



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월09일

(11) 등록번호 10-1500046

(24) 등록일자 2015년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/14 (2006.01) *C12P 17/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0152585

(22) 출원일자 2012년12월24일

심사청구일자 2012년12월24일

(65) 공개번호 10-2014-0082510

(43) 공개일자 2014년07월02일

(56) 선행기술조사문헌

[곰팡이 병원성 연구센터, 2012년 8월]

*Gibberella zeae*의 G 단백질 신호 전달 조절 유전자 기능연구.

KR100777229 B1

Microbiology, 2008 February; 154(Pt 2): 392401.

GENTAUR. Publication Date : 2012/07/03

전체 청구항 수 : 총 5 항

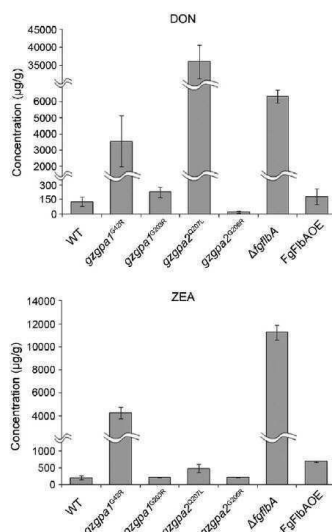
심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 **g z g p a 2 유전자의 치환된 돌연변이 균주 및 이를 이용한 진균독소 생산방법**

(57) 요약

본 발명은 지베렐라 지에서 G 단백질 신호전달의 조절자인 *gzgpa2* 유전자의 치환된 돌연변이 균주(*gzgpa2*^{Q207L}) 및 이 균주를 이용한 진균독소 생산방법에 관한 것이다. 본 발명은 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주, 특히 상기 균주는 기탁번호 KCTC 12244BP 인 것을 특징으로 하는 균주에 관한 것이다. 또한 본 발명은 지베렐라 지에서 G 단백질 신호전달의 조절자인 *gzgpa2* 유전자의 치환된 돌연변이 균주(*gzgpa2*^{Q207L}) 또는 상기 균주가 기탁번호 KCTC 12244BP 인 것을 특징으로 하는 균주를 이용한 진균독소 생산방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 진균독소가 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON) 또는 제아랄레논(zearalenone; ZEA)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 진균독소가 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(72) 발명자

민경훈

서울 서초구 방배로23길 55, 101호 (방배동)

손호경

서울 관악구 신림로11길 110, 1층 (신림동)

특허청구의 범위

청구항 1

g zgpa2 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서 상기 균주는 기탁번호 KCTC 12244BP 인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항중의 어느 한 항의 *G. zeae* 균주를 이용한 진균독소 생산 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 진균독소는 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON) 또는 제아랄레논(zearalenone; ZE A)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 진균독소는 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 지베렐라 지에에서 지베렐라 지에에서 G 단백질 신호전달의 조절자인 *g zgpa2* 유전자의 치환된 돌연변이 균주(*g zgpa2*^{0207L}) 및 이 균주를 이용한 진균독소 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자낭균인 *Gibberella zeae*(무정형 *Fusarium graminearum*)은 전세계적인 시리얼(cereal) 작물의 맥류 붉은 곰팡이병(Fusarium head blight; FHB)의 가장 일반적인 원인 물질이다(Leslie and Summerell, 2006). FHB는 마이토톡신을 갖는 시리얼을 포함하여 곡물의 수율 및 품질을 축소시킴으로써 주요한 곡물 손실을 야기한다. *G. zeae*에 의해 생산된 주요한 마이토독소는 트라이코테센 디옥시니발레놀(trichothecene deoxynivalenol; DON) 및 에스트로젠성 독소 제랄레논(zearalenone; (ZEA)이고 이들 모두가 인간 및 가축에 유해하다(Desjardins, 2006). FHB의 제 1차 및 2차 접종원으로서, *G. zeae*는 자낭 포자(유식 포자) 및 분생자(무성 포자)를 각각 생산한다.

[0003] *Aspergillus nidulans*에서, 무성적 발달은 대개 스테리그마토시스틴(sterigmatocystin; ST) 생산에 의해 수반되고 이 과정들은 G 단백질 신호전달 경로에 의해 조절된다(Hicks et al., 1997). G 단백질 신호전달은 진핵생물에서 잘 연구되어있고, 곰팡이에서 다양한 짝짓기, 발생, 2차적 물질 대사 및 병원성을 포함하는 다양한 세포 작용을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다(reviewed in Bolker, 1998). 헤테로머인 G 단백질은 Ga, Gb 및 Gc 서브유닛으로 구성되어있고 트랜스멤브레인 G 단백질 커플링 리셉터(G protein coupled receptors; GPCR)들과 유사분열 물질(mitogen)-활성화 단백질 카이네이즈(mitogen-activated protein kinases), 아데닐 사이클레이즈-cAMP 의존성 단백질 카이네이즈, 이온 채널 및 포스포리페이즈(phospholipases)와 같은 세포내 효과기(intracellular effector) 간의 신호 전달을 매개한다(Neer, 1995; Neves et al., 2002; Simon et al., 1991).

[0004] G 단백질 신호전달의 조절자(Regulator of G protein signaling; RGS) 단백질은 Ga 서브유닛과 상호작용을 하는 보존된 RGS 아미노산 도메인을 갖는다. 이 상호작용은 Ga 서브유닛의 본질적인 GTPase 활성을 아주 용이하게 해주고 활성화된 G 단백질 신호를 빠르게 턴오프(turn off)시키고, 그렇게 함으로써 G 단백질 신호전달을 조절한다(Chidiac and Roy, 2003).

[0005] G 단백질 신호 전달을 GTPase-가속 단백질(GTPase-accelerating protein; GAP) 활성을 통해서 직접 억제하는

것 뿐만 아니라, RGS 단백질은 리셉터, G 단백질 또는 다른 조절 분자를 위한 효과기, 효과기 안타고니스트(effector antagonists) 및 지지체 단백질로 작용함으로써 또한 G 단백질 신호전달 경로를 향상시킬 수 있다(Ballon et al., 2006; Chen 및 Hamm, 2006; Zhong 및 Neubig, 2001). Gα 서브유닛에서 아미노산 치환 및 RGS 유전자 파괴의 연구는 곰팡이에서 G 단백질 신호전달 메커니즘 및 RGS 단백질의 새로운 기능에 대한 추가적 통찰력을 제공했다(Hicks et al., 1997; Miyajima et al., 1989; Yu et al., 1996; Zhang et al., 2011). *A. nidulans*에서, FlbA는 균사 증식을 음성적으로 조절할 수 있고 스테리그마토시스틴(sterigmatocystin; ST) 생산 및 분생자 형성을 활성화할 수 있다(Yu, 2006). *A. nidulans*의 RgsA는 스트레스 반응 및 분생자 발아를 하향 조절하지만, ST 생산 및 분생자 발아를 자극한다(Han et al., 2004). 게다가, 벼열도병 곰팡이(rice blast fungus)인 *Magnaporthe oryzae*에서, Rgs10가 병독성, 무성적 발달 및 굴측성(thigmotropism)을 조절한다는 것이 밝혀졌고(Liu et al., 2007) *F. verticillioides*에서 FlbA2 및 RgsB는 모두 영양 생장 및 퓨모니신 B1(fumonisin B1)을 조절하는데 필요하다(Mukherjee et al., 2010).

[0006] 본 발명자들의 식물병원성 곰팡이인 *G. zeae*에 대한 기존 연구에서, 3개의 추정상의 Gα 단백질 암호화 유전자인 *GzGPA1*, *GzGPA2* 및 *GzGPA3*를 각각 결실(deletion)시켰다(Yu et al., 2008). *GzGPA1*를 결실시켰을 때, 자성 불임성(female sterility)이 절충되었고 마이토크신 생산이 향상되었다. *GzGPA2*가 결실되었을 때, 병독성은 감소되었고 세포벽에서의 키틴 축적은 증가했다. 그러나 *GzGPA3* 널(null) 돌연변이는 표현형 변화를 전혀 나타내지 않았다. Gα 서브유닛과의 상호작용을 통한 세포내 신호전달의 음성 조절자로서 RGS 단백질의 주요한 기능이 다른 곰팡이에서 증명되었다 하더라도, *G. zeae*에서의 RGS 단백질의 기능은 상세히 알려지지 않았다.

[0007] 따라서, 본 발명에서는 *G. zeae*에서로부터 얻은 7개의 RGS 유전자의 특성을 규명했고 G 단백질 신호전달 경로에서 FgFlbA의 기계적 역할을 Gα 단백질의 위치지정 돌연변이 및 FgFlbA 유전자의 과발현 연구에 의해서 연구했다. 본 발명의 실험결과들은 FgFlbA가 *G. zeae*의 *GzGPA2*-의존적 신호전달 경로를 통해서 분생자 형성, 성적 발달, 세포벽 건실성(integrity), 마이토크신 생합성 및 병독성을 포함하는 다양한 세포의 과정에 관련한다는 것을 증명했다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 목적은 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주가 기탁번호 KCTC 12244BP인 것을 특징으로 하는 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 목적은 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주 또는 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주가 기탁번호 KCTC 12244BP인 것을 특징으로 하는 균주를 이용한 진균독소 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 목적은 상기 진균독소가 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON) 또는 제아랄레논(zearalenone; ZEA)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명의 목적은 상기 진균독소가 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기한 목적을 위하여, 본 발명의 제 1 형태는 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주 또는 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주가 기탁번호 KCTC 12244BP인 것을 특징으로 하는 균주를 제공한다. 자낭균인 *Gibberella zeae*(무정형 *Fusarium graminearum*)은 전세계적인 시리얼(cereal) 작물의 맥류 붉은 곰팡이병(*Fusarium head blight*; FHB)의 가장 일반적인 원인 물질이다. 상기 FgFlbA 균주는 이의 “기능적 동등물”을 포함한다. 상기 FgFlbA 유전자 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 FgFlbA 단백질의 기능을 유지하는 것 모두를 포함된다.

[0014] 본 발명의 제 2 형태는 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주 또는 *gzgpa2* 유전자의 207번째 글루타민을 류신으로 치환한 *G. zeae* 균주가 기탁번호 KCTC 12244BP인 것을 특징으로 하는 균주를

이용한 진균독소 생산 방법을 제공한다. *G. zeae*에 의해 생산된 주요한 마이토독신은 트라이코테센 디옥시니발레놀(trichothecene deoxynivalenol; DON) 및 에스트로젠성 독소 제랄레논(zearalenone; (ZEA)이고 이들 모두가 인간 및 가축에 유해하다.

[0015]

본 발명의 제 3 형태는 본 발명의 목적은 상기 진균독소가 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON) 또는 제아랄레논(zearalenone; ZEA)인 것을 특징으로 하는 진균독소 생산 방법을 제공한다. 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON)은 트리코세신(trichothecene) 그룹에 속하는 곰팡이독소인데, 푸사리움(*Fusarium*) 속의 곰팡이에 의해 농작물 특히 밀, 보리, 옥수수 같은 곡류에서 발생한다. DON에 의한 중독증은 오염된 농산물 및 가공식품을 직접 섭취함으로써 1차적으로 발생하고, 오염된 농산물이 함유된 사료를 먹은 가축으로부터 생산된 축산물을 2차적으로 사람이 섭취한 경우에도 각종 건강장애 (간장 장애, 신경장애, 신장 장애, 면역기능 저하 등)가 발생할 수 있다. 제아랄레논은 푸사리움 속의 다양한 종에 의하여 형성된, 에스트로젠 작용을 하는 진균독소이다. 제아랄레논은 진균의 매우 늦은 발생기에서 형성되므로, 이는 특히 고도로 감염된 곡물에서 발견된다. 제아랄레논은 급성 독성을 갖지 않는다. 그러나, 이는 발암 작용을 갖는 것으로 생각된다. 방목 동물의 경우에, 이는 생식 능력 장애, 조산 및 사산을 유발한다.

발명의 효과

[0016]

G 단백질 신호전달 경로는 곰팡이 발달, 2차 물질대사 및 병독성의 조절에 중요한 역할을 한다(Bolker, 1998; Liu and Dean, 1997). 이에 상응하여, G proteins of *G. zeae*는 무성 및 유성 발달에 기여하는 것으로 밝혀졌다(Yu et al., 2008). 본 발명에서는 식물병원성 곰팡이 *G. zeae*에서 7개의 추정상의 RGS 유전자가 기능적으로 특성 규명되었다. 연구된 7개의 RGS 유전자 중에서, FgF1bA, FgF1bB, FgRgsA, FgRgsB 및 FgRgsC가 영양 생장, 분생자 형성, 포자 형태와 발아, 성적 발달, 마이토독신 생산 및/또는 병독성에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. RGS 단백질은 자낭 균류 중에서 아주 보존적임에도 불구하고, 이 유전자의 돌연변이체들은 서로 다른 표현형 변화를 자주 나타낸다. 반면에 FgF1bA, FgRgsA 또는 FgRgsB가 *G. zeae*에서 병독성을 의미있게 감소시켰다(Mukherjee et al., 2010). *G. zeae*의 FgF1bA 결실은 *A. nidulans*와 유사한 분생자 형성 표현형을 나타냈지만, 마이토독신 생산에 대해서는 서로 다른 표현형을 나타냈다(도 9). *A. nidulans* F1bA 결실 돌연변이체가 기존 연구에서 ST 생산에서 블록을 가진다는 것이 밝혀졌다(Adams 및 Yu, 1998). 반면에 *G. zeae*에서 FgF1bA의 결실은 DON 및 ZEA 생산을 높였다. 또한 *F. verticillioides*에서 RGS 유전자의 결실은 마이토독신의 과발현을 촉발시켰고 여기서 F1bA2 및 RgsBI은 퓨모니신 B1(Fumonisin B1)의 생산과 관련이 있었다(Mukherjee et al., 2010). RGS 단백질이 G 단백질 캐스케이드(cascade) 세포 신호전달의 음성 조절라로서 잘 알려져있더라도, *G. zeae*에서 RGS 결실 돌연변이는 균사체의 성장, 성적 발달, 병독성 및 마이토독신 생산과 관련하여 G 단백질 결실 돌연변이와 유사한 표현형을 나타냈다.

[0017]

*G. zeae*에서, $\Delta fgf1bA$ 돌연변이체는 솜털 같은, 자가 분해의 표현형을 나타내지 않았지만, 세포벽 견실성에 영향을 주었다. 사상균에서, 세포벽 견실성을 기주(host)에서 확립된 질병에 대해 유지하는 능력은 중요하다. 본 발명에서 관찰된 $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP) 및 $\Delta fgf1bA$ 돌연변이체의 드리셀레이즈(Driselase)에 대한 증가된 민감성은 FgF1bA가 GzGPA2 활성을 음성적으로 조절함으로써 세포벽 견실성과 관련이 있고(도 9) 계속해서 이 유전자 돌연변이체들은 식물병원성 곰팡이인 *G. zeae*의 병독성에 영향을 준다는 것을 강력히 시사한다.

[0018]

또한 FgF1bA는 *G. zeae*에서 GzGPA2 신호전달의 조절을 통해서 DON 생합성과 밀접하게 관련이 있다. 두 개의 G α 단백질 돌연변이체인 $gzgpa1^{G42R}$ 및 $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP)은 더 높은 수준의 DON을 생산했다. 반면에 $gzgpa1^{G42R}$ 돌연변이체는 FgF1bA 결실 돌연변이체와 유사하게 더 높은 수준의 ZEA를 생산했다(도 8). 종합해서 말하자면, 이러한 실험결과는 G 단백질 및 RGS 단백질이 마이코톡신 생산에 있어서 세밀하게 조절되는 메커니즘을 통해서 곰팡이에 따라 서로 다른 반응을 매개한다는 것을 나타낸다. 식물병원성 곰팡이에서의 G 단백질 신호전달 경로와 관련된 기능적 다양성은 기주 범위, 생식 방법 및 2차 물질 대사와 같은 표현형의 다양성이라는 결과로 나타날 수 있다. 또한, 다양한 곰팡이의 세포 과정이 G 단백질 신호전달 경로를 통해서 다운스트림(down stream) 유전자 활성화/억제에 의해 차등적으로 조절될 수 있다(Brown et al., 1996; Keller et al., 1997; Kim et al., 2005; Proctor et al., 2003).

[0019]

곰팡이에서 많은 기존의 G 단백질의 유전자 연구는 G α 단백질의 G42R 및 Q204L 돌연변이를 우성 활성의 G α 를 생성시키기 위해서 이용했더라도(Fang and Dean, 2000; Hicks et al., 1997; Liu et al., 2007; Shimizu and Keller, 2001; Yu, 2006; Yu et al., 1996; Zhang et al., 2011), 최근의 인간 G α protein인 GzGPA1의 호모로

그(homolog)는 G42R 돌연변이를 포함하는 G_{11} 돌연변이체가 완전한 활성의 형태로 작용할 수 없고 따라서 $gzgpa1^{G42R}$ 가 GzGPA1의 우성 활성의 형태를 형성하지 않았다는 것을 증명했다(Bosch et al., 2012). *G. zeae*에서, 다양한 표현형 $gzgpa1^{G42R}$ 돌연변이체는 성적 발달 및 병독성에서 우성 간섭의 돌연변이체들인 $gzgpa1^{G203R}$ 의 표현형과 상반되지 않았다. 따라서, 우성 활성의 돌연변이체인 $gzgpa1^{Q204L}$ 에 대한 추가 연구가 G 단백질 경로에서 RGS 및 GzGPA1 간의 상관관계를 명확히 하기 위해서 요구된다. 결론적으로, 본 발명은 *G. zeae*의 무성/유성 발달, 마이토크신 생산 및 병독성에서 RGS 단백질이 다양한 기능을 나타낸다는 것을 보여주었다. 나아가 FgF1bA는 GzGPA2-의존적 신호전달 경로를 매개하는데 대하여 및 *G. zeae*에서 독특한 신호전달 경로를 통해서 마이토크신 생산을 조절에 관하여 다양한 발달 단계에서 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 추가 연구가 RGS 단백질 및 헤테로머인 G 단백질 서브유닛 간의 상호작용 및 *G. zeae*에서 G 단백질 신호전달 및 다운스트림 조절자 간의 관계를 더 잘 이해하기 위해서 필요하다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 (A) 분생자 및 (B) 자낭 포자의 발아에 대한 RGS 결실의 영향을 나타낸다. 포자를 회전식 셰이커(150rpm) 상의 감자 덱스트로스 브로스(potato dextrose broth; PDB)에서 25 °C에서, 발아한지 2, 3, 4, 5 및 6 시간 후 분석했다. 별표는 Tukey 테스트에 기초해서 의미있게 달라진 실험데이터를 나타낸다($p < 0.05$). WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$, FgF1bA 결실 돌연변이(기탁번호 KCTC 12244BP); $\Delta fgrgsA$, FgRgsA 결실 돌연변이, FgF1bAc, FgF1bA로 컴플리멘테이션화된(complemented) $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주 결실 돌연변이; FgRgsAc, FgRgsA로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsA$ 유래의 균주.

도 2는 *G. zeae* 균주의 성적 발달을 나타낸다. (A) 각각의 RGS 결실 균주를 당근 아가 상에서 5일 동안 접종한 후 유성생식을 유도하기 위해서 모크 수정(mock-fertilization)을 시켰다. 9일 후, 해부 현미경을 사용해서 자가수정을 조사했다. 검정색의 공 같은 구조가 자낭각이다. 스케일바 = 1mm. (B) 당근 아가 상에서 생산된 자낭 각으로부터 자낭 포자의 강렬한 방출을 나타낸다. 수평으로 방출된 자낭 포자를 포획하기 위해 자낭각으로 덮힌 반원의 아가 블록을 각 챔버에 있는 커버슬립에 놓았다. (C) *G. zeae* 균주 각각의 자낭 로제트를 각각 유도한지 7 및/또는 9일 후 현미경으로 관찰했다. 스케일바 = 20 μm . WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$, FgF1bA 결실 돌연변이(기탁번호 KCTC 12244BP); $\Delta fgf1bB$, FgF1bB 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsA$, FgRgsA 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsB$, FgRgsB 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsB2$, FgRgsB2 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsC$, FgRgsC 결실 돌연변이; $\Delta fggprK$, FgGprK 결실 돌연변이; FgF1bAc, FgF1bA로 컴플리멘테이션화된(complemented) $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주, FgF1bBc, FgF1bB로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgf1bB$ 유래의 균주, FgRgsAc, FgRgsA로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsA$ 유래의 균주, FgRgsBc, FgRgsB로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsB$ 유래의 균주, FgRgsB2c, FgRgsB2로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsB2$ 유래의 균주, FgRgsCc, FgRgsC로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsC$ 유래의 균주, FgGprKc, FgGprK로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fggprK$ 유래의 균주.

도 3은 *G. zeae* 균주에 의한 마이코톡신(mycotoxin) 생산을 나타낸다. 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol; DON) 및 제아랄레논(zearalenone; ZEA)을 각각의 균주 접종 21일 후 쌀 배양물로부터 추출했고 그 수준을 GCMS 및 HPLC로 각각 추출했다. WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$, FgF1bA 결실 돌연변이(기탁번호 KCTC 12244BP); $\Delta fgf1bB$, FgF1bB 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsA$, FgRgsA 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsB$, FgRgsB 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsB2$, FgRgsB2 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsC$, FgRgsC 결실 돌연변이; $\Delta fggprK$, FgGprK 결실 돌연변이.

도 4는 소맥두 상에서 *G. zeae* 균주의 병독성(virulence)을 나타낸다. 각각 소맥두의 중심 잔이삭(center spikelet)을 10 μl 의 분생자 혼탁액에 주입했다. WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$, FgF1bA 결실 돌연변이(기탁번호 KCTC 12244BP); $\Delta fgf1bB$, FgF1bB 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsA$, FgRgsA 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsB$, FgRgsB 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsB2$, FgRgsB2 결실 돌연변이; $\Delta fgrgsC$, FgRgsC 결실 돌연변이; $\Delta fggprK$, FgGprK 결실 돌연변이; FgF1bAc, FgF1bA FgF1bBc로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주, FgF1bB FgRgsAc로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgf1bB$ 유래의 균주, FgRgsA FgRgsBc로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsA$ 유래의 균주, FgRgsB FgRgsB2c로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsB$ 유래의 균주, FgRgsB2 FgRgsCc로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsB2$ 유래의 균주, FgRgsC FgGprKc로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fgrgsC$ 유래의 균주, FgGprK로 컴플리멘테이션화된 $\Delta fggprK$ 유래의 균주.

도 5는 *G. zeae* 균주의 자가수정을 나타낸다. 각각의 균주를 당근 아가 상에서 5일 동안 접종한 다음, 유성 생식을 유도하기 위해서 모크 수정(mock fertilization)시켰다. 이러한 이미지들을 추가 배양한지 9일 후 해부 현미경을 사용해서 얻었다. WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$ (기탁번호 KCTC 12244BP), FgF1bA 결실 돌

연변이; FgF1bAOE, $P_{EF1\alpha}$ $gzgpa1^{G42R}$ 에 의해 유도된 FgF1bA로 형질전환된 $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주, $gzgpa1^{G42R}$, G42R 돌연변이를 이용한 GzGPA1 돌연변이; $gzgpa1^{G203R}$, 추정상의 우성 간섭(dominant interfering)의 GzGPA1 돌연변이; $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP), 추정상의 항활성(constitutively active)의 GzGPA2 돌연변이; $gzgpa2^{G206R}$, 추정상의 우성 간섭의 GzGPA2 돌연변이.

도 6은 소맥두 상에서 *G. zeae* 균주의 병독성을 나타낸다. 10개의 소맥두의 중심 잔이삭(center spikelet)을 10 μ l 분생자 혼탁액을 이용하여 주입했다. WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$ (기탁번호 KCTC 12244BP), FgF1bA 결실 돌연변이; FgF1bAOE, $P_{EF1\alpha}$ $gzgpa1^{G42R}$ 에 의해 유도된 FgF1bA로 형질전환된 $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주, G42R 돌연변이를 이용한 GzGPA1 돌연변이; $gzgpa1^{G203R}$, 추정상 우성 간섭의 GzGPA1 돌연변이; $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP), 추정상의 항활성(constitutively active)을 갖는 GzGPA2 돌연변이; $gzgpa2^{G206R}$, 추정상의 우성 간섭의 GzGPA2 돌연변이.

도 7은 *G. zeae* 균주의 균사로부터 얻은 원형질체를 나타낸다. 현미경 관찰을 *G. zeae* 균주 각각의 균류에 의한 카보하이드롤레이즈(carbohydrolase) 혼합물을 처리한지 90분 후 수행했다. WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$ (기탁번호 KCTC 12244BP), FgF1bA 결실 돌연변이; FgF1bAOE, $P_{EF1\alpha}$ 에 의해 유도된 FgF1bA로 형질전환된 $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주, GzGPA2 결실 돌연변이; $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP), 추정상 항활성(constitutively active)을 갖는 GzGPA2 돌연변이; $gzgpa2^{G206R}$, 추정상 우성 간섭의 GzGPA2 돌연변이. 스케일바 = 50 μ m.

도 8은 *G. zeae* 균주에 의한 디옥시니발레놀(deoxynivalenol; DON) 및 제아랄라레논(zearealenone; ZEA)의 생산을 나타낸다. *G. zeae* 균주를 DON 및 ZEA의 수준을 GCS 및 HPLC로 각각 분석하기 전에 21일 동안 쌀 상에서 배양했다. WT, *G. zeae* 야생형 균주 Z-3639; $\Delta fgf1bA$ (기탁번호 KCTC 12244BP), FgF1bA 결실 돌연변이; FgF1bAOE, $P_{EF1\alpha}$ $gzgpa1^{G42R}$ 에 의해 유도된 FgF1bA로 형질전환된 $\Delta fgf1bA$ 유래의 균주; G42R 돌연변이를 이용한 GzGPA1 돌연변이; $gzgpa1^{G203R}$, 추정상 우성 간섭의 GzGPA1 돌연변이; $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP), 추정상 항활성의 GzGPA2 돌연변이; $gzgpa2^{G206R}$, 추정상 우성 간섭의 GzGPA2 돌연변이.

도 9는 *G. zeae*, *A. nidulans* 및 *M. oryzae*에서 G 단백질 신호전달 경로의 비교 분석을 나타낸다. F1bA는 1차적으로 *A. nidulans*에서 영양 성장, 발달 및 ST 생산을 지배한다. Rgs1는 *M. oryzae*에서 발병 동안 MagA를 조절한다. FgF1bA는 *G. zeae*에서 세포의 무성/유성 생식, 세포벽 통합성, 마이코톡신 생산 및 병독성과 연관될 수 있고, 이는 *M. oryzae* 및 *A. nidulans*보다 더 복잡한 조절을 갖는, GzGPA2 활성을 음성적으로 조절하는 수용능력에 근거한다. 점선은 Ga 단백질 및 RGS 단백질 간의 확실하게 정의되지 않은 상호작용을 나타낸다.

도 10, 11, 12, 13는 *G. zeae*에서 G 단백질의 위치지정 돌연변이를 나타낸다. (A) 화살표로 나타난 GzGPA 단백질 포함하는 GzGPA 유전자의 제한효소 맵. 시작 코돈, ATB 및 종결 코돈, TAA 또는 TAG를 각각 나타냈다. 제거(#)된 안쪽의 BsrFI와 돌연변이 균주의 세대에서 만들어진 새로운 EaeI 및 AccI 사이트를 (*) 표시로 나타냈다. 제한 효소 사이트를 하기에 약어로 나타낸다:

S=SalI, X=XhoI, P=PstI, V=EcoRV, SP=SphI, B=BamHI. (B) 강조 표시된 $gzgpa1^{G42R}$ 및 $gzgpa1^{G203R}$ 돌연변이를 포함하는 GzGPA1의 추정되는 아미노산 서열 (C) 강조 표시된 $gzgpa2^{G206R}$ 및 $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP) 돌연변이를 포함하는 GzGPA2의 추정되는 아미노산 서열. (D) 강조 표시된 $gzgpa3^{G203R}$ 및 $gzgpa3^{Q204L}$ 돌연변이를 포함하는 GzGPA3의 추정되는 아미노산 서열

도 14는 *Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae*, *Fusarium verticillioides*, *Magnaportheoryzae* 및 *Saccharomyces cerevisiae*에서 동정된 RGS 단백질의 계통적 분석을 나타낸다. 유사한 단백질을 ClustalX를 이용하여 배열하고 네이버-조이닝 방법(neighbor-joining approach(MEGA 5.03 software))을 이용하여 분석했고 이것은 1000 반복의 부트스트랩을 포함했다. 각각의 분지에 표시된 숫자는 가장 근접한 분지 마디 간의 부트스트랩 값을 나타낸다. *A.nidulans*, *M.oryzae*, *S.cerevisiae*, *F.verticillioides* 및 *G.zeae*에 대한 RGS 단백질 서열을 Broad Institute Fungal Comparative Database (<http://www.broadinstitute.org/scientific->

community/data) 및 Saccharomyces Genome Database(<http://www.yeastgenome.org/>)에서 계통수에 포함된 로커스(locus)를 이용하여 발견할 수 있었다. 단백질 오솔로그(ortholog)의 모식적인 설명은 보존적 도메인(conserved domain) 위치 및 배열을 나타낸다. DEP, Dishevelled, EGL-10 및 pleckstrin 도메인; PX, Phox 상동성 도메인; PXA, PX 결합 도메인; RGS, G 단백질 신호전달 도메인의 조절자; TM, 트랜스멤브레인 도메인.

도 15는 수행된 RGS 유전자의 표적의 결실 및 컴플리멘테이션을 나타냈다. *FgFlbA*(A), *FgFlbB*(B), *FgRgsA*(C), *FgRgsB*(D), *FgRgsB2*(E), *FgRgsC*(F) 및 *FgGprK*(G)를 *G.zeae*의 야생형(WT) 계놈으로부터 결실시켰고 컴플리멘테이션을 상응하는 RGS 유전자를 이용하여 수행했다. 왼쪽 패널은 RGS 결실 돌연변이를 생성하기 위한 상동성 유전자 재조합 전략의 모식적 설명을 나타낸다. 오른쪽 패널은 서던 분석(Southern analysis)을 나타낸다. 레인 1, WT; 레인 2, 결실 돌연변이체; 레인 3, 컴플리멘테이션화된 균주. 사용된 DNA 표준의 크기를 블롯(blot)의 왼쪽에 킬로 베이스(kilobase)로 나타냈다.

도 16은 *FgFlbA*의 과발현을 나타낸다. (A) *EF1a* 프로모터(P_{EF1a})로 *FgFlbA*를 위한 안쪽의 프로모터를 대체했다. (B) 야생, *FgFlbA*-결실 및 *FgFlbA*-과발현 균주에서 *FgFlbA*의 발현을 나타낸다. *FgFlbA*의 전사체 수준을 완전 배지에서 정량적 실시간-PCR에 의해 분석했다. WT, *G.zeae* 야생형 균주 Z-3639; *fgflbA*, *FgFlbA* 결실 돌연변이; *FgFlbAOE*, P_{EF1a} 에 의해 유도된 *FgFlbA*를 이용하여 형질전환된 *fgflbA*-유래의 균주.

도 17은 접종한지 3일 후 PDA 상에서 *G.zeae*의 균사 성장을 나타냈다. WT, *G.zeae* 야생형 균주 Z-3639; *gzgpa1*, *GzGPA1* 결실 돌연변이체; *gzgpa1*^{G42R}, G42R 돌연변이를 이용한 *GzGPA1* 돌연변이체; *gzgpa1*^{G203R}, 추정상의 우성 간섭의 *GzGPA1* 돌연변이; *gzgpa2*, *GzGPA2* 결실 돌연변이체; *gzgpa2*^{G207L} (기탁번호 KCTC 12244BP), 추정상의 항활성 *GzGPA2* 돌연변이체; *gzgpa2*^{G206R}, 추정상의 우성 간섭의 *GzGPA2* 돌연변이; *fgflbA* (기탁번호 KCTC 12244BP), *FgFlbA* 결실 돌연변이; *FgFlbAOE*, P_{EF1a} 에 의해 유도된 *FgFlbA*로 형질전환된 *fgflbA*-유래의 균주.

도 18은 *G.zeae* 균주에서 분생자의 발아를 나타낸다. 포자를 회전식 셰이커(150rpm) 상의 감자 텍스트로오스 브로스(PDB)에서 25℃에서 배양하고, 발아를 위해 배양한지 2, 3, 4, 및 5 시간 후에 분석했다. 별표는 Tukey 테스트에 기초해서 의미있게 달라지는 데이터를 나타낸다($p < 0.05$). WT, *G.zeae* 야생형 균주 Z-3639; *gzgpa1*^{G203R}, 추정상의 우성 간섭의 *GzGPA1* 돌연변이; *gzgpa2*^{G207L} (기탁번호 KCTC 12244BP), 추정상의 항활성의 *GzGPA2* 돌연변이; *gzgpa2*^{G206R}, 추정상의 우성 간섭의 *GzGPA2* 돌연변이; *fgflbA* (기탁번호 KCTC 12244BP), *FgFlbA* 결실 돌연변이; *FgFlbAOE*, P_{EF1a} 에 의해 유도된 *FgFlbA*를 이용하여 형질변환된 *fgflbA*-유래의 균주.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

이하, 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것일 뿐, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0022]

명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다. 또한, "및/또는"은 언급된 구성요소의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작 또는 소자에 대한 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작 또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[0023]

<실시예 1> *G. zeae*에서 RGS 유전자의 동정 및 결실

[0024]

하기 실시예들을 위해 사용된 물질 및 방법은 하기와 같다.

[0025]

1. 균류 균주 및 배지

[0026]

*G. zeae*의 야생형 균주 Z-3639(Bowden and Leslie, 1999) 및 이 균주에서 얻은 돌연변이체를 푸자리움(*Fusarium*) 실험 매뉴얼에 따라 배지에서 배양했다(Leslie and Summerell, 2006). 분생자(Conidia)를 카복실

메틸 셀룰로오스(CMC) 배지(Cappellini and Peterson, 1965) 및 이스트 말트 아가(yeast malt agar; YMA)(Harris, 2005) 상에서 유도하였다. 모든 균주를 -70℃에서 20% 글리세롤에서 분생자 혼탁액으로 저장했다.

2. 유전자 조작, PCR 프라이머 및 PCR 조건

지노믹(Genomic) DNA를 세틸트라이메틸암모늄 브로마이드 방법(Leslie and Summerell, 2006)를 이용하여 추출했다. 제한 엔도뉴클리에이스 분해(restriction endonuclease digestion), 젤 전기영동법(gel electrophoresis), 젤 블로팅(gel blotting) 및 ³²P로 표지된 프로브를 이용한 서던 하이브리다이제이션(southern hybridizations)을 표준절차에 따라 수행했다(Sambrook and Russell, 2001). 본 발명에 사용된 PCR 프라이머(표 S1)를 바이오닉스 올리고뉴클레오타이드 합성 시설(Bionics oligonucleotide synthetic facility)(Seoul, Korea)에서 합성했다. 이지스핀 토탈 익스트랙션 키트(Easy-Spin Total Extraction Kit(Intron Biotech, Seongnam, Korea))를 이용하여 전체 RNA를 추출했다. SuperScript III 역전사효소를 이용하여 첫 번째 가닥 cDNA를 합성했다(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3. 표적 유전자 결실 및 컴플리멘테이션(complimentation)

표적 유전자 결실을 위해서, 더블 조인트(double joint; DJ)-PCR 전략을 사용했다(Yu et al., 2004). 요약하면, 각각의 표적 유전자의 5' 및 3' 플랭킹(flanking) 부위를, 야생형 균주에서 취한 각각의 RGS-5for/RGS-5rev 및 RGS-3for/RGS-3rev 프라이머 쌍을 이용하여 PCR로 증폭했다. 제네티신(geneticin)-저항성 카세트(gen)을 pII99로부터 증폭했다(Namiki et al., 2001). 이후 이 3개의 증폭물(amplicon)(5' 부위, 3' 부위 및 gen)을 1:1:2 M 비율로 혼합했고 2회차 PCR에서 융합시켰다. 융합된 구조물을 네스트(nest) 프라이머인 RGS-nf 및 RGS-nr를 이용하여 증폭했다. 결실 돌연변이체와 컴플리멘테이션을 시키기 위해서, 원래의 프로모터(promoter) 및 터미네이터를 포함하는 RGS 유전자를 RGS-nf 및 RGS-nr 프라이머를 이용하여 야생형 균주의 지노믹 DNA로부터 증폭했다. 완전한 RGS 유전자의 복제체를, 선별 마커로서 히그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자(hyg)를 운반하는 벡터 pUCH1와 함께, 상응되는 결실 돌연변이체의 곰팡이 원형질체 내로 직접 형질전환하였다(Turgeon et al., 1987). 곰팡이의 형질전환을 인용문헌과 같이 수행했다(Han et al., 2007).

4. 발아 시험

인용문헌에서처럼(Lee et al., 2009b) 발아 시험을 수행했다. 요약해서, 분생자 형성(conidiation)을 유도하기 위해서, 감자 덱스트로오스 브로스(potato dextrose broth, PDB)로부터 추출한 균사를 YMA에 스프레딩을 하고 근자외선, 25℃ 조건에서 2일 동안 배양했다(파장: 365 nm, HKiv Import & Export Co., Ltd., Xiamen, China). 이후 분생자를 증류수에서 수득하여, 한 층의 미라클로스(CalBiochem, San Diego, CA, USA)를 통해 여과하고, 증류수로 두 번 세척하고 원심분리시켰다(5000 rpm, 25℃, 5 분). 자낭 포자(ascospore)를 페트리 디시 커버 상에서, 자낭각에서 방출되어진 자낭 포자를 포획하기 위해서, 당근 아가(carrot agar)의 위를 아래로 뒤집어 놓음으로써 수확했다.

포자 현탁액 1 ml(10^6 분생자/ml)을 50 ml의 PDB에서 배양했다. 이후 발아된 포자의 전체수를 0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 시간 후에 세었다. 또한 각 실험을 위해 백개의 분생자를 광학현미경으로 관찰했다. 이 실험들을 3개의 리플케이트(replicate)를 이용하여 2번 반복 수행했다.

5. 원형질체 생산 분석법

G. zeae 균주에 대한 원형질체 생산 분석법을 Hou et al.(2002)의 방법에 약간의 변형을 가해 수행했다. 요약컨대, CMC 배양으로부터 생산된 곰팡이의 분생자를 YPG 액체 배지(리터당 3 g의 효모 추출물, 10 g의 펩톤 및 20g의 포도당)로 ml 당 10^6 개의 양으로 접종시켰고 25℃에서 12시간 동안 배양했다. 원형질체를 생산하기 위해서, 균사체를 멸균된 Whatman No. 2 필터페이퍼를 통한 여과에 의해 수득했고 1% 드리셀레이스(Driselase)를 포함하는 1 M NH₄Cl에서 90분 동안 배양했다(Karlan Research Products, Santa Rosa, CA, USA). CCD 카메라를 갖는 DE/Axio Image A1 전자현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 이용하여 원형질체의 형성을 모니터링했다.

[0036]

6. 유성교배(sexual cross) 및 자낭포자 방출

[0037]

5일 동안 당근 아가에서 배양한 균사체를 자가수정을 위해 인용문헌에서처럼(Leslie and Sumnerell, 2006) 모크 수정(mock fertilization)시켰다. 이종교배를 위해서, 당근 아가 플레이트 상에서 배양된 암컷 균주의 균사를 1 ml의 수컷 균주 분생자 혼합액(1×10^6 분생자/ml)으로 수정시켰다. MAT1-1이 결실된 타가교배성(heterothallic) 균사 Dmat1 균주(Lee et al., 2003)를 이종교배를 위한 시험용 균주로서 이용했다. 자낭각 및 자낭 포자를 수정한지 9일 후에 관찰했다. 성유도(sexual induction) 후에, 모든 배양물들을 근자외선 하에서 배양했다(HKiv Import & Export Co., Ltd.).

[0038]

자낭포자 방출은 자유 대류를 최소화하기 위해 구축된 작은 아크릴 챔버($1 \times 2.5 \times 5$ cm)에서 관찰되었다(Aylor and Anagnostakis, 1991). 커버슬립 상에 놓여진 성숙한 자낭각으로 커버된 반원의 아가 블록(직경 11mm)을 24 시간 동안 챔버에 두었다(Min et al., 2010; Trail et al., 2005). 이후 수정한 후 7일 및 9일째의 자낭 로제트(asci rosettes) 및 자낭 포자의 형태를 관찰하였다. 자낭각을 한 방울의 15% 글리세롤에서 글래스 슬라이드 상에서 해부하고, 자낭을 커버슬립 하에서 평평하게 폈다(Son et al., 2011). 차등 간섭 대비(DIC) 이미지를 CCD 카메라를 장착한 DE/Axio Image A1 현미경(Carl Zeiss)를 이용하여 획득했다.

[0039]

7. 마이코톡신(mycotoxin) 분석

[0040]

G. zeae 균주를 쌀 배지 상의 마이코톡신 생산을 위해 접종했다. 요약컨대, 250 ml의 Erlenmeyer 플라스크에 놓았고 25 °C에서 *G. zeae* 균주를 이용하여 배양했다(Lee et al., 2002). 쌀 배양물을 21일 후 수득했다. 디옥시 니발레놀(Deoxynivalenol; DON) 분석을 위해서, 쌀 배양물을 수득하고 아세트나이트릴-물(84:16, v/v)로 추출했다. 이후 추출물(각각 500 μ l)을 농축하여 건조시켰고 50 μ l의 Sylon BZT(BSA + TMCS + TMS1, 3:2:3, Supelco, Bellefonte, PA, USA)에 용해시켰고 부드럽게 교반한 다음 60°C에서 5분 동안 유도체화(derivatization)를 위해 가열했다. 반응 후, 200 μ l의 n-헥산을 그 용액에 첨가하고, 이후 200 μ l의 증류수를 첨가하고 이 용액을 두 층이 분리될 때까지 가만히 두었다. 상층(1 μ l)을 인용문헌(Seo et al., 1996)에서 설명한 것처럼 Shimadzu QP-5000 가스 크로마토그래프-매스 스펙트로미터(GCMS, Shimadzu, Kyoto, Japan) 및 선별된 이온 모니터링 모드를 이용하여 분석했다.

[0041]

제랄레논(zearalenone; ZEA) 정량화를 위해서, 쌀 배양물을 아세트나이트릴-물(84:16, v/v)로 추출했다. 이후 추출물을 메탄올-물(65:35, v/v)로 희석시켰고, RF-10A 형광 검출기(Shimadzu)를 갖춘 Shimadzu LC-10 AD HPLC를 분석을 위해 이용했다. 대칭형 C₁₈ 칼럼(15 mm x 4.6 mm; 입자 크기 5 μ m; Waters Corp, Milford, MA, USA)을 사용했고 탐지 파장은 274 내지 466 nm이었다. 이동상은 65% 수성 메탄올이었고 유속 1 ml/min으로 이동시켰다.

[0042]

8. 병독성 시험(Virulence test)

[0043]

곰팡이의 균주 병독성을 인용문헌(Lee et al., 2009a)에서 설명한 것처럼 밀 재배품종 Eunpamil을 이용하여 측정했다. 10 μ l의 분생자 혼합액(0.1% Tween 20 내의 1×10^5 분생자/ml)을 개화 중간에 소맥두(wheat head)의 중앙 잔이삭 내로 주사했다. 열 개의 소맥두를 각각의 처리물에 주사했다. 3일 동안 25 °C 항습기에서 배양한 후, 식물을 온실에 두고, 붉은 곰팡이병(Fusarium head blight; FHB) 증상을 나타내는 잔이삭을 접종한지 14일 후 카운트했다.

[0044]

9. Ga 단백질의 위치지정 돌연변이 및 RGS 과발현

[0045]

우성 활성(dominant active) 및 우성 간섭(dominant interfering) G 단백질을 가지고 있는 돌연변이를 생성시키기 위해서, 돌연변이체를 기존 연구(Fang and Dean, 2000; Liu et al., 2007; Yu, 2006; Yu et al., 1996) 방법에 따라 위치지정 돌연변이를 이용하여 각각의 G α 유전자로부터 생산했다. *G. zeae*에서 위치지정 돌연변이를 시키기 위한 위치를 *A. nidulans*(Yu et al., 1996) 및 *M. oryzae* (Fang and Dean, 2000)의 G α 단백질들 중에서 서열 정렬(sequence alignment)을 통해 결정했다. 요약하면, 우성 활성의 GzGPA1 단백질을 생산하도록

GzGPA1 내의 42번 글라이신을 알지닌으로 전환하기 위해서, 두 개의 PCR 단편을 GzGPA1-5for/GzGPA1G42R-3rev 및 GzGPA1G42R-5for/GzGPA1-3rev 프라이머 들을 사용하여 야생균주로부터 증폭하였다. 우성 간섭(dominant interfering)하는 GzGPA1 단백질을 생성하도록 GzGPA1의 203번 글라이신을 알지닌으로 전환시키기 위해서, 두 개의 PCR 단편을 GzGPA1-5for/GzGPA1G203R-3rev 및 GzGPA1G203R-5for/GzGPA1-3rev 프라이머를 이용하여 야생형 균주로부터 증폭했다. 이후 이 단편을 인용문헌에서처럼(Yu et al., 2004) 융합시켰고 최종 구조물을 네스트 프라이머, GzGPA1-nf 및 GzGPA1-nr을 이용하여 증폭했다. 이후 *gzgpa1*^{G42R} 및 *gzgpa1*^{G203R}의 대립 유전자 돌연변이(mutant allele)를 갖는 각각의 구조물을 pUCH1 벡터(Turgeon et al., 1987)를 이용하여 GzGPA1 결실 돌연변이 곰팡이의 원형질체 내로 공동-형질전환시켰다. 획득되어진 형질전환체를 하이그로마이신(hygromycin) 및 제네틱신(geneticin)을 이용하여 초기에 스크리닝하고, 적절한 BsrFI 및 EaeI 위치를 가지거나 가지지 않는 것을 이용하여 대립유전자(allele) 돌연변이를 확인하였고, 최종적으로 시퀀싱(sequencing)에 의해 확인했다(도 S1). 유사한 전략을 우성 활성 또는 우성 간섭의 GzGPA2 및 GzGPA3를 가지는 돌연변이체를 생산하기 위해 이용했다. 우성 활성의 GzGPA2(*gzgpa2*^{Q207L} (기탁번호 KCTC 12244BP)) 및 GzGPA3(*gzgpa3*^{Q204L}) 단백질을 갖는 돌연변이를 생성시키기 위해, GzGPA2 및 GzGPA3의 Ga 서브유닛의 207번 및 204번 글루타민을 류신으로 전환시켰다. 우성 간섭의 GzGPA2(*gzgpa2*^{G206R}) 및 GzGPA3(*gzgpa3*^{G203R}) 단백질을 갖는 돌연변이를 생성하기 위해, GzGPA2 및 GzGPA3의 Ga 서브유닛의 206번 및 203번 글라이신을 알지닌으로 전환시켰다(도 S1). FgFlbA 유전자의 과발현을 인용문헌에서처럼(Lin et al., 2011) 하였다. 간략하게 설명하면, 각각의 표적 유전자의 5' 및 3' 플랭킹 부위를 각각 야생형 균주로부터 얻은 FgFlbA-5for/FgFlbA-OE 5rev 및 FgFlbA-OE 3for/FgFlbA-3rev PCR 프라이머 쌍을 이용하여 증폭했다. *F. verticillioides*의 신장 인자 1a 프로모터(P_{EF1a})를 프라이머 EF pro-5for 및 EF pro-3rev를 이용하여 pSKGEN(Lee et al., 2011)으로부터 증폭했다. 다음으로 3개의 증폭물(예컨대, 5' 부위, 3' 부위 및 P_{EF1a})을 혼합하고, 2회차 PCR을 이용하여 융합시켰다. 획득되어진 구조물을 네스트 프라이머(FgFlbA-nf 및 FgFlbA-nr)를 이용하여 증폭했다. 이후 FgFlbA 유전자의 과발현 구조물을 pUCH1과 함께 FgFlbA 결실 돌연변이체의 곰팡이 원형질체 내로 직접 형질전환하였고, FgFlbA의 과발현을 SYBR Green Supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 7500 real-time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 갖춘 qRT-PCR로 확인했다. 내생 하우스키핑 유전자인 사이클로필린(Cyp1 Broad Institute ID: FGSG_07439.3)을 정상화를 위한 대조군으로 이용했다(Kwon et al., 2009). PCR 분석을 회당 2번 증폭하여 3번 반복 수행했다. FgFlbA 유전자 발현의 정량화를 위해, 데이터를 SDS Software 1.3.1(Applied Biosystems)을 이용하여 분석했다.

10. 실험결과

FgFlbA, FgFlbB, FgRgsA, FgRgsB, FgRgsC 및 FgGprK를 포함하는 여섯개의 RGS 유전자는 기존 연구에서 동정되었다(Lafon et al., 2006). 본 발명에서는 추가적으로 추정되는 RGS 유전자(Broad Institute ID: FGSG_08679.3)를 동정했다. 라이브러리 및 게놈 배치 서버(library and genome assignments server; <http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/>)를 이용하여 동정했다(Cuomo et al., 2007; Gough et al., 2001). 새롭게 동정된 이 유전자를 FgRgsB2라고 명명했다.

A.nidulans, *M.oryzae*, *S.cerevisiae*, 및 *F.verticillioides*(Chasse et al., 2006; Lafon et al., 2006; Liu et al., 2007; Mukherjee et al., 2010)를 포함하는 기존의 다른 곰팡이 종에서 동정된 각각의 단백질 뿐만 아니라 *G. zeae*의 7개의 RGS 단백질은 MEGA 소프트웨어 패키지에서 이용가능한 네이버-조이닝 방법(neighbor-joining approach)을 사용하여 5개의 서브 그룹으로 분류되었다(Tamura et al., 2007)(도 S2). 이들 RGS 단백질들은 2 디시벨트(Dishevelled), EGL-10 및 플렉스트린(pleckstrin(DEP)) 도메인(FgFlbA 및 FgFlbB), N-말단의 RGS 도메인(FgRgsA), C-말단의 트랜스메브레인(TM) 도메인(FgRgsB 및 FgRgsB2), C-말단과 N-말단 각각의 Phox(PX) 상동성 및 PX-결합(PXA) 도메인(FgRgsC) 및 N-말단의 여섯개 TM 도메인(FgGprK)과 같은 다른 도메인과 조합하여 적어도 하나의 RGS 도메인을 포함하였다.

*G. zeae*의 7개의 RGS 유전자의 기능을 결정하기 위해, 야생형 균주의 RGS 오픈 리딩 프레임(ORF)을 *gen* 유전자로 대체했다. 또한, pUCH1에 야생형 대립 유전자를 도입함으로써 각각의 결실 돌연변이체를 컴플리멘테이션(complementation)하였다. 각각 유전자의 결실 및 컴플리멘테이션은 서던(Southern) 분석법으로 확인되었다(도 S3).

[0050] <실시예 2> FgF1bA, FgF1bB, FgRgsA 및 FgRgsB는 영양 생장, 분생자의 형태 및/또는 분생자 생산과 관련이 있다.

[0051] FgRgsA 및 FgRgsB의 결실은 감자 텍스트로오스 아가(PDA)(표 1)상의 야생형 및 컴플리멘테이션화된 균주와 비교해서 의미있게 감소된 영양 생장을 야기했다. 또한, 최소 배지 상의 균주 각각에 대한 생장 패턴은 PDA 상에서 관찰된 것과 비교해서 유사했다. RGS 유전자가 분생자 형태 및 생산, 크기 및 분생자의 수에 영향을 미치는지를 확인하기 위해서, 각각의 균주에 의해 생산된 분생자의 수를 분석하고 기록했다. 야생형 및 컴플리멘테이션화된 균주와 비교해서, 분생자 생산에서 의미있는 감소(59%)를 $\Delta fgl1bA$ 돌연변이체에서만 관찰했다. 반면에, $\Delta fgl1bB$ 돌연변이체는 더 적은 격막을 갖는, 더 짧고 더 얇은 분생자를 생산했다. 대조적으로, $\Delta fgrgsB$ 돌연변이체는 야생형 및 컴플리멘테이션화된 균주보다 더 길고 더 넓은 분생자를 생산했다(표 1 *G. zeae* 균주의 영양 생장, 무성 생식 및 병독성).

[0052] [표 1]

Strain	Radial growth (mm) ^a	Conidia morphology ^b			Conidia production (number/ml) ^c	Disease index ^d
		Length (μm)	Width (μm)	No. of septum		
WT	84 A ^e	45 A	4.7 A	4.3 A	1.7×10^6 A	7.0 A
$\Delta fgl1bA$	85 A	45 A	4.6 A	4.3 A	0.7×10^6 B	1.4 B
$\Delta fgl1bB$	85 A	36 B	4.3 B	3.6 B	1.5×10^6 AB	6.0 A
$\Delta fgrgsA$	80 B	45 A	4.8 A	4.0 A	2.1×10^6 A	1.1 B
$\Delta fgrgsB$	51 C	51 C	5.1 C	4.3 A	2.1×10^6 A	1.2 B
$\Delta fgrgsB2$	84 A	45 A	4.8 A	4.0 A	1.6×10^6 A	7.1 A
$\Delta fgrgsC$	83 A	46 A	4.6 A	4.0 A	1.9×10^6 A	5.9 A
$\Delta fgrgsA$	83 A	44 A	4.8 A	4.0 A	1.7×10^6 A	6.7 A
FgF1bAc	85 A	45 A	4.8 A	4.3 A	1.7×10^6 A	6.6 A
FgF1bBc	85 A	46 A	4.7 A	4.3 A	1.7×10^6 A	7.4 A
FgRgsAc	85 A	46 A	4.8 A	4.3 A	1.6×10^6 A	6.7 A
FgRgsBc	83 A	46 A	4.7 A	4.4 A	1.6×10^6 A	7.4 A
FgRgsB2c	84 A	45 A	4.7 A	4.2 A	1.8×10^6 A	7.3 A
FgRgsCc	85 A	44 A	4.8 A	4.3 A	1.8×10^6 A	7.2 A
FgGprKc	84 A	45 A	4.6 A	4.2 A	1.8×10^6 A	6.5 A

[0053]

[0054] ^a 방사상의 성장을 감자 텍스트로오스 아가(PDA) 상에서 접종한지 4일 후에 측정했다.

[0055] ^b 이스트 말트 아가(YMA)로부터 수득된 백개의 분생자를 광학현미경을 이용하여 각각의 균주에 대해 관찰했다.

[0056] ^c 분생자 형성(conidiation)을 카복시메틸셀룰로오스(CMC) 배지에서 3일 동안 배양 후 생산된 분생자의 수를 카운팅함으로써 측정했다.

[0057] ^d 증후가 나타난 잔이삭의 평균값을 접종한 지 14일 후 카운팅했다.

[0058] ^e 서로 다른 표기를 한 칼럼 내의 값들은 SPSS 12.0 소프트웨어(SPSS, Inc., Chicago, IL)를 이용한 Tukey 테스트($p < 0.05$)에 따라 의미있게 차이가 있다. 모든 데이터는 3개의 생물학 레플리케이트(replicate)로부터 수득되었다.

[0059] <실시예 3> FgF1bA 및 FgRgsA의 결실은 포자의 발아 속도를 바꾼다.

[0060] FgF1bA의 결실은 야생형 및 컴플리멘테이션화된 균주와 비교해서 분생자의 조속한 발아를 일으킨 반면에, FgRgsA의 결실은 발아 속도를 감소시켰다. 야생형 균주에서, 분생자의 5% 및 50%가 배양한지 2 시간 및 3시간 후 각각 발아했다.

[0061] $\Delta fgl1bA$ 돌연변이체(기탁번호 KCTC 12244BP)에서, 분생자의 약 50%가 감자 텍스트로오스 브로스(PDB)에서 배양 후 2시간 만에 발아했고, 분생자의 80%가 배양 후 3시간이 지나서 발아했다(도 1A). 대조적으로, $\Delta fgrgsA$ 돌연변이체의 분생자는 2 시간이 지날 때까지 발아하지 않았고, 분생자의 25%만이 3 시간 후에 발아했다. 유사한 실험결과를 $\Delta fgrgsA$ 돌연변이체에서 측정된 자낭포자 발아 속도에서 얻었다(도 1B).

[0062] <실시예 4> FgF1bA, FgRgsB 및 FgRgsC는 성적 발달과 관련되어 있다.

[0063] G 단백질 신호전달은 *G. zeae*의 성적 발달에 필요하다(Yu et al., 2008). RGS 유전자가 성적 발달에 기여하는지를 확인하기 위해서, RGS 결실 돌연변이체의 생식능력을 조사했다. $\Delta fgl1bA$ 돌연변이체(기탁번호 KCTC

12244BP)는 자가-수정에 의해 자낭각을 발달시키지 못했고, 암컷의 생식능력을 상실했다(도 2A). 그러나, $\Delta fglbA$ 돌연변이체(기탁번호 KCTC 12244BP)의 분생자가 이중교배에서 암컷으로 사용된 $\Delta mat1$ 이질균사 균주와 수정되었을 때, 자낭각 및 생존가능한 자낭 포자를 정상적으로 생산했다.

[0064]

$\Delta fgrgsB$ 및 $\Delta fgrgsC$ 돌연변이체는 모두 정상적 자낭각을 생산했고 결실 돌연변이체에 의해 생산된 자낭각의 수는 야생형 균주의 수와 다르지 않았다(도 2A). 그러나 이러한 자낭각으로부터 강력하게 방출되는 자낭 포자의 수는 급격히 감소했다(도 2B). 자낭 포자를 성유도(sexual induction)한 지 9일 후 배양 접시의 뚜껑으로부터 수득했을 때, 야생형 균주는 자낭막 당 약 450개의 자낭 포자를 방출한 반면에, $\Delta fgrgsB$ 및 $\Delta fgrgsC$ 돌연변이체는 자낭막 당 1개 및 3개를 각각 방출했다. 돌연변이체 및 야생형 균주 각각의 자낭각 성숙도를 조사하기 위해서, 무작위로 50개의 자낭각을 선택해서 자르고 해부한 후, 현미경 하에서 관찰했다. 성유도한지 7일 후, 야생형 균주에서 자낭의 약 90%가 자낭 포자를 포함했다. 대조적으로, $\Delta fgrgsB$ 돌연변이체에서 자낭의 대부분은 성유도한지 7일 후에는 자낭 포자를 포함하지 않았고, 성유도한지 9일 후의 $\Delta fgrgsB$ 의 자낭포자 형성은 성유도한지 7일 후 관찰된 야생형 및 컴플리멘테이션화된 균주의 것과 유사했다(도 2C). $\Delta fgrgsC$ 돌연변이체에서 여덟개의 자낭 포자가 성유도한지 7일후 자낭에서 관찰되었지만, 상기 자낭은 야생형 균주와 비교해서 대부분 비정상적이고, 2-세포화된 또는 불규칙적으로 굵거나 짧아진 자낭 포자를 포함했다(도 2C).

[0065]

<실시예 5> 마이코톡신 생산에 대한 FgF1bA 및 FgRgsA 결실의 효과

[0066]

쌀 배지 상에서의 성장이 *G. zeae* 균주 사이에서 서로 다르지 않더라도, **FgF1bA** 및 FgRgsA 결실 돌연변이체는 야생형 균주보다 더 높은 수준의 DON 및 ZEA를 생산했다. 대조적으로, 또 다른 다섯 개의 RGS 유전자 결실은 변화된 독소(toxin) 수준을 나타내지 않았다(도 3). 컴플리멘테이션화된 균주에서 측정된 독소 생산 수준은 야생형 균주의 수준과 유사했다.

[0067]

<실시예 6> FgF1bA, FgRgsA 및 FgRgsB는 병독성(virulence)을 위해 필요하다

[0068]

G. zeae 균주 각각을 소맥두(wheat head) 상에서 병충해 증상을 나타내는 소맥 잔이삭의 수를 카운팅함으로써 정량화했다. 야생형 및 컴플리멘테이션화된 균주는 신선한 소맥 잔이삭을 콜로니화할 수 있었고 접종한지 14일 내의 전체두(entire head) 상에서 분명한 붉은곰팡이병(Fusarium Head blight; FHB) 증상을 가질 수 있었다. $\Delta fglbA$, $\Delta fgrgsA$ 및 $\Delta fgrgsB$ 돌연변이체는 단지 접종된 잔이삭을 콜로니화할 수 있었지만, 다른 잔이삭에게로 전파되지 않았다(표 1 및 도 4). 대조적으로, 다른 4개의 RGS 결실 돌연변이체는 야생형 균주의 증상과 유사한 전형적인 이삭마름병(head blight) 증상을 일으켰다.

[0069]

<실시예 7> G α 의 위치지정 돌연변이(Site-directed mutagenesis) 및 RGS의 과발현

[0070]

또한 G α 단백질(예컨대 GzGPA1, GzGPA2 및 GzGPA3) 및 RGS 단백질 간의 상관관계를 조사하기 위해서, 돌연변이체 $gzgpa1^{G42R}$, $gzgpa1^{G203R}$, $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP), $gzgpa2^{G206R}$, $gzgpa3^{Q204L}$ 및 $gzgpa3^{G203R}$ 을 위치지정 돌연변이에 의해 제조했다. $gzgpa1^{G42R}$ 에서의 돌연변이는 GzGPA1의 G α 의 서브유닛에서 글라이신 42를 알지닌으로 전환시킨 것인 반면에, $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP) 및 $gzgpa3^{Q204L}$ 돌연변이체는 GzGPA2 및 GzGPA3 각각의 G α 서브유닛에서 207 및 204의 글루타민의 류신으로의 치환체를 각각 포함한다. 이 돌연변이체들은 G α 서브유닛의 내생적인 GTPase 활성을 파괴할 것이라 예상되고, 따라서 우성 활성의 G 단백질 신호전달을 일으킨다. 대조적으로, $gzgpa1^{G203R}$, $gzgpa2^{G206R}$ 및 $gzgpa3^{G203R}$ 돌연변이체는 우성 간섭의 돌연변이체로서 G α 서브유닛에서 203 또는 206의 글라이신을 알지닌으로 대체시켰다. 또한, 이러한 위치지정 돌연변이 반응을 위해 설계된 올리고머는 바람직한 돌연변이체의 빠른 스크리닝을 용이하게 하도록 변형된 제한효소 사이트를 포함하고 있다. 이후 적합한 BsrFI, AccI 및 EaeI 사이트가 있거나 없는 돌연변이체를 시퀀싱했다. FgF1bA 과발현 돌연변이를 생성하기 위해서, FgF1bAOE 균주를 자연상의 프로모터 대신에 과발현되는 EF1 α (P_{EF1 α})에서 기원된 프로모터의 조절 하에서 FgF1bA를 발현시키기 위해서 변형시켰다(도 S4A). FgF1bAOE 균주에서 FgF1bA의 발현이 완전배지에서 야생형과 비교해서 높게 조절되는 것을 보았다.

[0071]

<실시예 8> FgF1bA는 GzGPA2-매개 신호전달 경로를 경유하여 다양한 세포 과정을 조절한다.

[0072]

Ga 단백질 및 FgF1bA 돌연변이의 표현형 분석을 3 개의 Ga 단백질들 중에서 FgF1bA의 기능적 대응체를 찾기 위해 수행했다. 이 분석법에서, GzGPA1의 $gzgpa1^{G42R}$ 및 $gzgpa1^{G203R}$ 양 돌연변이체는 $gzgpa1^{G42R}$ 돌연변이체와 달리 모두 자낭막의 초기 구조를 전혀 생산하지 않았고, 우성 간섭 돌연변이체($gzgpa1^{G203R}$)의 배지는 $gzgpa1^{G42R}$ 돌연변이체와는 달리 성유도 후 매우 멜라닌화되었다(도 5).

[0073]

그러나, 우성 활성의 GzGPA2($gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP)) 및 우성 간섭의 GzGPA2 단백질($gzgpa2^{G206R}$)을 수반하는 돌연변이의 자낭막 발달 및 색소형성은 FgF1bA의 결실 및 과발현 돌연변이에 의해 각각 나타난 것과 유사했다(도 5). 더욱이 FgF1bA 결실 균주(기탁번호 KCTC 12244BP)와 $gzgpa1^{G42R}$ 및 $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP) 돌연변이 간의 영양 생장의 차이에도 불구하고 유사한 표현형을 유성/무성 생식 및 병독성 분석에서 또한 관찰했다(표 2, 도 5 및 6). GzGPA3 돌연변이는 유성/무성 생식 또는 병독성에서 표현형 변화를 전혀 나타내지 않았다. 또한 *G. zeae* 균주의 세포벽 구성 요소의 잠재적 결손을 곰팡이의 카보하이드롤레이즈 혼합물을 이용하여 처리한 후 원형질체 생산의 효율에 기초해서 분석했다. GzGPA2 결실 돌연변이체는 기존에 보고된 것처럼 트리셀레이즈 처리 후 90 분까지는 원형질체를 생산하지 못했다(Yu et al., 2008), 그러나 우성 활성의 GzGPA2 돌연변이체($gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP)) 및 FgF1bA 결실 균주(기탁번호 KCTC 12244BP)는 트리셀레이즈에 아주 민감한 것으로 보였다(도 7). 다른 돌연변이체들은 야생형 균주가 생산하는 것과 유사하게 원형질체 생산을 나타냈다.

[0074]

이를 종합하면, 상기 실험데이터들은 FgF1bA가 유성/무성 생식, 병독성 및 세포벽 조성을 GzGPA2-의존적인 방법으로 조절한다는 것을 시사한다. 그러나, 균사의 성장 동안의 발달 표현형 및 발아 속도는 다른 표현형 패턴들과 일치하지 않는 것으로 관찰되었다.

[0075]

표 2 *G. zeae* 균주의 영양 성장 및 분생자 형성

[0076]

[표 2]

Strain	Radial growth (mm) ^a	Conidia production (number/ml) ^b
WT	76 A ^c	2.0×10^6 A
$gzgpa1^{G42R}$	55 B	2.5×10^3 B
$gzgpa1^{G203R}$	44 B	1.7×10^6 A
$gzgpa2^{Q207L}$	48 B	2.0×10^4 B
$gzgpa2^{G206R}$	72 A	2.9×10^6 C
$\Delta fgf1bA$	78 A	4.5×10^5 B
FgF1bAOE	80 C	1.9×10^6 A

[0077]

^a 방사상의 성장을 감자 텍스토로오스 아가(PDA) 상에서 접종한지 4일 후에 측정했다.

[0078]

^b 분생자 형성을 카복시메틸셀룰로오스(CMC) 배지에서 3일 동안 배양한 후 생산된 분생자의 수를 카운팅함으로써 측정했다.

[0079]

^c 서로 다른 표기를 한 칼럼 내의 값들은 SPSS 12.0 소프트웨어(SPSS, Inc., Chicago, IL)를 이용한 Tukey 테스트($p < 0.05$)에 따라 의미있게 차이가 있다. 모든 데이터는 3개의 생물학 레플리케이트(replicate)로부터 획득되었다.

[0080]

[0081]

<실시예 9> FgF1bA는 GzGPA1 및 GzGPA2 신호전달 경로의 조절을 통한 DON 및 ZEA 생합성과 차별적으로 관련이 있다.

[0082]

$gzgpa1^{G42R}$ 및 $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP) 돌연변이는 야생형 균주보다 의미있게 더 높은 수준의 DON을 생산했다. 특히, 우성 활성의 GzGPA2 돌연변이체인 $gzgpa2^{Q207L}$ (기탁번호 KCTC 12244BP)는 FgF1bA 결실 돌연변이

체(기탁번호 KCTC 12243BP)가 했던 것처럼 야생형 균주보다 약 280배 더 높은 수준의 DON을 축적했다(도 8). ZEA 생산을 위해서, *gzgpa1*^{G42R} 돌연변이체는 FgF1bA 결실 돌연변이체로서 야생형 균주보다 더 높은 수준의 마이코톡신을 생산했다. G 단백질의 우성 간섭의 돌연변이인 *gzgpa1*^{G203R}, *gzgpa2*^{G206R} 및 FgF1bA 과발현 돌연변이체는 야생형과 비교해서 유사한 수준의 마이코톡신을 생산했다(도 8).

수탁번호

[0083]

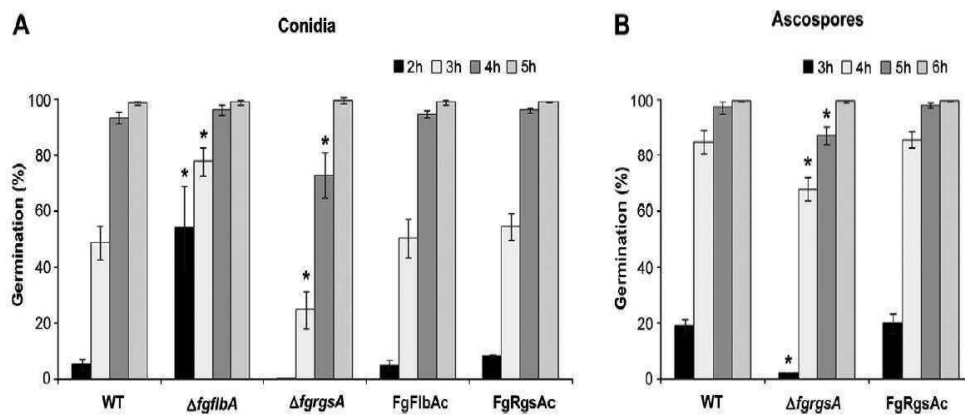
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12244BP

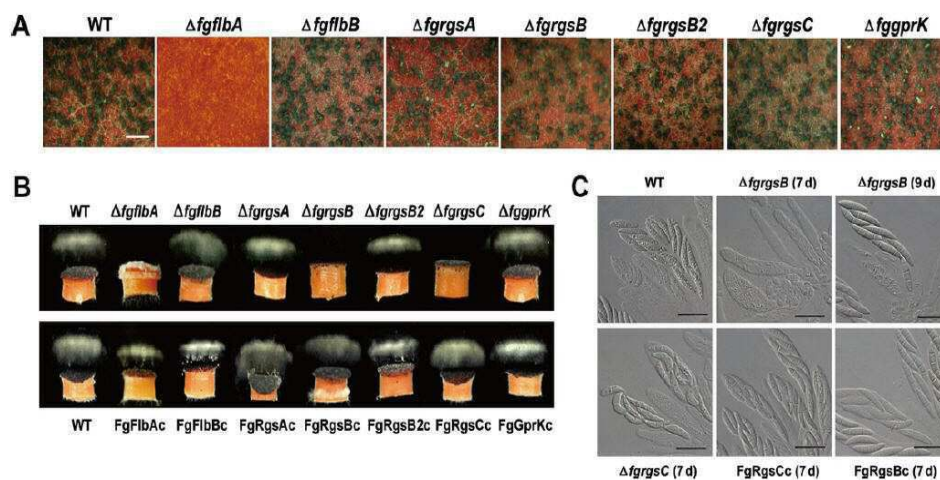
수탁일자 : 20120731

도면

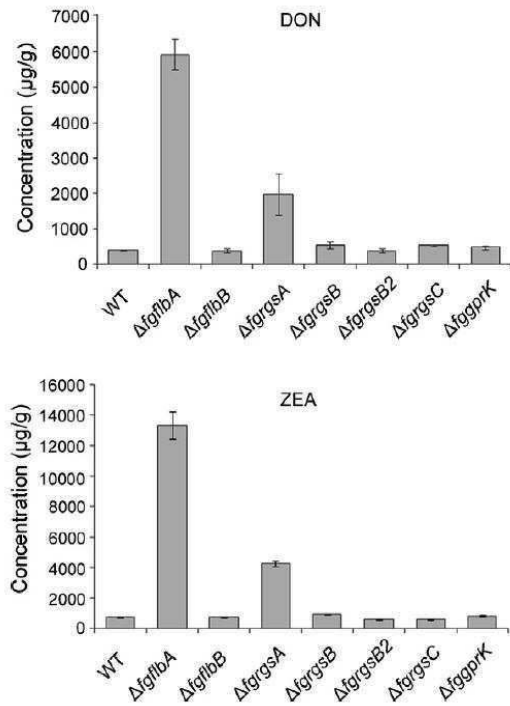
도면1



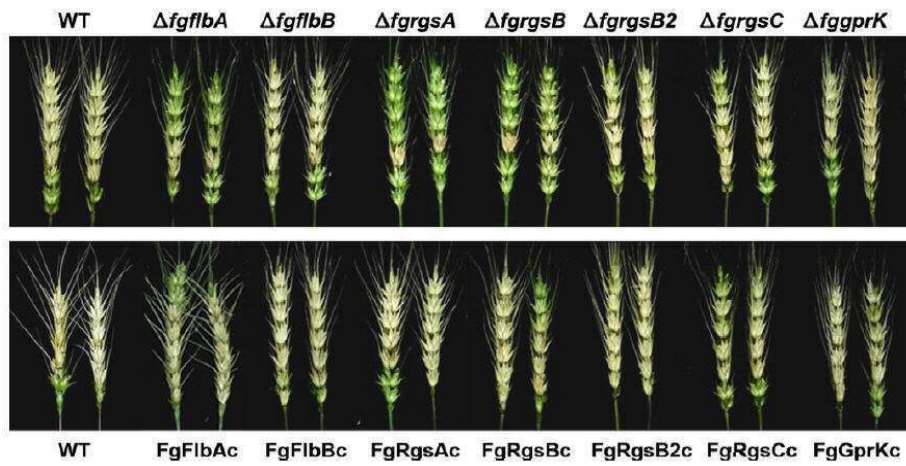
도면2



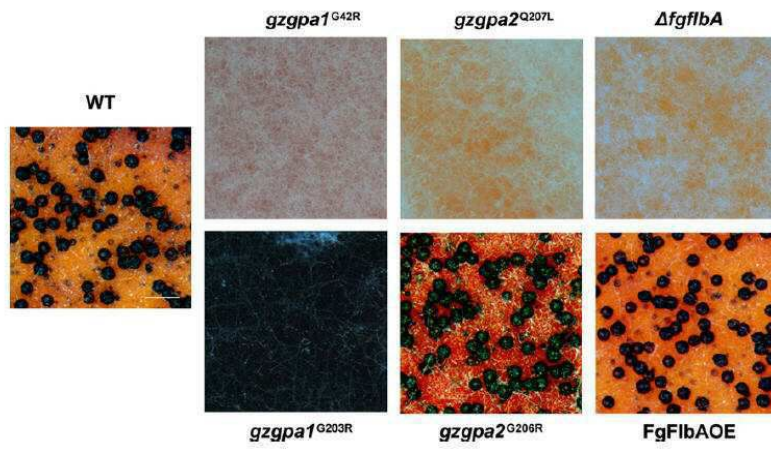
도면3



도면4



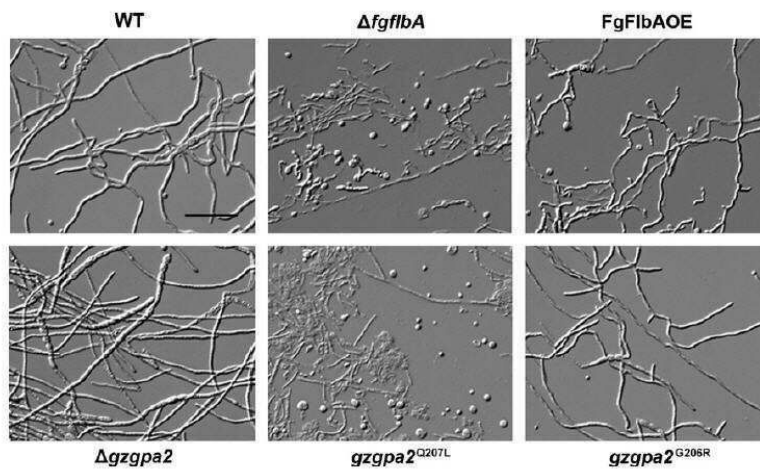
도면5



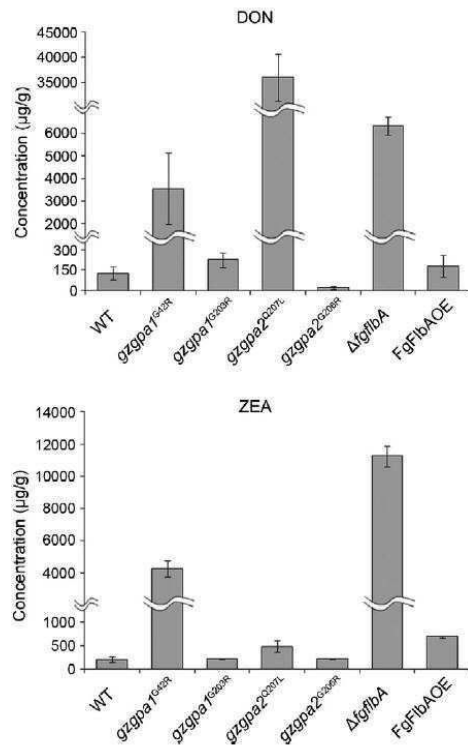
도면6



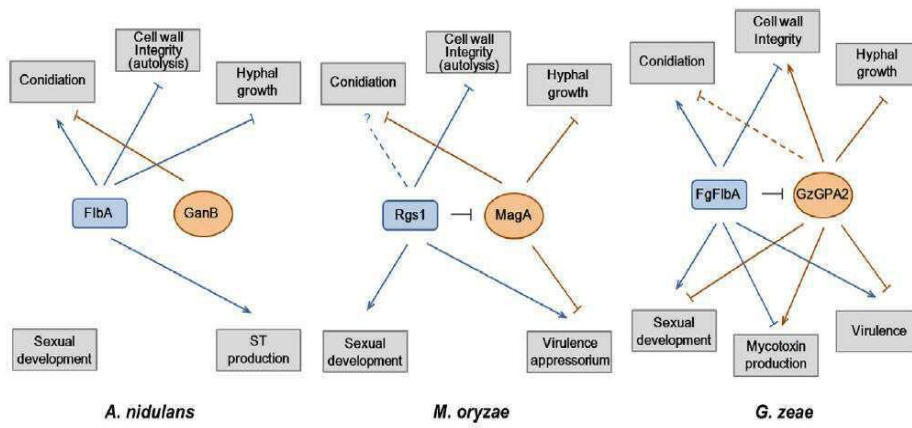
도면7



도면8



도면9



도면10

Primer ^o	Sequence (5'-3') ^o
FgFibA-5for ^o	TTACTGTCAATCGGTCGTGCTCG ^o
FgFibA-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGAGGGCCAGGATCAGGGTCAAG ^o
FgFibA-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGATCCAGACTTGAGGCCAGAACCA ^o
FgFibA-3rev ^o	GAGGGGAAATGAGGAAAAAGAAACA ^o
FgFibA-5nf ^o	TGTTACGTACCTACCTCGTGCGCAATTG ^o
FgFibA-3nr ^o	TGACCCGTGTTAICTGCGGCTTCTCA ^o
FgFibB-5for ^o	CCTGCTGGGCTAGTCAAGTGTTTA ^o
FgFibB-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGAACTCAATTCATGGGTGCGGAG ^o
FgFibB-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGACGCGCATGCCACCCCTAC ^o
FgFibB-3rev ^o	ACGCCAACTCTTAAGCCCCG ^o
FgFibB-5nf ^o	GCTGCCGGGCAAAACAAAA ^o
FgFibB-3nr ^o	TGGCCACGGCTGCTCTC ^o
FgRgsA-5for ^o	CTGGATGGCGGAGCACTATT ^o
FgRgsA-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGAGAAAGCGGAAGATGGTTGAGGT ^o
FgRgsA-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGAGCCGGTCTTCAACAGCAACAC ^o
FgRgsA-3rev ^o	CGTTACCTGACTCACTCAAGCCAT ^o
FgRgsA-5nf ^o	TGACCAACCTTCGGACGGACTTCT ^o
FgRgsA-3nr ^o	AGAGGCCGTTGTCGTATCATCAG ^o
FgRgsB-5for ^o	CCGTTGTCGATAGCAGACCCTC ^o
FgRgsB-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGACGACGACAAGCCGCTGTATT ^o
FgRgsB-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGACGCGGATTAATTGGGACATAAT ^o
FgRgsB-3rev ^o	GCAAGGAACCAAGGCAGCAC ^o
FgRgsB-5nf ^o	ACCCGTCAGCAITCAATCCCAATA ^o
FgRgsB-3nr ^o	CCCATGCACCCCGAGTCC ^o
FgRgsB2-5for ^o	ATCGCGCAAAAGCAATATGAAC ^o
FgRgsB2-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGAGTCGAAAGCCAAGGATCAGG ^o
FgRgsB2-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGATCATCATCAGAC ^o
FgRgsB2-3rev ^o	TCGTCCGTCATCTTCTCAAACTA ^o
FgRgsB2-5nf ^o	CGAAGCATCGGCGACAAGGAAC ^o
FgRgsB2-5nr ^o	ATGGTCGTACTCTTCAGCCCAATCTT ^o

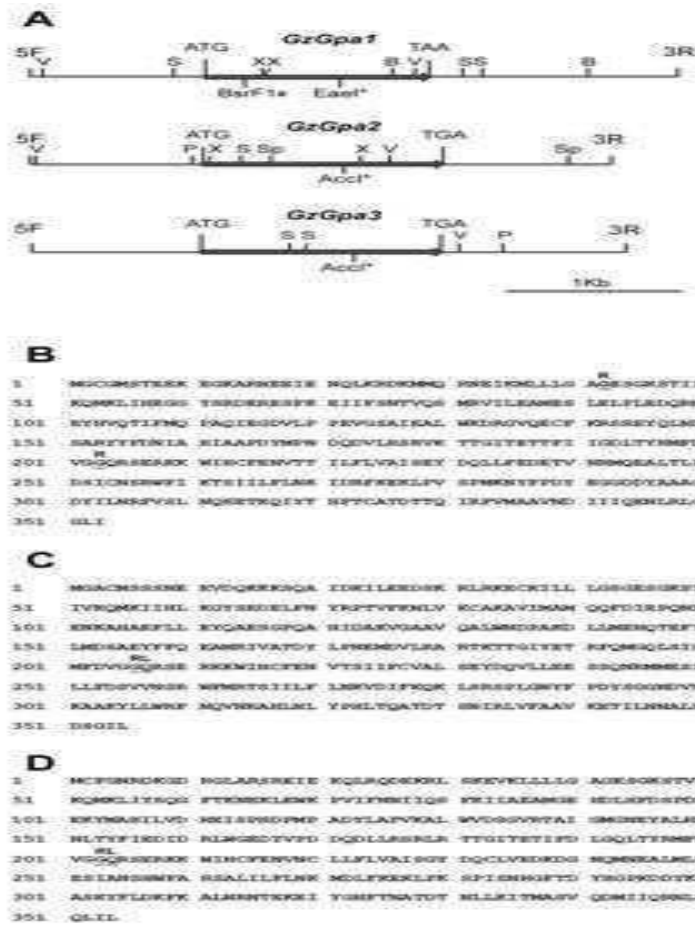
도면11

FgRgsC-5for ^o	TAGGCCTGGAGATTGCGACAC ^o
FgRgsC-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGACTGTCAAATAGCTGCGGGA ^o
FgRgsC-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGAAAGCGTTGGGCGTCACTG ^o
FgRgsC-3rev ^o	GCCATTCATAAGCTTAACCTCGGTG ^o
FgRgsC-5nf ^o	GGAAGAAGAAGAGGCGGACGAGTGT ^o
FgRgsC-3nr ^o	TGGGGCAAGGCGGACAGG ^o
FgGprK-5for ^o	AATCTTGCTTGGTTTGGGAGGTAA ^o
FgGprK-5rev ^o	GCACAGGTACACTTGTTTAGAGAAATGGAAGGGCGAGGGCG ^o
FgGprK-3for ^o	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGAAAGCGTCTGCCCATGTGATAG ^o
FgGprK-3rev ^o	TGAGTGTGCGATTCCAAAGTGTAG ^o
FgGprK-5nf ^o	CACAGCAACAGGCGACAACTTCAA ^o
FgGprK-3nr ^o	GCGCGGTGCAAGGAAAGAAAC ^o
Gen-for ^o	CGACAGAAGATGATTTGAAGG ^o
Gen-rev ^o	CTCTAAACAAGTGACTCTGTG ^o
RT-FgFibA-for ^o	GACGTGCTGTTTGGAGATGCTC ^o
RT-FgFibA-rev ^o	TTCCGTTGGACCTGCTTTGGC ^o
RT-FgFibB-for ^o	AGCGTGGTCAAGACCTCGTCG ^o
RT-FgFibB-rev ^o	GCTTGTGTCGGTTGCTCTCAATTGA ^o
RT-FgRgsA-for ^o	TGCATCATCATCATGAACCCGAG ^o
RT-FgRgsA-rev ^o	ACCAACTTAGCACCCATCTTCTTCC ^o
RT-FgRgsB-for ^o	TGGATCCTATTATGGCCCTGATTGG ^o
RT-FgRgsB-rev ^o	TCCGGGGACGAGAATGAAGAGAA ^o
RT-FgRgsB2-for ^o	GCGAGAACAATGATGACTTGACTAAGC ^o
RT-FgRgsB2-rev ^o	TCCGCTGGATGAAATGGTGTCTT ^o
RT-FgRgsC-for ^o	TCCGCTCAATGTCAACGAAGAGAAC ^o
RT-FgRgsC-rev ^o	AAGAAGTTGCTGAAGAACACCAGCAG ^o
RT-FgGprK-for ^o	CCACAGCCAACAAGTCAAGTCAT ^o
RT-FgGprK-rev ^o	GATGTGCGCCTCAGAGTCGTCAA ^o
RT-FgCyp1-for ^o	TCAAGCTCAAGCACCAAGAAGG ^o
RT-FgCyp1-rev ^o	GGTCCGCCCTCCAGTCT ^o
GzGPA1-5for ^o	CATCTCGGATCTGCTCTGATT ^o
GzGPA1-3rev ^o	TGTCTATCGACAGGTCACCGTGT ^o

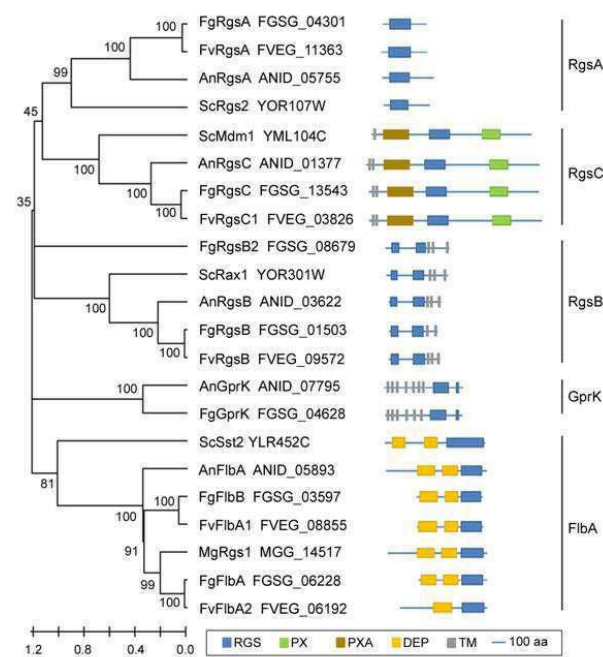
도면12

GzGPA1-nf ^o	ATTCTCACTCCAGCTCTTGG ^o
GzGPA1-nr ^o	ATGCAITGTCATACCAGAGA ^o
GzGPA1G42R-5for ^o	AATCCGGAAAAATCTACTACTCTGAAGCAGATGAAGCTTATCCACGA ^o
GzGPA1G42R-3rev ^o	AAGCTTCACTGCTTCAGGATAGTAGATTTCGGGATTACCGGGCACCTAGAAG ^o
GzGPA1G203R-5for ^o	CACATACCGAATGTCGACGTTGGTCGGCAAAGATCCGAGCGAAAGAAAGTGGA ^o
GzGPA1G203R-3rev ^o	TCCACTTCTTCGCTCGGATCTTGGCCGACCAACGTCAACATTCGGTATGTG ^o
GzGPA2-5for ^o	GAACGGTCGAGGTCTCTTTGTA ^o
GzGPA2-3rev ^o	GCCAACAAGCCATATACCGATA ^o
GzGPA2-nf ^o	TCGCTCCAATTAGTCCATCTGCTA ^o
GzGPA2-nr ^o	CACATCTTCGTTCCAA ^o
GzGPA2Q207L-5for ^o	GTTATCATAGTATGTTGACGTCGGTGGTCTACGAAGCGAGAGGAAGAAGTGGATACA ^o
GzGPA2Q207L-3rev ^o	TGTATCCAATTCTTCTCTCGCTTCGTAGACCACCGAGCTCGAACATACTATGATAAC ^o
GzGPA2G206R-5for ^o	GTTATCATAGTATGTTGACGTCGGTAGACAGCGAAGCGAGAGGAAGAAGTGGATACA ^o
GzGPA2G206R-3rev ^o	TGTATCCAATTCTTCTCTCGCTTCGTCTACCGACGTCGAACATACTATGATAAC ^o
GzGPA3-5for ^o	TACCTAGAGAGGTACGCTCCAAAG ^o
GzGPA3-3rev ^o	ATAGCAATCCGCTCTCTCTGTACT ^o
GzGPA3-nf ^o	CCACTGCCAAAAAACCTTAGCTTGCA ^o
GzGPA3-nr ^o	TGAGCATCAAGCAGACCAGTGA ^o
GzGPA3Q204L-5for ^o	AGTTGACCTACCGTATGTTTGATGTTGGTGGTCTACGATCAGAGCGAAAGAAGTGGATT ^o
GzGPA3Q204L-3rev ^o	AACTCACTCTTTTCGCTCTGATCGTAGACCACCAACATCAACATACGGTAGGTCAACT ^o
GzGPA3G203R-5for ^o	AGTTGACCTACCGTATGTTTGATGTTGGTCGACAGCGATCAGAGCGAAAGAAGTGGATT ^o
GzGPA3G203R-3rev ^o	AACTCACTCTTTTCGCTCTGATCGCTGTCGACCAACATCAACATACGGTAGGTCAACT ^o
EF pro-5for ^o	GAATTCGGTACCTATAGGCGCAATTG ^o
EF pro-3rev ^o	TTTGAAGATTGGGTTCCCTTTTGTG ^o
FgFibA-OE-5for ^o	CAATTGCGCCTATAGGTACCGGAATTCGCAATTTGAAGTAGGGAAGAGCTTAC ^o
FgFibA-OE-3for ^o	CACAAAAGGAACCAATCTTCAAAATTCATGTTGTGCTTTGATCGCGCGTTTC ^o

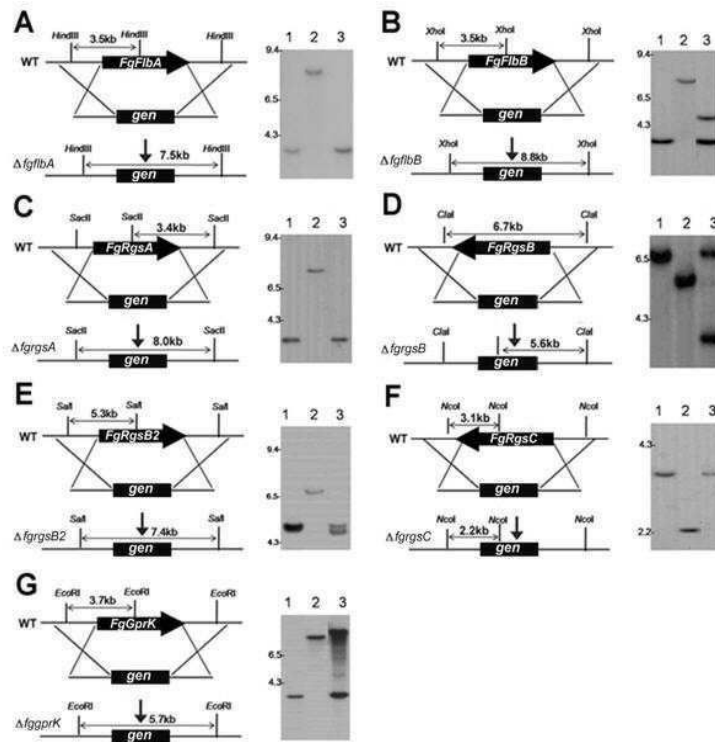
도면13



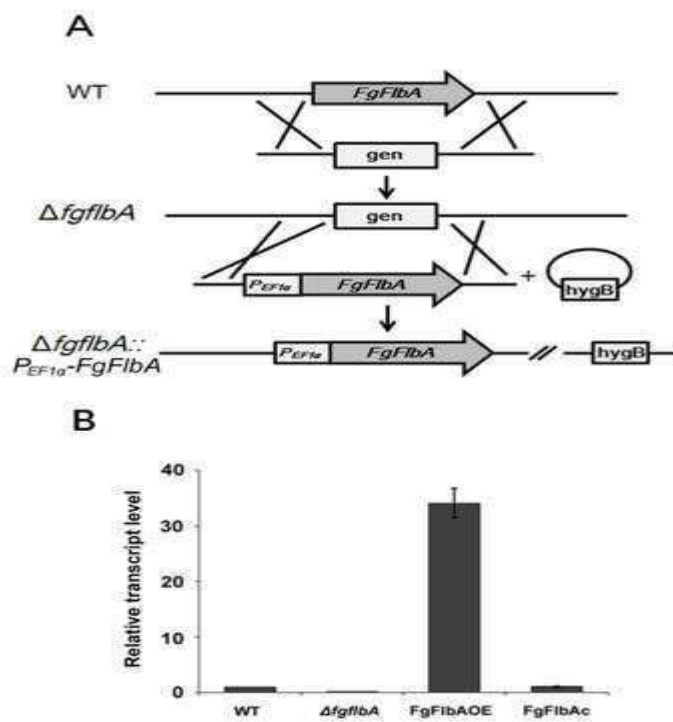
도면14



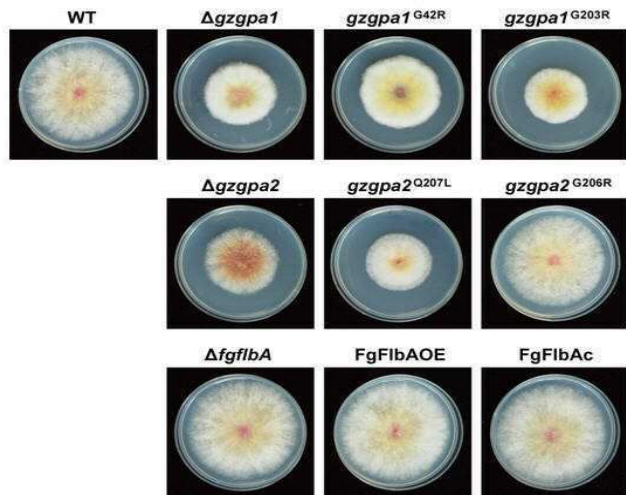
도면15



도면16



도면17



도면18

