

11-
1543000-
002342-01

발간등록번호
11-1543000-002342-01

동·식물 병원균의
기능유전체학적 연구를 통한
병진단 및 제어기술 개발
최종보고서

2018.11.02.

주관연구기관 / 부산대학교
협동연구기관 / 부산대학교

농림축산식품부

포스트게놈다부처유전체사업 R&D Report

동·식물병원균의기능유전체학적연구를통한병진단및제어기술개발 최종보고서

2018

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식물_미생분과 균류_미생물 상호작용에 대해 비교 유전체 및 비교 *in host* 전사체 분석을 통한 새로운 병원성 인자 발굴 및 응용”(개발기간 : 2016.11.07. ~ 2018.08.22.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.11.02.

주관연구기관명 : 부산대학교

윤 석 영

협동연구기관명 : 부산대학교

윤 석 영



주관연구책임자 : 시 영 스

협동연구책임자 : 이 복 돈

국기연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	916009-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.11.07. ~ 2018.08.22.	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 1 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	식물_미생물과 곤충_미생물 상호작용에 대해 비교 유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 새로운 병원성 인자 발굴 및 응용			
연구책임자	서 영 수	해당단계 참여연구원 수	총: 13명 내부: 12명 외부: 1명	해당단계 연구개발비	정부:400,000천원 민간: 천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 12 명 외부: 1 명	총 연구개발비	정부:400,000천원 민간: 천원 계:400,000천원
연구기관명 및 소속부서명				참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 루이지애나 주립대학교 (미국)			연구책임자: 함 종 현	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	6							3	6		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

다양한 *Burkholderia* species의 유전체 분석을 통해 진화론적 관계를 설명하고, 비교유전체분석의 결과로 *B.glumae* BGR1의 특이적인 hfq 유전자 및 T6SS의 기능을 연구하여, 병원성 인자를 발굴함.

비교 *in host* 전사체 분석을 통해, 식물 병원성 *Burkholderia glumae* BGR1과 곤충 공생 *Burkholderia* sp. RPE64의 공통적인 up-regulated pathway를 확인하여 돌연변이주를 제작하였음. 숙주-공생 *burkholderia*의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석을 수행해서 AprA 유전자 결손 돌연변이 균주가 숙주 곤충에 대해 현저히 떨어진 독성을 나타낸다는 것을 보임으로써, AprA가 중요한 독성 인자임을 증명함. 특히, 공통적 pathway에서 sulfate transport system 구성요소 중 *cysW* 변이 돌연변이주에서 병원성이 감소함을 확인하여 비교 *in host* 전사체 분석을 통한 접근성 효율적임 보임.

공생 *burkholderia*를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명을 위해서 곤충의 중장기관에서 콩 유래의 inhibitor를 찾았고, 이 물질이 O-antigen이 결합된 재조합 변이 공생 *burkholderia*를 사멸시킨다는 것을 증명하여 *Burkholderia*의 LPS O-antigen은 중요한 공생인자임을 밝혀냄. 이외에도 전사체 분석 내용을 기반으로한 공생 인자인, *wbiG*, *wabS*, *wabO*, *waaC*, *waaF*가 결합된 재조합 변이 공생 *burkholderia*의 제작하였고, 재조합 변이 공생 *burkholderia*를 이용한 공생 인자가 공생균의 LPS core OS가 숙주 곤충이 중장에 공생을 하는 데 중요한 역할을 한다는 내용을 돌연변이주를 이용하여 규명함.

세계최초로 벼에 *Burkholderia glumae*와 *Fusarium gramineum*의 복합감염하는 기작을 규명함

보고서 면수
92 쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>동·식물 공통 병원균인 <i>Burkholderia</i>를 사용하여, 비교유전체, 비교 <i>in host</i> 전사체 및 생물정보학을 기반으로하여 <i>Burkholderia</i>의 기주 특이성을 결정하는 특정 유전인자를 규명하고, 더 나아가 병원균과 공생균을 결정하는 신규 유전자원을 발굴하고자 한다. 또한, 대용량 기능유전체학적 방법을 통하여 <i>Burkholderia</i>의 종에 따른 진화론적 관계를 설명하고, 최종적으로는 <i>Burkholderia</i>의 병 전염경로와 병 발생 기작에 대해 규명하고, 이를 통한 진단 및 친환경적 방제 기술을 마련하고자 한다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>유용유전자원확보 6건 (달성률 : 120%) 표준유전체해독 3건 (달성률 : 150%) 미생물진단마커개발 2건 (달성률 : 100%) 미생물병발생기작규명 1건 (달성률 : 100%) 특허출원 2건 (달성률 : 100%) SCI 논문 6편 게재 (달성률 : 150%) 학술발표 4건 (달성률 : 100%)</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>동·식물 공통 병원성 <i>Burkholderia</i>에서 발견되는 특정 병원성 유전 인자의 진화론적인 근연관계를 규명하고, 신규 병원성인자의 규명을 통해 식물 병원성 <i>Burkholderia</i>에 의한 병을 신속히 진단할 수 있고, 병 발생 진단 키트의 개발에 필요한 기초자료로 활용할 수 있다. 더 나아가, 복합감염기작 규명을 통해 친환경농업 등에서 빈발하는 복합감염의 방제에 기초를 제공할 수 있다. 또한, 다양한 공생 인자 발굴을 통한 공생기작의 이해를 돕고 톱다리개미허리노린재의 친환경방제제 개발을 위한 원천핵심 기반 기술 마련에 기초를 제공할 수 있다.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>기능성유전체학</p>	<p>벼</p>	<p><i>Burkholderia</i> 세균</p>	<p>병원성</p>	<p>톱다리개미허리 노린재</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>functional genomcis</p>	<p>rice</p>	<p><i>Burkholderia</i> spp</p>	<p>virulence</p>	<p><i>Riptortus</i> <i>pedestris</i></p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구수행 내용 및 결과
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도
4. 연구결과의 활용 계획 등
붙임. 참고 문헌

<별첨> 연구개발보고서 초록

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<별첨> 연구성과 활용계획서

1장. 연구개발과제의 개요

1절 연구개발 목적

1. *Burkholderia*는 벼알마름병, 줄기썩음병, 그리고 유모썩음병을 일으켜 수확량에 피해를 주는 대표적인 아열대 식물병원성 세균이다. 한국에서 1986년 처음으로 전국적인 발생이 8개 지역에서 보고가 된 후, 1990년도 전남 서해안 지대의 벼 재배지역에서 점진적으로 피해 발생이 증가함이 보고가 되었으며, 1999~2000년 2년동안 전국적인 조사를 통해 약 20% 내외의 발병률이 보고가 되었지만, 지금까지 한국에서 대 발생으로 큰 피해는 발생하고 있지 않다. *Burkholderia*의 병원균이 발생한 지역은 특정 조건의 경우(아열대성기후나 곤충과 함께), 일본의 구주지역(1975~1989년; 30~40% 발병률), 미국의 남부 벼 농사지역(1995년~1998년; 40% 수확량감소), 코스타리카를 포함한 중남지 지역(1997년, 30~90% 수확량 감소)에서 보고가 되었다. *Burkholderia glumae*는 벼 이외에도 가지, 감자, 토마토와 같은 다양한 발작물에도 줄기 썩음병을 유발한다. 한국의 경우, 다습한 열대야가 지속되는 기후와 벼의 개화시기가 일치할 경우 대 발생이 가능하다. 뿐만 아니라 주요 발작물에도 아열대성 기후로 진행됨에 따라서 큰 피해를 초래할 수 있다. **기후 온난화의 영향으로 우리나라에 아열대성 병원균과 해충에 의한 피해가 증가할 것으로 예상이 되지만, 돌발 병해충에 대한 방제기반이 매우 미흡한 편이며, 이에 대처할 수 있는 신속하고 효과적인 접근인 방법으로 유전체 및 오믹스 기반으로 한 식물병해충 방제가 필요하다.**

2. 차세대 유전체 해독 기술이 보급된 이래 더 우수한 성능의 해독 기술이 보급되고 있다. 그동안 다양한 종의 유전체가 해독되었으며, 이를 바탕으로 전사체학(transcriptome)을 포함한 기능성유전체학의 필요성이 증가하고 있다. 하지만, 미생물의 기능성 유전체학적 접근은 *in vitro* 수준에서 대부분 수행이 되었으며, *in situ* 또는 *in vivo* 조건에서의 수행이 어려우며, 특히 병원균 또는 공생균이 기주와 상호작용 시에 발생하는 기작 구명을 위한 미생물의 *in host* 기능성 유전체학적 접근은 매우 미흡한 편이다.

3. 동·식물 병원균인 *Burkholderia species*를 사용하여, 유전체 및 *in host* 기능성 유전체학적 접근으로 *Burkholderia*의 기주 특이성을 결정하는 특정 인자를 규명하고, 더 나아가 병원균과 공생균을 결정하는 신규 유전자원을 발굴하는 것과 숙주-공생 미생물간의 상호작용에 대해 연구하고자 한다. 또한, *Burkholderia*의 종에 따른 진화론적 관계를 설명하고 **최종적으로 *Burkholderia*의 병 전염경로와 병 발생기작에 대한 규명**을 하고자 한다.

4. 공통연구 분모인 *Burkholderia species*의 경우 벼 병원성 *Burkholderia*와 bean-bug 공생 *Burkholderia*에 대한 유전체 및 분자생물학적 기반이 마련되어 있으며, 특히 bean-bug 공생 *Burkholderia*의 경우에는 대부분의 공생균이 10^5 이하의 농도로 기주와 상호 작용을 하는 것에 비해 우점종으로 10^7 이상의 고농도로 bean-bug (*Riptortus pedestris*, 툽다리개미허리노린재)의 장내에서 공생관계를 유지한다. 이를 통해 *in host* 기능성 유전체학적 접근이 가능하여 식물-*Burkholderia*와 곤충-*Burkholderia* 상호 작용 연구 및 비교 분석을 할 수 있는 좋은 모델을 가지고 있다.

5. 포스트게놈다부처유전체사업을 통해 *Burkholderia*라는 공통분모를 매개로 하여, 각 연구팀이 보유한 **연구능력 및 기술을 융합하여 국내외적으로 누구도 시도한 적 없는 접근으로 새로운 병원**

성 인자 또는 상호작용기작을 규명하여 친환경병해충방제체계 확립기반을 마련하는데 목적을 둔다.

2절. 연구개발의 필요성

1. 다양한 유전체 변이와 농업생태계에서 다양한 역할을 가지는 *Burkholderia* species 진화적 관계 규명을 통한 이해

가. *Burkholderia* species는 다른 병원성 세균과는 다르게 유전체 크기가 대략 2~11Mbp를 가지고, 병원균, 공생균 등의 역할로서 다양한 환경에 서식하고 있다. 농업생태계에서 *Burkholderia* species는 다양한 발작물과 수도 작물, 해충, 나아가 다른 병원균과의 상호작용을 하기에, *Burkholderia* species와 작물, *Burkholderia* species와 곤충의 다각적인 상호작용 연구가 필요하다. 특히, 연구 대상이 되는 벼 병원성 *Burkholderia glumae* (*B.glumae*)의 경우에는 한국, 중국, 그리고 미국에서의 균주가 유전체의 크기가 ~2Mbp 이상 차이가 나며, 서로 다른 병원성 기작을 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있다. 다른 식물병원성 세균과는 다르게 벼뿐만 아니라 다양한 발작물에도 병을 유발하고 점진적으로 아열대 기후 지역에서 병이 확산되고 최근 미국 남서부와 동남아에서 큰 피해를 유발하였으며, 기후온난화로 인한 국내에서도 큰 피해를 유발할 수 있기 때문에 방제 기술 개발이 매우 시급하다.

2. 식물 병원성 *Burkholderia*의 이해

가. 식물 병원성 *Burkholderia* 중에서 가장 큰 피해를 유발하고 연구가 많이 진행이 된 *B. glumae*는 벼의 이삭과 줄기에 썩음병을 일으킬 뿐만 아니라, 고추, 토마토, 오이 등의 가지과 작물에서 시들음병을 일으킨다. 최근 기후 변화로 인해 우리나라의 벼 생육기 기온이 상승함으로써 고온성 병원 세균벼알마름병 발병이 증가하여 벼 농가에 큰 피해를 야기하고 있으나 병원성 인자 및 감염기작에 대한 연구는 미비하여 이에 대한 연구가 필요하다.

나. *B.glumae*의 경우, Two Component System (TofI/TofR)에 의한 밀도 조절 기작(Quorum Sensing)에 의해 조절되는 일부 병원성 인자에 대해서만 연구가 진행되었다. 특히, Toxoflavin의 경우에는 가장 대표적인 병원성 인자로 밝혀져 있지만, 최근 본 연구팀에 의해 TofI/TofR에 의한 조절을 받지 않는 *Burkholderia gladioli*에 대한 병원성 연구 및 거의 Toxoflavin을 분비하지 않고도 매우 고병원성을 나타내는 균주를 확보하여 식물 병원성 *Burkholderia*의 새로운 병원성 인자 및 감염기작 연구 수행의 필요성이 있다.

3. 곤충 공생균 *Burkholderia*의 이해

가. Bean Bug-*Burkholderia* 공생 모델이 가지고 있는 여러 가지 장점을 이용하여 본 연구팀에서는 장내 *Burkholderia* 공생균의 대량 획득하여 곤충 및 장내 공생균의 생리학·생화학·분자생물학적으로 공생연구가 가능한 모델을 제시하여 세계적으로 많은 기대와 관심을 받고 있는 상황이다. 그러나 *in vitro*에서의 배양 공생균과 *in host*에서의 장내 공생균은 숙자라는 변수에 따라 서로 다른 생리·생태학적인 상태를 나타낼 것이라는 의견이 많다. 따라서 배양 공생균과 장내 공생균의 직접적인 기능성 전사체학적으로 비교하여, 숙주동물인 곤충과의 안정적인 공생

을 이루기 위해 필요한 공생 *Burkholderia*균의 공생유전인자 규명이 필요하다.

4. 비교 유전체, 비교 *in host* 전사체, 그리고 오믹스의 접근법을 이용한 중간 상호작용 및 비교 감염기작 연구의 이해

가. 비교 유전체학 분석을 통해 식물 병원성 *Burkholderia*와 곤충 공생 *Burkholderia*의 진화론적 관계를 이해하고 식물병원성 *Burkholderia*와 곤충 공생 *Burkholderia*의 공통적으로 가지는 특이적인 유전자를 발굴하고, **병원성 및 공생에 중요한 역할을 하는 유전자들을 서로 다른 세균에서 검증함으로써 특이적 · 공통적 감염기작을 연구하기 위한 기능유전체학을 적용한 병원체-식물 간의 상호작용 연구가 필요하다.**

나. *Burkholderia*라는 공통분모를 매개로 하여, 각 분야의 우수한 연구팀의 연구능력과 기술을 융합하여 국내외적으로 누구도 시도한 적 없는 접근인, 서로 다른 기주를 가지고 그 역할이 차이가 나는 식물병원성 *Burkholderia*와 곤충 공생 *Burkholderia*의 *in host* 전사체분석을 포함한 **기능성 유전체학의 오믹스를 이용해 새로운 병원성 인자 또는 상호작용 기작을 구명하여, *Burkholderia*의 종에 따른 진화론적 관계를 설명하고 나아가 *Burkholderia*의 병 전염경로와 병 발생 기작에 대한 규명을 통해 친환경 병해충방제체계 확립기반을 마련할 필요가 있다.**

3절. 연구개발 범위

1. 1차년도

가. 식물병원성 *Burkholderia gladioli* KACC11889의 완전 유전체해독

(1) NGS 기반으로 *Burkholderia gladioli* KACC11889를 비롯한 서로 다른 병원성을 가지는 식물 병원성 ***Burkholderia* species (*B. glumae* 957856-41-C, *B. glumae* 411gr-6, *B. glumae* 336gr-1)의 완전 유전체 해독 완료하여, NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등재함.**

나. 서로 다른 병원성을 가지는 식물 및 동물 병원성 *Burkholderia* species 간의 비교 유전체 연구

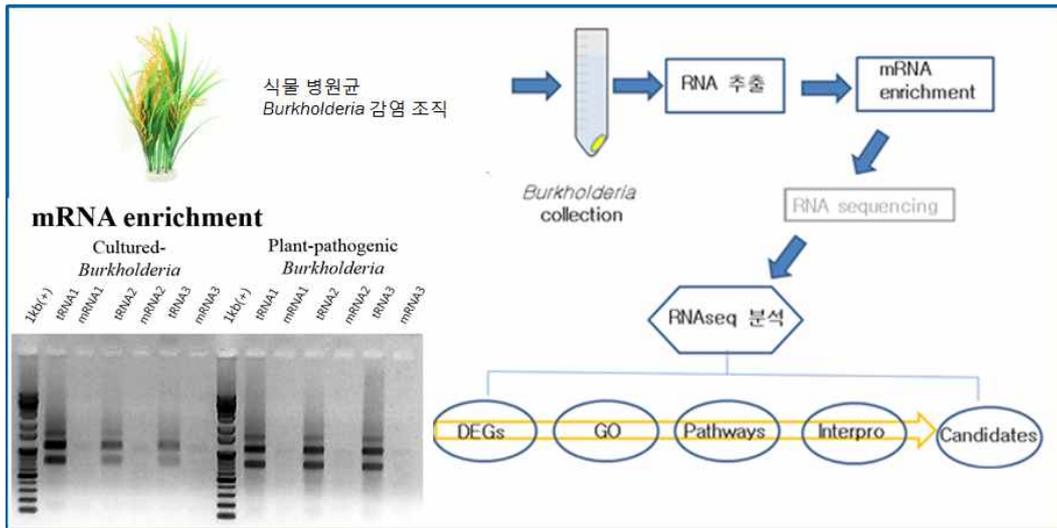
(1) 식물 및 동물 병원성 *Burkholderia* species (*B. glumae* BGR1, *B. gladioli* BSR3, *B. cepacia* LO6, *B. pseudomallei* K96243) 의 whole genome sequence를 이용해 비교 유전체 분석 수행하였으며, 진화적인 측면과 비교유전체 분석을 통해 *Burkholderia* species간의 진화적 차이를 확인하였고, 특히, *Burkholderia* species에서 주요 병원성인자로 알려진 **Secretion system에 집중적으로 비교 유전체 분석 수행**

다. 식물과 곤충의 *Burkholderia* species의 비교 유전체 연구

(1) 식물 병원성 *Burkholderia* species (*B. glumae* BGR1, *B. gladioli* BSR3)와 곤충 공생 *Burkholderia* species (*Burkholderia* sp. RPE64, *Burkholderia* sp. RPE67)의 whole genome

sequence를 이용해 비교 유전체 분석 수행하였으며, 진화적인 측면과 비교유전체 분석을 통해 *Burkholderia* species간의 진화적 차이를 확인하였고, 특히, *Burkholderia* species에서 주요 병원성인자로 알려진 **Secretion system에 집중적으로 비교 유전체 분석 수행**

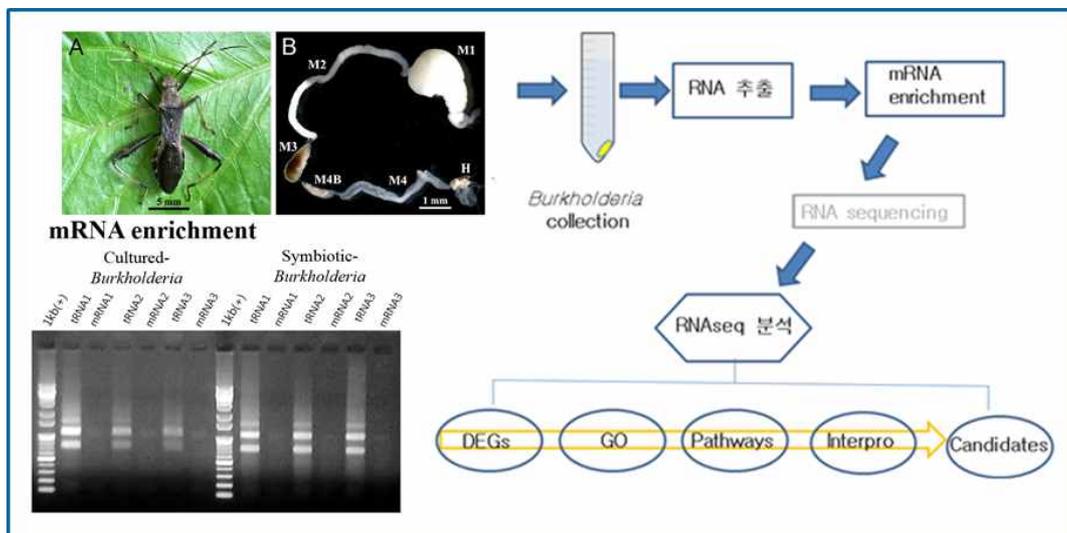
라. 벼 병원성 *Burkholderia* species의 *in host* 전사체 분석



(1) 벼 병원성 *Burkholderia*에 감염된 벼로부터 벼 병원성 *Burkholderia*를 분리 및 대량 확보하여, *in host* 전사체 분석을 수행함으로써 다양한 병원성 인자에 관련된 후보 유전자 발굴을 목표로 함.

(2) 유의성을 **P-value 0.05미만 기준을 통해 Differentially Expressed Genes (DEGs)**를 최종적으로 획득하여, 분석된 RNAseq data를 이용해 추가적으로 **KEGG pathway 분석 수행** 함.

마. 곤충 공생 *Burkholderia*의 *in vitro* 및 *in host* 전사체 분석



(1) 톱다리개미허리노린재의 중장기관(M4)에 서식하고 있는 장내공생균인 *Burkholderia* sp. RPE64를 대량 확보하여, *in host* 전사체 분석을 수행함으로써 다양한 공생인자와 공생기작에 관련된 유전자를 발굴을 목표로 함.

(2) 유의성을 **P-value 0.05미만 기준을 통해 Differentially Expressed Genes (DEGs)**를 최종적으로 획득하여, 분석된 RNAseq data를 이용해 추가적으로 **KEGG pathway 분석** 수행 함.

(3) **RNAseq 정보를 바탕으로 *in vitro* Burkholderia sp. RPE64와 장내 공생균인 Burkholderia sp. RPE64간의 유전자 발현 패턴 비교분석을 통해 숙주의 장내 환경 하에서만 발현되는 다양한 공생 인자의 후보군을 추리할 수 있으며, 기존 보고된 인자들을 선별해냄으로써, 신규 공생 인자를 발굴함.**

바. 공생 *Burkholderia*를 선별하기 위한 숙주의 방어기작 규명

(1) 톱다리개미허리노린재 유래의 **항균활성 물질 선별을 위한 정제 및 분리를 통해 방어물질을 선별** 연구 수행함.

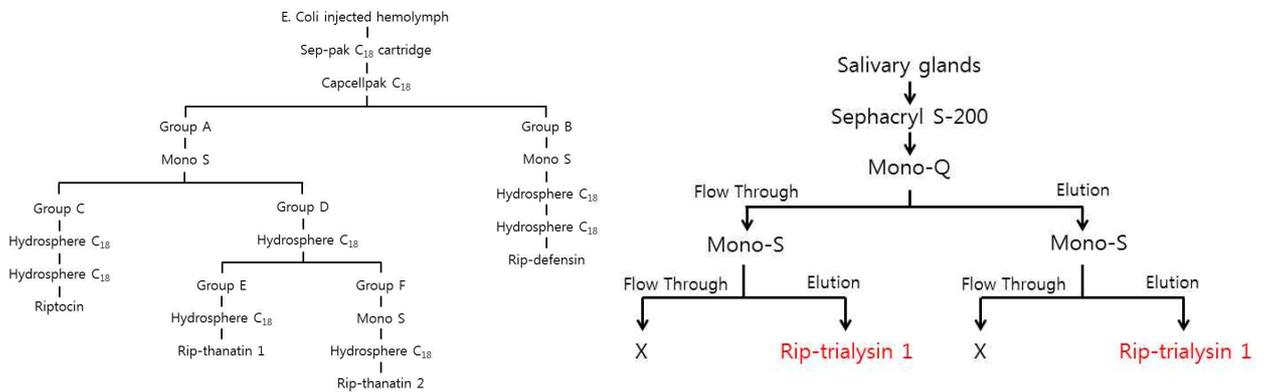


그림 5 톱다리개미허리노린재 유래의 항균활성 물질 선별을 위한 정제과정 모식도

(2) 세포벽 성분 중, **O-antigen이 걸여된 재조합 변이 공생 Burkholderia를 이용**하여, 곤충의 방어물질을 screening함.

2. 2차년도

가. 식물병원성 *Burkholderia*와 Bean-bug 공생 *Burkholderia*의 비교 *in host* 전사체분석

(1) 식물병원성 *Burkholderia*와 Bean-bug 공생 *Burkholderia*의 orthologue를 이용한 비교유전체 분석으로 단순 비교를 수행함.

(2) *in host* 식물병원성 *Burkholderia*와 *in host* Bean-bug *Burkholderia*의 RNAseq 결과인 DEGs 분석을 수행하여, Kegg pathway enrichment 분석을 하였고, 이를 통해 **두 Burkholderia 간의 in host 비교전사체 분석**을 수행함.

나. 비교 *in host* 전사체 분석 및 비교 유전체 분석으로 선발된 식물 병원성 인자 후보 유전자가 결여된 돌연변이체 확립 및 병원성 실험

(1) *Burkholderia* species의 **비교유전체 연구를 통해 확보한 Type VI Secretion System (T6SS) 특이성을 확인**하여 식물 병원성 *Burkholderia*의 T6SS 관련 유전자가 결여된 재조합 변이 균주를 제작하여 병원성 실험 수행함.

(2) *Burkholderia* species의 비교유전체 분석을 통해 확보한 다른 *Burkholderia* species와 달리 식물 병원성 *Burkholderia glumae*에서 **2개의 Hfq 유전자 있음을 확인하고 그 특이성에 대해 재조합 변이 균주 제작 및 병원성 실험** 수행함.

(3) 식물 병원성 *Burkholderia* species 간의 **분비단백질에 대한 비교유전체 연구 수행함.**

다. 비교유전체 및 비교 *in host* 전사체 분석을 통한 식물 병원성 *Burkholderia*의 진단 및 제어 기술 개발

(1) *B. glumae* 및 *B. gladioli*를 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트의 제작을 위해 *B. glumae*와 *B. gladioli* 전체 유전자 서열을 이용하여 제작 수행

(2) **PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭 반응 조건 확립을 통한 민감도, 특이성 및 적용 가능성을 평가하기 위한 PCR에서 효율적인 검출을 나타내는 프라이머 쌍을 선택하여 효율적인 프라이머 세트를 결정함.**

라. 공생 인자가 결여된 재조합 변이 공생 *Burkholderia*의 제작

(1) 비교 유전체 분석 및 비교 전사체 분석을 통해 예측된 공생 인자가 결여된 다양한 여러 개의 재조합 변이 공생 *Burkholderia*를 Homologous recombinant mutagenesis 방법을 이용해 제작함.

마. 재조합 변이 공생 *Burkholderia*를 이용한 공생 인자의 기능 규명

(1) **재조합 변이 공생 *Burkholderia*를 이용하여 톱다리개미허리노린재에 경구감염으로 통해 공생인자의 기능을 규명하기 위한 연구 수행함.**

(2) 톱다리개미허리노린재의 중장기과(M4)에 서식하고 있는 장내 공생균을 확보하여 서식밀도 (colony forming unit assay)를 측정하고, 숙주의 생리학적 및 조직학적 변화를 확인하여 다양한 공생 인자가 공생기작에서 갖는 의미와 그 역할을 규명할 수 있다. 또한, 다양한 분자생물학적 실험방법을 통해 해당 공생인자가 *Burkholderia* 스스로에게 미치는 영향에 대한 연구 수행함.

바. 숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석

(1) **야생의 공생 *Burkholderia*와 재조합 변이공생 *Burkholderia*를 톱다리개미허리노린재에 경구감염하였을 때, 곤충 숙주에서 나타나는 생리학적 변화를 관찰 수행함.**

(2) 특정 공생인자가 결여 되었을 경우, 숙주에 나타나는 생리학적 변화를 확인하고 이를 통해 곤충 미생물 상호작용에 대한 연구를 수행함.

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 연구개발 추진 전략 및 방법

1. 공동 연구체계

- 가. 과제의 성공적 수행을 위해 각 세부과제의 연구결과를 공유하는 시스템을 도입함
- 나. 식물병원균 및 곤충공생균 *Burkholderia*에 대한 돌연변이체 확립 및 기반 기술을 공유하여 효과적인 연구를 수행함.
- 다. 유전체 정보 및 비교 유전체 분석 결과를 각 세부 연구자들과 공유하면서 연구를 수행함.
- 라. 유전체 해독에 필요한 시료(균주 또는 RNA, DNA)는 각 세부과제에서 준비를 하고 유전체 해독된 정보 및 비교유전체 정보를 공유 및 토론하여 병원성 및 감염기작 규명을 효과적으로 진행되도록 함.
- 마. 비교 *in host* 전사체 시료에 필요한 충분한 세균과 양질의 RNA를 확보하기 위해 각 세부과제간의 토론 및 정보를 공유함
- 바. 유전체 해독 및 전사체 분석은 제1세부의 생물정보학팀을 중심으로 raw sequencing reads를 의뢰 기관(NICEM 및 Macrogen)에서 직접 받아서 분석을 수행하여 sequencing 비용을 최소화하여 가능한 많은 시료에 대해서 진행을 하도록 함.

2. 연구개발 협력체계

- 가. 본 연구의 성공적인 추진을 위해 연구진을 미생물 비교유전체 및 전사체 분석과 식물병원균과 분자생물 분야의 전문가와 곤충 공생균의 분자생화학 전문가로 공동구성하여 협동 연구로 수행함.

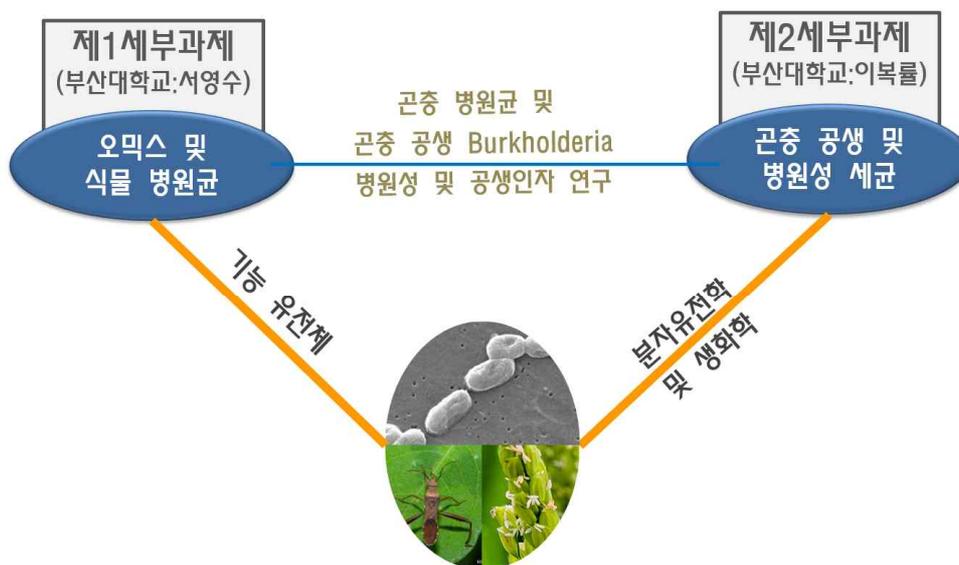


그림 6 연구개발 협력체계 모식도

2절. 연구개발 추진체계

가. 본 연구 계획서의 연구목표와 내용은 국내·외 수준에서 각 분야별로 독보적인 기술력과 연구 모델을 확보하고 있다. 식물병원성 세균의 비교 유전체 및 *in host* 전사체분석 분야로 최고 수준의 전문팀인 부산대 서영수 교수팀(제1세부)과 곤충 공생 *Burkholderia* 분야에서 세계 최고 수준의 연구력을 가지고 있는 부산대 이복률 교수팀(제2세부)이 *Burkholderia* 세균에 대한 연구를 중심으로 벼-*Burkholderia* 그리고 Bean Bug-*Burkholderia*의 각각의 상호작용을 공동 연구하여 새로운 병원성 인자, 감염기작, 그리고 이를 바탕으로 곤충과 미생물의 공생기작과 함께 방제 기술을 개발하고자 한다.

추진체계

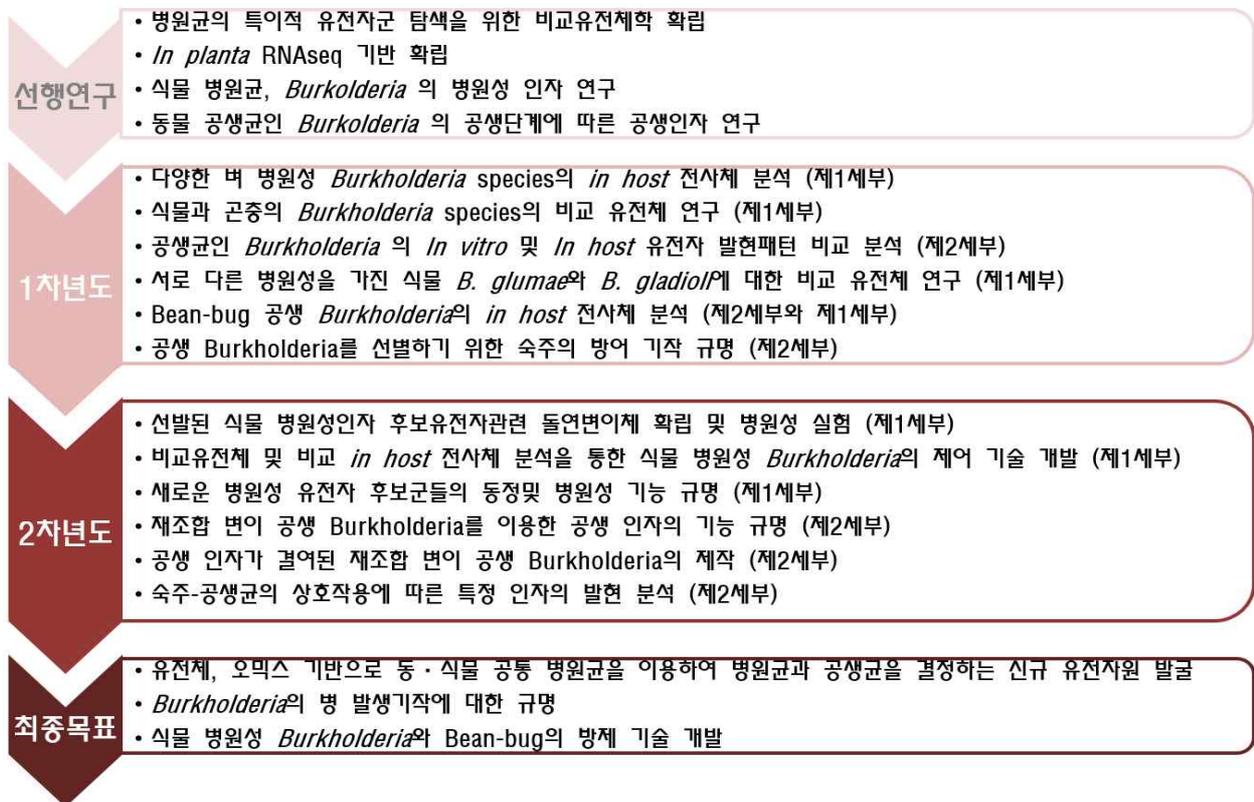


그림 7 연구개발 추진체계 모식도

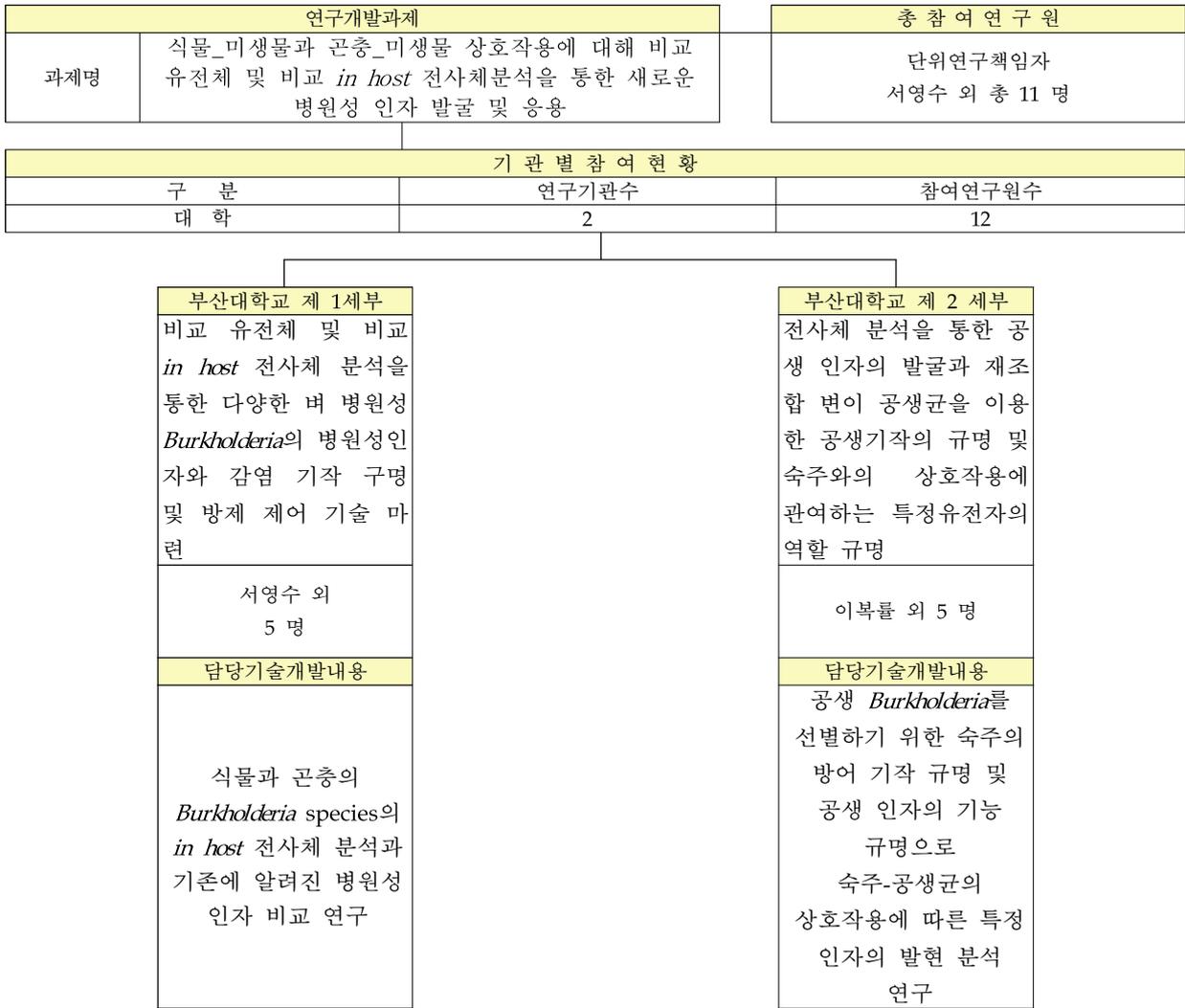


표 1 연구개발 추진체계 도표

3절. 연구개발 추진일정

가. 1차년도 연구개발 추진일정

번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속기관)
		11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	식물 병원성 <i>B. gladioli</i> KACC 11889의 완전 유전체 해독													서영수 (부산대)
2	서로 다른 병원성을 가진 식물 <i>B. glumae</i> 와 <i>B. gladioli</i> 에 대한 비교 유전체 연구													서영수 (부산대)
3	식물과 곤충의 <i>Burkholderia</i> species의 비교 유전체 연구													서영수 (부산대)

4	다양한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석													서영수 (부산대)
5	동물 공생균인 <i>Burkholderia</i> 의 <i>In host</i> 전사체 분석													이복률 (부산대)
6	곤충 공생 <i>Burkholderia</i> 의 <i>In vitro</i> 및 <i>In host</i> 유전자 발현패턴 비교 분석													이복률 (부산대)
7	공생 <i>Burkholderia</i> 를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명													이복률 (부산대)

나. 2차년도 연구개발 추진일정

번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속기관)
		11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	식물 병원성 <i>Burkholderia</i> , bean-bug bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i> 의 비교 <i>in host</i> 전사체 분석													서영수 (부산대)
2	비교 <i>in host</i> 전사체 분석으로 선발된 식물 병원성인자 후보유전자에 관여하는 돌연변이체 확립 및 병원성 실험													서영수 (부산대)
3	비교유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i> 의 진단 및 제어 기술 개발													서영수 (부산대)
4	공생 인자가 결여된 재조합 변이 공생 <i>Burkholderia</i> 의 제작													이복률 (부산대)
5	재조합 변이 공생 <i>Burkholderia</i> 를 이용한 공생 인자의 기능 규명													이복률 (부산대)
6	숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석													이복률 (부산대)

4절. 연구개발 목표 및 결과

1. 제1세부(부산대학교 서영수)

가. 연구개발 목표 및 결과요약

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도	<i>Burkholderia a</i> 균주에 대한 비교 유전체 분석 및 식물과 곤충의 <i>Burkholderia a</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석과 기존에 알려진 병원성 인자 비교 연구	식물 병원성 <i>B. gladioli</i> KACC11889의 완전 유전체 해독	NGS기반으로 <i>B. gladioli</i> KACC11889 genome sequencing 진행하였음.	<i>B. gladioli</i> KACC11889 유전체 해독 이외에 추가적으로 <i>Burkholderia</i> species를 유전체 해독함 (1차년도 2건, 2차년도 1건)
		서로 다른 병원성을 가진 식물 병원균 <i>B. glumae</i> 와 <i>B. gladioli</i> 에 대한 비교 유전체 연구	2개의 식물병원성 <i>Burkholderia</i> (<i>B. glumae</i> BGR1, <i>B. gladioli</i> BSR3), 2개의 인간병원성 <i>Burkholderia</i> (<i>B. pseudomallei</i> K96243, <i>B. cepacia</i> LO6), 2개의 식물내성 <i>Burkholderia</i> (<i>Burkholderia sp.</i> KJ006, <i>B. phytofirmans</i> PsJN), 그리고 2개의 동물심바이오틱 <i>Burkholderia</i> (<i>Burkholderia sp.</i> RPE64, <i>Burkholderia sp.</i> RPE67)을 포함한 8개의 <i>Burkholderia</i> strains에 대한 전체적인 유전체 분석함.	<i>Burkholderia</i> species의 GC%를 확인함. 8개의 <i>Burkholderia</i> strains 모두 T2SS (type 2 secretion system)와 T6SS (type 6 secretion system) 시스템을 가지고 있었지만, T1SS와 T4의 경우에는 대부분이 가지고 없고 있기에, T2SS와 T6SS을 통해서 단백질들을 분비하여 <i>Burkholderia</i> strains에서 중요한 기능을 수행함을 확인하였음.
		식물과 곤충의 <i>Burkholderia</i> species의 비교 유전체 연구	대표적인 병원성 인자 중의 하나인 bacterial secretion system (BSS)에 대한 8개의 <i>Burkholderia</i> strains에 대한 비교 분석함.	
		다양한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석	<i>In vitro</i> 및 <i>in host</i> 에서 분리 획득한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species에 대한 RNAseq 수행함.	RNAseq data를 이용해 Differentially expressed genes(DEGs) 분석 및 KEGG pathway 분석

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도	비교 <i>in host</i> 전사체 연구 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i> 의 새로운 병원성인자 발굴과 감염 기작 구명 및 진단 및 방제 기술 마련	식물병원성 <i>Burkholderia</i> 와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i> 의 비교 <i>in host</i> 전사체분석	식물병원성 <i>Burkholderia</i> 와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i> 의 전사체 분석으로 확보한 KEGG pathway enrichment, KEGG module enrichment를 통해서 <i>in host</i> 내의 발현패턴을 분석	<i>B. glumae</i> BGR1에 비해 <i>Burkholderia</i> sp. RPE64가 conserved 혹은 unique하게 가지는 유전자들에서 EDG가 차지하는 비율이 50%이상으로 20%정도 BGR1보다 높음.
		비교 <i>in host</i> 전사체 분석 및 비교 유전체 분석으로 선발된 식물 병원성 인자 후보 유전자가 결여된 돌연변이체 확립 및 병원성 실험	식물병원성 <i>Burkholderia</i> 와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i> 의 전사체분석을 통해 획득한 DEGs와 유전체정보를 기반으로 Orthologue를 분석하여 식물병원성 <i>Burkholderia</i> 와 곤충 공생 <i>Burkholderia</i> 의 공통적인 유전자와 차별적인 유전자를 전사체 수준에서 분석	비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통해서 <i>B. glumae</i> 와 RPE64의 공통적인 up regulated gene을 확보하여 돌연변이체를 확립 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통해서 <i>B. glumae</i> 와 RPE64의 차별적으로 up regulated gene을 확보하여 돌연변이체 확립 1차년도 비교유전체분석을 통해서 확보한 T6SS 관련 돌연변이체 확립 및 병원성 실험

		<p>비교유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i>의 진단 및 제어 기술 개발</p>	<p>비교유전체학 분석으로 <i>B. glumae</i> 또는 <i>B. gladioli</i> 종의 대표적인 식물병원균은 두 병원균의 genome서열을 제외하고 재구성된 NCBI의 비중복 DNA 서열 데이터베이스에 대하여 BLASTN을 통해 진단 프라이머를 검색하고, 다른 박테리아와 일치하는 유전자를 제거하기 위해, 추정 표적 유전자에 대해 쿼리 적용 범위(query coverage) 및 일치하지 않는 CDS를 포함하는 ID가 30% 미만인 CDS region을 선택함</p> <p>각 표적 종에 속하는 모든 균주에서 높은 상동성 유전자를 수집하기 위해 선택된 유전자를 사용하여 메가블라스트(Mega-blast) 검색을 수행하였음</p>	<p>종자에서 검출되는 <i>B. glumae</i>와 <i>B. gladioli</i>가 1g의 마른 벼 종자 당 각균의 양이 1.86×10^3, 1.04×10^4개만 존재해도 검출되는 진단 프라이머 확보</p>
--	--	---	---	---

나. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>식물 병원성 <i>B. gladioli</i> KACC11889의 완전 유전체 해독</p>	<p>완전 유전체 해독을 위해서 <i>in vitro</i> 배양 균주를 충분히 배양하여 gDNA 추출하여 MacroGen 의뢰. 완전 해독된 유전체 정보에 대해서 annotation 수행.</p>	<p>서로 다른 병원성을 가지는 <i>B. glumae</i> 957856-41-C, <i>B. glumae</i> 411gr-6, <i>B. glumae</i> 336gr-1에 대한 완전 유전체 해독완료하여, NCBI등재.</p>
<p>서로 다른 병원성을 가진 식물 병원균 <i>B. glumae</i>와 <i>B. gladioli</i>에 대한 비교 유전체 연구</p>	<p>비교유전체 분석을 위해서 NCBI에 등재된 식물병원성, 동물병원성, 식물공생균 및 내생균, 동물공생균에 해당하는 <i>Burkholderia</i> species의 완전 유전체 정보 데이터베이스를 이용해 비교유전체 분석 수행</p>	<p>비교유전체 분석을 통해 진화적 근연관계 분석을 포함한 특정 병원성인자 간에 orthologue 분석 진행하여, Conserved 혹은 unique한 유전자에 대한 분석 완료</p>
<p>식물과 곤충의 <i>Burkholderia</i> species의 비교 유전체 연구</p>		

<p>다양한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석</p>	<p><i>in host</i> 전사체 분석을 위한 식물병원성 <i>Burkholderia</i>가 감염된 벼에서 분리과정을 진행하여, 많은 양의 <i>Burkholderia</i>를 수거하여 RNA extraction 과정을 수행, 높은 정확성의 전사체 분석을 위해서 16s rRNA를 제거하기 위한 bacterial mRNA enrichment 과정을 수행함.</p> <p>고농도 양질의 RNA를 이용해 RNAseq 수행하고, RNAseq raw data는 FastQC를 이용해 read quality를 확인, filtering 과정을 통해 양질의 read data를 확보하고, 확보도 data는 referencce genome에 mapping한후, 최종적으로 mapping된 read의 개수를 확인하여, 최종적으로 DEG를 획득함.</p>	<p>비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통해서 확보한 DEGs를 통해 <i>in host</i>에서 가장 중요하게 발현되는 유전자 패턴에 대한 분석과 다양한 <i>Burkholderia</i> species 간의 숙주 내 유전자 발현의 다양성을 확인할 수 있었음.</p> <p>DEGs 분석 Data를 기반으로 <i>Burkholderia</i> species의 간에 공통적 혹은 특이적으로 발현되는 유전자에 대해 병원성 인자 및 공생 인자의 후보군을 확보함.</p>
<p>식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i>의 비교 <i>in host</i> 전사체분석</p>	<p>식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 Bean bug <i>Burkholderia</i>의 <i>in host</i> 전사체 분석을 통해 획득한 KEGG pathway enrichment, KEGG module enrichment를 통해 전반적인 life pattern을 확인함,</p> <p><i>in host</i> 전사체 분석을 통해 최종 획득한 DEGs를 이용해 orthologue 분석을 더해 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i>에서 수행함.</p>	

<p>비교 <i>in host</i> 전사체 분석 및 비교 유전체 분석으로 선발된 식물 병원성 인자 후보 유전자가 결여된 돌연변이체 확립 및 병원성 실험</p>	<p>확보된 후보 유전자에 대해서 <i>SacB</i> 유전자를 이용한 Deletion mutant를 single에서 triple mutant로 제작함. 확립된 특정 유전자 결핍 돌연변이체에 대해서 병원성 및 공생에 대한 표현형을 분석.</p>	<p>병원성 인자 및 공생인자 후보 유전자에 대한 돌연변이체 확립 후, 표현형을 분석함. 식물병원성 <i>Burkholderia</i>의 경우 Hfq 유전자의 특이성을 확인하여 돌연변이체를 확보하여 실험하여 벼의 병원성을 감소하는 것을 확인함. 또한 <i>asnC</i> 유전자 결실 돌연변이의 경우 다른 병원성인자를 조절하여 병원성이 감소하는 것을 확인함.</p>
<p>비교유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i>의 진단 및 제어 기술 개발</p>	<p>식물병원성 <i>Burkholderia glumae</i>와 <i>Burkholderia gladioli</i>의 진단 및 제어 기술 개발을 위한 비교유전체 분석을 기반으로한 프라이머제작 기존의 알려진 진단프라이머보다 저농도 소량의 세포수에도 검출가능하도록 생물정보학 기술을 바탕으로 프라이머 제작</p>	<p>이전의 검출 프라이머세트들에 비해서 상대적으로 현저히 우수한 민감도를 나타내며, <i>B. glumae</i> 및 <i>B. gladioli</i>에만 특이적이며, 특히 벼 종자에 있는 <i>B. glumae</i> 및 <i>B. gladioli</i>를 일반 PCR로서 동시에 검출하는데 효과적인 도구로 작용</p>

다. 연구내용 및 결과

(1) *Burkholderia* 균주에 대한 비교 유전체 분석 및 식물과 곤충의 *Burkholderia* species의 *in host* 전사체 분석과 기존에 알려진 병원성 인자 비교 연구

(가) 식물 병원성 *B.gладиoli* KACC11889의 완전 유전체 해독

B.gладиoli KACC11889 균주를 포함해, 서로 다른 병원성을 가지는 *Burkholderia* species (toxoflavin을 생성하지 않지만, 고병원성을 나타내는 균주인 *Burkholderia glumae* 957856-41-C, *Burkholderia glumae* 411gr-6, *Burkholderia glumae* 336gr-1)로부터 genomic DNA를 추출하여, 추출된 genomic DNA를 주형으로 사용하여 SMRTbell Template Prep Kit 1.0 (Pacific Bioscience, USA)를 통해 약 20 kb 길이를 가지는 DNA sequencing library를 제작하였음. sequencing 및 assembly 수행을 위해 제작된 PacBio SMRTbell sequencing library는 PacBio RS-II (Pacific Bioscience, USA) 장비를 통해 각 시료 당 1 cell의 sequencing 반응을 수행하였고, Sequencing이 완료된 후 얻어진 raw data는 HGAP2 프로토콜을 기반으로 SMRT Analysis Software (Pacific Bioscience)을 통해 분석되었음. BLAST search를 통하여 각 contig 양쪽을 circularization을 수행하였음. 따라서 *B. gladioli* KACC11889의 완전 유전체 해독이 완료되었으며, 모든 유전자에 대해서 annotation 완료하여, NCBI에 등재하였음.

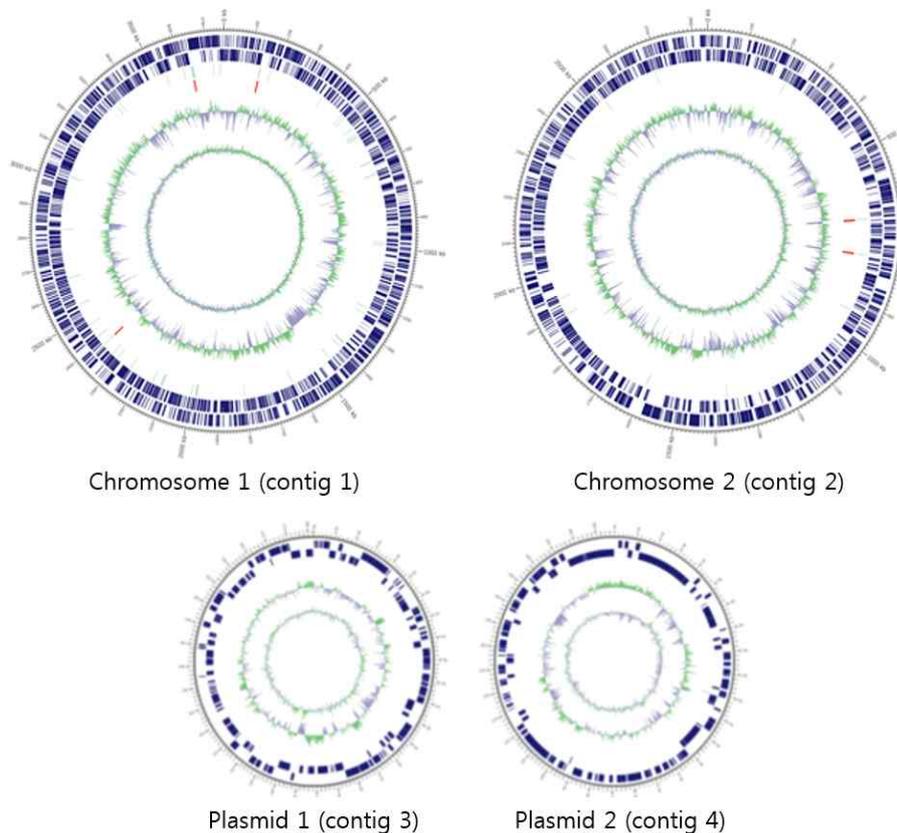


그림 8 *Burkholderia glumae* 957856-41-C의 Sequencing 및 assembly 수행

Contig Name	Length (bp)	CDS	tRNA	rRNA
contig1	3,761,157	3,388	63	9
contig2	2,836,688	2,272	14	6
contig3	181,392	188	0	0
contig4	168,969	156	1	0
Total	6,948,206	6,004	78	15

- Length(bp) : The number of bases in each contig
- CDS : Coding Sequence
- tRNA : Transfer RNA, tRNA has triplet nucleotide sequence complementary to the triplet nucleotide coding sequences of messenger RNA (mRNA)
- rRNA : Ribosomal RNA, a molecular component of ribosome

그림 9 *Burkholderia glumae* 957856-41-C의 Annotation 수행

(나) 서로 다른 병원성을 가진 식물 *B. glumae*와 *B. gladioli*에 대한 비교 유전체 연구와 식물과 곤충의 *Burkholderia* species의 비교 유전체 연구

(논문투고 : ● Nguyen, Thao Thi, et al. "Computational Identification and Comparative Analysis of Secreted and Transmembrane Proteins in Six *Burkholderia* Species." The plant pathology journal 33.2 (2017): 148., ● Nguyen, Thao Thi, et al, 'Genome-Wide Analysis of Type VI System Clusters and Effectors in *Burkholderia* Species', The Plant Pathology Journal, 34(1) : 11-22 (2018))

① 서로 다른 병원성을 가진 식물 *B. glumae*와 *B. gladioli*에 대한 본 연구를 위해서 2개의 식물 병원성 *Burkholderia* (*B. glumae* BGR1, *B. gladioli* BSR3)의 비교 유전체 연구를 2개의 인간병원성 *Burkholderia* (*B. pseudomallei* K96243, *B. cepacia* LO6), 2개의 식물내성 *Burkholderia* (*Burkholderia* sp. KJ006, *B. phytofirmans* PsJN), 그리고 2개의 동물심바이오틱 *Burkholderia* (*Burkholderia* sp. RPE64, *Burkholderia* sp. RPE67)을 포함해 8개의 *Burkholderia* species에 대해 비교 유전체학을 수행함. 본 연구수행내용은 연구추진목표상에서 100%에 해당하며, 본 연구결과는 식물과 곤충의 *Burkholderia* species의 비교 유전체 연구에도 이용되었음 (Table 1)

2개의 식물병원성 *Burkholderia* (*B. glumae* BGR1, *B. gladioli* BSR3), 2개의 인간병원성 *Burkholderia* (*B. pseudomallei* K96243, *B. cepacia* LO6), 2개의 식물내성 *Burkholderia* (*Burkholderia* sp. KJ006, *B. phytofirmans* PsJN), 그리고 2개의 동물심바이오틱 *Burkholderia* (*Burkholderia* sp. RPE64, *Burkholderia* sp. RPE67)을 포함한 8개의 *Burkholderia* strains에 대한 전체적인 유전체 분석은 다음과 같다.

Organism	Size (Mb)	GC%	Host / Isolation source	Reference
<i>B. pseudomallei</i> K96243	7.24755	68.05	human melioidosis	Holden et al., 2004
<i>B. cepacia</i> LO6	6.41938	67.00	pulmonary/ cystic fibrosis	Belcaid et al., 2015
<i>B. glumae</i> BGR1	7.28464	67.93	Rice (phytopathogen)	Lim et al., 2009
<i>B. gladioli</i> BSR3	9.0523	67.41	Rice (phytopathogen)	Seo et al., 2011
<i>B. phytofirmans</i> PsJN (T)	8.21466	62.32	surface-sterilized onion roots	Weilharter et al., 2011
<i>Burkholderia</i> sp. KJ006	6.62991	67.19	Rice root	Kwak et al., 2012
<i>Burkholderia</i> sp. RPE64	6.96449	63.15	Bean bug, bacterial symbiont	Shibata et al., 2013
<i>Burkholderia</i> sp. RPE67	8.68576	63.44	Bean bug, bacterial symbiont	Takeshita et al., 2014

전반적으로 유전체 크기는 6~8Mbp 정도이며, GC%는 대체로 병원성 *Burkholoderia* strains는 67 ~ 68%정도이지만, 내생균이나 공생균인 경우에는 62 ~ 63%정도임을 확인함.

②대표적인 병원성 인자 중의 하나인 bacterial secretion system (BSS)에 대한 8개의 *Burkholoderia* strains에 대한 비교 분석은 아래의 표와 같음.

Secretion pathway	<i>B. pseudomallei</i> K96243	<i>B. cepacia</i> LO6 (*)	<i>B. glumae</i> BGR1	<i>B. gladioli</i> BSR3	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	<i>Burkholderia</i> sp. KJ006	<i>Burkholderia</i> sp. RPE64	<i>Burkholderia</i> sp. RPE67
T1SS	Unclear	Yes	Yes	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear
T2SS	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
T3SS	Yes (3)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Unclear	Unclear
T4SS	Unclear	Yes	Unclear	Unclear	Yes	Yes	Unclear	Unclear
T5SS	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear
T6SS	Yes (6)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tat	Yes	Unclear	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Sec n	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

8개의 *Burkholoderia* strains 모두 T2SS (type 2 secretion system)와 T6SS (type 6

secretion system) 시스템을 가지고 있었지만, T1SS와 T4SS의 경우에는 대부분이 가지고 있지 않기에, T2SS와 T6SS을 통해서 단백질들을 분비하여 *Burkholderia* strains에서 중요한 기능을 수행함을 알 수가 있으며, 동식물 병원성 세균에서 공통적으로 가장 연구가 많이 되어 있는 T3SS의 경우에는 2개의 동물심바이오틱 *Burkholderia* strains을 가지고 있지 않기에, T3SS을 통해서 기주에 대한 병원성을 나타내는 분비단백질들이 작용을 하지 않음을 알 수가 있음.

특히, T6SS (Type VI Scretion system)은 Eukaryotic 및 Prokaryotic cell 모두와 상호작용을 할 수 있는 시스템으로 알려져 있으며, 이 시스템에 의해 분비되는 T6SE (Type VI scretion effector)들은 주요 병원균의 주된 병원성 인자로 알려져 있고, 많은 *Burkholderia* species에서 T6SS는 가장 복잡한 구조를 가지고 있으며, 이는 *Burkholderia* genus에 있어서 T6SS가 중요함을 제시하기 때문에 본 연구팀은 식물 및 환경과 연관되어 있는 *Burkholderia* species들의 T6SS, T6SE를 분석했음. 30개의 *Burkholderia* species를 target genome으로 하여 86개의 잠재적인 T6SS cluster를 확인하였고 이중에서 66개는 13개의 core component 중 10개의 component를 가짐. *B. glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii* strain들은 적어도 2~3개의 기능적인 T6SS cluster를 가진다고 알려져 있으나, plant growth promoting bacteria, symbiont, nodule bacteria들은 1~2개의 T6SS cluster를 가지고 있다. 식물병원성 *Burkholderia*는 식물에 피해를 주는 상호작용에 관여하여, 식물 내에서 colonization을 촉진하는데 관여한다.

② 다양한 *Burkholderia* speice의 T6SS 사이의 phylogenetic relationship 분석

TssC, TssD, TssL protein은 이미 알려져 있는 대부분의 T6SS cluster의 중요 구성 요소이다. 이 때문에 T6SS cluster의 분류 기준이 될 수 있다. 분류 결과, T6SS-i3(39%), T6SS-i4b subtype(38%)이 plant pathogenic *Burkholderia*의 병원성에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀짐.

Bacterial strain	Number of T6SS locus	Potential T6SS subtype				
		i1	i2	i3	i4a	i4b
<i>Plant-associated pathogenic bacteria</i>						
<i>B. glumae</i> BGR1	4	-	1	1	1	1
<i>B. gladioli</i> BSR3	3	-	-	2	-	1
<i>B. glumae</i> LMG 2196	3	-	1	1	-	1
<i>B. glumae</i> PG1	3	-	-	2	-	1
<i>B. plantarii</i> ATCC 43733	3	-	-	2	-	1
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	2	-	-	1	-	1
<i>B. gladioli</i> ATCC 10248	2	-	-	1	-	1
<i>B. gladioli</i> KACC 11889	2	-	-	1	-	1
<i>Plant-associated beneficial bacteria</i>						
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	3	-	1	1	1	-
<i>B. phenoltruxitrix</i> BR3459a	2	-	1	-	-	1
<i>B. phytofirmans</i> PsJN	2	-	-	1	-	1
<i>B. pyrrocinia</i> DSM10685	2	-	1	-	-	1
<i>Burkholderia</i> sp. KJ006	2	-	1	-	-	1
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001	2	-	-	1	-	1
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003	2	-	-	1	-	1
<i>Burkholderia</i> sp. RPE67	2	1	-	1	-	-
<i>Burkholderia</i> sp. RPE64	1	1	-	-	-	-
<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929	1	-	-	-	-	1
<i>B. vietnamiensis</i> G4	1	-	-	-	-	1
<i>Environmental bacteria or biocontrol agent</i>						
<i>B. ambifaria</i> MC40-6	4	-	1	2	-	1
<i>Burkholderia</i> sp. Y123	4	1	1	2	-	-
<i>B. cepacia</i> JBK9	3	1	-	1	-	1
<i>Burkholderia lata</i> sp. 383	3	-	-	2	-	1
<i>B. ambifaria</i> AMMD	2	-	-	1	-	1
<i>B. cepacia</i> GG4	2	-	-	1	-	1
<i>B. phymatum</i> STM815	2	-	-	1	1	-
<i>B. cenocepacia</i> HI2424	1	-	-	-	-	1
<i>B. cenocepacia</i> MC0-3	1	-	-	-	-	1
<i>B. cepacia</i> DDS 7H-2	1	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1	1	-	-	-	-	1
Total (%)	66	4	8	26	3	25
	100%	6%	12%	39%	5%	38%

그림 10 30개의 *Burkholderia* species에서 13개의 core component 중 10개의 component를 가지는 66개의 T6SS 간의 phylogenetic relationship

③ homology에 근거한 Type VI Secretion effector (T6SE) 분류

T6SE는 같은 niche에서 살아가는 bacteria들과의 경쟁을 촉진하거나 저해하는 역할을 하는 것으로 생각되며, experimental effector를 query sequence로 사용해서 potential T6 effector를 찾아보았다. 그 결과 322개의 effector 중 215(66.8%)개가 non classically secreted proteins(NCSPS)이었으며 17개만이 적어도 하나의 TM(transmembrane) domain을 가지고 있었고, T6 effector의 평균적인 가짓수를 비교해 보면 plant pathogenic *Burkholderia*가 14.5개, biocontrol 및 environmental strain이 11.6개, plant associated beneficial bacteria가 7.1개였다. 중요한 것은 plant pathogenic *Burkholderia*의 T6SE들은 plant cell 감염 과정에 관여하는 것이 분명한다는 것이다. 다만, 이 감염 process가 T6SS cluster 및 T6SE candidate의 가짓수와는 상관이 없는 것으로 보이는 것을 확인하였음

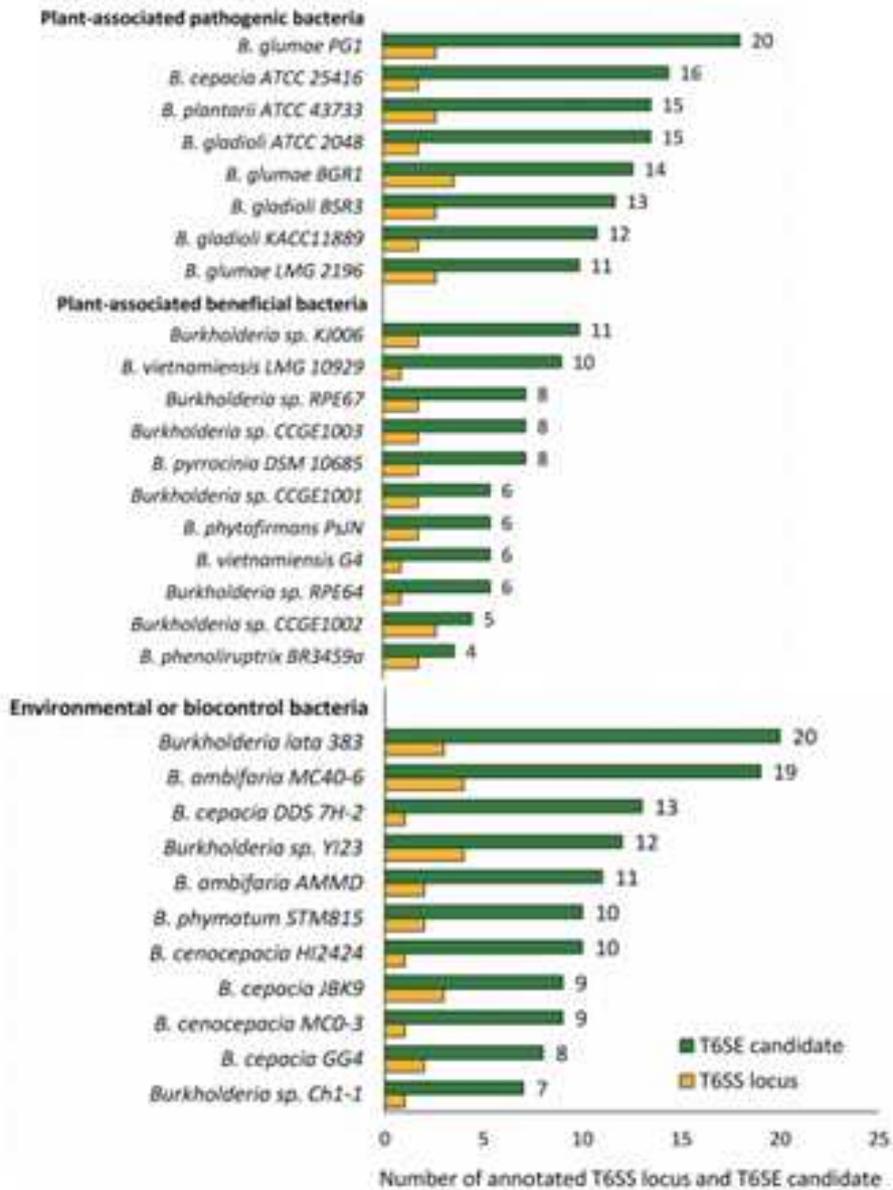


그림 11 T6SE와 annotated T6SS cluster의 분류

④ T6SS cluster의 domain 및 motif 조사

Domain과 motif는 cargo effector와 component effector를 연결해 주는 과정에 관여할 수 있으며 이들을 조사하면 T6SS의 전반적 특징을 파악할 수 있다. 가장 많이 발견되는 domain으로는 VgrG related domain(40%)으로 그 종류에는 VgrG, T6SS_Vgr, VI_Rhs_Vgr가 있으며, 다음으로 많이 발견되는 domain은 Hcp related domain(15%)으로 그 종류에는 T6SS_HCP, VI_effect_Hcp1가 있었다. 식물 내에서 secretion process에 중요한 domain의 경우 두가지로 정리가능하며, 하나는 phospholipase D domain으로 eukaryote와 prokaryote의 cell 모두를 target하는데 관여할 수 있고, 다른 하나는 HNH superfamily로 AHH, WHH, HNHC, Tox_SHH domain 등이 포함되며 이들은 toxicity에 관여함.

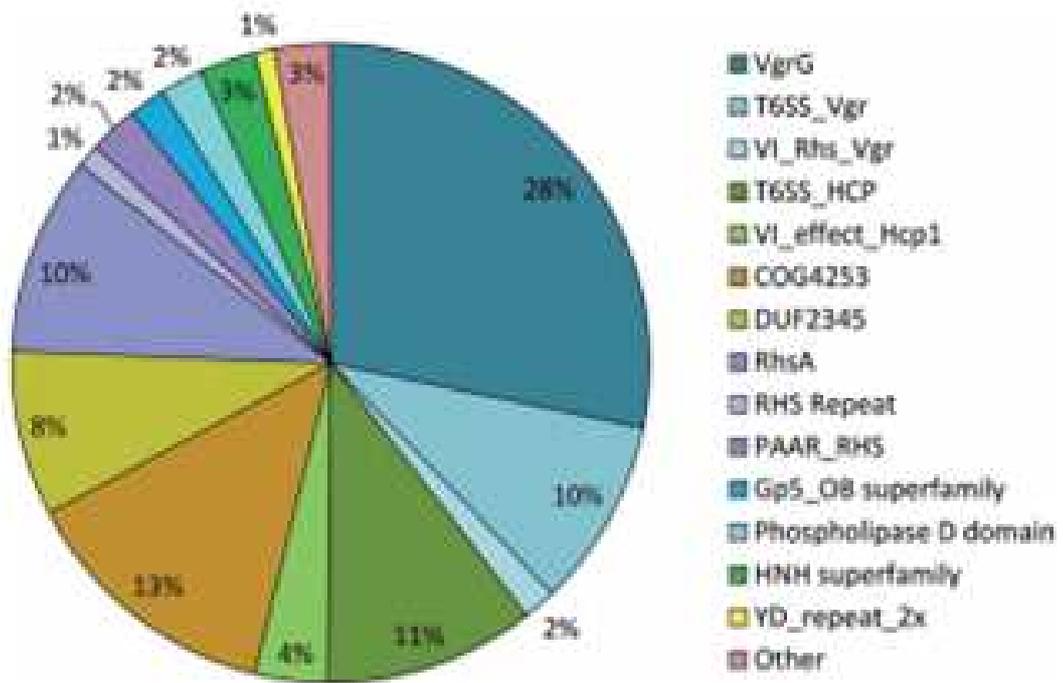


그림 12 *Burkholderia* species의 putative T6SE의 conserved domain 분석

⑤ HMM profile에 근거한 MIX T6SE candidate 분석

T6SE 후보군을 5가지 pHMM(profile hidden Markov model)으로 분석하여 potential MIX T6SE를 밝혀냈고, MIX T6SE는 총 66개의 protein을 포함하고 있으며, 이 중 20개는 T1e1 effector, 즉 anti effector로 작용함을 유추할 수 있었으나, plant associated beneficial bacteria 에서는 MIX T6SE가 발견되지 않음.

Bacterial strain	Locus_tag	Detection model	Specify
<i>B. ambifaria</i> AMMD	Bamb_0209	pHMM5	Non-training
<i>B. ambifaria</i> AMMD	Bamb_3481	pHMM1-4	Non-training
<i>B. ambifaria</i> MC40-6	BamMC406_1283	pHMM1-4	Non-training
<i>B. ambifaria</i> MC40-6	BamMC406_6438	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cenosepacia</i> HL2424	Bcen2424_3748	pHMM1,2,3	Non-training
<i>B. cenosepacia</i> MCO-3	Bcenmc03_3775	pHMM1-4	Non-training
<i>B. cenosepacia</i> MCO-3	Bcenmc03_4489	pHMM5	Non-training
<i>B. cenosepacia</i> MCO-3	Bcenmc03_2204	pHMM2-4	Training
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	APZ15_13810	pHMM1,3	Non-training
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	APZ15_27370	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	APZ15_10550	pHMM5	Non-training ^h
<i>B. cepacia</i> GG4	GEM_2121	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> GG4	GEM_3886	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> GG4	GEM_5241	pHMM1-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> GG4	GEM_2081	pHMM5	Non-training ^h
<i>B. cepacia</i> JBK9	P350_09635	pHMM1,3,4	Non-training
<i>B. cepacia</i> JBK9	P350_21025	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> JBK9	P350_26890	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> JBK9	P350_29000	pHMM2-4	Non-training
<i>B. cepacia</i> sp. DDS 7H-2	DM42_5101	pHMM5	Non-training
<i>B. cepacia</i> sp. DDS 7H-2	DM42_351	pHMM5	Non-training ^h
<i>B. gladioli</i> ATCC10248	BM43_1116	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> ATCC10248	BM43_4700	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> ATCC10248	BM43_5800	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> ATCC10248	BM43_6466	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> BSR3	bgla_1g00120	pHMM5	Non-training
<i>B. gladioli</i> BSR3	bgla_1g35960	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> BSR3	bgla_2g09490	pHMM5	Non-training
<i>B. gladioli</i> BSR3	bgla_2g21270	pHMM2-4	Training
<i>B. gladioli</i> KACC11889	CEJ98_19680	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> KACC11889	CEJ98_33410	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> KACC11889	CEJ98_36770	pHMM2-4	Non-training
<i>B. gladioli</i> KACC11889	CEJ98_26495	pHMM2-4	Non-training
<i>B. glumae</i> BGR1	bglu_2g11010	pHMM2-4	Non-training
<i>B. glumae</i> BGR1	bglu_2g21110	pHMM1-4	Training
<i>B. glumae</i> LMG 2196	KS03_3815	pHMM1,3,4	Non-training
<i>B. glumae</i> LMG 2196	KS03_4819	pHMM2-4	Non-training
<i>B. glumae</i> LMG 2196	KS03_1707	pHMM1,3	Non-training
<i>B. glumae</i> PG1	BGL_1c07750	pHMM5	Non-training
<i>B. glumae</i> PG1	BGL_1c13450	pHMM5	Non-training
<i>B. glumae</i> PG1	BGL_1c14860	pHMM5	Non-training
<i>B. glumae</i> PG1	BGL_2c15480	pHMM5	Non-training
<i>B. lata</i> 383	Bcep18194_B0989	pHMM5	Non-training
<i>B. lata</i> 383	Bcep18194_C7607	pHMM1-4	Training
<i>B. phenoliraptoris</i> BR3459a	BLPH_02104	pHMM5	Non-training
<i>B. phenoliraptoris</i> BR3459a	BLPH_03923	pHMM2-4	Training
<i>B. phymatum</i> STM815	Bply_4426	pHMM1	Non-training
<i>B. phymatum</i> STM815	Bply_7020	pHMM1-4	Training

Bacterial strain	Locus_tag	Detection model	Specify
<i>B. phytofirmans</i> PsJN	Bphyt_0008	pHMM2-4	Non-training
<i>B. phytofirmans</i> PsJN	Bphyt_0012	pHMM2-4	Non-training
<i>B. phytofirmans</i> PsJN	Bphyt_0454	pHMM5	Non-training
<i>B. phytofirmans</i> PsJN	Bphyt_5928	pHMM1	Non-training
<i>B. plantarii</i> ATCC43733	bpln_1g07570	pHMM5	Non-training
<i>B. plantarii</i> ATCC43733	bpln_1g07910	pHMM5	Non-training
<i>B. plantarii</i> ATCC43733	bpln_1g13180	pHMM5	Non-training
<i>B. plantarii</i> ATCC43733	bpln_1g33820	pHMM5	Non-training
<i>B. plantarii</i> ATCC43733	bpln_2g16180	pHMM5	Non-training
<i>B. pyrrocinia</i> DSM10685	ABD05_27150	pHMM2-4	Non-training
<i>B. vietnamiensis</i> G4	Bcep1808_0439	pHMM2-4	Training
<i>B. vietnamiensis</i> G4	Bcep1808_1196	pHMM2-4	Training
<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929	AK36_2702	pHMM2-4	Non-training
<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929	AK36_380	pHMM2-4	Non-training
<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1	BCh11DRAFT_01156	pHMM1	Non-training
<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1	BCh11DRAFT_04532	pHMM2-4	Training
<i>Burkholderia</i> sp. KJ006	MYA_1124	pHMM2-4	Non-training
<i>Burkholderia</i> sp. YI23	BYI23_C000120	pHMM2,3,4	Non-training

^aindicates a protein that shared significantly high similarity with at least one evidential T6SE.

그림 14 HMM profile에 근거한 MIX T6SE candidate

결과적으로, 식물병원성 *Burkholderia*는 식물 유용 *Burkholderia*보다 더 많은 T6SS cluster를 가지고 있으며, T6SS cluster의 주요 component인 TssC, TssD, TssL에 기반으로 둔 계통수를 확인해보면, 비슷한 생활사를 가진 *Burkholderia* species가 가까운 관계에 있음을 확인하였음. 비교유전체학적 접근으로 *Burkholderia*의 T6SS와 T6SE가 *Burkholderia* species가 숙주와 상호작용을 이해할 수 있었음.

(다) 다양한 벼 병원성 *Burkholderia* species의 *in host* 전사체 분석

다양한 *Burkholderia* species의 *in host* 전사체 분석을 위해서 식물병원성 *Burkholderia glumae* BGR1와 곤충 공생 *Burkholderia* sp. RPE64의 *in host* 전사체 분석을 수행하였고, *Burkholderia* sp. RPE 64의 전사체분석 내용은 제2세부 결과자료에 서술하였음.

① KEGG pathway enrichment와 KEGG module enrichment

in host 전사체 분석을 통해 *Burkholderia glumae* BGR1의 up-regulated pathway와 down-regulated pathway를 확인하였고, up-regulated pathway로, chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation, Chloroalkane and Chloroalkene degradation, Microbial metabolism in diverse environments, Starch and sucrose metabolism, Benzoate degradation, Pentose and glucuronate interconversions, Quorum sensing, Degradation of aromatic compounds, Ascorbate and aldarate metabolism, Two-component system, Bacterial chemotaxis, Flagellar assembly의 pathway가 해당되었고, down-regulated pathway로 Biosynthesis of secondary metabolites, Microbial metabolism in diverse environments, Citrate cycle (TCA cycle), Carbon fixation in photosynthetic organisms, Metabolic pathways, Valine, leucine and isoleucine degradation, Oxidative phosphorylation, Carbon metabolism의 pathway가 결과로 도출되었음.

up-regulated pathway Quorum sensing (QS), Two-component system (TCS), Bacterial chemotaxis, Flagellar assembly가 해당되는 것을 보아 in host에서 *Burkholderia glumae* BGR1는 QS와 TCS를 통해 숙주와 활발한 상호작용에 있음을 확인할 수 있었으며, 특히, QS에 의해서 *Burkholderia glumae* BGR1의 운동성의 증가하는 것을 Bacterial chemotaxis, Flagellar assembly pathway가 up-regulated pathway에 해당하는 것으로 유추할 수 있었음.

in host 전사체 분석의 KEGG module enrichment 결과로, 기존의 숙주의 병징을 일으킬 수 있는 병원성으로 알려진 T3SS이 높은 수준으로 식물 내에서 발현하는 것을 in host 전사체 분석으로 간접적으로 확인할 수 있었으나, T6SS는 in host에서 상대적으로 in vitro에 비해 적게 발현되고 있으나, 이것은 *Burkholderia glumae* BGR1가 이미 숙주에서 충분한 colonization을 완료하였기 때문이라 유추함.

본 연구팀은 up-regulated에 초점을 맞추어 후속연구를 진행하였다,

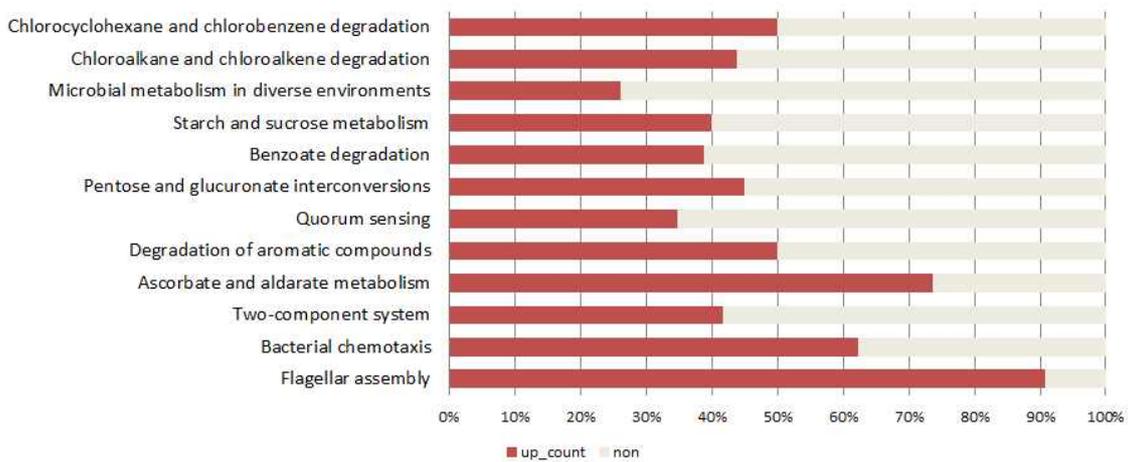


그림 15 *Burkholderia glumae* BGR1 (up-regulated KEGG pathway enrichment)

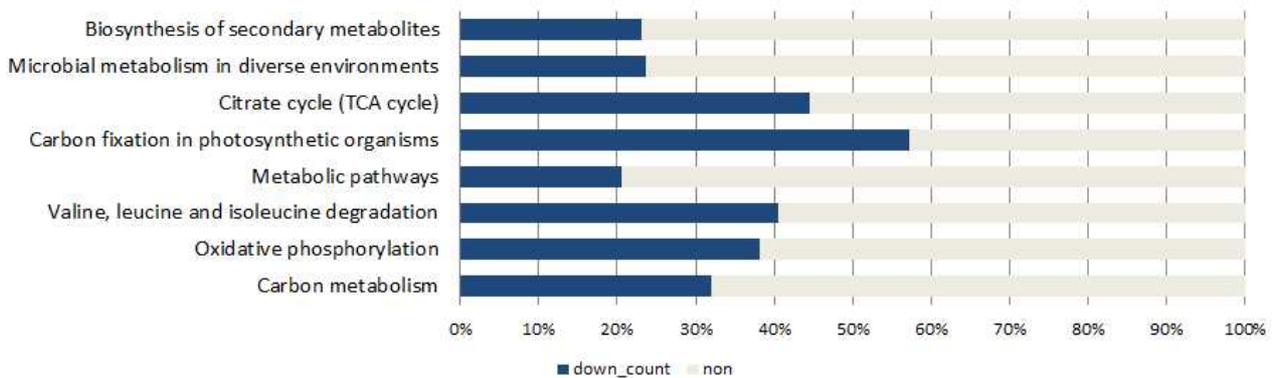


그림 16 *Burkholderia glumae* BGR1 (down-regulated KEGG pathway enrichment)

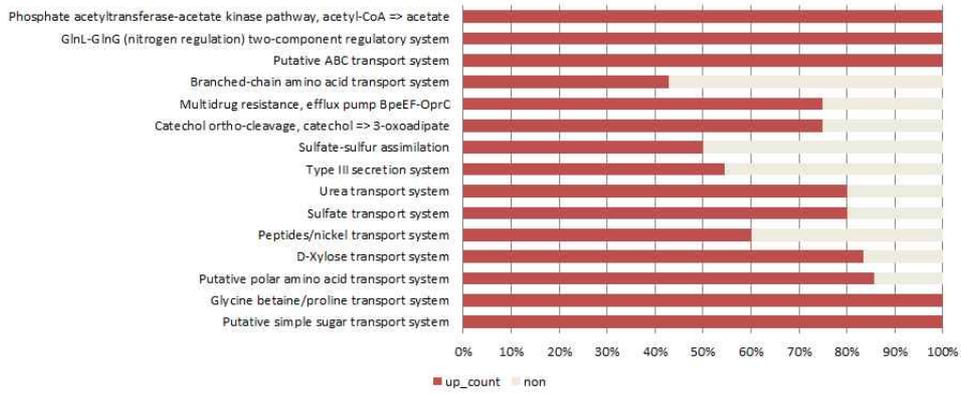


그림 18 *Burkholderia glumae* BGR1 (up-regulated KEGG module enrichment)

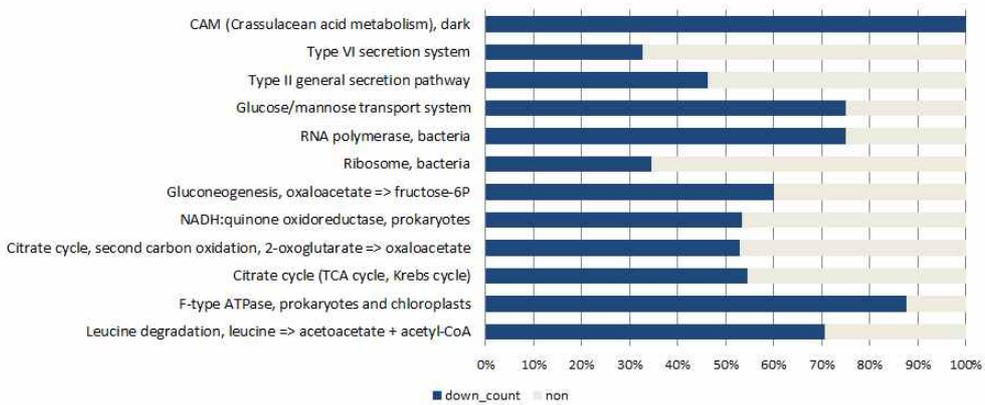


그림 17 *Burkholderia glumae* BGR1 (down-regulated KEGG module enrichment)

(2) 비교 *in host* 전사체 연구 분석을 통한 식물 병원성 *Burkholderia*의 새로운 병원성인자 발굴과 감염 기작 구명 및 진단 및 방제 기술 마련

(가) 식물병원성 *Burkholderia*와 Bean-bug 공생 *Burkholderia*의 비교 *in host* 전사체분석

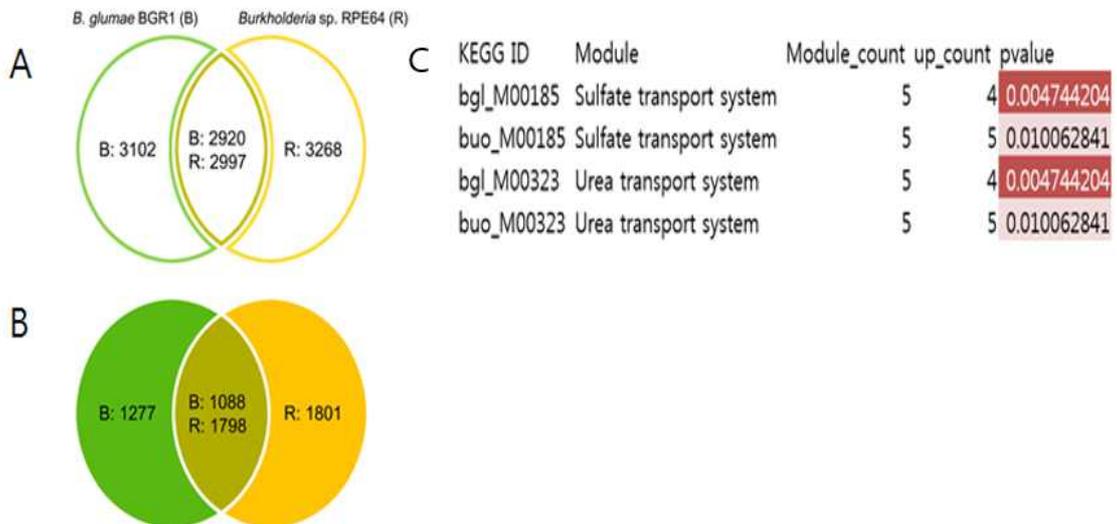


그림 19 유전체 수준(A) 및 DEG 수준(B)에서의 비교분석 및 두 균의 common pathway

비교 in host 전사체 분석을 통해 확보된 *Burkholderia glumae* BGR1과 *Burkholderia* sp. RPE64의 공통 pathway는 아래와 같이 Sulfate와 Sulfonate transport system이 관여하는 pathway와 Urea transport system이 관여하는 pathway 2 가지를 확인할 수 있었음.

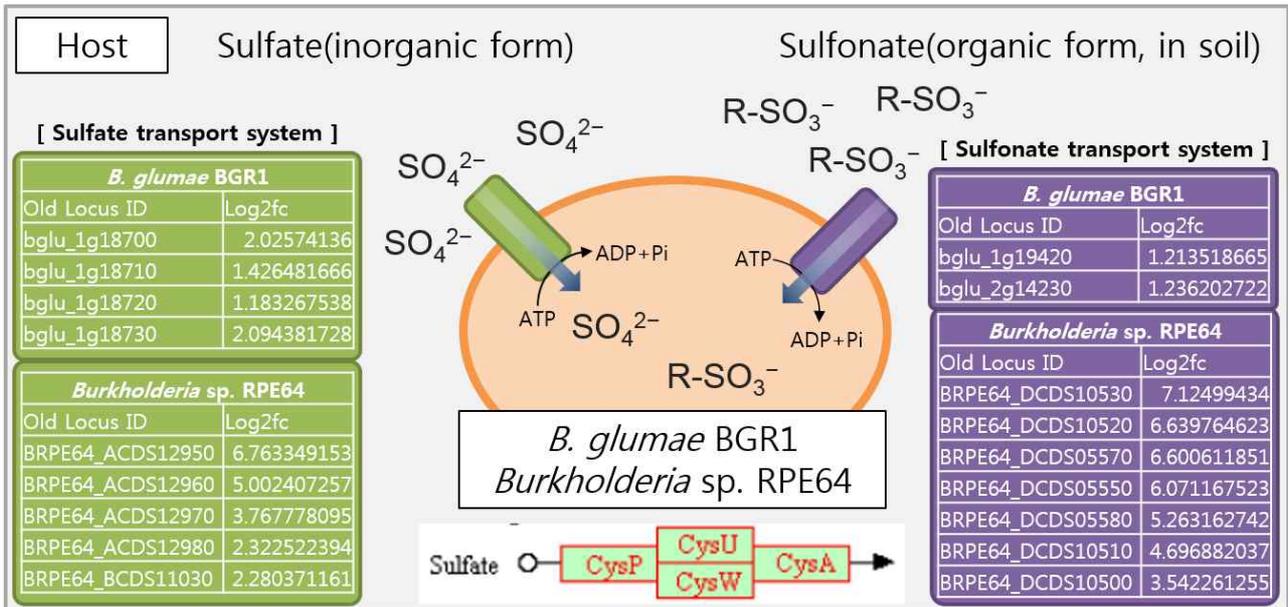


그림 20 Sulfate and Sulfonate transport system of up-regulated common pathway in *B. glumae* BGR1 and *Burkholderia* sp. RPE64

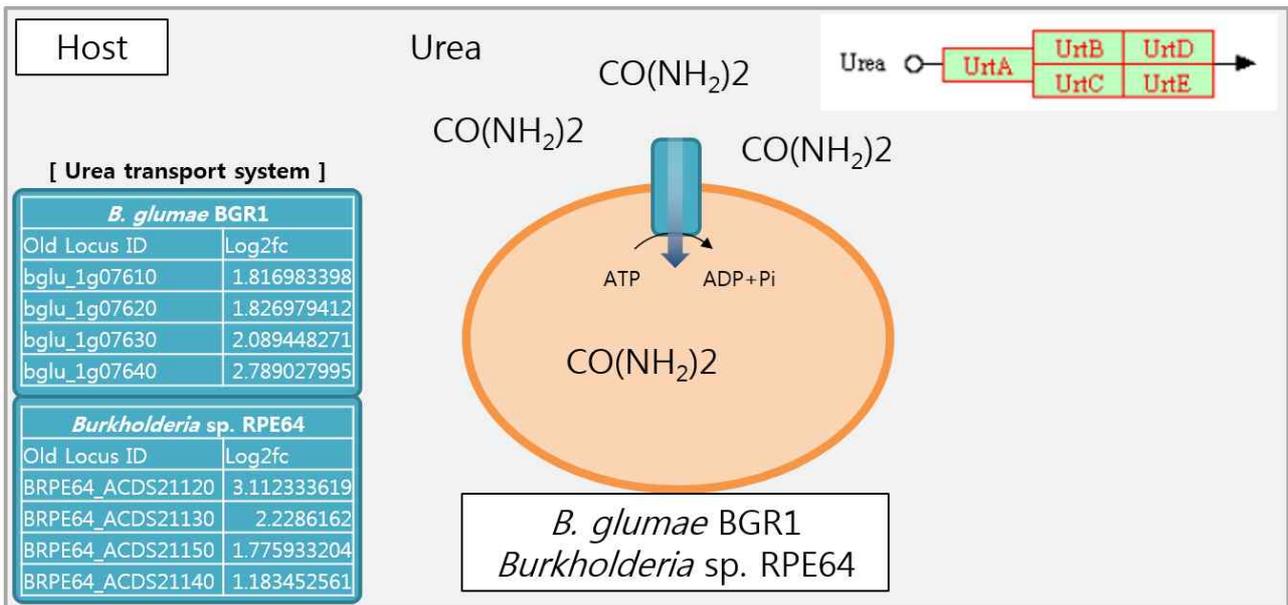


그림 21 Urea transport system of up-regulated common pathway in *B. glumae* BGR1 and *Burkholderia* sp. RPE64

(나) 비교 *in host* 전사체 분석 및 비교 유전체 분석으로 선발된 식물 병원성 인자 후보 유전자가 결여된 돌연변이체 확립 및 병원성 실험

① *B. glumae* BGR1과 *Burkholderia* sp. RPE64 공통적인 up-regulated pathway인 Sulfate transport system에 관련된 유전자가 결핍된 돌연변이 균주 제작 및 병원성 실험

B. glumae BGR1의 Sulfate transport system을 구성하는 4가지 유전자(*cysP*, *cysW*, *cysA*, *cysT*) 중 *cysW*를 결실한 돌연변이 균주, $\Delta cysW$ 를 제작하여 *in vivo* 병원성 test를 벼의 2가지 stage(seedling stage와 vegetative stage)와 양과에서 실험하였음. 결과적으로 병원성 표현형이 벼의 vegetative stage에서 감소하였고, 이는 *B. glumae* BGR1의 sulfate transport system이 vegetative stage의 벼에서 sulfate를 이용하지 못하는 것이 병원성과 연관이 되어있음을 확인하고, 후속 연구중에 있음.

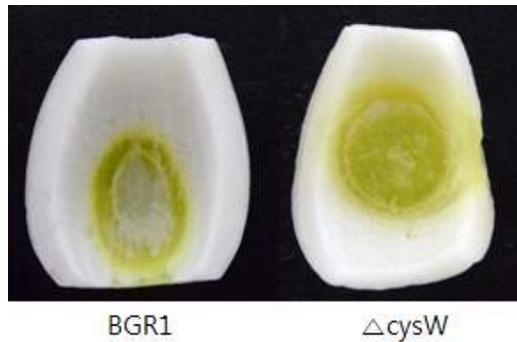


그림 22 pathogenicity test in onion

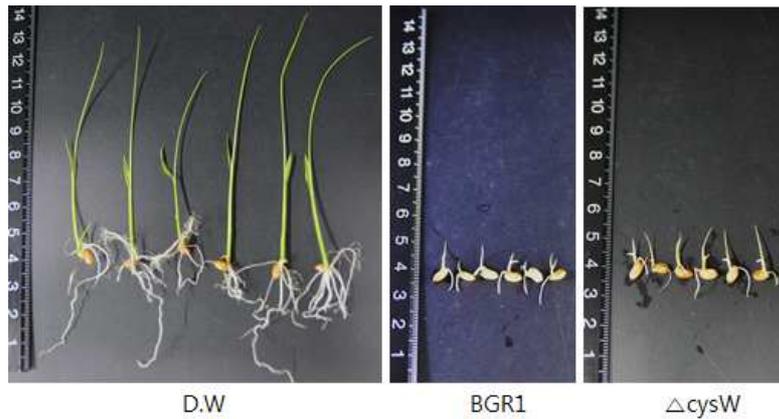


그림 23 pathogenicity test in rice seedling stage



그림 24 pathogenicity test in vegetative stage of rice

② 비교유전체 분석을 이용한 특이적 유전자 *Hfq*의 기능 규명

비교유전체분석을 통해 *Burkholderia glumae* BGR1의 특이적 특성으로 2개의 *Hfq* 유전자를 암호화하고 있음을 확인하고 2개의 *Hfq* 유전자(*hfq1*, *hfq2*)의 결실돌연변이 HFQ1, HFQ2, HFQ12를 제작하였고, 결실돌연변이 HFQ1, HFQ2, HFQ12의 TLC분석을 통해 toxoflavin 생산량이 감소하는 것을 확인하였음.

HFQ1, HFQ2, HFQ12 돌연변이 균주의 Motility test결과, HFQ12 돌연변이에서는 운동성을 확인할 수 없었고, HFQ1 돌연변이 균주는 야생형 *B. glumae* BGR1 보다 운동성이 감소되었음을 확인하였다. 결과적으로, *B. glumae*의 Motility와 in vivo pathogenicity test의 결과를 통해서 *Hfq1* 주기능을 담당하고, *Hfq2*가 *Hfq1*을 도와 부가적인 기능을 하는 것으로 유추할 수 있었음.

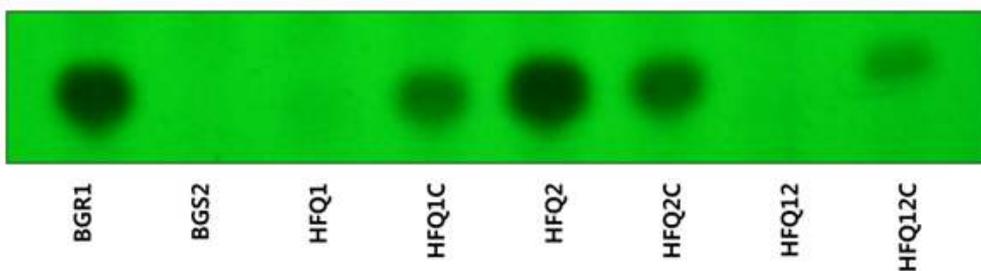


그림 25 TLC analysis for detecting toxolavin

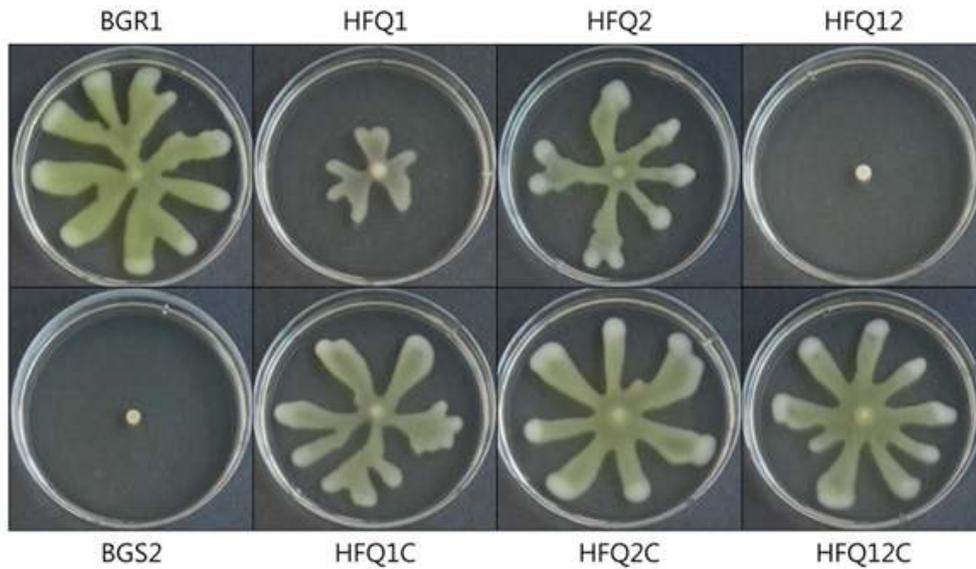


그림 26 Motility Test

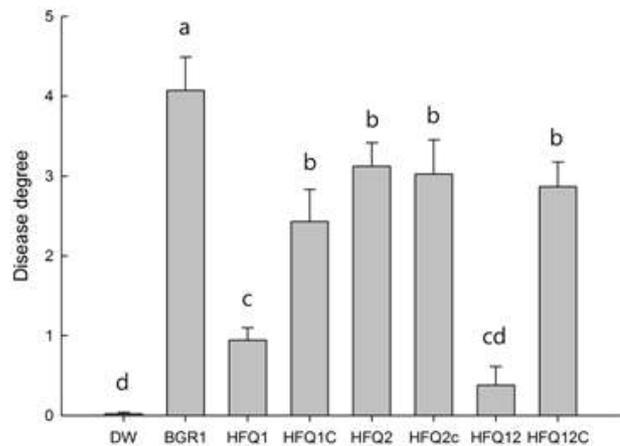
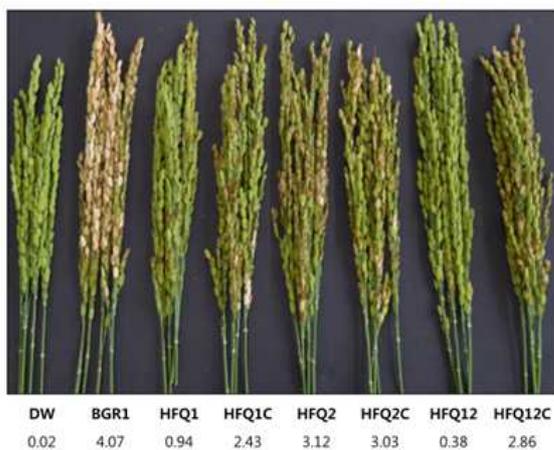


그림. *in vivo* pathogenicity test

③ 비교유전체분석을 통해 확보한 Type VI secretion system 의 기능 규명

Burkholderia specise간의 비교유전체 분석에 따르면, *B. glumae* BGR1의 경우, 4가지의 T6SS cluster를 가지고 있음을 확인하였고, 각각의 T6SS cluster의 기능을 규명하기 위해 T6SS cluster 내의 다양한 구성요소 중 분비시스템의 구조 형성 및 구동에 관여하는 주요 요소인 Hcp (Hemolysin Coregulated Protein)에 초점을 맞추어 진행하였음.

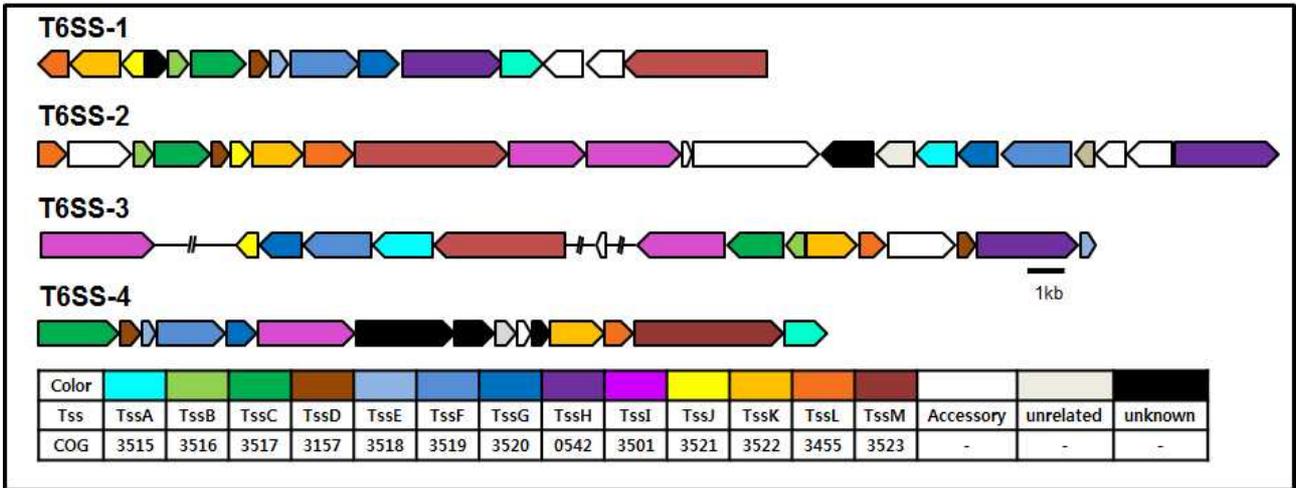


그림 29 Genetic organization of 4 T6SS clusters in *B. glumae* BGR1

B. glumae BGR1이 가지고 있는 4개의 T6SS cluster의 Hcp 결실 돌연변이를 single mutant에서 tetra mutant를 제작($\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$, $\Delta hcp3$, $\Delta hcp4$, $\Delta hcp12$, $\Delta hcp13$, $\Delta hcp14$, $\Delta hcp23$, $\Delta hcp24$, $\Delta hcp34$, $\Delta hcp123$, $\Delta hcp124$, $\Delta hcp134$, $\Delta hcp234$, $\Delta hcp1234$) 하였고, 성장곡선을 통해 결실돌연변이의 성장에 문제가 없음을 확인하고 기존의 *B. glumae* BGR1의 병원성인자인 Motility와 Toxoflavin 생합성에 관련된 실험을 진행하였으나, 야생형 모균주 *B. glumae* BGR1과 차이가 없었음.

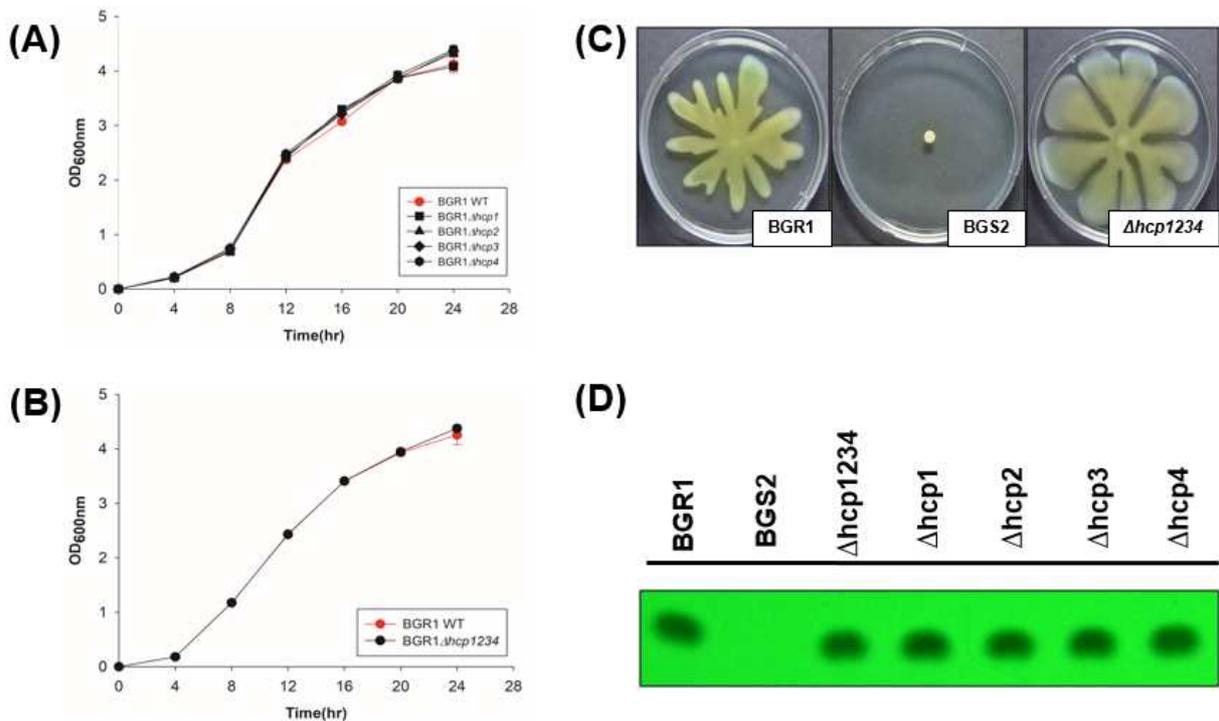


그림 30 A, B; Growth curve of T6SS deletion mutant, C, Motility test, D, TLC analysis for detecting toxoflavin

문헌조사를 통해 Bacterial T6SS가 다른 미생물과의 competition에 관여하는 것을 확인하였고, 본연구팀은 *B. glumae* BGR1과 *E. coli*를 이용한 inter-bacterial competition assay를 수행하였음. 그결과, hcp1과 hcp2가 bacteria를 목적으로하는 killing effect가 있는 것을 확인하였고 식물 내 초기감염기작으로서 *B. glumae* BGR1이 colonization을 하는데 기여할 것으로 생각하고 후속 연구 중에 있음.

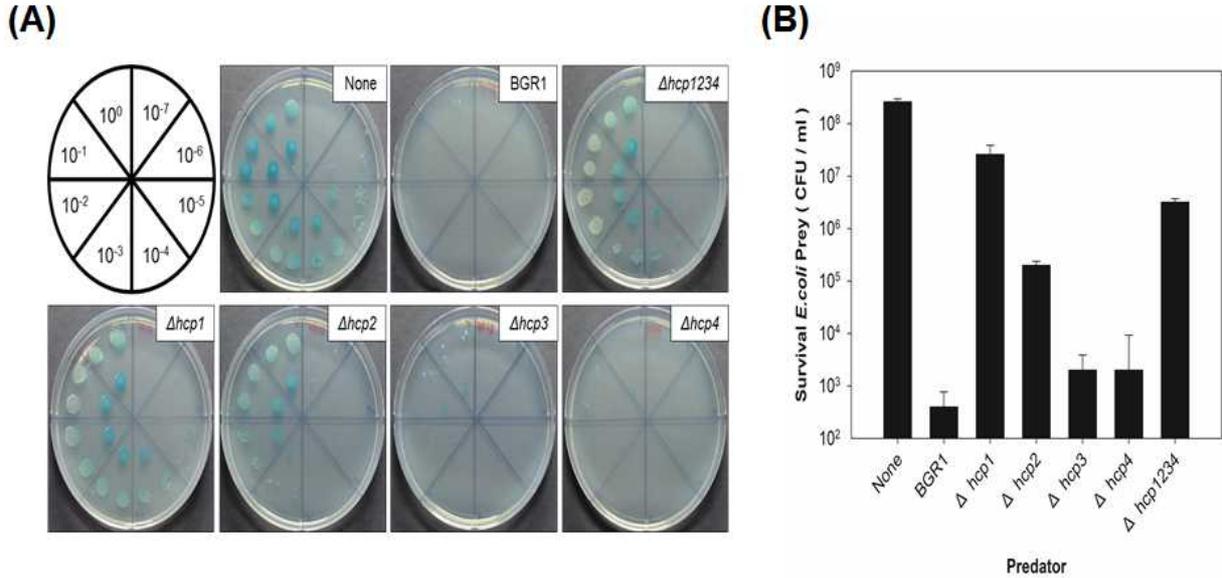


그림 31 inter-bacterial competition assay between *B. glumae* and *E. coli*

결과적으로, 본 연구는 비교유전체학적 분석을 통해 T6SS의 기능을 예측하고 실험적 증명을 통해 효과적으로 연구가능함을 보였고, *Burkholderia glumae*의 T6SS이 벼에 대한 감염과정에서 성공적인 군집형성을 도와줌을 시사하고 나아가, 식물 병원균의 제어를 위한 새로운 표적 후보로서 T6SS의 가능성을 열어줌.

(다) 비교유전체 및 비교 *in host* 전사체 분석을 통한 식물 병원성 *Burkholderia*의 진단 및 제어 기술 개발

미생물 진단마커의 개발을 위한 비교유전체학적 접근은 *B. glumae* 또는 *B. gladioli* 종의 대표적인 식물병원균은 두 병원균의 genome서열을 제외하고 재구성 된 NCBI의 비중복 DNA 서열 데이터베이스에 대하여 BLASTN을 통해 검색되었고, 다른 박테리아와 일치하는 유전자를 제거하기 위해, *B. glumae* 및 *B. gladioli* 종에 대한 추정 표적 유전자에 대해 쿼리 적용 범위 (query coverage) 및 일치하지 않는 CDS를 포함하는 ID가 30% 미만인 CDS region을 선택하였으며, *B. glumae* 및 *B. gladioli* 균주의 genome 서열로 구성된 대상 염기 서열에 대해 각 표적 종에 속하는 모든 균주에서 높은 상동성 유전자를 수집하기 위해 선택된 유전자를 사용하여 메가블라스트(Mega-blast) 검색을 수행하였음.

Strain	Origin	Reference or source
<i>Burkholderia glumae</i>		
BGR1	South Korea	(Jeong et al., 2003)
411gr-6	USA	(Nandakumar, et al., 2009)
201sh-1	USA	(Nandakumar, et al., 2009)
957856-41-c	USA	(Nandakumar, et al., 2009)
117g1-7-1	USA	(Nandakumar, et al., 2009)
<i>Burkholderia gladioli</i>		
BSR3	South Korea	(Seo et al., 2011)
KACC 18962	South Korea	NAS
KACC 18963	South Korea	NAS
KACC 13944	South Korea	(Lee et al., 2010)
KACC11889	USA	(Yabuuchi et al., 1993)
KTCT 12374	South Korea	(Lee et al., 2005)
Other <i>Burkholderia</i> spp.		
<i>cepacia</i> KACC 10189	USA	(Noula et al., 2000)
<i>cepacia</i> KACC 10190	Trinidad	(Stanier et al., 1966)
<i>cepacia</i> KACC 10337	USA	(Zaid et al., 2012)
<i>cepacia</i> KACC 12679	South Korea	NAS
<i>cepacia</i> KACC 15010	South Korea	NAS
<i>kururiensis</i> KACC 12038	Japan	(Zhang et al., 2000)
sp. KJ006	South Korea	(Cho et al., 2007)
megalochromosomata KACC 17925	South Korea	(Baek et al., 2015)
<i>phymatum</i> KACC 12032	South Korea	NAS
<i>phytofirmans</i> KACC 12042	Netherland	(Sessitsch et al., 2005)
<i>pyrrocinia</i> KACC 17914	South Korea	(Lee et al., 2011)
<i>stabillia</i> KACC 12028	Belgium	(Vandamme et al., 2000)

표 14 미생물진단마커 개발을 위한 사용된 *B. glumae* 및 *B. gladioli*

Primer pair	Target protein	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Expected product (bp)
<i>Burkholderia glumae</i>				
서열번호1	Hypothetical protein	GGGGAAAAGAACGA TGAACAGA	CATGAAACGATGAA GATGCGC	255
서열번호2	Hypothetical protein	TTCTTTCGACTGGCT GTTTCG	TCGCTGAAACGATC AATGAAAT	103

서열번호3	Hypothetical protein	GTCACGATCGCTCT GTTGTT	CATGAATCCACGAA GCCGAG	125
서열번호4	Hypothetical protein	CATCACAACCTCGC GGATAC	GAAATGGTGAGCTC GGCATAG	177
서열번호5	Flp family type IVb pilin	GGTCGAGTATGGAT TGATCGG	ATCTGTTGAAAAAG CTCGTGAC	116
서열번호6	Hypothetical protein	ATGATGCCTGACGA TATCGG	ATCCCGCTTTGTTG GCAATA	140
서열번호7	Hypothetical protein	CGCAAGCCTTATTC GATCCT	GTTGATCGTGAACG GGTCTT	219
서열번호8	Hypothetical protein	ACCATTAACGAAAA GATTGCCG	AATGGTCCAACCTCT TGATCTCG	300
서열번호9	Hypothetical protein	AAGATGAATCGACC GTCGTG	ACCGTCGCGATCAT GATTTC	289
서열번호11	Hypothetical protein	TTGGTGTTCAGTCGA TTACAAGG	AATAGAGATCGTCG AGGATCCA	283
서열번호12	Hypothetical protein	GTCCAGCTGAAGTA TTACCTGG	GATGAATTCACGCA GGCGATA	117
서열번호13	Hypothetical protein	CTACGTCGAGTATG TGGTGG	GAAGAACGATTTCA AGGCCAC	106
서열번호14	Hypothetical protein	GATTTGCTTACCTT GTGGCTG	GGCCACTTCGATTT CTGTATTG	235

표 15 비교유전체학적 접근을 통해 확보한 *B. glumae* 프라이머 세트

Primer pair	Target protein	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Expected product (bp)
<i>Burkholderia gladioli</i>				
서열번호15	FkbM family methyltransferase	CAGTCGTTTAGCTG GAAGATCA	CCGTAGATGCAGGA GATTGATT	193
서열번호16	Methyltransferase domain-containing protein	CCGATCCAGTATGA GCACTATC	GAATGAGTTCAGCA CGTCGATC	267
서열번호17	Hypothetical protein	TGTCGAGGGCGTAT GATCAG	AAATGATGGTGAT TTCCCTGGT	174
서열번호18	Hypothetical protein	AGTACTTGTTTGAG TCTCACCC	CCAGTGACAGCAGG AATTTTTC	171
서열번호19	Flp family type IVb pilin	GGATAAGGCGAGAA TATTGGCA	GCAAAGAAATTTTCG CTTTCTGC	212
서열번호20	Metallophosphoesterase	CGAATTCAGATAGC GTCAGACT	TCGTAGAATTCGTG ATTACCCG	197
서열번호21	Hypothetical protein	GATTTGCACCGATT TTCTGCTC	CATCTTCTGGTAAT AGGCAGGC	297
서열번호22	Hypothetical protein	GTCTCTTTACGCGC AGATAGAG	CTTGTTGTCAGCCG TCGTATAAC	141
서열번호23	Phosphoesterase family protein	CATTTGCGGATCGA TCTCAATC	TTCGTTAGCCATGT AAGATCCC	243
서열번호24	AraC family transcriptional regulator	TCACGGTCTTTACG GATCAAAA	ATTGATGTTGTGCA AGGGAGTA	109
서열번호25	TagK domain-containi	GACGAAGGACAAGA ACATCGA	AGACTGATTAGGTG ATGTTCCG	180

	ng protein			
서열번호26	Hybrid sensor histidine kinase/respose regulator	AGTCGTTGAAATGA AGAAAGCC	CAGGTCCGATGTCGG TAATAACA	238
서열번호27	Hypothetical protein	TCTGGATTCCGGAA AATCGAAT	CTTCTACCAGACGG AAGGTTTC	113
서열번호28	Hypothetical protein	ACTGTTTTCTCTCGG CAGAATC	CTCTTTCAGGCGAA GATAGGC	161
서열번호29	Hypothetical protein	GTTTCGGATTCTGG CTGTCTT	CTTTGCGGCTGATA ATCGTAGT	102

표 16 비교유전체학적 접근을 통해 확보한 *B. gladioli* 프라이머 세트

특히, 미생물 진단마커의 서열17번과 서열9번은 종자에서 검출되는 *B. glumae*와 *B. gladioli*가 1g의 마른 벼 종자 당 각균의 양이 1.86×10^3 , 1.04×10^4 개만 존재해도 검출되는 것을 확인함.

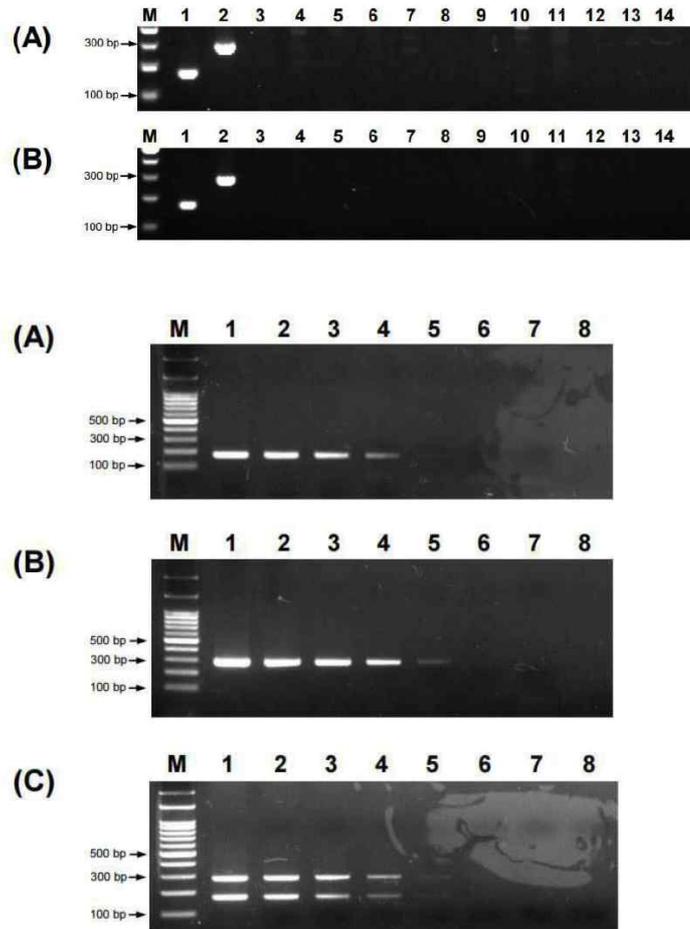


그림 32 미생물진단마커의 정확성 및 민감도 검증

미생물 진단 마커는 벼 종자에서 발견되는 식물 병원성 균인, *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 동시에 검출하기 위한 프라이머 세트에 관한 것으로, 벼 종자의 전염성 병원균으로 알려진 *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 초기에 정확하고 효과적으로 검출하기 위해서 비교 유전체학적 접근 방식으로 PCR(Polymerase Chain Reaction) 반응

을 이용하여 쉽고 명확한 결과를 얻는 효과를 가지며, 특허출원되었음.

(3) 미생물병원성기작 규명

Cooperative interactions between seed-borne bacterial and air-borne fungal pathogens on rice' (저널명 : nature communications / 호: (2018) 9:31 / 게재년일 : 2018.01.02. /주저자: Boknam Jung /교신저자: Young-Su Seo & Jungkwan Lee /사사 개수: 2)

seed-borne 식물병원성 세균인, *Burkholderia glumae*와 air-borne 식물병원성 곰팡이인, *Fusarium graminearum*의 상호작용은 *Burkholderia glumae*에 의해 생산되는 항미생물제어제인, toxoflavin이 있음에도 불구하고, 두 종간의 생존능력을 포함한 병징의 확산 및 발달을 증가시키고, *Burkholderia glumae*는 *Fusarium graminearum*에 물리적 접촉을 이용해 병징의 발생 정도를 빠르고 광범위하게 나타낼 수 있음을 밝혀냄.

(가) 감염된 벼종자에서 *Burkholderia glumae*와 *Fusarium graminearum*이 동시 검출되는 현상을 발견하고, *Burkholderia glumae* 의해서 생산되는 Toxoflavin의 sensitivity가 *Fusarium graminearum*에서는 약소함을 확인하였음.

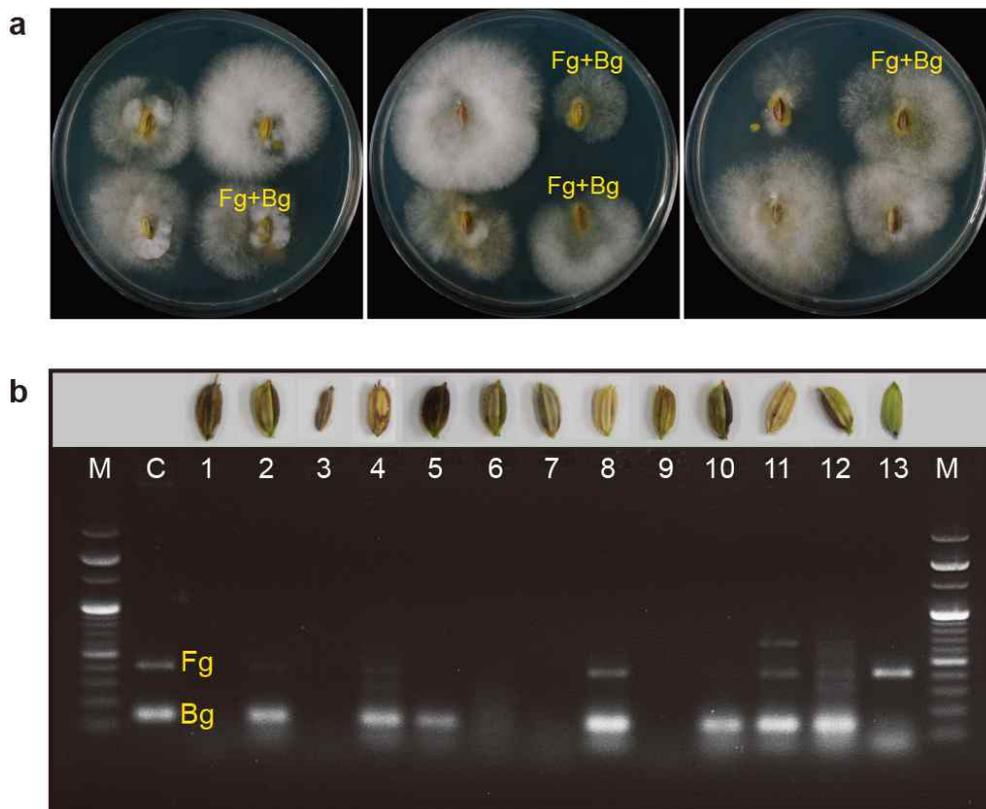


그림 33 기감염된 벼 종자에서 *Burkholderia glumae*와 *Fusarium graminearum* 검출

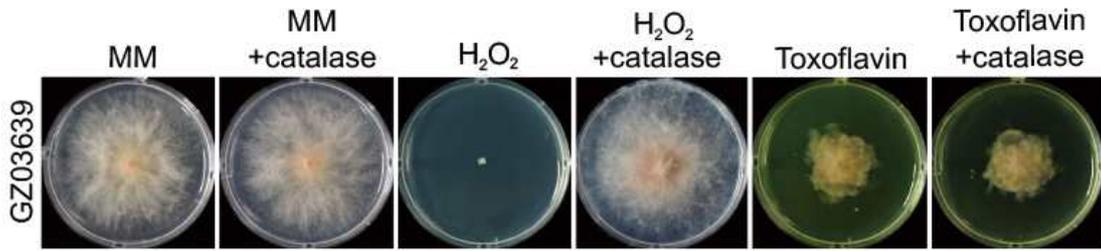
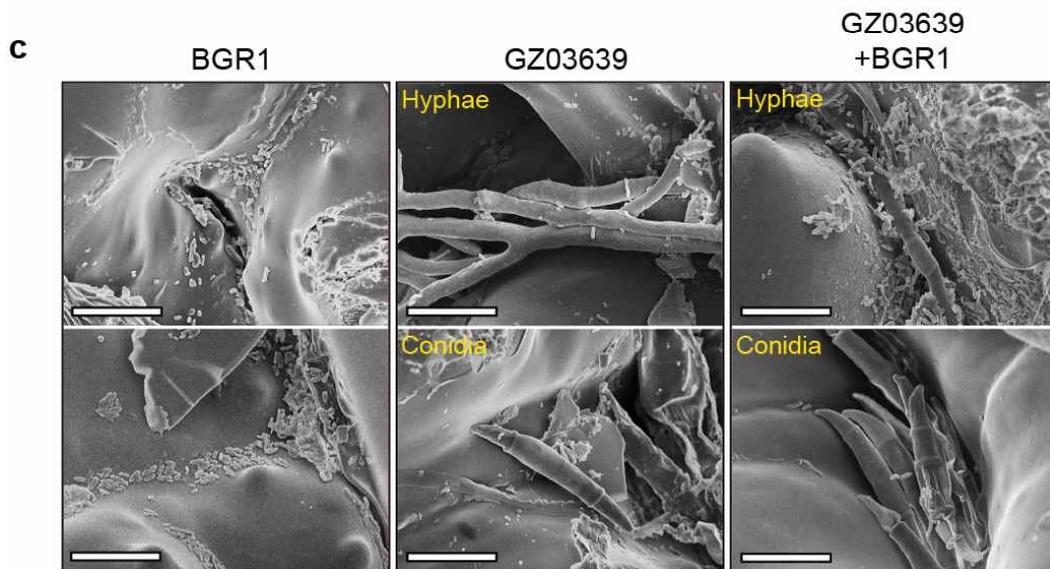
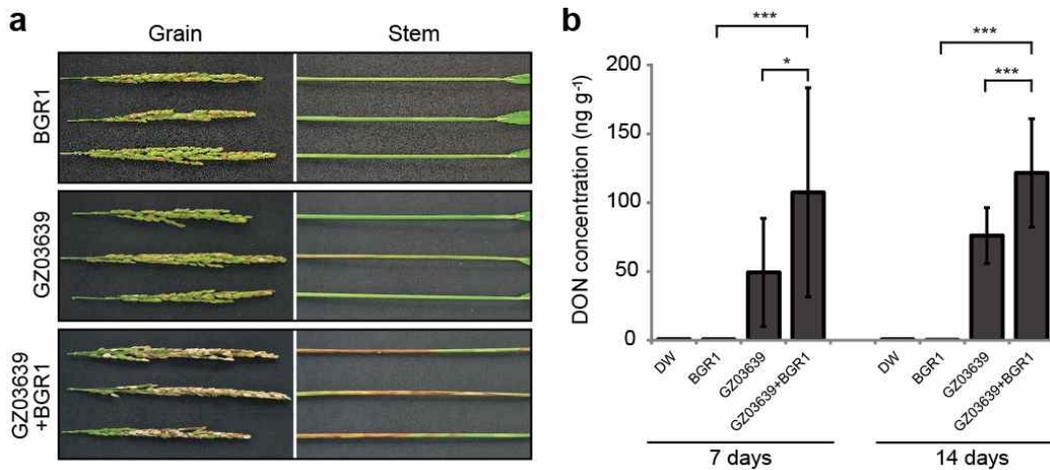


그림 34 sensitivity of *Fusarium graminearum* against toxoflavin by *Burkholderia glumae*

(나) 실제로 *in vivo* pathogenicity test에서 *Burkholderia glumae*와 *Fusarium graminearum*를 벼에 복합감염시켰을 때 병징의 정도가 심하게 나는 것을 확인하였으며, *Burkholderia glumae*와 *Fusarium graminearum*를 같이 감염시켰을 때 *Fusarium graminearum*의 toxin인 DON (deoxynivalenol)이 벼에서 더 많이 검출됨을 확인하였음. 이러한 결과로 *Burkholderia glumae*와 *Fusarium graminearum*은 서로의 상호작용을 통해 더 강한 병원성을 가지고 벼의 질병을 유발하는 것을 실험적으로 확인하였음.



2. 제2세부(부산대학교 이복률)

가. 연구개발 목표 및 결과요약

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도	전사체 분석을 통해 곤충 공생 <i>burkholderia</i> 로부터 다양한 공생 인자의 발굴	동물 공생균인 <i>burkholderia</i> 의 <i>in host</i> 전사체 분석	곤충의 중장기관으로부터 장내 환경에 적응된 공생균인 <i>burkholderia</i> 를 대량으로 획득함. <i>in vitro</i> 및 <i>in host</i> 에서 획득된 공생 <i>burkholderia</i> 로부터 total RNA를 추출하였음. 이를 바탕으로 RNAseq을 수행하였음. RNAseq data를 이용한 Differentially expressed genes(DEGs) 분석 및 KEGG pathway를 수행함.	총 6,732개의 유전자를 분석하였음. 이중 <i>in host burkholderia</i> 에서는 1,853개의 유전자가 많이 발현됨. 이중 protein export와 관련된 유전자가 특이적으로 많이 발현됨.
		배양 <i>burkholderia</i> sp. RPE64와 장내 공생균인 <i>burkholderia</i> sp. RPE64간의 유전자 발현패턴 비교 분석		
		공생 <i>burkholderia</i> 를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명	세포벽 성분 중, O-antigen이 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용하여, 곤충의 방어물질을 screening함.	곤충의 중장기관에서 콩 유래의 Kunitz-type trypsin inhibitor를 찾았음. 이 물질이 O-antigen이 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 사멸시킨다는 것을 증명함. <i>Burkholdeora</i> 의 LPS O-antigen은 중요한 공생인자임을 밝혀냄.

구분	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도	재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용한 공생기작의 규명 및 숙주와의	공생 인자가 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 의 제작	공생 <i>burkholderia</i> 에서 LPS core OS 생합성 유전자를 찾아 본 결과, <i>wbiG</i> , <i>wabS</i> , <i>wabO</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> 가 있었다. 공생 관계에서 이 유전자들의 중요성을 알기	결과를 기반으로 유전자 재조합법을 통한 각 유전자가 결여된 돌연변이 공생균주를 제작함.

			<p>위하여, 각 유전자가 결여된 돌연변이 공생균주를 제작하였다. 각 돌연변이 균주들의 LPS를 은 염색법을 통하여 염색해본 결과, 야생형 균주의 LPS와는 다르게 각 돌연변이 균주들은 LPS의 O-antigen부분이 없고 core OS부분이 야생형과 다르다는 사실을 알</p>	
	<p>상호작용에 관여하는 특정유전자의 역할 규명</p>	<p>재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i>를 이용한 공생 인자의 기능 규명</p>	<p>각 돌연변이 균주들의 LPS를 은 염색법을 통하여 염색해본 결과, 야생형 균주의 LPS와는 다르게 각 돌연변이 균주들은 LPS의 O-antigen부분이 없고 core OS부분이 야생형과 다르다는 사실을 확인하여 돌연변이 균주의 LPS 구조를 분석 결과, <i>waaC</i> 유전자는 heptosyltransferase I을 암호화하며 이 유전자는 Kdo 단위체의 O-5 위치에 glycosylation을 시키는 기능을 한다는 것을 알아냄</p>	<p>공생균의 LPS core OS가 숙주 곤충이 중장에 공생을 하는 데 중요한 역할을 한다는 내용을 전사체 분석 내용을 기반으로 한 돌연변이주를 이용하여 규명함.</p>
		<p>숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석</p>	<p>곤충 병원균인 <i>Pseudomonas entomophila</i>를 타겟 균주로 주요 독성인자를 발굴하기 위해서 생화학적인 접근을 통하여 독성 인자를 밝혀내었다. 독성인자는 metalloprotease인 AprA로 밝혀졌고, 숙주인 톱다리개미허리노린재의 면역반응을 억제시키며 숙주 곤충을 효율적으로 사멸시킴을 확인함.</p>	<p>AprA 유전자 결손 돌연변이 균주가 숙주 곤충에 대해 현저히 떨어진 독성을 나타낸다는 것을 보임으로써, AprA가 중요한 독성 인자임을 증명함.</p>

나. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
동물 공생균인 <i>burkholderia</i> 의 <i>in host</i> 전사체 분석	곤충의 중장기관으로부터 장내 환경에 적용된 공생균인 <i>burkholderia</i> 를 대량으로 획득함. <i>in vitro</i> 및 <i>in host</i> 에서 획득된 공생 <i>burkholderia</i> 로부터 total RNA를 추출하였음. 이를 바탕으로 RNAseq을 수행하였음. RNAseq data를 이용한 Differentially expressed genes(DEGs) 분석 및 KEGG pathway를 수행	총 6,732개의 유전자를 분석하였음. 이중 <i>in host burkholderia</i> 에서는 1,853개의 유전자가 많이 발현됨.
배양 <i>burkholderia</i> sp. RPE64와 장내 공생균인 <i>burkholderia</i> sp. RPE64간의 유전자 발현패턴 비교 분석		
공생 <i>burkholderia</i> 를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명	세포벽 성분 중, O-antigen이 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용하여, 곤충의 방어물질을 screening함.	곤충의 중장기관에서 콩 유래의 Kunitz-type trypsin inhibitor를 찾았음. 이 물질이 O-antigen이 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 사멸시킨다는 것을 증명함. <i>Burkholderia</i> 의 LPS O-antigen은 중요한 공생인자임을 밝혀냄.
공생 인자가 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 의 제작	공생균인 <i>burkholderia</i> 에서 LPS core OS 생합성 유전자를 찾아 그 결과를 기반으로 유전자 재조합법을 통한 각 유전자가 결여된 돌연변이 공생균주를 제작. 각 돌연변이 균주들의 LPS를 염색법을 통하여 염색.	야생형 균주의 LPS와는 다르게 각 돌연변이 균주들은 LPS의 O-antigen부분이 없고 core OS부분이 야생형과 다르다는 사실을 알 수 있었다
재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용한 공생 인자의 기능 규명	각 돌연변이 균주의 LPS 구조를 MALDI-TOF를 통하여 분석하였고, 유전자들의 역할을 바탕으로, 각 돌연변이 균주의 LPS core OS의 구조를 화학적으로 분석함. 각 돌연변이 공생균들을 숙주 곤충에 감염 시킨 뒤, 중장에 서식하고 있는 공생균의 수를 측정.	LPS core OS, 특히 <i>waaC</i> 유전자가 공생균이 공생하는데 있어 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었음.

<p>숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석</p>	<p><i>P. entomophila</i>가 숙주 곤충에게 어느 정도의 독성을 가지는지 알기 위하여 다른 균주 (<i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i>, <i>burkholderia</i>)와 <i>P. entomophila</i>를 숙주 곤충의 혈림프에 주사하고 생존율을 측정 및 혈구 세포의 숫자를 측정. <i>P. entomophila</i>의 독성인자를 정제하기 위하여, 먼저 배양액 안에 있는 단백질을 SDS-PAGE기법을 통하여 확인 후 음이온수지교환 크로마토그래피법과 크기배제 크로마토그래피법을 사용하여 하나의 살충 효과를 나타내는 단백질을 분리 정제.</p>	<p>AprA는 세포의 세포 자살을 유도하여 숙주 곤충의 세포를 사멸시킨다는 것을 알 수 있었다.</p>
--------------------------------------	--	--

다. 연구내용 및 결과

(1) 전사체 분석을 통해 곤충 공생 *burkholderia*로부터 다양한 공생 인자의 발굴

(가) 동물 공생균인 *burkholderia*의 *in host* 전사체 분석

1차년도 연구기간동안 본 연구진은 공생 *burkholderia*가 특이적으로 서식하는 노린재곤충의 중장기관 (M4)으로부터 장내 환경에 적응된 장내 공생균인 *burkholderia* sp. RPE64를 대량으로 획득하여, 이로부터 전사체 분석을 위한 양질의 total RNA를 추출 후, rRNA를 제거하기 위해 mRNA enrichment를 수행하였음. 이를 바탕으로 *in host* RNAseq을 진행하였으며, 최종적으로는 동물 공생균인 *burkholderia*의 *in host* 전사체를 획득하였음. 본 연구수행내용은 연구추진목표상에서 100%에 해당하며, 본 연구결과는 *in vitro* 및 *in host* 유전자 발현패턴 비교 분석에도 이용되었음.

(나) 곤충 공생 *burkholderia*의 *in vitro* 및 *in host* 유전자 발현패턴 비교 분석

공생균이 증식하고 있는 환경조건 (*in vitro* 또는 *in host*)에 따라서 특이적으로 발현되거나 억제되고 있는 유전자군을 탐색하고자 하며, *in host*의 샘플은 앞선 수행된 연구결과를 동일하게 이용하고자 했음. *in vitro* 샘플은 공생균인 *burkholderia*를 영양배지에서 대량으로 배양하여, 이의 colony를 획득하였으며, 이로부터 전사체 분석을 위한 total RNA를 추출하였음. 기 진행된 RNA sequencing 및 DEGs (differentially expressed genes) 분석을 통해 얻어진 연구결과를 바탕으로, KEGG database를 기반으로 하여 RNA mapping 및 특이발현 유전자의 확인함. 최종적으로는 동물 공생균인 *burkholderia*가 숙주의 장내환경에 적응하기 위해 발현하는 특정 공생인자 후보군을 찾고 있는 중이며, 본 연구결과를 바탕으로 2차년도에서 진행될 신규 공생인자의 기능 규명연구가 진행 될 예정임. 본 연구수행내용은 연구추진목표상에서 100%에 해당함. 동물 공생균인 *burkholderia*의 *in host* 전사체 분석과 곤충 공생 *burkholderia*의 *in vitro* 및 *in host* 유전자 발현패턴 비교 분석에 대한 연구 결과는 다음과 같음.

① *in vitro* 및 *in host* 공생균인 *burkholderia*의 RNAseq 라이브러리 획득 및 서열 해독
 RNAseq 라이브러리를 Illuminal TruSeq™ RNA sample prep kit (Illumina, San Diego, USA)의 standard low-throughput protocol을 통하여 생산한 후, 생산된 라이브러리를 Illumina HiSeq2000 기기를 통하여 염기 해독을 수행하여 read data 생산하였음.

Sample	Type	Length (bp)	GC (%)	Total reads	Quality filtered reads	Aligned reads to genome
<i>In vitro</i> 1	Paired-end	101	54	35,222,854	33,939,634	33,856,411
<i>In vitro</i> 2	Paired-end	101	54	30,490,120	29,653,206	29,713,076
<i>In vitro</i> 3	Paired-end	101	53	35,349,582	34,358,036	34,415,952
<i>In vivo</i> 1	Paired-end	101	54	37,964,074	36,789,182	34,566,214
<i>In vivo</i> 2	Paired-end	101	54	33,965,398	32,955,098	31,898,956
<i>In vivo</i> 3	Paired-end	101	54	34,531,754	33,547,420	33,302,906

그림 3. 라이브러리 획득 및 서열 해독

② Read quality 확인

리눅스 시스템 환경에서 FastQC (Babraham Institute, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 프로그램을 통해 read data의 quality를 확인함. 대부분의 read 라이브러리에서 read의 quality score가 30이상의 높은 수준인 것을 확인함.

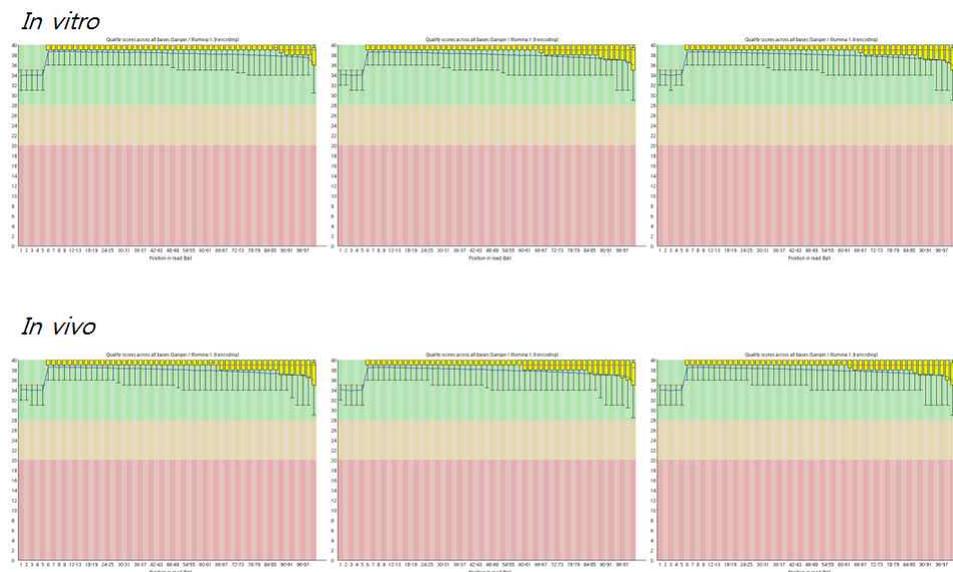
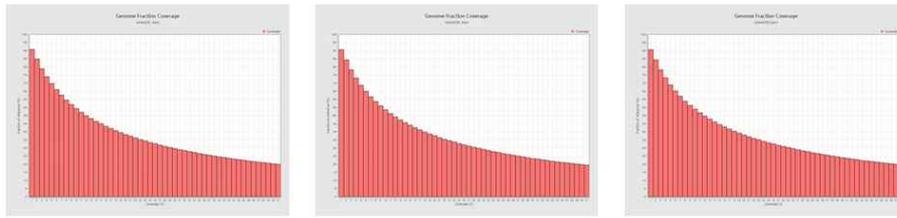


그림 37. Read quality 확인

In vitro



In vivo

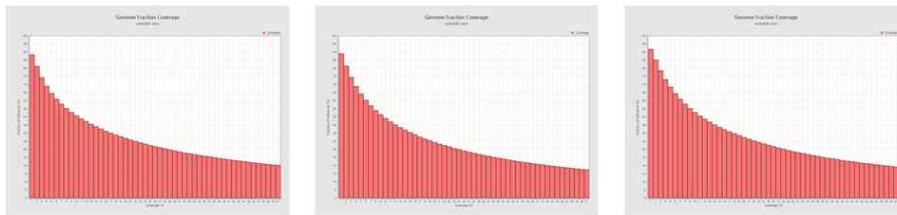


그림 38. Qualimap (<http://qualimap.bioinfo.cipf.es/>) 프로그램을 이용하여 이전 과정에서 생성된 Bam 파일의 quality를 확인

③ Differentially expressed genes (DEGs, 차별유전자) 분석

EdgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) 의 R package를 이용하여 $\log_2(\text{in vivo}/\text{in vitro})$ 값을 구하고, 유의성을 P-value 0.05미만 기준을 통해 DEG를 최종적으로 획득함.

MDS plot을 통해 *in vitro*조건과 *in vivo*조건에서 생성된 RNAseq read library가 replicate별로 상당히 가깝게 그룹화되는 것을 확인함.

BCV, Volcano, Smear plot을 통해 DEG의 분포가 상당히 높은 것을 알 수 있으며, up-regulation, down-regulation되는 DEG의 개수가 유사한 것을 확인할 수 있었음.

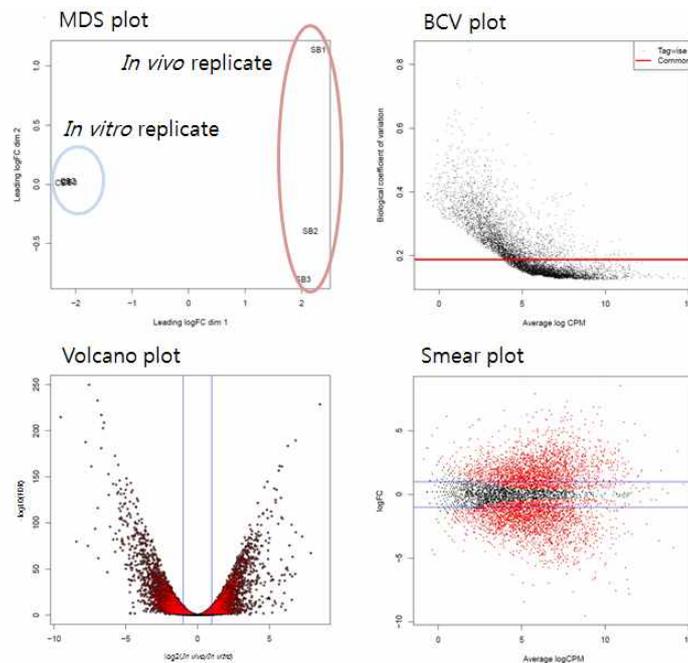


그림 39. *in vitro* 및 *in host* sample의 MDS plot

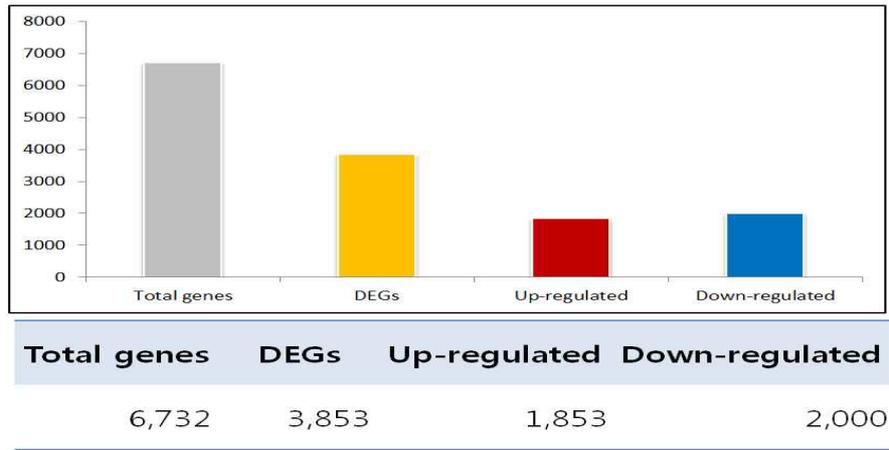


그림 40. DEGs 분석 결과

④ Differentially expressed genes (DEGs, 차별유전자) 분석결과를 이용한 KEGG pathway enrichment를 수행함.

DEGs data를 기반으로 up-regulated DEGs를 중심으로 KEGG pathway 결과를 확인함. 그 중 가장 신뢰성 있는 10개의 pathway를 확보함. 10개의 pathway는 다음과 같다.

kegg id	pathway	total	up	non	down	count	kegg_deg	kegg_total	p value
buo00240	Pyrimidine metabolism - Burkholderia sp. RPE64	50	28	22	0	28	678	1989	0.001055596
buo00670	One carbon pool by folate - Burkholderia sp. RPE64	16	11	5	0	11	678	1989	0.004764937
buo00730	Thiamine metabolism - Burkholderia sp. RPE64	14	10	4	0	10	678	1989	0.004725699
buo00920	Sulfur metabolism - Burkholderia sp. RPE64	44	27	17	0	27	678	1989	0.000168023
buo01100	Metabolic pathways - Burkholderia sp. RPE64	959	358	601	0	358	678	1989	0.001884039
buo01130	Biosynthesis of antibiotics - Burkholderia sp. RPE64	289	123	166	0	123	678	1989	0.00073449
buo02010	ABC transporters - Burkholderia sp. RPE64	258	108	150	0	108	678	1989	0.003239986
buo03010	Ribosome - Burkholderia sp. RPE64	70	43	27	0	43	678	1989	1.79E-06
buo03060	Protein export - Burkholderia sp. RPE64	15	13	2	0	13	678	1989	3.86E-05
buo03070	Bacterial secretion system - Burkholderia sp. RPE64	38	23	15	0	23	678	1989	0.000685055

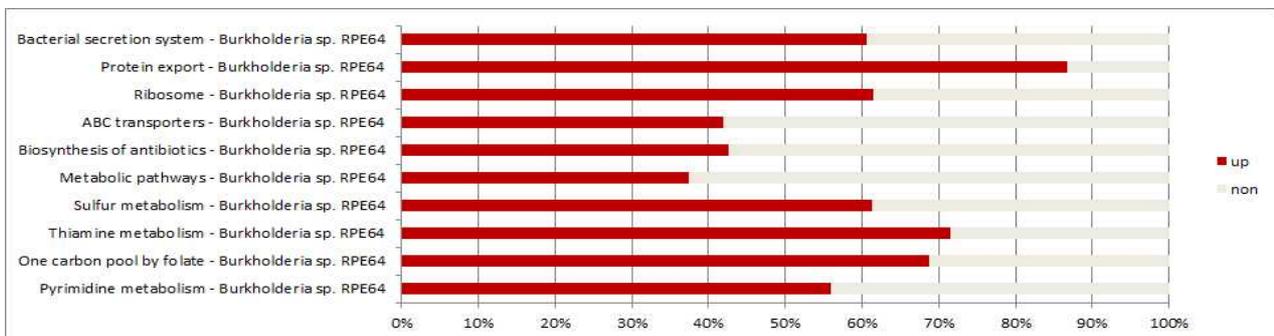


그림 41. up-regulated DEGs data만을 중심으로 KEGG enrichment pathway 분석 결과

DEGs data를 기반으로 total DEGs를 중심으로 KEGG pathway 결과를 확인함. 그 중 가장 신뢰성 있는 10개의 pathway를 확보함. 10개의 pathway는 다음과 같음.

kegg_id	pathway	total	up	non	down	count	kegg_deg	kegg_total	p value
buo00430	Taurine and hypotaurine metabolism - Burkholderia sp. RPE64	14	7	2	5	12	1169	1989	0.032172908
buo00440	Phosphonate and phosphinate metabolism - Burkholderia sp. RPE64	12	5	1	6	11	1169	1989	0.0157616
buo00643	Styrene degradation - Burkholderia sp. RPE64	15	4	2	9	13	1169	1989	0.021419977
buo00920	Sulfur metabolism - Burkholderia sp. RPE64	44	27	9	8	35	1169	1989	0.00279805
buo01503	Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance - Burkholderia sp. RPE64	15	10	2	3	13	1169	1989	0.021419977
buo02010	ABC transporters - Burkholderia sp. RPE64	258	108	77	73	181	1169	1989	3.56E-05
buo02020	Two-component system - Burkholderia sp. RPE64	134	32	38	64	96	1169	1989	0.000974711
buo02030	Bacterial chemotaxis - Burkholderia sp. RPE64	45	8	8	29	37	1169	1989	0.000643827
buo02040	Flagellar assembly - Burkholderia sp. RPE64	41	0	7	34	34	1169	1989	0.000797388
buo03060	Protein export - Burkholderia sp. RPE64	15	13	2	0	13	1169	1989	0.021419977
buo03070	Bacterial secretion system - Burkholderia sp. RPE64	38	23	8	7	30	1169	1989	0.006932182

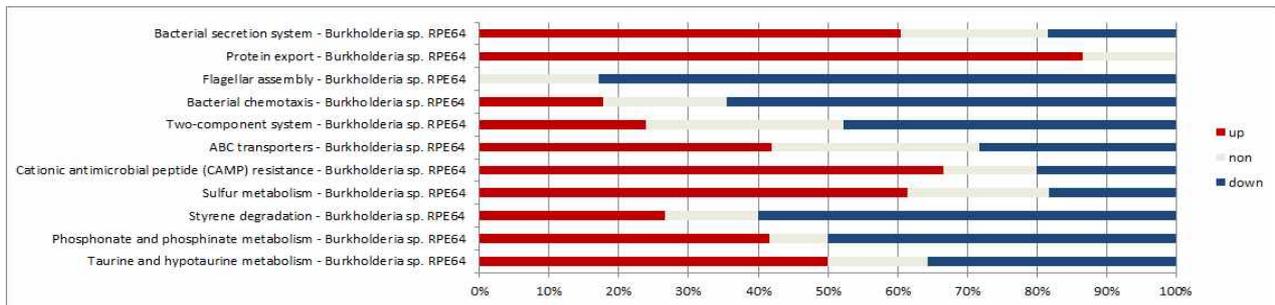


그림 42. Total DEGs data를 이용한 KEGG enrichment pathway 분석 결과

(다) 공생 *Burkholderia*를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명 (논문투고; Jang HA et al., (2017) A midgut lysate of the *Riptortus pedestris* has antibacterial activity against LPS O-antigen-deficient *Burkholderia* mutants. *Developmental & Comparative Immunology* 67: 97-106.)

본 연구는 공생균이 야외로부터 숙주에 의해 획득되어지는 감염초기단계에서의 선별기작에 관여하는 공생인자를 찾고자 진행되었음. 곤충 숙주는 경구감염을 통한 공생초기단계에서 공생균의 O-antigen을 공생인자로써 인식하고, 중장기관인 M1에서 Kunitz-type trypsin inhibitor를 통해 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었고, 이러한 기작을 통해, 곤충숙주는 O-antigen이 결여된 변이공생균 또는 다른 종에 속하는 병원균에 대한 선별을 진행할 수 있는 것으로 재차 확인되었음. 따라서 본 연구결과는 1차년도에 얻게 될 특이공생인자의 기능분석에 있어서 중요한 자료로 사용되어 질 수 있을 것으로 여겨지며, 2차년도 연구에 있어서 참고할 만한 기초자료가 될 것으로 판단됨. 본 연구수행내용은 연구추진목표상에서 100%에 해당하며, 연구결과는 국외 SCI저널인 *Developmental and Comparative Immunology*에 게재 완료하였음.

① M1은 *Burkholderia*의 O-antigen type에 따른 서로 다른 항균활성

본 연구진이 기보고한 연구논문(Kim JK et al., 2017, JBC)에 따르면, 실험실에서 배양한 *Burkholderia* (*in vitro Burkholderia*)는 O-antigen이 포함된 smooth type의 LPS를 가지며, 숙주의 공생기관인 M4 crypt에 서식하는 *Burkholderia* (*in host Burkholderia*)는 O-antigen이 소실된 rough type의 LPS를 가진다는 사실을 밝혔음. 이를 토대로 실험실에서 배양한 *Burkholderia*와 O-antigen이 결여된 변이 균주 간에 감염되는 정도의 차이를 알아보았고, 그 결과 O-antigen이 결여된 변이 균주가 실험실에서 배양한 *Burkholderia*보다 초기 감염률이 낮아지는 것을 2016년에 DCI에 보고한바 있음.

본 연구는 이러한 결과들을 바탕으로, O-antigen의 결여로 인해 초기 감염률이 저하되는 원인

이 숙주에 의한 면역반응의 결과일 것이라고 생각하였으며, 숙주 유래의 항균활성물질을 정제하기 위해 공생균의 감염 경로에 해당되는 중장 (midgut) 구간을 중점적으로 조사하기로 하여 중장구간을 구조에 따라 M1, M2, M3, M4B, M4로 나눈 후, 이를 추출물로 만들어서 *in vitro burkholderia* 와 *in host burkholderia*, 그리고 O-antigen이 결여된 *wbiG* 재조합 변이 공생균주에 각각 처리하여 항균활성을 확인하였다. 그 결과, *in vitro burkholderia*는 숙주의 M1 lysate에 의해 어떠한 영향도 받지 않는 반면, *in host burkholderia*와 *wbiG* 재조합 변이 공생균주는 M1 lysate에 의해 사멸된다는 것을 확인함 (그림 8).

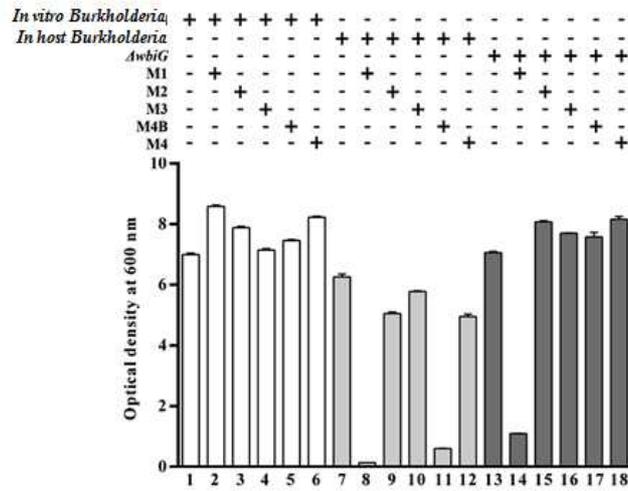


그림 8. 숙주의 중장구간에 따른 공생균의 type별 항균활성.

이러한 결과를 명확히 확인하고자 곤충 숙주인 톱다리개미허리노린재에 배양된 *in vitro burkholderia*와 *wbiG* 재조합 변이 공생균주를 감염시키고 1시간 후, M1에 생존하는 공생균의 밀도를 측정하였음. 그 결과, O-antigen이 결여된 *wbiG* 재조합 변이 공생균주의 서식밀도가 *in vitro burkholderia*의 서식밀도보다 현저히 낮은 것을 확인하였고, 이러한 결과는 숙주의 M1 내에 O-antigen이 결여된 *burkholderia*를 사멸시키는 항균물질이 존재한다는 것을 다시 한 번 증명하는 결과임. (그림 9).

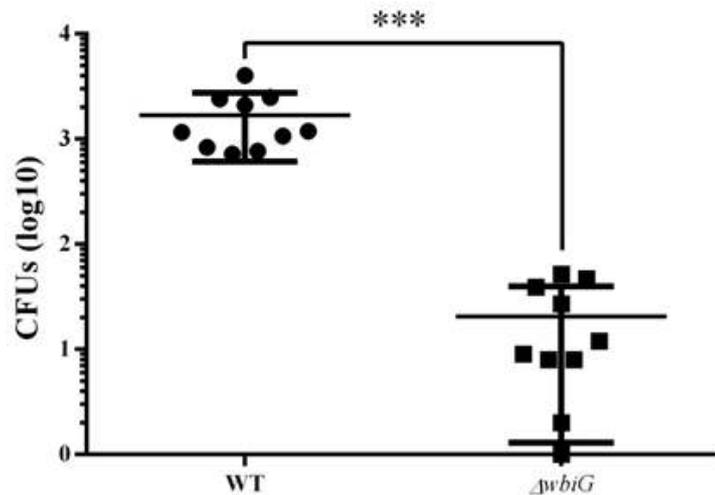


그림 9. M1에서의 *in vitro burkholderia*와 *wbiG* 재조합 변이 공생균주간의 CFUs.

② M1내에는 rough type LPS를 가지는 *Burkholderia*를 사멸시키는 Kunitz-type trypsin inhibitor의 존재

따라서 M1 내에 존재하는 항균물질을 규명하기 위해, 대량의 톱다리개미허리노린재를 해부하여 M1을 얻어 추출물로 만든 후, ammonium sulfate 침전법을 수행하여 정제를 시작하였음. 그 후 *wbiG* 재조합 변이 공생균주에 대해 항균활성을 가지는 40-60%의 침전구역을 size exclusion chromatography인 Superdex 75 column을 사용하여 분리 한 후 (그림 10A, B), 항균활성을 가지는 peak 4를 얻음 (그림 10C). 그 후 peak 4에서 나머지 peak에서는 나타나지 않는 17 kDa의 특이적인 단백질 밴드를 확인할 수 있었음 (그림 10D). 이 17 kDa의 단백질이 무엇인지 알기 위해서 N-말단 아미노산서열을 분석하여 NCBI에서 BLAST한 결과, 17 kDa의 단백질은 톱다리개미허리노린재의 먹이인 콩에서 유래한 Kunitz-type의 trypsin inhibitor로 밝혀짐 (그림 10E).

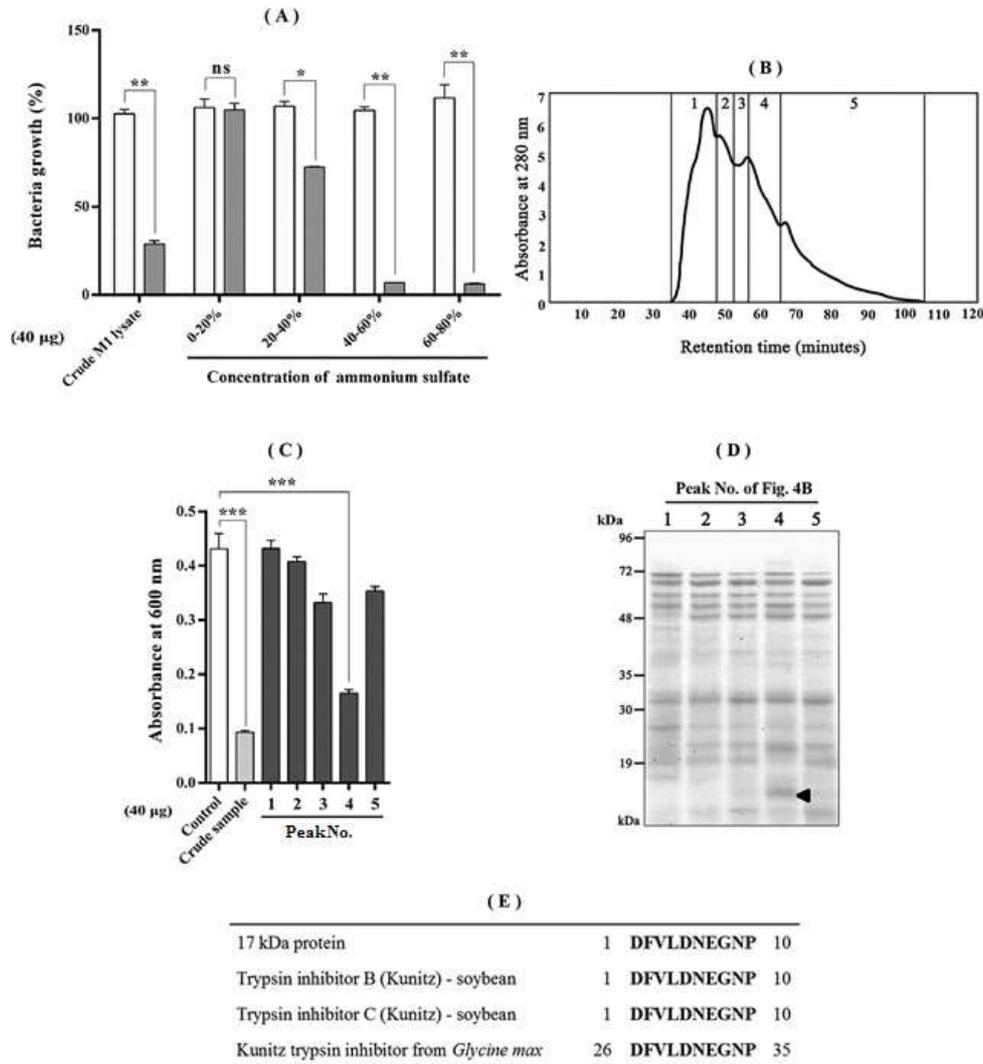


그림 10. M1 midgut으로부터 O-antigen 결여 *burkholderia*에 대해 항균활성을 가지는 Kunitz-type trypsin inhibitor의 규명.

③ Kunitz-type trypsin inhibitor가 항균활성을 가지기 위한 M1의 환경

Trypsin inhibitor의 항균활성을 알아보기 위해 시판되고 있는 soybean에서 유래한 trypsin inhibitor를 O-antigen이 결여된 *wbiG* 재조합 변이 공생균주에 처리한 결과, 공생균이 사멸하지 않았다. 따라서 trypsin inhibitor가 O-antigen이 결여된 *burkholderia*에 대해 항균활성을 가지려면 “M1 내에 존재하는 다른 물질 또는 M1의 환경이 필요할 것”이라는 가설을 세우고 차후 실험을 진행하였음. 콩을 제거한 M1 lysate를 *wbiG* 재조합 변이 공생균주에 처리한 그룹에서는 *wbiG* 재조합 변이 공생균주가 사멸하지 않았으나, 콩을 제거한 M1 lysate와 trypsin inhibitor를 *wbiG* 재조합 변이 공생균주에 같이 처리한 그룹에서 *wbiG* 재조합 변이 공생균주가 유의미하게 사멸하였음 (그림 11). 이 결과는 trypsin inhibitor가 O-antigen이 소실된 *burkholderia*를 사멸시키나, host의 M1 내에 존재하는 물질 또는 그 환경이 필요하다는 결론을 내릴 수 있었음.

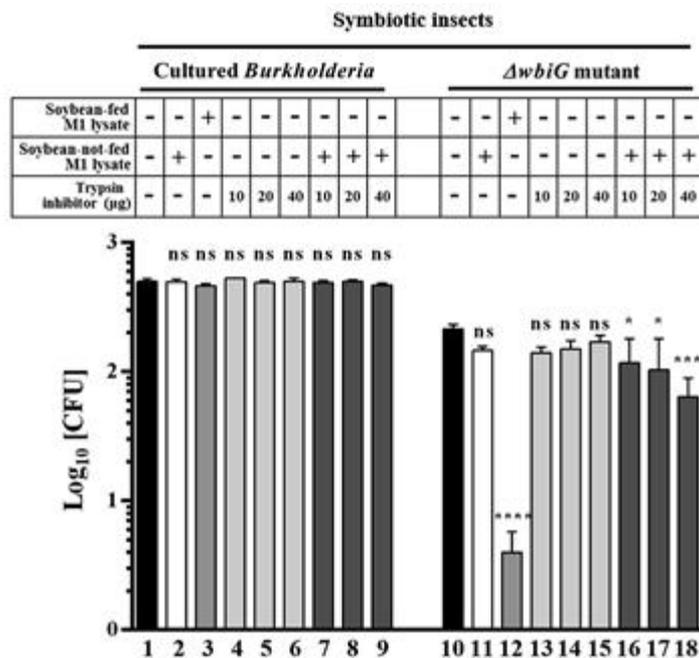


그림 11. M1 lysate 존재 하에 O-antigen이 결여된 *burkholderia*에 대해 항균활성이 있는 trypsin inhibitor.

④ Smooth-type LPS를 가지는 *burkholderia*와 숙주의 안정적인 공생관계

M1 lysate에서의 항균활성은 곤충 숙주인 톱다리개미허리노린재와 *burkholderia*의 공생관계에서 생물학적 의미를 가지며, 일반적인 야외환경에는 O-antigen이 소실된 rough-type의 *burkholderia*와 O-antigen을 가진 smooth-type의 *burkholderia*가 다양한 이유에 의해 모두 존재할 수 있다. 그리고 본 연구결과를 바탕으로, 동물 공생균인 *burkholderia*의 경구 감염 시, 곤충 숙주의 M1 중장기관에서의 항균 활성으로 인해 rough-type의 *burkholderia*는 높은 수준으로 사멸되나, smooth-type의 *burkholderia*는 사멸되지 않는다는 것을 알 수 있음. 따라서 최종적으로는 곤충 숙주인 톱다리개미허리노린재는 smooth-type의 *burkholderia* 만을 선택적으로 획득할 수 있으며, 이들은 안정적으로 공생관계를 이룰 수 있게 됨을 확인함.

지금까지의 결과들을 토대로 본 연구진은 “공생균인 *burkholderia*의 smooth-type LPS는 콩 으로부터 유래되는 Kunitz-type trypsin inhibitor와 이를 보조하는 M1 내의 어떤 인자의 항균 활성으로부터 동물 공생균인 *burkholderia*를 보호한다”는 결론을 내릴 수 있었음. 또한 “반면, Rough-type LPS를 가지는 동물 공생균인 *burkholderia*는 M1의 영향을 받아 사멸하여, 정상적인 공생관계를 이루는데 어려움을 겪는다”는 연구 결과를 도출함.

이러한 연구결과는 1차년도에 얻게 될 특이공생인자의 기능분석에 있어서 중요한 자료로 사용되어 질 수 있을 것으로 여겨지며, 2차년도 연구에 있어서 참고할 만한 기초자료가 될 것으로 판단됨.

(2) 공생 관계에 필요한 공생균의 공생 인자 규명

(가)공생 관계에서 공생균의 lipopolysaccharide core oligosaccharide의 중요성 규명

숙주인 *Riptortus pedestris*의 중장에 공생하기 위하여, 공생균인 *burkholderia*는 숙주의 중장 환경에 적응을 하여야만 한다. 그 중, 박테리아의 세포벽의 최외각 성분은 숙주의 중장 환경과 직접적으로 마주하는 부분이다. Gram-negative 박테리아인 *burkholderia*는 lipopolysaccharide (LPS)를 세포 외막에 주요 성분으로써 가지고 있으며, 이것은 lipid A, O-antigen, core oligosaccharide (OS)라는 부분으로 나뉘어진다. 본 연구에서는, 이러한 공생균의 LPS core OS가 숙주 곤충이 중장에 공생을 하는 데 중요한 역할을 한다는 내용을 전자채 분석 내용을 기반으로 한 돌연변이주를 이용하여 규명하였다. 본 연구는 SCI급 국제저널 *The journal of biological chemistry*에 2017년 11월에 게재 완료 하였다.

① 공생균에서의 LPS core OS 생합성 유전자의 위치와 각 유전자의 돌연변이 균주의 LPS 분석
공생균인 *burkholderia*에서 LPS core OS 생합성 유전자를 찾아 본 결과, *wbiG*, *wabS*, *wabO*, *waaC*, *waaF*가 있었다 (그림 12A). 공생 관계에서 이 유전자들의 중요성을 알기 위하여, 이 결과를 기반으로 유전자 재조합법을 통한 각 유전자가 결여된 돌연변이 공생균주를 제작 하였다. 각 돌연변이 균주들의 LPS를 은 염색법을 통하여 염색 해 본 결과, 야생형 균주의 LPS와는 다르게 각 돌연변이 균주들은 LPS의 O-antigen부분이 없고 core OS부분이 야생형과 다르다는 사실을 알 수 있었다 (그림 12B).

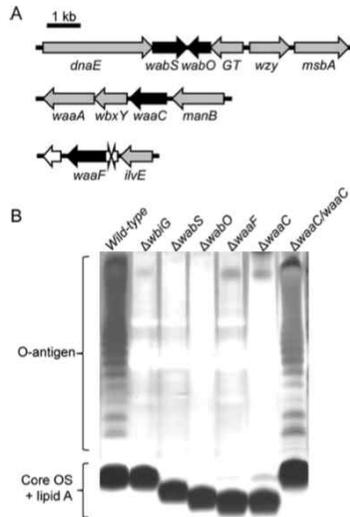


그림 12. LPS core OS 생합성 관련 유전자 및 각 유전자 돌연변이 균주의 LPS 분석

② MALDI-TOF를 통한 각 돌연변이 균주의 LPS 구조 분석

각 유전자가 LPS를 생합성 하는데 있어 어떠한 역할을 하는지 심층적으로 알기 위하여, 각 돌연변이 균주의 LPS 구조를 MALDI-TOF를 통하여 분석하였다 (그림 13). 그 결과, *waaC* 유전자는 heptosyltransferase I을 암호화 하는 유전자이며 이 유전자는 Kdo 단위체의 O-5 위치에 glycosylation을 시키는 기능을 한다는 것을 알아내었다. 또한 *waaF* 유전자는 heptosyltransferase II 효소를 암호화하는 유전자임을 밝혀냈다. 더불어 *wabO* 유전자는 glucosyltransferase를 암호화한다는 것을 알아내었다. 마지막으로 *wabS* 유전자는 second glucosyltransferase 효소를 암호화 한다는 것을 알아내었고, 이 결과를 통하여 공생균인 *burkholderia*의 LPS 생합성에 관련 된 각각의 유전자가 LPS를 생합성 하는 데에 있어서 어떠한 역할을 하는지를 규명하였다.

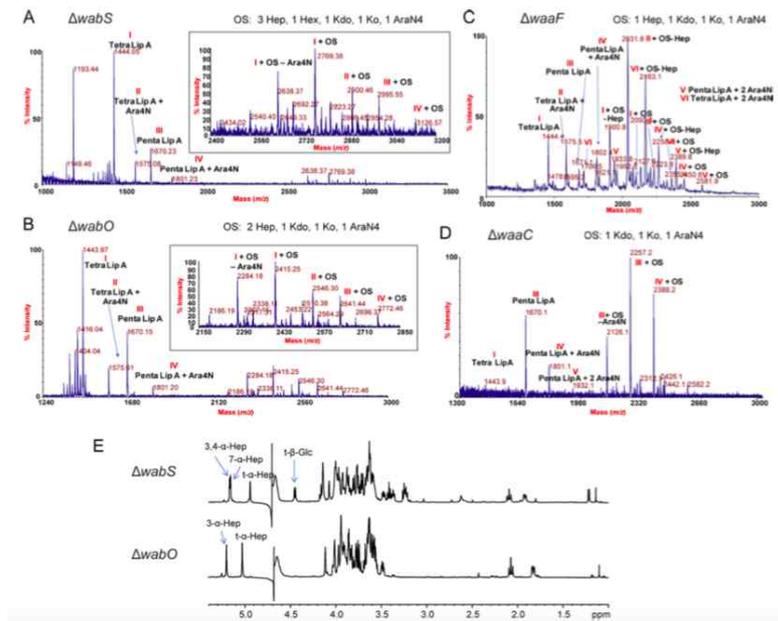


그림 13. MALDI-TOF를 이용한 LPS 구조 분석

③ 각 돌연변이 균주의 LPS core OS의 화학적 구조 분석

그림 13에서 밝힌 유전자들의 역할을 바탕으로, 각 돌연변이 균주의 LPS core OS의 구조를 화학적으로 분석하였다 (그림 14). 이 결과로 각 돌연변이 균주의 lipid A의 구조를 정확하게 알 수 있었다.

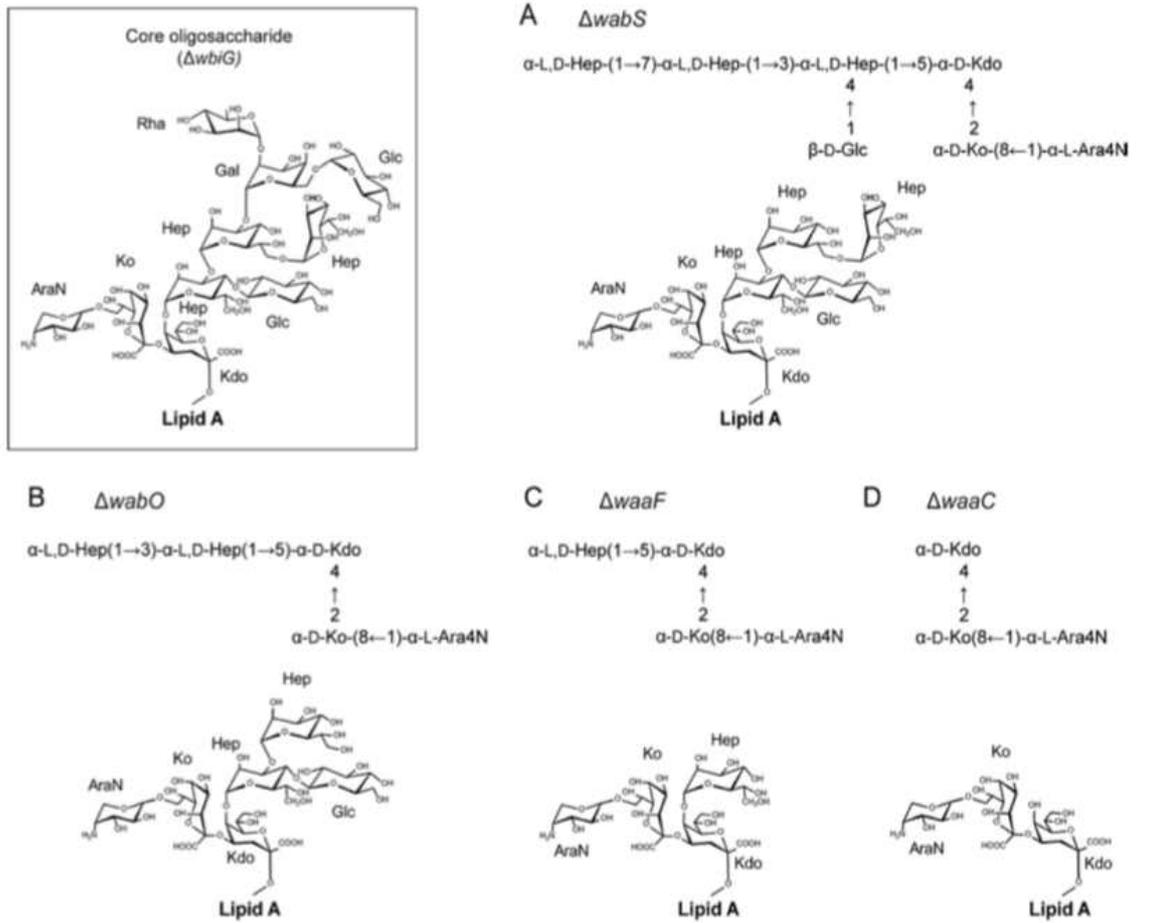


그림 14. LPS core OS의 화학적 구조 분석

④ 각 돌연변이 균주의 공생 능력 비교

LPS core OS가 공생하는 데에 있어 중요한지 알아보기 위하여, 각 돌연변이 공생균들을 숙주 곤충에 감염 시킨 뒤, 중장에 서식하고 있는 공생균의 수를 측정하였다 (그림 15A). 그 결과, *wbiG*, *wabO*, *waaF*, *waaC* 유전자가 결손된 돌연변이 균주의 공생 능력이 떨어지는 것을 관찰하였다. 특히 *waaC* 결손 돌연변이 균주는 다른 돌연변이 균주에 비해 공생 능력이 현저히 떨어졌다. 그리고 야생형과 *waaC* 결손 돌연변이 균주를 숙주 곤충에 감염시킨 뒤 그 중장을 추출하여 전자 현미경을 통해 관찰 하였다 (그림 15B, C). 그 결과 야생형은 중장지역에 잘 군집화 하고 있는 것을 보았지만, *waaC* 결손 돌연변이 균주는 잘 공생하고 있지 않은 것을 보았

다. 이 결과로 LPS core OS, 특히 *waaC* 유전자가 공생균이 공생하는데 있어 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

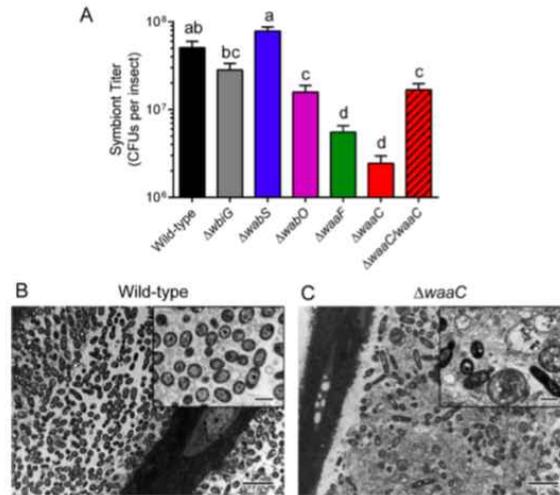


그림 15. LPS core OS 결손 돌연변이 균주들의 공생 능력 측정

⑤ LPS core OS 결손 돌연변이 균주가 숙주에게 미치는 영향

LPS core OS 결손 돌연변이 균주들을 숙주에게 감염 시킨 뒤, 성충이 되는 속도와 성충의 건조 된 무게 및 길이를 측정하였다. 먼저, 야생형 공생균을 2령 약충에 감염시키면, 숙주 곤충이 성충이 되는 데에는 약 16~18일 정도가 걸렸다. 하지만 *waaC* 결손 돌연변이 공생균을 감염 시킨 경우에는, 성충이 되는 데 18~26일 정도가 소요되었다. 이것은 공생균을 가지지 않는 곤충의 성장속도와 비슷하였다 (그림 16A). 또한 성충의 몸무게와 길이도 야생형을 감염시킨 곤충보다 *waaC* 결손 돌연변이 균주를 감염시킨 곤충이 현저히 낮은 것을 알 수 있었다 (그림 16B, C). 이 결과를 통하여, LPS core OS 돌연변이 균주가 숙주 곤충내에 잘 공생하지 못함으로써, 숙주 곤충의 성장 및 발달속도를 증진시키지 못한다는 것을 알 수 있었다.

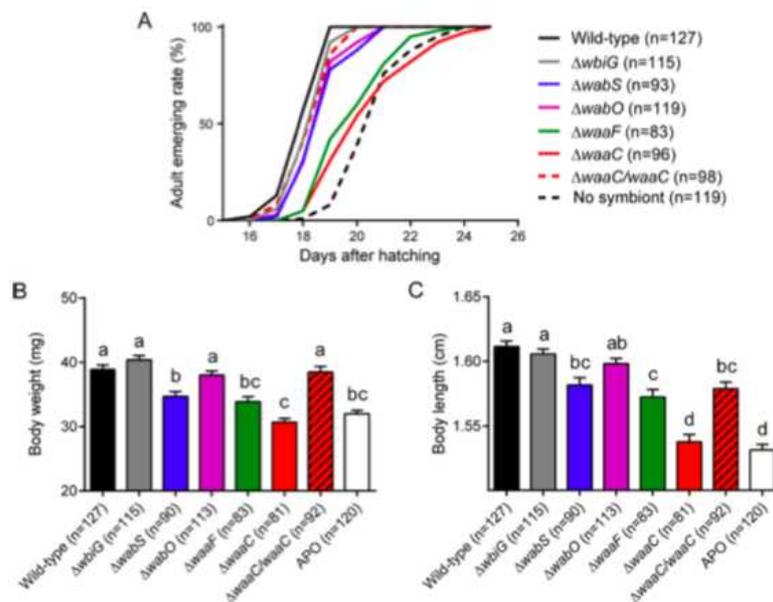


그림 16. LPS core OS 결손 돌연변이가 숙주 곤충의 성장 및 발달에 미치는 영향

㉔ LPS core OS 돌연변이 균주가 숙주 곤충의 면역에 미치는 영향

야생형과 각 LPS core OS 돌연변이 균주를 감염시킨 숙주 곤충의 혈림프에 병원균인 *E. coli* 를 주사한 후 생존율을 측정함으로써, 숙주 곤충의 면역력을 측정하였다. 그 결과 *waaC* 결손 돌연변이 균주를 감염시킨 곤충의 생존율이 야생형 공생균을 감염시킨 곤충보다 현저히 낮음을 보였다. 이 결과로 *waaC* 결손 돌연변이 균주는 숙주 곤충의 면역반응을 증강시키지 못한다는 것을 알 수 있었다.

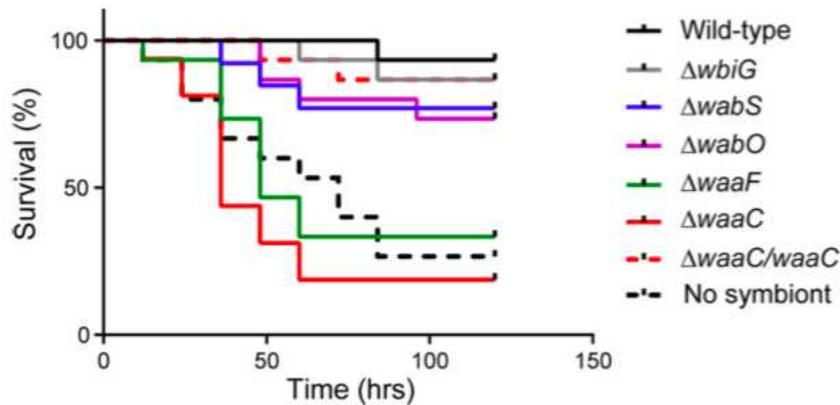


그림 17. LPS core OS 결손 돌연변이가 숙주 곤충의 면역력에 미치는 영향

(3) 곤충 병원균 *P. entomophila*의 중요 독성인자 발굴 및 그 특성의 규명

(가) 곤충 병원균의 중요 독성인자의 발굴

공생균을 이용한 자연친화적 해충 방제법을 개발하기 위하여, 다른 병원균의 독성 인자를 공생균인 *burkholderia*에서 과발현시킬 계획이다. 이 연구를 위하여, 먼저 곤충 병원균인 *Pseudomonas entomophila*를 타겟 균주로 선택하였다. 이 균주의 주요 독성인자를 발굴하기 위해서 유전학적 접근을 하였으나, 아직 밝혀지지 않은 바가 많아 생화학적인 접근을 통하여 독성 인자를 밝혀내었다. 독성인자는 metalloprotease인 AprA로 밝혀졌고, 이 단백질은 숙주인 톱다리개미허리노린재의 면역반응을 억제시키며 숙주 곤충을 효율적으로 사멸시켰다. 또한 *aprA* 유전자 결손 돌연변이 균주가 숙주 곤충에 대해 현저히 떨어진 독성을 나타낸다는 것을 보임으로써, AprA가 중요한 독성 인자임을 증명하였다. 이 연구 결과는 2018년도 4월에 SCI급 저널인 'Developmental and Comparative Immunology'에 게재 완료하였다.

㉑ 숙주 곤충에 대한 *P. entomophila*의 독성 측정

*P. entomophila*가 숙주 곤충에게 어느 정도의 독성을 가지는지 알기 위하여 다른 균주 (*E. coli*, *S. aureus*, *burkholderia*)와 *P. entomophila*를 숙주 곤충의 혈림프에 주사하고 생존율을 측정하였다 (그림 18A). 그 결과, 오직 *P. entomophila*만이 숙주 곤충을 효과적으로 사멸시킬 수 있었다. 또한, 더 자세하게 그 독성을 알기 위하여, 각기 다른 세포 수의 *P. entomophila*와 열처리를 통해 사멸시킨 *P. entomophila*를 숙주의 혈림프에 주사하고 생존율을 측정하였다

(그림 18B). 그 결과 오직 살아있는 균주만이 숙주 곤충을 죽일 수 있다는 사실을 알아내었고, 세포 수에 의존적으로 그 독성이 강해진다는 것을 알 수 있었다.

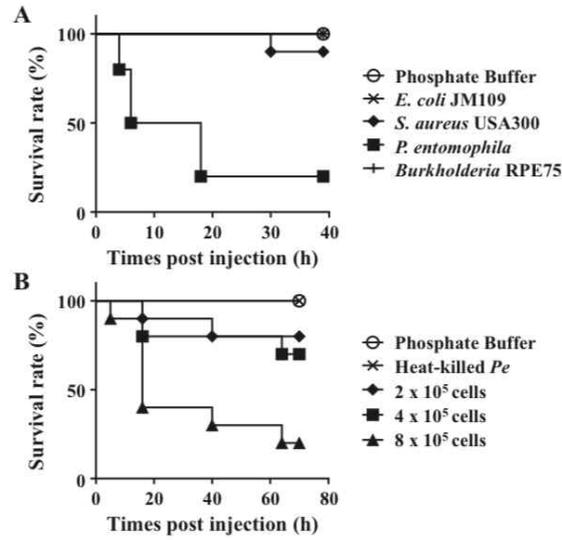


그림 18. *P. entomophila*의 독성 측정

② 숙주의 혈구 세포에 대한 *P. entomophila*의 세포 독성

*P. entomophila*가 숙주 곤충을 어떻게 사멸시키는지를 알아보기 위하여, *P. entomophila*를 숙주의 혈림프로 주사한 뒤, 혈구 세포의 숫자를 측정하였다. 그 결과, *P. entomophila*를 주사 한 후 시간이 지남에 따라 총 혈구 세포의 숫자가 증가하였다 (그림 19A). 이것을 통해 숙주가 침입한 병원균을 제거하기 위해 면역반응을 일으켰다는 것을 알 수 있었다. 하지만, 증가한 숫자의 혈구 세포의 대부분은 이미 죽은 혈구 세포라는 것을 trypan blue 염색을 통하여 알 수 있었다 (그림 19B). 또한 *in vitro* 와 *in vivo* 모두에서 *P. entomophila*가 숙주 곤충의 혈구의 죽음을 유도한다는 것을 죽은 혈구세포의 비율을 측정함으로써 알 수 있었다 (그림 19C, D). 이 결과를 통하여 *P. entomophila*가 숙주의 세포성면역반응을 억제함으로써 숙주 곤충을 죽일 수 있을 것이라는 사실을 알 수 있었다.

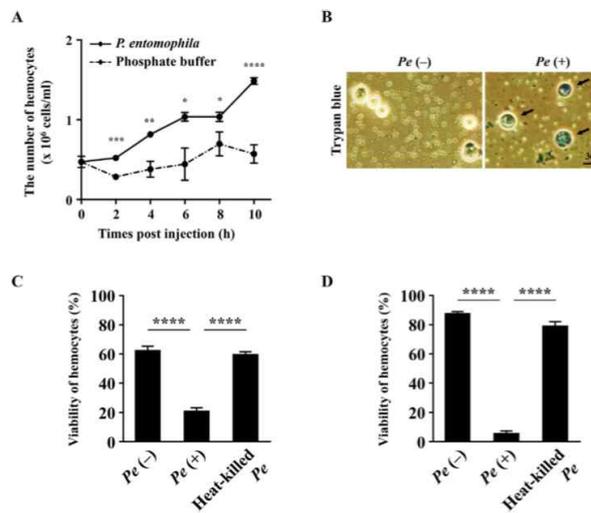


그림 19. *P. entomophila*의 세포 독성 규명

③ 살충효과를 보이는 독성인자의 정제 및 규명

*P. entomophila*가 분비하는 독성인자를 정제하기 위하여, 먼저 *P. entomophila* 배양액을 숙주 곤충의 혈림프로 주사하여 생존율을 확인하였다 (그림 20A). 그 결과 배양액 또한 숙주 곤충을 잘 사멸시킨다는 것을 확인 하였고, 이 결과를 통해 배양액 속에는 독성 인자가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 배양액이 숙주의 혈구 세포에 대한 세포 독성을 보였다 (그림 20B). *P. entomophila*의 독성인자를 정제하기 위하여, 먼저 배양액 안에 있는 단백질을 SDS-PAGE기법을 통하여 확인하였다 (그림 20C). 그 결과 3 종류의 많은 양의 단백질과 여러 가지 다른 단백질들이 존재하는 것을 확인하였다. 이것을 음이온수지교환 크로마토그래피법과 크기배제 크로마토그래피법을 사용하여 하나의 살충 효과를 나타내는 단백질을 분리 정제 하였다 (그림 20D). 이 45 kDa의 단백질을 LC-MS 분석법을 통하여 분석하여, metalloprotease인 AprA라는 것을 규명하였다 (그림 20E).

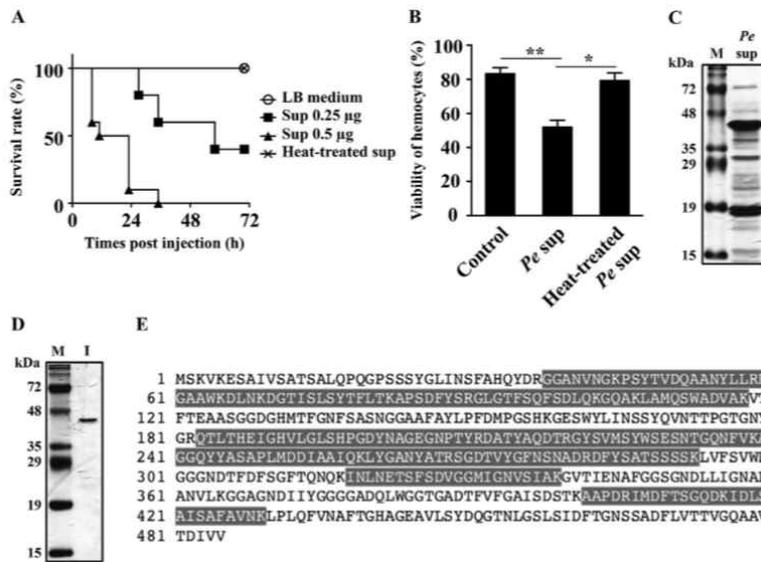


그림 20. 살충 효과를 나타내는 단백질 AprA의 분리 정제

④ AprA에 의한 숙주 혈구 세포의 세포 자살 유도

정제한 AprA의 살충 능력을 확인하기 위해, AprA를 숙주 곤충의 혈림프로 주사 한 뒤 생존율을 측정하였다 (그림 21A). 그 결과, AprA는 효과적으로 곤충을 사멸시킴을 알 수 있었다. 반면에, AprA를 열처리하여 비활성화 시키면 살충 효과가 없어지는 것을 확인하였다. 또한, *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 숙주 곤충의 혈구 세포를 사멸 시켰다 (그림 21B, C). 마찬가지로, AprA를 비활성화 시키면 세포독성이 사라졌다. 어떠한 메카니즘으로 혈구 세포를 사멸시키는 지 알기 위해, 종마다 잘 보존 되어있는 세포 자살을 먼저 확인 해 보았다. 그 결과, AprA를 주사한 곤충의 혈구 세포가 Annexin V-FITC 및 Propidium Iodide에 염색이 잘 되는 것을 관찰하였다 (그림 21D, E). 이 결과들을 통해, AprA는 세포의 세포 자살을 유도하여 숙주 곤충의 세포를 사멸시킨다는 것을 알 수 있었다.

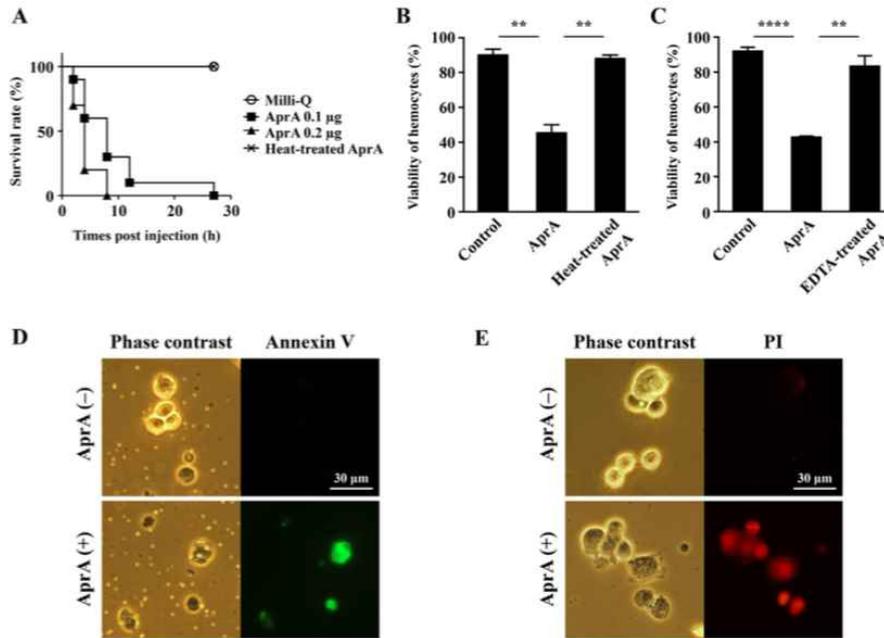


그림 21. AprA에 의한 숙주 곤충의 세포 자살

⑤ AprA에 의한 숙주 곤충의 체액성 면역 억제

숙주 곤충의 세포성 면역 말고도, 체액성 면역이 AprA에 의해 억제되는지를 확인하기 위해, 먼저 *P. entomophila* 세포를 숙주 곤충의 혈림프에 주사한 뒤, 3가지의 항균펩타이드 유전자의 발현량을 측정하였다 (그림 22A-C). 그 결과, 주사 후 시간이 지남에 따라 3가지의 항균펩타이드 유전자의 발현량이 높게 증가하는 것을 확인하였다. 이것은 *P. entomophila*에 의해 숙주 곤충의 체액성 면역이 유도 되었다는 뜻으로 해석 된다. 이렇게 숙주 곤충에 의해서 분비된 항균 펩타이드가 AprA에 의해 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위하여, 화학적으로 합성한 항균 펩타이드와 정제된 AprA를 같이 반응시킨 후 웨스턴블랏을 통하여 그 변화를 확인하였다 (그림 22D). 그 결과, AprA에 의해서 항균 펩타이드가 완벽하게 분해되는 것을 알 수 있었다. 반면에, AprA를 비활성화 시키면 항균펩타이드가 분해되지 않는 것을 확인 하였다. 추가적으로, 항균펩타이드에 감수성이 높은 균주로 알려진 *E. coli* 균주를 이용하여 AprA가 항균펩타이드를 분해함으로써 *E. coli*를 보호한다는 것을 알아내었다 (그림 22E, F). 이 결과들을 통하여 AprA가 숙주 곤충의 세포성 면역뿐만 아니라, 체액성 면역 또한 억제하여 숙주 곤충을 사멸시킨다는 것을 알 수 있었다.

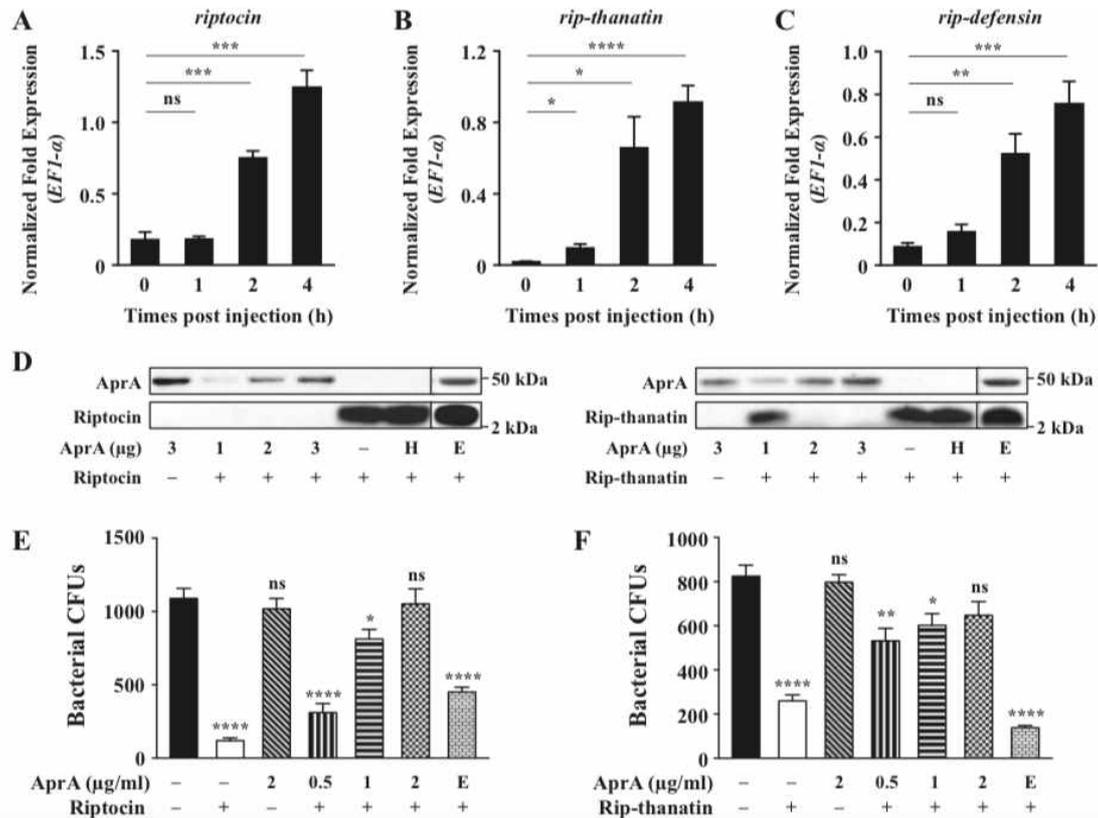


그림 22. AprA에 의한 숙주 곤충의 체액성 면역 억제

⑥ *aprA* 유전자 결손 돌연변이 *P. entomophila*의 감소된 독성

*AprA*가 *P. entomophila*의 주요한 독성 인자임을 증명하기 위하여, *aprA* 유전자가 결여된 돌연변이 균주를 사용하여 실험하였다. 먼저 야생형과 돌연변이 균주를 배양한 배양액의 단백질을 SDS-PAGE와 웨스턴블랏을 이용해 확인 해 본 결과, *aprA* 결손 돌연변이 균주에서는 *AprA*가 없다는 것을 확인 하였다 (그림 23A). 또한 돌연변이 균주의 독성을 확인하기 위해, 야생형과 돌연변이 균주를 숙주 곤충의 혈림프로 주사 한 후 생존율을 측정하였다 (그림 23B). 그 결과, 돌연변이 균주의 병원성이 더 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 돌연변이 균주의 배양액에는 *AprA*가 없기 때문에 숙주에 대한 독성이 사라지는 것을 알 수 있었다 (그림 23C). 그리고, 돌연변이 균주의 배양액은 숙주 곤충의 혈구 세포에 대한 세포 독성 또한 사라짐을 확인하였다 (그림 23D). 마지막으로, 돌연변이 균주의 배양액이 숙주 곤충의 항균펩타이드를 분해하지 못한다는 것을 알아내었다 (그림 23E). 이 결과들을 통하여 *AprA*가 *P. entomophila*의 주요한 독성 인자임을 증명하였다.

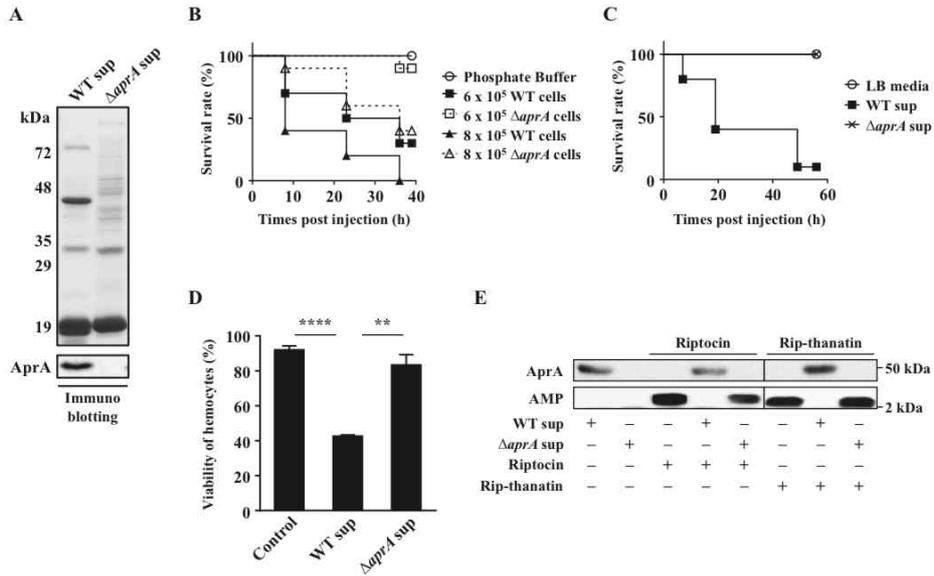


그림 23. *aprA* 돌연변이 균주의 약화된 독성

현재까지, 공생균 *Burkholderia*의 *in vivo* 및 *in vitro* 전사체 분석을 통하여 공생 인자를 발굴해 왔다. 이 전사체 분석을 기반으로, 공생균인 *Burkholderia*가 가지지 않는 병원균 유래의 독성 인자를 공생균에서 과발현 시킴으로써, 해충인 숙주 곤충 톱다리개미허리노린재의 자연친화적인 방제법을 찾을 수 있다고 판단된다.

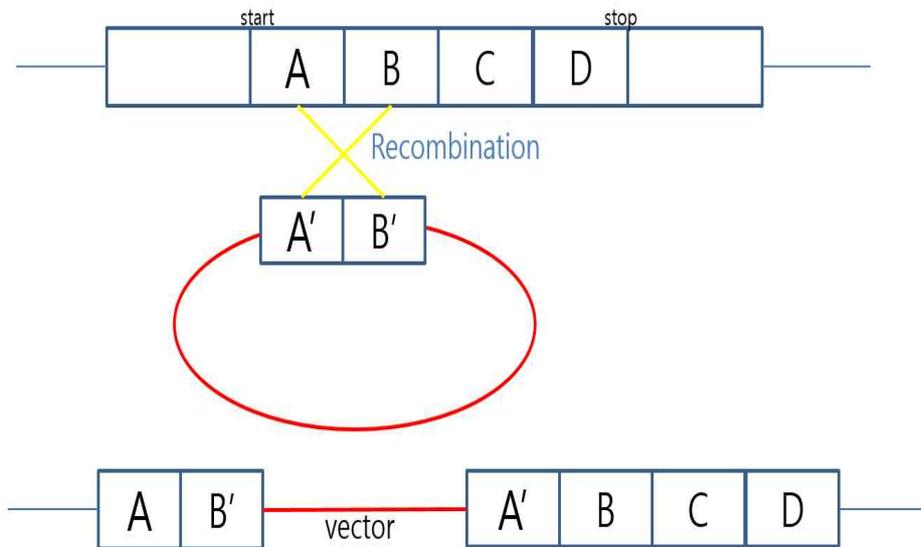
미생물인 *Pseudomonas entomophila*는 그 독성 인자에 대해서 많이 밝혀져 있지 않고, 여러 종의 곤충을 잘 죽일 수 있는 것으로 알려져 있다. 그래서, 이 균주로부터 숙주인 톱다리개미허리노린재를 사멸시킬 수 있는 독성 인자를 발굴해내어 독성 인자를 찾아내면, 그것을 공생균인 *Burkholderia*에서 발현 시킨 후, 공생균에 대해 독성을 나타내는지 확인하고, 독성이 없다면, 이것을 숙주 곤충에 감염시켜 자연친화적인 해충방제에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

3. 용역(루이지애나 주립대학교 함종현)

가. 병원성 및 비병원성 균주들의 유전체 염기서열 분석을 통해서 발견된 후보 유전자 중 2개의 유전자 병원성 기능 유전자 규명

병원성 및 비병원성 균주들의 유전체 염기서열 분석을 통하여 발견된 후보 유전자들 가운데 두 개의 유전자(잠정적으로 각각 BGVC11 과 LSUPB467 로 표기)의 병원성 기능을 유전학적 생물학적 실험을 통하여 규명하였다. 이 두 유전자들 가운데 BGVC11 은 TetR/AcrR 계열의 조절인자를 LSUPB467 은 AsnC 계열의 조절인자를 각각 코딩하고 있는 것으로 분석되었다. 따라서 이들 두 개의 새로운 병원성 유전자들이 이번 1차 년도의 용역 연구과제의 성과로써 발견되었다. 새롭게 발견된 이들 유전자의 병원성과 관련된 기능들은 다음과 같다.

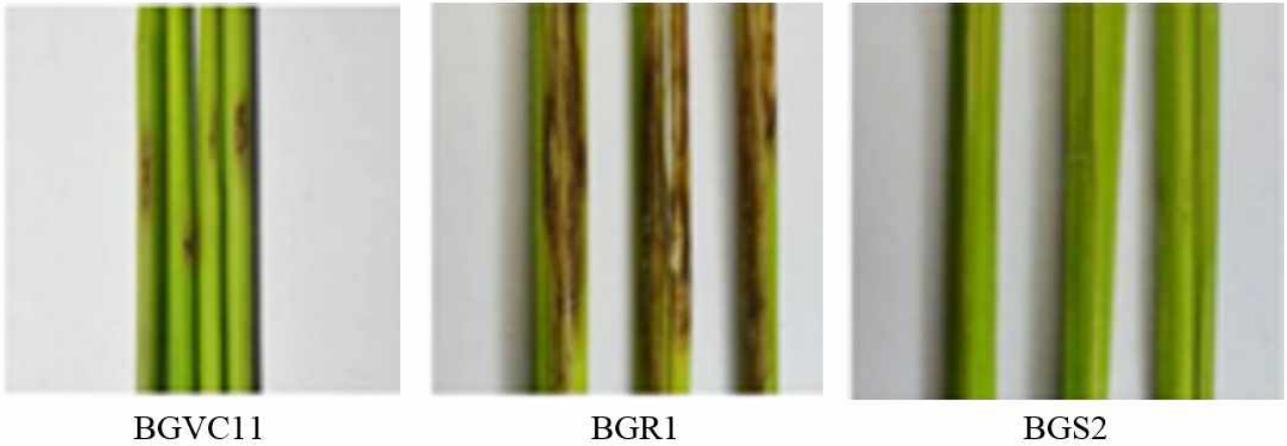
(1) *B. glumae* BGR1의 BGVC11 insertion mutant 제작 원리.



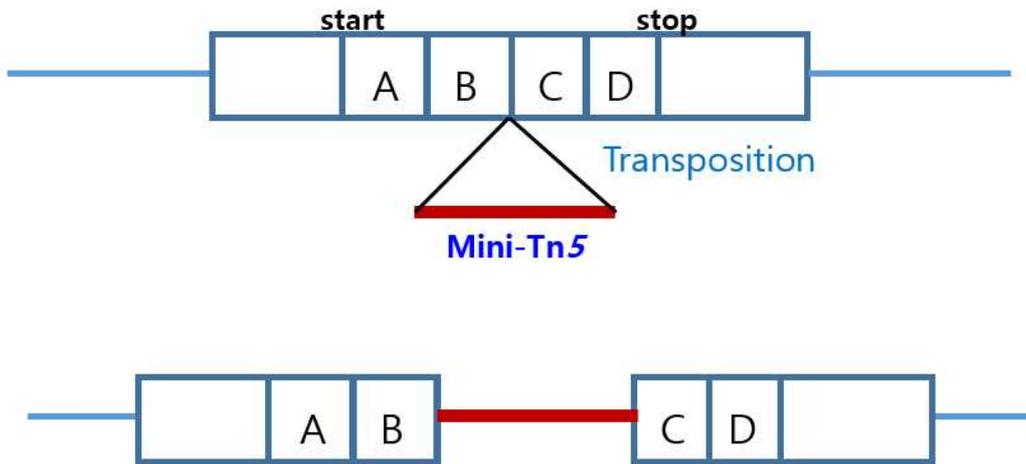
(2) *B. glumae* BGR1의 BGVC11 insertion mutant의 motility test



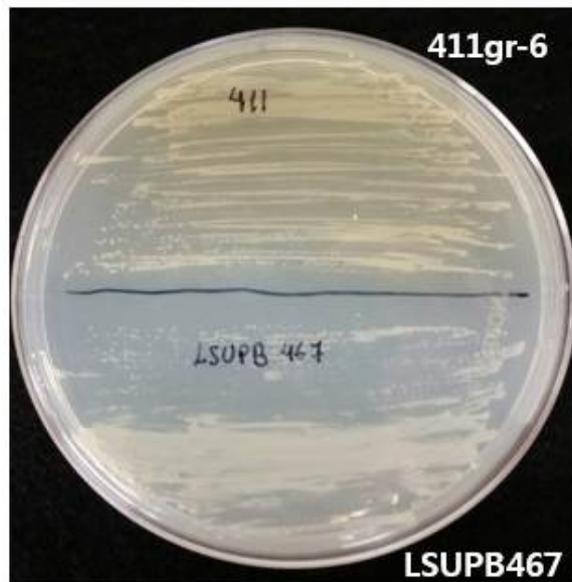
(3) *B. glumae* BGR1의 BGVC11 insertion mutant 병원성 test



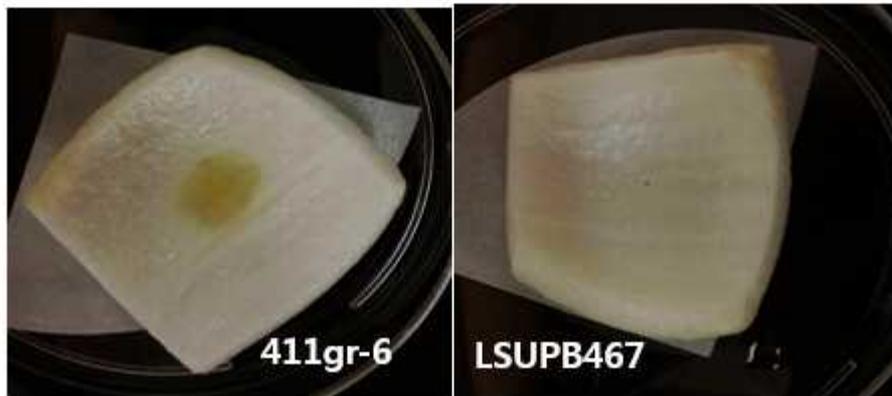
(4) *B. glumae* 411gr-6의 LSUPB465 insertion mutant 제작 원리



(5) *B. glumae* 411gr-6 의 LSUPB467 insertion mutant의 toxoflavin test



(6) *B. glumae* 411gr-6 의 LSUPB467 insertion mutant의 병원성 test



나. *Burkholderia glumae* 유전체 염기서열 분석을 통해서 발견된 후보 유전자의 동정과 기능 분석

제1차 년도 연구용역에서 발견된 두 개의 유전자들 중 *asnC* 유전자의 기능을 세밀하게 연구하여 이 유전자의 병원성에 미치는 영향과 기존에 알려진 조절인자들과의 관계를 규명하였다. 우선적으로 기존의 transposon (miniTn5) 돌연변이 균주 LSUPB467로 관찰한 *asnC* 유전자의 기능을 거듭 확인하기 위하여 유전자의 coding sequence 전체를 제거한 Δ *asnC* 균주를 만들었는데 (그림 1), 이 균주는 기존의 돌연변이 균주 LSUPB467와 비교하여 비슷한 표현형을 보여주었다 (그림 2). 그러나 Δ *asnC* 균주의 경우 첫번째 혹은 두번째 계대배양시 생존력을 잃어버리는 불안정한 특성으로 말미암아 toxoflavin 생성에 관한 테스트 이외의 생물학적 특성들을 지속적으로 파악하는데 어려움이 있었다. 이러한 이유로 toxoflavin 생성을 제외한 병원성 관련 표현형 및 quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) 결과들은 기존의 *asnC* mutant 인 LSUPB467을 이용한 실험들로부터 얻게 되었다. 또한 TetR/AcrR 계열의 조절인자인, BGVC1은 벼스트레스 반응에 관련된 단백질들과 상호작용을 확인하기 위한 Y2H (Yeast two hybrids)를 수행하였음.

(1) Δ *asnC* 균주의 생성 및 표현형

이번 연구로 새로 발견된 *asnC* 유전자를 marker-exchange eviction mutation 기술로 제거하여 Δ *asnC* 균주를 생성하였고 유전자가 성공적으로 제거되었음을 PCR로 확인하였다 (원리그림). 이 Δ *asnC* 균주는 원래의 *asnC* 돌연변이 균주인 LSUPB467과 마찬가지로 toxoflavin의 생산이 감소되는 표현형을 보였다 (플레이트 그림). 그러나 Δ *asnC* 균주는 계대배양시 생존력에 문제가 있어서 *asnC* 유전자의 기능 규명을 위한 다음단계의 실험들은 원래의 *asnC* 돌연변이 균주인 LSUPB467을 가지고 수행하였음

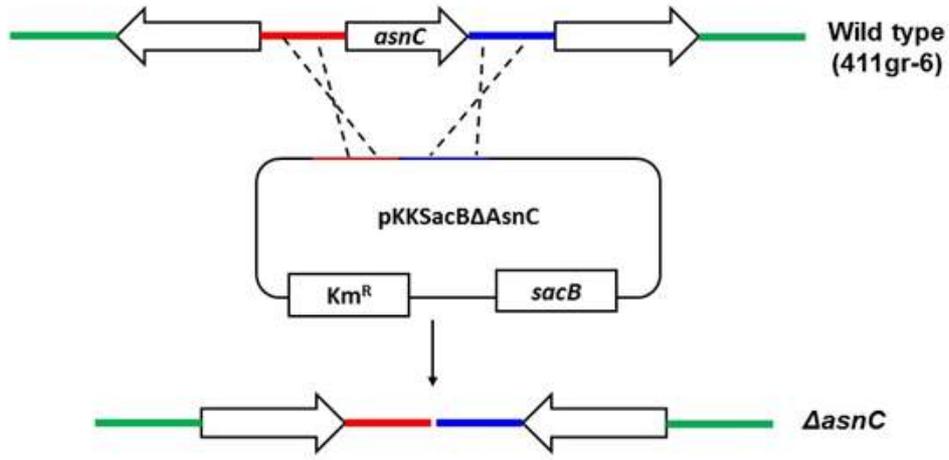


그림 65 Δ *asnC* 균주의 생성원리

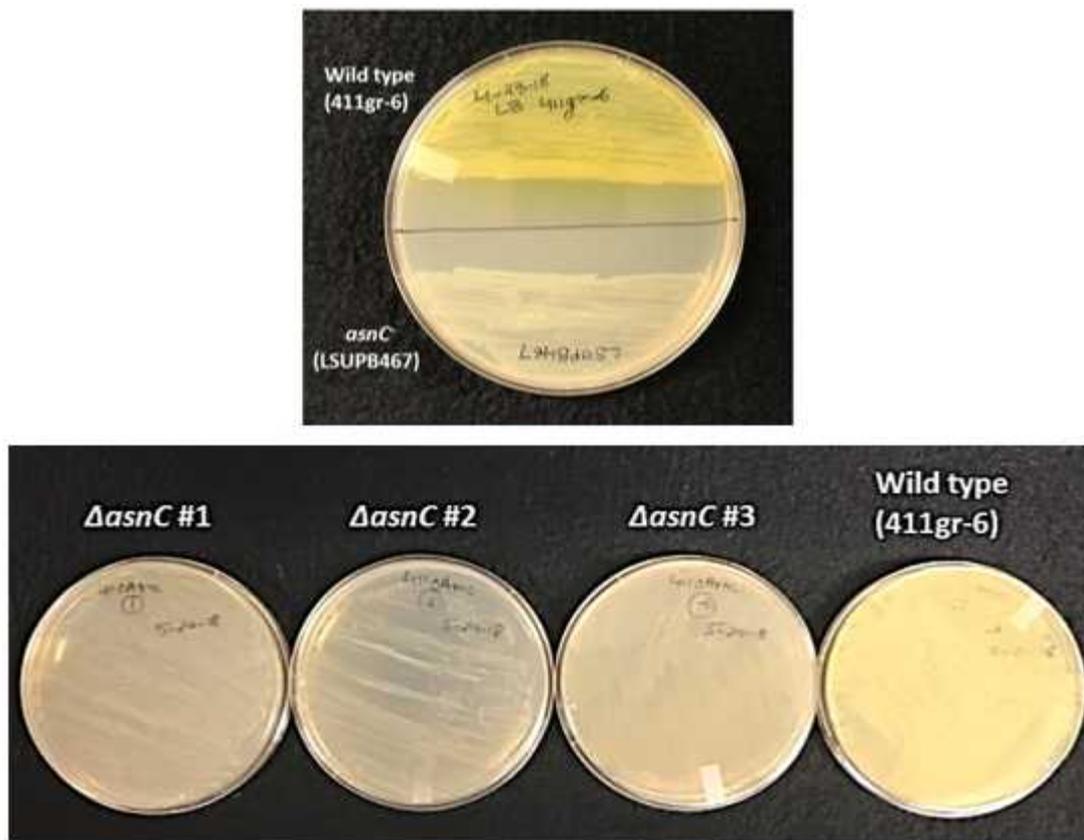


그림 66 *asnC* 유전자의 돌연변이균주 LSUPB467과 Δ *asnC*의 toxoflavin 표현형

(2) *asnC* 돌연변이 균주 LSUPB467의 벼에서의 병원성 표현형
 벼에서의 병원성 실험결과 *asnC* 돌연변이 균주인 LSUPB467가 wild type 균주인 411gr-6에 비해 현저하게 낮은 병원성을 보이며 이 유전자가 *B. glumae*의 병원성에 매우 중요함을 확인할 수 있었음 (그림 3)



그림 67 *asnC* 유전자의 돌연변이균주 LSUPB467의 벼에서의 병원성 표현형

(3) *asnC* 돌연변이 균주 LSUPB467의 acyl-homoserine lactone (AHL, quorum-sensing signal) 생성

*B. glumae*의 quorum-sensing signal 물질인 AHL의 생성을 지표 균주인 *Chromobacterium violaceum* CV026 을 이용하여 검사한 결과 *asnC* 돌연변이 균주인 LSUPB467의 AHL 생성이 야생형 모균주인 411gr-6에 비해 다소 감소한 것을 관찰할 수 있었음 (그림 4).



그림 68 *B. glumae*의 quorum-sensing signal 물질 AHL의 생성

411gr-6: LSUPB467의 야생형 모균주

LSUPB467: *asnC* 돌연변이 균주

336gr-1: 또 다른 병원성 야생형 균주

336Δtofl: 336gr-1의 quorum-sensing 돌연변이 균주

(4) *asnC* 유전자가 기존에 알려진 병원성 유전자 및 병원성 조절 유전자의 발현에 미치는 영향 유전자의 발현 정도를 qRT-PCR 방법으로 측정한 결과 quorum-sensing 에 관여하는 *tofl* 와 *tofr* 유전자의 발현이 *asnC* 돌연변이 균주 LSUPB467 에서 현저히 감소하였고 toxoflavin 생합성에 관여하는 *toxA* 유전자의 경우 거의 발현이 되지 않았다. 기존에 toxoflavin 생합성과 운반체계를 조절하는 것으로 알려진 toxoflavin 조절 유전자 *toxJ* 와 *toxR* 의 경우 LSUPB467 에서 야생형 모균주 411gr-6 에 비해 약간 감소하였다 (그림 5). 이 qRT-PCR 실험결과는 앞서 관찰된 AHL 과 toxoflavin 생성에 관련된 표현형 관찰결과와 일치하였음. (그림 2와 4).

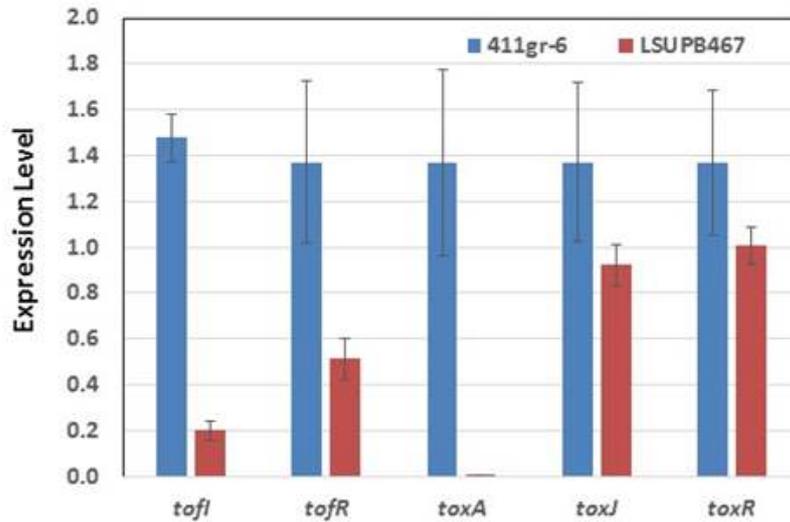


그림 69 qRT-PCR 로 측정된 병원성 유전자 및 조절 유전자의 발현에 *asnC* 유전자가 미치는 영향.

이번 유전체 연구를 통하여 새로 발견된 *asnC* 유전자의 기능을 병원성에 관련된 표현형을 중심으로 조사한 결과 이 유전자는 주요 병원성인자인 toxoflavin 생성에 매우 중요한 역할을 하였고 그에 따라 벼에서의 병원성에도 큰 영향력을 보였다. 기존에 알려진 병원성에 관여하는 유전자의 발현에 이 *asnC* 유전자가 끼치는 영향을 qRT-PCR 기법으로 분석한 결과 이 유전자가 quorum-sensing 에 관여하는 유전자 *tofl* 와 *tofr* 의 발현에 매우 중요하고 toxoflavin 생합성 유전자인 *toxA* 유전자 발현에는 필수적임을 알 수 있었다. 이 qRT-PCR 결과는 AHL signal 물질과 toxoflavin 생성에 관한 *asnC* 돌연변이 균주의 표현형과 일치하였다. 흥미로운 사실은 기존에 toxoflavin 생성에 중요한 조절 유전자로 알려진 *toxJ* 와 *toxR* 유전자의 발현이 *asnC* 유전자에 의해 크게 영향을 받지 않았다는 것이다. 이 결과로 미루어 볼 때 *asnC* 유전자의 toxoflavin 생성을 포함한 병원성에 관련한 기능은 *toxJ* 와 *toxR* 유전자와는 독립적으로 이루어짐을 유추할 수 있다. 다만 *asnC* 유전자에 의해 코딩된 AsnC 단백질이 ToxJ 와 ToxR 단백질과 마찬가지로 *toxABCDE* operon 의 promoter 에 직접 결합하여 조절기능을 하는지 아니면 또다른 조절인자를 매개로 하는지 규명하기 위해서는 좀 더 세밀한 유전학적 생화학적 연구가 필요한 것으로 사료됨.

(5) BGVC11의 기능 분석

*B. glumae*의 BGVC11 돌연변이 균주의 운동성 감소와 병원성 감소를 확인하여, Y2H 기법을 수행하여 BGVC11가 어떠한 벼 단백질과 상호작용하는지를 분석하고함.

우선은 벼 스트레스 반응에 관여하는 단백질에 대해서 BGVC11 단백질과의 interaction 스크리닝하여, WRKY90, XB12와 상호작용함을 확인하고, 실제로 *B. glumae*가 감염된 벼에서 RNA를 추출하여 WRKY90, XB12를 제외한 다른 상호작용 단백질을 찾아 BGVC11의 식물내 역할을 규명하고자함.

Y2H 분석 결과, 5개의 positive 상호작용 단백질을 확인할 수 있었으며, 이들의 GO(Gene Ontology) 분석을 통해 그 기능을 확인하였고, BGVC11은 식물내 여러 메카니즘에 관련하는 병원성 인자인 것으로 추정할 수 있었음.

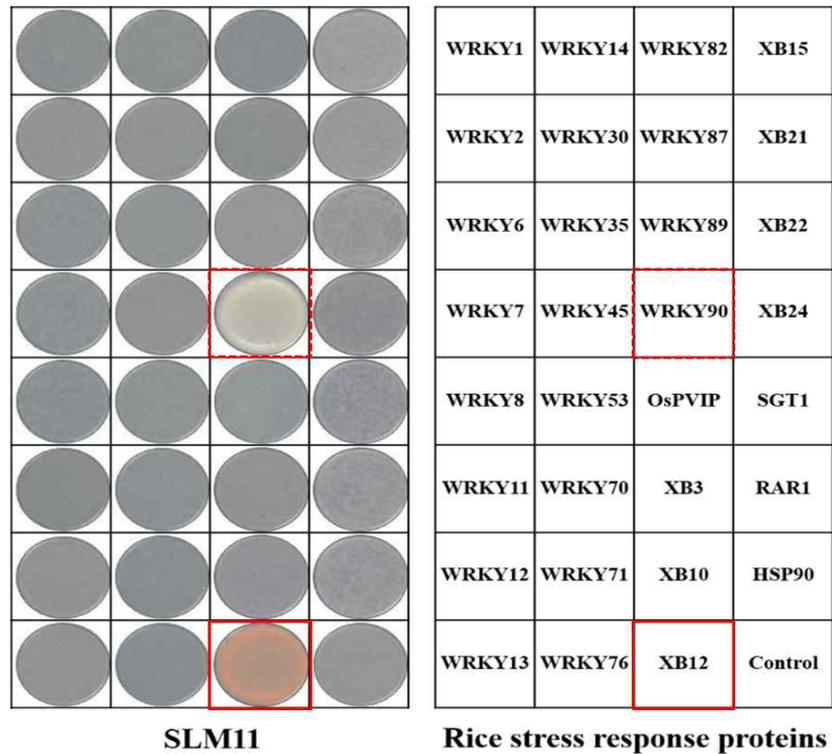


그림 70 Rice stress responses 단백질과 상호작용

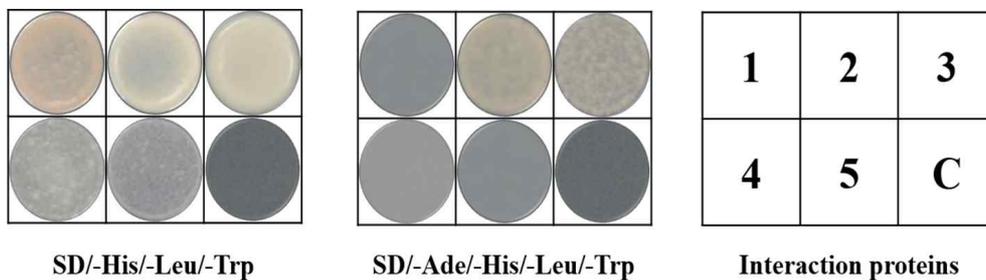


그림 71 *B. glumae*가 감염된 벼의 cDNA 라이브러리를 이용한 BGVC11의 positive interaction

NO.	Locus ID	Gene product	Scores		Identities			
			Bits	Hits	E-value	Match	Total	Pct.(%)
1	LOC_Os04g57200	Heavy metal transport/detoxification protein, putative, expressed	1066	538	0.0	548	550	99.64
2	LOC_Os01g12910	Thioesterase family protein, putative, expressed	763	385	0.0	388	389	99.74
3	LOC_Os08g09200	Aconitate hydratase protein, putative, expressed	854	431	0.0	441	443	99.55
4	LOC_Os10g42700	CS domain containing protein, putative, expressed	785	396	0.0	402	404	99.50
5	LOC_Os09g30400	SUSIBA2-like protein, expressed	311	157	2e-83	157	157	100

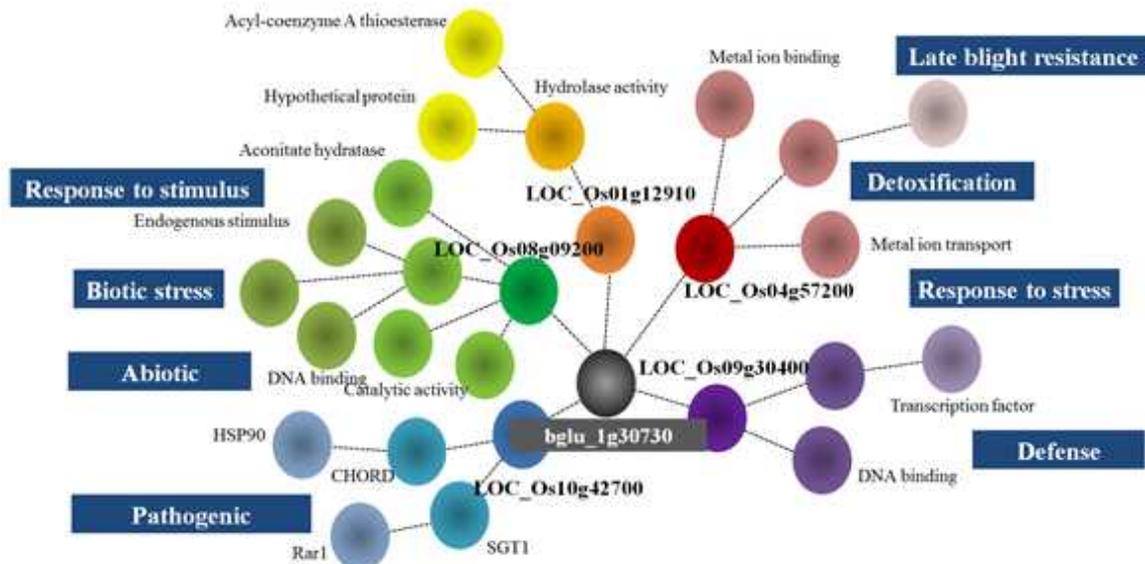


그림 72 그림 Y2H를 통해 확보한 BGVC11의 interaction partner의 GO(Gene ontology) 분석

4. 총괄 결과

다양한 *Burkholderia* species의 유전체 분석결과 식물 병원성 *Burkholderia glumae* BGR1의 다양한 새로운 식물 병원성 인자를 발굴과 새로운 병원성 기작을 규명하였으며, 이를 바탕으로 종자 전염에 의한 확산을 방제할 수 있는 신속한 특이적인 PCR기반 진단 방법을 구축하였다. 곤충 공생 *Burkholderia*를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명을 위해서 곤충의 중장기관에서 콩 유래의 inhibitor를 찾았고, 이 물질이 O-antigen이 결합된 재조합 변이 공생 *Burkholderia*를 사멸시킨다는 것을 증명하여 *Burkholderia*의 LPS O-antigen은 중요한 공생인자임을 밝혀다. 또한 식물 병원균인 *Burkholderia glumae* BGR1과 곤충 공생 *Burkholderia* sp. RPE64의 기주 내에서 발현되는 특이적인 유전자 발굴 및 기능 연구를 위해서 *in vivo* RNAseq과 분자 생화학적 접근을 통해서 숙주-공생 *Burkholderia*의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석을 수행해서 AprA 유

전자 결손 돌연변이 균주가 숙주 곤충에 대해 현저히 떨어진 독성을 나타낸다는 것을 보임으로써, AprA가 중요한 독성 인자임을 증명함. 특히, 식물병원성 *Burkholderia glumae*와 곤충 공생 *Burkholderia* sp. RPE64의 공통적인 pathway에서 sulfate transport system 구성요소 중 cysW 변이 돌연변이주에서 병원성이 감소함을 규명하였다.

2. 미생물 유전체사업의 성과목표 및 결과

가. 성과목표

(단위 : 건수)

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	사업화 · 실용 화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술 개발	NaBic 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 물 정보완미 생성	미생물병발 생기작규명
최종목표		5		2				2**		1
1차 년 도	목표	2		1						
	실적	2		2						
2차 년 도	목표	3		1				2		1
	실적	4		1				2		1
계		6		3				2		1

(1) 유용유전자원 확보

(가) Hfq (*bglu_1g14550, bglu_1g19700*)

다른 *Burkholderia* species와 다르게 *B. glumae*의 경우 2개의 Hfq 유전자를 가지는 것을 특징으로 하고 있다. *B. glumae*의 Hfq 단백질은 *B. glumae*의 기존의 병원성 인자인 toxoflavin 생산을 감소시키고, 운동성을 감소시킨다. 이로 인해 병원성 표현형도 감소시킴

(나) BGVC11

BGVC11 은 TetR/AcrR 계열의 조절인자이며, 이 유전자가 결실된 경우 *B. glumae*의 야생균주에 비해 현저히 병원성이 감소하는 것을 확인하였다. BGVC11을 생물정보학을 바탕으로 식물내로 들어가는 단백질로 예측하고 식물단백질과 BGVC11의 단백질 상호작용을 알아보았다. 특히, Y2H assay를 통한 벼스트레스 반응 단백질 및 기감염된 벼의 cDNA 라이브러리에서 반응하는 벼의 여러 단백질 존재함을 확인하였다. BGVC11은 식물내로 들어가 식물의 다양한 유전자 발현을 조절하여 병징을 발달시키는데 도움을 줄 것으로 예상함.

(다) asnC

유전자는 주요 병원성인자인 toxoflavin 생성에 매우 중요한 역할을 하였고 그에 따라 벼에서의 병원성에도 큰 영향력을 보였다. 기존에 알려진 병원성에 관여하는 유전자의 발현에 이 *asnC* 유전자가 끼치는 영향을 qRT-PCR 기법으로 분석한 결과 이 유전자가 quorum-sensing에 관여하는 유전자 *toII* 와 *toIR* 의 발현에 매우 중요하고 toxoflavin 생합성 유전자인 *toxA* 유전자 발현에는 필수적임을 알 수 있었다. 이 qRT-PCR 결과는 AHL signal 물질과 toxoflavin 생성에 관한 *asnC* 돌연변이 균주의 표현형과 일치함.

(라) *wbiG*

일반적으로 LPS의 구성성분 중, O-antigen을 coding하는 유전자로 알려져 있으나, 본 연구를 통해 동물 공생 *Burkholderia*에 있어서는 성공적인 공생관계를 이루기 위한 중요한 공생인자임을 밝혀냄.

(마) *waaC*

LPS core OS의 생합성에 관련되어있다고 알려진 *waaC* 유전자의 결손이 공생균의 *Burkholderia*가 숙주에 공생하는 데 있어서 중요한 인자임을 유전자 수준 및 화학적 수준에서 규명함.

(2) 표준유전체 해독 성과

No	미생물	유전체 해독 (contig)	등록번호	등록기관
1	<i>Burkholderia glumae</i> 957856-41-C	contig 1	CP021074	National Center Biotechnology Information
		contig 2	CP021075	
		contig 3	CP021076	
		contig 4	CP021077	
2	<i>Burkholderia glumae</i> 411gr-6	contig 1	CP021157	National Center Biotechnology Information
		contig 2	CP021158	
		contig 3	CP021159	
		contig 4	CP021160	
3	<i>Burkholderia glumae</i> 336gr-1	contig 1	CP023203	National Center Biotechnology Information
		contig 2	CP023204	
		contig 3	CP023205	
		contig 4	CP023206	
		contig 5	CP023206	

(3) 병원성미생물진단마커 개발 성과

본 미생물 진단 마커는 벼 종자에서 발견되는 식물 병원성 균인, *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 동시에 검출하기 위한 프라이머 세트에 관한 것으로, 벼 종자의 전염성 병원균으로 알려진 *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 초기에 정확하고 효과적으로 검출하기 위해서 비교 유전체학적 접근 방식으로 PCR(Polymerase Chain Reaction) 반응을 이용하여 쉽고 명확한 결과를 얻는 효과를 가짐.

Primer pair	Target protein	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Expected product (bp)
<i>Burkholderia glumae</i>				
서열번호1	Hypothetical protein	GGGGAAAAGAACGA TGAACAGA	CATGAAACGATGAA GATGCGC	255
서열번호2	Hypothetical protein	TTCTTCGACTGGCT GTTTCG	TCGCTGAAACGATC AATGAAAT	103

서열번호3	Hypothetical protein	GTCACGATCGCTCT GTTGTT	CATGAATCCACGAA GCCGAG	125
서열번호4	Hypothetical protein	CATCACAACCTCGC GGATAC	GAAATGGTGAGCTC GGCATAG	177
서열번호5	Flp family type IVb pilin	GGTCGAGTATGGAT TGATCGG	ATCTGTTGAAAAAG CTCGTGAC	116
서열번호6	Hypothetical protein	ATGATGCCTGACGA TATCGG	ATCCCGCTTTGTTG GCAATA	140
서열번호7	Hypothetical protein	CGCAAGCCTTATTC GATCCT	GTTGATCGTGAACG GGTCTT	219
서열번호8	Hypothetical protein	ACCATTAACGAAAA GATTGCCG	AATGGTCCAACCTCT TGATCTCG	300
서열번호9	Hypothetical protein	AAGATGAATCGACC GTCGTG	ACCGTCGCGATCAT GATTTC	289
서열번호11	Hypothetical protein	TTGGTGTTCAGTCGA TTACAAGG	AATAGAGATCGTGC AGGATCCA	283
서열번호12	Hypothetical protein	GTCCAGCTGAAGTA TTACCTGG	GATGAATTCACGCA GGCGATA	117
서열번호13	Hypothetical protein	CTACGTCGAGTATG TGGTGG	GAAGAACGATTTCA AGGCCAC	106
서열번호14	Hypothetical protein	GATTTGCTTACCTT GTGGCTG	GGCCACTTCGATTT CTGTATTG	235

표 22 비교유전체학적 접근을 통해 확보한 *B. glumae* 프라이머 세트

Primer pair	Target protein	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Expected product (bp)
<i>Burkholderia gladioli</i>				
서열번호15	FkbM family methyltransferase	CAGTCGTTTAGCTG GAAGATCA	CCGTAGATGCAGGA GATTGATT	193
서열번호16	Methyltransferase domain-containing protein	CCGATCCAGTATGA GCACTATC	GAATGAGTTCAGCA CGTCGATC	267
서열번호17	Hypothetical protein	TGTCGAGGGCGTAT GATCAG	AAATGATGGTGAT TTCCCTGGT	174
서열번호18	Hypothetical protein	AGTACTTGTTTGAG TCTCACCC	CCAGTGACAGCAGG AATTTTTC	171
서열번호19	Flp family type IVb pilin	GGATAAGGCGAGAA TATTGGCA	GCAAAGAAATTTTCG CTTTCTGC	212
서열번호20	Metallophosphoesterase	CGAATTCAGATAGC GTCAGACT	TCGTAGAATTCGTG ATTACCCG	197
서열번호21	Hypothetical protein	GATTTGCACCGATT TTCTGCTC	CATCTTCTGGTAAT AGGCAGGC	297
서열번호22	Hypothetical protein	GTCTCTTTACGCGC AGATAGAG	CTTGTTGTCAGCCG TCGTATAAC	141
서열번호23	Phosphoesterase family protein	CATTTGCGGATCGA TCTCAATC	TTCGTTAGCCATGT AAGATCCC	243
서열번호24	AraC family transcriptional regulator	TCACGGTCTTTACG GATCAAAA	ATTGATGTTGTGCA AGGGAGTA	109
서열번호25	TagK domain-containi	GACGAAGGACAAGA ACATCGA	AGACTGATTAGGTG ATGTTCCG	180

	ng protein			
서열번호26	Hybrid sensor histidine kinase/respose regulator	AGTCGTTGAAATGA AGAAAGCC	CAGGTTCGATGTCGG TAATAACA	238
서열번호27	Hypothetical protein	TCTGGATTCCGGAA AATCGAAT	CTTCTACCAGACGG AAGGTTTC	113
서열번호28	Hypothetical protein	ACTGTTTTCTCTCGG CAGAATC	CTCTTTCAGGCGAA GATAGGC	161
서열번호29	Hypothetical protein	GTTTCGGATTCTGG CTGTCTT	CTTTGCGGCTGATA ATCGTAGT	102

표 23 비교유전체학적 접근을 통해 확보한 *B. gladioli* 프라이머 세트

다부처사업을 통해 개발된 미생물진단마커는 이전의 검출 프라이머세트들에 비해서 상대적으로 현저히 우수한 민감도를 나타내며, *B. glumae* 및 *B. gladioli*에만 특이적이며, 특히 벼 종자에 있는 *B. glumae* 및 *B. gladioli*를 일반 PCR로서 동시에 검출하는데 효과적인 도구로 작용할 수 있으며, 초기 검출을 통해 벼의 이삭마름병과 종자썩음병을 막고 벼 종자의 병원균 전염 여부를 판단하는데 중요한 역할과 예방 및 방제 기여 가능함.

(4) 미생물병발생기작 규명

seed-borne 식물병원성 세균인, *Burkholderia glumae*와 air-borne 식물병원성 곰팡이인, *Fusarium graminearum*의 상호작용은 *Burkholderia glumae*에 의해 생산되는 항미생물제어제인, toxoflavin이 있음에도 불구하고, 두 종간의 생존능력을 포함한 병징의 확산 및 발달을 증가시키고, *Burkholderia glumae*는 *Fusarium graminearum*에 물리적 접촉을 이용해 병징의 발생 정도를 빠르고 광범위하게 나타날 수 있음을 ‘Cooperative interactions between seed-borne bacterial and air-borne fungal pathogens on rice’ (저널명 : nature communications / 호: (2018) 9:31 / 게재년일 : 2018.01.02. /주저자: Boknam Jung /교신저자: Young-Su Seo & Jungkwan Lee /사사 개수: 2) 로 규명함

나. 기타 성과목표 및 결과

(1) 성과목표

<단위: 건 수>

성과목표	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화					기술인증	논문		학술발표	교육지도	인력양성	정책활용	홍보전시	기타	
	출원	등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI							
1차 년도	목표										2		2						
	실적										2		2		1				
2차 년도	목표	2									2		2						
	실적										4		3						
계		2									6		5		1				

(2) 결과

(가) 특허출원

No	발명의 명칭	발명자	출원번호	출원 일자	출원인 명칭
1	벼 종자에서 발견되는 병원균 <i>Burkholderia glumae</i> 및 <i>Burkholderia gladioli</i> 를 동시에 검출하기 위한 프라이머 세트	서영수 이채영 이현희	10-2018-0087480	2018. 07.27	부산대학교 산학협력단
2	protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물 병원성 그람음성 세균 억제용 약학 조성물 및 상기 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제의 스크리닝 방법	서영수 박정옥	10-2018-0089719	2018. 08.01	부산대학교 산학협력단

- ① 벼 종자에서 발견되는 병원균 *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 동시에 검출하기 위한 프라이머 세트
- ㉠ 본 발명은 벼 종자에서 발견되는 병원균 *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 동시에 검출하기 위한 프라이머에 관한 것으로, 보다 구체적으로 벼 종자의 전염성 병원균으로 알려진 *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 초기에 정확하고 효과적으로 검출하기 위해 비교 유전체학 접근 방식으로 PCR(Polymerase Chain Reaction)반응을 이용하여 쉽고 명확하게 *Burkholderia glumae* 및 *Burkholderia gladioli*를 동시에 검출하기 위한 프라이머에 관한 것이다.
- ① protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물 병원성 그람음성 세균 억제용 약학 조성물 및 상기 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제의 스크리닝 방법
- ㉠ 본 발명은 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물 병원성 그람음성 세균 억제용 약학 조성물 및 상기 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현에 의해 야기되는 식물 병원성 질환의 치료 또는 예방에 효과적이며, protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자를 특이적으로 선별하여 상기 식물 병원성 질환의 치료제 개발에 효과적일 수 있는 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물 병원성 그람음성 세균 억제용 약학 조성물 및 상기 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

(나) 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	국명	SCI (SCI/비SCI)	게재일
		발행기관			호	등록번호
1	Computational Identification and Comparative Analysis of Secreted and Transmembrane Proteins in Six Burkholderia Species	The plant pathology Journal	Thao Thi Nguyen	Korea	SCI	2017 1.5
		The Korean Society of Plant Pathology			33(2) : 148-162 (2017)	1598-2254
2	Cooperative interactions between seed-brone bacterial and air borne fungal pathogens on rice	Nature communications	Boknam Jung	Engla nd	SCI	2018 01.2
		Nature Pub. Group			(2018) 9:31	2041-1723
3	Genome-Wide Analysis of Type VI System Clusters and Effector in <i>Burkholderia</i> species	The plant pathology Journal	Thao Thi Nguyen,	Korea	SCI	2017 12.4
		The Korean Society of Plant Pathology			34 (1)	1598-2254
4	A midgut lysate of the <i>Riptortus pedestris</i> has antibacterial activity against LPS O-antigen-deficient <i>burkholderia</i> mutants	Developmental and Comparative Immunology	JANG, Ho Am	Engla nd	SCI	2017.1.5
		International Society of Developmental and Comparative			67	0145-305X
5	The roles of antimicrobial peptide, rip-thanatin, in the midgut of Riptortus pedestris.	Developmental and Comparative Immunology	Kyoung-Eun Park, Seong Han Jang	Engla nd	SCI	2017.09
		International Society of Developmental and Comparative			78	0145-305X
6	The lipopolysaccharide core oligosaccharide of <i>burkholderia</i> plays a critical role in maintaining a proper gut symbiosis with the bean bug Riptortus pedestris	The journal of biological chemistry	Kim, Jiyeun Kate & Jang, Ho Am	USA	SCI	2017 11.24
		The American Society for Biochemistry and Molecular Biology			292	1083-351X

(다) 학술발표

No	발표제목	발표자	발표일시	장소	국명
1	comparative genome and in planta transcriptome analyses of three different pathogenic bacteria	서 영 수	17.04.26	한국미생물학회	Korea
2	GENOME-WIDE AND COMPARATIVE ANALYSIS OF SECRETED AND TRANSMEMBRANE PROTEINS IN <i>BURKHOLDERIA</i> SPECIES	이 현 희	17.07.11.	유럽미생물학회	Spain
3	Characteriazation of <i>htg</i> genes in plant pathogen, <i>Burkholderia glumae</i> BGR1	김 지 은	17.09.15	Asian Conference on plant pathology	Korea
4	The Advantages of Toxoflavin in plant pathogenic <i>Burkholderia</i> spp. for plant interactions	서 영 수	18. 2. 2	2018 KSPB Winter Conference	Korea
5	Functional characterization of O-antigen in LPS of <i>Burkholderia glumae</i> BGR1 during infection into the plants	이 채 영	18.06.27	한국미생물 생명공학회	Korea

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표 및 목표달성여부

1. 연구개발목표의 달성도 및 자체평가

가. 제1세부 부산대학교 서영수

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
1차 년도 (2016)	<i>Burkholderia</i> 균주에 대한 비교 유전체 분석 및 식물과 곤충의 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석과 기존에 알려진 병원성 인자 비교 연구	식물 병원성 <i>B. gladioli</i> KACC11889의 완전 유전체 해독	NGS기반으로 <i>B. gladioli</i> KACC11889 genome sequencing 진행하였음.	<i>B. gladioli</i> KACC11889 유전체 해독 이외에 추가적으로 <i>Burkholderia</i> species를 유전체 해독함 (1차년도 2건, 2차년도 1건)	100%
		서로 다른 병원성을 가진 식물 병원균 <i>B. glumae</i> 와 <i>B. gladioli</i> 에 대한 비교 유전체 연구	2개의 식물병원성 <i>Burkholderia</i> (<i>B. glumae</i> BGR1, <i>B. gladioli</i> BSR3), 2개의 인간병원성 <i>Burkholderia</i> (<i>B. pseudomallei</i> K96243, <i>B. cepacia</i> LO6), 2개의 식물내성 <i>Burkholderia</i> (<i>Burkholderia</i> sp. KJ006, <i>B. phytofirmans</i> PsJN), 그리고 2개의 동물심바이오틱	<i>Burkholderia</i> species의 GC%를 확인함. 8개의 <i>Burkholderia</i> strains 모두 T2SS (type 2 secretion system)와 T6SS (type 6 secretion system) 시스템을 가지고 있었지만, T1SS와 T4의 경우에는 대부분이 가지고 않고 있기에, T2SS와 T6SS을 통해서 단백질들을 분비하여 <i>Burkholderia</i> strains에서 중요한 기능을 수행함을 확인하였음.	100%
		식물과 곤충의 <i>Burkholderia</i> species의 비교 유전체 연구	<i>Burkholderia</i> (<i>Burkholderia</i> sp. RPE64, <i>Burkholderia</i> sp. RPE67)을 포함한 8개의 <i>Burkholderia</i> strains에 대한 전체적인 유전체 분석함. 대표적인 병원성 인자 중의 하나인 bacterial secretion system (BSS)에 대한 8개의 <i>Burkholderia</i> strains에 대한 비교 분석함.		

		<p>다양한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석</p> <p>다양한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석</p>	<p><i>In vitro</i> 및 <i>in host</i>에서 분리 획득한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species에 대한 RNAseq 수행함.</p>	<p>RNAseq data를 이용해 Differentially expressed genes(DEGs) 분석 및 KEGG pathway 분석</p>	100%
<p>2차 년도 (2016)</p>	<p>비교 <i>in host</i> 전사체 연구 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i>의 새로운 병원성인자 발굴과 감염 기작 구명 및 진단 및 방제 기술 마련</p>	<p>식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i>의 비교 <i>in host</i> 전사체분석</p>	<p>식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i>의 전사체 분석으로 확보한 KEGG pathway enrichment, KEGG module enrichment를 통해서 <i>in host</i> 내의 발현패턴을 분석</p>	<p><i>B. glumae</i> BGR1에 비해 <i>Burkholderia</i> sp. RPE64가 conserved 혹은 unique하게 가지는 유전자들에서 EDG가 차지하는 비율이 50%이상으로 20%정도 BGR1보다 높음.</p>	100%
		<p>비교 <i>in host</i> 전사체 분석 및 비교 유전체 분석으로 선발된 식물 병원성 인자 후보 유전자가 결여된 돌연변이체 확립 및 병원성 실험</p>	<p>식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i>의 전사체분석을 통해 획득한 DEGs와 유전체정보를 기반으로 Orthologue를 분석하여 식물병원성 <i>Burkholderia</i>와 곤충 공생 <i>Burkholderia</i>의 공통적인 유전자와 차별적인 유전자를 전사체 수준에서 분석</p>	<p>비교 <i>in host</i> 전사체분석과 비교유전체 분석을 통해서 <i>B. glumae</i> BGR1의 병원성 유전자로서 Hfq의 특이성을 확인함.</p> <p>비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통해서 <i>B. glumae</i>와 RPE64의 공통적 및 차별적인 up regulated gene을 확보하여 돌연변이체를 확립</p> <p>T6SS 관련 돌연변이체 확립 및 병원성 실험</p>	100%

		<p>비교유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i>의 진단 및 제어 기술 개발</p>	<p>비교유전체학 분석으로 <i>B. glumae</i> 또는 <i>B. gladioli</i> 중의 대표적인 식물병원균은 두 병원균의 genome서열을 제외하고 재구성 된 NCBI의 비중복 DNA 서열 데이터베이스에 대하여 BLASTN을 통해 진단 프라이머를 검색하고, 다른 박테리아와 일치하는 유전자를 제거하기 위해, 추정 표적 유전자에 대해 쿼리 적용 범위(query coverage) 및 일치하지 않는 CDS를 포함하는 ID가 30% 미만인 CDS region을 선택함</p> <p>각 표적 종에 속하는 모든 균주에서 높은 상동성 유전자를 수집하기 위해 선택된 유전자를 사용하여 메가블라스트(Mega-blast) 검색을 수행하였음</p>	<p>종자에서 검출되는 <i>B. glumae</i>와 <i>B. gladioli</i>가 1g의 마른 벼 종자 당 각균의 양이 1.86×10^3~1.04×10^4개만 존재해도 검출되는 진단 프라이머 확보</p>	100%
--	--	---	--	--	------

나. 제2세부 부산대학교 이복률

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
1차 년도 (2016)	<p>전사체 분석을 통해 곤충 공생 <i>burkholderia</i>로부터 다양한 공생 인자의 발굴</p>	<p>동물 공생균인 <i>burkholderia</i>의 <i>in host</i> 전사체 분석</p> <p>배양 <i>burkholderia</i> sp. RPE64와 장내 공생균인 <i>burkholderia</i> sp. RPE64간의 유전자 발현패턴 비교 분석</p>	<p>곤충의 중장기관으로부터 장내 환경에 적응된 공생균인 <i>burkholderia</i>를 대량으로 획득함. <i>in vitro</i> 및 <i>in host</i>에서 획득된 공생 <i>burkholderia</i>로부터 total RNA를 추출하였음. 이를 바탕으로 RNAseq을 수행하였음. RNAseq data를 이용한 Differentially expressed genes(DEGs) 분석 및 KEGG pathway를 수행함.</p>	<p>총 6,732개의 유전자를 분석하였음. 이중 <i>in host burkholderia</i>에서는 1,853개의 유전자가 많이 발현됨. 이중 protein export와 관련된 유전자가 특이적으로 많이 발현됨.</p>	100%

		공생 <i>burkholderia</i> 를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명	세포벽 성분 중, O-antigen이 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용하여, 곤충의 방어물질을 screening함.	곤충의 중장기관에서 콩 유래의 Kunitz-type trypsin inhibitor를 찾았음. 이 물질이 O-antigen이 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 사멸시킨다는 것을 증명함. <i>Burkholderia</i> 의 LPS O-antigen은 중요한 공생인자임을 밝혀냄.	100%
2차 년도 (2016)	재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용한 공생기작의 규명 및 숙주와의 상호작용에 관여하는 특정유전자의 역할 규명	공생 인자가 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 의 제작	공생균인 <i>burkholderia</i> 에서 LPS core OS 생합성 유전자를 찾아본 결과, <i>wbiG</i> , <i>wabS</i> , <i>wabO</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> 가 있었다. 공생 관계에서 이 유전자들의 중요성을 알기 위하여, 이 결과를 기반으로 유전자 재조합법을 통한 각 유전자가 결여된 돌연변이 공생균주를 제작 하였다. 각 돌연변이 균주들의 LPS를 은 염색법을 통하여 염색 해 본 결과, 야생형 균주의 LPS와는 다르게 각 돌연변이 균주들은 LPS의 O-antigen부분이 없고 core OS부분이 야생형과 다르다는 사실을 알 수 있었다.	결과를 기반으로 유전자 재조합법을 통한 각 유전자가 결여된 돌연변이 공생균주를 제작함.	100%
		재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용한 공생 인자의 기능 규명	각 돌연변이 균주들의 LPS를 은 염색법을 통하여 염색 해 본 결과, 야생형 균주의 LPS와는 다르게 각 돌연변이 균주들은 LPS의 O-antigen부분이 없고 core OS부분이 야생형과 다르다는 사실을 알 수 있었다. 각 돌연변이 균주의 LPS 구조를 MALDI-TOF를 통하여 분석하였다. 그 결과, <i>waaC</i> 유전자는 heptosyltransferase I을 암호화 하는 유전자이며 이 유전자는 Kdo 단위체의 O-5 위치에 glycosylation을 시키는 기능을 한다는 것을 알아내었다.	공생균의 LPS core OS가 숙주 곤충이 중장에 공생을 하는데 중요한 역할을 한다는 내용을 전자체 분석 내용을 기반으로 한 돌연변이주를 이용하여 규명함	100%

		숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석	먼저 곤충 병원균인 <i>Pseudomonas entomophila</i> 를 타겟 균주로 선택하였다. 이 균주의 주요 독성인자를 발굴하기 위해서 유전학적 접근을 하였으나, 아직 밝혀지지 않은 바가 많아 생화학적인 접근을 통하여 독성인자를 밝혀내었다. 독성인자는 metalloprotease인 AprA로 밝혀졌고, 이 단백질은 숙주인 톱다리개미허리노린재의 면역반응을 억제시키며 숙주 곤충을 효율적으로 사멸시켰다.	AprA 유전자 결손 돌연변이 균주가 숙주 곤충에 대해 현저히 떨어진 독성을 나타낸다는 것을 보임으로써, AprA가 중요한 독성 인자임을 증명함.	100%
--	--	-------------------------------	--	---	------

다. 용역 (루이지애나 주립대학교 함중현)

구분 (연도)	계약건명	세부연구목표	연구개발 수행 내용	연구결과	달성도
1차 년도	식물_미생물과 곤충_미생물 상호작용에 대해 비교 유전체 및 비교 <i>in host</i>	병원성 및 비병원성 균주들의 유전체 염기서열 분석을 통해서 발견된 후보 유전자 중 2개의 유전자의 병원성 기능 유전자 규명	병원성 및 비병원성 균주들의 유전체 염기서열 분석을 통하여 병원성 기능 유전자 후보군 스크리닝 수행	2개의 병원성 기능 유전자 확인(SLM11, LSUPB467)	100%
2차 년도	전사체 분석을 통해 새로운 병원성 인자 발굴	<i>Burkholderia glumae</i> 유전체 염기서열 분석을 통해서 발견된 후보 유전자의 동정과 기능분석	1차년도에 확보된 2개의 병원성 유전자의 돌연변이체 제작 및 표현형 분석	2개의 유전자가 결실된 돌연변이에서 병원성 표현형이 감소함을 확인하고, 조절 메카니즘 규명	100%

2절. 목표 달성여부

1. 성과목표별 가중치

성과지표명	목표	목표달성 여부	가중치	달성률(%)	의견
유용유전자원 확보	5	6	15	120	
표준유전체해독	2	3	15	150	기존의 목표를 초과달성함
미생물진단마커 개발	2	2	10	100	개발된 미생물진단마커로 특허출원
미생물병발생 기작규명	1	1	20	100	식물병원성균의 복합감염에 대한 연구로 Nature communication에 논문 투고
특허출원	2	2	10	100	
SCI 논문 게재	4	6	20	150	6편의 논문 중 4편이상 상위 저널에 게재하며, 초과달성률을 보임
학술발표	4	4	10	100	

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1절. 연구 성과의 활용분야

1. 동·식물 공통 병원균인 *Burkholderia*에서 발견되는 특정 병원성 유전인자의 진화론적인 근연관계의 규명을 통한 식물미생물 그리고 동물미생물이 숙주와 상호작용에 있어서 공통점과 차이점을 규명하여 특이적 및 공통적 감염기작의 연구에 활용
2. 식물병원성 *Burkholderia glumae*가 일으키는 복합감염기작을 규명하여 이를 통해 친환경 농업 등에서 빈발하는 복합감염의 방제에 기초자료로 활용
3. 비교전사체 데이터베이스 구축을 통해 작물 생산량 증가 및 병충 저항성 식물개발을 위한 단계로 진입할 수 있는 토대를 제공가능

2절. 연구 성과의 활용방안

1. 다양한 *Burkholderia* species의 비교유전체 분석을 통한 종자검역에 필요한 진단키트의 개발에 필요한 기초자료로 활용
2. 본 연구 결과를 통해 집적된 자료는 국내외 저명 학술지에 발표하고 특허 출원을 통한 지적재산권을 확보
3. 본 연구진은 각각의 연구팀이 보유한 핵심기술과 연구능력의 융합을 통하여, 현장에서 필요로 하는 유용유전자원의 발굴 및 분석에서부터 산업 핵심기술로의 응용까지 아우를 수 있는 연구를 수행하였으며, 이러한 연구기술의 융합 결과는 향후 산업전반에 있어서 훌륭한 연구모델로써 자리매김 가능한 부분을 통해 부처간 협력을 통한 연구효율의 증대 및 시너지 효과 창출

3절. 추가 연구의 필요성

1. 곤충과 식물을 포함한 숙주와 미생물간의 상호작용 연구를 위한 기능유전체학적 비교분석을 통해 숙주의 측면에서 바라보고 식물병원성 *Burkholderia*의 병원성인자를 극복할 수 있는 벼의 생리학적 변화와 저항성유전인자의 발굴하고, 공생 *Burkholderia*와의 공존으로 톱다리개미허리노린재의 생리학적 이익과 공생균을 선별 가능하게 하는 톱다리개미허리노린재의 공생기작 규명을 통해 친환경농업에 적용하여 고수율의 작물재배를 위한 응용 자료로 적용 가능

붙임. 참고문헌

1. Shibata, Tomoko F., et al. "Complete genome sequence of *Burkholderia* sp. strain RPE64, bacterial symbiont of the bean bug *Riptortus pedestris*." *Genome announcements* 1.4 (2013): e00441-13.
2. Kinoshita, Yoshiaki, et al. "Unforeseen swimming and gliding mode of an insect gut symbiont, *Burkholderia* sp. RPE64, with wrapping of the flagella around its cell body." *The ISME journal* 12.3 (2018): 838.
3. Kim, Jiyeun Kate, Ha Young Park, and Bok Luel Lee. "The symbiotic role of O-antigen of *Burkholderia* symbiont in association with host *Riptortus pedestris*." *Developmental & Comparative Immunology* 60 (2016): 202-208.
4. Kim, Jiyeun Kate, et al. "Understanding regulation of the host-mediated gut symbiont population and the symbiont-mediated host immunity in the *Riptortus-Burkholderia* symbiosis system." *Developmental & Comparative Immunology* 64 (2016): 75-81.
5. Lee, Jun Beom, et al. "Bacterial cell motility of *Burkholderia* gut symbiont is required to colonize the insect gut." *FEBS letters* 589.19 (2015): 2784-2790.
6. Kim, Jiyeun Kate, et al. "*Burkholderia* gut symbionts enhance the innate immunity of host *Riptortus pedestris*." *Developmental & Comparative Immunology* 53.1 (2015): 265-269.
7. Byeon, Jin Hee, et al. "A specific cathepsin-L-like protease purified from an insect midgut shows antibacterial activity against gut symbiotic bacteria." *Developmental & Comparative Immunology* 53.1 (2015): 79-84.
8. Kim, Jiyeun Kate, et al. "Insect gut symbiont's susceptibility to host antimicrobial peptides caused by alteration of bacterial cell envelope." *Journal of Biological Chemistry* (2015): jbc-M115.
9. Skaljic, Marisa, et al. "Fitness costs of infection with *Serratia symbiotica* are associated with greater susceptibility to insecticides in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*." *Pest management science* (2018).
10. Kim, Jiyeun Kate, et al. "Molting-associated suppression of symbiont population and up-regulation of antimicrobial activity in the midgut symbiotic organ of the *Riptortus - Burkholderia* symbiosis." *Developmental & Comparative Immunology* 43.1 (2014): 10-14.

11. Kim, Jiyeun Kate, et al. "Purine biosynthesis-deficient *Burkholderia* mutants are incapable of symbiotic accommodation in the stinkbug." *The ISME Journal* 8.3 (2014): 552.
12. Kim, Jiyeun Kate, et al. "A specified midgut region controlling the symbiont titer in an insect-microbe gut symbiotic association." *Applied and environmental microbiology* (2013): AEM-02152.
13. Kim, Jiyeun Kate, et al. "The bacterial cell wall synthesis gene *uppP* is required for *Burkholderia* colonization of the stinkbug gut." *Applied and environmental microbiology* (2013): AEM-01269.
14. Kim, Jiyeun Kate, et al. "Polyester synthesis genes associated with stress resistance are involved in an insect - bacterium symbiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.26 (2013): E2381-E2389.
15. Genome-Wide Analysis of Type VI System Clusters and Effectors in *Burkholderia* Species, *The Plant Pathology Journal*, 34(1) : 11-22 (2018)
16. Cooperative interactions between seed-borne bacterial and air-borne fungal pathogens on rice. *NATURE COMMUNICATIONS*. DOI: 10.1038/s41467-017-02430-2
17. Comparative and bioinformatics analyses of pathogenic bacterial secretomes identified by mass spectrometry in *Burkholderia* species. *Journal of Microbiology*. 55(7): 568-582 (2017)
18. Understanding the direction of evolution in *Burkholderia glumae* through comparative genomics. *Current Genetics* (2016) 62:115 - 123
19. Jeong, Yeonhwa, et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." *Plant disease* 87.8 (2003): 890-895.
20. Kang, Yongsung, and Ingyu Hwang. "Glutamate uptake is important for osmoregulation and survival in the rice pathogen *Burkholderia glumae*." *PloS one* 13.1 (2018): e0190431.
21. Riera-Ruiz, Carlos, et al. "Interactions of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* in symptom development in rice seeds and seedlings." *Canadian Journal of Plant Pathology* just-accepted (2018).
22. Choi, Ji-Eun, et al. "Isolation and characterization of a novel metagenomic enzyme capa

- ble of degrading bacterial phytotoxin toxoflavin." PLoS one 13.1 (2018): e0183893.
23. Kang, Yongsung, et al. "Critical role of quorum sensing-dependent glutamate metabolism in homeostatic osmolality and outer membrane vesiculation in *Burkholderia glumae*." Scientific Reports 7 (2017): 44195.
 24. Mulaw, Temesgen, Yeshe Wamishe, and Yulin Jia. "Characterization and in Plant Detection of Bacteria That Cause Bacterial Panicle Blight of Rice." American Journal of Plant Sciences 9.04 (2018): 667.
 25. Fenwick, Michael K., et al. "*Burkholderia glumae* ToxA is a dual-specificity methyltransferase that catalyzes the last two steps of toxoflavin biosynthesis." Biochemistry 55.19 (2016): 2748-2759.
 26. Jung, Da Hye, et al. "Production of p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by *Burkholderia glumae* BGR1." Biotechnology and bioengineering 113.7 (2016): 1493-1503.
 27. Jang, Moon Sun, et al. "Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*." PLoS One 9.1 (2014): e84831.
 28. Chen, Ruoxi, Inderjit K. Barphagha, and Jong Hyun Ham. "Identification of potential genetic components involved in the deviant quorum-sensing signaling pathways of *Burkholderia glumae* through a functional genomics approach." Frontiers in cellular and infection microbiology 5 (2015): 22.
 29. Sharma, Shailendra, et al. "Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells." The Plant Journal 74.4 (2013): 701-712.
 30. Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2016) 17(1), 65 - 76
 31. Investigation of Quorum Sensing-Dependent Gene Expression in *Burkholderia gladioli* BSR3 through RNA-seq Analyses. J. Microbiol. Biotechnol. (2014), 24(12), 1609 - 1621
 32. Bacterial quorum sensing and metabolic slowing in a cooperative population. PNAS October 14, 2014 vol. 111 no. 41 14912-14917
 33. Complete genome sequence of *Burkholderia gladioli* BSR3. J Bacteriol 193:3149

34. Kuang, Weigang, et al. "Development of a Real time Fluorescence Loop mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*." *Journal of Phytopathology* 165.2 (2017): 82-90.
35. Zhou, F., et al. "*Burkholderia gladioli* infection isolated from the blood cultures of newborns in the neonatal intensive care unit." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34.8 (2015): 1533-1537.
36. Chen, Xiang, et al. "Efficient biosynthesis of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutyrate using a stereoselective carbonyl reductase from *Burkholderia gladioli*." *BMC biotechnology* 16.1 (2016): 70.
37. Ross, Claudia, et al. "Biosynthesis of antifungal and antibacterial polyketides by *Burkholderia gladioli* in coculture with *Rhizopus microsporus*." *Mycoses* 57 (2014): 48-55.
38. Kajiwara, Hideyuki. "Direct detection of the plant pathogens *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, and *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* in infected rice seedlings using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Journal of microbiological methods* 120 (2016): 1-5.
39. Mazer, Dale M., et al. "*In vitro* activity of ceftolozane-tazobactam and other antimicrobial agents against *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2017): AAC-00766.
40. Catter, Karla Maria, et al. "Biosurfactant production by *pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia gladioli* isolated from mangrove sediments using alternative substrates." *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* 8.5 (2016): 269-275.
41. Mano, E. T., et al. "First Description of Necrosis in Leaves and Pseudobulbs of *Oncidium* Orchids Caused by *Burkholderia gladioli* in São Paulo State, Brazil." *Plant Disease* 99.11 (2015): 1642-1642.
42. Elshafie, Hazem S., et al. "*In vitro* study of biological activity of four strains of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* and identification of their bioactive metabolites using GC - MS." *Saudi journal of biological sciences* 24.2 (2017): 295-301.
43. Rombola, Tiago Henrique, et al. "Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*." *BMC research notes* 7.1 (2014): 221.
44. Kikuchi, Yoshitomo, Takahiro Hosokawa, and Takema Fukatsu. "An ancient but

promiscuous host - symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts." *The ISME journal* 5.3 (2011): 446.

45. Kikuchi, Yoshitomo, Xian-Ying Meng, and Takema Fukatsu. "Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae)." *Applied and Environmental Microbiology* 71.7 (2005): 4035-4043.

46. Takeshita, Kazutaka, and Yoshitomo Kikuchi. "*Riptortus pedestris* and *Burkholderia* symbiont: an ideal model system for insect - microbe symbiotic associations." *Research in microbiology* 168.3 (2017): 175-187.

47. Ruiu, Luca. "Insect pathogenic bacteria in integrated pest management." *Insects* 6.2 (2015): 352-367.

48. Coenye, Tom, and Peter Vandamme. "Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches." *Environmental Microbiology* 5.9 (2003): 719-729.

49. Engel, Philipp, and Nancy A. Moran. "The gut microbiota of insects - diversity in structure and function." *FEMS microbiology reviews* 37.5 (2013): 699-735.

50. Kim, Jinwoo, et al. "Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*." *Molecular microbiology* 64.1 (2007): 165-179.

51. Cho, Hyun-Soo, et al. "Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium." *FEMS microbiology ecology* 60.1 (2007): 14-23.

52. Costa, S. G. V. A. O., E. Déziel, and F. Lépine. "Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*." *Letters in applied microbiology* 53.6 (2011): 620-627.

53. Mitchell, Robin E., David R. Greenwood, and Vijayalekshmi Sarojini. "An antibacterial pyrazole derivative from *Burkholderia glumae*, a bacterial pathogen of rice." *Phytochemistry* 69.15 (2008): 2704-2707.

54. Nickzad, Arvin, François Lépine, and Eric Déziel. "Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids." *PLoS One* 10.6 (2015): e0128509.

55. Nandakumar, Rangaraj, et al. "*Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial

- panicle blight in rice in the southern United States." *Plant Disease* 93.9 (2009): 896–905.
56. Nandakumar, R., M. C. Rush, and F. Correa. "Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama." *Plant Disease* 91.6 (2007): 767–767.
57. Wagner, Ulrike G., et al. "EstB from *Burkholderia gladioli*: A novel esterase with a β lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and β lactam cleaving activity." *Protein science* 11.3 (2002): 467–478.
58. Whitby, Paul W., et al. "Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*." *Journal of clinical microbiology* 38.1 (2000): 282–285.
59. Maeda, Yukiko, et al. "Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using gyrB and rpoD sequences." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56.5 (2006): 1031–1038.
60. Song, Lijiang, et al. "Discovery and biosynthesis of gladiolin: a *Burkholderia gladioli* antibiotic with promising activity against *Mycobacterium tuberculosis*." *Journal of the American Chemical Society* 139.23 (2017): 7974–7981.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 식물_미생물과 곤충_미생물 상호작용에 대해 비교 유전체 및 비교 in host 전사체분석을 통한 새로운 병원성 인자 발굴 및 응용				
	(영문) Comparative analyses of genome and in host transcriptome between plant-microbe and insect-microbe interactions to identify new virulence factors and its application				
주관연구기관	부산대학교		주 관 연 구	(소속) 부산대학교	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 서 영 수	
총연구개발비 (400,000천원)	계	400,000 천원	총 연 구 기 간	2016.08. ~ 2018.08.(1년10개월)	
	정부출연 연구개발비	400,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	13
	기업부담금			내부인원	12
	연구기관부담금			외부인원	1

○ 연구개발 목표 및 성과

동·식물 공통 병원균인 *Burkholderia*를 사용하여, 비교유전체, 비교 *in host* 전사체 및 생물정보학을 기반으로 하여 “*Burkholderia*의 기주 특이성을 결정하는 특정 유전인자를 규명”하고, “병원균과 공생균을 결정하는 신규 유전자원을 발굴”하고 대용량 기능유전체학적 방법을 통하여 “*Burkholderia*의 종에 따른 진화론적 관계를 설명”하고, 최종적으로는 “*Burkholderia*의 병 전염경로와 병 발생 기작에 대한 규명하고, 이를 통한 진단 및 친환경적 방제 기술을 마련”을 하고자 한다.

○ 연구내용 및 결과

- 다양한 *Burkholderia* species의 유전체 분석을 통해 진화론적 관계를 설명하고, 이를 진단할수 있는 병원성미생물진단마커프라이머를 개발하여 특허출원하였으며, 비교유전체분석의 결과로 *B.glumae* BGR1의 특이적인 hfq 유전자의 기능을 연구하여, Hfq 단백질의 다양한 기능을 표현형 분석을 통해 확인하였음.
- 또한, 식물병원성 *B. glumae* BGR1의 T6SS의 재조합변이 균주를 통해 기능을 규명함.
- 비교 *in host* 전사체 분석을 통해, 식물 병원성 *Burkholderia glumae* BGR1과 곤충 공생 *Burkholderia* sp. RPE64의 공통적인 up-regulated pathway를 확인하여 돌연변이주를 제작하였음. 특히, 공통적 pathway에서 sulfate transport system 구성요소 중 *cysW* 변이 돌연변이주에서 병원성이 감소함을 보였다.
- 세계최초로 벼에 *Burkholderia glumae*와 *Fusarium gramineum*의 복합감염하는 기작을 규명함.
- 곤충 공생 *burkholderia*의 *in vitro* 및 *in host* 유전자 발현패턴 비교 분석을 통해 공생균이 증식하고 있는 환경조건 (*in vitro* 또는 *in host*)에 따라서 특이적으로 발현되거나 억제되고 있는 유전자군을 탐색하였음.
- 공생 *burkholderia*를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명을 위해서 곤충의 중장기관에서 콩 유래의 Kunitz-type trypsin inhibitor를 찾았고, 이 물질이 O-antigen이 결합된 재조합 변이 공생 *burkholderia*를 사멸시킨다는 것을 증명하여 *Burkholdeora*의 LPS O-antigen은 중요한 공생인자임을 밝혀냄. 이외에도 전사체 분석 내용을 기반으로한 공생 인자인, *wbiG*, *wabS*, *wabO*, *waaC*, *waaF*가 결합된 재조합 변이 공생 *burkholderia*의 제작하였고, 재조합 변이 공생 *burkholderia*를 이용한 공생 인자가 공생균의 LPS core OS가 숙주 곤충이 중장에 공생을 하는 데 중요한 역할을 한다는 내용을 돌연변이주를 이용하여 규명함.
- 특히, *in host* 전사체 분석을 이용해서, 숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석을 수행해서 *AprA* 유전자 결손 돌연변이 균주가 숙주 곤충에 대해 현저히 떨어진 독성을 나타낸다는 것을 보임으로써, *AprA*가 중요한 독성 인자임을 증명함.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 동·식물 공통 병원균인 *Burkholderia*에서 발견되는 특정 병원성 유전인자의 진화론적인 근연관계의 규명을 통한 식물미생물 그리고 동물미생물이 숙주와 상호작용에 있어서 공통점과 차이점을 규명하여 특이적 및 공통적 감염기작의 연구에 활용
- 식물병원성 *Burkholderia glumae*가 일으키는 복합감염기작을 규명하여 이를 통해 친환경농업 등에서 빈발하는 복합감염의 방제에 기초자료로 활용
- 독성인자인 *AprA*를 공생균인 *burkholderia*에서 과발현시켜 자연친화적인 해충방제를 미생물학적 관점에서 해결 할 수 있는 기초 자료 제공

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		916009-2	
사업구분	포스트게놈 다부처 유전체 사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	포스트게놈 다부처유전체 사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	식물_미생물과 곤충_미생물 상호작용에 대해 비교 유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체분석을 통한 새로운 병원성 인자 발굴 및 응용			과제유형	기초
연구기관	부산대학교			연구책임자	서영수
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.11.07.~ 2017.08.22	200,000천원		200,000천원
	2차년도	2017.08.23.~ 2018.08.22	200,000천원		200,000천원
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 18.10.19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
부산대학교	부교수	서영수

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 서 영 수

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	서영수
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수함

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우수함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주 우수함

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
식물 병원성 <i>B. gladioli</i> KACC11889의 완전 유전체 해독	5	100	목표 달성함
서로 다른 병원성을 가진 식물 병원균 <i>B. glumae</i> 와 <i>B.</i> <i>gladioli</i> 에 대한 비교 유전체 연구	7.5	100	목표 달성함
식물과 곤충의 <i>Burkholderia</i> species의 비교 유전체 연구	7.5	100	목표 달성함
다양한 벼 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 <i>in host</i> 전사체 분석	7.5	100	목표 달성함
식물병원성 <i>Burkholderia</i> 와 Bean-bug 공생 <i>Burkholderia</i> 의 비교 <i>in host</i> 전사체분석	7.5	100	목표 달성함
비교 <i>in host</i> 전사체 분석 및 비교 유전체 분석으로 선발된 식물 병원성 인자 후보 유전자가 결여된 돌연변이체 확립 및 병원성 실험	10	100	목표 달성함
비교유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 식물 병원성 <i>Burkholderia</i> 의 진단 및 제어 기술 개발	5	100	목표 달성함
동물 공생균인 <i>burkholderia</i> 의 <i>in</i> <i>host</i> 전사체 분석	7.5	100	목표 달성함
배양 <i>burkholderia</i> sp. RPE64와 장내 공생균인 <i>burkholderia</i> sp. RPE64간의 유전자 발현패턴 비교 분석	7.5	100	목표 달성함
공생 <i>burkholderia</i> 를 선별하기 위한 숙주의 방어 기작 규명	10	100	목표 달성함
공생 인자가 결여된 재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 의 제작	10	100	목표 달성함
재조합 변이 공생 <i>burkholderia</i> 를 이용한 공생 인자의 기능 규명	7.5	100	목표 달성함
숙주-공생균의 상호작용에 따른 특정 인자의 발현 분석	7.5	100	목표 달성함
합계	100	100	목표 완료함

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

다양한 *Burkholderia* species의 유전체 분석결과 식물 병원성 *Burkholderia glumae* BGR1의 다양한 새로운 식물 병원성 인자를 발굴과 새로운 병원성 기작을 규명하였으며, 정량적 및 정성적 성과를 100% 이상으로 초과달성함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해당 사항 없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

동·식물 공통 병원균인 *Burkholderia*에서 발견되는 특정 병원성 유전인자의 진화론적인 근연관계의 규명을 통한 식물미생물 그리고 동물미생물이 숙주와 상호작용에 있어서 공통점과 차이점을 규명하여 특이적 및 공통적 감염기작의 연구에 활용하며, 식물병원성 *Burkholderia glumae*가 일으키는 복합감염기작을 규명하여 이를 통해 친환경농업 등에서 빈발하는 복합감염의 방제에 기초자료로 활용 가능하고, 비교전사체 데이터베이스 구축을 통해 작물 생산량 증가 및 병충 저항성 식물개발을 위한 단계로 진입할 수 있는 토대를 제공가능

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기초	
연구과제명	식물_미생물과 곤충_미생물 상호작용에 대해 비교 유전체 및 비교 <i>in host</i> 전사체 분석을 통한 새로운 병원성 인자 발굴 및 응용			
주관연구기관	부산대학교		주관연구책임자	서 영 수
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	400,000 천원			400,000 천원
연구개발기간	2016. 11. 07 - 2018. 8. 22 (22개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 유용유전자원 확보 5건	비교유전체분석 및 비교 <i>in host</i> 전사체분석을 통해 확보한 식물병원성 <i>Burkholderia</i> 의 병원성인자와 곤충 공생 <i>Burkholderia</i> 의 공생인자를 암호화하는 유용유전자원 6건 확보로 초과달성함.
② 표준유전체해독 2건	다양한 병원성 <i>Burkholderia</i> species의 완전 유전체 해독 3건으로 초과달성함.
③ 미생물병발생기작규명 1건	‘Cooperative interactions between seed-borne bacterial and air-borne fungal pathogens on rice’ (저널명: nature communications/호: (2018) 9:31 /게재년일: 2018.01.02./주저자:Boknam Jung /교신저자:Young-Su Seo & Jungkwan Lee/사사개수: 2)를 발표함으로써 ed-borne 식물병원성 세균인, <i>Burkholderia glumae</i> 와 air-borne 식물병원성 곰팡이인, <i>Fusarium graminearum</i> 의 상호작용은 두 종간의 생존능력을 포함한 병징의 확산 및 발달을 증가시키고 병징의 발생 정도를 빠르고 광범위하게 나타낼 수 있음을 밝히며, 동시에 복합감염을 일으키는 기작을 세계최초로 밝혀 부산일보를 비롯하여 여러 언론매체에 보도되었으며, 이를 통해 친환경농업 등에서 빈발하는 복합감염의 방제에 기초를 제공할 것으로 우수성을 평가받음.
④ 특허출원 2건	벼 종자에서 발견되는 병원균 <i>Burkholderia glumae</i> 및 <i>Burkholderia gladioli</i> 를 동시에 검출하기 위한 프라이머 세트와 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물병원성 그람음성 세균 억제용 약학 조성물 및 상기 protocatechuate 3,4-dioxygenase 유전자 발현 억제제의 스크리닝 방법에 대한 특허출원함.
⑤ SCI 논문 게재 4건	총 6편의 논문 중 4편이상 상위 저널에 게재하며, 초과달성률을 보임
⑥ 미생물진단마커 개발 2건	벼 종자에서 발견되는 병원균 <i>Burkholderia glumae</i> 및 <i>Burkholderia gladioli</i> 를 동시에 검출하기 위한 진단프라이머 개발
⑦ 학술발표 4건	국외 및 국내 학술발표 4건 달성함.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용 화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		5		2				2		1
연구기간 내 달성실적		6		3				2		1
달성율(%)		120		150				100		100

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	2건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	4건	건	4건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2											4		4						
연구기간내 달성실적	2											6		4						
달성율(%)	100											100		100						

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	고농도 양질의 Bacteria RNA를 획득하기 위한 Bacterial mRNA enrichment 기술
②	식물병원성균의 복감감염기작 규명 기술
③	<i>in host</i> RNAseq 기술
④	비교 <i>in host</i> 전사체 분석 기술
⑤	비교유전체학을 바탕으로 미생물진단마커개발
⑥	장내 공생균의 숙주 장내 colonization에 필요한 인자 규명 및 그 작용 기작 규명 기술
⑦	장내 공생균 배양 기술
⑧	장내 공생균 인자 정제기술

	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	증	논문		논문평균IF	학술발표	도	성	정책활용	홍보전시	구활용등)
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건			명		
가중치																				
최종목표																				
연구기간내 달성실적																				
연구종료후 성과창출 계획																				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)