Y L E V L K H Q  
63

ATAAATTTGCGGGAGCATCGCGGCCGAAACGTGGGTATTCGGTATTG  
CCCTCAACCTGG 840

D K F A G A S R P E T W V F G I A L N L  
83

TTCGCAATTATTTCAAGCAGGCACGCCAGCGCGCTCAGGAAATGGGCG  
ATGAGATGCTGG 900

V R N Y F K Q A R Q R A Q E M G D E M L  
103

AACATATCGCGATAGATCTCGATCCTGGCGCTATCACCGAAAGCCAGC  
GGGCATTGAAAC 960

E H I A I D L D P G A I T E S Q R A L K 123  
GCGCGATGGATGCCATCGTCTCACTGCCTGAAGATACCCGTCAGATGC  
TGATGCAATTGC 1020

R A M D A I V S L P E D T R Q M L M Q L  
143

TGGATACCGATGCCAGCTATCAGGATCTCGCGTTGCAGTTGGAGATCC  
CGATCGGTACGG 1080

L D T D A S Y Q D L A L Q L E I P I G T 163  
TGCGGTCGCGGCTGTCTCGTGCCCGAAGTGTGATTCGTCAGGCCGTAG  
AATCCTGACGGC 1140

V R S R L S R A R S V I R Q A V E S \* 181  
ATTTACGGGACGAAAGGACGCGCCTGCACCCGCCGTTTTTCACTGAC  
TGAGGTGGTAAC 1200

CGCTTTATTTAATGATGGCGGTTGCCGTTTCAGTTCGTGGTTCGCACGCC  
GTGATATCAGGT 1260

CGCATTGATGCCGTTGCAGGGTTCCTGTCCATCTTCTGGAATGTTGA  
GACGCCGTATTG 1320

→ hrpX

CGCTACCTGCACGGCGGGTGGCTGCACAACAGTCTTAATTCAAATAAG  
GAGATGGCAATG 1380

R.B. M A M 3

ATGTTACCCAACCTTTTTCGTTCCGATGAGAAAGCCAAAGCCCCGAG  
CTTGAACCTGGTG 1440

M F T Q P F R S D E K A K A P E L E L V  
23

GATTTTGCATTTGGCCGCATCAAGGACGCGATTTATATCGTCAATGA  
AGATCAGCGTTTT 1500

D F A F G R I K D A I Y I V N E D Q R F 43  
TGTTACGTCAATGAAGCAGCCAGCCAGACGCTGGGCTACAGCATTACG  
GAATTCATGCAT 1560

C Y V N E A A S Q T L G Y S I T E F M H  
63

TTGAGCGTTGCCGATATCGATCCCGACTGGGTCGCTGAGCATAGCTCG  
CCCGACTGGTTT 1620

L S V A D I D P D W V A E H S S P D W F  
83

CAGAAGTACGCATCGGGCGTCGGCACCACGTTTGAAACCAGGCACCTT  
ACCCGCAATGGC 1680

Q K Y A S G V G T T F E T R H L T R N G  
103

ATGGCGATTCCGGTCGAGGTTAATCTCACGCATTTCCAACACAGAGGA  
CGTAGCTACAAC 1740

M A I P V E V N L T H F Q H R G R S Y N  
123

ATGTGTGTAGTCAGAGATATCAGGGAACGTAGACATATTGAACAGTT  
GGCTTACGCGCGA 1800

M C V V R D I R E R R H I E Q L A Y A R  
143

**Fig. 5-3.** 클로닝된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 구조와 염기서열 분석. (A) *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자 주위에 존재하고 있는 유전자 및 orientation. (B) 클로닝된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자 클론의 염기서열 및 deduced amino acid sequences.

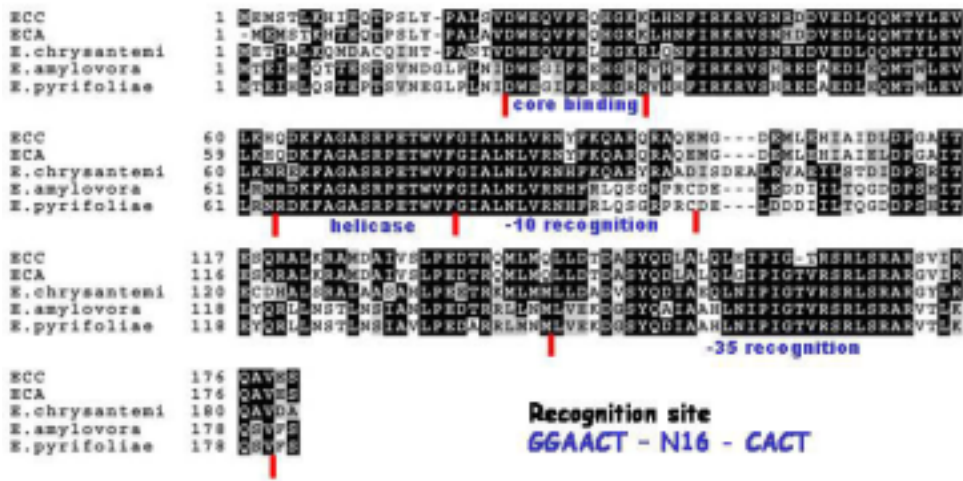
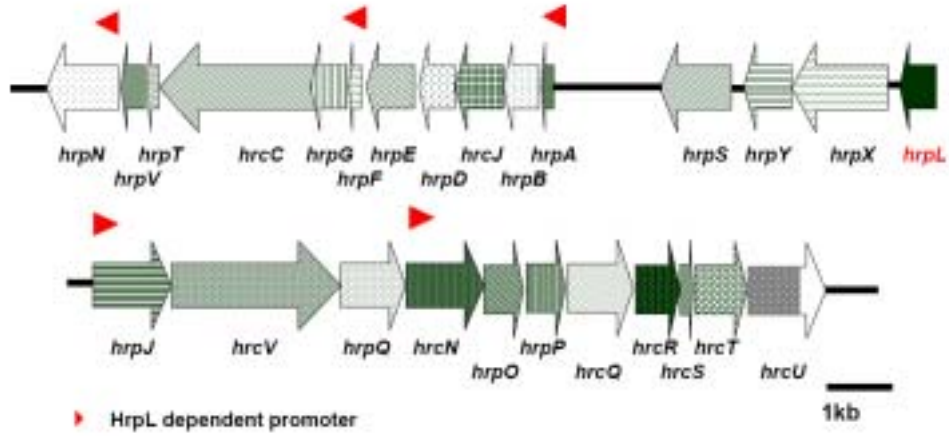


Fig. 5-4. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 아미노산 서열과 다른 *Erwinia*속 균들의 extracytoplasmic fuction(ECF) sigma family member와의 상동성 비교. *E. carotovora* ssp. *carotovora*; *Ecc*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; *Eca*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*(AY496066); *E. amylovora*, HrpL of *Erwinia amylovora*(AF083877); *E. chrysanthemi*, *Erwinia chrysanthemi*(AF448202); *E. pyrifoliae*, *Erwinia pyrifoliae*(AJ438881).

*E. carotovora* ssp. *carotovora* BAC clone E16에서 약 24 kb의 DNA fragment가 전체 hrp cluster 유전자를 포함하고 있었다. 26개의 hrp 또는 hrc 유전자들이 24 kb안의 DNA fragment내에 존재하고 있었다(Fig. 5-5). hrpL과 hrpJ를 기준으로 전사가 양 방향으로 hrp 유전자들이 배열되어 있었다. hrpL 유전자 방향으로는 hrpN, hrpV, hrpT, hrcC hrpG, hrpF, hrpE, hrpD, hrcJ, hrpB, hrpA hrpS hrpY, hrpX가 배열되어 있었고, hrpJ의 downstream 방향으로는 hrcV, hrpQ, hrcN, hrpO, hrpP, hrcS, hrcT, hrcU가 배열되어 있었다(Fig. 5-5). *E. carotovora* subsp. *atroseptica* SCR1043과 *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1의 hrp 유전자들의 상동성을 비교해 본 결과 *E. carotovora* ssp. *carotovora* SCC1과는 92%(hrpN, hrpV) - 99%(hrpL)까지 높은 상동성을 보였고, *E. carotovora* ssp. *atroseptica* SCR1043과도 83%(hrpT) - 97%(hrpJ)까지 높은 상동성을 보였다(Table 5-1). *E. carotovora* ssp. *atroseptica* SCR1043의 putative hrpN, hrpV, hrpT, hrgG, hrpE, hrpD, hrcJ, hrpS, hrpX, hrpQ, hrpO, hrpP, hrcQ, hrcT와는 90% 이하의 상동성을 보였으나, *E. carotovora* ssp. *carotovora* SCC1 균주의 모든 hrp 유전자들은 90% 이상의 높은 상동성을 보였다(Table 5-1).

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 HrpJ amino acid sequence는 *Pectrobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* HrpJ 단백질과 97% 상동성이 있었으며 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* HrpJ 단백질과 87%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 5-6). 지금까지 HrpJ 단백질은 아직 그 기능이 정확히 밝혀지지 않았지만 hydrophilic 단백질로 typeIII secretion에 관련된 단백질로 알려져 있다.



**Fig. 5-5.** 세균성 무름병균 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrp* 유전자 cluster 지도. Hrp box들을 함유하고 있는 유전자들의 promoter 부위에는 빨간 색 arrowheads로 나타내었다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrp* 유전자 sequence는 GenBank database에 accession number로 등록되어 있다.



**Table 5-1.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35, SCC1 균주와 *E. carotovora* ssp. *atroseptica*SCRI1043 균주간의 hypersensitive reaction과 pathogenicity (*hrp*) 유전자의 상동성

	<i>hrpN</i>	<i>hrpV</i>	<i>hrpT</i>	<i>hrcC</i>	<i>hrpG</i>	<i>hrpF</i>	<i>hrpE</i>	<i>hrpD</i>	<i>hrcJ</i>
<b><i>Ecc</i> SCC1</b>	92%	92%	94%	98%	98%	94%	94%	94%	95%
<b><i>Eca</i> SCRI1043</b>	88%	84%	83%	95%	86%	92%	86%	84%	88%

	<i>hrpB</i>	<i>hrpA</i>	<i>hrpS</i>	<i>hrpY</i>	<i>hrpX</i>	<i>hrpL</i>	<i>hrpJ</i>	<i>hrcV</i>	<i>hrpQ</i>
<b><i>Ecc</i> SCC1</b>	96%	98%	95%	96%	96%	99%	97%	96%	97%
<b><i>Eca</i> SCRI1043</b>	91%	95%	84%	90%	86%	92%	97%	91%	89%

	<i>hrcN</i>	<i>hrpO</i>	<i>hrpP</i>	<i>hrcQ</i>	<i>hrcR</i>	<i>hrcS</i>	<i>hrcT</i>	<i>hrcU</i>	
<b><i>Ecc</i> SCC1</b>	96%	96%	95%	95%	96%	97%	95%		
<b><i>Eca</i> SCRI1043</b>	91%	87%	84%	85%	92%	92%	89%		

CATTTTGATCATGATGTCATCCTGAATAAATCGGCTACGTGTCTGGTGTGAACGTGCAG  
 C 61  
 hrpL dependent promoter  
 GGTATGAATGTATTGCTGTGTGGACGTAGAAAAGGATGGGTTCCTCCGACGTGAAGTCATC  
 121  
 GGAGCAGGCCGAATTTGATGGCGGATTGAATTAATGTCGTTTTACTGATTGCAAGAAC  
 T 181  
 TGCAATTTACGCCGCTGACGTTGGCAACAAGTGGCGTGATAAAAAAGCAAAGTGAAAAA  
 T 241  
 Sigma-54 promoter  
 AACTGATTAATAATCAGTGTGATAATAATCATTCTGGGCTGGCACAAGGCTTGTCTTTC  
 C 301  
 hrpL  
 GTTTTTGCCAAATGGGGCACAACAACGGAGAGTCAGCAAatggaaatgtctaccctgaaa  
 361

M E M S T L K

7  
 cacatcgaacagacccttcgctttaccagcgttatctgctgattgggaacaggtgtt 421  
 H I E Q T P S L Y P A L S V D W E Q V F  
 27  
 cgtaacacggaagaattgcataactttaccgcaagcgcgtcagcaaccgtgacgac 481  
 R Q H G K K L H N F I R K R V S N R D D  
 47  
 gtggaggatttacgcaaatgacctatctggaagtgtcacaacatcaggataaattgcg 541  
 V E D L Q Q M T Y L E V L K H Q D K F A  
 67  
 ggagcatcgcggccggagacgtgggtattcggtattgccctcaacctggttcgcaattat 601  
 G A S R P E T W V F G I A L N L V R N Y  
 87  
 ttcaagcaggcagccagcgcgctcaggaaatggcgatgatgctggaacatatcgcg 661  
 F K Q A R Q R A Q E M G D E M L E H I A  
 107  
 atagatctgatcccggcgtatcaccgaaagccagcggcattgaaacgcgcatggat 721  
 I D L D P G A I T E S Q R A L K R A M D  
 127  
 gccatcgtctcactgctgaagatacccgctcagatgctgatgcaattgctggataccgat 781  
 A I V S L P E D T R Q M L M Q L L D T D  
 147  
 gccagctatcaggatctcgcgttgagttggagatcccgatcggtacggtgcggtcgcgg 841  
 A S Y Q D L A L Q L E I P I G T V R S R

167  
ctgtctcgtgccgaagtgtgattcgtcaggccgtagaatcctgaCGGCATTTTCACGGGA  
901  
L S R A R S V I R Q A V E S - 182  
CGAAAGGACGCGCCTGCACCCGCCGTTTTTCACTGACTGAGGTGGTAACCGCTTTATTTA  
961  
ATGATGGCGGTTGCCGTTTCAGTTCGTGGTTCGCACGCCGTGATATCAGGTCGCATTGATGC  
1021  
CGTTGCAGGGTTCCTGTCCATCTTCTGGAATGTTGAGACGCCGTATTGCGCTACCTGCA  
1081  
CGGCGGGTGGCTGCACAACAGTCTTAATTCAAATAAGGAGATGGCAATGATGTTACCCA  
1141  
hrpX  
ACCTTTTCGTTCCGatgagaaagccaaagccccgagcttgaactggtggatttgc  
1200  
M R K P K P P S L N W W I L H  
15  
ttggccgcatcaaggacgcatattatcgtcaatgaagatcagccgttttgttacgct 1260  
L A A S R T R F I S S M K I S R F C Y V  
35  
aatgaagcagccagccagcgtggctacagcattacggaattcatgcatttgagcgtt 1320  
N E A A S Q T L G Y S I T E F M H L S V  
55  
gccgatatcgatcccactgggtcgtgagcatagctgcccactggttcagaagtac 1380  
A D I D P D W V A E H S S P D W F Q K Y  
75  
gcatcggcgtcggcaccacgttgaaccaggcaccttaccgcaatggcatggcgatt 1440  
A S G V G T T F E T R H L T R N G M A I  
95  
ccggtcaggtcaatctcacgattccaacacagaggacgtagctacaacatgtgtgta 1500  
P V E V N L T H F Q H R G R S Y N M C V  
115  
gtcagagatatcaggaacgtagacatattgaacagttggcttacgcgcgagaacaggaa 1560  
V R D I R E R R H I E Q L A Y A R E Q E  
135  
tttcgctgctggttgagaacacgcccgttggattatccgcttcgatgccaacctgaat 1620  
F R A L V E N T P D L I I R F D A N L N  
155  
tgctgtacccaaccccgagctctgaacatctggattcaccatagagcaactcgg 1680  
C L Y A N P A S L K H L D F T I E Q L R

175  
ggtcgcgatgattacggaactgatgcccggtgtgggctgtcgcgatccgcgatggaacagctg 1740  
G R M I T E L M P G V G C A I R M E Q L  
195  
gtcggcgtggtgtcgcgatcccgagcagtgcggaaggcgaagtcgatggaagaactgggg 1800  
V R L V V D T R S S A E G E V M E E L G  
215  
aaagtgagcaacggcatcacatattcacatattcgtcgtgcccagttcgatcag 1860  
K G E Q R H H H I H H I R C V P E F D Q  
235  
cacggcgcgctggtgtccattctgaccgtcggacggacattacggcgattcgcgatgcg 1920  
H G A L V S I L T V G R D I T A I R Y A  
255  
gagaagaaactggccgattcgacatgcaactacgtttattggcgcgccagcgtgagatt 1980  
E K K L A D S H M Q L R L L A R Q R E I  
275  
tcacggaagaagagcgttaagcatatcgcctcaggaaattcacgatgagctggggcagcac 2040  
S R E E E R K H I A Q E I H D E L G Q H  
295  
ctgaccacgatccgcgatgagcctgtcgtcctatgctatgtgttttccaaggaaaacca 2100  
L T T I R M S L S L M R M C F A K E N P  
315  
gagatgcaggcacatttgcaaaagttgatgcagctggcggaccaaacgatccagtggtg 2160  
E M Q A H L Q K L M Q L A D Q T I Q V V  
335  
cgcaacgtttcgaccggctcaggccgaatgtactgaatatggggctgacgcctgcactg 2220  
R N V S T R L R P N V L N M G L T P A L  
355  
gaatggctgtgcgacgaatttaaccggcattacagcgaacctgtctgctgcaacgttg 2280  
E W L C D E F N R H Y S A T C L L R T L  
375  
ggagaaccgctggcgcttaatgacgaaagcaccacggcgctccgcgtcgcgcaggag 2340  
G E P L A L N D E S T T A A F R V A Q E  
395  
tcgttgactaacgtggcgcgctacgccgctgccacacaggtaatcattacgctggataat 2400  
S L T N V A R Y A A A T Q V I I T L D N  
415  
cagccggactgcgtggtgtgtgcaccaaggacaacggcaaggttttgattctcgcgct 2460  
Q P D C V V L C T K D N G K G F D S R A  
435

aaaaataaaaatgcctttggactcatgagcatgaaagagcgtggacggatgctgggaggt 2520  
K N K N A F G L M S M K E R G R M L G G  
455  
gaagtggttattgaagcgcgccccggcaaaggcacgttggtgcagctaacgtttcctaaa 2580  
E V V I E S A P G K G T L V Q L T F P K  
475  
R.B hrpY  
aatggctatacccgctaaCCGCGGGATAAGAATAACAAAAGGAAGAGATGAGCGatgtgc  
2640  
N G Y T R -  
481  
M C  
2  
aatccaatacgtttaatgatcgcagacgatcacgtcatcatcgggaaggactcaagcag 2300  
N P I R L M I A D D H V I M R E G L K Q  
22  
atcttgcgctggatgactcgttgagcgtcgtcgccaagcggaaatggcgcacaggtg 2360  
I F A L D D S L S V V A E A G N G A Q V  
42  
ctggcgcagctgcgcagcgtgacgcccgattactgctgctggatgctgatgcccgggt 2420  
L A Q L R S V T P D L L L L D M S M P G  
62  
atcagcggtgaaagcgtgattcacgcgtggtggcgaatatccgcgtctgccgattctg 2480  
I S G E A L I S R V V A Q Y P R L P I L  
82  
gtgctcagcatgtacagcgaagcgaattgcgcagcatgcgctgaagagtgggccaga 2540  
V L S M Y S E A Q I A Q H A L K S G A R  
102  
ggttacatcaccaagataaagaccggaagcgtgctagcagcgtccgacgctggca 2600  
G Y I T K D K D P E A L L A A I R R V A  
122  
cagggcgtcgtctatcgaccacagcattgccgagcaactgggttttccaactacgcg 2660  
Q G A R Y I D H T I A E Q L V F S N Y A  
142  
gagggcggcagagccaagcatgatgtgctgacggccagagcaccaaatcatgattatg 2720  
E G G R A K H D V L T A R E H Q I M I M  
162  
tttgcgcaggggatgggcatcaacgccatgccaatgagttggccatcagcaacaaaacg 2780  
F A Q G M G I N A I A N E L A I S N K T  
182

gtcagcaccacaagcagctctgatggagaaaatgcagttcagttaccaatgtggaatt 2840  
 V S T H K A R L M E K M Q F S T N V E I  
 202  
 gtgaagtatgtcgttagcaagaagctgattccctagCGGTGGGAATACGCTGTGCGAAA  
 2900  
 V K Y V V S K K L I P -  
 214  
 AATAACAGATAAAAAGGGATTCAACAGTCGGTGAATCCCTTTTGCTGAAGCTTACGCTTT  
 C 2960  
 CTTACGACATCTTTTCGCTTTCCTGCTAATTGTTTAGGAAGGTAACGGACTGTTTTGCT  
 3020  
 TATGTTGGCCGTTTTTTGTAGGTATTTCCCTACAAATTCCTCTGGAATTCCTACCTGATG  
 3080  
 TTCAGCGATGCCTGATGGTTTCATTATTCAATGGCGGTAATGCTTATCATCGTTCTACTG  
 3140  
 GAGATGCATTGGCCTGCGTTATGCGGAGAAACGCGACAGATGCACGGTAGGGCACCACGT  
 3200  
 R.B hrpS  
 TATGGAAGGCAGTCAGTTAGCCCGTCTGGGCTTCAGGAGTAGTTAatgagtattattac  
 3260  
 M S Y Y Y 5  
 cgtcaggacagacagcacgcttcttcattagcgcattcgttatcagagcattcaccatta 3320  
 R Q D R Q H A S S L A H S L S E H S P L  
 25  
 gcgccttcattagaaaaaccctcattagaaaaagctcggatcagtagactatttc 3380  
 A P S S L E K P S L E K A R S S V D Y F  
 45  
 ccgcatcgtcgggacattccacacacacagcagaggatattcattcatcgtctcgccc 3440  
 P P S S G H S T H T A E D I H S S L S P  
 65  
 atcatcaatgttattgcgcctctcaatgtcgcacatcgtcgtggagagtgaaccggtacg 3500  
 I I N V I A P L N V D I V L E S E T G T  
 85  
 ggcaaaagacagcgtggcagatcgcacatcaactttctcgtatgcagcgcccgtggtg 3560  
 G K D T L A D R I H Q L S R C S G P L V  
 105  
 gcggtgaaactgcgcccgctgcccgaaaatctggccgaaagcagctgttggcgtggtc 3620  
 A V N C A A V P E N L A E S E L F G V V  
 125  
 tcagggcttataccggcgcaaaccttcccgcggctatctgaaagtgcagataag 3680

S G A Y T G A N R S R A G Y L E S A D K  
 145  
 gggattctgtttctggatgagatcgacagcatgccatgacgctgcaagccaagatgctg 3740  
 G I L F L D E I D S M P M T L Q A K M L  
 165  
 cgcgtgctggaagccgtggcgtaaagcggctgggaagcaccagttcacgccgtggat 3800  
 R V L E S R G V K R L G S T Q F T P V D  
 185  
 atgcgctgatttggcgacgcaaacgccgctgctgcaactggggaaaaaggactgttt 3860  
 M R V I V A T Q T P L L Q L V E K G L F  
 205  
 cgcgcgatctctattccgtctggatacggtaaagattcaactgccgacgctgcttcc 3920  
 R R D L Y F R L D T V K I Q L P T L R S  
 225  
 cgcagcgtatttctgcccgtgttcagcgttttagtcaggaagcggcagtagcctg 3980  
 R S D L I L P L F Q R F S Q E A A V R L  
 245  
 aaaatgacgctgccccgatgacggcagacattgacgaacagttgctgaccacagctgg 4040  
 K M T L P P M T A D I D E Q L L T H S W  
 265  
 ccgggcaatatccgcgagttgaaagcggcgcgatcgtggcgctggggctgtcgct 4100  
 P G N I R E L K A A A D R W A L G L S P  
 285  
 ttggctgaaattcagccgctgctgcacccacgtcctttgcaactgaaagaccgttaaag 4160  
 L A E I Q P L L H P R P L Q L K D R L K  
 305  
 cggattgaaaagtctctgattcaggatcgctgcccggccagcaccactgcattgacgat 4220  
 R I E K F L I Q D A L R R H D H C I D D  
 325  
 gtgattgtggagctggggatcccaagcggacactttatcaccgctgaaagtgtgaac 4280  
 V I V E L G I P K R T L Y H R L K V L N  
 345  
 gtgacggcgcgagaaatgtgtcagggggcggggaagcctgtcaggcatgaGGGCTGAAG  
 4340  
 V T A R E M C A G G G E A C Q A -  
 362  
 ATGGCAGGCTGTTTTGGGGAGAGGCCTGCCTTCAGGTTACACCGTTTCTCTCTACACCG  
 4400  
 TTTCTATCGGCGGACACAGATAGTGACGGATGTCCGGTAAATCGTGCAATGCTACCGCT  
 4460

TACTGAAATACCATCCTTGCATAATCGCCGACGGGCACTGTTGCAGGATGTAGGCGGCTT  
4520  
GCTCGCGCGTTTTCCACCCCTTCGATGATCACCGGGACGTCGAGTTTTTTGATCAGGGTAA  
4580  
ATAGCAGATCGGCCATGGCGGCATTAACCGTGTCTGTGCCGATGGCGTCGACAAAAATCT  
4640  
TGTCGATCTTGATCATATCGAACGGTAAGTGGCTCAGATAATCGAGGTTGGAATAGCCCG  
4700  
TGCCGAAATCATCAAGCGCGACCTTATAGCCCGAATGTCGTAAGGCCTCAAGGCCGTCTG  
4760  
CCAGCGTCTTATGGGATGTACTCGACCGCTCGGTGAGTTCCAACATAATACGTGTTCTGT  
4820  
CTATCCCAGTTCGTCACACATTTGCTGTAGAAAAGTGATGATAATCGGGCGAAACAATGT  
4880  
CGGAGACGGACAGGTTAATGCTGAGAAGAAACGGCGTTTTCTGCGTGAGGTACGGCTGCA  
4940  
TGTCACGCAGTGCTGACCGTAATGATGCGGGTTAGTTTATCTGAGTAGCCCATTTTTTT  
5000  
CAGCTGCACTGATAAAAAACTCTGGCGAAACGTTGTCGCCACGCTCGTTTTTTTCCAACGC  
5060  
GCCAACGCCTCGACGCCAATGATGGCGCGCTGTGGCAGGCTGATTAGCGGCTGATAATGT  
5120  
ACCTGAAATTGCTGATGTTTGATTGCGCGTTTTAGCTGTGATGGCAAAGCATGGTGTGCG  
A 5180  
TCGTCATAGAGCTGGTAGGACAGAGTAAAACCTGACACCGATGAGCGCACCGACCAAAGAA  
5240  
CAGGGAGGCAATGACATACCACGGTTGGTATAAAAACCTCCGGCGGAATCCAACCTGCGCCAG  
5300  
CACGCAGATATCCGGTTTGGCGCGCAGAAAAACGTCTGACGTTTTCCCATGCTTAGCCA  
5360  
CGCGTTATGCTGGTTGCTGTGTCTGTTTGAATGCCGGGAGATCGATGTTACCAAAGGTCT  
5420  
GATAGACATGATCCAGATTACGCGTGAGCAGCATCGCGCTATGTTTCGGCTGGCGGCTGAA  
5480  
CGAAACGGCGAAATGCCGGCGCGCGGTGATGGTGACCACACCGTTGAGGCTCGCGATAT  
5540  
CTGCGGTATGCGTGGATCAACCACATCTTTCATTGCAGTCCACAGCTGTACGCCCTCGGG  
5600  
CGTCGTTAGGTTTCGGCGGCAGCAGATAAATCGGTGGGTTGAGAATGCCCCAGCCTGCGGA  
5660



ACAGATGAGATAGTTGTCCTTAATACGCCGATATCGCGTAGATAAACGGAATAAAAGG  
 A 5720  
 GATCAGGCGTAATTCTTTTCAGGTCCGCGCTGGAGCAAGGGGCGTTATTCAGCATCAGCAC  
 5780  
 CCGATCGATGGTTTCCCGACCTTCATTCGCGACAGCGATTCCCTGATTGAGCACTTCCTG  
 5840  
 ACTATAGTGTGTCAGCTGTGTTTGTTCAGCCTGGCTAAAATTCCCTGGCCAATAAATAG  
 5900  
 AGCCAGCAATGCACTGGCAAACGAAATCAAACAAGTCTGAACCACAATCCGGTGTGGT  
 5960  
 AGTTAAGGTGAGCATAGCGACCATTTGGCAGCGTGACGAGAATAGTACGGCATGGGTTCA  
 6020  
 AATATCGCATCCTTGCCAGTTGCACAGCATAAAAACGTTCCCTGCAAATCAGAAAACAACGT  
 6080  
 ACGAACTTTTGGTAGGTAATAACGTTTATTATTTTAAAAGAAATCTATGATAACT  
 AA 6140  
 CGGCCGAAACACAGATAAAACTAGGCTAGTTCTTCCTCTCGAATGGCATTACAGAAAGA  
 6200  
 hrpL dependent promoter  
 ATTTCTTTCCGTTGGAACTCACTGACCCGCTCTCTCACTTAATGAATGAACAAGATGAC  
 6260

R.B

TGTATGTACAGCATGACAGTTCCTACCGTAAACATTCATCATATTTGGAGATATATC  
 6318

hrpA

atggcttaggacttctcaggttgcactcaggcggttctcagactctggataccgcg 6378

M A L G L S Q V A S Q A A S Q T L D T A  
 20

atggccggttctctgacgctgctgcggcgctcaggcacagaaaattgcgctggatacg 6438

M A G S L T R A A G A Q A Q K I A L D T  
 40

gaaaactccattctggatggatcagatggattccgcatcctcaactgaactccggcgag 6498

E N S I L D G Q M D S A S K S L N S G Q  
 60

hrpB

aaagcgcgaaagccatccagttctgaTCGTGatgcaacgagccggagccttgetccggett 6560

K A A K A I Q F -  
 69

M Q R A G A L L R L

10



R Y I Y A L S Q E V E A T L A Q I D G V  
123  
ctggtagcgcgggtgcatgttggtactgccgaactatgccccggcgagccccgttcag 7400  
L V A R V H V V L P E R I A P G E P V Q  
143  
ccagcctcggcggtgtttatcaaataccgtgccgaactggagcctgatgggatggag 7460  
P A S A A V F I K Y R A E L E P D G M E  
163  
caacgcatccgtctatggtgccagcagcatccccgcctgtctggaagatgataaa 7520  
Q R I R R M V A S S I P G L S G K D D K  
183  
gagctggcgatgctttgtccggcagaaccgtatcaggacacgatccccGtggtcacg 7580  
E L A I V F V P A E P Y Q D T I P V V T  
203  
ctggggccgtttacgctcacgccggaatgaGATGCCGGCGCTGGCAGTGGAGTGCGGGGC  
7640  
L G P F T L T P E -  
213  
TGTTCCGGTCTGCTACTGGCCGGGCTATAAAGGCTGGCGTGTTGGCATGCCTTACCTGCGGC  
7700  
hrpD  
AGTGGCAGCAGAAAAAAGCGGGGGCGGCGTCTGTCACCatgaccacacaagcgcaaaaacag  
7761  
M T T Q A Q K Q 8  
ggggcgcaatcgggtgacatcacaccgcttgctggctgacctggtggcgagaggattgc 7821  
G G E S G D I T P L A W L T W W A E D C  
28  
ctgttacaggccgatcccagttggtggaacgggaaggtgaggttgctgattcggcgag 7881  
L L Q A D P S W W N G K V R L P D S P Q  
48  
cgtcgcgactggctgcatgtaaaccggagcagcttcacgccattttctctgcccgtca 7941  
R R D W L H V N A E Q L H R H F S L P S  
68  
gcgctcccggatccgctgtctcactgatgcaaataggagcttgatagggcgag 8001  
A L P P D P L V S L M Q I G T L D T A Q  
88  
cgggaaacggtactgcgctgatggcggggtgtcagcccgtgctaatccagatcgc 8061  
R E T V L R L M A R V C Q P V R N P D R  
108  
tcggacgcggaggcatatggtgcaacggctggcaaggcgtgcgccgggcttatgg 8121

S D A E G I W C E R L A K A L R P G L W  
 128  
 ctaccgtcagcggctacttttctgccttatcgtcgacatcaccgccacgagacatcag 8181  
 L P S A V T F S A L S S T S P A T R H Q  
 148  
 gatgcgctgacgctgctgcgcattcgtatgggaaacatgctggccgctctgcggctg 8241  
 D A L T L L R I R Y G E T C W P R L R L  
 168  
 cttttcctcgcgattggcccggtagcggggaacatcctgcgatacccccagcatgtca 8301  
 L F P R D W P G D G E H P C D T P T M S  
 188  
 ttccccccgcccggctgaatgcgctgtgcgatgccctgatttggaaagcatcgaccccc 8361  
 L P A A R L N A L C D A L I W K A S T P  
 208  
 hrpE  
 acataaCCTTCCTCATTTCTATTTCATTTTGCTAAGGACGACGTAatgctgacaacgaag  
 8420  
 T - 210  
 M L T T K  
 5  
 acgtttgcgacattaccggcgcgagtcgggatgaaacgggtattattccggcggagcgc 8480  
 T F A T L P G A S R D E T V I I P A E R  
 25  
 gtcgcccgcgcatcgtcgcagtcggacactctgggaagaggccaatgcgcagccgagacg 8540  
 V A A H R R S R T L W E E A N A Q A E T  
 45  
 atgtggctcaggcgcacgaccgtgccgaacgctctgtgagcaggcggtagaacacgca 8600  
 I V A Q A H D R A R T L C E Q A V E H A  
 65  
 gagggcgagtctcggctgcaggcaaacgcctattacagggtgttcgacaagaccgaatg 8660  
 E A E F W L Q A N A L L Q G V R Q D R M  
 85  
 gatctgaaaagatcatgattacgcaagccggacagctgctgcgcgatgcgctggcgcac 8720  
 D L E K I M I T Q A G Q L L R D A L A H  
 105  
 ttgctggataaaacgcctgcaccgtcacgccatcacgctttattacgacaactgctgaag 8780  
 L L D K T P A P S R H H A L L R Q L L K  
 125  
 caacagcaggagagagccggggaacgctgtactgtcatcccggcagcttgccgatgtg 8840  
 Q Q Q G E S R G T L Y C H P A Q L A D V

145  
cagcactggctggatgctcatgcgcatctggagtggcgtctcgccagcgatgaagcgctg 8900  
Q H W L D A H A H L E W R L A S D E A L

165  
gatagtgatgctatgaagctgattacggcgcatggcgtgatgctgctgagctggcgcgag 8960  
D S D A M K L I T A H G V M S L S W R Q

185  
cgcagcggcgagctcattcctcctgagatcccgcgcatgtgaAATCACTGCCTGCTA  
9020  
A T A Q L I P P E Y P A A M -

200  
hrpL dependent promoter  
ATGGGAAACTGCACGCCGGGGTTAACCACTCACTATTGAGTCAATGACGAGAACGTTTAGG  
9080  
TAACGGCCAAAACGTCAGGTCAACGACCCAAACCGTGTGTGAGGAAATTACCCTATGAG  
9140

R.B hrpF  
GAGAGCGTGCTatgtcccttaacccattcagcgtcgctgacgcgcacctggctgat  
9139  
M S L N P I Q R R L D A H L V D

16  
tcgcagcaacagctggatgatattgcgttgaatgtgccgaaggcggagccagtcaggca 9199  
S Q Q Q L D D I A L N V A E G G A S Q A

36  
gacagttatgcctttttgaagctagcatgattatccaacgccagctggcggtcggg 9259  
D S Y A F F E A S M D Y S N A S W A V G

56  
caactgttgagcgtgaaacacggccttgcaaaaggccatcatcaatgacttcaactgaGTT 9319  
Q L L S V K H G L A K A I I N D F N -

75  
hrpG  
GGCCGCGatgctggagcgttggtctaaacggcgggacgccgacgctaaagttgacattgac  
9380  
M L E R W L N G G T P T L K L D I D

18  
ggtggcgcgggtgacgatggtgacagctcttcgggctggcgtgacgcgcggccattccg 9440  
G G A V T M V R Q S S G V A C S A A I P

38  
ctgcgcgccacaccgatgagccgatgctggcgcgcattacagctggctgacgccgcc 9500  
L R A T P D E P M L A R A L Q L A D A A

58  
cagcccgatcttcaggatgacaccgccatactgtcgctttccccacaggatgaacagttc 9560  
H A Q F Q D D T A I L S L S P Q D E Q F

78  
tggctctggatgcgcccgatgccgatgacgtcatgcagctgtgccgagcctggaaacc 9620  
W L W M R P D A D D V M Q L C R S L E T

98  
ttacttaatcaacgggatgtctggctgagcctgctcaccccgctgcaagcaccgctt 9680  
L L N Q R D V W L S L L T P R A K A P V

118  
R.B hrcC

tccgcgacctgaatctgaacacgctcgctttttgcaaggagaacgacatgcgtaaggga 9741  
S A P L N L N T L A F L Q G E R H A -

137  
M R K G 4

ttgatactcatcgatcgatagcacgttgctggcggtctatcgctgtttgctgggcg 9801  
L I R H R S Y S T L L A V Y R W F C W A

24  
atggtgctgatggggattatccagtgaaacgggatcatttcgctggcgacgcccacg 9861  
M V L M G I I P V N G I I S L A H A A T

44  
ccaccgactggaataaggcgctatgcctattctgccgagcaaacgacctgtctgcg 9921  
P P D W N K G A Y A Y S A E Q T P L S A

64  
atttgacggattttccaacagccacgggtggatttggtactgggtaatattgaggac 9981  
I L T D F A N S H G V D L V L G N I A D

84  
aatgaggttacggcgaaaattcgggcagataaccccacgctgtttctcgacaggctggcg 10041  
N E V T A K I R A D N P T L F L D R L A

104  
ctggagcatcgcttcagtggttcgtgtataacaatgcgctctatgtcagcccagcat 10101  
L E H R F Q W F V Y N N A L Y V S P Q D

124  
gaacaggcgtcggtgctgctggaattttcccgacccgcccgatcaaacaggcg 10161  
E Q A S V R L E I S P D A A P D I K Q A

144  
ctcagcggtatcgggctgctcgatgcacgcttcggctgggggaattgccggaagaggcg 10221  
L S G I G L L D A R F G W G E L P E E G

164  
gtggtgctggtcaccggtccgagcatatcatgatctgatccgtaatttcagccagcag 10281

V V L V T G P Q A Y I D L I R N F S Q Q  
184

cgggaaaagcaggacgaacggcgcaaggtcatgattttccgttgcgctatgcctcgta 10341  
R E K Q D E R R K V M I F P L R Y A S V  
204

tctgaccgtacgctgcaatcgcgatcagaaggtcacgattcccggcgctcgcgaccatt 10401  
S D R T L Q Y R D Q K V T I P G V A T I  
224

ctcaatgagttgatggatgggtcagcgttcggcaccggcgggcgcatccggcccgatgcc 10461  
L N E L M D G Q R S A P A G A S G P M P  
244

gtgcagccggataacggcatggaagcgatgcgggacagtacgcgttcgctgatgaccgg 10521  
V Q P D N G M E A M R D S T R S L M T R  
264

ctggcaacgctaacaaccaggtcgaacggtaggcacagcccgctgacgctgagt 10581  
L A T R N N P G R N G E A S G R V T L S  
284

ggcaagattccgccgatgtgcgtaataacgcgctgctgattcgggatgatgaaaaacgc 10641  
G K I S A D V R N N A L L I R D D E K R  
304

cgggcccggatcagcagctcgtcgcgatcaccgcaaaatctggtaacatt 10701  
R A E Y Q Q L V E H I D V P Q N L V N I  
324

gatgccattattctggatgtggaccgaaccgccatgtcgcggtggaagcgaactggcag 10761  
D A I I L D V D R T A M S R L E A N W Q  
344

gcacagctcggcaatgtgagcggggcagcacgatgatgatggggcggagtaccctgttt 10821  
A Q L G N V S A G S T M M M G R S T L F  
364

gtcagcgatttcaaacgcttcttcgccgatattcaggcgtggaaggagaaggaacagcc 10881  
V S D F K R F F A D I Q A L E G E G T A  
424

tccatcgttgcgaatccttcgctgacgctggaatacagcccgcgattgtcgatttc 10941  
S I V A N P S V L T L E N Q P A I V D F  
444

agccggcagggcattatcacggcaacggcgagcgcgtcgcggacattcagcctgtaacg 11001  
S R T A F I T A T G E R V A D I Q P V T  
464

gcgggaaccagcctgcaagtgacccgcgtgtgatcggtgaaggcacgcagcgcagcatc 11061  
A G T S L Q V T P R V I G E G T Q R S I

484  
caactggttatcgcacatcgaagacgggtcaggtggagacggggcgtgaaggtgaggcctcc 11121  
Q L V I D I E D G Q V E T G R E G E A S  
504  
ggtgtgaaacgcggcaccgtcagcacgcagggcgtgattggtgaaaaccgcgcgtggtg 11181  
G V K R G T V S T Q A L I G E N R A L V  
524  
ttggcggttttcatgttgaagaaagcgggtgaccgcatcgtcgattccgatcctcgga 11241  
L G G F H V E E S G D R D R R I P I L G  
544  
gatatcccgtgctgggacaactgtttacctgacgcgtcatgaagtctcgccgtgag 11301  
D I P L L G Q L F T S T R H E V S R R E  
564  
cgcctgtttatctgacccgcatctggtcggcatcaaacgatccacacgctatgtt 11361  
R L F I L T P H L V G D Q T D P T R Y V  
584  
tctccgccaatcgtcagcagttgaacgggtcgtatgaaccgctcgcgcagcgaacggt 11421  
S S A N R Q Q L N G A M N R V A Q R N G  
604  
aaaacggatctctatagcctgattgaaggcgcgtttcgcgatctgccagccgagctt 11481  
K T D L Y S L I E G A F R D L A S R Q L  
624  
cccgccgggtttcagcccacagcaaaggtgcgcgattgggagaggtgtgccgctcgcag 11541  
P A G F Q A D S K G A R L G E V C R S Q  
644  
tcggcctgatctacacagttcgcgtatcagtggtacggcaacggacaggtgcgcctg 11601  
S G L I Y D S S R Y Q W Y G N G Q V R L  
664  
agcgtcggcgtcgtgcgtaacggcggcacacagccgcagcgttttgatgaagccgctgt 11661  
S V G V V R N G G T Q P Q R F D E A A C  
684  
gccagtagccgcaggttagcgggtggccgtgtggccgaaaacgacgctggcaccgggggag 11721  
A S S R T L A V A V W P K T T L A P G E  
704  
tccagcgaggtgttcttgcgttcagcccgcgtaactccaaccagcccgcgtaac 11781  
S S E V F L A L Q P A L T S Q P A R R N  
724  
R.B hrpT  
ctgctgacatctcagtagCGATCTCAATTTAAAACAGGAAATTGTCatgaatcataaagca  
11841



L L T S Q -

730

M N H K A

5

ctatccgtcgcgctgatcgcactcctgctgagcgcctgcactgccccgcggcaggtgcc 11901

L S V A L I A L L L S A C T A P R Q V A

25

aagtgcgcctcggtagcctgtcgtccgcagccggaacgcggcaattaatcatctggtgg 11961

K C A S V T C R P Q P E T R Q L I I W W

45

hrpV

cagccccgatttgcgtagcgggtccgcggtattacagcagggcagcgtggatgagtgagcca 12022

Q P D L R S G P A D Y S R V S V D E -

64

M S E P

4

gcggcagttatcgacaatcagcatgactttctcggcactggaaacgcgctgcccgcct 12082

A A V F D N Q H D F L A A L E T A L A A

24

tgttgacggtacagccggcgtcacgctgtggtttacggccggtcggcgcggcagggcg 12142

C W T V Q P G V T L W F T A V S A R Q A

44

acactcaccttaacgctggctcccgcgcgacattaccccggaatgctcggcaaatTTTA 12202

T L T L T L A P A R H Y P G M L R Q I L

64

caacgccgctttctggaggctgacgcgctgtttgccattagcctgagcctggatgaacag 12262

Q R R F L E A D A L F A I S L S L D E Q

84

caacatctcggttatgtcgcgcttatccacattgactgactcggttcggcaatcgat 12322

Q H L R L C R A L S T L T D S V A A I D

104

gaactgtggcgtttggccggtctgccgccgctgaACCGTGAAAAAGTCATGCGTTTTTC

12382

E L W R L A G L P P R -

116

hrpL dependent promoter

GTGCATAAGACGGGAACTGAGTACGCAAGGAAATCACTTAATGGGGGAGTGTCACAATC

A

12442

R.B

CGCGGGCTGACCGCACATCATTGGCGCTTTTCATAACCCATTTATTCATTGAGGAAACATT

12502

hrpN

atgcttaattctcttggtagcgagcttctctgcaaatcacgatcaaagcgggtggtaac 12562  
M L N S L G G G A S L Q I T I K A G G N  
20  
ggcagtttattccctctcagtttcacaaaatggcggatcgccatcgagtcggcgttt 12622  
G S L F P S Q S S Q N G G S P S Q S A F  
40  
ggtggccagcgtagcaacatcgagaacggctgtccgatatcatgacaacctgatgttc 12682  
G G Q R S N I A E R L S D I M T T M M F  
60  
atggcagcattatggcgcggcatggcggtagggctcggtaggtagcagctggtggcg 12742  
M A A L W R G M A V G S V V R Q Q S G G  
120  
ctcggcggcggttctgctgggtggcctggggggcggtctcggtagtagccttggcagc 12802  
L G G G L L G G G L G G G L G S S L G S  
140  
gggctggcagtcgctcgggtggattaggcggggcgctgggtgctggcatgaatgcc 12862  
G L G S A L G G G L G G A L G A G M N A  
160  
atgaatccatcgccatgatggggagcttctgttttagcgcgctggaagatctgctgggc 12922  
M N P S A M M G S L L F S A L E D L L G  
180  
ggcggcatgtcgcagcagcagggtgggcttttcggcaacaacagccgtcgtcgccggaa 12982  
G G M S Q Q Q G G L F G N K Q P S S P E  
200  
atctctgctatacccaaggtgtaacgatgcgctgtccgctattctggcaacggcctg 13042  
I S A Y T Q G V N D A L S A I L G N G L  
220  
agccagacgaaaggcaaacgccaccgctgcaactgggcaataacggctgcaaggcctg 13102  
S Q T K G Q T P P L Q L G N N G L Q G L  
240  
agcggtagcgggtcgttcaatcaactgggtagcacgctgggatgagcgttgggcaaaaa 13162  
S G A G A F N Q L G S T L G M S V G Q K  
260  
gccggttgcaggaactgaacaacatcagcacgcacaacgaccccgagcgttacttc 13222  
A G L Q E L N N I S T H N D S P T R Y F  
280  
gtcgataaagaagaccggcgatggcgaaagaaatggtcagttatggatcaatctct 13282  
V D K E D R A M A K E I G Q F M D Q Y P

300  
gaggtcttcggtaaaccggaataaccagaaaagataactggcagacggcgaagcaggatgac 13342  
E V F G K P E Y Q K D N W Q T A K Q D D

320  
aaatcctggcgaaagcgtgagcaagccggatgatgacggcatgaccaaaggcagcatg 13402  
K S W A K A L S K P D D D G M T K G S M

340  
gataaattcatgaaggcggctcggcatgatcaagagcgggtggcgggtgacaccggcaat 13462  
D K F M K A V G M I K S A V A G D T G N

360  
actaacctgcagctcggcgaatggcggttcgtctctggcattgatcgcgcatgatt 13522  
T N L H A R G N G G S S L G I D A A M I

380  
ggtgaccgtatcgtaaatatggggctgcaaaagctctccagctaaAGCGAAGAAACGACA  
13582  
G D R I V N M G L Q K L S S -

395  
GGGAGCAGGGCGGAAGCACTGCTCTTGTATGAGTTTTAATGTGATTATTTCAATTC  
A 13442  
AATCAATTGGTTTACTCGGTTTTAGTCCTTTTTTTGCGCTATTAGCACTATGAACATCT  
T 13502  
GTTATCCTTTACGCGTATTTTCTTAAAAGGAATAGCGTCAAGGATGTCACATGGAACG  
13560

R.B      hrpJ

CTGCACGTTACACCACGACACGTAGCCGATTTATTCAGGATGACATCATGATCAAAATG  
14220

M I K M

4  
CCGACTGTCTTCCCTCCAGCAGCGCCCTGCCGCGCCAGTCGTCGTGGATGACGATCCC  
14280  
P T V L P S S S A L P R P V V V D D D P

24  
GTGCCACAGGTCGCGGTGCAGCAGACAAGTTCTCACCATGCTTCCCCCGGTTCCGCCGTTA  
14340  
V P Q V A V Q Q T S S H H A S P G S P L

44  
TCCACCTCGATGGAGGAAGTGGCGATGGCATTGGCGAGCAAGCTGAGCGAAGAAGCAAA  
14400  
S T S M E E V A M A F G E Q A E R R S K

64

TCGCTGAATCGGCGCCACATCGCCCAGCAGCCGGACGCACGCGCGACCGCCAATGTCGAG  
14460  
S L N R R H I A Q Q P D A R A T A N V E  
84  
CGGATTGAGAAACTGACCGAACTGTTTCAGGATGCTGGAAAATCCGTGCGCAAAGTACGCTC  
14520  
R I E K L T E L F R M L E N P S Q S T L  
104  
GATCAGCAGCTGAGCCGCTGCGCGATCTGCTGATGCAGCAAGGTTGCGCGTCGCTTGAA  
14580  
D Q Q L S R L R D L L M Q Q G S P S L E  
124  
GCGGTGCTGGAAGCCGCGAGGCAACGATCCGGCGCGTGGGGATATTCTGCTACGCCACATC  
14640  
A V L E A A G N D P A R G D I L L R H I  
144  
CAGCAGCAGTTTCCCAACAGCCCGAAGTACGCGCGCGCAGAAAAGTGCCTACAAAAG  
14700  
Q Q Q F P Q Q P E L T A A A E S A L Q K  
164  
TTGCATCAGGAGAAAGGGCCGGAAGTCCGAGCCGGTTTGAATACGGCAACGGCCATTGCG  
14760  
L H Q E K G P E V R A G L N T A T A I A  
184  
CTGTTTCAGCACTCAGCCGGAACAAAAACAGGCGATGCGCGAGCTGTACTACCAAAAAATC  
14820  
L F S T Q P E Q K Q A M R E L Y Y Q K I  
204  
GTACATCAGCAGTCGGCCAGCGCGCTGCTGGATTCCCTGCTGGAACGCTTTGACGCCGCG  
14880  
V H Q Q S A S A L L D S L L E R F D A A  
224  
ACCTTTTCCATTGGGCTGCGCACGTTGCAGCGGGCGCTGGCGGCGGATATTGCCTCGCTG  
14940  
T F S I G L R T L Q R A L A A D I A S L  
244  
ACGCCGTCGATTTCGAAAAGCCGTACTCAGCAAAAATGCTGAGCAACCTCAACGATTCCCGC  
15000  
T P S I S K A V L S K M L S N L N D S R  
264

CACCTGAGCCATACGCTGTCATCCAGCCAGACGCTGCTCACTCGGCTAGCGAACAAAGTG

15060

H L S H T L S S S Q T L L T R L A N K V

284

CCCGCCTTTACGCTCGGTGCCGTGGAGTTAACCCGCCGCTGATTGGCCTGAGCGCCAAC

15120

P A F T L G A V E L T R R L I G L S A N

304

GGTGCTATGCCCGGACCTGCATAATCTCGGGCGGGAAGTGCCGGTACGCAGGTGCAA

15180

G A Y A R D L H N L G R E V A G T Q V Q

324

CATCAGGCGATGTTTTTCAGCGCCCTGCTGCCGCTCGTCAGCGACCTGCCGCATCCGCTG

15240

H Q A M F F S A L L P L V S D L P H P L

344

TGGCGAGATAGTAAAAACCGGCAAACGGCGATCCAACCTGATACGCGGCATGATTGGCGAT

15300

W R D S K N R Q T A I Q L I R G M I G D

364

ATCGCTCAATATGAAAAACAGCAGGCCAAAAGCACTCAACATGATGAACTGACGCAACGT

15360

I A Q Y E K Q Q A K S T Q H D E L T Q R

384

R.B

hrcV

GATACCGCATCGCGCAAATCAGGATGCTCGCGACTCGGATAAGGAGCAGCCATGAAT

15419

D T A S R Q N Q D A R D S D K E Q P -

403

M N

2

CTGTTGATTATCTGGCTGAACCGCATTGCGCTGAGCGGATGCAGCGCTCGGAGGTCGTT

15479

L L I I W L N R I A L S A M Q R S E V V

22

GGCGGGTCATCGTGATGTCCATCGTCTTCATGATGATCATCCCCTGCCAACCGGACTG

15539

G A V I V M S I V F M M I I P L P T G L

42

ATCGATGTGCTGATCGCGCTCAATATCTGCGTCTCTCCCTGCTGATCGTGCTGGCAATG

15599

I D V L I A L N I C V S S L L I V L A M 62  
 TATCTGCCCAAGCCGCTGGCTTTCTCGACGTTTCCGGCCGTGCTGCTGCTGACCACCATG  
 15659  
 Y L P K P L A F S T F P A V L L L T T M  
 82  
 TTCCGGCTGGCGATCTCCATTTCCACCACGCGCCAAATTCTGCTTCAGCAGGACGGCGGC  
 15719  
 F R L A I S I S T T R Q I L L Q Q D G G  
 102  
 CATATCGTCGAAGCCTTCGGTAACTACGTGGTGGGCGGGAATCTGGCGGTCTGGTGTG  
 15779  
 H I V E A F G N Y V V G G N L A V G L V  
 122  
 ATTTTCCTGATTCTGACGGTGGTGAACCTTTCTGGTGATCACCAAAGGCTCCGAGCGCGTG  
 15839  
 I F L I L T V V N F L V I T K G S E R V  
 142  
 GCCGAAGTAGCGGCGCGCTTACGCTTGATGCGATGCCCGGTAAACAGATGTCCATCGAC  
 15899  
 A E V A A R F T L D A M P G K Q M S I D  
 162  
 AGCGATCTGCGTGCCGGATTAATCGAAGCCCATCACGCACGGCAGCGGGCGGAAAATCTG  
 15959  
 S D L R A G L I E A H H A R Q R R E N L  
 182  
 GCAAAAGAAAGCCAGCTATTCGGGGCGATGGACGGCGGATGAAGTTCGTAAAGGCGAT  
 16019  
 A K E S Q L F G A M D G A M K F V K G D  
 202  
 GCCATTGCATCGCTGGTGATCGTGTTCATCAACATGATCGGCGGCTTCGCCATCGGCGTG  
 16079  
 A I A S L V I V F I N M I G G F A I G V  
 242  
 TTGCAGCACAACATGGCCGCGTCCGATGCAATGCACGTCTACTCGGTATTGACCATCGGC  
 16139  
 L Q H N M A A S D A M H V Y S V L T I G  
 262  
 GACGGACTGATCGCCCAAATTCGCGCCTGCTGATCTCGCTGACCGCCGGGATGATCATC  
 16199  
 D G L I A Q I P A L L I S L T A G M I I

282  
ACGCGCGTCTCAGCCGACGGGCAAAAAGTGGATGCCAATATTGGCCGCGAAAATTGCCGAA  
16259  
T R V S A D G Q K V D A N I G R E I A E  
302  
CAGCTCACCAGCCAGCCCAAAGCGTGGATCATCTCCTCCATCGGCATGTTTGGCTTTGCG  
16319  
Q L T S Q P K A W I I S S I G M F G F A  
322  
CTGCTGCCGGGGATGCCGACGCTGGTGTGTTTACCATCAGTCTGGCCTCACTCGGCAGC  
16379  
L L P G M P T L V F V T I S L A S L G S  
342  
GGTCTGTTTCAGCTCTGGCGCATCAAACAGCAGGGCCAGCTCGATGCCAACAGTTGGAA  
16439  
G L F Q L W R I K Q Q G Q L D A N Q L E  
362  
GCGGACAATATGCCCGCTGAACAGAACGGCTATCAGGATCTGCGGCGCTTCAACCCCACG  
16499  
A D N M P A E Q N G Y Q D L R R F N P T  
382  
CGCGCCTATTTGCTGCTGTTTCATCCGGTCTGGCAAGGGCAGCCAACGGCAACGGCGCTG  
16559  
R A Y L L L F H P V W Q G Q P T A T A L  
402  
GTGCAGAAATATCCGCCGCTGCGTAACAAGCTGGTCTATCGTTTTGGCTTTACGCTGCCG  
16619  
V Q N I R R L R N K L V Y R F G F T L P  
422  
TCCTTTGATATCGAATTCAGCGATCGGCTAGCGGAAGATGAATTTTCAGTTTTGCGTCTAC  
16679  
S F D I E F S D R L A E D E F Q F C V Y  
442  
GAGATCCCTACGTTAAAGCCACGTTTGTACCGACCAGTTGGCCGTTGCCAGCGGTGCC  
16739  
E I P Y V K A T F V T D Q L A V A S G A  
462  
GTCGAACCGACTGATGCCGCCCTCGCCACGCCCGCCCCACGCTACGGGATGAAAGTCAG  
16799  
V E P T D A A L A T P G P T L R D E S Q

482  
TGGCTCTGGCTGCCGCTGGCACATGTGCGCAGCAGCCCGACGACGTGCCGCGCTGGACG  
16859  
W L W L P L A H V A Q Q P D D V P R W T

502  
TCAGATGAGCTGATTCTGGCGCGCATGGAACAGGCCATTACCCGCACCGGTTACAGTTT  
16919  
S D E L I L A R M E Q A I H R T G S Q F

522  
ATTGGTTTGCAGGAAACCAAATCCATTCTGGCCTGGCTGGAGAGCGAACAGCCGGAACTG  
16979  
I G L Q E T K S I L A W L E S E Q P E L

542  
GCGCAGGAGCTTCAGCGCATCATGCCACTCTCGCGTTTTGCCAGCGTGCTGCAACGGCTG  
17039  
A Q E L Q R I M P L S R F A S V L Q R L

562  
GCTTCCGAACGTGTCCCCCTGCGGTGCGTGCGCCCATCGCCGAGGCGCTGATTGAAGTC  
17099  
A S E R V P L R S V R P I A E A L I E V

582  
GGCCAGCACGAACGGGACACGCTGGCGCTGACCGACTACGTGCGTCTGGCGCTTAAATCG  
17159  
G Q H E R D T L A L T D Y V R L A L K S

602  
CAAATCTGCCACCAGTACAGCGACGAAAACAACCTTGCCGTCTGGCTGCTGACGCCAGAA  
17219  
Q I C H Q Y S D E N N L A V W L L T P E

622  
AGCGAAGAGCTGCTGCGGATGCGCTGCGCCAGACGCAGAGCGAAACCTTCTTCGCTCTG  
17279  
S E E L L R D A L R Q T Q S E T F F A L

642  
ACGCAGGACTACGCCTCCACGCTGCTCGGTCAGCTGCGGCAGGCGTTCCGCCGCTCTCA  
17339  
T Q D Y A S T L L G Q L R Q A F P P L S

662  
TCGCAGCGCAGTCTGGTGCTGGTGGCACAGGATTTACGCAGCCCGCTGCGCACGCTGTTG  
17399  
S Q R S L V L V A Q D L R S P L R T L L



682

CAGGACGAATTTTCACCACGTTCCGGTGCTGTCTTCACCGAACTGGAATCCACCCTGTCTG

17459

Q D E F H H V P V L S F T E L E S T L S

702

R.B

ATCAACGTCATTGGACGTCTCGATCTGTACGACTCCCCGATCCCTTAGCGCATAGGAAA

17519

I N V I G R L D L Y D S P D P L A H R K

722

hrpQ

CATCATGTTTGAATTACGCGTGCTGACTGGTTTACATCGCGGTGCGGCGCTGCCGCTCTG

C 17580

H H V -

726

M F E L R V L T G L H R G A A L P L C

19

GGAAACGCCTGGCGCATCGGTGCAGCCGATGACGCCGATCTCGTGCTTTACGATCCCGGC

17640

G N A W R I G A A D D A D L V L Y D P G

39

ATTGCGCCGTATCACAGCCAGTTGGAGAAGACCGCTGACGGCTGGGCGCTCAGCGCACAG

17700

I A P Y H S Q L E K T A D G W A L S A Q

59

GATGGCGCGTTGTGTAATGCGGAAGGCCATACCGTCGAGCAGATTGACGCTCTGCCGCTA

17760

D G A L C N A E G H T V E Q I D A L P L

79

GGCAGCCGTTTTCGCTGGGGCAGATTTGGCTCTGCATTGTGGCGGCCGATAACCCCTTGG

17820

G T P F A L G Q I W L C I V A A D T P W

99

CCTGACGATAACGAAGCCCTCCGACTGCGGAAGAGCACGTTCCCCAGCGGATATGCC

17880

P D D N E A P P T A E E H V P P A D M P

119

ATCGACGACACACCCGTTTCATACCGCTGCGCCGCTTCTACACCCGCACCCTCGACACGC

17940

I D D T P V H T A A P L P T P A P S T R

139

CTACCGCTGTGGGCTAAAGCCAGCTATCTGCTGCTTGGCGGTTGCTGCTGGTGATGGTC  
18000

L P L W A K A S Y L L L G A L L L V M V

159

GGCAGTTGGCAGCTACAGGAGAGCGTCGCGATGCCCGCCGCTCCGTCGCCGCAGGATACC

18060

G S W Q L Q E S V A M P A A P S P Q D T

179

CGTAAGCCGCTCGGCACATTGCCACAGCTGGAAAGCACGCTGCGCATTATGTTGCAGGAG

18120

R K P L G T L P Q L E S T L R I M L Q E 199

CGAGAACTGAGCACGGCCGTGAAAGTGGCGGCGTATCAAGATCGCCTCACGCTCACCGGG

18180

R E L S T A V K V A A Y Q D R L T L T G

219

HrpL dependent promoter

CAAGTCACGCCGACGATCAAAAAAAGCTGGAACGGATGCTCGCTCAACTCCACCAACGT

18240

Q V T P D D Q K K L E R M L A Q L H Q R

239

TATAGAACCGCGCTGTCCGTGGATAACCGCACGCAGCTGAAAACGGAGCAACTGCCGTTT

18300

Y R T A L S V D N R T Q L K T E Q L P F

259

CAGATCGTTTCAGGTGACCAGCGGGTCGCGCGCCAACGTCGTCACGGCGGACGGTCAGCGC

18360

Q I V Q V T S G S R A N V V T A D G Q R

279

TTTTTCATCGGCGATGAGATCGACAACCTGCGTCTGGTGAGAATTGATGAGCACCAGATT

18420

F F I G D E I D N L R L V R I D E H Q I

299

hrcN

GAATTCAGCGGCAGACAACAGATAACGGTGAACTGGTAATGCAGACGCAACCTTCTTCT

18479

E F S G R Q Q I T V N W -

312

M Q T Q P S S

7

TTTCCGCTGCTCGACCAGTGGGTGCGCACAGCAGCGCCAGCATCTGGCGAACTACGCGCCC

18539  
 F P L L D Q W V A Q Q R Q H L A N Y A P  
 27  
 GTGGAGAAAAAAGCCGCGTCATGGCCGTCAGCGGCATTTTGCTGGAGTGCAGCCTGCCG  
 18599  
 V E K K G R V M A V S G I L L E C S L P  
 47  
 CAGGCGCGTATTGGCGATCTGTGCTGGGTAGCCCGTCAGGACGACAGCCAGATGATGGCC  
 18659  
 Q A R I G D L C W V A R Q D D S Q M M A  
 67  
 GAAGTCGTAGGGTTCAGCCCGACAACACCTTTCTCTCCGCGCTCGGTGCGCTGGACGGC  
 18719  
 E V V G F S P D N T F L S A L G A L D G  
 87  
 ATCGCTCAGGGTGCCGCCGTGACGCCGCTGTATCAGCCGCACTGCATTCAGGTGTCCGAT  
 18779  
 I A Q G A A V T P L Y Q P H C I Q V S D  
 107  
 CGTTTGCTGGGCAGCGTGCTGGACGGGTTTGGGCGGGCATTGGAAGACGGCGGGGAGAGC  
 18839  
 R L L G S V L D G F G R A L E D G G E S  
 127  
 GCGTTTGCTCGAACCGGGTCATGCCACGGGACGCACGCAGCCGGTGCTGGGCGACGCCCCG  
 18899  
 A F V E P G H A T G R T Q P V L G D A P  
 147  
 CCGCCGACCTCCCGCCCGCGCATCAGCCAGCCATTCCTACCGGATTACGCGCCGTGAT  
 18959  
 P P T S R P R I S Q P F P T G L R A V D  
 167  
 GGCCTGCTAACTATCGGTCAGGGGACGCGGTCGGCATTTCGCCGGTGCGGGCTGCGGT  
 19019  
 G L L T I G Q G Q R V G I F A G A G C G  
 187  
 AAAACCACGCTGCTGGCCGAGCTGGCGCGTAATACCCGTGCGACGCCATCGTTTTTCGGG  
 19079  
 K T T L L A E L A R N T P C D A I V F G  
 207  
 CTGATTGGCGAACGTGGTTCGCGAACTGCGTGAATTTCTCGATCACGAACTGGACGATGAA

19139  
L I G E R G R E L R E F L D H E L D D E  
227  
CTGCGTAGCCGTACCGTGCTGGTGTGTTCCACCTCCGACCGCAGCAGCATGGAACGCGCC

19199  
L R S R T V L V C S T S D R S S M E R A  
247  
CGCGGGCGTTACCGCCACCGCCATCGCCGAGGCTTACCGTGCCGAAGGCCGTCAGGTG

19259  
R A A F T A T A I A E A Y R A E G R Q V  
267  
CTGCTGATTATTGATTCCCTGACGCGTTTCGCCCAGCGTCAAATCGGTCTAGCG

19319  
L L I I D S L T R F A R A Q R E I G L A  
287  
CTCGGGGAACCGCAGGGGGCGGGGGCTACCGCCGTCAGTCTATACGCTGCTGCCCGT

19379  
L G E P Q G R G G L P P S V Y T L L P R  
307  
CTGGTCGAGCGCGCCGACAAACGGAAGACGGTGCCATCACCGCGCTCTATTCCGTGCTG

19439  
L V E R A G Q T E D G A I T A L Y S V L  
327  
ATCGAGCAGGACTCCATGAACGATCCGGTCGCCGACGAAGTGCGTTCGCTGATCGACGGG

19499  
I E Q D S M N D P V A D E V R S L I D G  
347  
CACATCGTGCTCGCCCAGGACTGGCTGAACAGGGGCACTATCCGGCTATCGACGTGCTG

19559  
H I V L A R R L A E Q G H Y P A I D V L  
367  
GCCAGCCTGAGCCGTACCATGAGTAACGTCGTGGATACCGATCACACTCGCAACGCGGGC

19619  
A S L S R T M S N V V D T D H T R N A G  
387  
GGCGTACGGCGACTGATGGCAGCTTACAAGCAGGTTGAAATGCTGATCCGTCTCGGGCAA

19679  
G V R R L M A A Y K Q V E M L I R L G E  
407  
TACCAACCCGGCCATGACGTGTTGACCGATTCCGCCGTCAAACGCTCAGGCAGAAATCACG

19739  
 Y Q P G H D V L T D S A V N A Q A E I T  
 427  
 CAGTTTCTGCGTCAGTTCGATGCGTGAACCGATGCCGTATGGCGTGATTCAGCAACAGCTC  
 19799  
 Q F L R Q S M R E P M P Y G V I Q Q Q L  
 447  
 hrpO  
 GCCGGAGTCAGCCGCTatgcccataaacaccgaacgcgatgcggagttacagaccgtgtg  
 19860  
 A G V S R Y A P -  
 456  
 M P H N T E R D A E L Q T V L  
 15  
 aactgctgatgccgatacggccagcgcttaagccgcagcgagcgtcagcagcggcag 19920  
 N L L M P I R R Q R L S R S E R Q Q R Q  
 35  
 gaagaaaagcagttgctccgaattgcggaacagcaacccatcatcaacgcaggtcgag 19980  
 E E K Q L L R I A E Q Q R H H Q Q Q V E  
 55  
 gcgctgcaacaagccagccagcagcgcgaccagtttgcggagaaaccaggggcaa 20040  
 A L Q Q A S Q T Q R D Q F A R E T Q G Q  
 75  
 tgccaaacgctgaaaacctgaaaacgcgccttgccgccaacagcgttactcagcgag 20100  
 C Q T L E N L K T R L A A E Q R L L S E  
 95  
 atagcgacagaaacgcagcaggtgcaggccacacagcagcaacaccagaccagcagcgt 20160  
 I A T E T Q Q V Q A T Q Q Q H H D Q Q R  
 115  
 caggtggatcacgccgagcgtactcgccaatgccgaaagcagtgagaagctggaa 20220  
 Q V D H A R D A T R Q C Q K A V E K L E  
 135  
 R.B hrpP  
 tatctgcttacgttacctcaggacacgtatgaataaccgacagattgcgtccccgaa 20279  
 Y L L T L P Q E H V - 146  
 M N N R Q I A S P E  
 10  
 tccaagcgacgcagaacgcgcagccgctgcatggcaaatcctcacgcgggatgat 20339  
 S K A T Q N A Q A A L H G K S S R A D D  
 30

tcacagcacgatccacacataggatttctgggaggccttcaccttttcagacggcttt 20399  
S Q H D P H H R D F W E A F T F S D G F  
50  
gaagacgcgttcTATCACGAAGCGCCTTTCGCCTTAGCGCCAGGCGGCCCATCAACGCC  
20459  
E D A F Y H E A P F A L A P G G P I N A  
70  
CCACCGCCGTTGCAGAGTGAGGGCGCCGGACAGCCCACAAAACGTGACGACGTACAGTGG  
20519  
P P P L Q S E A P D S P Q N V T T S Q W  
90  
CAGTCGCTGCAATGTGAGCTGATTGAGGCGATGGACAACATCTGCGCCCCGCGTTTGCC  
20579  
Q S L Q C E L I E A M D N I C A P P F A  
110  
TTCAGCCTGCAACTGCCGAGTTGGGCGATATCGATGCGGGCTAGCCACGCTGGTGCCG  
20639  
F S L Q L P Q L G D I D A R L A T L V P  
130  
CGCGGCTGGGATGTTTTCTCTGCGTTTTAGCCGAGAAAAGCTACCACCAGTTGAAAGATCGG  
20699  
R G W D V S L R F S R E S Y H Q L K D R  
150  
CGTGAAGCCTGCCGTCATTCGCTCTCCAGCGCGCTGGACTGCCCGATAAATCTGCGTTTTT  
20759  
R E A C R H S L S S A L D C P I N L R F  
170  
R.B hrcQ  
GACGCCAGAGAGTATGAGCGATGAATCCGAATTCACCGACTTTC AATTCAGCGCACATC  
20818  
D A R E Y E R -  
178  
M N P N S P T F N S A H I  
13  
AGACCGCTGACGCTGCCGGCCCTGCGCGCGCAGCACGCCTGCATTCGATCGGTGCTGGCC  
20878  
R P L T L P A L R A Q H A C I R S V L A  
33  
ACTGGATTATCGTCGCCGTTTACCCGCGACGGACGGGCTGGCCGCTGCACCTTCAACTG  
20938

T G L S S P F T R D G R A G R L H L Q L  
 53  
 GCGAATGCACCCGGGCAGGCAGAGGACTCGTTCCACACACAGGCAAGCCGTTGGCGGAGC  
 20998  
 A N A P G Q A E D S F T T Q A S R W R S  
 73  
 GATATCGGCCATGTCTCACTGGCCGATCCGTTTCTGTACTCAGCCTGCTGTGCGGATTGC  
 21058  
 D I G H V S L A D P F P V L S L L S D C  
 93  
 CCGCTGCTGCCCCCTCACAGAAGACGATGACGCGGCACAGGAATGGTACTGGACGCTCTAC  
 21118  
 P L L P L T E D D D A A Q E W Y W T L Y  
 113  
 AACCAGTCGCTTAACCCCGTGCTGCGAGCGCTGGTCGGGGAAATCTATCCGCTGGGCCTT  
 21178  
 N Q S L N P V L R A L V G E I Y P L G L  
 133  
 CCGTCAGCAAGAAATGGGCAGAAAGAACAGGATTCAACAAAGCAGAATCACAATGCTGCC  
 21238  
 P S A R N G Q K E Q D S T K Q N H N A A  
 153  
 TGGCTCAGCGTGAGCTGGAACGGCATGACCGTGCGCAGCCGGATGCAGGCCGCTGACGCC  
 21298  
 W L S V S W N G M T V R S R M Q A A D A  
 173  
 GTCTGGCTGGCGCTGTTTTCTCGCGCCGACTGGCACCACCAACGCCGTGCGCTCCCCGCA  
 21358  
 V W L A L F S R A D W H H Q R R A L P A  
 193  
 GGAATGACTATCGCTATCCCGCTCACGCTGGCTGAGGCCGTGCTGCCGCTGTCCGCGTTA  
 21418  
 G M T I A I P L T L A E A V L P L S A L  
 213  
 CGCCGTTTGGGTACGGGGGATCTTATTCTGCCTAACCGCCCGTGGTTTACCCCTTCCGGC  
 21478  
 R R L R T G D L I L P N R P W F T P S G  
 233  
 GAGGGAACGTTGTCATCCGGTTCGCTGCGCCTGCGCGGCACGTTACAGCTCACGGCGCTC  
 21538

E G T L S S G S L R L R G T L Q L T A L  
 253  
 GCCCCCTACACCTTTACCGTTACCGACATGGAGACTGTCTCAATGCCCGCTACCGACACG  
 21598  
 A P Y T F T V T D M E T V S M P A T D T  
 273  
 ATGCTAGCCGATCCCCACTCAGATGCGTCAGCGCTTGAATTCACGCCAGAGAGTGACAAC  
 21658  
 M L A D P H S D A S A L E F T P E S D N  
 293  
 GTCACCGAAAACCTTACCGCCGCTGCCGGTCACCTTACACATTCGCTGTGGCAGCCTGACG  
 21718  
 V T E N L P P L P V T L H I R C G S L T  
 313  
 ATGACGCTGGCGGAATTACAACACCTCGCCAGCGGTAGCGTGCTGACGCTGCGCGACGTG  
 21778  
 M T L A E L Q H L A S G S V L T L R D V  
 333  
 GTGCCGGGGCAAGCCTTGCTGTATCACGGCGATATCGCCCTGGCGAGCGGCGATCTGGTC  
 21838  
 V P G Q A L L Y H G D I A L A S G D L V  
 353  
 GATGTGAAAGGCCGACTAGGGCTACAGATTACCCAATGCTTTTCCGCACCCGCGCACGAA  
 21898  
 D V K G R L G L Q I T Q C F S A P A H E  
 373  
 R.B hrcR  
 CTACCGGTAGCGGATGAAGAATACGCCGCCGAACCGGAGCTGGCACCatgacctccggcgcg  
 21960  
 L P V A D E E Y A A E P E L A P -  
 389  
 M T S G A  
 5  
 ttcgatccgttgatgtttgcgctctttctgggtgccctttccctgattccgttgatgatg 22020  
 F D P L M F A L F L G A L S L I P L M M  
 25  
 attgtctgtaCCTGCTTTCTGAAGATTGCGATTGTGCTGCTGATTACCCGCAACGCCATC  
 22080  
 I V C T C F L K I A I V L L I T R N A I  
 45



GGGGTGCAACAAGTGCCGCCCAACATGGCGCTGTACGGTATCGCACTCGCGGCAACGCTG

22140

G V Q Q V P P N M A L Y G I A L A A T L

65

TTTGTTCATGGCACCGGTGTTTCAGGACATCAGCAAACGCGTGCAGGAAAAGCCGCTGGAT

22200

F V M A P V F Q D I S K R V Q E K P L D

85

ATGACCGACATCACGTCGCTTCAGGCCAGCGTGACCTACGGGCTGGAGCCGCTGCAAACG

22260

M T D I T S L Q A S V T Y G L E P L Q T

105

TTTATGTCACGCAACGTTGACCCGGATATTCTCACCCACCTGCATGAGAACAGCCTGCAC

22320

F M S R N V D P D I L T H L H E N S L H

125

AATGTGGCCTGTTTCGCTGTCCGAAAAGGTGAATACGCAGAATCTGCTGTTGGTGATCCCG

22380

N V A C S L S E K V N T Q N L L L V I P

145

GCTTTCGTCCTGTCCGAGCTACAGGCTGGGTTCAAAAATCGGCTTCCTGATCTATATCCCG

22440

A F V L S E L Q A G F K I G F L I Y I P

165

TTTATCGTCATCGACCTCATTGTCTCAAACGTGCTGCTGGCGCTGGGGATGCAAATGGTC

22500

F I V I D L I V S N V L L A L G M Q M V

185

GCGCCAATGACGCTCTCGCTACCGTTAAAGCTGCTGCTGTTTCGTGCTGGTCAACGGCTGG

22560

A P M T L S L P L K L L L F V L V N G W

205

R.B hrcS

ACGCGATTGCTGGACGGCCTGTTCTACAGCTACCTGTGAGGCCACGATGGAAATAATCAC

A

22621

T R L L D G L F Y S Y L -

218

M E I I T

5

CTTTTCCGTCAGGCCATGGTGATGGTCGTGCTGCTCTCTGCGCCCGCTGCTGGTTGCG

22681

L F R Q A M V M V V L L S A P P L L V A  
 25  
 GTGATCGTCGGCGTGCTGATTTTCGCTGCTACAGGCGGTGATGCAGTTGCAGGATCAGACG  
 22741  
 V I V G V L I S L L Q A V M Q L Q D Q T  
 45  
 CTGCCCTTTGCCGTCAAACCTGATTTCCGTCGGGCTGACGCTGGCGCTCTGCGGGCGCTGG  
 22801  
 L P F A V K L I S V G L T L A L C G R W  
 65  
 ATTGCGTAGAGCTGATGCAGTTGGCTATCACCGCATTCAACATGATTGCGCACACTGGG  
 22861  
 I G V E L M Q L A I T A F N M I A H T G  
 85  
 hrcT  
 GTATAACGCCGATGATCGCCACCATTTCAGCACGTTTACGATTTTATCATCGCCATTAC  
 G 22921  
 V - 87  
 M I A T I Q H V Y D F I I A I T  
 16  
 CTCGGCATCGCCCGCTGTACCCCTGCTTTATTCTGGTGCCGTTTTTTTCACTCAACGTG  
 22981  
 L G I A R L Y P C F I L V P V F S L N V  
 36  
 CTGAAAGGCATGACGCGCAACGCCGTGGTGATTTCCCTGACGCTGCTGCCCGCCCCATC  
 23041  
 L K G M T R N A V V I S L T L L P A P I  
 56  
 GTGCAGCAGCAGCTTCTGCTGACGCCGCTGTCCTGGCCGATGCTACCCGGCCTGTACTG  
 23101  
 V Q Q Q L L L T P L S W P M L P G L L L  
 76  
 AAAGAGGTTATTGTGCGGGCTCCTCATCGCGCTGATTTTGGCTATGCCATTCTGGCTGTTT  
 23161  
 K E V I V G L L I A L I L A M P F W L F  
 96  
 GAATCCGTCGGTGCCCTGTTTGATAACCAGCGCGGCGCTCATGGGCGGCCAGCTCAAC  
 23221  
 E S V G A L F D N Q R G A L M G G Q L N  
 116

CCCGCGCTGGGCTCGGACGCCACGCCGCTCGGCCATCTGCTGAAACAGACGCTGATTCTG  
 23281  
 P A L G S D A T P L G H L L K Q T L I L  
 136  
 CTGTTGATTATCGGTATCGGCCTGAAAGGGCTGACGCAGCTGATTTGGGACAGCTACCAG  
 23341  
 L L I I G I G L K G L T Q L I W D S Y Q  
 156  
 ATCTGGCCGGTGCTGTCTGGCTACCCGCGCCGGGCGAACAAGGGTTTGAGGTCTATCTC  
 23401  
 I W P V L S W L P A P G E Q G F E V Y L  
 176  
 AGCCTGTTGGCCGACACTTTCACTCATCTGGTGGTGTACGCCGGGCCGCTGGTCGCGCTG  
 23461  
 S L L A D T F T H L V V Y A G P L V A L  
 196  
 CTGCTGCTGTTGGAATTCAGCATTGCGCTACTCAGCCTGTATAGCCCGCAGCTTCAGGTG  
 23521  
 L L L L E F S I A L L S L Y S P Q L Q V  
 216  
 TTTGTCCTGTCCATTCCGGCCAAGTGTCTGGTGGGGATGGCATTTTTCATCGTTTACCTG  
 23581  
 F V L S I P A K C L V G M A F F I V Y L  
 236  
 CCAGTGCTGCAATATTTAGGTGACCATAAACTTCAGGGGCTGCCGGATCTCAAGCACCTG  
 23640  
 P V L Q Y L G D H K L Q G L P D L K H L  
 256  
 hrcU  
 CTCCCGCTGATTTTTACGGCATCGAACAACGAATAAGGCGGAGCTGATGAGCGAGAAAAC  
 23701  
 L P L I F T A S N N E -  
 268  
 GGAAGAACCCACAGAGAAAAAAGTTCGAAGACGCGCCGTAAAGGGGAAGTCGGGCAAAG  
 23761  
 TCAGGATGTGCCAAGCTGCTGATTTGCGTCGGCCTGCTGGAATGCGTATTGGCGCTGGC  
 23821  
 AGACAGCACGATGGGGAAACTGCAAACGCTGGTACAACCTGCCGCTGCAACGGCTGGATGC  
 23881  
 CCCGTTTGGCGAGGTGGCGAAAAGAGGTGTTCCACGATGCTGCTGTAAGTGGCGGGCACGCT

23941  
 CTGCCTGTTAGCCGCTGCCATTGCCGTGCTGCTGCGCGTGGTGGGCGGCTGGCTCCAGTA  
 24001  
 TGGTCCGCTGTTTGGCGCCGAAGCCCTGAAGCTCGATCTCAACCGTTTGAACCCCATCAA  
 24061  
 CCAGTTCAAGCAGATGTTTTCGATGCGCAAGCTGGTGGAAATGCTGACCAATATCCTAAA  
 24121  
 AGCCGTGGTGATCGGTACGGTCTTTTATAAAGTGGTGGTGCCAGAGCTGGAAGCGCTGGT  
 24181  
 CGAATTGTCCTATGGCGATCTACACGGCTTCTGGCAAGGGGTGAAAGCCCTGCTCACGCG  
 24241  
 CATTGCCCGCACCACGCTGACGGCGTTGCTGGTGCTGTCCGCACTGGATTTCCGGCCTGCA  
 24301  
 AAAGTATTTCTTTCTCAAGCAGCAGCGGATGAGCCACGAGGATTTACGCAATGAACATA  
 A  
 24361  
 AGATTCCGAAGGCGATCCGCATATGAAAGGTCACCGTAAATCGCTGGCGCACGAACTGAT  
 24421  
 GAACGAGCCAGCCGCCCGCGTCCCAAAGCCAACATAGAAGACGCCGATA  
 24472

**Fig. 5-6.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* strain 35 균주의 full length *hrp* 유전자들의 nucleotide sequences와 deduced amino acid sequences.

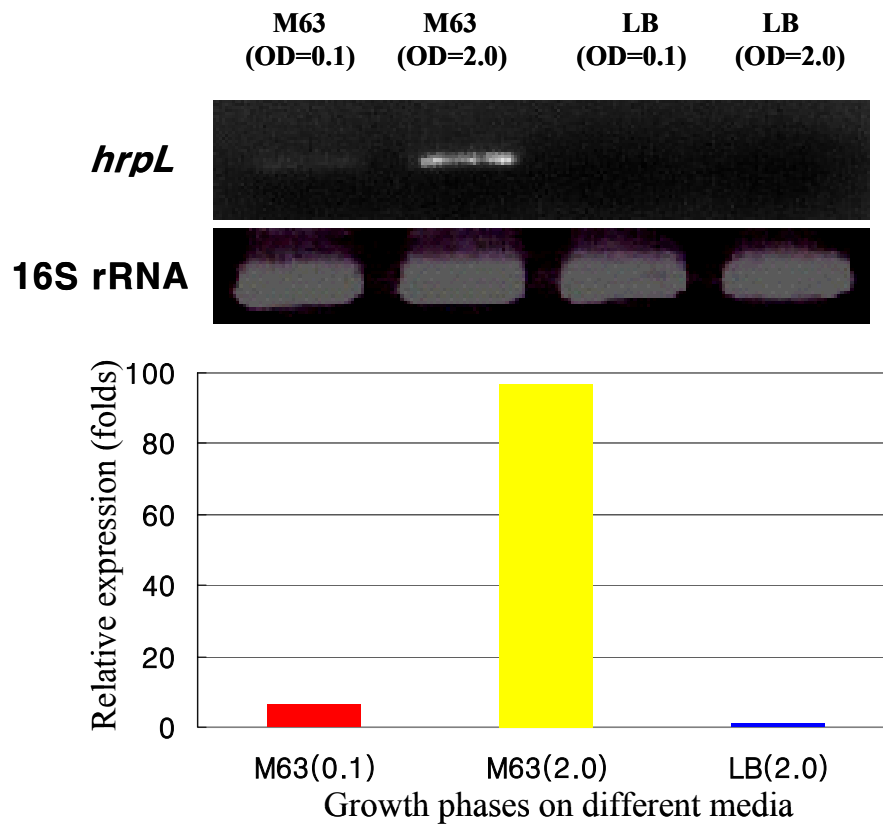
*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 HrpF amino acid는 pI값이 4.46이었고 분자량이 8 kDa로 아주 작은 단백질로서 지금까지 알려진 바에 의하면 HrpF 단백질은 putative typeIII translocon protein으로 알려져 있다(Fig. 5-6). Downstream의 *hrpF* 유전자에는 *hrpG* 그리고 *hrcC*와 상동성이 높은 유전자가 위치하고 있었다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 *hrpF* 유전자는 *hrpC* operon의 첫 번째 유전자로 *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1과 같은 *hrpF* operon의 gene arrangement를 가지고 있었다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 HrpF 단백질은 *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1 균주의 HrpF와 96%의 높은 상동성을 보였고, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* HrpF와 88%의 상동성을 보였다(Fig. 5-6). *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 HrpN amino acid는 pI값이 5.24이었고, 분자량이 38 kDa인 단백질이었고, 식물에서 hypersensitive response을 유도하는 harpin과 상동성을 지니고 있었다. HrpN amino acid sequence는 glycine-rich regions이 존재하고 cysteine이 없는 전형적인 harpin의 구조를 가지고 있었다(Fig. 5-6). *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 HrpN 단백질은 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 균주의 HrpN와 93%의 높은 상동성을 보였고, *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1 HrpN와 87%의 상동성을 보였다.

*E. carotovora* ssp. *carotovora* SCC1, *E. carotovora* ssp. *atroseptica* SCR1034, 그리고 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrp* 유전자들의 배열양상은 유사하였다(Lehtimäke *et al.*, 2003). *hrpJ*에서 *hrpU*까지의 11 유전자들은 한개의 큰 operon에 의해서 전사된다고 알려져 있다(Bogdanove *et al.*, 1996). *E. carotovora* ssp. *carotovora* SCC1과 같이 *hrpXY*은 *hrp* 유전자의 발현을 조절하는 histidine kinase와 response regulator를 암호화한다고 알려져 있고, 세 번째 regulatory locus, *hrpS*가 이들 two component system의 downstream에 위치하고 있었다(Lehtimäki *et al.*, 2003) (Fig. 5-6). *hrpY*와 *hrpS* 유전자 사이에 조절 단백질의 target 혹은 전사 종결 염기서열로 생각되는 palindromic sequence, AAAAGGGATTCN-N10-GAATCCCTTTT가 존재하였다. *E. chrysanthemi*에서 보고된 다른 병원성 관련 유전자는 *E. carotovora*의 *hrp* 유전자 cluster에서는 발견되지 않았다(Kim *et al.*, 1998). 아직까지 나머지 대부분의 *hrp* 유전자들의 기능은 밝혀지지 않았으나, *P. syringae* *hrp* 유전자의 기능에 의하면 *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU*, *hrcV*, *hrcJ*, *hrcN*, *hrcC*, *hrpO*, 그리고 *hrpJ* 유전자들이 type III secretion system의 중요한

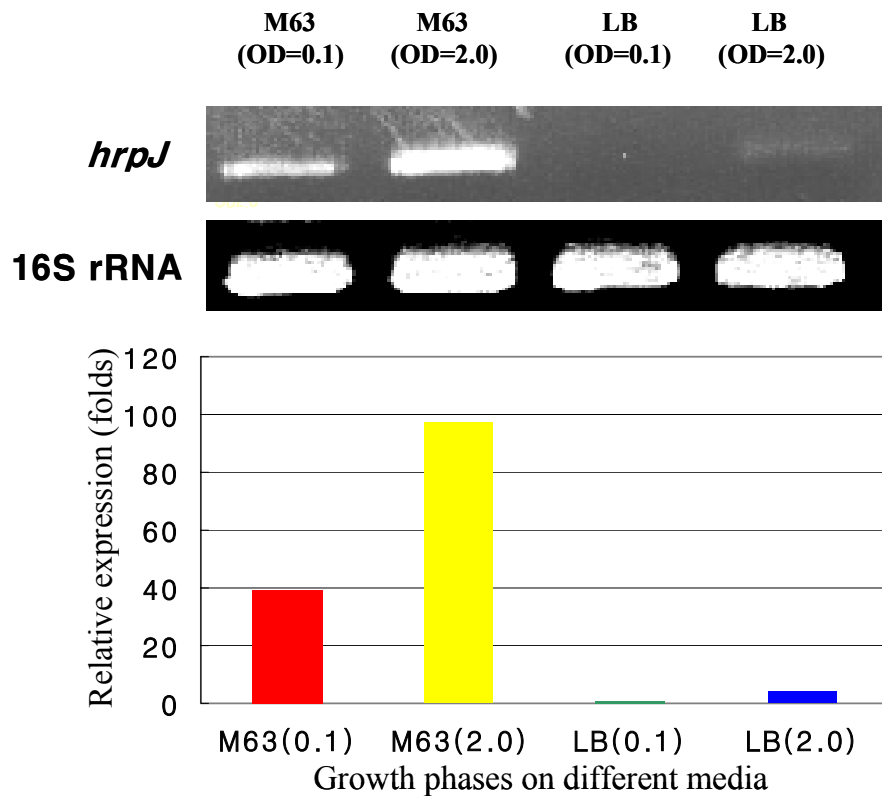
component라고 알려져 있는데[Tampakaki *et al.* (2004)], *E. carotovora*의 이들 유전자들도 동일한 기능을 수행할 것으로 사료된다.

다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 *hrpL*과 *hrpJ* 유전자의 발현 양상

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 *hrpL*과 *hrpJ* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주를 Hrp inducing M63배지와 고영양 배지인 LB 배지에서 생육시키는 동안 early log phase cell 과 stationary phase에서 total RNA를 분리하여 real time RT-PCR 분석에 의해 발현 양상을 비교하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 *hrpL*과 *hrpJ* 유전자는 *hrp* inducing minimal 배지인 M63배지에 생육시켰을 때 rich medium인 LB배지에서 생육시켰을 때 보다 100배 이상의 mRNA가 발현되었다. 또한 early-log phase cell에서 보다는 stationary-phase cell에서 *hrpL*과 *hrpJ* 유전자 발현양이 최대가 되었다(Fig. 5-7과 5-8).



**Fig. 5-7.** 생육 시기별과 생육 배지별 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrpL* 유전자의 RT-PCR에 의한 발현 양상 비교. 무름병균을 200 rpm에서 shaking하면서 28°C에서 Hrp-inducing M63 혹은 LB broth에서 생육하면서 주어진 시간에 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다. RT-PCR은 *hrpL* 특이적 혹은 16S rRNA 유전자 특이적 primer를 이용하여 수행하였다. RT-PCR 반응은 15 사이클이 끝났을 때 정지하고 PCR product를 2% agarose gel에 전기영동 하였다. 전체 RT-PCR profile은 각 유전자의 transcript의 상대적인 발현량을 측정하는데 사용하였다.



**Fig. 5-8.** 생육 시기별과 생육 배지별 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrpJ* 유전자의 RT-PCR에 의한 발현 양상 비교. 무름병균을 200 rpm에서 shaking하면서 28°C에서 Hrp-inducing M63 혹은 LB broth에서 생육하면서 주어진 시간에 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다. RT-PCR은 *hrpL* 특이적 혹은 16S rRNA 유전자 특이적 primer를 이용하여 수행하였다. RT-PCR 반응은 15 사이클이 끝났을 때 정지하고 PCR product를 2% agarose gel에 전기영동 하였다. 전체 RT-PCR profiles은 각 유전자의 transcript의 상대적인 발현량을 측정하는데 사용하였다.



## 제 6 절. IVET을 이용한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 *hrpL* 조절유전자 분리 및 기능 분석

### 1. 서언

식물과 세균성 병원균의 상호관계에서 식물세균병원균에 의해 병원성과 과민감반응을 일으키는 기작에 대해서는 많은 연구가 진행되었다. 특히 그람 음성 식물병원세균이 식물체에 병을 일으키고 비기주 식물에 과민감반응을 일으키는 기작에 대해서는 많은 진척이 있었다. 그람 음성 식물병원세균은 약 20 kb 정도되는 hypersensitive reaction and pathogenicity(*hrp*) cluster가 존재하여 이들에 의해 식물에 병원성과 과민감반응을 일으키는 중요한 유전자 cluster로 밝혀져 있다. 특히 식물에 biotrophic bacterial pathogen으로 알려진 *P. syringae* pv. *syringae* DC3000의 경우 *hrp* regulon에 대한 연구가 많이 진행되어 *hrpL*이 중요한 alternative sigma factor로서 promoter 부위에 *hrp* box을 가진 여러 *hrp* regulon을 조절한다고 알려져 있다(Alfano *et al.*, 2000). 그리고 이들 *hrp* 유전자들이 식물병원성과 비기주에 과민감 반응을 일으키는 중요한 유전자들로 알려져 있고, 이들 대부분의 *hrp* 유전자들의 기능은 type III secretion시스템을 구성하는 다양한 단백질을 암호화하고 있고, 물질이나 단백질을 분비하는데 필요한 에너지를 제공하고, 비기주 식물체에 과민감 반응을 유도하는 harpin(*hrpN*)과 저항성 품종에서 저항성 반응을 유도하는 *avr* 단백질을 암호화하고 있다고 알려져 있다(Collmer *et al.*, 2000; He, 1998). 이들 다양한 *hrp* 유전자를 조절하는 중요한 alternative RNA polymerase sigma factor로 *hrpL*이 밝혀져 있고, *hrpL*에 의해서 다양한 *hrp* 유전자 operon들이 조절된다고 알려져 있다(Hutcheson *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2000). 이들 *hrpL*에 의해서 조절되는 *hrp* 유전자들의 promoter sequence에는 *hrp* box라고 하는 특이한 염기서열이 존재하고 이들 *hrpL* sigma factor가 이 site에 결합하여 전사가 시작된다고 알려져 있다. 하지만, 대표적인 식물의 biotrophic bacterial pathogen인 세균성 무름병을 일으키는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에서 *hrp* regulon에 대한 각 유전자들의 기능, 발현 양상, 발현 조절 기작에 대한 연구는 초보단계이다. 현재까지 이들 무름병균도 biotrophic pathogen인 *P. syringae*에 존재하는 *hrp* 유전자 cluster가 분리되었고, 이들의 기능을 밝히는

연구가 진행 중이나 아마도 *P. syringae*에서의 *hrp* 유전자들의 기능과 각 유전자들의 발현양상이나 병원성과 과민감 반응에서의 기능이 다를 것으로 추정된다. 따라서 necrotrophic 세균병원균인 *E. carotovora*에서는 아직까지는 구체적인 *hrpL*의 기능과 *hrpL*에 의해 조절되는 유전자들이 어떤 것이고 이들 유전자들의 병원성 및 과민감 반응에서 역할이나 기능, 이들의 발현조절기구가 *P. syringae*와는 어떻게 다른 지에 대한 연구는 초보 단계이다.

*In vivo* expression technology(IVET)은 식물체 혹은 병이 발병하는 과정 중에 발현되는 유전자의 분리를 위해 최근 개발된 기술로서 여러 식물병원균 시스템 뿐만 아니라 생물적 방제균에서도 성공적으로 쓰여진 technique이다(Miller *et al.*, 2000). 본 절에서 사용된 IVET vector는 GFP가 장착된 promoterless broad host range vector로서 약 2 kb 정도되는 target 미생물 유전자를 vector에 클로닝하여 library를 조제하고 연구하고자 하는 regulator 유전자를 대장균에서 잘 발현되는 vector에 클로닝하고 두 vector를 동시에 *E. coli*에 발현시켜 regulator 유전자가 존재하는 조건에서만 발현되는 clone들을 선별할 수 있는 시스템이다(Miller *et al.*, 2000). 이미 *P. syringae* pv. *syringae* DC3000에서 알려진 *hrp* gene들의 기능과 발현 조절기작과 비교하여 보기 위하여 본 절에서는 *E. carotovora hrpL*에 의해 조절되는 유전자들을 분리하기 위하여 IVET을 이용하였다(Fig. 6-1). IVET에 의해 분리된 어떤 putative *hrpL*-regulated 유전자들을 분리되는 지 알아보고 이들 유전자들을 실제로 클로닝하여 이들 분리된 유전자들의 promoter에 *hrp* box가 존재하는지 알아보고자 하였다.

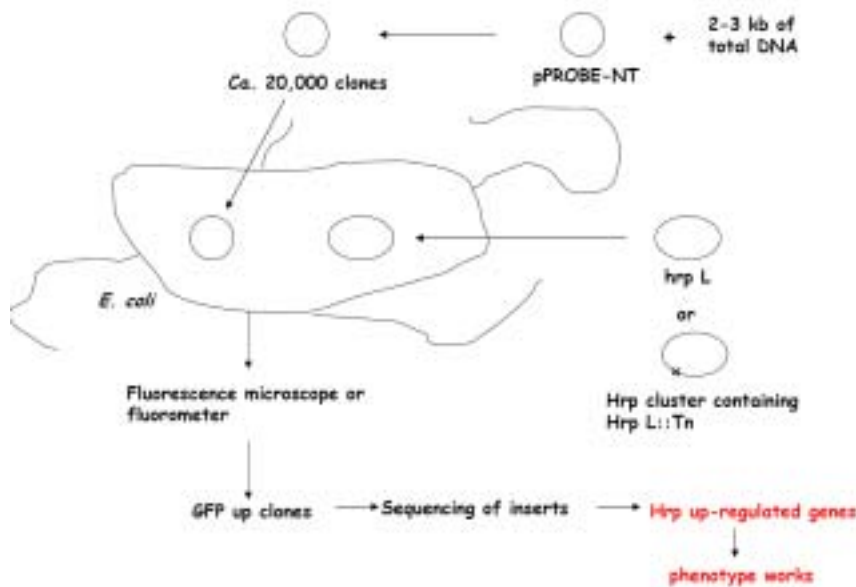


Fig. 6-1. *In vivo* expression technology(IVET)를 이용한 genome-wide hrp regulon 클로닝.

## 2. 재료 및 방법

### 가. *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrpL* 유전자의 promoter 교체

1절에서 클로닝한 *Ecc* 35 균주의 *hrpL* 유전자를 본 절에서 사용하였다. 최근의 연구에 의하면 *hrpL* 유전자는 *hrpRS* transcriptional regulator들에 조절된다는 보고가 있다. 따라서 *Ecc hrpL* 유전자를 *E. coli*에서 발현시키기 위해서는 *hrpL* 유전자의 promoter를 *E. coli*에서 잘 발현되는 *nptII* 나 *tac* promoter sequence로 교체하였다. *Ecc hrpL* 유전자의 open reading frame내에 존재하는 *NsiI* site 부위를 reverse primer(TCG GCA ACG CTC AAA TGC ATG)로 이용하였고, Forward primer로 *tac* promoter sequence로는 5'-GCT CTA GAG CTT GAC AAT TAT CAT CGG CTC GTA TAA TGT GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAC TTT CAC ACA GGA AAC AGC

TAA ATG GAA ATG TCT ACC CTG AAA CAC ATC G-3'를 사용하였고, *nptII* promoter sequence로는 5'-GCA CTA GAG CCC GGA ATT GCC AGC TGG GGC GCC CTC TGG TAA GGT TGG GAA GCC CTG CAA ATG GAA ATG TCT ACC CTG AAA CAC ATC G-3'를 사용하였다. Forward primer들은 5'말단에 *XbaI* site를 장착하고 있으며 *Ecc hrpL*유전자의 첫 9개 아미노산을 암호화하는 nucleotide를 primer sequence로 조제하여 사용하였다(Fig. 6-2). 이렇게 조제된 *nptII*나 *tac* promoter로 장착된 *hrpL*유전자는 sequencing을 통해 확인하였다. *nptII*가 장착된 *Ecc hrpL*유전자를 *E. coli*에 형질전환하여 CaCl<sub>2</sub>방법으로 competent cell을 조제하여 *Ecc IVET* library를 형질전환하여 *Ecc hrpL*에 의해 유도되는 IVET clone을 선발하는데 사용하였다.

나. Real time RT-PCR을 이용한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL*유전자의 발현 분석

상기에서 조제한 promoter를 교체한 *hrpL*유전자의 *E. coli*내에서 발현 양상을 확인하기 위해, 각 *hrpL* construct를 지닌 *E. coli* DH5a 균주들을 LB 배지에서 optical density가 600 nm에서 0.8이 되게 생육시킨 다음, TRI reagent<sup>TM</sup> 방법으로 total RNA를 분리하였다(Molecular Research Center). 또한 *E. carotovora* ssp. *carotovora*내에서 *hrpL*유전자가 생육 시기에 따라 발현 양상을 알아보기 위해 *E. carotovora* ssp. *carotovora*균주를 LB 배지에서 생육하면서 600 nm에서 0.8 혹은 1.5이상일 때 같은 방법으로 *E. carotovora* ssp. *carotovora* total RNA를 분리하였다.

분리된 total RNA를 template로 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 발현 정도를 Rotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system(Corbett Research)와 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit(Qiagen)를 사용하여 측정하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL*유전자를 증폭하기 위한 primer는 약 200 bp이하로 증폭되게 하여 조제하여 사용하였다. 각 total RNA의 양은 500 ng를 이용하였으며, 다음의 프로그램을 사용하여 RT-PCR하였다.: 30min at 50°C for reverse transcription; 15min at 95°C for HotStarTaq DNA polymerase activation; 18 cycles of 15s at 94°C, 30s at 55°C, 30s at 72°C 30s at 72°C for extension step. 기기에 장착된 프로그램을 이용하여 결과를 분석하였으며, 전기영동에 의해서도 발현 정도를 확인하였다.

primer <sup>2824</sup> forward - A. *Tac* promoter B. *NptII* promoter (XbaI site <sup>2824</sup>)

- A. *Tac* 5'-<sup>XbaI</sup> GCT CTA GAG CTT GAC AAT TAT CAT CGG CTC GTA TAA TGT GTG  
 GAA TTG TGA GCG GAT AAC TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAA ATG  
 GAA ATG TCT ACC CTG AAA CAC ATC G-3'
- B. *NptII* 5'-<sup>XbaI</sup> GCA CTA GAG CCC GGA ATT GCC AGC TGG GGC GCC CTC TGG TAA  
 GGT TGG GAA GCC CTG CAA ATG GAA ATG TCT ACC CTG AAA CAC  
 ATC G-3'

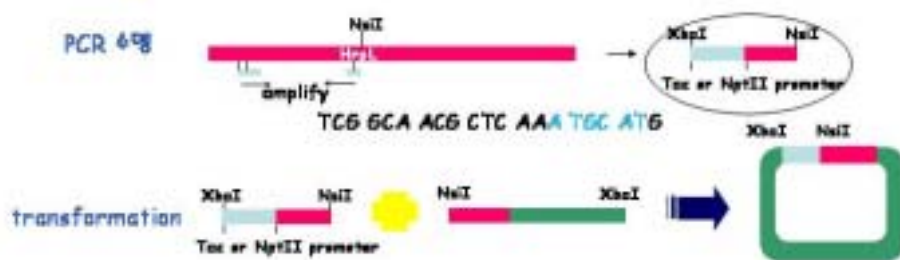


Fig. 6-2. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* native promoter를 constitutive expressed *nptII*와 *tac* promoter로의 교체 방법. Promoter의 교체 방법은 *nptII*와 *tac* promoter sequence를 가진 primer를 조제하여 PCR을 통하여 교체하였다.

다. Promoterless GFP IVET vector를 이용한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* genomic library 조제 및 *hrp* regulate 유전자 screening

*E. carotovora* ssp. *carotovora*로부터 total DNA를 분리하고 nebulizer로 partial digest하여 agarose gel에 전기영동한 후 약 2 kb 크기의 DNA를 agarose gel로부터 분리하였다. 이 DNA를 promoterless long life GFP를 reporter로 가진 pPROBE-NT(Miller *et al.*, 2000)를 *Sma*I으로 절단하고 *E. carotovora* ssp. *carotovora* DNA를 삽입하여 library를 조제하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* library stock를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 kanamycin plate에서 약 50개의 colony가 자라도록 조정한 후 멸균수를 LB plate에 부어 1개의 plate에서 자란 모든 *E. coli* 세포를 회수하여 이 세포로부터 plasmid DNA를 분리하고, 분리된 플라스미드를 *hrpL E. carotovora* ssp. *carotovora* 유전자를 지니고 있는 *E. coli* XL-blue에 형질전환하는데 사용하였다.

*E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *nptII* promoter를 장착한 *hrpL*를 포함한 대장균에 pPROBE-NT에 만들어진 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 library clone를 형질전환하였고, plate에서 자란 single colony로 master plate를 만들었다. Master plate에 있는 대장균을 LB가 들어있는 microtiter plate로 옮겨 24시간 배양 후 녹색형광이 control에 비해 증가한(GFP value가 1,000이상인 것) clone들을 micro plate fluorescence reader(FLX800, BIO-TEK instruments Inc.)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 528 nm에서 GFP를 측정하였다. 선발된 클론들로부터 plasmid를 분리하여 *nptII* promoter를 장착한 *hrpL*유전자와 *E. carotovora* ssp. *carotovora* IVET clone이 존재하는지를 확인하고 있고, 다시 plasmid를 *E. coli*에 형질 전환하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* library clone들만을 선발할 수 있는 kanamycin만이 첨가된 plate에 도말하여 *hrpL*에 의해 유도되는 *E. carotovora* ssp. *carotovora* IVET library clone들을 선발하였다. 이렇게 선발된 clone들은 다시 fluorescence spectrophotometer에서 GFP를 측정하여 *hrpL*에 의해 유도되는 최종 클론을 확인하여 선발하였다(Fig. 6-3). 이렇게 최종 확인된 clone들은 sequencing을 통해 insert DNA의 염기서열을 결정하고, 이 염기서열을 이용하여 gene bank와 2004년 공개된 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* genome sequence에서 blast를 실시하여 homologous한 유전자를 찾고, 그 유전자의 기능을 예측하였다.

hrpL에 의해 조절되는 Ecc 유전자의 스크리닝 방법

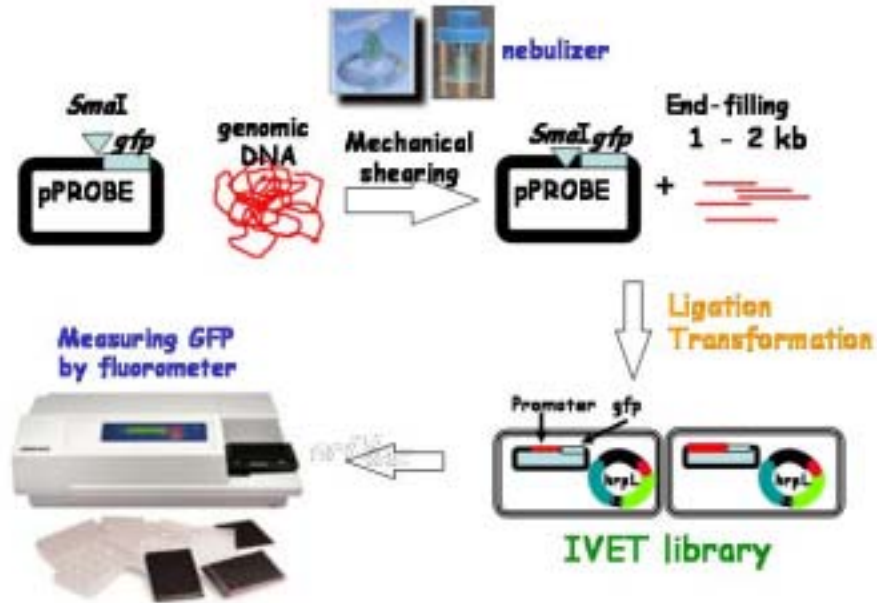


Fig. 6-3. IVET system을 이용한 *hrpL*에 유도되는 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 유전자 선발을 위한 모식도.

### 3. 결과 및 고찰

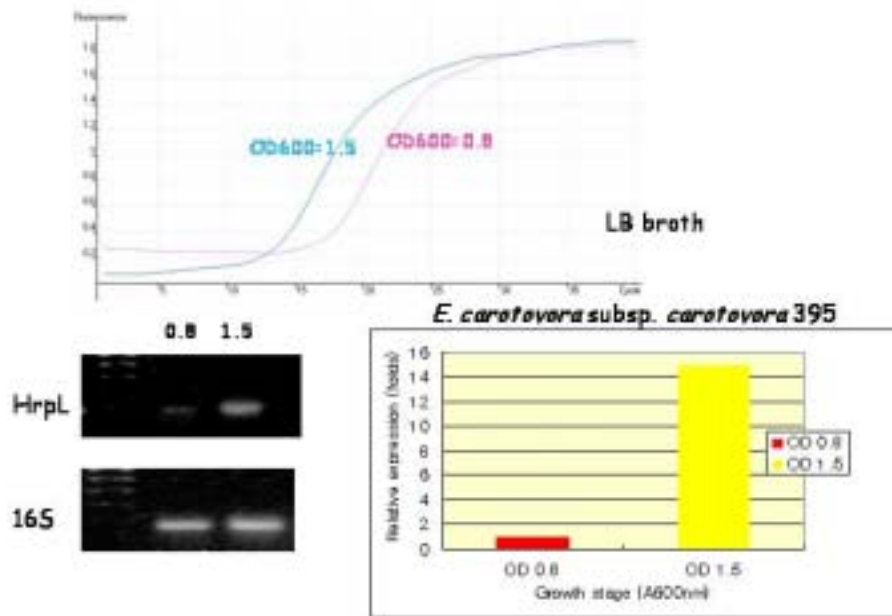
#### 가. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자의 클로닝

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 *hrpL* 유전자를 클로닝하여 sequencing하여 본 결과, *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자는 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*와 같이 *hrpJ*와 *hrpX*의 사이에 존재하였다. Down stream의 *hrpL* 유전자에는 최근에 *hrp* 유전자의 tyrosine sensor kinase로 알려진 *hrpX* 유전자가 존재하였다(1절). *hrpL* 유전자의 promoter sequence를 최근에 발표된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 61균주와 비교해 본 결과, 거의 같은 promoter elements를 가지고 있었다(1절). *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 *hrpL* promoter sequence에는 2개의 RpoN consensus sequence가 존재하여 nitrogen source에 조절될 것으로 추정되며, putative integration host factor가 존재하였다. 또한 3개의 direct repeat도 존재하여 기 보고된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 61균주와 같은 발현 양상을 보일 것으로 추정된다. 또한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 *hrpL* 유전자의 deduced amino acid sequence도 다른 *Erwinia*속에서의 *hrpL* 유전자와 상동성이 높았으며, -10 recognition, -35 recognition, helicase 활성을 지닌 domain을 지닌 alternative sigma factor와 상동성이 높았다(1절).

#### 나. Real time RT-PCR에 의한 *E. carotovora* ssp. *carotovora*(*Ecc*) 35 *hrpL* 유전자의 발현 양상

선발된 유전자들의 발현 양상을 확인하는 방법으로 Real time RT-PCR 방법을 확립하기 위해 상기에서 클로닝한 *Ecc* *hrpL* 유전자의 발현 양상을 밝혔다. *Ecc* 35 균주를 LB배지 상에서 키우면서 mid-log (OD600 nm = 0.8)와 stationary-phase(OD600 nm = 1.5)에서 total RNA를 추출하여 발현 양상을 확인해 본 결과, *hrpL* transcript는 stationary phase에서 약 14배 정도 더 발현되었다(Fig. 6-4).





**Fig. 6-4.** 고영양 배지 LB broth에서 생육시기별 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 발현 양상. *hrpL* 유전자의 발현 양상은 무름병균을 고영양 배지인 LB배지에서 생육을 시키면서 OD600 nm에서 0.8과 1.5에 도달할 때 total RNA를 분리하여 *hrpL*과 16S rRNA에 특이적인 primer로 RT-PCR을 통해서 발현량을 조사하였다.

*Ecc*의 native promoter를 가진 *hrpL* construct를 이용하여 *Ecc* IVET library를 screening 하였으나 false positive clone들만 선발되었다. 따라서 *E. coli* 내에서 발현이 되는 *tac*과 *nptII* promoter를 *Ecc hrpL* 유전자의 promoter부위에 장착하였다. 각기 다른 promoter를 장착한 *Ecc hrpL* 유전자의 *E. coli* 내에서 발현 양상을 Real time RT-PCR을 이용하여 확인하여 본 결과, native promoter를 장착한 *hrpL* 유전자는 아주 낮은 발현을 보였으나, *tac*이나 *nptII*가 장착된 *hrpL*유전자는 아주 강한 발현을 보였다(Fig. 6-5). 특히 *nptII*가 장착된 *hrpL*유전자의 발현이 *tac* promoter를 장착한 construct보다 발현이 강하여 *nptII*를 장착한 *hrpL*유전자를 *E. coli* XL1 blue에 형질 전환하여 competent세포로 사용하였다.

다. Promoter 교체에 의한 *E. carotovora* ssp. *carotovora hrpL* 유전자의 *E. coli* 내에서의 발현

*E. carotovora* ssp. *carotovora*의 IVET library를 이용하여 *E. coli*내에서 *hrpL*에 의해 조절되는 유전자를 선발하기 위해서는 *E. carotovora* ssp. *carotovora hrpL*유전자가 *E. coli*내에서 발현되어야 한다. *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 native promoter를 가진 *hrpL* construct를 이용하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* IVET library를 screening 하였으나 false positive clone들만 선발되었다. 따라서 *E. coli* 내에서 발현이 되는 *tac*과 *nptII* promoter를 *E. carotovora* ssp. *carotovora hrpL* 유전자의 promoter부위에 장착하였다. 각기 다른 promoter를 장착한 *E. carotovora* ssp. *carotovora hrpL* 유전자의 *E. coli* 내에서 발현 양상을 Real time RT-PCR을 이용하여 확인하여 본 결과, native promoter를 장착한 *hrpL* 유전자는 아주 낮은 발현을 보였으나, *tac*이나 *nptII*가 장착된 *hrpL*유전자는 아주 강한 발현을 보였다(Fig. 6-5). 특히 *nptII*가 장착된 *hrpL*유전자의 발현이 *tac* promoter를 장착한 construct보다 발현이 강하여 *nptII*를 장착한 *hrpL*유전자를 *E. coli* XL1 blue에 형질 전환하여 competent세포로 사용하였다.

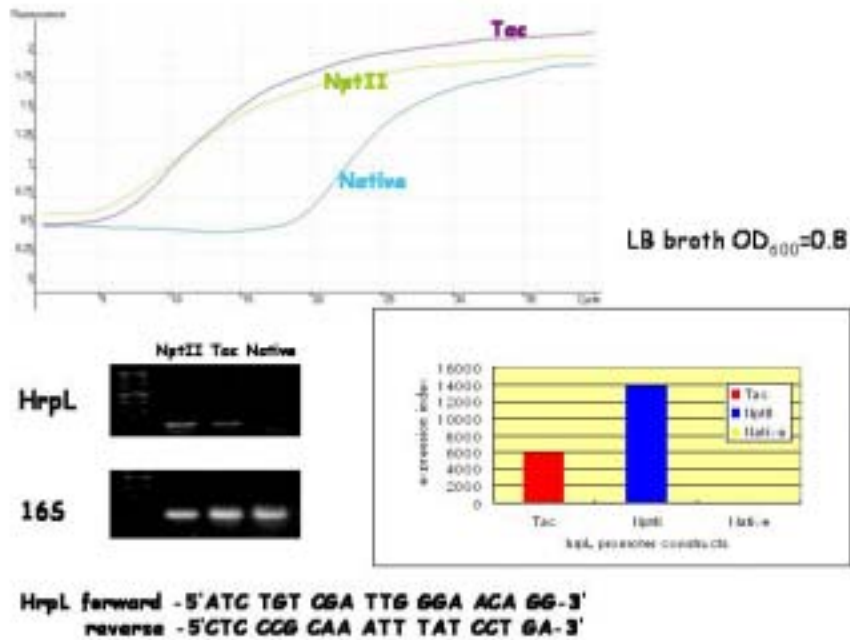


Fig. 6-5. *E. coli*내에서 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* promoter construct들의 발현 양상 비교. Native promoter와 *nptII* 혹은 *tac* promoter로 교체한 *hrpL* 유전자를 pUC18 vector에 클로닝하고 *E. coli*에 형질전환한 다음, 각 promoter construct를 가진 *E. coli*에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR 분석에 의해 *hrpL*의 발현량을 확인하였다.

라. *E. carotovora* ssp. *carotovora* IVET library 조제 및 *hrpL* regulate 유전자 screening

Green fluorescens protein을 마커 유전자로 가지고 있는 IVET plasmid인 pPROBE-NT에 nebulizer를 이용하여 mechanical sharing에 의해 절단된 약 2 kb의 *E. carotovora* ssp. *carotovora* genomic DNA를 클로닝하여 약 30,000개의 IVET library를 조제하였다. 약 100여개의 IVET library colony를 배지에서 생육시켜 plasmid를 추출하여 promoter를 *nptII*로 교체한 *hrpL* 유전자를 가지고 있는 *E. coli* XL1 blue에 형질 전환한 다음 각 형질 전환체를 micro plate에서 생육시킨 후, GFP발현 정도를 fluorescence spectrophotometer에서 측정하여 측정값이 1,000이상 인 것들만 선발하였다. 총 20,000개의 IVET library를 형질 전환하여 84개의 positive clone을 확보하였다(Table 6-1).

IVET를 이용하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35군주의 *hrpL*에 의해 조절되는 유전자 단편을 screening하여 150개 이상의 IVET clone들이 *hrpL*에 의해서 발현이 증가함을 확인하였다. 이 중에서 약 2/3은 *hrpJ*와 상동성이 있는 유전자 단편이 존재하여 *hrpJ* 유전자가 *hrpL*에 의해 가장 강하게 조절되는 유전자임을 알 수 있었다. 이 외에 *pel*, *typA*, large repetitive protein, *yfeD*, LysR-family transcriptional activator, *pehRS* 유전자와 같이 직접 식물병원균의 병원성에 관여하는 유전자도 선발되었으나. 병원성과는 무관한 일차 혹은 이차 대사에 관련된 다수의 유전자들이 선발되었다(Table 6-1). 선발된 유전자들의 *hrp* box 존재 유무를 확인해 본 결과, *hrpJ*와 *prfC* 유전자의 promoter에 *hrp* box consensus sequence가 존재하였으나 다른 선발 유전자에는 존재하지 않았다. 따라서 *hrpJ*와 *prfC* 유전자의 클로닝과 sequencing을 수행하여 이들의 기능을 밝히는 연구를 진행하였다.

**Table 6-1.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 유전자에 의해 GFP가 발현되는 IVET clone들

Clone No.	Gene or function in <i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>	GFP	GFP
		with <i>hrpL</i> (RLU)	without <i>hrpL</i> (RLU)
Pathogenicity related genes			
J11B와 100개	<i>hrpJ</i> , typeIII secretion protein	1500-2000	100-200
J11C	<i>pel</i> , pectate lyase	1671	234
J52A	<i>typA</i> , GTP-binding regulatory protein	586	197
J75B	large repetitive protein	829	87
J128H	<i>yfeD</i> , chelated iron transport system membrane protein	1263	985
J136H	LysR-family transcriptional activator	1211	583
J791B	<i>pehRS</i> , two-component response regulator of virulence determinants	1129	682
Other genes			
J42H	<i>artP</i> , arginine transport ATP-binding protein upstream	528	73
J46C	putative glutathionylspermidine synthase	531	133
J56C	putative membrane protein	501	136
J55E	<i>pyrG</i> , CTP synthase	520	127
J147D	probable aminotransferase	1453	812
J151H	putative peptidase	542	260
J657C	<i>asnB</i> , asparagine synthase B	1167	451
J6512E	<i>zwf</i> , glucose-6-phosphate-1- dehydrogenase	996	321
J746A	<i>mtlA</i> , PTS system, mannitol-specific II abc component	542	92
J562H	<i>sfsA</i> , sugar fermentation stimulation protein A	3692	1701
J54B	<i>degQ</i> , exported protease	590	66
J69A	putative exported protein	516	128
J587A	<i>prfC</i> , peptide chain release factor 3	1280	436
J792A	<i>pdxH</i> , pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	2055	874
J811F	<i>polA</i> , putative DNA polymerase I	502	154
J153A	putative membrane protein	510	221
J321F	thioredoxin reductase	521	252
J741E	nucleoid-associated protein	657	260

---

마. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrpL* regulated 유전자의 클로닝 및 sequencing

상기에서 *hrpL*에 의해 조절되는 유전자들 중 *hrpL* binding consensus sequence를 promoter에 가지고 있었던 *hrpJ* 유전자를 클로닝하고 sequencing 하였다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrpJ* 유전자의 클로닝은 위에서 *hrp* cluster를 함유하고 있는 BAC clone들로부터 BAC clone을 분리하여 *hrpJ* 유전자에 특이한 primer를 조제하여 PCR에 의해 증폭된 단편을 dig로 labeling하여 probe로 사용하여 subcloning하고 sequencing하였다.

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrpJ* 유전자는 promoter에 HrpL binding site인 *hrp* box consensus sequence를 가지고 있었으며, sigma 54 promoter를 지니고 있었고, deduced amino acid는 pI 값이 9.68인 염기성 단백질이었으며 분자량이 44 kDa인 단백질이었다(Fig. 6-6). *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 HrpJ amino acid sequence는 *Pectrobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* HrpJ 단백질과 97% 상동성이 있었으며 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* HrpJ 단백질과 87%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 6-7). 지금까지 HrpJ 단백질은 아직 그 기능이 정확히 밝혀지지 않았지만 hydrophilic 단백질로 typeIII secretion에 관련된 단백질로 알려져 있다.

IVET방법에 의해 *hrpL* regulated 유전자들의 screening에 의해서는 분리되지 않았지만, 다른 *Erwinia carotovora* system에서 *hrpL*에 의해 조절된다고 알려진 *hrpF* operon, *hrpN*, *hrpA*, *hrcN*의 유전자들을 실제로 *Ecc* 35 균주에서 *hrpL*에 의해서 조절되는 지를 알아보기 위해 각 유전자들을 따로 클로닝하였다. *Ecc* 35 균주의 *hrpF* operon과 *hrpN*유전자는 full length 유전자를 클로닝하여 sequencing 분석을 하여 본 결과, 두 균주 모두 promoter 부위에 *hrpL* binding consensus sequence를 가지고 있었다(Table 6-2). 지금까지 분리된 유전자들 중 *hrpL* consensus sequence를 가진 유전자들은 *hrpJ*를 비롯해 *hrpN*, *hrpF*유전자들만이 promoter에 지니고 있었고, IVET에 의해 선발된 *hrpJ* 이외의 대부분의 유전자들은 *hrpL* binding consensus sequence를 가지고 있지 않아서 아마도 artificial factor에 의해 GFP가 증가한 듯하다. 그러나 이들 IVET에 의해 선발된 유전자들 중 *hrp* box가 존재하지 않은 유전자들의 *hrp* dependent regulation에 대한 연구내용은 *hrpL* knock out 돌연변이주를

조제한 다음 이들 유전자들의 발현양상을 *hrpL* 돌연변이주에서 최종 확인한 3  
절에서 논의한다.

Sigma54 promoter

ATTTGCTGACTCTCCGTTGTTGTGCCCCATTTGGCAAAAACGGAAGAG  
CAAGCCTTGTGC  
CAGCCAGAATGATTTTTATCACACTGATTTTTAATCAGTTATTTTT  
CACTTTGCTTTTT  
ATCACGCCACTTGTTGCCAACGTCAGCGGCGTGAAATTGCAAGTTCTT  
GCAATCAGTAAA

HrpL dependent promoter

ACGACATTTAATTCAATCCGCCATCAAATTCGGCCTGCTCCGATGACT  
TCACGTCGGGGA  
ACCCATCCTTTTCTACGTCCACACAGCAATACATTCATACCGCTGCAC  
GTTACACCACG

HrpJ

ACACGTAGCCGATTTATTCAGGATGACATCATGATCAAAAATGCCGAC  
TGTCCCTCCCTCC

MI K M P T V L P S

GCAGCGCCCTGCCGCGCCAGTCGTCTGGATGACGATCCCGTGCCACA  
GGTCGCGGTGC  
S S A L P R P V V V D D D P V P Q V A V  
AAGCAGACAAGTTCTCACCATGCTTCCCCGGTTCGCCGTTATCCACC  
TCGATGGAGGAA  
Q Q T S S H H A S P G S P L S T S M E E  
GTGGCGATGGCATTGCGGAGCAAGCTGAGCGAAGAAGCAAATCGCTG  
AATCGGCGCCAC  
V A M A F G E Q A E R R S K S L N R R H  
ATCGCCAGCAGCCGGACGCACGCGGACCGCCAATGTCGAGCGGATTG  
AGAAACTGACC  
I A Q Q P D A R A T A N V E R I E K L T

GAACTG TTCAGGATGCTGGAAAATCCGTCGCAAAGTACGCTCGATCAG  
CAGCTGAGCCGC  
E L F R M L E N P S Q S T L D Q Q L S R  
CTGCGCGATCTGCTGATGCAGCAAGGTTGCGCCGTCGCTTGAAGCGGTG  
TTGGAAGCCGCA  
L R D L L M Q Q G S P S L E A V L E A A  
GGCAACGATCCGGCGCGCGGCGATATCCTGCTGCGCCACATCCAGCAGC  
AGTCACCCCAA  
G N D P A R G D I L L R H I Q Q Q S P Q  
CAGC  
CCGAACTGACGGCGGCGCAGAAAGTGCCTACAAAAGTTGCATCAGGA  
GAAAGGC  
Q P E L T A A Q K V R Y K S C I R R K A  
CGGAAGTCCGAGCCGGTTTGAATACGGCAACGGCCATTGCGCTGTTCA  
GCACTCAGCCGG  
G S P S R F E Y G N G H C A V Q H S A G  
AACAAAAACAGGCGATGCGCGAGCTGTACTACCAAAAAATCGTACAT  
CAGCAGTCGGCCA  
T K T G D A R A V L P K N R T S A V G Q  
GCGCTGCTGGATTCCCTGCTGGAACGCTTTGACGCCGCGACCTTTTCC  
ATTGGGCTGCGC  
R L L D S L L E R F D A A T F S I G L R  
ACGTTGCAGCGGGCGCTGGCGGCGGATATTGCCTCGCTGACGCCGTCGA  
TTTCGAAAGCC  
T L Q R A L A A D I A S L T P S I S K A  
GTACTCAGCAAAATGCTGAGCAACCTCAACGATTCCCGCCACCTGAGC  
CATACGCTGTCA  
V L S K M L S N L N D S R H L S H T L S  
TCCAGCCAGACGCTGCTCACTCGGCTAGCGAACAAAGTGCCCGCCTTT  
ACGCTCGGTGCC  
S S Q T L L T R L A N K V P A F T L G A  
GTGGAGTTAACCCGCGCCTGATTGGCCTGAGCGCCAACGGTGCCTAT



GCCCGCGACCTG  
 V E L T R R L I G L S A N G A Y A R D L  
 CATAATCTCGGGCGGGAAGTGGCCGGTACGCAGGTGCAACATCAGGCG  
 ATGTTTTTCAGC  
 H N L G R E V A G T Q V Q H Q A M F F S  
 GCCCTGCTGCCGCTCGTCAGCGACCTGCCGCATCCGCTGTGGCGAGATA  
 GTAAAAACCGG  
 A L L P L V S D L P H P L W R D S K N R  
 CAAACGGCGATCCAACCTGATACGCGGCATGATTGGCGATATCGCTCAA  
 TATGAAAAACAG  
 Q T A I Q L I R G M I G D I A Q Y E K Q  
 CAGGCCAAAAGCACTCAACATGATGAACTGACGCAACGTGATACCGCA  
 TCGCGGCAAAT  
 Q A K S T Q H D E L T Q R D T A S R Q N  
 CAGGATGCTCGCGACTCGGATAAGGAGCAGCCATGAATCTGTTGATTA  
 TCTGGCTGAACC  
 Q D A R D S D K E Q P -  
 GCATTGCGCTGAGCGCGATGCAGCGCTCGGAGGTCGTTGGCGCGGTCA  
 TCGTGATGTCCA  
 TCGTCTTCATGATGATCATCCCCTGCCAACCGGACTGATCGATGTGC  
 TGATCGCGCTCA  
 ATATCTGCGTCTCTTCCCTGCTGATCGTGCTGGCAATGTATCTGCCCA  
 AGCCGCTGGCTT  
 TCTCGACGTTTCCGGCCGTGCTGCTGCTGACCACCATGTTCCGGCTGGC  
 GATCTCCATTT  
 CCACCACGC

**Fig. 6-6.** *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 *hrpJ* 유전자의 nucleotide와 deduced amino acid sequence. Putative ribosomal binding site(RBS), sigma factor 54 binding site와 *hrpL* binding site들은 표시하였다.

```

Ecc33      1 ---MINKPTVLPSSALPRP VVVDSDPVPQAVVQOTSEHNSAPGSEPLSTEMEVAIAFG
EccSCC1    1 ---MINKPTVLPSSALPRP VVVDSDPVPQAVVQOTSEHNSAPGSEPLSTEMEVAIAFG
EcaSCRI1043 1 ---MINKPTVLPSSALPRP VVVDSDPVPQAVVQOTSEHNSAPGSEPLSTEMEVAIAFG
Ech        1 MISELNEVSEVLENTSIAVNNHNDHICDQGLIGSPSEKGEARPCHEKSLNDRKHEVAIAFG
Ham       1 -MKTAPVLSGRCQPHPVAINAADKAPATSEVAPSAANCSARRQVDFLEDHHEVETPA

Ecc33      57 EQARRRKSLSRRSIAQOPCARATANVVERIKELTFLPMLENPFGSTLDQQLGRERDLEL
EccSCC1    57 EQARRRKSLSRRSIAQOPCARATANVVERIKELTFLPMLENPFGSTLDQQLGRERDLEL
EcaSCRI1043 57 EQARRRKSLSRRSIAQOPCARATANVVERIKELTFLPMLENPFGSTLDQQLGRERDLEL
Ech        61 SCIEARRKSLNRQISG-DQSHMMANIERIKELTFLPMLENPKHPTLDQQLGRERDLEL
Ham       60 SHVEDSSEGLNQRVVAHRAIERRNLSALFELDELLELERDQHAQESTQWQELQTLQ

Ecc33      117 QGSEFPEAVLRAAGNDPARGDILLREIQGSDQGF--ELTAIQEVRYKSCIRERAGSPS
EccSCC1    117 QGSEFPEAVLRAAGNDPARGDILLREIQGSDQGF--ELTAIQEVRYKSCIRERAGSPS
EcaSCRI1043 117 QGSEFPEAVLRAAGNDPARGDILLREIQGSDQGF--ELTAIQEVRYKSCIRERAGSPS
Ech        120 QGSEFPEAVLRAAGNDPARGDILLREIQGSDQGF--ELTAIQEVRYKSCIRERAGSPS
Ham       120 HSEGFPEAVLRAAGNDPARGDILLREIQGSDQGF--ELTAIQEVRYKSCIRERAGSPS

Ecc33      175 R-FRYGNGECAYOHSAGITGSDARAVLSEKRTSAVGGQLLDSLLERFDAAATPSIGLETLO
EccSCC1    175 AGLNTAIAIALFSTGPKQKQAMRQLYTQKIVHOQSAHALDSLLERFDAAATPSIGLETLO
EcaSCRI1043 175 AGLNTAIAIALFSTGPKQKQAMRQLYTQKIVHOQSAHALDSLLERFDAAATPSIGLETLO
Ech        180 AGLNTAIAIALFSTGPKQKQAMRQLYTQKIVHOQSAHALDSLLERFDAAATPSIGLETLO
Ham       180 AGLNTAIAIALFSTGPKQKQAMRQLYTQKIVHOQSAHALDSLLERFDAAATPSIGLETLO

Ecc33      234 RALAADIASLTPSISIAVLEKMLSELNDSRHLSEHTLSBSOTLLTRLAKMCPAPTLGAVEL
EccSCC1    235 RALAADIASLTPSISIAVLEKMLSELNDSRHLSEHTLSBSOTLLTRLAKMCPAPTLGAVEL
EcaSCRI1043 235 RALAADIASLTPSISIAVLEKMLSELNDSRHLSEHTLSBSOTLLTRLAKMCPAPTLGAVEL
Ech        240 RALAADIASLTPSISIAVLEKMLSELNDSRHLSEHTLSBSOTLLTRLAKMCPAPTLGAVEL
Ham       240 RALADDIASRSESIPRRALCKELSELCQASNISCTLITSEHTLLTRLKCEPTINFTEHEL

Ecc33      294 TRRLIGLSANGATARDLHNLGREVAGTQVQHQAMFFSALLPLVSDLPFLWRDSKINQTA
EccSCC1    295 TRRLIGLSANGATARDLHNLGREVAGTQVQHQAMFFSALLPLVSDLPFLWRDSKINQTA
EcaSCRI1043 295 TRRLIGLSANGATARDLHNLGREVAGTQVQHQAMFFSALLPLVSDLPFLWRDSKINQTA
Ech        300 TRRLIGLSANGATARDLHNLGREVAGTQVQHQAMFFSALLPLVSDLPFLWRDSKINQTA
Ham       300 TRRLIGLSANGATARDLHNLGREVAGTQVQHQAMFFSALLPLVSDLPFLWRDSKINQTA

Ecc33      354 IQLIGMIGDIAQYEKQQAESTQNSHDTTRDTASRQNDARDSDEKQF
EccSCC1    355 IQLIGMIGDIAQYEKQQAESTQNSHDTTRDTASRQNDARDSDEKQF
EcaSCRI1043 355 IQLIGMIGDIAQYEKQQAESTQNSHDTTRDTASRQNDARDSDEKQF
Ech        360 IQLIGMIGDIAQYEKQQAESTQNSHDTTRDTASRQNDARDSDEKQF
Ham       359 NALNCCQGDQ-----

```

Fig. 6-7. Deduced *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 *hrpJ* sequences와 여러 *Erwinia* 세균으로부터 밝혀진 *hrpJ*와의 상동성 비교. Deduced amino acid sequences는 *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1와는 97%, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*와는 87%의 상동성을 보였다. Clustal-W multi alignment tool을 이용하여 상동성을 비교하였다.

**Table 6-2.** 여러 *E. carotovora* subsp. *carotovora* strains의 Hrp boxes 발견된 유전자들의 promoter sequences.

Organism and gene/operon	Promoter sequences and consensus sequences
<i>E. carotovora</i> SCC1	
<i>hrpA</i>	CTTTTAGTTGGA <u>ACT</u> CACTGACC-CGCTCTCC <u>CACTTA</u> AATGAATGAA
<i>hrpC</i>	CGTACGATGGGA <u>ACT</u> GAGCAGGC-AAGAAAATC <u>ACTTA</u> AATGGGGGAG
<i>hrpN</i>	CTGCCACTGGGA <u>ACT</u> GCACGCTT-AGGTTAACC <u>ACTCACT</u> ATTGAGT
<i>hrpJ</i>	TCACGTCGGGGA <u>ACCCAT</u> CCTTT-TCTGCGTCCACACAGCAATACAT
<i>hrcN</i>	AAAAAAGCTGGA <u>ACGGAT</u> GCTCG-CTCAACTCC <u>ACCAAC</u> CGTTACAGA
<i>E. carotovora</i> 35	
<i>hrpN</i>	CATAAGACGGGA <u>ACT</u> GAGCACGCAAGGAAATC <u>ACTTA</u> AATGGGGGA
<i>hrpJ</i>	TCACGTCGGGGA <u>ACCCAT</u> CCTTTTCTGCATCCACATAGCAATACAT
<i>hrpC</i>	TGCTAATGGGA <u>ACT</u> GCACGCCGGGGTTAACC <u>ACTCACT</u> ATTGAGT
<i>hrcN</i>	AAAAAAGCTGGA <u>ACGGAT</u> GGCTCGCTCAACTCC <u>ACCAAC</u> CGTTATAG
<i>hrpA</i>	CTTTCGGTTGGA <u>ACT</u> CACTGACCCGCTCTC <u>ACTTA</u> AATGAATGA
<i>prfC</i>	CCTGACGCGGGA <u>ACGCTAT</u> CCAGAAGTGACGTTCC <u>ACCAAC</u> CGCG
Consensus	GGAACc --16bp space---cCACTcA

Hrp box를 함유하고 있는 각 유전자들의 promoter를 비교해 본 결과, *hrp* gene cluster에서 *hrpJ*, *hrcN*, *hrpN*, *hrpF*, *hrpN* 유전자가 putative *hrp* box를 가지고 있었다(Table 6-2). 이들 유전자들 중에서 *hrpJ* 유전자만이 *hrpL*의 IVET분석에 의해서 선발되었고, 나머지 유전자들은 선발되지 않았다. 그 이유는 아마도 IVET system 자체가 아주 적은 transcript의 차이는 구별하지 못하였기 때문일 수도 있고, 실제로 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서는 *hrpL*이 오직 *hrpJ* operon만 조절하고 다른 유사 *hrp* box를 지닌 유전자들에는 binding을 하지 않아 이들 유전자들을 조절하지 못하는 것이 수도 있다. 또, 한 가지 가능성은 *hrpJ*를 제외한 다른 *hrp* box를 지닌 유전자들은 다른 부가적인 regulatory element가 필요할 가능성도 배제할 수 없다. 현재까지 연구되어진 바에 의하면 이들 *hrp* box 유전자들이 *hrpL* sigma factor에 의해서 조절된다고 알려져 있는데, 과민감반응을 유도하지 못하는 *E. carotovora* ssp. *carotovora*에서는 아마도 *hrpJ* operon만이 *hrpL*에 의해 조절되는 지에 대한 부가적인 연구를 미래에 수행하는 것이 흥미로울 것 같고, 새로운 기작을 밝히는 중요한 재료가 될 것으로 사료된다.

## 제 7 절. 무름병균, *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 alternative sigma factor *hrpL*의 병원성과 과민감 반응에서의 기능 분석

### 1. 서언

많은 식물 병원성 세균은 비기주 식물이나 또는 race 특이적 저항성 기주에서 과민감반응(hypersensitive response, HR)에 의해 빠른 방어 기작과 관련된 programmed cell death을 유도한다(Goodman and Novacky, 1994). 이러한 반응을 유도하기 위해서는 type III secretion system을 구성하는 *hrp*(HR and pathogenicity) and *hrc*(HR and conserved) genes 뿐만 아니라 이러한 통로를 통해서 식물체 세포에 주입되는 Avr(avirulence)과 같은 effector proteins이나 harpin단백질이 필수적이다(Alfano *et al.*, 2000; Collmer *et al.*, 2000a,b; He, 1998; Staskawicz *et al.*, 2001). *hrp/hrc* 유전자들은 *Erwinia amylovora*(Kim *et al.*, 1997; Wei and Beer, 1995; Wei *et al.*, 1992, 2000), *Pantoea stewartii*(Frederick *et al.*, 1993, 2001), *Pantoea herbicola* pv. *gypsophilae*(Mor *et al.*, 2001), *Pseudomonas yringae*(Alfano *et al.*, 2000; Collmer *et al.*, 2000a,b; Huang *et al.*, 1995; Hutcheson, 1999; Rahme *et al.*, 1991a; Xiao *et al.*, 1992), *Ralstoniaolanacearum*(Van Gijsegemet *et al.*, 2000; Vasse *et al.*, 2000),와 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*(Bonas *et al.*, 1991; Rossier *et al.*, 1999)와 같은 대부분의 그람 음성 식물병원균에서 일반적으로 존재한다. 대부분의 무름병을 일으키는 *Erwinia*속 균들은 HR반응을 유도하지 않는다. 하지만, *E. chrysanthemi*(Ham, 1999; Kim *et al.*, 1998)와 *E. carotovora* ssp. *carotovora*(Cui *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 1997; Rantakari *et al.*, 2001)의 연구에 의하면 다른 대부분의 그람 음성 식물병원세균과 같이 무름병 식물병원세균도 *hrp*과 *hrc*유전자를 가지고 있다고 밝혀져 있다. 이러한 무름병균 *Erwinia*의 HR반응을 유도하지 못하는 것은 아마도 pectinase나 다른 효소의 억제 효과나(Bauer *et al.*, 1994), 또는 *hrp*과 *hrc*유전자의 발현이 낮은 이유라고 추정하고 있다. *E. carotovora* ssp. *carotovora*와 다른 대부분의 *E. carotovora* subspecies에서 이들 *hrp/hrc* 유전자의 발현이

낮은 것은 RsmA의 negative effects라고 추정되고 있다(Cui *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 1997). RsmA은 small RNA-binding protein로 *E. carotovora* ssp. *carotovora*와 다른 enterobacteria에서 RNA를 분해한다고 알려져 있다(Chatterjee *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 1995; Romeo, 1998). Rantakari 등(2001)은 *E. carotovora* ssp. *carotovora* strain SCC1에서 9개의 *hrp* genes 과 두 개의 *hrc* genes이 HrpN, HrpC and HrpA 오페론에 배열되어 있다고 보고하였다. 이러한 유전자 배열은 *E. amylovora*(Kim *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2000)와 *E. chrysanthemi*(Ham, 1999; Kim *et al.*, 1998)에 유사하였다. 이들 operon에는 alternative sigma factor인 HrpL(Wei and Beer, 1995)이 binding 할 수 있는 consensus 염기서열인 HRP box들이 존재함을 밝혔다. *E. amylovora*(Wei and Beer, 1995; Wei *et al.*, 2000), *Pantoea stewartii*(Frederick et al., 2001), 그리고 *Pseudomonas syringae*(Xiao *et al.*, 1994)을 비롯한 여러 세균에서 연구된 바에 의하면 복잡한 조절 cascades에 의해 조절되는 *hrpL* 유전자 산물이 *hrp/hrc*의 발현을 조절하는 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있다(Hutcheson *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2000). 하지만 아직까지 *E. carotovora*에서 *hrpL*에 의해 조절되는 유전자들의 종류와 *hrpL*의 돌연 변이주의 표현형이나 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 내에서 역할이 아직까지 명확히 밝혀지지 않았고, HRP box들을 가지고 있는 유전자 operon이 *hrpL*에 의해서 조절되는 지 등에 대한 연구가 진행되지 않아, 본 절에서는 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrpL* 돌연변이주를 조제하여 이들 *hrpL* 돌연 변이주내에서 box를 가진 *hrp/hrc*유전자들의 발현 양상을 IVET vector와 RT-PCR분석을 통해서 밝히고, 또한 2절에서 IVET 분석에 의해 분리된 putative *hrpL* regulated 유전자들 중에 병원성에 관련될 것으로 추정되는 유전자들의 발현 양상을 야생형과 *hrpL* 돌연변이체에서 확인하였다. 이와 더불어 *E. carotovora* ssp. *carotovora* strain 35 *hrpL* 돌연변이주의 병원성과 과민 감 반응에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시균주 및 배양

본 연구에 사용된 배추 무름병균인 *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strain 35균주는 충북에서 무름병 증상을 보인 배추에서 분리된 균

주로서 충북대학교 식물외학과 식물세균병학 실험실에서 주로 균주의 생태학적 혹은 분류학적 연구가 주로 이루어왔던 균주이다. 배추 무름병균은 30℃에서 *E. coli* 균주는 37℃에서 LB 배지(Bacto-trypton 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, distilled water 1L, pH 7.5)에 배양시켰다. BAC clone들은 Luria Bertani broth(LB) 혹은 IPTG, X-Gal, 그리고 12.5  $\mu\text{g}$  chloramphenicol  $\text{ml}^{-1}$ 을 첨가한 LB agar에서 생육하였다. 선별 과정에서 배지에 첨가하는 항생물질은 Tetracycline(12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Ampicillin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Kanamycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 사용하였다(Sambrook *et al.*, 1989). 본 실험에 사용한 모든 균주는 -80℃에 보관하여 사용하였다.

#### 나. DNA 조작.

일반적인 DNA 조작방법은 Ausubel 등(1989)과 Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 수행하였다. 제한효소와 modifying 효소의 사용 방법은 제조사의 사용방법에 준하여 실시하였다. Agarose gel에서의 DNA fragments Zymoclean gel DNA recovery kit(Zymo Research Inc., Orange, CA)을 이용하여 분리 정제하였다. Southern 혹은 colony hybridization은 non-radioactive Genius system(Roche Biochem. Inc. Indianapolis, IN)을 사용하여 실시하였다. Nucleotide 와 deduced amino acid sequences는 University of Wisconsin Genetic Computer Group(GCG) packages와 NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 그리고 Expasy(<http://www.expasy.hcuge.ch/>) 등의 방법을 이용하여 분석하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 균주와 다른 병원균과의 *hrp* cluster와 phylogenetic relationship은 CLUSTAL-W program, WORKBENCH(<http://www.ch.embnet.org>)을 이용하여 수행하였다. Deduced *hrp* 유전자 sequences의 alignment는 BCM Search Launcher의 Multiple Sequence Alignments를 이용하여 수행하였다(<http://www.bcm.tmc.edu/>). 본 연구에 사용된 oligonucleotide primers들은 주식회사 Bioneer(대전, 대한민국)에서 주문하여 조제하였다(Table 7-1).

Table 7-1. RT-PCR 분석에 사용한 각 *hrp* 유전자들의 primer 염기서열

Genes	Primer sequences for RT-PCR analysis
<i>hrpL</i>	F: 5'-ATCTGTCGATTGCGAACAGG-3' R: 5'-CTCCCGCAAATTTATCCTGA-3'
<i>hrpJ</i>	F: 5'-AACGGCGATCCAACGATAAC-3' R: 5'-ACAGATTCATGGCTGCTCCT-3'
<i>hrpA</i>	F: 5'-GAGAGCGGGTCAGTGAGTTC-3' R: 5'-AAACAACGTACGGCCTTTTG-3'
<i>hrpG</i>	F: 5'-GACGTTTTGGCCGTTACCTA-3' R: 5'-CGATGCGATGAAGCTGATTA-3'
<i>hrpN</i>	F: 5'-AACTGAGCACGCAAGGAAAT-3' R: 5'-AGCCGCATTTTGTGAAGACT-3'
<i>hrcN</i>	F: 5'-CCGTTTCAGATCGTTCAGGT-3' R: 5'-AAGAAGGTTGCGTCTGCATT-3'
<i>prfC</i>	F: 5'-CGGTTATGCTTGGCTTTAGG-3' R: 5'-AGGGGAGCAAGGGAATATGT-3'



다. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 돌연변이주 조제

*Ecc* 35 균주의 *hrpL* 돌연변이주를 조제하기 위해 pCRII에 partial *hrpX*, *hrpJ* 유전자와 full length *hrpL* 유전자를 지닌 plasmid를 *hrpL* open reading frame(ORF)의 unique *MfeI* site에 kanamycin 저항성 유전자를 가진 1 kb *EcoRI* fragment인 plasmid pRL648(Elhai and Wolk, 1988)로부터 분리하여 삽입하여 *hrpL* 돌연변이주에 조제에 사용하였다. Kanamycin marker 유전자를 ORF에 삽입하여 돌연변이시킨 *hrpL* 유전자를 broad host range vector인 pRK415에 옮긴 후 helper plasmid pRK2013을 이용하여 *Ecc* 35 균주에 옮겼다. Kanamycin 저항성 *Ecc* 35 transconjugant.을 *hrp* inducing medium에서 생육시키면서 두 번 새로이 계대 배양한 다음 kanamycin이 첨가된 LB agar 배지에서 putative 돌연변이주들을 선발하였다. 선발된 putative mutants들은 kanamycin 저항성과 tetracycline에 감수성인 콜로니를 돌연변이주로 간주하여 genomic DNA를 putative mutant들로부터 분리하여 dig-labeled *hrpL* probe로 southern hybridization에 의한 확인하거나 *hrpL* primer를 이용하여 genomic DNA를 template로 PCR하여 최종적으로 *hrpL* 돌연변이주들을 선발하였다.

라. Real time RT-PCR을 이용한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrp* 유전자의 발현 분석

*Ecc* 야생균주와 *hrpL* 돌연변이주 균주에서 LB 배지와 *hrp* inducing 배지에서 optical density가 600 nm에서 0.1과 0.8이 되게 생육시킨 다음, TRI reagent™ 방법으로 total RNA를 분리하였다(Molecular Research Center). 분리된 total RNA를 template로 *Ecc hrp* 유전자의 발현 정도를 Rotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system(Corbett Research)와 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit(Qiagen)를 사용하여 측정하였다. *Ecc hrp* 유전자, *hrpL*, *hrpN*, *hrpJ*, *hrcN*, *hrpF*와 16S rRNA를 positive control로 사용하였고, 이들 유전자들의 발현양상을 알아보기 위해 각 유전자들의 primer는 약 200 bp이하로 증폭되게 하여 조제하여 사용하였다(Table 7-1). 각 total RNA의 양은 500 ng를 이용하였으며, 다음의 프로그램을 사용하여 RT-PCR하였다.: 30min at 50°C for reverse transcription; 15min at 95°C for HotStarTaq DNA polymerase activation; 18 cycles of 15s at 94°C, 30s at 55°C, 30s at 72°C 30s at 72°C for extension step. 기기에 장착된 프로그램을 이용하여 결과를 분석하였으며, 전기영동에 의해서도 발현 정도를 확인하였다.

**Table 7-1.** IVET에 의해 선발된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 유전자들과 hrp box를 함유하고 있는 *hrp* 유전자들의 *hrpL* 유전자 존재 유무에 의해 GFP 발현 양상

Gene of <i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> 35	GFP with <i>hrpL</i> (RLU)	GFP without <i>hrpL</i> (RLU)
<i>hrpJ</i>	1500-2000	100-200
<i>pel</i>	1671	234
<i>typA</i>	586	197
large repetitive protein	829	87
<i>yfeD</i>	1263	985
LysR-family transcriptional activator	1211	583
<i>pehRS</i>	1129	682
<i>hrpN</i>	58 ± 5	49 ± 5
<i>hrcN</i>	65 ± 8	48 ± 2
<i>hrpG</i>	49 ± 1	52 ± 2
<i>hrpA</i>		
control	50 ± 3	50 ± 1

마. IVET system을 이용한 putative *hrpL*-regulated genes의 발현양상

2절에서 putative *hrp* box를 가지고 있다고 알려진 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 *hrp* 유전자들과 IVET에 의해 분리된 유전자들 중 병원성에 관련된 유전자들의 promoter부위를 pPROBE-NT vector에 PCR primer를 조제하여 클로닝하였다. 선발된 클론들로부터 plasmid를 분리하여 *nptII* promoter를 장착한 *hrpL*유전자와 정확한 *E. carotovora* ssp. *carotovora* promoter sequence가 존재하는 지를 확인하였다. 각 유전자들의 조합을 지닌 대장균들을 LB가 들어있는 microtiter plate로 옮겨 배양하면서 주어진 시간에 GFP값을 micro plate fluorescence reader(FLX800, BIO-TEK instruments Inc.)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 528 nm에서 GFP를 측정하였다.

바. 무름병 병원성 검정 및 과민감 반응 검정.

담배(Xanthi 품종) 종자를 70% ethanol로 2분 담그고, 1% sodium hypochlorite에 30분간 담가서 표면 살균하고, 멸균수로 여러 번 세척하여 10 ml 1/2 MS medium이 담긴 microtiter plates(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)에 파종하였다. 종자는 14시간 광 조건과 25-28°C의 성장상에서 생육시켰다. 파종 후 3주 후에 LB 배지에서 28°C에서 36시간 배양한 식물 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 35균주와 *hrpL* 돌연변이주를 멸균수에 약  $1 \times 10^8$  cfu/ml이 되게 현탁하여 각 담배 잎에 5  $\mu$ l씩 접종하고 2일 후에 식물의 무름 증상 유무를 관찰하여 무름병 발병도를 조사하였다. 또한 시판되고 있는 감자를 70% ethanol로 표면 살균한 다음, 2 cm 정도 두께로 절단한 다음, 중앙에 멸균된 cork borer로 상처를 낸 다음 10  $\mu$ l의 무름병균 현탁액을 떨어뜨린 다음 2일 후에 무름증상의 심각도를 무름 증상이 난 돌레를 측정하여 조사하였다.

본 연구에 사용된 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 과민감 반응 유무를 확인하기 위하여, 상기의 방법으로 살균된 xanthi를 상토에 2달 생육시킨 완전 전개된 담배 잎과 pinto bean를 상토에서 1달 생육시킨 다음 완전 전개된 잎에 멸균된 증류수에 희석된 무름병균을 syringe를 이용하여 infiltration한 다음 1-2일 이내에 일어나는 괴사 증상을 과민감 반응으로 간주하였다.

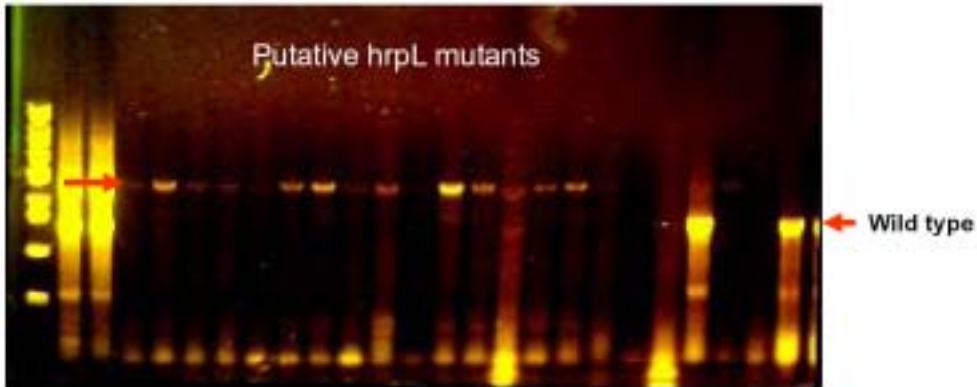
### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *E. carotovora* ssp. *carotovora* *hrpL* 돌연변이주 조제

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 여러 putative kanamycin resistant *hrpL* 돌연변이주를 선발하여 genomic DNA를 분리하여 *hrpL* primer로 PCR을 통해 돌연변이 유무를 확인하였다(Fig. 7-1). 야생형 무름병균에서 분리한 genomic DNA에서는 약 1.4 kb의 *hrpL* PCR product가 증폭된 반면에, 여러개의 putative *hrpL* 돌연변이주에서는 약 2.3 kb 크기의 *hrpL* PCR product가 증폭이 되어 *hrpL* open reading frame에 kanamycin이 유전자가 야생형의 *hrpL* 유전자와 치환이 되었음이 확인되었다(Fig. 7-1). 이 중에서 한 개의 돌연변이주를 최종 선발하여 *E. carotovora* ssp. *carotovora* strain 35 균주의 *hrpL* 돌연변이주로 선발하여 본 연구에 사용하였다.

#### 나. *hrpL* 돌연변이주에서 *hrp* box를 가진 유전자들의 발현 양상.

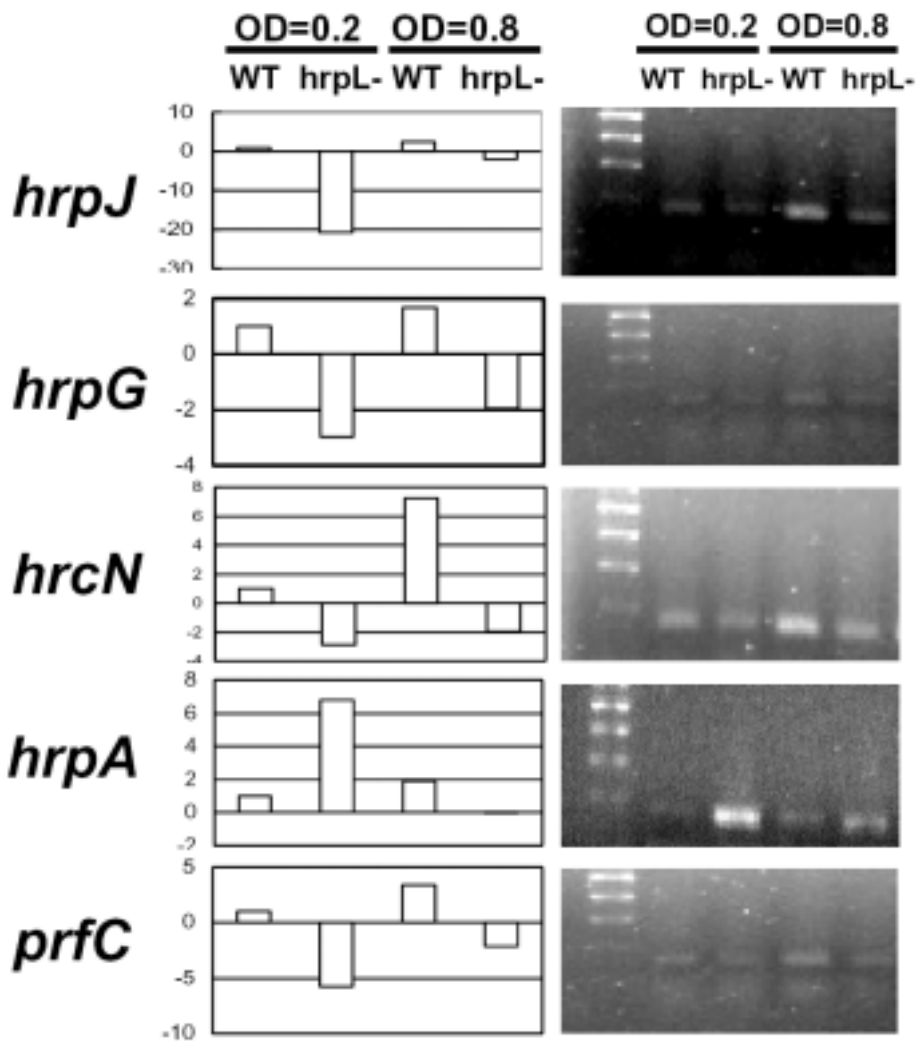
2절에서 IVET을 이용한 방법에 의해 분리된 *hrpL*에 의해 조절되는 유전자들이 실제로 *hrpL*-dependent regulation되는 지를 알아보기 위해 두가지 방법에 의해 확인하였다. 첫 번째로, IVET system을 이용하여 *hrp* box를 가진 유전자들의 promoter부위를 cloning하여 *nptII-hrpL*이 발현되고 있는 대장균에 형질전환하여 *hrpL*의 존재 유무에 따라 GFP발현 양상을 비교하였다. 두 번째 방법으로 wild-type과 *hrpL* 돌연변이주에서 total RNA를 분리하여 여러 유전자들의 RT-PCR analysis를 통해 IVET에 의해 분리된 유전자들이 *hrpL*에 의해 조절받는 지를 확인하였다.



**Fig. 7-1.** Putative *hrpL* 돌연변이주들의 PCR analysis. Wild-type(마지막 lane)과 여러 putative *hrpL* 돌연변이주들로부터 genomic DNA를 분리하여 *hrpL* specific primer를 이용하여 PCR을 수행하여 *hrpL* 돌연변이주를 확인하였다. Wild-type의 PCR product의 크기는 1.4 kb인 반면 대부분의 *hrpL* 돌연변이주는 2.3 kb의 PCR product를 보였다.

2절의 IVET의 결과와 같이 *hrpJ* promoter가 *hrpL* 유전자가 존재하지 않을 때는 GFP값이 234 RLU이었으나, 대장균에 *hrpL*이 over expression 되었을 때 훨씬 높은 GFP값 1671 RLU를 보여주었지만, 다른 *hrp* box를 가진 *hrpN*, *hrcN*, *hrpG* 유전자의 promoter를 지닌 IVET vector의 GFP값은 *hrpL*의 존재 유무에 상관없이 아주 낮은 basal level의 GFP값을 나타내었다(about 50 RLU)(Table 7-1). 이러한 결과는 2절의 IVET 결과를 확인하는 결과였다. 즉 지금까지 *P. syringae*나 *E. chrysanthemi*의 연구 결과에 의하면 *hrpL*에 의해서 *hrp* cluster 유전자들 중에 *hrp* box를 지닌 유전자들이 조절된다고 보고가 되어 있으나, 본 연구에 의한 결과로 보면 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주는 지금까지 보고된 것과는 달리 오직 *hrpJ* operon만 *hrpL*에 의해서 조절되고 다른 *hrp* box를 지닌 유전자들은 *hrpL*에 의해 조절되지 않음을 암시하고 있다. *Ecc*와 *P. syringae* 병원균간의 차이점 중의 하나가 *P. syringae* 병원균은 과민감 반응을 유도하는 반면에 *Ecc* 균주들은 과민감 반응을 유도하지 않아 아마도 *P. syringae* 균주의 harpin을 암호화하는 *hrpN* 유전자는 *hrp* box를 가지고 있고 *hrpL*에 의해 조절되지만, *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 경우 *hrpN* 유전자가 *hrp* box를 가지고 있지만 발현되지 않을 것이라는 추정도 가능하다. 아마도 *hrp* box이외에 *hrpJ* 유전자의 promoter에만 특이적으로 존재하는 다른 consensus sequence(예를 들어 *hrpN* binding site)가 *E. carotovora* ssp. *carotovora*의 *hrpL*에 의해 인식이 되기 때문에 *hrpJ*만이 *hrpL* alternative sigma factor에 의해 조절된다고 추정하고 있다.

좀 더 심도있게 이들 *hrp* box를 가진 유전자들이 실제로 *hrpL* 돌연변이주에서 어떻게 발현되는지 또한 2절에 IVET에 의해 선발된 *hrp* box를 가지지 않은 유전자들 중 병원성에 관련된 유전자들의 발현 양상을 *hrpL* 돌연변이주에서 비교하였다(Fig. 7-2). *hrpJ*의 발현량은 *hrpL* 돌연변이주에서 델타-델타 Ct 값이 약 20배 정도 발현량이 감소하여 현저히 *hrpJ*의 발현량이 *hrpL* 돌연변이에 의해서 감소하였고, 또한 IVET에 의해 선발된 *prfC* 유전자의 발현량도 현저히 감소하여 *hrpL* 돌연변이주에서 약 6배 정도 감소하였다. 하지만, *hrp* box를 가지고 있는 *hrcN*와 *hrpG*의 경우 약 2-3배정도 발현량이 *hrpL*에서 감소하였다. 그러나 *hrpA*의 경우에는 *hrpL* 돌연변이주에서 발현량이 오히려 증가하는 것으로 보아 이들 유전자들의 발현량에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 추정된다. harpin을 암호화하고 있는 *hrpN*의 transcript는 전혀 발현되지 않았다(data not shown).



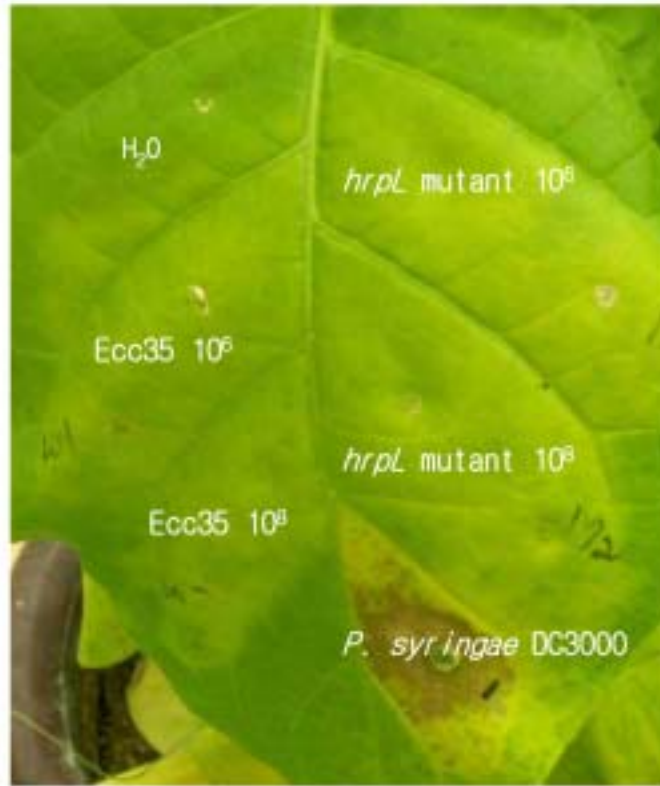
**Fig. 7-2.** Putative *hrpL*-regulated 유전자들의 real time RT-PCR 분석. Hrp-inducing medium에서 OD600 nm에서 wild-type과 *hrpL* 돌연변이주들을 각각 흡광도 0.2와 0.8이 되게 생육시킨 다음 total RNA를 분리하여 putative *hrpL*-regulated 유전자 specific 유전자를 이용하여 RT-PCR을 분석하였다. *hrpN* transcript는 전혀 detection되지 않았다.

현재 이들 *hrpL* 돌연변이주와 wild-type에서 total RNA를 분리하여 이들 IVET에 의해 분리된 병원성에 관련된 유전자들의 발현 양상과 *hrp* box를 지닌 유전자들의 발현양상을 비교 분석하는 연구가 현재 진행 중이다. 따라서 이들 결과가 종합되면 *Ecc* 35 균주의 어떤 유전자들이 *hrpL*에 의해서 조절되는지를 알 수 있을 것으로 기대된다.

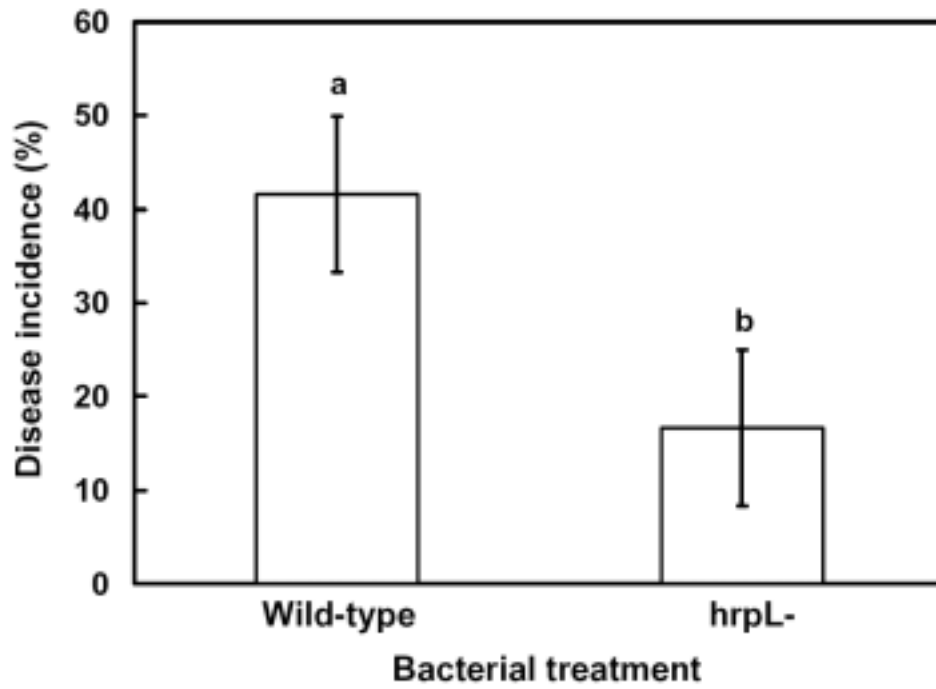
#### 다. *hrpL* 돌연변이주의 병원성

조제된 *hrpL* 돌연변이주의 병원성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 먼저 과민감 반응의 생성 유무를 잎이 완전히 전개된 담배 잎에 infiltration하여 24-48시간 후에 과민감 반응 생성을 관찰하였으나, wild-type 뿐만 아니라 *hrpL* 돌연변이주들도 담배에 과민감 반응을 나타내지 않았지만, 오직 positive control로 접종한 *P. syringae* 접종구에서는 과민감 반응을 나타내었다(Fig. 7-3). *In vitro* MS 배지에서 생육시킨 어린 담배 잎에 *Ecc* 35 균주를 drop 접종법에 의해 접종하였을 경우 무름 증상을 나타내어, *hrpL* 돌연변이주를 담배 잎에 접종하여 wild-type에 비교하여 무름병 발병도를 비교하였다. Wild-type 균주는 약 40%의 담배가 무름 증상을 보인 반면에, *hrpL* 돌연변이주를 접종하였을 때는 약 15%정도의 무름 증상을 보여 병원성이 약화됨을 확인하였다(Fig. 7-4). 이러한 현상은 *hrpL*에 의해 적어도 *hrpJ* operon에 관련된 유전자들의 발현이 현저히 감소되어 여러 *hrp* 유전자들이 제 기능을 하지 못한 이유일 것으로 추정된다. 특히 *hrpJ* operon 유전자들은 typeIII secretion system을 암호화하는 유전자들이 많이 존재하는 부위로서 이들 *hrp* 유전자들의 돌연변이주들이 실제 식물체에서 생존하는 능력이 크게 감소하여 병원성이 감소된 것으로 사료된다. 현재 여러 가지 식물 시스템을 이용하여 *hrpL* 돌연변이주의 병원성 감소 유무를 확인 중이다.





**Fig. 7-3.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 wild-type과 *hrpL* 돌연변이주들의 담배에서의 과민감 반응. 2달 동안 생육시킨 담배(Xanthi)의 완전 전개된 잎에 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 wild-type과 *hrpL* 돌연변이주, *P. syringae* DC3000 현탁액( $1 \times 10^8$ cfu/ml), 대조구로 멸균수를 syringe infiltration에 의해 접종하였다. Infiltration한 후 48시간 후에 괴사 증상이 나타난 것을 과민감 반응으로 조사하였다.



**Fig. 7-4.** Wild-type과 *hrpL* 돌연변이주의 담배에서 무름병 발병도. 담배 (Xanthi)를 *in vitro* MS 배지에서 2주 동안 microtiter plate에서 생육시킨 후, *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 wild-type과 *hrpL* mutant 세균 현탁액( $1 \times 10^8$  cfu/ml) 5  $\mu$ l를 접종한 다음 2일 후에 무름증상을 일어난 담배 잎의 발병도를 측정하였다.

## 제 8 절. Homoserine lactone을 분해하는 미생물을 이용한 무름병 방제 및 방제 target 제시.

### 1. 서언

그람 음성 세균은 quorum sensing 기작(QS)에 의해 세균의 밀도에 반응하여 특이적인 유전자들의 발현을 조절한다. 많은 그람 양성균은 acyl-homoserine lactones(AHLs)이라는 아주 작고 쉽게 확산되는 신호물질을 quorum sensing에 이용한다(Fuqua *et al.* 2001 Whitehead *et al.* 2001). 이러한 분자는 자유롭게 세포막을 이동하고 외부 환경에 집적된다. 이러한 분자가 한계 농도에 도달하게 되면, AHLs은 전사 수준에서 여러 가지 유전자를 활성화시키는 신호분자로 작용한다(Fuqua *et al.* 2001). AHLs은 병원균에서 virulence 유전자(Pirhonen *et al.*, 1993)를 유도하다던지 항생물질 생산(McClean *et al.*, 1997; Pierson *et al.*, 1994)에 관련된 유전자들의 유도 등과 관련된 다양한 생물적 기능을 조절한다고 알려져 있다. 이러한 QS은 해양에서 식하는 *Vibrio fischeri*에서 처음 보고되었으며, 이 세균의 bioluminescence의 조절하는 중요한 신호물질로 알려져 있다. 이들 QS 기작은 두 개의 조절 유전자가 관여하는데, LuxI 유사 단백질들이 다양한 형태의 acyl homoserine lactone의 생성을 유도하고 이렇게 축적된 AHL분자는 transcriptional activator 단백질인 LuxR 유사 단백질과 상호작용에 의해 target 유전자를 활성화한다고 알려져 있다.

식물관련 미생물과 식물의 상호작용에서도 AHL 유사 물질들이 생성되고 이들에 의해 growth inhibition, nodulation, 및 항생물질 생산 등 다양한 작용 범위를 가지고 있다. 무름병균인 *Pectobacterium*속 균은 pectate lysases, polygalaturonases, cellulase 및 protease와 같은 extracellular 효소를 생산하여 식물체 조직을 파괴한다(Charterjee *et al.*, 1995). *Pectobacterium* 속에서 quorum sensing에 의해 병원성에 관련된 효소가 조절되는 이유는 아마도 충분한 병원균의 수가 증식된 후에 이들 병원성 관련 효소를 분비함으로써 식물 방어를 피하게 되어 식물체에 무름증상을 일으키기 때문일 것으로 추정된다(Dong *et al.*, 2000). 무름병균에서 이러한 효소의 발현을 조절하는 quorum sensing에 관련된 유전자로서 *expR*과 *expI*유전자가 관여하여 조절된다.

최근에 특정 세균에 의해 이들 AHLs의 생물적으로 분해됨이 보고되었다. *Variovorax paradoxus* strain들이 AHLs의 acyl amide bond를 절단하여 sole carbon과 nitrogen 원으로 이용할 수 있다고 보고되었다(Leadbetter and Greenberg, 2000). 이러한 AHL을 분해할 수 있는 lactonase genes 유전자들은 널리 *Bacillus*속 균주에 분포되어 있다(Dong *et al.*, 2002). 예를 들어, 토양 서식균인 *Bacillus* isolate 240B1는 *aiiA* 유전자에 의해 암호화된 lactonase를 통해 AHL의 lactone bond를 가수분해함으로써 AHLs을 불활성화시킬 수 있다(Dong *et al.*, 2000). 최근에 *Arthrobacter* sp. strain IBN110(Park *et al.*, 2003)과 *Pseudomonas* strain PAI-A(Huang *et al.*, 2003)도 homoserine lactone을 분해하는 능력이 있다고 보고되었다.

AHLs이 병원성 인자의 생성을 조절한다고 알려진 식물과 동물 세균 병원균에서 AHL을 생물적으로 분해하여 이들 병원균에 의한 병을 방제할 수 있는 가능성이 제시되었다(Dong *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2002; Fray, 2002; Reimmann *et al.*, 2002). 이러한 가능성은 무름병균 연구에 의해서도 제시되었다. *E. carotovora*에 의해 식물 세포의 무름증상에 관여하는 exoenzymes의 분비는 AHL 생산에 의해 조절된다. *E. carotovora*에서 AHL 생합성에 관여하는 유전자인 *expI* 돌연변이주의 병원성 상실되는데, 이 돌연변이주에 외부에서 AHL을 추가했을 경우 병원성이 회복되었다(Pirhonen *et al.*, 1993). 무름병균에 *Bacillus aiiA* 유전자를 발현시킨 결과, AHLs의 수준이 감소하고 무름 증상이 감소되어 병원성이 약해짐을 밝혀졌다(Dong *et al.*, 2000). *AiiA* 유전자를 발현시킨 형질전환 담배도 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 대해 강한 저항성을 보였다(Dong *et al.* 2001). 하지만 어떤 신호 전달 체계가 관여하여 *expI*에 의해서 생성된 AHL이 무름증상에 관여하는 exoenzyme의 생성을 유도하는지 등에 대해서는 아직까지 밝혀진 바 없다.

AHL의 생물적 분해에 의해 식물 무름병균의 방제 target를 제시하기 위해 먼저 AHLs를 분해하는 미생물을 분리하였다. 본 연구에서는 AHLs분해 미생물을 분리하기 위해 phenazine을 생성하는 생물적 방제균인 *Pseudomonas chlororaphis* O6을 공시균주로 이용하여 phenazine 생성을 억제하는 미생물을 선발하였다. 그리고 방제 대상 그람 음성 식물세균병으로는 벼 세균성벼알마름병균인 *Burkholderia glumae*와 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 35 균주를 이용하였다. 세균성 벼알마름병균은 주 병원성 인자로 AHL에 의해 매개되는 신호전달체계에 의해 toxoflavin이라는 독소를 생산한다

(Yoneyama *et al.*, 1998). 본 절에서는 분리된 AHL분해 미생물의 특성과 이들 미생물을 이용한 식물세균병 방제 가능성을 제시하고, AHL을 분해하는 *aiiA* 유전자를 무름병균에 과다 발현시켜 병원성 인자의 발현에 관련된 단백질을 동정하여 AHL에 의해 매개되는 병원성 관련 단백질을 동정하여 새로운 무름병 방제 target를 제시하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시균주, 배지, 및 배양조건

본 절에서 사용된 균주는 토양에서 분리된 AHL분해 균주인 *Acinetobacter* sp. C1010와 Dr. Dong, Singapore(Dong *et al.* 2000)에게서 분양받은 AHL 분해 균주인 *Bacillus* sp. 240B1, phenazine 생성 균주인 *P. chlororaphis* O6, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35와 세균성 벼알마름병균인 *B. glumae*를 사용하였다. 모든 세균 strain들은 Luria-Bertani(LB) broth나 agar 배지에서 28°C에서 배양하였다(Ausubel *et al.*, 1989). AHL 물질을 detection할 수 있는 균주인 *Chromobacterium violaceum* CV026 와 *Agrobacterium tumefaciens* NT-1들은 Dr. P. Williams(U. Nottingham, Nottingham, UK)로부터 분양받았다(McClean *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1997). 장기간의 균주보관은 15% glycerol(v/v)이 첨가된 LB 배지에서 -70°C에서 보관하였다.

### 나. AHLs분해 미생물 screening

*Bacillus* sp. 240B1 strain 을 AHL 분해 미생물을 분리하는 positive control로 사용하였다. 다양한 지역에서 채취한 근권 토양을 멸균수에 현탁하고(1 g/10 ml), 토양 입자를 제거하기 위해 원심분리한 다음 상정액을 회석하여 LB agar나 PDA(Potato dextrose agar, Difco Inc., Detroit, MI) 배지에 도말하였다. 다른 콜로니를 보인 균주들을 단 콜로니 분리에 의해 순수분리하였다. 순수분리된 isolates들은 5 ml LB broth에서 150 rpm, 28°C에서 24시간동안 배양한 다음 세균을 원심분리에 의해 회수하였다. 각 세균 침전물은 동량의 멸균수로 현탁하여 10  $\mu$ l씩 LB agar 배지에 떨어뜨린 후 dry시켰다. *P. chlororaphis* O6 세포는 OD600 nm에서 0.4가 되게 5 ml LB broth에서 배양한 다음, 원리분리로 세포를 회수하고 동량의 멸균수로 현탁하였다. *P.*

*chlororaphis* O6 현탁액을 이미 접종된 tester 세균의 중앙에 떨어뜨리고 28℃에서 2일 동안 배양하였다. O6 균주의 phenazine 생성 유무를 판단하게 해주는 오렌지 색깔을 내지 않은 균주를 AHL 분해 균주로 선발하였다.

다. AHL 분해 미생물 C1010의 동정.

C1010균주의 형태적 특징은 transmission electron microscopy(TEM)에 LB 배지에서 28℃에서 24시간 배양한 균주를 이용하여 관찰하였다. TEM 관찰을 위해 C1010 세포를 phosphotungstic acid(PTA, pH 7.2)로 염색하고 JEM-1010(JEOL Ltd., Tokyo, Japan) 현미경을 이용하여 관찰하였다. C1010균주의 16S rDNA sequence 분석을 위해서, Ausubel 등(1989)의 방법을 통하여 염색체 DNA를 CTAB-DNA 방법으로 분리하였다. 16S rDNA sequence는 염색체 DNA를 template로 하여 다음과 같은 universal primers, forward 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and reverse primer 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'을 이용하여 Weisburg 등(1991)에 의해 사용된 PCR 방법에 의해 증폭하였다. PCR 반응은 GenAmp 2400thermal cycler(Perkin Elmer, San Jose, CA)에서 preMix(Bioneer Inc., Daejeon, Korea)을 이용하여 수행하였다. 1.4 kb PCR product 정제하여 pGEM T-easy vector(Promega, Madison, WI)에 클로닝하였다. PCR inserts를 함유하고 있는 recombinant plasmids는 Bioneer Inc.(Bioneer Inc., Daejeon, Korea)에서 시판되고 있는 miniplasmid purification system을 이용하여 정제하였다. PCR product insert는 전남대학교 기초과학연구 광주분소에서 ABI1301 DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 dye terminator 방법을 이용하여 분석하였다. 얻어진 sequences GenBank database에서 검색된 다른 16S rRNA sequence와 정렬하였다. Web-based ClustalW program을 strain C1010균주의 phylogenetic tree를 작성하는데 사용하였다. C1010 strain의 16S rRNA의 염기서열은 GenBank accession number AY366481에 기탁되었다.

라. *Acinetobacter* sp. C1010와 *Bacillus* sp. 240B1의 HSL 분해 bioassay.

C1010과 240B1의 AHL-분해 능력은 Dong 등의 방법에 준하여 실시하였다(2000). N-hexanoyl-L-homoserine lactone(HHSL)과 N-octanoyl-L-homoserine lactone(OHSL)은 Sigma-Aldrich(Denver, CO, USA)로부터 주문

하였다. *P. chlororaphis* O6와 *B. glumae*로부터 AHLs은 50 ml LB에서 정제기의 세포로부터 추출하였다. 세포는 15,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 제거한 다음, 세포 상정액을 동량의 ethyl acetate로 추출하였다. Organic fraction은 수집하여 fume hood하에서 건조시키고, 1 ml의 ethyl acetate에 녹였다 (Shaw *et al.*, 1997). 10 ml LB에서 28℃의 온도에서 24시간 생육시킨 C1010 균주와 240B1균주를 동량의 여러 농도를 첨가한 fresh LB와 혼합하여 최종 농도를 40 μl가 되게 조절하였다. 혼합액은 28 ℃에서 주어진 시간동안 배양하여 60분간 UV등 아래에서 살균하였다.

C1010의 AHL 분해 능력은 또한 *P. chlororaphis*와 *B. glumae*와 공동배양에 의해서도 결정하였다. *P. chlororaphis* O6, *B. glumae*, 그리고 *Acinetobacter* sp. C1010 세균은 5 ml LB broth에서 14 시간동안 생육시킨 다음 원심분리하여 세포를 회수하여 다시 fresh LB broth에서 OD600 nm에서 0.1이 되게 현탁하였다. *P. chlororaphis* O6 또는 *B. glumae* 현탁액 10 μl를 단독 혹은 *Acinetobacter* sp. C1010 현탁액 10 μl와 공동으로 50 ml fresh LB broth에 접종하였다. 주어진 시간에, 세포배양액으로부터 상기의 방법을 통해 동량의 ethyl acetate로 AHLs를 추출하였다.

반응액에 남아있는 AHL의 양을 측정은 전에 보고된 방법에 준하여 실시하였다(Dong *et al.*, 2000). 멸균된 cell-free 혼합액을 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside(X-Gal, 40 μg/ml)가 첨가된 minimal agar 배지의 한 쪽 끝에 spotting한 다음, 0.6 μl의 지수기까지 키운 AHL-indicator strain인 *A. tumefaciens* NT-1을 연속적으로 spot하였다. Agar strips 은 28℃에서 24시간동안 배양한 다음 추출액을 접종한 부위로부터 마지막 blue colony로 변한 부위까지의 거리를 측정하였다(Dong *et al.*, 2000). 남아있는 AHLs의 상대적인 양은 이미 알려진 AHL의 양과 색깔이 변한 거리와의 방정식에 의해 측정하였다(Dong *et al.*, 2000).

AHL분해를 증명하기 위해, Shaw 등(1997)이 사용했던 TLC방법으로 분석하였다. Ethyl acetate 추출물에서의 AHLs은 C18 reversed-phase silica plates(Aldrich Inc. Milwaukee, USA)에서 methanol/water(60:40, v/v)를 전개 용매로 하여 분리하였다(McClean *et al.*, 1997). TLC plates는 건조시킨 다음에 0.3% LB agar 배지에 *C. violaceum* CV026첨가한 다음 부었다. TLC plates는 28℃에서 24시간동안 배양한 다음 purple spot를 보인 것을 AHLs로 간주하였다.

마. Virulence test.

*E. carotovora* subsp. *carotovora* 35와 *Acinetobacter* sp. C1010 균주는 LB에서 OD<sub>600nm</sub>=1.0이 되도록 배양하고, 최종 농도가 OD<sub>600 nm</sub>에서 0.05가 되게 희석하였다. 두 개의 균주를 1:1(v/v)로 혼합하여 감자 slices에 20  $\mu$ l씩 접종한 다음 30°C에서 24시간동안 배양하였다. 병원성은 접종부위 부근의 수침상 무름증상이 일어난 병징의 정도를 조사하였다. 48시간 이후에, 무름 증상 면적(mm<sup>2</sup>)을 측정하였고, 멸균수를 접종한 구를 대조구로 사용하였다.

사. C1010균주와 240B1균주의 AHL 분해 능력의 subcellular localization.

*Acinetobacter* sp. C1010와 *Bacillus* sp. 240B1 균주를 LB broth에서 24시간 동안 배양한 다음 10,000  $\times$ g로 10분간 원심분리하였다. 세균 배양액을 0.2  $\mu$ m filter에 통과시킨 다음, 동결건조시켜 1 ml 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8) 현탁하여 extracellular fractions으로 사용하였다. 회수된 세포는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)로 현탁하고 얼음물에서 10초동안 2번 sonication하였다. Sonicates를 13,000 g 에서 30분 동안 원심분리하고, 상정액을 cell extract factions으로 사용하였다. 두 층에서의 단백질 함량은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL)로 측정하였다. 두 층으로부터 동량의 단백질(100 ng)을 상기의 AHL 분해 능력을 측정하는데 사용하였다.

아. *aiiA* 유전자의 클로닝과 *nptII* promoter 장착

*Bacillus* sp. 240B1 균주의 genomic DNA를 Ausubel 등(1989)의 방법으로 추출하여 *aiiA* 유전자의 PCR 증폭의 template로 사용하였다. *aiiA* 유전자의 forward primer(5'-ATG GGA TCC ATG ACA GTA AAG AAG CTT TAA-3'), reverse primer(5'-GTC GAA TTC CTC AAC AAG ATA CTC CTA ATG)로 PCR에 의해 증폭하였다. PCR 반응은 GenAmp 2400thermal cycler(Perkin Elmer, San Jose, CA)에서 preMix(Bioneer Inc., Daejeon, Korea)을 이용하여 수행하였다. 750 bp PCR product를 정제하여 pGEM T-easy vector(Promega, Madison, WI)에 클로닝하였다. PCR inserts를 함유하고 있는 recombinant plasmids는 Bioneer Inc.(Bioneer Inc., Daejeon, Korea)에서 시판되고 있는 miniplasmid purification system을 이용하여 정제하였다. PCR product insert는 전남대학교 기호과학연구 광주분소에서 ABI1301 DNA



sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 dye terminator 방법을 이용하여 분석하였다. 얻어진 sequences GenBank database 에서 *Bacillus* sp. 240B1균주의 *aiiA*와 상동성을 비교하였다.

차. *nptII-aiiA* 유전자 construct의 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35 내의 발현

야생형 *aiiA* 유전자의 promoter는 무름병균에서 잘 발현되기 위해서 constitutive promoter인 *nptII*로 교체하였다. *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* 유전자의 C-terminal open reading frame을 reverse primer(5'-GTC GAA TTC CTC AAC AAG ATA CTC CTA ATG)로 이용하였고, *nptII* promoter의 forward primer로 *nptII* promoter sequence로는 5'-CC GGA ATT GCC AGC TGG GGC GCC CTC TGG TAA GGT TGG GAA GCC CTG CAA ATG GGA TCC ATG ACA GTA AAG AAG CTT TAT-3'를 사용하였다. 이렇게 조제된 *nptII* promoter로 장착된 *aiiA* 유전자는 sequencing을 통해 확인하였다. *nptII*가 장착된 *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* 유전자를 다시 *EcoR1*으로 절단하여 broad host range vector인 pML122 vector에 transfer한 다음, pRK2013을 helper plasmid로 tri-parental mating을 통해 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주에 옮겼다.

차. *aiiA* 유전자 과다발현 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 35균주의 proteomic분석 및 병원성 분석

*nptII-aiiA*를 지닌 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 병원성 분석은 상기의 담배를 이용한 병원성 분석 방법에 준하여 실시하여 야생형과 비교하였다. 또한 상기의 방법에 의해 AHLs을 야생형과 *nptII-aiiA*가 과다발현된 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 분리하여 TLC와 minimal medium agar slice에서 분비되는 양을 비교하였다.

*E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주에서 AHLs에 의해서 조절되는 proteomic분석은 최소한 3번 이상의 2-D gel analysis에 의해 지속적으로 발현이 억제된 또는 증가된 단백질 spot을 최종 선정하였다. Proteomic분석을 실시하기 위하여 Urea, Thiourea, CHAPS, DTT, Benzamidine, Bradfordsolution, Acrylamide, Iodoacetamide, Bis-acrylamide, SDS, acetonitrile, trifluoroacetic acid Sigma-Aldrich(Electrophoresis grade or ACS reagents, Ultrapure)로부

터 주문하였다. Pharmalyte(pH 3.5 - 10) 등은 Amersham Biosciences에서 그리고 IPG DryStrips(pH4-10NL, 24cm)에서 Genomine Inc.. 제공받았다. Modified porcine trypsin(sequencing grade)는 Promega에서 제공받았다.

1) 단백질 샘플 준비.

주어진 시간동안 키운 세포를 원심분리에 의해 회수한 다음 ice-cold PBS에서 2번 정도 씻은 다음 7M urea , 2M Thiourea containing 4%(w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT)와 2%(v/v) pharmalyte 그리고 1mM benzamidine을 함유한 sample buffer에 현탁했다. 현탁액은 10초간 sonication에 의해 분쇄하였다. 단백질은 상온에서 한 시간동안 vortexing에 의해 분리하였다. 한시간동안 15,000 xg 15℃에서 원심분리한 다음, insoluble material은 버리고 soluble fraction은 two-dimensional gel electrophoresis에 사용하였다. Loading하는 단백질의 농도는 Bradford assay에 의해 결정하였다(Bradford *et al.*, 1976).

2) 2-D Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

IPG dry strips 12 - 16시간동안 7M urea, 2M thiourea containing 2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1% dithiothreitol(DTT), 1% pharmalyte에서 담근 후 200  $\mu$ g 샘플을 전개하였다. Isoelectric focusing(IEF)은 Multiphor II electrophoresis unit과 EPS 3500 XL power supply(Amersham Biosciences)을 이용하여 16℃에서 수행하였다. IEF을 위하여 전압을 처음 3시간 동안은 3,500 V로 전개한 다음, 지속적으로 3,500 V로 유지하였다. 2차원적 전개를 하기 전에, strips는 equilibration buffer(50mM Tris-Cl, pH6.8 containing 6M urea, 2% SDS and 30% glycerol)에 10분동안 배양하였다. Equilibrated strips는 SDS-PAGE gels(20-24cm, 10-16%) 위에 배치하였다. SDS-PAGE는 Hoefer DALT 2D system(Amersham Biosciences)을 이용하여 수행하였다. 2D gels는 20℃에서 1.7 kV/h로 수행하였다. 그리고 나서 2D gels은 Oakley 등(1980)의 방법에 따라 silver stain하였으나, fixing과 sensitization step에서 glutaraldehyde를 제거하였다.

### 3) Image analysis

Digitized images의 정량적인 분석은 PDQuest software(version 7.0, BioRad)을 이용하여 회사에서 제공하는 방법에 준하여 실시하였다. 각 spot의 양은 전체 valid spot의 명암도에 의해 normalize하였다. 대조구의 샘플과 비교해서 그 발현양이 2배 이상인 단백질 spot들을 최종 선발하였다.

### 4) In gel에서 단백질의 trypsin 절단

선택된 단백질 spot들은 Shevchenko 등의 방법에 의해 modified porcine trypsin을 이용하여 in-gel에서 효소적으로 분해하였다. Gel pieces는 50% acetonitrile에서 씻어 내어 SDS, salt와 stain을 제거한 다음 용매를 제거하기 위해 건조시키고 trypsin(8-10 ng/ $\mu$ l)으로 rehydrate한 다음 37°C에서 8-10시간동안 배양하였다. Proteolytic reaction은 5  $\mu$ l 0.5% trifluoroacetic acid를 첨가함으로써 정지시켰다. Tryptic peptides는 50% aqueous acetonitrile와 여러 번 gel pieces로부터 추출한 다음 수용액층을 합하여 회수하였다. Peptide mixture을 C18 ZipTips(Millipore)을 이용하여 desalt에 의해 농축하고 peptides는 1-5  $\mu$ l acetonitrile로 추출하였다. 일정량의 이 용액은 동량의 포화된 50% aqueous acetonitrile에 N-cyano-4-hydroxycinnamic acid이 첨가된 용액을 혼합하여, 1  $\mu$ l target plate에 spot하였다.

### 5) Desalting과 농축concentration

Custom-made chromatographic columns을 mass spectrometric analysis하기 전에 peptide 혼합액의 desalting과 농축에 사용하였다. 100-300 nL의 Poros reverse phase R2 material(20-30  $\mu$ m bead size, PerSeptive Biosystems)로 구성된 column에 constricted GELoader tip (Eppendorf, Hamburg, Germany)에 넣었다. 10 ml syringe에 아주 천천히 공기압을 주입함에 의해 액체가 통과하는데 사용되었다. 절단된 상정액으로부터 30  $\mu$ l의 peptide 혼합액을 30  $\mu$ l의 5% formic acid와 희석하여 column에 load하고 30  $\mu$ l의 5% formic acid로 씻어냈다. MS/MS에 의해 분석하기 위하여 peptides는 1.5  $\mu$ l 50% methanol/49% H<sub>2</sub>O/1% formic acid로 precoated borosilicate nanoelectrospray needle(Micromass, Manchester, UK)에서 직접 추출하였다.

## 6) ESI-MS/MS

In-gel digestion에 의해 생산된 peptide의 MS/MS는 Q-TOF2 mass spectrometer(Micromass, Manchester, UK)에서 nano-ESI에 의해 분석하였다. Source temperature는 80°C였다. Potential 1 kV를 안정된 flow rate(10-30 nL/min)를 유지하기 위해 a nitrogen back-pressure of 0-5 psi와 혼합된 ion source에서 precoated borosilicate nanoelectrospray needles(EconoTip™, New Objective, USA)에 주입하였다. Mass spectrometer는 추출된 peptides로부터 ion signals을 수집하기 위해 automatic data-dependent MS/MS에서 수행하였다. 이러한 mode에서, full scan mass spectrum(m/z 400-1500)에서 2배 혹은 3배 charged ion을 가진 가장 많은 peptide ion peak를 precursor ion으로 선택하였다. 최종적으로, 한 개의 MS/MS spectrum은 분자량에 따른 relative collision energy와 collision-induced dissociation(CID)을 사용한 precursor ion의 서열을 확인하기 위하여 기록하였다. Cone voltage는 40 V였다. Quadrupole analyzer는 hexapole collision cell에서 fragmentation을 위한 precursor ions을 선택하기 위해 사용하였다. Collision gas는 압력이  $67 \times 10^5$  mbar인 Ar이었고, collision energy는 20-30 V이었다. Product ions은 reflector, micro-channel plate detector, 그리고 time-to-digital converter가 장착된 orthogonal TOF analyzer을 이용하여 분석하였다. 데이터는 Mass Lynx Windows NT PC system을 이용하여 처리하였다.

## 7) 단백질 동정과 서열 결정

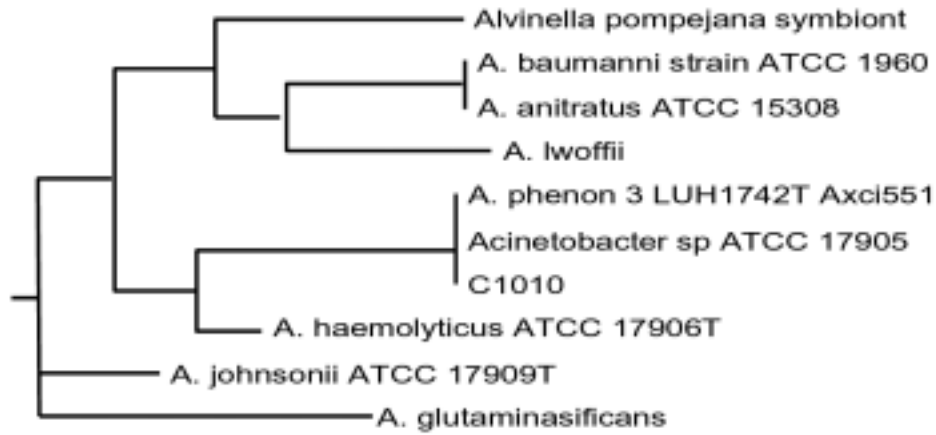
단백질을 동정하기 위해, peptide *de-novo* sequencing program, PepSeq,을 이용하여 deduce된 아미노산 서열과 spot으로부터 획득한 tryptic peptides에 기록된 모든 MS/MS spectra는 MASCOT search program ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))과 BLAST을 이용하여 NCBI와 EST databases의 단백질 서열과 비교하여 찾았다.

## 3. 결과 및 고찰

### 가. AHL 분해 미생물의 분리 및 동정

오이 근권에서 분리된 200여개가 넘는 균주 중에서 isolate C1010 강하게 *P. chlororaphis* O6의 phenazine 생성을 억제하는 능력을 보였다. 전자현

미경 관찰에 의하면 C1010 세포의 모양은 구형에서 간상 모양으로, 0.9-1.6  $\mu\text{m}$ 의 직경을 가지고 1.5-2.5  $\mu\text{m}$ 의 길이를 가지고 있었고, flagella는 보이지 않았다(data not shown). C1010균주의 genomic DNA로부터 16S rRNA primers를 이용하여 약 1.448 kb PCR product의 염기서열을 분석해 본 결과 *Acinetobacter* sp. phenon 3(GenBank accession numbers AJ293692, AJ293693, and AJ293694)와 100% 상동성을 보였고, *Acinetobacter* sp. ATCC 17905 strain(GenBank accession number Z93447)와 99% 상동성을 보였다(Fig. 8-1). 따라서 C1010 균주를 oxidative-negative, catalase-positive, 그리고 gram-negative인 *Acinetobacter* sp. C1010균주로 명명하였다. 대부분의 *Acinetobacter* 균주는 단순한 다양한 유기물(hydrocarbons과 aromatic compounds)을 탄소원으로 하는 mineral medium에서 생육한다. *Acinetobacter* 세균은 자연 상태에서 물이나 토양 등에 널리 분포하고, 적어도 토양이나 물에 존재하는 전체 heterotrophic aerobic 미생물중에서 0.001%가 acinetobacters 일 것을 추정되고 있다(Krieg *et al.* 1984).

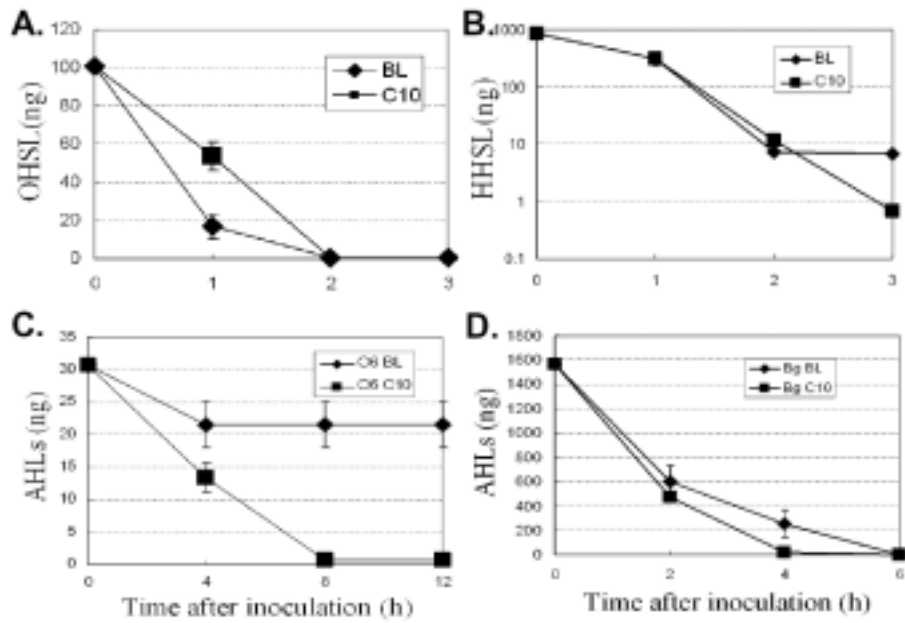


**Fig. 8-1.** Isolate C1010 균주의 16S rRNA에 의한 phylogenic tree. 그람 음성균의 전체 16S rRNA를 증폭할 수 있는 universal primer를 이용하여 C1010 genomic DNA를 주형으로 하여 1.4 kb PCR product를 증폭하여 sequence를 얻었다. C1010의 PCR product sequence는 GenBank에 등록된 그람 음성균의 16S rRNA를 BLASTn search tool을 이용하여 상동성이 있는 sequence들을 찾은 후 CLUSTAL-W tool을 이용하여 phylogenic tree를 작성하였다.

나. *Acinetobacter* sp. C1010의 AHL 분해 능력.

*Acinetobacter* sp. C1010와 *Bacillus* sp. 240B1 균주는 140 ng OHSL와 40 ng HHSL을 4시간에서 6시간동안 배양에 의해 대부분이 분해되었다(Fig. 8-2A와 2B). 그러나, 열처리 한 *Acinetobacter* C1010와 *Bacillus* sp. 240B1 그리고 두 균주의 세포외 분비액은 이러한 AHLs을 분해하는 능력이 없는 것으로 보아(data not shown), 열에 약한 세포내 효소가 AHLs을 분해하는데 관련이 있을 것으로 추정되었다. 비록 많은 *Acinetobacter* 균주들이 AHLs을 생산한다고 알려져 있으나(Gonzalez *et al.* 2001), C1010 strain은 어떤 AHLs도 생산하지 않았다(Table 8-1). Strain C1010은 glucose와 ammonium chloride을 함유하고 있는 minimal medium배지에서 생육하였으나, *Ralstonia* sp.(Lin *et al.* 2003)와 *Variovorax paradoxus*(Leadbetter and Greenberg, 2000)에서 보고된 것처럼 질소원이나 에너지원으로 사용하지 못하였다(data not shown).

*P. chlororaphis* O6와 *B. glumae*은 late log-phase에서 최대의 AHLs을 생산하였고, 정체기에서는 줄어들었다(Table 8-1). Byers 등(2002) *E. carotovora*의 AHL생산도 정체기에서 줄어드는데, 그 이유는 정체기에서 배양액의 알칼리화 때문이라고 하였다. *P. chlororaphis* O6의 배양액의 pH는 생육이 지속될수록 pH 7에서 8.3으로 증가하였으나, *B. glumae*의 배양액의 pH는 pH 7로 유지되었다(data not shown). *P. chlororaphis* O6와 *B. glumae*에서 정체기에서 AHL 농도의 감소는 아마도 생육배지의 알칼리화에 의한 비효소적 분해의 결과뿐만 아니라 전에 *Agrobacterium tumefaciens*(Zhang *et al.*, 2002)에서 보고된 바와 같이 아직까지 알려지지 않은 quorum sensing을 유전적으로 조절하는 조절자 때문일 것으로 추정된다.



**Fig. 8-2.** Isolate C1010의 AHLs 분해. *Acinetobacter* sp. C1010 균주와 *Bacillus* sp. 240B1 균주에 의한 OHSL(A), HHSL(B), *P. chlororaphis* O6가 생산하는 AHLs(C), *B. glumae*가 생산하는 AHLs(D) 분해능력을 agar slice bioassay방법에 의해 결정하였다. 약어 : BL, *Bacillus* sp. 240B1; C10, *Acinetobacter* sp. C1010; O6BL or O6C10, *P. chlororaphis* O6로부터 생산된 AHLs와 *Bacillus* sp. 240B1 혹은 *Acinetobacter* sp. C1010을 혼합; BgBL or BgC10, *B. glumae*가 생산하는 AHLs와 *Bacillus* sp. 240B1 혹은 *Acinetobacter* sp. C1010균주를 혼합.



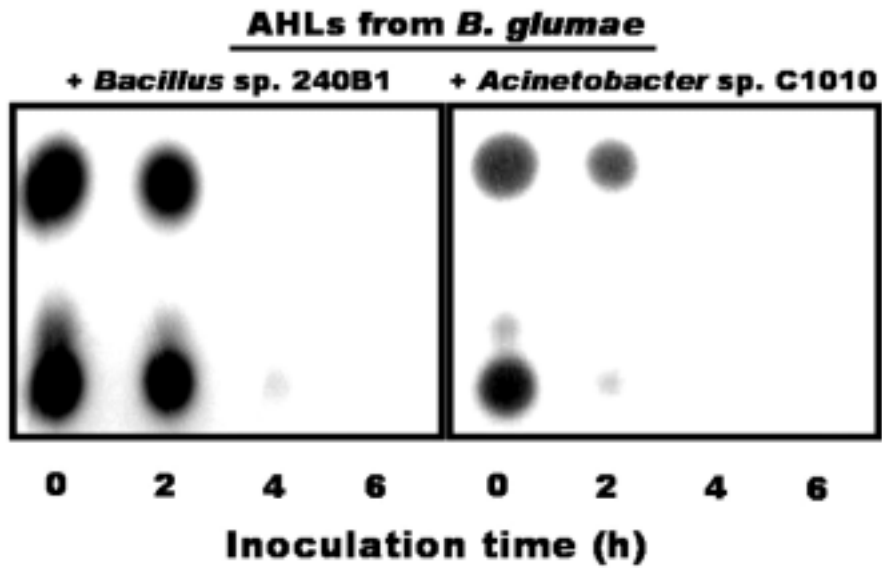
**Table 8-1.** *Acinetobacter* sp. C1010균주의 *P. chlororaphis*와 *B. glumae*의 homoserine lactone 생성에 미치는 영향.

Cultures extracted	Amounts of HSL at different growth stages (ng) <sup>a</sup>		
	Mid-log (12 h)	Late-log (24 h)	Stationary (36 h)
O6	43±19	234±28	184±22
<i>B. glumae</i>	0	303±80	275±147
O6 + C1010	0	0	0
<i>B. glumae</i> + C1010	0	0	0
C1010	0	0	0

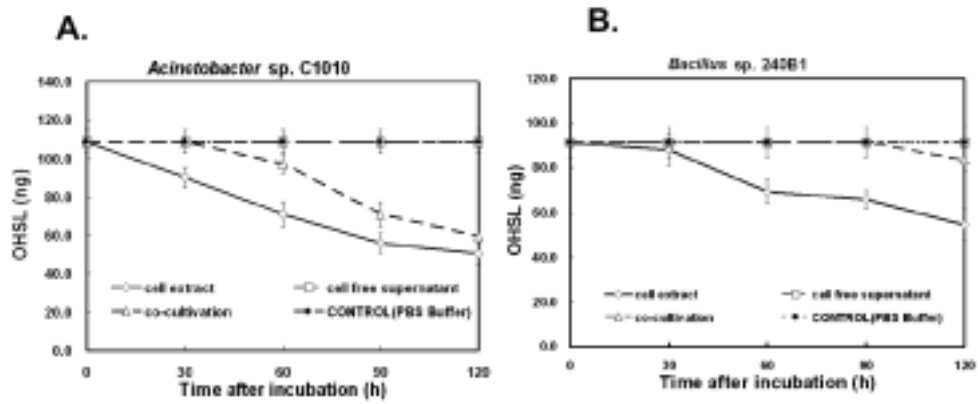
C1010의 정체기의 배양액의 pH는 8.5이었고, 240B1은 7.5이었다(data not shown). 따라서, C1010과 240B1의 배양 상정액을 본 절의 전체 bioassay를 하는데 배양액의 알칼리화에 의해서 C1010과 240B1이 AHL을 분해하는 능력이 있을 가능성을 배제하기 위해 negative control로 사용하였다. 비록 C1010의 배양액의 pH가 8.0이 넘었으나, AHLs은 bioassay에서 안정하였다(data not shown). Byers 등의 연구에서는 *E. carotovora*의 배양액 상정액을 30°C에서 7-18 시간동안 배양하였다(Byers *et al.* 2002). 본 절에서의 bioassay 시스템에서는 반응시간이 훨씬 짧아서 AHLs이 세포 배양액에서 안정한 이유라고 추론할 수 있었다. 이러한 결과들은 C1010의 AHL 분해 능력은 아마도 세포 내에서 효소적인 기작에 의해서 분해되고, 세포 배양액의 알칼리 조건에서는 분해가 되지 않는다는 것을 나타낸다.

*P. chlororaphis* O6나 *B. glumae*의 생육은 C1010균주와의 공동 배양에 의해서는 전혀 영향을 받지 않았다(data not shown). *Acinetobacter* sp. C1010과 *Bacillus* sp. 240B1 모든 생육시기에서 공동 배양에 의해 *B. glumae*와 *P. chlororaphis* O6에 의해서 생산되는 AHLs을 불활성화시켰다(Table 8-1). C1010균주는 *B. glumae*와 *P. chlororaphis* O6에 의해서 생성되는 AHLs혼합액을 4-6 시간동안의 배양에 의해 완전히 분해된 반면 *Bacillus* sp. 240B1는 *P. chlororaphis* O6로부터 분비된 AHLs을 완전히 분해하지 못했다(Fig. 8-2C). *Acinetobacter* sp. C1010에 의한 *B. glumae*로부터 생산되는 AHLs의 분해 능력은 TLC 분석에 의해도 증명하였다(Fig. 8-3).

*Acinetobacter* sp. C1010과 *Bacillus* sp. 240B1의 AHL 분해 능력은 오직 cell extract fractions에서만 확인되었고, culture filtrate fractions에서는 확인되지 않았다(Fig. 8-4). *Acinetobacter* sp. C1010과 *Bacillus* sp. 240B1의 cell extract fraction은 두 균주의 24 시간동안 키운 균주보다 AHL분해 능력이 뛰어났다(Fig. 8-4). 이러한 결과는 두 균주의 AHL 분해 능력은 세포내에 존재하고 있으며, 세포 밖으로는 분비되지 않음을 암시한다. 또한 *Acinetobacter* sp. C1010 그람 음성균에서 quorum sensing의 quenching을 연구하는데 아주 유용한 균주임을 암시한다. 하지만, 많은 양의 *Acinetobacter* sp. C1010은 생물적 방제균의 유용한 형질을 억제하는 negative 효과가 있을 가능성도 있다.



**Fig. 8-3.** *Acinetobacter* sp. C1010균주에 의한 *B. glumae*에 의해 생산되는 AHLs의 분해. *Acinetobacter* sp. C1010 혹은 *Bacillus* sp. 240B1 균주에 의해 AHLs의 분해 정도를 TLC 방법에 의해 결정하였다.



**Fig. 8-4.** *Acinetobacter* sp. C1010 균주와 *Bacillus* sp. 240B1 균주의 AHL 분해 능력의 subcellular localization. *Acinetobacter* sp. C1010(A)과 *Bacillus* sp. 240 B1(B)의 배양 상정액과 cell extract로부터 같은 량의 단백질(100 ng)을 agar slice bioassay에 의해 OHSL 분해 능력을 결정하는데 사용하였다. Co-cultivation은 24시간 자란 *Acinetobacter* sp. C1010 혹은 *Bacillus* sp. 240B1 균주를 주어진 시간에 공동 배양하고 OHSL 분해 능력을 측정하였다. 2 반복한 결과이고, vertical bars들은 standard errors을 의미한다.

다. *Acinetobacter* sp. C1010균주의 *E. carotovora*의 병원성과 *P. chlororaphis* O6의 phenazine생성에 미치는 영향

*P. chlororaphis* O6와 무름병균 *Ecc* 35 균주의 생장은 C1010과의 36 시간 공동 배양에 전혀 영향을 받지 않았다(data not shown). 그러나, *P. chlororaphis* O6균주의 phenazine 생성은 *Acinetobacter* sp. C1010와의 공동 배양에 의해 억제되었다(data not shown). Phenazine이 생성되지 않은 이유는 아마도 공동 배양동안 C1010균주에 의해 AHL 분해의 결과에 의한 것으로 추론하였다(Table 1). *E. carotovora*를 *Acinetobacter* sp. C1010와 공동 배양하였을 때도 병원균 단독 접종한 구에 비해 감자 slice에서 무름병의 병징도 감소하였다(Table 8-2, Fig. 8-5). *Acinetobacter* sp. C1010 단독 처리구는 절단된 감자에서 어떤 병징도 보이지 않았다. *Acinetobacter* sp. C1010는 *Ecc* 35 균주에 의해 생성되는 AHLs을 분해하는 능력도 있었다(data not shown). 최근에 수행한 포장실험 결과, *Acinetobacter* sp. C1010는 *B. glumae*에 의한 세균성 벼알마름병의 병징이 감소하였다(data not shown). 따라서, 이러한 결과는 식물 병원 세균에서 병원성 유전자의 발현을 조절하는데 AHLs의 중요하고 *Acinetobacter* sp. C1010이 이들 병원세균에 의해 발생하는 식물병을 방제하는데 사용될 가능성이 높다.

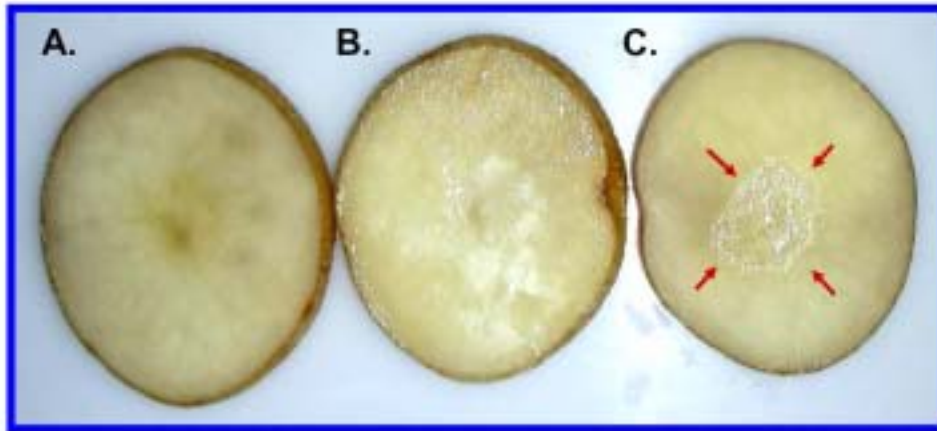
라. *aiiA* 과다발현 무름병균의 병원성

*nptII* promoter를 장착한 *aiiA* 유전자를 형질전환한 무름병균 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 AHLs 분해 능력을 확인하기 위해 wild-type 균주와 *nptII-aiiA*가 발현되고 있는 무름병균에서 AHLs를 분리하여 TLC를 통해서 AHLs 생성량과 패턴을 비교해 본 결과, *nptII-aiiA*가 발현된 무름병균은 wild-type 균주에 비해 아주 적은 AHLs을 생성하였다(Fig. 8-6). 현재 이들 AHLs의 양을 정량하는 실험이 진행 중이다.

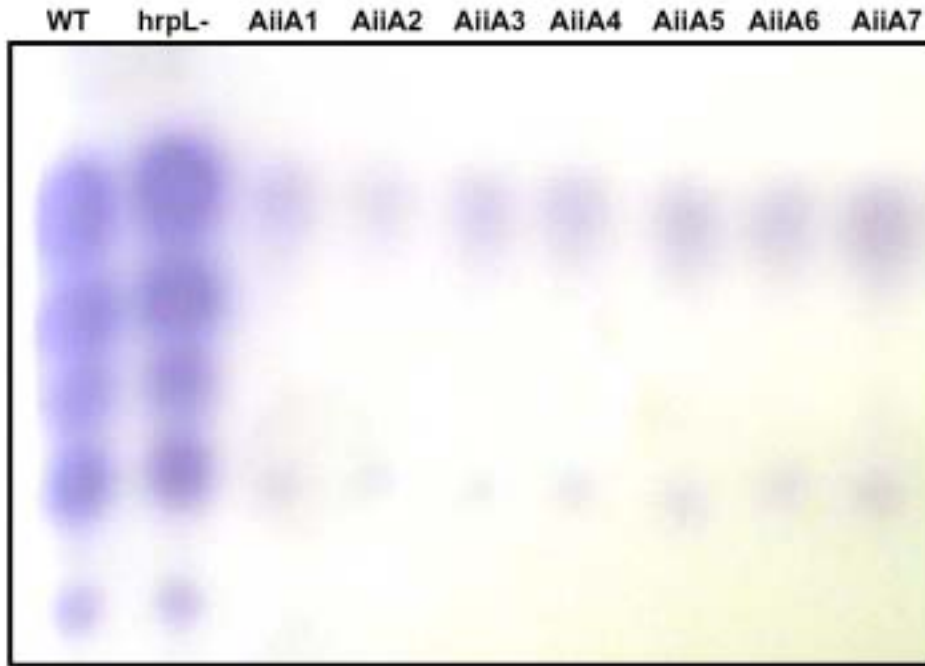
*aiiA* 과다 발현에 의해서 AHLs의 양이 감소함으로 인해 무름병균의 병원성도 감소할 것으로 생각되어 *in vitro*의 MS 배지에서 담배를 이용하여 무름병의 발병도를 조사하였다. wild-type 균주는 약 40%이상이 무름병을 일으킨 반면에 *aiiA*을 발현시킨 무름병균의 경우는 거의 대부분의 담배가 무름 증상을 일으키지 못하였다(Fig. 8-7). 이러한 결과는 무름병균이 생산하는 AHLs를 조절함으로써 무름병 발병 정도를 조절할 수 있다는 것을 증명한 결과이다.

**Table 8-2.** *Acinetobacter* sp. C1010 균주의 무름병균 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35균주의 병원성에 미치는 영향

Inoculum	Maceration area, mm <sup>2</sup> <sup>a</sup>
<i>E. carotovora</i> 1238	163±13
C1010	0
<i>E. carotovora</i> 1238 + C1010	16±2

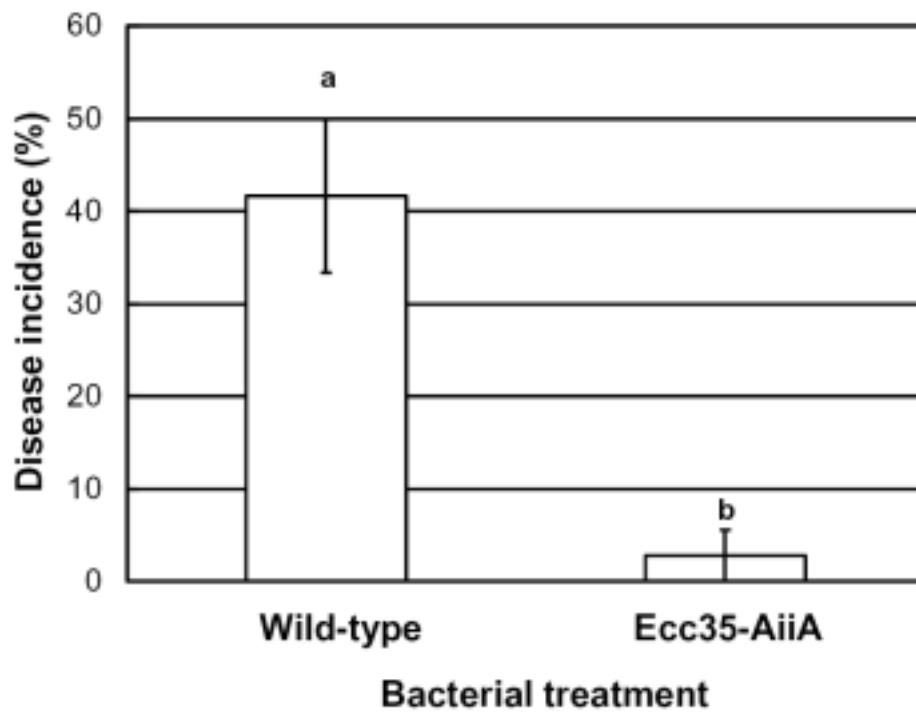


**Fig. 8-5.** *Acinetobacter* sp. C1010 균주의 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 균주의 감자에서의 무름증상에 미치는 영향. Slice된 감자 중앙에 각 균주의 현탁액( $1 \times 10^8$  colony-forming units/ml)  $20 \mu\text{l}$ 을 접종한 다음 2일 후에 무름증상을 조사하였다. (A) C1010 단독 처리, (B) *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 단독 처리, (C) C1010과 *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35와의 1:1로 혼합 처리.



**Fig. 8-6.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 wild-type, *hrpL* 돌연변이주, 여러 *aiaA* over expressed 균주들의 homoserine lactone 생성. 각 균주들을 LB 배지에서 48 시간동안 생육시킨 다음, ethyl acetate로 AHLs를 정제하여 TLC plate에 전개하고, AHL indicator strain인 *Chromobacter violaceum* CV026 균주를 도말하고 48 시간 후에 blue spot을 AHL로 동정하였다.





**Fig. 8-7.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* wild-type 33 균주와 *nptII-aiiA* 유전자를 over expression한 35 균주의 담배에서 무름병 발병도. 담배(Xanthi)를 *in vitro* MS 배지에서 2주 동안 microtiter plate에서 생육시킨 후, *E. carotovora* ssp. *carotovora* 33 wild-type과 *nptII-aiiA* 유전자를 over expression한 35 균주 현탁액 ( $1 \times 10^8$  cfu/ml)  $5 \mu\text{l}$ 를 담배 잎에 접종한 다음 2일 후에 무름증상을 일어난 담배 잎의 발병도를 측정하였다.

마. AHLs-regulated protein들의 proteomic 분석.

무름병의 방제 target을 제시하기 위해 우선 무름병 증상이 현저히 감소한 *aiiA*를 over expression한 무름병균에서 down- 혹은 up-regulate되는 protein spot을 동정하기 위해 2-D gel analysis를 수행하였다. wild-type과 *aiiA* 유전자를 over expression시킨 무름병균에서 total soluble proteins을 2-D PAGE에 전개하여 두 개의 균주에서 발현량이 차이가 나는 다양한 단백질 spot를 분리하였다(Fig. 8-8). 이 중에서 최종적으로 3번의 반복실험에 의해서 똑같이 단백질의 발현량이 2배 이상 감소하거나 증가한 단백질 spot을 정제하고 현재 Q-TOF 분석에 의해 단백질을 동정하는 연구가 진행 중이다 (Table 8-3). 최종 보고서 제출 시기까지는 AHLs에 의해서 조절되는 병원성 관련 단백질의 동정하여 무름병균의 방제를 위한 target으로서 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

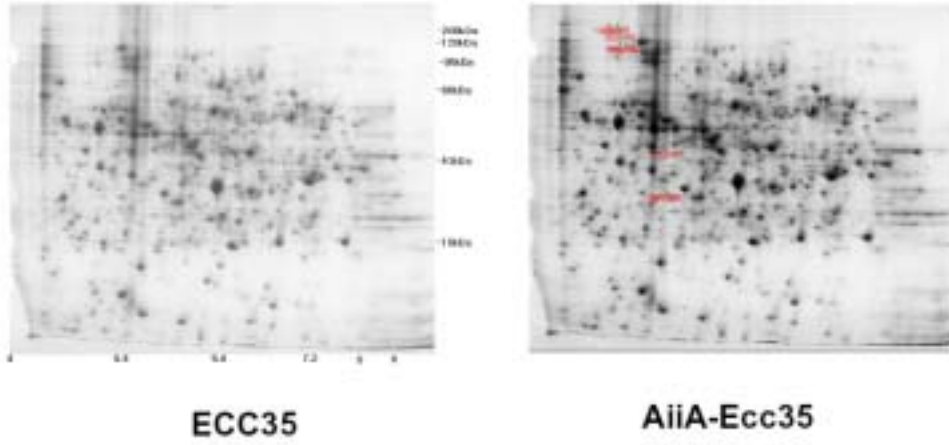


Fig. 8-8. *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 wild-type과 AiiA over-expressed 균주의 2-D gel 분석.

**Table 8-3.** *E. carotovora* ssp. *carotovora* 35 wild-type과 AiiA over expressed 균주간의 proteomics 분석에 의해 발현량이 차이가 나는 단백질

Protein designation (MW/pI)	Ratio of protein spot intensity of AiiA/wild-type		
	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3
1826R(148.04/4.72)	0/298.64	0/40.6	0/21.95
1834R(111.15/4.76)	278.28/118.87	156.9/0	141.34/50.28
1909(193.77/4.64)	168.91/0	172.58/0	156.31/0
1910(192.97/4.70)	65.21/0	111.45/0	212.26/0
2821R(109.83/4.81)	24.66/10.22.94	149.17/649.7	13.62/513.5
3112R(29.94/5.10)	107.23/274.38	0/268.74	116.19/153.89
3201R(31.10/5.07)	361.98/712.63	0/785.52	5.28/329.28
3304R(45.53/5.11)	816.87/0	0/1996.78	185.31/568.59



## 제 4 장. 목표달성도와 관련분야에서의 기여도

## 제 1 절. 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 1항, 2항, 3항에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하여 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 4항에 나타낸 바와 같이 계획서의 최종목표를 충분히 달성하였다고 생각한다.

### 1. 제 1 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
유전자 screening	1. <i>In vivo</i> 유전자 screening	50	50	
	2. 유전자 염기서열결정	30	30	
	3. Blast search	20	20	

### 2. 제 2 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
유전자 발현분석	1. 유전자 클로닝	50	50	
	2. 유전자발현분석	50	50	

3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
유전자 기능 분석	1. 유전자 클로닝	50	50	
	2. 유전자발현분석	50	50	

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

평가의 착안점	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 척도 (%)			
1. 유전자 screening	25		25	
2. 유전자 클로닝	20		20	
3. 유전자 발현분석	20		20	
4. 병원성 분석	25		20	
5. 방제를 위한 target 제시	10		10	



## 제 2 절. 관련 분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면에서의 기여도

가. 본 연구를 통해 우리나라의 배추 및 다즙성 작물에 큰 피해를 주고 있으면서도 효과적인 방제법이 없는 세균성무름병 연구에 필요한 자원 및 다양한 기술을 확보하였다.

나. 본 연구과정에서 확보된 박테리오신을 생산하는 94개의 *Ecc* 균주, end sequence가 밝혀진 *Ecc* BAC library, *Ecc* promoter library, 다양한 배양조건에서 발현이 다른 105개의 유전자 클론, HrpL에 의해 조절되는 24개의 유전자, 무름병 방제력을 가진 비병원성균주 및 HSL 분해능 균주 등은 국내에서 세균성무름병과 이 병의 방제를 위한 연구 또는 산업화에 중요한 자원으로 활용될 것이다.

다. 본 연구과정에서 확보된 IVET 기술, genomic and BAC library 제작 기술, 유전자 발현분석 기술, 박테리오신검정 및 HSL 대사물질 분석 기술, 유전자의 bioinformatics 관련기술, 병방제력을 측정하는 생물검정 기술 등은 본 연구의 참여 연구원 또는 연구보조원인 학문 및 산업화 인력 후속세대에 전달되었으며 미생물의 학술연구 및 산업화 연구에 중요하게 활용될 것이다.

### 2. 학문발전에의 기여도

가. 본 연구를 통해 우리나라에서 거의 이루어지지 않고 있는 세균성무름병의 학술적 연구기반을 확보하였다.

#### 나. 학술지 (SCI급)

1). Beom Ryong Kang, Jung Hoon Lee, Sug Ju Ko, Yong Hwan Lee, Jae Soon Cha, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2004. Degradation of Acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. C1010. Can. J. Microbiol. 50; 934-941.

다. 학술 발표

- 1) Beom Ryong Kang, Jung Hoon Lee, Sug Ju Ko, Yong Hwan Lee, Jae Soon Cha, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2004. Degradation of Acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. C1010. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 20; 108.
- 2) Hyo Song Nam, Jae Soon Cha, and Young Cheol Kim. 2004. Identification of HrpL-regulated genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 33 using a GFP-based IVET assay. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 20; 97.
- 3) Kim, J.-H., Lee, S.-H., Kwon, Y.-J., Jeong, K.-S., Kim, Y.-C., and Cha, J.-S. 2004. Identification of the differentially expressed genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Chinese cabbage by *in vivo* expression technology. 2004년 한국식물병리학회 학술대회 초록집, The Plant Pathology Journal 20; 100.
- 4) Shin, Y.-J., Park, S.-Y., Lee, S.-H., Kim, H.-S., Kim, B.-S., and Cha, J.-S. 2004. Characterization of a bacteriocin-producing avirulent *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 9-3 and application for biological control of bacterial soft rot of Chinese cabbage. 2004년 한국식물병리학회 학술대회 초록집, The Plant Pathology Journal 20; 109p.

### 3. 경제, 산업적 측면에의 기여도

가. 본 연구의 산업적 효용가치를 고려하여 다음과 같이 특허를 출원하였고, “세균병 자바“라는 상표명으로 주식회사 식물보호기술에 기술이전을 할 예정이며, 영농기술 자료로 활용 중이다.

- 1) 김영철. 아시네토박터 C1010균주 및 이를 이용한 식물 세균병 제어방법.  
특허 등록: 0521741. 대한민국 특허청. 2005. 10. 07
- 2) 주식회사 식물보호기술. 상표명- 세균병 자바
- 3) 특허검임연구원, 오이사업단에 영농기술 자료로 활용 중
- 4) 전남대학교 최고경영자반, 시설채소반과 친환경 유기 농법 반에서 강의 자료로 본 연구 과제가 활용되고 있음.

## 제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

## 제 1 절. 추가 연구의 필요성

### 1. 일부 선별된 유전자의 기능 확인에 대한 추가적인 연구

IVET 및 유전자 발현분석 결과로 산발된 유전자의 기능분석 연구가 연구기간동안 마무리되지 못했는데, 이부분에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

### 2. *Ecc hrpL*의 새로운 조절 기작 및 *hrpL*과 *Ecc*의 병원성과 과민감 반응의 관계 추가적인 연구

*Hrp* 유전자는 식물병원세균의 병원성 및 과민성반응에 핵심적인 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 그러나 *Ecc*에서의 *hrp* 유전자의 기능은 다른 병원세균에서보다 명확하지 않다. 즉 어떤 연구결과는 *hrp*이 *Ecc*의 병원성이나 과민성반응에 역할을 한다고 보고했지만 다른 연구에서는 그렇지 않으며 본 연구결과는 그 증거가 뚜렷하지 않다. *Hrp*이 *Ecc*에 존재한다면 아직까지 검토하지 못한 병원성 및 생리 생태적 역할을 담당할 것이다. 그런데 아직 연구자들이 그 부분을 밝혀내지 못하고 있다고 판단되고 추가적인 연구를 계속한다면 지금까지 밝혀지지 않은 *hrpL*의 새로운 기능을 찾아낼 것으로 확신한다.

### 3. 박테리오신 생성 및 기주범위와 lactonase에 의해 조절되는 병원성 발현관련 신호전달체계 연구

무름병 방제에 새로운 도구로 사용되고 있고 앞으로 사용될 박테리오신 및 lactonase 생산균주의 효과를 높이기 위해서 이 분야의 추가적인 연구가 필요하다.

### 4. 무름병 방제에 효과적인 박테리오신 및 lactonase 생산 균주의 포장 실험으로 확대

본 연구에서 무름병 방제에 효과가 인정된 두 균주의 포장에서의 병 방제효과를 확인하는 추가 연구가 필요하다.

### 5. 무름병 방제균의 다른 작물에의 응용에 관한 추가 연구

많은 식물병원 세균이 HSL을 병원성 유도의 신호물질로 사용하고 있으므로 다른 작물의 무름병 또는 다른 세균병 방제에 효과를 확인하는 추가 연구가 필요하다.

## 제 2 절. 타 연구에의 응용

\* 보고서 제출 후 추가 기술할 예정임

## 제 3 절. 기업화 추진 방향

1. 미생물 농약의 경우 효과적인 길항균을 확보하는 것이 가장 중요한 시작이지만 그 미생물을 이용한 제제화 및 상품화는 다른 기술에 속하므로 그 기술을 자체 확보 전에는 다른 미생물 또는 미생물농약회사와 공동으로 사업화 또는 기업화를 추진하는 것이 바람직하다.



제 6 장. 연구개발과정에서 수집한  
해외과학기술정보



\* 보고서 제출 후 추가할 예정입니다

## 제 7 장. 참고문헌

- Aizawa, S-I. 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol. Lett. 202: 157-64.
- Aldridge, P, JE Karlinsey, E Becker, FF Chevance, and KT Hughes. 2006. Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm. Mol. Microbiol. 60(3):630-643.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., Badel, T., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. and Collmer, A. (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4856-4861.
- Alfano, J. R. & Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants : life up against the wall. Plant Cell 8, 1683-1698.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389-3402.
- Andersson, R. A., Palva, E. T. & Pirhonen, M. (1999). The response regulator *expM* is essential for the virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and acts negatively on the sigma factor RpoS (sigma(S)). Mol Plant-Microbe Interact 12, 575-584.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (Editors). 1989. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York.
- Bauer, D.W., Bogdanove, A.J., Beer, S.V. and Collmer, A. (1994) *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 7, 573-581.
- Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T. G., Hyman, L. J., Holey, M. C., Thoson, N. R., Bentley, S. D., Chrucher, L. J. C., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S.,

- Norbertczak, H., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, D., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P. C., Birch, P. R. J., Parkhill, J., Toth, I. K. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 11105-11110.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., III, Bloch, C. A. & 14 other authors (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. Science 277, 1453-1462.
- Bogdanove, A. J., Kim, J. F., Wei, Z., Kolchinsky, P., Charkowski, A. O., Conlin, A. K., Collmer, A. & Beer, S. V. (1998). Homology and functional similarity of an *hrp*-linked pathogenicity locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1325-1330.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G.V. and Staskawicz, B.J. (1991) Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 4, 81-88.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54.
- Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31:230-314.
- Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P., and Welch, M. 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. J. Bacteriol. 184: 1163-1171.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. and Chatterjee, A. (1995) Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1959-1967.

- Chatterjee, A. K. 1980. Acceptance by *Erwinia* spp. Of R plasmid R68.45 and its ability to mobilize the chromosome of *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 142:111-119.
- Chuang, D. Y., A. G. Kyeremch, I. Gunji, Y. Takahara, Y. Ehara, and T. Ki kumoto. 1999. Identification and cloning of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* bacteriocin regulator gene by insertional mutagenesis. J. Bacteriol. 181:1953-1957.
- Choi, J. K., and I. O. Kim. 1988. Properties of carotovoricin H, a bacteriocin from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Korean J. Plant Pathol. 4:40-48.
- Collmer, A., Alfano, J., Anderson, D.M., Badel, J.L., Deng, W.-L., Fouts, D.E., Rehm, A.H., Rojas, C., Schneewind, O. and van Dijk, K. (2000) Hrp (type III) protein secretion and the virulence of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia chrysanthemi*. In: Biology of Plant-Microbe Interactions, Vol. 2 (de Wit, P.J.G.M., Bisseling, T. and Stiekema, W., eds). St. Paul, MN: International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, pp. 65-70.
- Collmer, A., Badel, J.L., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., Fouts, D.E., Ramos, A.R., Rehm, A.H., Anderson, D.M., Schneewind, O., van Dijk, K. and Alfano, J.R. (2000b) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 8770-8777.
- Crowley, C. F., and S. H. De Boer. 1980. Sensitivity of some *Erwinia carotovora* serogroups to macromolecular bacteriocin. Can. J. Microbiol. 26:1023-1028.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. and Chatterjee, A. (1995) Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. J. Bacteriol. 177, 5108-5115.
- Cui, Y., Madi, L., Mukherjee, A., Dumenyo, C. and Chatterjee, A. (1996) The RsmA- mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain

- Ecc71* overexpress *hrpNEcc* and elicit a hypersensitive reaction-like response in tobacco leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 565-573.
- Cuppels, D. A., R. S. Hanson, and A. Kelman. 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by the plant wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* 109:298-303.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., and Zhang, L.H. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1754-1759.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., and Zhang, L.H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 411: 813-817.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., and Zhang, L.H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 3526-3531.
- Elhai, J., and Wolk, C.P. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*. 68: 119-138.
- Fett, W. F., and G. T. Mahar. 1985. Bacterocin production by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Phytopathology* 75:1280(abstract).
- Fouts DE, Abramovitch RB, Alfano JR, Baldo AM, Buell CR, Cartinhour S, Chatterjee AK, D'Ascenzo M, Gwinn ML, Lazarowitz SG, Lin NC, Martin GB, Rehm AH, Schneider DJ, van Dijk K, Tang X, Collmer A. 2002. Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99(4):2275-80.
- Frangeul, L., Nelson, K. E., Buchrieser, C., Danchin, A., Glaser, P. & Kunst, F. (1999). Cloning and assembly strategies in microbial genome projects. *Microbiology* 145, 2625-2634.
- Frederick, R.D., Ahmad, M., Majerczak, D.R., Arroyo-Rodriguez, A.S., Manulis, S. and Coplin, D.L. (2001) Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the

- hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1213-1222.
- Frederick, R.D., Majerczak, D.R. and Coplin, D.L. (1993) *Erwinia stewartii* WtsA, a positive regulator of pathogenicity gene expression, is similar to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Hrps. *Mol. Microbiol.* 9, 477-485.
- Fray, R.G. 2002. Altering plant-microbe interaction through artificial manipulation of bacterial quorum sensing. *Annals of Bot.* 89: 245-253.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35: 439-468.
- Galan, J. E. & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328.
- Gonzalez, R.H., Nusblat, A., and Nudel, B.C. 2001 Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res.* 155: 271-277.
- Goodman, R.N. and Novacky, A.J. (1994) *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon.* St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Gross, D. C., and A. K. Vidaver. 1978. Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing rhizobia, cowpea rhizobia, *Corynebacterium nebraskense* as an indicator, soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:936-943.
- Ham, J.H. (1999) *Extracellular proteins, secretion pathways, and the virulence of Erwinia chrysanthemi.* PhD Thesis. Ithaca, NY: University of Cornell.
- Hamon, Y. B., and Y. Peron. 1961. Les propriétés antagonistes réciproques parmi les *Erwinia*. *C. R. Acad. Sci.* 253:913-915.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vautern, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. & Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol* 21, 384-397.

- He, S.Y. (1998) Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 363-392.
- Hinton, J. C. D., Sidebottom, J. M., Hyman, L. J., Perombelon, M. C. M. & Salmond, G. P. C. (1989). Isolation and characterisation of transposon-induced mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* exhibiting reduced virulence. *Mol Gen Genet* 217, 141-148.
- Hossain, M. M., S. Shibata, S.-I. Aizawa, and S. Tsuyumu. 2005. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66:134-143.
- Huang, J.J., Han, J.-I., Zhang, L.-H., and Leadbetter, J.R. 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5941-5949.
- Huang, H.-C., Lin, R.H., Chang, C.J., Collmer, A. and Deng, W.-L. (1995) The complete hrp gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpinPss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia* ysc homologs. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 733-746.
- Hutcheson, S.W. (1999) The Hrp cluster of *Pseudomonas syringae*: a pathogenicity island encoding a type III protein translocation complex? In: *Pathogenicity Islands and other Mobile Virulence Elements* (Kaper, J.B. and Harker, J., eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 309-329.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S. and Pak, K. (2001) Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J. Bacteriol.* 183, 5589-5398.
- Itoh, K., and H. Taharashi. 1978. Purification and characterization of a bacteriocin from *Erwinia carotovora*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24:27-39.
- Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197.



- Kerr, A. 1978. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 4:37-44.
- Kim, J.F., Ham, J.H., Bauer, D.W., Collmer, A. and Beer, S.V. (1998) The *hrpC* and *hrpN* operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 563-567.
- Kim, J.F., Wei, Z.M. and Beer, S.V. (1997) The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. *J. Bacteriol.* 179, 1690-1697.
- Koster, W. 2005. Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci.* 1;10:462-77.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., Murray, R.G.E. (Editors). 1984. *Bergey's manual of systemic bacteriology*, 1st edn. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
- Leadbetter, J.R., and Greenberg, E.P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182: 6921-6926.
- Lee, S. H., Hava, D. L., Waldor, M. K., and Camili, A. 1999. Regulation and temporal expression pattern of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *The Cell* 99: 625-634.
- Lehtimäki, S., Rantakari, A., Routtu, J., Tuikkala, A., Li, J., Virtaharju, O., Palva, E. T., Romantschuk, M., and Saarilahti. 2003. Characterization of the *hrp* pathogenicity cluster of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: high basal level expression is a mutant is associated with reduced virulence. *Mol. Gen. Genomics* 270: 263-272.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., and Zhang, L.H. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47: 849-860.
- Lundrigan, MD, LC De Veaux, BJ Mann, and RJ Kadner. 1987. Separate regulatory systems for the repression of *metE* and *btuB* by vitamin B12 in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 206(3):401-7.

- Mahan, M. J., Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., and Low, D. A. 2000. Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 139-164.
- Mahan, M. J., Slauch, J. M., and Mekalanos, J. J. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259: 686-688.
- Marco, M. L., Legac, J., and Lindow, S. E. 2003. Conditional survival as a selection strategy to identify plant-inducible genes of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5793-5801.
- Matsumoto, H., H. Muroi, M. Umehara, Y. Yoshitake, and S. Tsuyums. 2003. Peh production, fragellum synthesis and virulence reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by mutation in a homologue of cyt R. *Mol. Plant-Microbe interact.* 5:389-397.
- 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.A.B., and Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143: 37033711.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. microbiol.* 16:584-586.
- Miller, W. G., Leveau, J. H. J., and Lindow S. E. 2000. Improved gfp and *inaZ* Broad-host range promoter-probe vectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1243-1250.
- Mills, PC, DJ Richardson, JC Hinton, and S Spiro. 2005. Detoxification of nitric oxide by the flavorubredoxin of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Biochem. Soc. Trans.* 33:198-9.
- Mor, H., Manulis, S., Zuck, M., Nizan, R., Coplin, D.L. and Barash, I. (2001) Genetic organization of the *hrp* gene cluster and *dspAE/BF* operon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 431-436.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y. & Chatterjee, A. K. (1997). Molecular

- characterization and expression of the *Erwinia carotovora* *hrpN<sub>Ecc</sub>* gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction. *Mol Plant-Microbe Interact* 10, 462-471.
- Nguyen, A. N., J. Kaneko, and Y. Kamio. 2002. Temperature-production of carotovoricin Er and pectin lyase in phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2:444-44739.
- Nguyen, A. N., T. Tomota, J. Kaneko, M. Hayashi, and Y. Kamio. 2001. DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *J. Bacteriol.* 183:6274-6218.
- Oakley B.R., Kirsch D.R., Morris N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 105(2):361-3.
- Okinaka, Y., Yang, C. H., Perna, N. T., and Keen, N. T. 2002. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthimi* 3937 genes that are regulated during plant infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 619-629.
- Osbourn, A. E., Barber, C. E., and Daniels, M. J. 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a promoter-probe plasmid. *EMBO J.* 6: 23-28.
- Park, S.-Y., Lee, S.J., Oh, T.-K., Oh, J.-W., Koo, B.-T., Yum, D.-Y., and Lee, J.-K. 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiol.* 149: 1541-1550.
- Perombelon, M. C. M. & Salmond, G. P. C. (1995). Bacterial soft rots. In *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*, vol. 1, pp. 1-7. Edited by U. S. Singh, R. P. Singh & K. Kohmoto. Oxford: Pergamon Press.
- Pierson, L.S. III, Keppenne, V.D., and Wood, D.W. 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J. Bacteriol.* 176: 3966-3974.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and Palva, E.T. 1993. 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.
- Py, B., Barras, F., Harris, S., Robson, N. & Salmond, G. P. C. (1998). Extracellular enzymes and their role in *Erwinia* virulence. Methods Microbiol 27, 157-168.
- Rahme, L.G., Mindrinos, M. and Panopoulos, N. (1991a) Genetic and transcriptional organization of the *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J. Bacteriol. 173, 575-586.
- Rainey, P. B., and Preston, G. M. 2000. *In vivo* expression technology strategies: valuable tools for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 11: 440-444.
- Rantakari, A., Virtaharju, O., Viko, S., Taira, S., Palva, E., Saarilahti, H. and Romantschuk, M. (2001) Type III secretion contributes to the pathogenesis of the soft-rot pathogen *Erwinia carotovora*: Partial characterization of the *hrp* gene cluster. Mol. Plant-Microbe Interact. 14, 962-968.
- 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. 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiol. 148: 923-932.
- Romeo, T. (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol. Microbiol. 29, 1321-1330.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. and Bonas, U. (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9368-9373.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch E. F. (1989). Molecular Cloning: a

- Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E. jr., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 60366041.
- Smidt, M. L., and A. K. Vidaver. 1982. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW- a in plant tissue. Can. J. Microbiol. 25:367-374.
- Smith, H. 1998. What happens to bacterial pathogens *in vivo*. Trends Microbiol. 6: 239-243.
- Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangel, J.L. and Galan J.E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. Science, 292, 2285-2289.
- Takahara, Y. 2000. Biokeeper wettable powder: The reserch and practical application of microbial pesticide for softrot disease. In Bacterial Control for Crop protection. Rural Development Administration pp. 57-65.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J., and Kokkinidis, M. 2004. Conserved features of type III secretion. Cellular Microbiol. 6: 805-816.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., and Conway, T. 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. Journal of Bacteriology 181: 6425-6440.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marena, M. and Boucher, C. (2000) *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. Mol. Microbiol. 36, 249-260.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C. and Brito, B. (2000) The hrpB and hrpG regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for

- different stages of the tomato root infection process. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 259-267.
- Venkatesh, B, L Babujee, H Liu, P Hedley, T Fujikawa, P Birch, I Toth, and S Tsuyumu. 2006. The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. *J. Bacteriol.* 188(8):3088-98.
- Vincent-Sealy, L. V., J. D. Thomas, P. Commander, and G. P. C. Salmond. 1999. *Erwinia carotovora* DsbA mutants: evidence for a periplasmic-stress signal transduction system affecting transcription of genes encoding secreted proteins. *Microbiology* 145: 1945-1958.
- Von Bodman, S. B., D. R. Majerczak, and D. L. Coplin. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7687-7692.
- Wei, Z.M. and Beer, S.V. (1995) hrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J. Bacteriol.* 177, 6201-6210.
- Wei, Z.M., Kim, J.F. and Beer, S.V. (2000) Regulation of hrp genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX /HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 1251-1262.
- Wei, Z.M., Laby, R., Zumoff, C., Bauer, D., He, S., Collmer, A. and Beer, S. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257, 85-88.
- Weisburg, W.G., Barns, M.S., Pelletier, A.D., and Lane, J.D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., and Salmond, G.P.C. 2001. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.
- Xiao, Y. and Hutcheson, S.W. (1994) A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs

- expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 176, 3089–3091.
- Xiao, Y., Lu, Y., Heu, S. and Hutcheson, S.W. (1992) Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp cluster. J. Bacteriol. 174, 1734–1741.
- Xu, G. W., and C. F. Gonzalez. 1991. Plasmid, genomic, and bacteriocin diversity in U.S. strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Phytopathology. 81:628–631.
- Yoneyama, K., Kono, Y., Yamaguchi, I., Horikoshi, M., and Hirooka, T. 1998. Toxoflavin is an essential factor for virulence of *Burkholderia glumae* causing rice seedling rot disease. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 91–96.
- Zhang, H.B., Wang, L.H., and Zhang, L.H. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 4638–4643.
- Zwiesler-vollick, J., Plovnick-Jones, A., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Joardar, V., Kunkel, B. N., and He, S. Y. 2002. Identification of novel hrp-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 genome. Molecular Microbiology 45: 1207–1218.