



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0151768
(43) 공개일자 2023년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/20 (2020.01)
A01P 1/00 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A01N 63/20 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0051521
(22) 출원일자 2022년04월26일
심사청구일자 2022년04월26일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김진우
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(평거동, 들말대경아파트)
(74) 대리인
특허법인충정

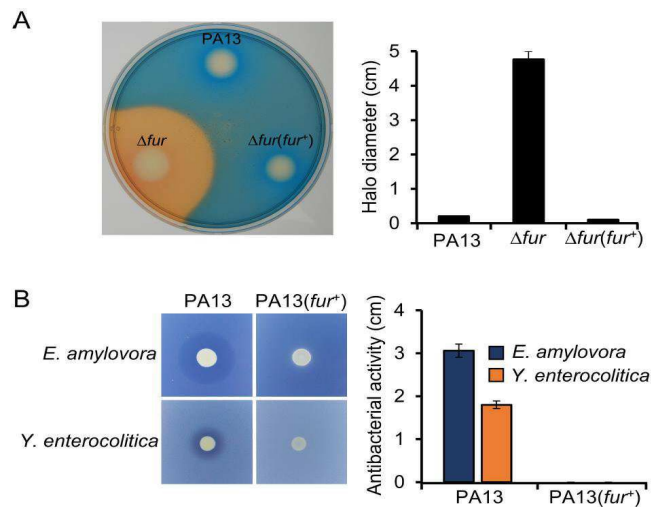
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 에어로박틴 및 데스페리옥사민-이를 고효율로 생성하여 과수화상병에 대한 방제효과를 갖는 판토에아 아나나티스 변이균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 에어로박틴 및 데스페리옥사민-이를 고효율로 생성하여 과수화상병에 대한 방제효과를 갖는 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 변이 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 판토에아 아나나티스 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자를 결손시킨 돌연 변이 판토에아 아나나티스 균주, 상기 균주를 이용한 시데로포어의 대량 생산방법, 상기 균주를 포함하는 과수화상병(fire blight) 방제용 제제 및 상기 과수화상병 방제용 제제를 식물 또는 식물의 주변에 처리하는 단계를 포함하는 과수화상병 방제방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A01P 1/00 (2021.08)

C12N 15/74 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345332138
과제번호	2015R1A6A1A03031413
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	농업생명과학연구원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자를 결손시킨, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 야생형 판토에아 아나나티스 균주에 비해 시데로포어(siderophore) 생성이 증가된 것을 특징으로 하는, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 시데로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)인 것을 특징으로 하는, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 식물병원균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 및 에르시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*)에 대한 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주.

청구항 6

제1항의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 시데로포어의 대량 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 시데로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)인 것을 특징으로 하는, 시데로포어의 대량 생산방법.

청구항 8

제1항의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 과쇄물을 유효성분으로 포함하는, 과수화상병(fire blight) 방제용 제제.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 과수화상병(fire blight) 방제용 제제는 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주로부터 생산된 시데로포어를

함유하는 것을 특징으로 하는, 과수화상병(fire blight) 방제용 제제.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 시데로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)인 것을 특징으로 하는, 과수화상병(fire blight) 방제용 제제.

청구항 11

제8항의 과수화상병 방제용 제제를 식물 또는 식물의 주변에 처리하는 단계를 포함하는, 과수화상병 방제방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)를 고효율로 생성하여 과수화상병에 대한 방제효과를 갖는 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 변이 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과수화상병(fire blight)은 대표적인 세균성 식물 전염병 중의 하나로, *Erwinia amylovora*(에르위니아 아밀로보라)가 그 원인균으로 밝혀져 있으며, 마치 화상을 입은 것처럼 배 또는 사과나무의 꽃, 가지, 열매 등을 까맣게 고사시킨다고해서 국내에서는 화상병으로 불린다.

[0003] *Erwinia amylovora*(에르위니아 아밀로보라)는 배나무 또는 사과나무 등의 과수에서 화상병을 야기하는 그람 음성(Gram-negative) 식물병원균으로, 에르위니아 아밀로보라의 대표적인 증상으로는 잎은 시들고 흑색으로 변하여 마르며, 줄기나 열매도 처음에는 수침상의 병반이 생기고 움푹 들어가며 열매가 시들어가며 화상을 입은 것처럼 검게 변한다. 이 병원균은 한국에서는 2015년 사과와 배의 화상병을 통해 처음으로 보고되었고, 곤충이나 비바람에 의해 전염되어 꽃, 꽃샘, 기공, 피목, 상처 등을 통해 기주체로 침입하기 때문에 전염성이 높고 배나무, 사과나무, 살구나무 등 70여종의 식물을 침해할 수 있다.

[0004] 이러한 식물병원균에 의해 발생하는 과수화상병은 당해의 수확을 망칠 뿐만 아니라, 장기간의 타격도 줄 수 있다. 꽃의 감염은 과일을 말려 죽여, 당해의 수확을 감소시키고 어린가지의 화상은 다음해의 과수가 열릴 가능성을 감소시킨다. 많은 과수 품종의 뿌리와 줄기에 있어서 화상은 큰 가지나 나무 전체마저도 파괴할 수 있다. 과수 수확에 대한 화상병의 잠재적인 영향을 감안해 봤을 때, 이 질병에 대한 해결책이 절실한 상황이다.

[0005] 현재 과수화상병에 대한 대응방법 중 하나는, 원예적인 실시에 의해 질병 발생을 최소한으로 하는 것이다. 예를 들어, 토양 수분을 감소시키고 비료 영양소의 균형을 유지함으로써 화상병의 감염 및 확산을 제어할 수 있는 방법이 있다. 그러나 이 방법은 본질적인 질병 발생을 제거할 수 없다.

[0006] 또 다른 방법으로는, 감염된 과수나 검게 변한 가지를 병원균이 휴지 기간을 갖는 겨울에 제거함으로써 화상병을 치료하는 것이다. 그러나 이러한 방법은 장비의 멸균에 주의하여 질병의 확산을 방지해야 한다. 또한 이 방법은 작은 병변 또는 내부 감염을 다 검출할 수 없기 때문에 질병을 완전하게 근절할 수 없다.

[0007] 따라서 과수 화상병과 같은 식물병을 효과적으로 방제할 수 있는 새로운 기술의 개발이 필요한 실정이다.

[0008] 한편, 철(iron)은 병원성 유기체, 숙주 및 숙주를 둘러싼 병원성 미생물을 포함하여 거의 모든 형태의 생명체에 필수적인 영양소이다. 그러나 철의 생체이용률은 매우 제한적이어서 숙주와 병원성 박테리아 간의 경쟁에서 중요한 요소가 된다. 인간과 같은 고등생물체에서는 주로 철은 단순한 형태로 흡수되어 생체 내 다양한 부위에 전해진다. 그러나 박테리아의 경우, 철이 부족한 환경에서 다른 형태의 철 흡수 기작을 지니고 있으며 시데로포어(siderophore)를 이용하여 철의 흡수를 활성화시키는 독특한 기작이 알려져 있다. 특히 철이 부족한 환경에서 철을 흡수하기 위해 대부분의 박테리아는 시데로포어로 알려진 고친화성 철 결합 킬레이터를 생성하고 분비한다.

[0009] 지금까지 많은 종류의 시데로포어가 알려져 있는데, 철 결합 능력을 부여하는 부분에 따라 catecholates, hydroxamates, phenolates, carboxylates 및 혼합 형태의 5가지 주요군으로 분류되어 있다. 에어로박틴(aerobactin)은 많은 독성 대장균 균주와 장내세균(*Enterobacteriaceae*)이 혼합된 시데로포어로서, 에어로박틴

은 원래 *Aerobacter aerogenes*에서 분리되었고, 에어로박틴 생합성 및 흡수를 인코딩하는 유전자는 5개의 유전자(*iucABCD* 및 *iutA*)를 포함하는 오페론으로 클러스터링되어 있다. 이중 4개의 유전자(*iucABCD*)는 에어로박틴 생합성 단백질을 인코딩하는 반면 *iutA*는 고친화성 외막 수용체를 인코딩한다.

[0010] 또한, 데스페리옥사민(Desferrioxamines; DFO)은 *Streptomyces* sp.에서 처음으로 분리된 히드록사메이트(hydroxamate) 그룹의 시테로포어로서, DFO-B 및 DFO-E는 *Streptomyces coelicolor*에서 생산되는 것으로 알려져 있다. 또한 DFO는 *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas stutzeri* 및 *Erwinia amylovora*를 포함한 장내세균(Enterobacterales)에서도 발견된 것으로 보고된 바 있다.

[0011] 시테로포어는 식물병원성 박테리아의 많은 종에서 종종 숙주 식물과 경쟁하여 철 흡수를 위해 분비되는 것으로 알려져 있다.

[0012] 또한 시테로포어의 철이온 흡착 기능은 다양한 분야에 응용되고 있는데, 병원성 미생물의 경우 철이온의 이용 능력이 병원성에 영향을 미치는데, *Pseudomonas* spp.가 생산하는 시테로포어인 desferol은 의약품으로 개발되어 병원성 미생물의 병원성을 약화시키기 위해 이용되고 있고, 항생제의 흡수를 방해하여 항생제 내성을 나타내는 경우 항생제를 시테로포어 결합체 형태로 처리하여 항생제 흡수를 촉진시켜 항생제 내성 미생물의 제어에도 이용되고 있다. 뿐만 아니라, 시테로포어는 철이온 이외의 다른 중금속과의 결합능력이 있어서 이를 이용하여 오염수의 중금속 제거에 사용하려는 시도가 이루어지고 있다.

[0013] 한편, 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주는 쌀, 옥수수, 양파, 멜론, 파인애플과 같은 경제적으로 중요한 작물에 질병을 일으키는 식물 병원체이며, 인간과 곤충에도 감염되는 것으로 알려져 있다. *P. ananatis*에 속하는 *Pantoea ananatis* PA13 균주는 국내에서 쌀알썩음병(rice grain rot), 벼잎집썩음병(sheath rot) 및 양파중심 부패병(onion center rot diseases)을 유발시키는 병원균으로 알려져 있다.

[0014] 또한 독성, 엑소폴리사카라이드 생산 및 과민 반응이 *P. ananatis* PA13에서 정족수 감지에 의해 조절된다는 것이 알려져 있고, *P. ananatis* PA13에 의한 카로티노이드 생산이 Hfq-제어된 퀴럼 센싱에 의한 것으로 알려져 있다.

[0015] 최근에는 *Pantoea* 균주에 대한 전체 게놈 조사가 진행되었고, 시테로포어 생합성 클러스터 식별을 위한 연구가 진행되고 있으나, 아직까지 *P. ananatis*에서 시테로포어의 역할이 밝혀지지 않고 있으며, *Pantoea ananatis* PA13 균주의 병원성을 제어하여 식물병을 방제할 수 있는 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2013-0029213
(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 10-2017-0015664

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 이에 본 발명자들은 *P. ananatis* PA13에서 에어로박틴과 DFO-E의 생합성 유전자 클러스터를 분석하였고, *P. ananatis*에서 시테로포어의 역할을 규명하는 실험을 진행하였으며, 그 결과, 에어로박틴과 DFO-E의 생산이 철 흡수 조절 단백질(Fur)에 의해 부정적으로 조절되고 있는 것을 확인하였으며, *P. ananatis* PA13 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur)의 유전자를 결손시킨 *P. ananatis* PA13의 변이 균주의 경우, 야생형 *P. ananatis* PA13 균주에 비해 에어로박틴과 DFO-E의 생성이 월등히 우수한 것으로 나타났고, 식물병원균인 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대해 우수한 항세균 활성을 갖는다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0018] 따라서 본 발명의 목적은 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자를 결손시킨, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는,

시테로포어의 대량 생산방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 파쇄물을 유효성분으로 포함하는, 과수화상병(fire blight) 방제용 제제를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 과수화상병 방제용 제제를 식물 또는 식물의 주변에 처리하는 단계를 포함하는, 과수화상병 방제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자를 결손시킨, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 야생형 판토에아 아나나티스 균주에 비해 시테로포어(siderophore) 생성이 증가된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시테로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 식물병원균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 및 에르시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*)에 대한 항균 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0027] 또한 본 발명은 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 시테로포어의 대량 생산방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시테로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)일 수 있다.

[0029] 또한 본 발명은 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 파쇄물을 유효성분으로 포함하는, 과수화상병(fire blight) 방제용 제제를 제공한다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 과수화상병(fire blight) 방제용 제제는 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주로부터 생산된 시테로포어를 함유하는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시테로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)일 수 있다.

[0032] 나아가 본 발명은 본 발명의 과수화상병 방제용 제제를 식물 또는 식물의 주변에 처리하는 단계를 포함하는, 과수화상병 방제방법을 제공한다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자를 결손시킨 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 야생형 판토에아 아나나티스 균주에 비해 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)의 시테로포어 생산능이 현저하게 증가되어 있고, 식물병 원인균인 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대한 항세균 활성이 우수하여 과수화상병을 효과적으로 방제하기 위한 제제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 철 흡수 및 조절을 담당하는 *Pantoea ananatis* PA13 유전자좌의 유전적 구성을 나타낸 것으로, 화살표는 시테로포어 생산 및 조절을 담당하는 유전자의 위치와 방향을 나타낸 것이며, (A)는 에어로박틴 생합성 및 수송에 관여하는 *P. ananatis iucABCD-iutA* 유전자 클러스터를 나타낸 것이고, (B)는 데스페리옥사민 E(DFO-E) 생합성 및 수송에 관여하는 *P. ananatis dfoJACS-foxA* 유전자 클러스터를 나타낸 것이며, (C)는 철 흡수 조절 단백질을 암호화하는 *P. ananatis fur* 유전자를 나타낸 것이다. 도 1에서 화살표가 있는 수직 막대는 *lacZY* 삽입

의 위치와 방향을 나타낸 것이고, Fur-결합 서열(TGATAAT)은 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA* 오픈 리딩 프레임(ORF)의 프로모터 영역을 표시한 것이며, 유전자 번호는 시테로포어 유전자 지도의 아래에 표시하였다.

도 2는 아그로박테리움(AB) 최소 한천배지에서 *Erwinia amylovora* ATCC19383 및 *Yersinia enterocolitica* ATCC9610에 대한 *P. ananatis* 야생형 PA13, 에어로박틴 및 DFO-E 생합성 오페론의 단일 오페론 유전자 돌연변이체 및 이중 오페론 유전자 돌연변이체의 항균 활성을 나타낸 것이다. 그래프는 박테리아 콜로니 주변의 할로 직경 평균값을 나타낸 것이고, 3번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준 편차값으로(SD) 나타낸 것이며, 플레이트 사진은 28° C에서 24시간 동안 배양하고 촬영한 것을 나타낸 것이다.

도 3은 *P. ananatis* 야생형 PA13, 에어로박틴 및 DFO-E 생합성 오페론의 단일 오페론 및 이중 오페론 유전자 돌연변이에 대한 시테로포어의 생산정도를 chrome azurol S (CAS) 표시판에서 분석한 결과를 나타낸 것으로, (A) 박테리아 콜로니 주변의 노란색 할로는 시테로포어 생산을 나타낸 것이며, 양성 대조군 균주로 는 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5를 사용하였고, 사진은 박테리아가 제거된 후의 플레이트를 보여준 것이나 콜로니 마진은 점선으로 표시하였다. (B)는 각 실험군의 시테로포어의 상대적인 생산 정도를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 *P. ananatis* 야생형 PA13, 오페론의 단일 오페론 및 이중 오페론 유전자 돌연변이체에 대한 독성을 양과 구근 및 벼 묘목에서 확인한 것으로, 박테리아 현탁액(OD600 = 0.8)을 주사기를 사용하여 양과 구근과 벼 묘목에 접종하였고, 이때 음성대조군으로 박테리아 현탁액 대신 물을 접종한 균을 사용하였다. 접종 후 18일과 15일 동안 벼 묘목과 양과 구근의 질병 발생 상태를 관찰하였고 사진을 촬영하였다.

도 5는 *P. ananatis*의 시테로포어 생산 및 항균 활성에 대한 Fur의 효과를 확인한 것으로, (A)는 *P. ananatis* 야생형 PA13, Δfur 돌연변이체 및 *fur* 유전자가 과발현된 *fur*⁺ 균주에서 시테로포어 생산에 미치는 Fur의 효과를 확인한 것으로, 시테로포어의 생산은 CAS 배지에서 박테리아 콜로니 주변에 형성된 할로의 직경 크기를 측정하여 분석하였고, (B)는 *P. ananatis* 야생형 PA13 및 *fur* 유전자를 과발현시킨 *fur*⁺ 균주의 항균활성이 Fur이 미치는 영향을 분석한 것으로, 항균활성은 AB 최소 아가 배지 상에서 박테리아 콜로니 주변에 형성된 억제존의 직경을 측정한 결과로 나타내었다.

도 6은 *P. ananatis*에서 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA*의 발현에 미치는 Fur의 효과를 분석한 것으로, 야생형 PA13L, Δfur 돌연변이 및 *fur* 발현 보완 균주(*fur*⁺)에서의 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA*의 발현수준을 베타 갈락토시다제 활성으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 철 결핍(A) 또는 철 충족 조건(B)에서 *P. ananatis* PA13 균주의 에어로박틴 및 DFO-E를 통한 철 흡수 조절자(Fur)-매개 철 흡수 조절을 모식도록 나타낸 것이다. 철이 결핍된 상태에서 철이 없는 Fur(Apo-Fur)는 시테로포어 유전자 오페론의 프로모터 영역에 있는 Fur 결합부위에 결합하지 않게 되고 RNA 중합효소(RNAP)가 시테로포어 유전자의 전사를 시작하고 더 많은 시테로포어 생산을 유도한다. 주변 환경에서 철의 산화환원 상태는 제3철(Fe3+)에 의해 지배될 가능성이 있다. Ferric-siderophore 복합체는 외막 수용체, 주변 세포질 결합 단백질 및 내막 수송체로 구성된 특정 흡수 시스템을 통해 내재화된다. 일단 박테리아 세포 내부에 들어가면 ferric-siderophore 복합체는 환원에 의해 해리된다. 철의 존재 하에서, Fe²⁺-Fur 복합체는 시테로포어 유전자 오페론의 프로모터 영역에 있는 Fur-결합 부위에 결합하여 RNAP 전사를 차단한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 발명은 에어로박틴 및 테스페리옥사민-이를 고효율로 생성하여 과수화상병에 대한 방제효과를 갖는 판토에아 아나나티스 변이균주 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [0036] 구체적으로 본 발명은 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자를 프레임 내 결손방법으로 결손시킨, 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 제공함에 특징이 있다.
- [0037] 본 발명자들은 과수화상병에 대한 방제 효과가 우수한 새로운 방제제를 개발하기 위해 판토에아 아나나티스 균주의 이용 가능성에 대한 연구를 진행하였다.
- [0038] 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주는 곤충과 동물뿐만 아니라 다양한 식물에 질병을 일으키는 세균성 병원체로 알려져 있다. 그러나 식물병원체로서 *P. ananatis* 균주의 독성 인자에 대해서는 전혀 밝혀진 바가 없어, 본 발명자들은 *P. ananatis* PA13 균주를 이용하여 다른 박테리아와 경쟁하는 시테로포어의 기능과 식물 병

원성에 대한 분석을 수행하였다.

- [0039] 시테로포어는 종래 연구된 보고에 의하면 식물 병원체에서 독성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있고, 철이 부족한 환경에서 박테리아 등의 식물 병원체는 시테로포어를 이용한 철의 흡수 활성화 기작이 알려져 있다. 그러나 아직까지 *P. ananatis* 균주에서의 시테로포어가 갖는 역할에 대해서는 연구된 바가 없다.
- [0040] 이에 본 발명자들은 에어로박틴 또는 데스페리옥사민이 각각 결실된 *P. ananatis* 돌연변이체 및 에어로박틴과 데스페리옥사민이 모두 결실된 *P. ananatis* 돌연변이체를 제조한 후, 시테로포어의 생산능 및 항균(항세균) 활성을 분석하였는데, 에어로박틴과 데스페리옥사민이 모두 결실된 돌연변이체만이 시테로포어의 생산능 및 항균(항세균) 활성이 완전히 상실된 것을 확인하였다(도 2 및 도 3 참조).
- [0041] 이를 통해 *P. ananatis* 균주의 에어로박틴과 데스페리옥사민은 시테로포어의 생산 및 항균 활성화에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었고, *P. ananatis* 균주의 항균 활성화는 철이 부족한 환경 조건에서 두 종류의 시테로포어를 생성하여 주변의 철을 효과적으로 선점함으로써 경쟁하는 다른 박테리아(세균)의 성장을 억제하여 항균 활성을 갖는다는 것을 알 수 있었다.
- [0042] 또한 본 발명자들은 *P. ananatis* 균주에서의 시테로포어 생산 및 항균 활성화에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)의 역할을 확인하기 위해, *P. ananatis* PA13 균주에서 Fur 유전자가 결실된 돌연변이(Δfur) 균주 및 P_{lac} -fur를 포함하는 플라스미드로 Δfur 돌연변이를 보완한 $\Delta fur(fur^+)$ 균주(즉, *fur* 유전자 발현이 보완된 균주)를 사용하여 각 균주의 시테로포어 생산 및 항균 활성을 분석하였다.
- [0043] 그 결과, Fur 유전자가 결실된 Δfur 돌연변이는 야생형에 비해 시테로포어의 생산이 증가한 것으로 나타났고, 반면 P_{lac} -fur를 포함하는 플라스미드가 도입된 $\Delta fur(fur^+)$ 균주는 야생형 균주와 유사한 것으로 확인되었다(도 5).
- [0044] 이를 통해, *P. ananatis* 균주에서 철 흡수 조절 단백질을 코딩하는 유전자의 결실은 시테로포어 생산을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0045] 항균 활성 분석결과, Fur 유전자를 과발현시킨 균주는 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대한 항균 활성이 완전히 상실된 것으로 나타나, Fur 유전자의 결실은 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대한 항균 활성을 증진시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [0046] 그러므로 본 발명에 따른 철 흡수 조절 단백질(*fur*)을 코딩하는 유전자가 결손된 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 시테로포어(siderophore) 생성능이 우수한 특징을 갖는다.
- [0047] 본 발명에 따른 상기 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 모균주인 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 균주의 게놈 유전자에서 *fur* 유전자를 프레임 내 결실(삭제) 방법을 통해 제조된 것일 수 있고, 본 발명에서 상기 시테로포어는 에어로박틴(aerobactin) 및 데스페리옥사민-이(desferrioxamine E)일 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 식물병원균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 및 에르시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*)에 대해 우수한 항균 활성을 갖는 특징이 있다.
- [0049] 한편, 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)은 세포 내 철 항상성을 유지하는 중요한 조절자로서, 철 이온의 존재 하에 Fur-철 이온 복합체는 타겟 유전자 프로모터의 보존된 DNA 서열인 Fur box에 결합하여 많은 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다.
- [0050] 이에 본 발명자들은 *P. ananatis* 균주에서 Fur에 의해 조절되는 유전자들을 분석하였는데, Fur 유전자를 결실시킨 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 시테로포어의 생산이 증가하는 것으로 나타났고, *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA* 유전자들의 발현도 증가하는 것으로 나타났다.
- [0051] 이를 통해 *P. ananatis* 균주에서 Fur는 시테로포어 합성 및 생성을 부정적으로 조절하며, Fur가 시테로포어 조절을 통해 항균 활성화에 직접적으로 관여한다는 것을 알 수 있었다.
- [0052] 본 발명에서 상기 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서 철 흡수 조절 단백질(*fur*)을 코딩하는 유전자가 결손된 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 서열번호 1로 이루어진 철 흡수 조절 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열에서 22번째 염기서열부터 423번째 염기서열로 이루어진 유전자 부위를 결실시켜 제조하

였다.

- [0053] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 상기 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 시테로포어의 대량 생산방법을 제공할 수 있다.
- [0054] 철 흡수 조절 단백질(fur)을 코딩하는 유전자가 결손된 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 야생형 판토에아 아나나티스 균주에 비해 시테로포어를 월등히 많은 양으로 생산할 수 있는 특징이 있는 바, 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주를 이용할 경우, 시테로포어를 대량 생산할 수 있다.
- [0055] 나아가 본 발명은 본 발명에 따른 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 파쇄물을 유효성분으로 포함하는, 과수화상병(fire blight) 방제용 제제를 제공할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 철 흡수 조절 단백질(fur)을 코딩하는 유전자가 결손된 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주는 과수화상병의 병원균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 및 에르시니아 엔테로콜리티카(*E. enterocolitica*)에 대한 항세균 활성을 갖는 에어로박틴 및 데스페리옥사민-이를 대량 생산할 수 있어 과수화상병을 효과적으로 방제할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 과수화상병 방제용 제제는 예를 들어, 직접 분사가 가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흠뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 본 발명의 과수화상병 방제용 제제는 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌-및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술폰네이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올 술페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술페이트화 핵사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리데실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술포이트 페액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0059] 적합한 고형 담체 물질은 원칙적으로, 모두 다공성이고, 농업적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 광물토류(예컨대 실리카, 실리카 겔, 실리케이트, 활석, 고령토, 석회암, 석회, 초크, 보울, 황토, 점토류, 백운석, 규조 토류, 황산칼슘, 황산 마그네슘, 산화마그네슘, 분쇄 합성물질), 비료(예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아), 식물성 제품(예컨대 곡물 가루, 나무 껍질 가루, 목분(wood meal) 및 견과 껍질 가루) 또는 셀룰로오스 분말일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 고형 담체는 1종류 또는 2종류 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0060] 본 발명의 과수화상병 방제용 제제는 유효성분으로서 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 파쇄물을 단독으로, 또는 2종 이상의 다른 식물병 방제제 등과 혼합하여 사용할 수 있으며, 또한, 식물체 흡수 및 효과를 증진시키기 위하여 확산제 및 침투제, 또는 계면활성제와도 혼용이 가능하다.
- [0061] 또한, 본 발명은 본 발명의 과수화상병 방제용 제제를 식물 또는 식물의 주변에 처리하는 단계를 포함하는, 과수화상병 방제방법을 제공할 수 있다.
- [0062] 상기 과수화상병 방제방법은 상기 본 발명의 돌연변이 판토에아 아나나티스 균주 및 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 파쇄물의 유효량을 이용한 방제용 제제를 식물이나 토양에 분무 또는 살포하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명의 '유효량'은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양으로, 식물병을 방제하기 위해 방제용 제제를 물로 균일하게 희석한 후 동력살포기와 같은 적절한 살포장치를 이용하여 식물체 및 경작지에 살포할 수 있다. 본 발명의 수화제 또는 액상 수화제를 물에 희석하는 경우 수화제 또는 액상 수화제의 농도는 유효성분이 생물학적으로 유효한 범위가 될 수 있도록 조절할 수 있다.

[0065] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0067] <준비에 및 실험방법>

[0068] 박테리아 균주 및 배양

[0069] 본 실험에서 사용한 박테리아 균주와 플라스미드는 하기 표 1에 기재된 바와 같다. 대장균(*E. coli*) 균주는 37 ° C의 LB(Luria-Bertani) 배지에서 배양하였다. *P. ananatis* PA13 균주는 LB 배지 또는 0.2% 포도당이 보충된 AB(Agrobacterium) 최소 배지에서 28 ° C의 온도로 배양하였다. 항생제로는 암피실린 100 µg/mL, 카나마이신 50 µg/mL, 리팜피신 50 µg/mL, 테트라사이클린 10 µg/mL, 젠타마이신 25 µg/mL을 사용하였다. 또한, 필요한 경우, 40 µg/mL 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside(X-gal)를 사용하였다.

표 1

Strain or plasmid	Relevant genotype ^a
<i>Acidovorax citrulli</i> AAC02	Wild type
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Wild type, nopaline-type, genomospecies G8
<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 19383	Wild type
<i>Escherichia coli</i>	
DH5α <i>Δpir</i>	Cloning host
S17-1 <i>Δpir</i>	IncP conjugal donor
<i>Pantoea ananatis</i>	
HY02	Wild type
PA13	Wild type, Rif ^R
PA13L	PA13 in-frame deletion of <i>lacZY</i> ^b
<i>ΔnucABC</i>	PA13 in-frame deletion of <i>nucABC</i> , Rif ^R
<i>ΔdfoA</i>	PA13 in-frame deletion of <i>dfoA</i> , Rif ^R
<i>ΔdfoC</i>	PA13 in-frame deletion of <i>dfoC</i> , Rif ^R
<i>ΔdfoAΔdfoC</i>	PA13 in-frame deletions of <i>dfoA</i> and <i>dfoC</i> , Rif ^R
<i>ΔnucABCΔdfoA</i>	PA13 in-frame deletions of <i>nucABC</i> and <i>dfoA</i> , Rif ^R
<i>ΔnucABCΔdfoC</i>	PA13 in-frame deletions of <i>nucABC</i> and <i>dfoC</i> , Rif ^R
<i>ΔnucABCΔdfoAΔdfoC</i>	PA13 in-frame deletions of <i>nucABC</i> , <i>dfoA</i> and <i>dfoC</i> , Rif ^R
<i>Δfur</i>	PA13 in-frame deletion of <i>fur</i> , Rif ^R
<i>nucA::pCOK194</i>	PA13L <i>nucA-lacZY</i> transcriptional fusion, Km ^R
<i>dfoJ::pBS148</i>	PA13L <i>dfoJ-lacZY</i> transcriptional fusion, Km ^R
<i>foxA::pBS147</i>	PA13L <i>foxA-lacZY</i> transcriptional fusion, Km ^R
<i>nucA::pCOK194 Δfur</i>	PA13L <i>Δfur nucA-lacZY</i> transcriptional fusion, Km ^R
<i>dfoJ::pBS148 Δfur</i>	PA13L <i>Δfur dfoJ-lacZY</i> transcriptional fusion, Km ^R
<i>foxA::pBS147 Δfur</i>	PA13L <i>Δfur foxA-lacZY</i> transcriptional fusion, Km ^R
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> KACC 10057	Wild type
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wild type
<i>Xanthomonas fragariae</i> XF1	Wild type
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	Wild type
Plasmids	
pGEM-T Easy	PCR cloning vector, Amp ^R
pVIK112	R6K suicide vector, <i>lacZY</i> for transcriptional fusion, Km ^R
pNPTS138-R6KT	R6K <i>sacB</i> : suicide plasmid for in-frame deletions, Km ^R
pBBR1MCS5	pBBR1MCS-5-derived broad-host-range expression vector, Gm ^R

[0070]

pCOK190	pGEM-T Easy, <i>iucA</i> internal fragment, Amp ^R
pBS145	pGEM-T Easy, <i>foxA</i> internal fragment, Amp ^R
pBS146	pGEM-T Easy, <i>dfoJ</i> internal fragment, Amp ^R
pJY18	pGEM-T Easy, <i>fur</i> deletion fragment, Amp ^R
pJY61	pGEM-T Easy, <i>iucABC</i> deletion fragment, Amp ^R
pJY62	pGEM-T Easy, <i>dfoC</i> deletion fragment, Amp ^R
pJY72	pGEM-T Easy, <i>dfoA</i> deletion fragment, Amp ^R
pJY73	pGEM-T Easy, <i>dfoA</i> and <i>dfoC</i> deletion fragment, Amp ^R
pCOK194	pVIK112, <i>iucA</i> internal fragment, transcriptional fusion, Km ^R
pBS147	pVIK112, <i>foxA</i> internal fragment, transcriptional fusion, Km ^R
pBS148	pVIK112, <i>dfoJ</i> internal fragment, transcriptional fusion, Km ^R
pJY19	pNPTS138-R6KT, <i>fur</i> deletion fragment, Km ^R
pJY63	pNPTS138-R6KT, <i>iucABC</i> deletion fragment, Km ^R
pJY64	pNPTS138-R6KT, <i>dfoC</i> deletion fragment, Km ^R
pJY80	pNPTS138-R6KT, <i>dfoA</i> deletion fragment, Km ^R
pJY85	pNPTS138-R6KT, <i>dfoA</i> and <i>dfoC</i> deletion fragment, Km ^R
pLY291	pBBR1MCS5::P _{lac} - <i>fur</i> , <i>fur</i> complementation

[0071]

[0073]

DNA 조작 및 데이터 분석

[0074]

DNA 조작, 클로닝, 제한효소 처리 및 아가로스 겔 전기영동은 당업계에 널리 사용되는 방법으로 수행하였다 (Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning). DNA 시퀀싱은 마크로젠(서울, 한국)에 의뢰하여 수행하였다. DNA 서열분석은 MEGALIGN(DNASTAR, Madison, WI, USA) 및 GENETYX-WIN 소프트웨어(Genetyx, Tokyo, Japan)를 사용하여 National Center for Biotechnology Information의 BLAST 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0076]

캠벨 삽입(Campbell insertion) 및 프레임 내 결실 돌연변이의 구축

[0077]

lacZY 전사 통합 돌연변이체(캠벨 삽입)의 제조를 위해 프라이머 *IucAK* 및 *IucAS*를 사용하여 *iucA*의 내부 DNA 단편을 증폭시켰다. 부분 *iucA* 단편을 정제하고 pGEM-T Easy(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 다음, 시퀀싱 분석을 수행하였다. 재조합 돌연변이 유도를 위해, *SmaI/KpnI* 제한효소가 처리된 pCOK190의 *iucA* 단편을 pVIK112 자살 벡터에 클로닝하여 pCOK194를 제조하였다. 모균주인 PA13는 pCOK194를 포함하는 대장균 S17-1과 접합시켰고 카나마이신 내성 콜로니를 선택하였다. 돌연변이체는 절단된 단편의 업스트림에 어닐링하는 프라이머와 *LacFuse* 프라이머를 이용하는 중합효소연쇄반응(PCR)에 의해 시퀀싱하여 확인하였다. 하기 표에 기재된 프라이머 및 제한효소를 사용하여 *dfoJ* 및 *foxA* null 돌연변이를 제조하였다.

표 2

Primers	Description	Uses
LacFuse	5'-GGGGATGTGCTGCAAGGCG-3'	sequencing for <i>lacZ</i> fusion junctions
IucAS	5'-TTACCCGGGGTTACGCTGGTTTGGCGGTGA-3'	<i>iucA lacZ</i> fusion
IucAK	5'-GGCGGTACCGTTTGTACGCCGACGCTCAG-3'	<i>iucA lacZ</i> fusion
DfoJE	5'-GCTGTCGATCTTGACCAG-3'	<i>dfoJ lacZ</i> fusion
DfoJK	5'-GGTACCGCTCAGTCTGGAGGTCAA-3'	<i>dfoJ lacZ</i> fusion
FoxAE	5'-GCGATGGATGTGAATCAG-3'	<i>foxA lacZ</i> fusion
FoxAK	5'-GGTATGATCGTACTGCGTATC-3'	<i>foxA lacZ</i> fusion
IucABC 1	5'-GGCACTAGTAAGAAGTGCGCAGCCCAT-3'	<i>iucABC</i> deletion
IucABC 2	5'-AAGCTTGGTACCGAATTCCGATTGAATCATTATCAAACAATT-3'	<i>iucABC</i> deletion
IucABC 3	5'-GAATTCGGTACCAAGCTTACCAAGGACTGAATCATGACAAAC-3'	<i>iucABC</i> deletion
IucABC 4	5'-GGCGGATCCAATGCCCAGACAGATGTT-3'	<i>iucABC</i> deletion
DfoA 1	5'-GGCACTAGTGGCTGACCTTACGCATTA-3'	<i>dfoA</i> deletion
DfoA 2	5'-AAGCTTGGTACCGAATTCATTGCACCGTTCTCACTGGTTAG-3'	<i>dfoA</i> deletion
DfoA 3	5'-GAATTCGGTACCAAGCTTCACTAATATGTCACAGTCCACACT-3'	<i>dfoA</i> deletion
DfoA 4	5'-GGCGGATCCCTGAACATGTAGTCCATG-3'	<i>dfoA</i> deletion
DfoC 1	5'-GGCACTAGTGCACCTTAATCAACGACA-3'	<i>dfoC</i> deletion
DfoC 2	5'-AAGCTTGGTACCGAATTCCTGTGACATATTAGTGTTCGTTT-3'	<i>dfoC</i> deletion
DfoC 3	5'-GAATTCGGTACCAAGCTTCGGTAACGGGATAATGACCTCCTT-3'	<i>dfoC</i> deletion
DfoC 4	5'-GGCGGATCCCTGCACCGATGAAACACA-3'	<i>dfoC</i> deletion
Fur 1	5'-GGCACTAGTTATTGATGAAGATCGCCA-3'	<i>fur</i> deletion
Fur 2	5'-AAGCTTGGTACCGAATTCATGCGGATATTGTCTGTTACTT-3'	<i>fur</i> deletion
Fur 3	5'-GAATTCGGTACCAAGCTTGACAAATAAGCGCTTTGGGTACA-3'	<i>fur</i> deletion
Fur 4	5'-GGCGTCGACGTCGTGTTACATCAGCTT-3'	<i>fur</i> deletion
FurX	5'-GGCCTCGAGCTGAAACAGGAAACAGCTATGACTGACAACAATACCGCA-3'	<i>fur</i> complementation
FurP	5'-GGCCTGCAGTTATTGTGTCGTGCAGCGTTTC-3'	<i>fur</i> complementation

[0078]

[0079]

또한, 프레임 내 결실 돌연변이의 제조를 위해, 상기 표 2의 해당 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 방법으로 표적 유전자 영역의 업스트림 및 다운스트림 단편(약 450bp)을 증폭하였다. 증폭된 단편은 정제 후, 오버랩 PCR 방법으로 융합시켰다. 최종 PCR 산물은 pGEM-T Easy에 클로닝하였고 DNA 시퀀싱을 수행하였다. 이후 제한효소로 DNA 단편을 절단하고 자살 벡터인 pNPTS138-R6KT에 라이게이션하였다. 생성된 재조합 플라스미드는 접합 교배에 의해 PA13 균주에 도입하였고 교배 세포(mating cell)를 카나마이신 및 리팜피신이 함유된 LB 배지에 도말하였다. 단일 교차 통합된 콜로니는 LB 플레이트 상에서 선택하였고, 단일 콜로니는 리팜피신(25 µg/mL)이 포함된 LB 배지에서 밤새 배양시킨 후, 5%(w/v) 수크로스를 함유하는 LB에 플레이팅하여 삭제된 플라스미드(plasmid excision)가 도입된 것을 선택하였다. 통합된 플라스미드의 삭제(excision)는 카나마이신 또는 수크로스가 보충된 LB 상에서 패칭(patching)으로 확인하였다. 카나마이신에 민감성을 갖는 콜로니를 선별하고, 진단형 PCR 및 DNA 시퀀싱을 통해 타겟 DNA의 결실을 확인하였다.

[0081]

유전자 보완(gene complementation)

[0082]

표적 유전자가 보완된 균주의 제조를 위해, 온전한 *fur* 유전자를 플라스미드 벡터인 pBBR1-MCS5에 클로닝하여 pBBR1-MCS5::P*lac-fur*를 제조하였고, 접합에 의해 해당 돌연변이 균주로 도입시켰다(표 1 참조).

[0084]

항균 활성분석

[0085]

항균 활성분석을 위해, *E. amylovora* ATCC19383 또는 *Y. enterocolitica* ATCC9610을 포함하는 표적 박테리아

균주의 배양물을 0.2% 글루코스를 함유하는 따뜻한 AB 최소 한천 배지에 첨가하고 혼합한 후 즉시 페트리 플레이트에 부었다. 한천을 고형화시킨 후, 10 μ L의 *P. ananatis* PA13(야생형 균주) 및 돌연변이 균주 배양물을 한천 플레이트의 표면에 처리하였다. 이후 플레이트 상에서 억제영역이 보일 때까지 28° C의 온도에서 배양하였다. 그런 뒤, 박테리아 콜로니 주변에 형성된 억제영역의 직경을 측정하였고, 실험은 독립적으로 적어도 세 번 반복수행하였다.

[0087] 시데로포어(Siderophore) 생산 분석

[0088] 종래 King's B 배지를 기반으로 하는 King's B-CAS 한천 플레이트를 사용하여 시데로포어 생산 분석을 수행하였다. 밤새도록 배양한 *P. ananatis* PA13 및 돌연변이 균주의 배양물을 CAS 한천 플레이트에 분주하고 28° C에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 주황색-노란색 할로(orange-yellow halo)의 직경을 측정하였다. 상대적인 시데로포어(siderophore) 생산수준의 분석은 ImageJ 소프트웨어(버전 1.45s)를 사용하여 King's B-CAS 분석에서 각 균주 할로의 파란색 픽셀 평균값을 계산하여 분석하였다. Pf-5의 값을 기준값으로 하여 각 균주의 제거된 청색화소의 평균값을 서로 비교하였다. PF5의 점선 안쪽 영역에 있는 파란색 픽셀의 평균값을 양성 대조군으로 하였고, 박테리아 콜로니가 없는 영역을 음성 대조군으로 사용하였다. 모든 실험은 독립적으로 적어도 세 번 반복수행하였다.

[0090] 독성분석(Virulence assay)

[0091] 벼 묘목(*Oryza sativa* cv. Dongjin)을 28° C 및 60%의 습도 조건에서 5주 동안 재배하였다. 양파 구근(*Allium cepa*)은 시중에서 구입하여 사용하였다. *P. ananatis* PA13 균주 및 돌연변이 균주는 LB 배지에서 28° C 온도로 밤새 배양하였고, 600 nm에서 광학 밀도(OD600) 0.8이 될 때, 배양한 균주들을 원심분리한 후 세척한 다음, 멸균 증류수(SDW)로 현탁시켰다. 균주 현탁액(100 μ L)을 주사기를 사용하여 벼 또는 양파 구근에 주입하였다. 이때 멸균된 증류수를 주입한 균을 음성 대조군으로 사용하였다. 균주가 접종된 묘목은 28° C 및 60% 습도의 온실에서 배양하였다. 양파 구근은 실온에서 포화 종이와 함께 플라스틱 상자에 넣었다. 벼 묘목과 양파 구근은 균주 접종 후 18일 및 15일 동안 질병의 증상여부를 관찰하였다.

[0093] 베타-갈락토시다아제 분석(β -Galactosidase assay)

[0094] 모든 시험 균주는 20시간 동안 배양하였고, 28° C에서 LB 브로쓰 배지를 이용하여 계대 배양하였다. 약 0.4의 OD600에서 지수기 배양을 사용하여 베타-갈락토시다아제 분석을 수행하였다.

[0096] <실시예 1>

[0097] *P. ananatis* PA13 균주에서 시데로포어(siderophore) 생산을 담당하는 유전자 확인

[0098] *Pantoea* 균주의 환경 및 숙주 연관성에 있어서 3개의 시데로포어 생합성 클러스터가 게놈 전체 조사를 기반으로 분석된 바 있다. *P. ananatis* PA13 균주의 시데로포어 생합성 클러스터를 확인하기 위해 게놈 시퀀스(GenBank 수탁 번호 CP003085) 스캔을 분석한 결과, *P. ananatis* PA13 균주가 에어로박틴 및 DFO-E의 2가지 형태의 시데로포어 유전자 클러스터를 가지고 있는 것을 확인하였다. 에어로박틴 및 DFO-E 생합성 유전자 클러스터의 유전적 방향성은 도 1에 나타내었다. 에어로박틴 생합성 유전자 클러스터는 5개의 오픈 리딩 프레임(*iucABCD* 및 *iutA*)을 인코딩하는 8.0kb DNA 영역으로 구성되어 있다. 또한, *P. ananatis* 균주 간 *iucABCD-iutA* 유전자 군집을 비교 분석한 결과, *iucABCD-iutA*가 양과 중심썩음병을 유발하는 *P. ananatis* PNA97-1R(GenBank accession no.CP020943)의 에어로박틴 생합성 유전자와 동일한 것으로 나타났다. *iucABCD-iutA* 오페론은 많은 병원성 대장균 균주와 *Pantoea* 종에서 알려져 있다. DFO-E 생합성 유전자 클러스터는 5개의 오픈 리딩 프레임(*dfoJACS* 및 *foxA*)을 인코딩하는 8.7kb DNA 영역으로 구성되어 있다. *dfoJACS* 및 *foxA* 유전자는 유칼립투스 마름병을 유발하는 *P. ananatis* LMG20103(GenBank 수탁 번호 CP001875)의 유전자와 높은 유사성을 갖는다. 단백질 DfoJ, DfoA, DfoC, DfoS 및 FoxA는 *P. ananatis* LMG20103에서 각각 L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase Ddc(동일성, 99%, 유사성, 99%), 알칼리긴 생합성 단백질 AlcA(동일성, 99%, 유사성, 100%), 리조박틴 시데로포어 생합성 단백질 RhbF(동일성, 99%; 유사성, 99%), 다약물 트랜스로카제 Cmr(동일성, 99%; 유사성, 100%) 및 페리옥사민 수

용체 전구체 FoxA(동일성, 99%; 유사성, 100%)와 높은 유사성을 갖는다. 또한, DFO-E 생합성 유전자 클러스터는 유전적으로 *Erwinia* 및 *Pantoea* 속에 있는 것과 유사한 것으로 확인되었고, Fur box 공통서열(TGATAAT)은 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA* 유전자의 프로모터 영역에서 확인되었다. 이러한 결과는 *iucABCD-iutA* 및 *dfoJACS-foxA* 오페론이 세포내 철 수준에 대한 반응에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다.

<실시예 2>

iucABCD-iutA 및 *dfoJACS-foxA* 오페론에서 이중-오페론 유전자 돌연변이에 의한 완전한 항균 활성의 상실확인

시데로포어 생산에서 *iucABCD-iutA* 및 *dfoJACS-foxA* 오페론 유전자의 중요성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 프레임 내 결실(in-frame deletion) 방법을 이용하여 에어로박틴 생합성 유전자 오페론 돌연변이 $\Delta iucABC$; DFO-E 생합성 유전자 오페론 돌연변이 $\Delta dfoA$, $\Delta dfoC$, $\Delta dfoAC$; 및 이중 오페론 유전자 돌연변이인 $\Delta iucABC\Delta dfoA$, $\Delta iucABC\Delta dfoC$ 및 $\Delta iucABC\Delta dfoAC$ 를 구축하였다. 시데로포어 생산은 항균 활성 분석용 플레이트에서 확인하였고, 항균 활성은 하기 표에 기재된 식물병원성 및 식중독 박테리아에 대하여 분석하였다.

표 3

P. ananatis PA13의 항균 활성

Bacterial strains	Inhibition diameter (mm)
<i>Acidovorax citrulli</i> AAC02	0.0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	13.0 $\pm$ 0.5
<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 19383	39.5 $\pm$ 0.8
<i>Pantoea ananatis</i> HY02	11.8 $\pm$ 0.2
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> KACC 10057	11.3 $\pm$ 0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	0.0
<i>Xanthomonas fragariae</i> XF1	21.0 $\pm$ 0.5
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	22.5 $\pm$ 1.0

Cultures were grown at 28°C. Values are means $\pm$ SDs of three replicates.

그 결과, *P. ananatis* PA13은 딸기모늬병세균(*Xanthomonas fragariae*)에 대한 높은 항세균활성이 나타났고 특히, *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*(Enterobacterales)에 대해 높은 항균 활성이 있는 것으로 나타났다(표 3 참조). 또한, 야생형과 비교하여 $\Delta iucABC$ 돌연변이체는 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대한 항균 활성이 약간 감소한 것으로 나타난 반면, $\Delta dfoA$, $\Delta dfoC$ 및 $\Delta dfoAC$ 돌연변이체는 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica* 모두에 대해 유사한 항균 활성을 보였다. 그러나 이중 오페론 유전자 돌연변이체인 $\Delta iucABC\Delta dfoA$, $\Delta iucABC\Delta dfoC$ 및 $\Delta iucABC\Delta dfoAC$ 는 항균 활성이 완전히 상실된 것으로 나타났다(도 2 참조).

이러한 결과를 통해 본 발명자들은 시데로포어인 에어로박틴과 DFO-E 모두가 *P. ananatis* PA13 균주의 완전한 항균 활성을 위해 필요하다는 것을 알 수 있었다.

<실시예 3>

항균 활성이 결핍된 돌연변이체의 시데로포어 생성 장애확인

본 발명자들은 King's B 및 chrome azurol S(King's B-CAS) 한천 표시 플레이트에서 시데로포어의 생산능을 분석하였다.

그 결과, 양성 균주인 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5는 King's B-CAS에서 강한 노란색의 할로가 생성되는 것으

로 나타났다. 한편 야생형 PA13은 Pf-5보다 약한 노란색 할로(halo)가 생성된 것으로 나타났으며, $\Delta dfoA$, $\Delta dfoC$ 및 $\Delta dfoAC$ 돌연변이는 야생형과 유사한 노란색 할로가 생성된 것으로 나타났다. 또한 aerobactin 유전자 돌연변이체인 $\Delta iucABC$ 는 야생형과 비교하여 청색에서 노란색으로 할로 색상이 약간 감소된 변화를 보였다. 그러나 이중 오페론 돌연변이체인 $\Delta iucABC\Delta dfoA$, $\Delta iucABC\Delta dfoC$ 및 $\Delta iucABC\Delta dfoAC$ 에서는 할로가 관찰되지 않았다(도 3A). 나아가 King' S B-CAS 분석에서 가시적으로 나타난 색상 변화가 쉽게 감지할 수 있는 정도가 아니었기 때문에 이러한 색상 변화를 정량적으로 분석하기 위해 상대적인 시테로포어 생산은 제거된 청색 픽셀의 상대적 값으로 정량화하였다. $\Delta iucABC$ 돌연변이를 제외한 단일 오페론 유전자 돌연변이의 상대적인 시테로포어 생산수준은 야생형과 유사한 것으로 나타났고, $\Delta iucABC$ 돌연변이체는 야생형보다 약 3배 더 낮은 시테로포어 생산수준을 나타내었다(도 3B). 또한, 이중 오페론 유전자 돌연변이체의 시테로포어 비생산 수준은 세균 콜로니가 없는 영역과 유사한 수준으로 나타났다(도 3B).

[0112] 이러한 결과는 도 3A의 시테로포어의 시각적 이미지 분석과 일치하는 것으로 나타났고, 항균 활성 분석 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.

[0113] 이를 통해 본 발명자들은 에어로박틴과 DFO-E가 *P. ananatis* PA13 균주의 시테로포어 생산 및 항균 활성에 있어서 필요한 요소임을 알 수 있었다.

[0115] <실시예 4>

[0116] 시테로포어가 결핍된 돌연변이체의 독성 유지확인

[0117] 나아가 본 발명자들은 *P. ananatis* PA13 균주의 독성(병원성) 활성에 있어서, 에어로박틴과 DFO-E 시테로포어의 역할을 확인하기 위해, 야생형 PA13과 시테로포어 돌연변이체인 $\Delta iucABC$, $\Delta dfoA$, $\Delta dfoC$, $\Delta iucABC\Delta dfoA$, $\Delta iucABC\Delta dfoC$, $\Delta iucABC\Delta dfoC$, $\Delta dfoC$ 를 양과 구근과 벼 모종에 각각 접종하였다.

[0118] 이후 양과 구근 및 벼 모종을 관찰한 결과, 접종 후 각각 15일 및 18일째에 양과 구근에 심각한 무름병이 발생하였고 벼에서 벼잎집썩음병(sheath rot)이 발생하였다. 흥미롭게도 에어로박틴 및 DFO-E 유전자의 모든 돌연변이체들은 양과 구근과 벼에서 심각한 부패 증상이 발생하는 것으로 나타났고, 이러한 현상은 야생형 양과 및 벼와 차이가 없는 것으로 나타났다(도 4).

[0119] 이를 통해 본 발명자들은 에어로박틴과 DFO-E가 *P. ananatis* PA13 균주의 독성에는 작용하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[0121] <실시예 5>

[0122] 시테로포어 생산 및 항균 활성에서 Fur의 역할

[0123] 시테로포어 생산 및 항균 활성에서 철 흡수 조절 단백질(Fur; ferric uptake regulator protein)의 역할을 확인하기 위해, *P. ananatis* PA13 균주에서 Fur 유전자가 결실된 돌연변이(Δfur) 균주 및 $P_{lac}-fur$ 를 포함하는 플라스미드로 Δfur 돌연변이를 보완한 $\Delta fur(fur^+)$ 균주를 사용하였다.

[0125] 분석 결과, Δfur 돌연변이는 야생형에 비해 King's B-CAS에서 노란색 할로가 유의하게 증가한 것으로 나타났고, $\Delta fur(fur^+)$ 균주에서는 노란색 할로가 감소하여 야생형 균주와 유사한 것으로 나타났다(도 5A).

[0126] 이러한 결과를 통해, 철 흡수 조절 단백질이 결실된 Δfur 돌연변이체의 경우, 시테로포어 생산이 증가되었음을 알 수 있었고, Δfur 돌연변이체에서 시테로포어의 생산 증가는 *fur* 유전자의 부재가 직접적인 원인임을 알 수 있었다.

[0127] 또한, 항균 활성 분석결과, Δfur 돌연변이체는 최소 배지에서 거의 성장하지 않았기 때문에 항균 활성을 평가할 수 없었다. 따라서 항균 활성에 있어서 Fur의 작용을 확인하기 위해, 야생형 균주에 $P_{lac}-fur$ 를 포함하는 플라스미드를 도입하여 Fur 유전자가 과발현된 균주를 제조한 후, Fur에 의한 활성을 분석하였다.

[0128] 그 결과, Fur-과발현 균주는 *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대한 항균 활성이 완전히 상실된 것으로 나

타났다(도. 5B).

[0129] 이러한 결과는 *P. ananatis* 균주의 Fur 유전자가 시데로포어의 생산과 항균 활성을 부정적으로(음성적) 조절한다는 것을 의미한다.

[0130] 따라서 *P. ananatis* 균주에서 Fur 유전자를 결실시킨 Δfur 돌연변이체는 시데로포어의 생산이 증가되어 있고, *E. amylovora* 및 *Y. enterocolitica*에 대한 우수한 항균 활성이 있다는 것을 알 수 있었다.

[0132] <실시예 6>

[0133] **Fur의 *iucABCD-iutA* 및 *dfoJACS-foxA* 오페론의 발현 억제**

[0134] *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA*의 프로모터 영역에 있는 Fur box의 존재는 이들 유전자의 발현이 Fur에 의해 제어될 수 있음을 의미한다(도 1). 이에 본 발명자들은 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA* 유전자 발현이 Fur 단백질에 의해 제어되는지 확인하기 위해 PA13L 및 PA13L Δfur 돌연변이에 Campbell이 삽입된, *iucA*::pCOK194, *dfoJ*::pBS148 및 *foxA*::pBS147을 제조하였다(도 1).

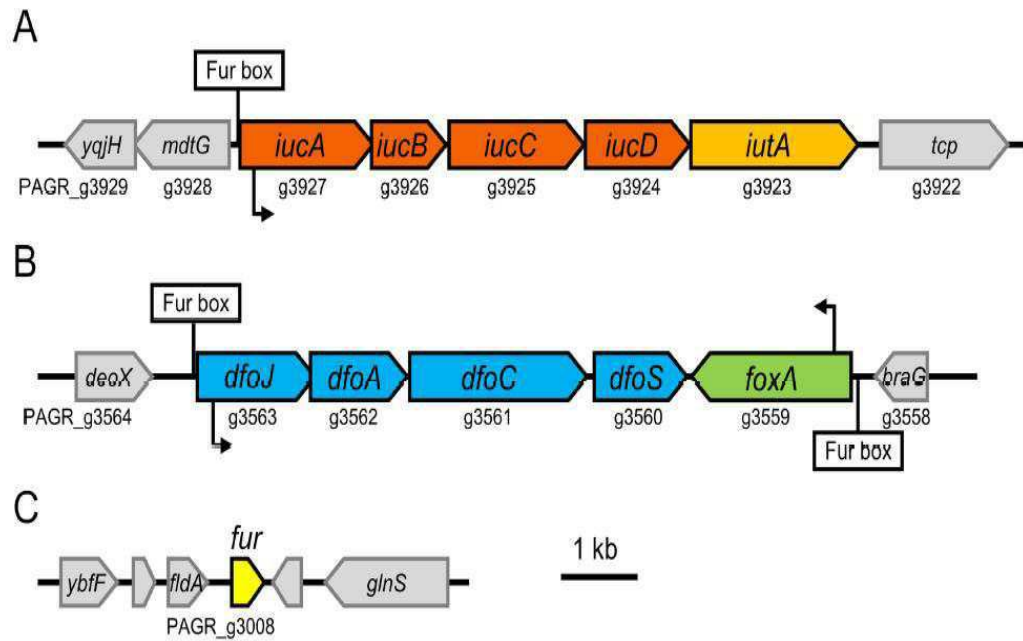
[0136] 이후 β -갈락토시다제 분석을 통해 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA*의 발현이 Fur에 의해 제어되는 것인지 분석하였는데, 그 결과, *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA* 유전자의 발현은 *fur* 유전자를 결실시킨 Δfur 돌연변이에서 유의하게 증가하는 나타났다, 반면 *fur* 유전자를 도입한 *fur+* 보완 균주에서는 상기 유전자들의 발현이 감소되는 것으로 나타났다(도 6).

[0137] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 Fur가 *iucA*, *dfoJ* 및 *foxA* 발현을 부정적(negatively)으로 조절한다는 것을 알 수 있었다.

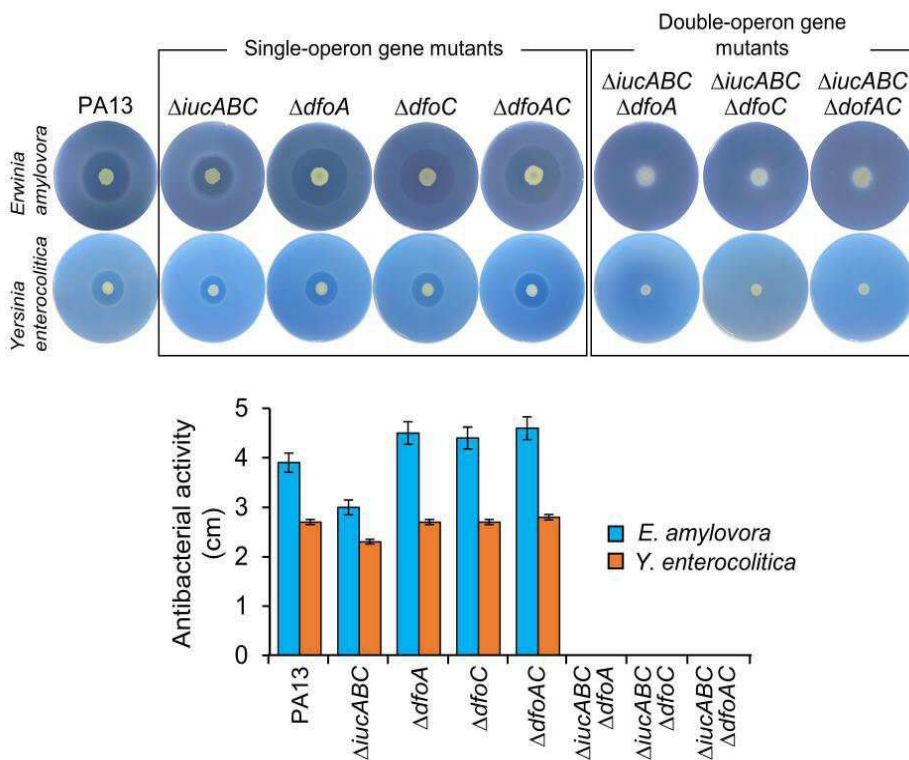
[0139] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

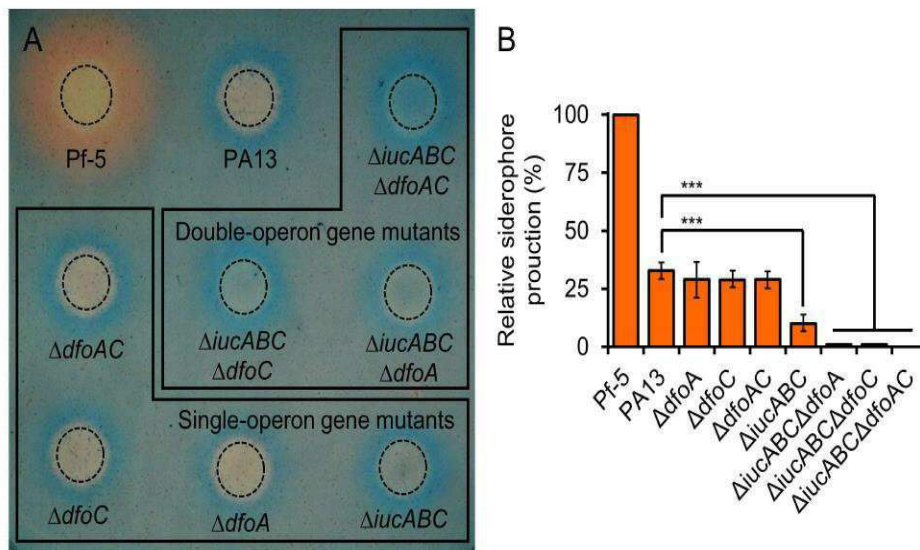
도면1



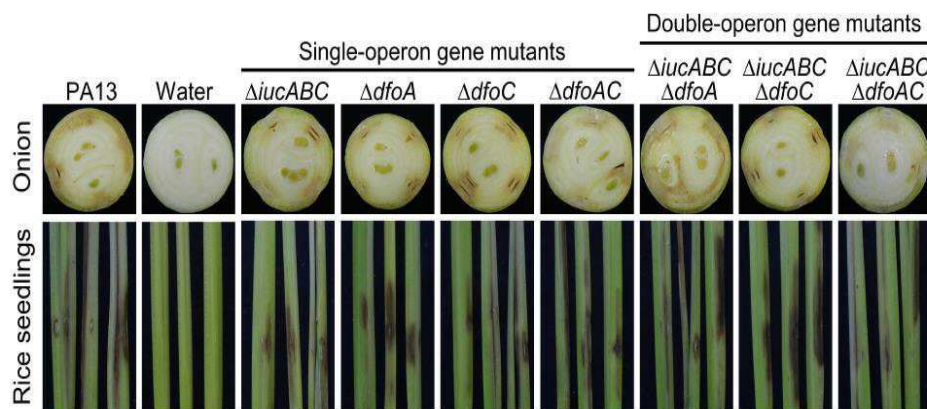
도면2



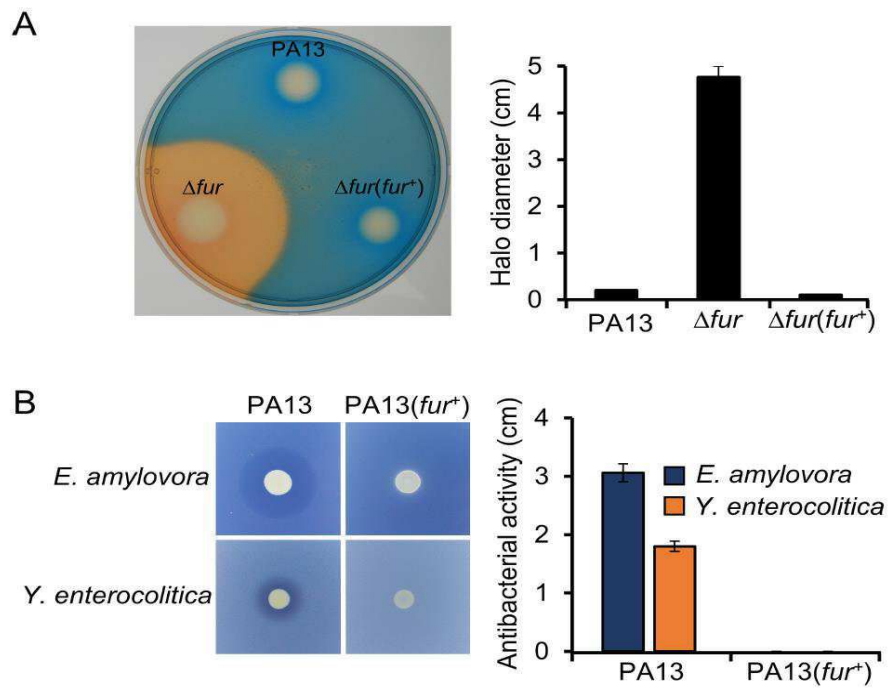
도면3



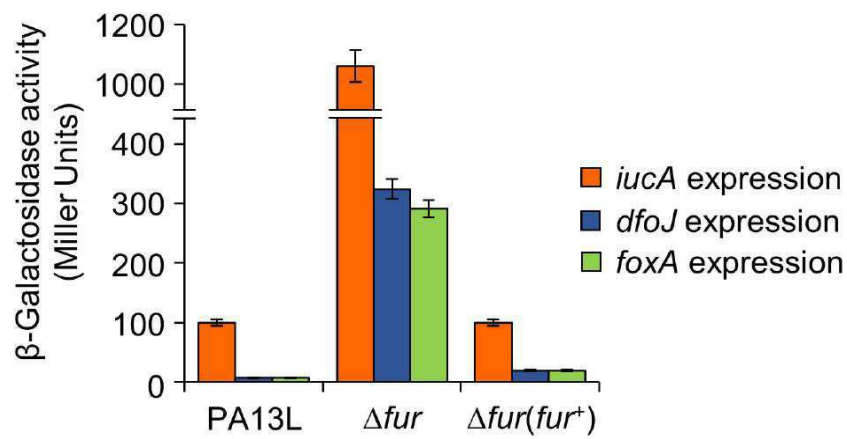
도면4



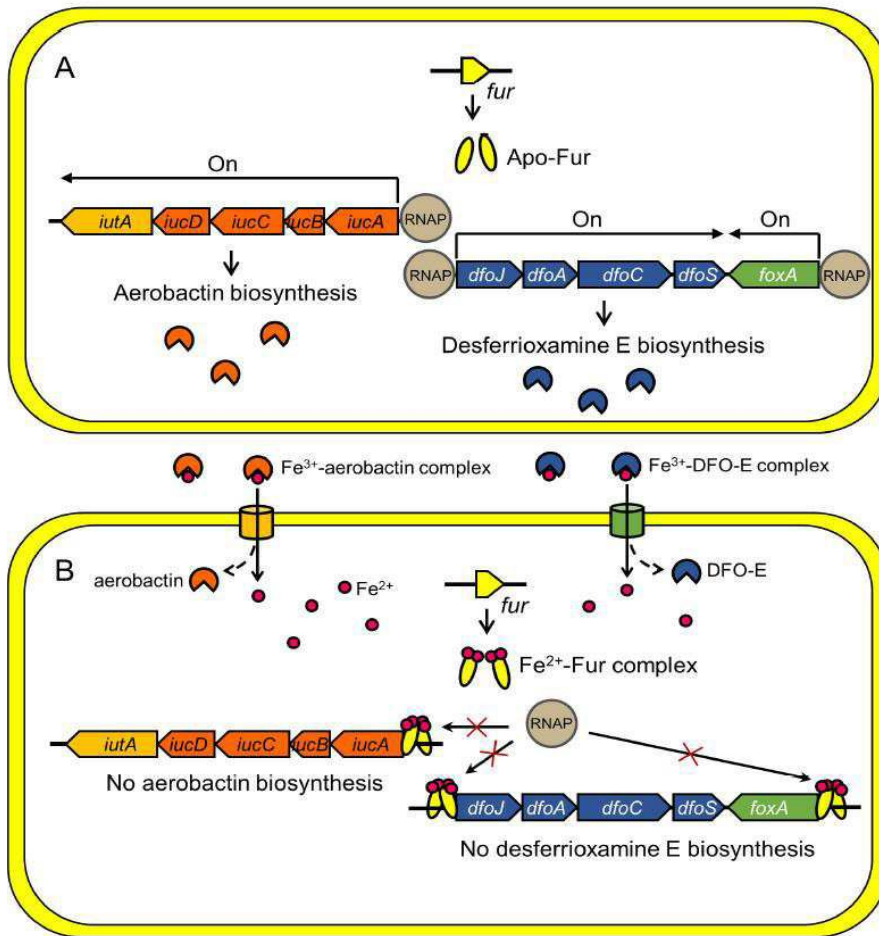
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Gyeongsang National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Aerobactin and desferrioxamine E over producing *Pantoea ananatis* mutant strain having a controlling fire blight and use thereof
- <130> 2022-1-033-KR
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 444
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> *Pantoea ananatis* PA13, *fur* gene sequence
- <400> 1

atgactgaca acaataccgc attaaagaag gctggcctga aagtcacatt gccagactc 60

aaaattctgg aagtgttca ggaacctgca tgccatcacg tcagcgcgga agatctgtat 120

aaacgcctga tcgacatggg cgaagagatt ggactggcca cggctaccg tgtgcttaac	180
cagttcgacg atgcaggcat cgtgaccgc cacaactttg aaggcggtaa atcgggtttt	240
gagctgacgc agcagcacca tcacgaccac ctgatctgtc tggattgcgg taaagtgatt	300
gaatttagtg acgaatccat tgagacgcgt caacgtgaaa tcgcgaccg tcatggtatt	360
aagctcacca accacagcct gtacctgtac ggccactgtg cactgggcga ctgccgtgaa	420
gacgaaacgc tgcacgacaa ataa	444