



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0089438
(43) 공개일자 2013년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 63/02 (2006.01) A01N 65/00 (2009.01)
G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0010787

(22) 출원일자 2012년02월02일

심사청구일자 2012년02월02일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

좌남수

서울특별시 광진구 자양동 855번지 이튼타워 3차 A동 1003호

정영호

서울특별시 광진구 능동 320-52번지

(74) 대리인

양부현

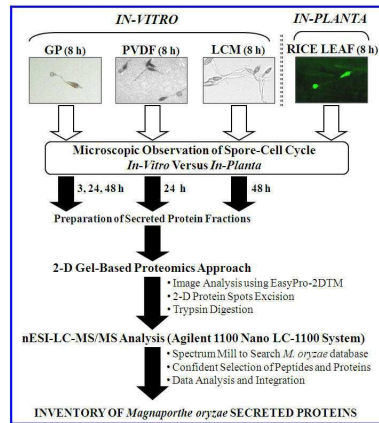
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 벼도열병 발병인자의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) (i) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 또는 (ii) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 벼도열병 방제제로 판정된다. 본 발명에 따르면, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 스크리닝하여 벼도열병 방제제 조성물로 이용함으로써, 벼 생산량을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0000139
부처명	교육과학기술부
연구사업명	중견연구자지원사업(핵심)
연구과제명	벼도열병균 침입에 따른 병원균 및 벼 단백질체 기능연구
주관기관	세종대학교
연구기간	2009.05.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ007993
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	형질전환을 통한 인디카벼 육종기반기술 구축
주관기관	세종대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법:

- (a) (i) 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제 또는 (ii) 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)에서 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 벼도열병 방제제로 판정된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제는 벼도열병균 (*Magnaporthe oryzae*)으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 벼도열병 방제용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제는 벼도열병균 (*Magnaporthe oryzae*)으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 활성 억제제는 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드, 작은 분자량 화합물 또는 천연추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 발현 억제제는 1,3- β -글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드인 것

을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 감염성 진균류 벼 병원체의 분비단백질 분석 방법:

- (a) 감염성 진균류 벼 병원체의 포자를 소수성 표면을 갖는 기질에 접촉하거나 감염성 진균류 벼 병원체의 균사체를 액체배지에서 배양하여 분비단백질의 분비를 유도하는 단계;
- (b) 상기 소수성 표면을 갖는 기질 또는 액체배지로부터 분비단백질을 분리하는 단계; 및
- (c) 상기 분비단백질을 분석하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 벼 병원체는 벼도열병균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 소수성 물질은 유리판 또는 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 막인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 분비단백질은 병원체 감염 초기에 분비되는 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

상기 제 9 항 내지 제 12 항의 방법에 의해 분리한 단백질.

명세서

기술분야

본 발명은 벼도열병 발병인자의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

식물 병원체인 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)은 싹 모양의 낭자균류이고, 벼(*Oryza sativa* L.)에서 강력한 질병을 일으키는 병원균이다.^{1,2} 벼도열병균은 밀(*Triticum aestivum*) 및 보리(*Hordeum vulgare*)와 같은 다른 초(*grass*)종도 감염시키는 것으로 알려져있다.³ 두 생물의 지놈 서열의 이용가능성으로 인해 벼도열병균과 벼의 관계는 식물-병원체 작용을 연구하는데 모델시스템으로 연구되어왔다.⁴⁻⁷ 벼는 세계 인구의 반 이상이 이용하는 주식 작물로 사회경제적인 중요성을 갖는다.^{8,9}

도열병 주기는 벼도열병균의 포자가 잎 표면에 접촉하면서 잎으로 포자가 부착하면서 시작된다.¹⁰ 발아한 포자는 부착기로 알려진 특이적인 구조로 분화하는 발아관(*germ tube*)을 생성한다. 부착기의 침투 길이는 잎 세포 표면의 기계적인 피어싱에 의해 숙주의 상피세포로 침투하게 한다.^{2,10} 침투한 균사가 성장하여 상피세포에 삽

입되어 질병 증상을 유발한다.

[0004] 벼도열병균과 벼 간의 상호작용과정 동안, 숙주 조직의 세포외 공간은 전장(battlefield)이 된다. 각 생물은 식물의 질병 민감성을 결정하는 몇 종류의 분자(예컨대, 단백질, 펩타이드 및 대사산물)를 세포외 공간으로 분비한다.

[0005] 벼도열병균에 의해 연간 최대 30%의 감소 수율이 보고되므로, 벼도열병균의 감염을 초기에 억제하면 벼 수율 및 질을 극적으로 개선할 수 있다.^{3,11} 또한, 이러한 결과는 벼도열병균은 광범위한 병원균이기 때문에, 다른 작물에 이용될 수 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 세계 인구의 반 이상이 이용하는 주식 작물인 벼의 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)을 방제하기 위해, 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 벼도열병균 포자가 벼 잎에 접촉된 후 감염 초기단계에 분비되는 분비단백질을 연구하여 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제가 결실될 경우, 벼도열병균이 병원성을 상실한다는 것을 규명하였고, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제가 벼도열병균의 감염에 중요한 단백질임을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 벼도열병 방제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 분비단백질의 분석방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 분비단백질을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0014] (a) (i) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 또는 (ii) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

[0015] (b) 상기 단계 (a)에서 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 벼도열병 방제제로 판정된다.

[0016] 본 발명자들은 세계 인구의 반 이상이 이용하는 주식 작물인 벼의 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)을 방제하기 위해, 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 벼도열병균 포자가 벼 잎에 접촉된 후 감염 초기단계에 분비되는 분비단백질을 연구하여 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제가 결실될 경우, 벼도열병균이 병원성을 상실한다는 것을 규명하였고, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제가 벼도열병균의 감염에 중요한 단백질임을 규명하였다.

[0017] 본 발명자들은 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질의 활성이 억제되거나 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제

의 발현이 억제되는 경우, 벼도열병균의 병원성이 상실되는 사실을 발견하였다. 본 발명에서 규명한 다른 감염 초기의 분비단백질과 달리 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 결실 시킨 돌연변이주에서 벼도열병균의 병원성이 상실된다는 것은, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제가 벼도열병균의 감염에 있어 필수적으로 요구되는 단백질임을 규명한 것으로, 이의 발현을 차단하는 물질은 벼도열병균의 병원성을 상실시킴으로써, 벼도열병균 방제제로 판정된다.

[0018] 단계 (a): 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 또는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료의 접촉

[0019] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 (i) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 또는 (ii) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킨다.

[0020] 바람직하게는, 본 발명의 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제는 벼도열병균 (*Magnaporthe oryzae*)으로부터 유래한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함하고, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0021] 본 발명의 첫 번째 단계에서 분석하고자 하는 시료를 (i) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 또는 (ii) 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 접촉시킨다.

[0022] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질 자체에 시료를 접촉시키는 경우에는, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질은 세포외에 단리된 단백질 또는 세포 또는 조직에 포함되어 있는 단백질이다.

[0023] 본 발명에 따르면, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직에 시료를 접촉시킬 수 있다.

[0024] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제-코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포 또는 조직은 바람직하게는 진균 (fungi) 세포 또는 조직이다. 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제-코딩 뉴클레오타이드 서열은 진균 세포에서 지놈에 포함되어 존재하거나 또는 박테리아에 삽입되어 존재할 수 있다. 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제-코딩 뉴클레오타이드 서열이 박테리아에 삽입되어 존재하는 경우, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제-코딩 뉴클레오타이드 서열은 진균 세포에서 작동가능한 프로모터에 결합되는 것이 바람직하다. 진균 세포에서 작동가능한 프로모터는 예를 들어, *Aspergillus nidulans*의 *gpdA* 프로모터, *A. niger*의 beta-xylosidase *xlnD* 프로모터, *Aspergillus oryzae* TAKA amylase 유전자 프로모터, *Rhizomucor miehei* lipase 유전자 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에서 이용되는 “시료”는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 유전자의 발현량, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질의 양 또는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질의 활성에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다.

[0026] 상기 시료는 화학물질, 항체, 단백질, 펩타이드, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시료는 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 세포 또는 조직 배양물)이다. 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레사블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

- [0027] 단계 (b): 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량 측정
- [0028] 이어, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 벼도열병 방제제로 판정된다.
- [0029] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufma et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 시투(*in situ*) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0030] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 유전자-특이적 프라이머 세트는 서열목록 제3서열 및 제4서열에 예시되어 있다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 유전자의 발현량 변화를 측정한다.
- [0031] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질의 양의 변화는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0033] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 타겟에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0035] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 변화 측정은, 예를 들어 크게 두 가지 방식으로 할 수 있다. 첫 번째 방식에 따르면, 시료가 처리된 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제에 기질(예컨대, 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유사물질)을 첨가하여 반응시켜, 기질의 분해 정도를 분석함으로써 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 변화를 측정할 수 있다. 두 번째 방식에 따르면, 시료가 처리된 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 포함하는 세포 또는 조직, 예컨대 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)의 균사체 또는 포자가 벼에 대하여 병원성을 나타내는지 여부를 측정함으로써, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 변화를 측정할 수 있다.
- [0036] 최종적으로, 분석대상의 시료가 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 벼도열병 방제제로 판정한다. “1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현량의 감소”는 시료를 처리하지 않은 실험군과 비교한 상대적인 감소를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 벼도열병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 명세서에서 이용되는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제는 벼도열병균의 벼 감염 초기 분비단백질인 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 또는 발현을 억제하여 벼도열병균의 병원성을

상실시킨다.

[0039] 바람직하게는, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제는 벼도열병균 (*Magnaporthe oryzae*) 으로부터 유래한다.

[0040] 본 발명에 이용되는 활성 억제제는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드, 작은 분자량 화합물 또는 천연추출물이다.

[0041] 본 발명에서 이용될 수 있는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질에 특이적으로 결합하는 활성을 갖는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0042] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제에 특이적으로 결합하여 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성을 억제할 수 있는 펩타이드는 당업계에 공지된 통상의 방법, 예를 들어 파아지 디스플레이 방식으로 얻을 수 있다(Smith GP, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". Science 228 (4705):13151317(1985); Smith GP, Petrenko VA, "Phage display". Chem. Rev. 97(2):391410(1997)).

[0043] 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성을 억제하는 작은 분자량의 화합물은 전술한 스크리닝 방법을 통하여 용이하게 얻을 수 있다.

[0044] 본 발명에 이용되는 발현 억제제는 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제를 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드이다.

[0045] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 서열은 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 mRNA에 상보적이고 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[0046] 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다(Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. Cell. Mol. Life Sci., 55:334-358(1999)).

[0047] 본 발명에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다.

[0048] 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 mRNA 서열에 상응하는 (corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보

성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.

[0049] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다.

[0050] 본 명세서에서 용어 ‘유효성분으로 포함하는’이란 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함된 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 감염성 진균류 벼 병원체의 분비단백질 분석 방법을 제공한다:

[0052] (a) 감염성 진균류 벼 병원체의 포자를 소수성 표면을 갖는 기질에 접촉하거나 감염성 진균류 벼 병원체의 균사체를 액체배지에서 배양하여 분비단백질의 분비를 유도하는 단계;

[0053] (b) 상기 소수성 표면을 갖는 기질 또는 액체배지로부터 분비단백질을 수득하는 단계; 및

[0054] (c) 상기 분비단백질을 분석하는 단계.

[0055] 본 발명은 감염성 진균류 벼 병원체의 벼 감염 시, 감염 초기에 분비되는 단백질을 분석하여 시크리토메(Secretome)를 확립하고자 하였다.

[0056] 본 발명의 감염성 진균류 벼 병원체의 분비단백질 분석 방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0057] 단계 (a): 분비단백질의 유도

[0058] 본 발명의 감염성 진균류 벼 병원체의 포자를 소수성 표면을 갖는 기질에 접촉하거나 감염성 진균류 벼 병원체의 균사체를 액체배지에서 배양하여 분비단백질의 분비를 유도한다.

[0059] 바람직하게는, 상기 감염성 진균류 벼 병원체는 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)이다.

[0060] 바람직하게는, 상기 단계 (a)의 소수성 표면을 갖는 기질은 유리판 또는 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 막이다.

[0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 감염성 진균류 벼 병원체의 분생자 포자(conidial spore)를 소수성 표면을 갖는 기질에 분무한다.

[0062] 바람직하게는, 상기 단계 (a)의 유리판은 요철 굴곡이 있는 표면을 갖는다.

[0063] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 액체배지는 0.01 중량% 내지 1 중량% 효모추출물, 0.01 중량% 내지 1 중량% 카사미노산(casamino acid) 및 0.01 중량% 내지 10 중량% 수크로스를 포함하는 액체배지로, 본 발명의 감염성 진균류 벼 병원체를 상기 액체배지에서 진탕배양한다.

[0064] 단계 (b): 분비단백질의 수득

[0065] 이어, 상기 소수성 표면을 갖는 기질 또는 액체배지로부터 분비단백질은 분리한다.

[0066] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 소수성 표면을 갖는 기질을 탈염수로 세척하고 블레이드로 긁어낸 배양액을 원심분리 후 상층액만 분리하여 분비단백질을 수득한다. 액체배지의 경우는 원심분리 후 여과하여 동결건조 한 여과액을 Tris 버퍼에서 투석하여 수득한다.

[0067] 단계 (c): 분비단백질의 분석

- [0068] 마지막으로, 상기 수득한 분비단백질을 분석한다.
- [0069] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 2-DE(Dimensional gel Electrophoresis) 및 질량분석법(Mass spectrometry)을 수행하여 분비단백질을 분석한다.
- [0070] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 감염성 진균류 벼 병원체의 분비단백질 분석 방법에 의해 분석한 단백질질을 제공한다.

발명의 효과

- [0071] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0072] (a) 본 발명은 벼도열병 방제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0073] (b) 본 발명은 벼도열병 감염시 분비단백질에 대한 시크리토를 확립할 수 있다.
- [0074] (c) 본 발명의 스크리닝 방법에 따라, 1,3-β-글루카노실트랜스퍼라아제의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 벼도열병 방제용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은 벼도열병균의 초기 감염과정의 분비단백질을 분석하기 위한 인 비트로 시스템을 도식화 하여 보여준다.
- 도 2는 인 비트로 시스템에서 벼도열병균 접종 후, 포자의 성장을 관찰한 현미경 이미지를 나타낸다.
- 도 3은 벼도열병균 접종 후, GP로부터 3, 24 및 48시간의 분비단백질을 수득하여 2-DE분석한 결과를 보여준다.
- 도 4는 벼도열병균 접종 후, PVDF membrane로부터 24시간의 분비단백질을 수득하여 2-DE분석한 결과를 보여준다.
- 도 5는 벼도열병균 접종 후, LCM로부터 48시간의 분비단백질을 수득하여 2-DE분석한 결과를 보여준다.
- 도 6은 단백질 스팟의 배치를 대표하는 15, 18 및 35 NR(Non Redundant) 분비단백질을 확인한 결과이다.
- 도 7은 펩타이드의 MS 스펙트라를 나타낸다.
- 도 8은 벼도열병균 포자가 벼 잎에 접종된 후 침입 초기단계의 분비단백질 연구를 도식화하여 보여준다.
- 도 9는 SK1834 벡터의 지도를 나타낸다.
- 도 10은 벼도열병균 결실돌연변이주 제작을 위한 각각의 분비단백질의 벡터 디자인을 보여준다.
- 도 11은 벼도열병균 결실돌연변이주 확인을 위한 PCR 결과를 나타낸다.
- 도 12는 벼도열병균 결실돌연변이주를 동진벼, 화청벼 및 니폰베어벼에 접종하여 병원성을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0076] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0077] 실시예

[0078] 실시예 1: 인비트로 시스템 구축

[0079] 벼도열병균(Magnaporthe oryzae)

- [0080] 균류(블라스트; M. oryzae KJ201, KJ401 및 S102) 병원체를 한국 농촌진흥청으로부터 수득하였다. KJ는 자포

니아 벼(japonia rice) 품종에 감염되는 한국 품종을 대표한다. KJ201 및 KJ401은 같은 품종이나, S102는 니폰배어(Nipponbare) 품종이다. 오토밀(Oatmeal) 아가 배지(50 g/L 오토밀)을 생장 번식 및 포자 생성을 위해 사용하였다.³¹ 균사체 파편(fragment)을 오토밀 아가 배지 상에 두고 3주 동안 26℃에서 분생자 포자를 생성하는 3일 동안은 광주기만을, 그 이후에는 16 시간 광주기/8시간 암주기 조건으로 배양하였다.

[0081] 현미경 관찰

[0082] 감염 전의 형태를 현미경을 사용하여 *인 비보(in vivo)* 및 *인 비트로(in vitro)*에서 관찰하였다. 분생자 포자(KJ201; 1×10^6 /ml)를 소수성의 유리판(Glass Plate; GP, 요철 굴곡이 있는 표면을 갖는 유리판) 및 PVDF(Polyvinylidene fluoride) 막(Hybond-P, 포어 크기 0.45 μ m; Amersham Biosciences, 스웨덴)에 공기압축기를 사용하여 분무하고 플라스틱 랩으로 덮어 습도를 유지하여 *인 비트로* 관찰하였다. 분생자 포자(KJ201; 1×10^6 /ml)를 액체 배양 배지(0.06%(w/v) 효모 추출물, 0.06%(w/v) 카사미노산(casamino acid) 및 0.1%(w/v) 수크로즈)에 접종하여 26℃, 220 rpm 조건에서 진탕배양으로 *인 비트로* 배양하였다. *인 비보* 관찰은 3주된 잎의 벼 묘목에 250 ppm 트윈20에 현탁된 GFP(Green Fluorescent Protein)-태깅된 KJ201 포자(1×10^6 /ml)를 공기압축기를 이용하여 분무하고, 24시간 동안 습식 챔버에서 배양하였다. 현미경 관찰은 접종 후(Post-Inoculation; PI), 0, 4, 8 및 24시간째에 녹색 필터(Carl Zeiss, 독일)를 장치한 현미경을 이용하여 광학 및 형광 조건(여기; 450-500 nm; 빔 스플리터, FT501 nm; 여기, BP5150565 nm)에서 관찰하였다. 액시오비전(Axiovision) 4.5(Carl Zeiss, 독일) 포토샵 CS2(Adobe)를 이용하여 전자이미지를 처리하였다.

[0083] 분비단백질의 추출

[0084] *인 비트로* 조건에서 분비단백질을 추출하기 위해, 분생자 포자(1×10^6 /ml; KJ201)을 GP 또는 PVDF 막(Hybond-P, 포어 크기 0.45 μ m)에 공기압축기를 이용하여 분무하고, 플라스틱으로 덮어 습도를 유지하였다. 접종 후, 3, 24 및 48시간째에 GP 표면에서 발아된 포자에 의해 분비된 단백질을 GP를 탈염수로 세척하여 수집하였다. 접종 후, 24시간에 PVDF 막 표면을 5 ml 탈염수(예컨대, 1차 세척)로 세척하여 분비단백질을 수집하였다. 동일한 막을 블레이드로 긁고 동일한 양의 탈염수로 세척(2차 세척)하여 남아있는 분비단백질을 수득하였다. 18,500×g로 4℃, 10분 동안 원심분리하여 샘플을 수득하였다. 두 번 세척의 맑은 상층액을 각각 독립적으로 2-DE 분석하였다. 간단하게, 상층액을 즉시 동결-건조하고 300 μ l LB-TT(7 M(w/v) 우레아, 2 M(w/v) 티오우레아, 4%(w/v) CHAPS(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 18 mM(w/v) Tris-HCl(pH8.0), 14 mM(w/v) 트리즈마 염, 0.2%(w/v) 트리트론 X-100, 50 mM(w/v) 디티오프레itol(dithiothreitol), 1%(w/v) 앰포라이트(ampholyte, pH3.0) 및 하나의 EDTA-프리 프로테이나제 억제제 타블렛(Roche Applied Science, 미국)/ 50ml 완충액)에 현탁하였다.

[0085] 벼도열병균 배양판의 균사체 파편을 LCM(300 ml)에서 48시간 동안 26℃로 220rpm 진탕배양하였다. 배양여과액을 3,500×g로 10분 동안 원심분리하고 상층액을 막 필터(0.45 μ m)를 통과시켜 균사체 및 다른 입자를 제거하였다. 여과액을 동결-건조하고 트리스 완충액(10 mM Tris-HCl, pH8.0)에 투석하였다. 탈염 단백질을 동결-건조하고 300 μ l LB-TT에 현탁하였다. 4 종의 독립적인 생물 복제물에 상기 언급한 *인 비트로* 방법을 수행하였다.

[0086] 단백질 정량

[0087] LB-TT 완충액에 현탁된 단백질을 원심분리하여 맑은 상층액을 수득하고 이를 수정된 브래드포드 분석법으로 단백질 정량하였다.³² 간단하게, 단백질 표준 용액으로, LB-TT 완충액에 BSA(Bovine Serum Albumin)을 준비하였다. 각 단백질 샘플(GP, PVDF 막 및 LCM의 2 μ l) 및 BSA 표준양(0, 2, 4 및 6 μ g)을 0.1 mM HCl을 포함하는 20% 브래드포드 시약(Bio-rad, 미국)혼합하여 최종 부피가 1 ml이 되었다. 각 샘플 혼합액을 Pharmacia LKB Ultrospec III(Amersham Biosciences, 미국)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0088] 2-DE, 단백질 가시화 및 이미지 분석

[0089] 이전에 보고된 수평 전기영동 유니트(Nihon Eido, 일본)에 12% SDS-PAGE로 2차원 분리 한 후에, IPGphor 유니트(GE Healthcare, 스웨덴)을 사용하여 2-DE 분석을 실시하였다.²⁹ 간략하게, 분리된 단백질의 30 μ g(GP 및 PVDF 막) 또는 100 μ g(LCM)을 0.5%(v/v) pH4-7 IPG 완충액 및 1% 디스트릭(DeStreak) 시약(GE Healthcare, 영국)을 포함하는 LB-TT와 최종 부피가 450 μ l이 되게 혼합하고, IPG 스트립(pH4-7, 24 cm; GE Healthcare)에 로딩하였다. 2-D 젤을 실버 니트레이트(silver nitrate, Plus One Silver Staining Kit, GE Healthcare), SYPRO 루비 단백질 염색(Bio-rad) 또는 콜로이드 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue; CBB)로 염색하였다. 젤 상의 단백질 패턴을 전자스캐너(EPSON Perfection 4490 Photo, 미국; 해상도 400dpi) 및 젤 다큐먼트 시스템(Bio-rad Gel Doc Imager System)을 사용하여 전자 이미지로 기록하고, TIF 파일로 저장하였다. 상기 젤을 EasyPro-2D 소프트웨어 작동 매뉴얼(BioBud, 대한민국)의 지시에 따라 프로필 모드로 정량하였다. 의미있는 단백질 스팟을 젤 피커(One Touch Spot Picker, P2D1.5 및 3.0; The Gel Co., 미국)을 이용하여 적제하여 -80℃에 저장하였다.

[0090] 젤 상 소화, 질량 분석법, 정보 검색 및 단백질 확인

[0091] 단백질 스팟을 포함하는 절제한 젤 조각을 15 mM 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide) 및 50 mM 티오황산나트륨(sodium thiosulfate)와 반응시켜 실버 니트레이트 염색을 제거하였다. 탈색된 스팟 및 SYPRO 루비-염색된 스팟에 트립신(Promega, 미국)을 처리하고, 추출한 단백질을 이전에 보고된 방법대로, nESI-LC(nano-Electrospray Ionization source Liquid Chromatography)-MS/MS 분석을 실시하였다.²⁹ 수득한 MS/MS 스펙트라의 *M. oryzae*에 대한 단백질 정보를 아질런트 스펙트럼 밀 MS 프로테오믹스 워크벤치(Agilent Spectrum Mill MS Progeomics Workbench, Spectrum Mill version; Agilent Technologies, 미국)을 사용하여 검색하였다. 상기 소프트웨어는 알려진 아미노산(서열 태그 길이>1)에 상응하는 충돌-유발분해(collision-induced dissociation)에 의한 파편의 차이를 구하여 MS/MS 스펙트라로부터 펩타이드를 확인하는 정보추출기능을 포함한다. 그러므로, 펩타이드의 불필요한 스펙트라를 버리는 필터로써 기능한다. MS/MS 스펙트라는 Bernd Glatz 및 Patric Horth 방법을 수정하여 아질런트 스펙트럼 밀 데이터 추출 프로그램(Agilent Spectrum Mill Data Extractor program)으로 도출하였다. 검색 파라미터는 비변경(unmodified) 및 카르바미도메틸레이션(carbamidomethylation) 시스테인을 포함한다. 추출한 MS/MS 스펙트라를 다음의 파라미터를 사용하여 *M. oryzae* 단백질 정보(*M. oryzae* 70-15)에 대해 검색하였다:

[0092] (i) 2 가능한 미스(missed) 절단을 갖는 풀(full) 트립신 절단, (ii) ± 2.5 Da의 전구체 이온 내성, (iii) ± 0.7 Da의 파편(fragment) 이온 내성, 및 (iv) 시스테인 잔기(+57 Da)의 카르복실아미노메틸화에 의한 가변적 조각. 단백질 상세 모드에서 Bernd Glatz 및 Horth 방법에 따라 스펙트럼 밀 자동-확인하였다.

[0093] 단백질의 기능적 분류 및 주석

[0094] 이전에 보고된 방법에 따라, 기능 분류를 수행하였다.^{33,34} 각 단백질의 기능 분류는 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 보존적 도메인 정보(Conserved Domain Database; CDD)에 근거하였다.³⁵ 기능을 모르는 단백질은 BlastP 프로그램을 이용하여 모든 NR 단백질 서열에 대하여 조사하였다. 단백질 얼라인먼트(alignment)는 10-30의 e-값을 갖는 중요성을 고려하였다. 확인된 단백질의 분비 기작을 예측하는데 SignalP 및 SecretomeP 예측 프로그램을 적용하였다.

[0095] 결과 및 토론

[0096] 벼도열병균(*M. oryzae*)의 시크리툼(secretome) 수립

[0097] 도 1에서 실험 전략을 도식적으로 나타내었다. 벼도열병균에 대한 벼 잎의 표면 구조/환경을 고려하여 인 비트로 실험을 계획하였다. 벼도열병균이 벼 잎의 표면에 접촉하였을 때, 감염 과정은 시작된다. 감염의 초기 단계는 분생자 형성, 발아, 군사 성장 및 세포벽을 파괴하고 침투하게 하는 부착기 형성을 포함한다. 현미경을 통해 관찰한 결과, 벼 잎 표면은 단단하고 소수성의 특징을 갖는다. 이러한 벼 잎의 소수성 특징은 벼도열

병균에 의한 부착기 형성에 적절한 환경을 제공한다. 예컨대, 반기생영양(hemibiotrophic) 균류인 벼도열병균은 벼 조직에 감염될 때 잎 및 뿌리에서 다른 감염방식을 갖는다. 뿌리에 감염되는 경우, 벼도열병균은 잎의 경우처럼 부착기를 형성하지 않고, 균족(hyphopodia)으로부터 감염을 개시한다.³⁸

[0098] 형태의 관찰결과를 고려하여, 3가지 인 비트로 실험을 계획하였다. GP 및 PVDF 막 실험은 벼도열병균에 대한 2가지 다른 소수성 조건을 제공하고, 반면에 LCM은 친수성 특징을 갖는다(도 1). LCM은 식물 및 균류의 시크리툼 연구에 주로 사용되어왔다.^{17,33,34,42-44} 인 비트로 시스템에서 숙주와 벼도열병균의 상호작용을 플랜타(planta) 시스템(벼 잎)과 병행하여 다양한 초기 시간대에서 벼도열병균-벼 상호작용의 환경 및 분비단백질의 분리 및 분석을 미시적으로 연구하였다(도 1). 최적 조건 하에, 특정 시간에 준비한 분비단백질 분획을 분석하여 2-D 젤-기반 프로테오믹 접근법을 nESI-LC-MS/MS 및 바이오인포매틱스와 조합한 방법을 통해 벼도열병균의 2-D 젤 시토크롬 지도 및 데이터세트를 확립하였다.

[0099] 인 비트로 벼 잎-벼도열병균 상호작용의 재연성 확립

[0100] 포자가 벼 잎에 접촉한 시간을 0 시간으로 정하고, 접종 후 4, 8 및 24 시간에 현미경을 통해 포자의 성장을 관찰하였다(도 2). GP, PVDF 막 및 벼 잎의 표면에서는 4 시간 이후에 포자 발아 및 발아관 성장이 시작된 것이 관찰되었으나, LCM에서는 그렇지 관찰되지 않았다. LCM에서, 포자 발아는 4시간 뒤에 시작하였고, 발아관은 8 시간 뒤에 분명해졌다. 그러나, LCM에서 24시간까지 균사가 부착기로 분화하지 않았다. 반면에, GP, PVDF 막 및 벼 잎 상에 발아한 포자는 접종 후 8시간째에 부착기를 발생하였고 발아관 및 부착기는 24시간까지 관찰되었다(도2). 흥미롭게도, PVDF 막 상의 부착기 발생은 8시간에 발아 및 발아관의 2단계에 진입하고 이어 24 시간에 구형 구조를 형성하였다. 이러한 결과는, (i) GP 및 PVDF 막의 표면에서 포자로부터 부착기를 형성하는 벼도열병 주기는 벼 잎 표면의 것과 시간적으로 유사하다. (ii) LCM에서 벼도열병균의 발생 주기는 부착기 단계로 진입하지 않았는데, 이는 LCM이 친수성 특성을 갖기 때문이다. 그러므로, LCM 상태로 GP 및 PVDF 막은 벼도열병균의 감염 초기 과정의 시크리툼을 개발하는데 적당한 플랫폼으로 사용될 것이다. 또한, 3가지 인 비트로 시스템 사이의 벼도열병균의 성장 패턴의 차이는 표면 환경에 따른 것이다.

[0101] GP, PVDF 막 및 LCM에서 벼도열병균 단백질 분비의 차이

[0102] 인 비트로 조건에서 벼도열병균의 성장을 관찰한 결과는 프로테오믹스 분석에 사용하기 위한 수용성 분비단백질을 분리하기 위한 샘플 수집의 적당한 시간대를 알려준다. 스왓이 겹치는 문제를 해결하기 위해, Righetti이 보고한대로, 24-cm IPG(Immobilized pH Gradient) 스트립(pH4-7)을 모든 2-DE 실험에 사용하였다.⁴⁵⁻⁴⁶ 첫 번째, 발아 및 발아관의 성장, 부착기 형성 및 부착기 후 단계를 각각 조사하기 위해, 접종 후 3, 24 및 48시간에 GP 상의 벼도열병균이 분비한 단백질을 분리하였다. 2-DE에 의한 단백질의 분리 결과는 48시간에 분비단백질 스왓의 수가 극격히 감소한 것을 말해준다(도 3). 3시간에도 약간의 단백질 스왓이 검출되었다. 24시간에서 최대 개수의 스왓이 나타났으며, 이는 48시간에 급격히 감소하였다. 3 단백질 스왓이 3시간 및 24시간에 검출되었다. 3시간의 단백질 스왓 H21 및 H22는 24시간의 단백질 스왓인 H1, H2 및 H3와 NCBI 접근번호 39974389로 동일한 단백질이다. 3시간의 단백질 스왓 H23은 24시간의 H15와 NCBI 접근번호 39945550으로 동일한 단백질이다(표 1). 단백질 프로파일은 3, 24 및 48시간의 분비단백질의 측정된 양(24시간에 수용성 분비단백질의 양은 865.4 fg/포자이고, 3시간의 수용성 분비단백질의 양은 223.1 fg 단백질/포자로, 24시간에 비해 4배나 많음)과 일치한다.

[0103] PVDF 막 및 LCM으로부터 분비단백질을 다양한 시간대에 수집하여, 단백질이 최대로 분비되는 시간을 찾기 위해 12% SDS-PAGE를 실시하였다. 도 1, 도 4 및 도 5는 PVDF 막 및 LCM에서 24시간에 벼도열병균의 단백질이 최대로 분비되어, 이 시간대를 2-DE 분석하였다.

[0104] PVDF 막 및 LCM에서 벼도열병균의 분비단백질 분석한 2-D 결과를 도 4 및 도 5에 각각 나타내었다. PVDF 막의 경우, 1차 및 2차 세척으로부터 분리한 분비단백질을 2-DE를 실시하고 독립적으로 SYPRO 루비(Ruby) 또는 콜로이달 CBB로 염색하였다(도 4). GP, PVDF 막 및 LCM에의 벼도열병균 분비단백질의 차이를 2-D 결과의 정성 비교로 확인하였다(도 3 내지 도 5). 이는 벼도열병균의 발생단계에 따른 형태학적 차이와 관련이 있다. LCM의 경우, 다른 품종에 대한 단백질 결과는 그 양에서 차이를 보였다.

[0105] 표 1, 표 2 및 표 3의 'Uni'는 'Unique', 'Pro'는 'Peptide', 'Sco'는 'Score', 'Cov'는 'Coverage', 'MM'은

丑 1

Spot No.	Uni. Pep. Seq.	Cov. (%)	MM/P. I	NCBI No.	Pro. name	Matched sequence	Sign. Pep.	Secretome P (NN, Sco.)	Matched Pro. (NCBI Blast) / Score	CDD (NCBI Blast)	Predicted Func. Class	
H1	4	56.01	8	32172	3997438	HP MG_00659	GGDVTD TDDTAAINAALQAGNR / AKPKQYETLPVSSFITAR/VLWIDHG IYR/VGGFTGSNLQVAQCLK	Yes	0.873	AAP33112.1 beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase family 29	C
H2	6	110.4	12	32172	3997438	HP MG_00659	GGDVTD TDDTAAINAALQAGNR / AKPKQYETLPVSSFITAR/GDGS TDDTNALQNAINTAQQQGR/VLWIDHG IYR/VGGFTGSNLQVAQCLK/GIAGNCANAWGVVR	Yes	0.873	AAP33112.1 beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase family 29	C
H21	2	20.76	4	32172	3997438	HP MG_00659	GGDVTD TDDTAAINAALQAGNR / VGGFTGSNLQVAQCLK	Yes	0.873	AAP33112.1 beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase family 29	C
H3	8	125.3	18	32172	3997438	HP MG_00659	GGDVTD TDDTAAINAALQAGNR / AKPKQYETLPVSSFITAR/GDGS TDDTNALQNAINTAQQQGR/VLWIDHG IYR/VGGFTGSNLQVAQCLK/GIAGNCANAWGVVR/VELQGPVSNINYNLTIGSLSMIQ R/WSDNINTFAQTAMRK	Yes	0.873	AAP33112.1 beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase family 29	C
H22	6	91.88	12	32172	3997438	HP MG_00659	GGDVTD TDDTAAINAALQAGNR / AKPKQYETLPVSSFITAR/GDGS TDDTNALQNAINTAQQQGR/VLWIDHG IYR/VGGFTGSNLQVAQCLK/GIAGNCANAWGVVR	Yes	0.873	AAP33112.1 beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase family 29	C
H4	3	45.18	8	58208	3997379	HP MG_00994	TSTEVSLFETTIR/LGDLTGPNVFTELALKYSYLHAEDAPWQVK	Yes	0.733	EFQ33498.1 glycosyl hydrolase family 47 [Glomerella graminicola M1.00.1] / 635	Glycosyl hydrolase family 47	C
H5	8	131.7	23	47106	456164	HP MG_00400	GNPTVEVDWVTDGLNRAVEIWNNNIGPALIK/ENDVKQGAEEVYQQKLKAANALLKVNQIGTLTESIQAAK/SGETEDVTADIAVGLR/IEELGSAVFAGESFR	No	0.396	XP_366388.2 endoglucanase [M. grisea 70-15] / 895	Endoglucanase	M
H6	5	34.51	12	56386	456116	HP MG_01608	INTVEYDGVPGVPTQCP/APGKISGADCSFAPVDPTAWR/YDASSTAEPSTSVSDVKR/VFDR/EPIRTPYNNMVR	Yes	0.806	CAD10747.1 laccase [Gaeumannomyces graminis var. tritici] / 780	Multicopper oxidase	R
H7	1	14.82	1	10532	456100	HP MG_01443	GKDNDEYNLPSSAK	No	0.227	XP_001817507.1 protein HorB [Aspergillus oryzae RIB40] / 372	HorB	G
H8	5	78.93	37	18004	3997048	HP MG_02710	VGDAFFPDGVSFTYVPTGGKKISIGWNLGDSGR/YAIVVDHGKLVITYAEK/EEAGGIAVSGAEAVLAK	No	0.898	AA56588.1 peroxisomal membrane protein [Chaetomium globosum] / 200	Peroxisomal membrane protein (PRX) family	R
H9	5	72.91	21	41349	3995217	HP MG_01732	ECSPDFAWLTDLSANSR/KVDITIGGPVSSVYIGK/FVVPDLGSDR/LAIDGAGGLGLTEVEPLARPGSGPR/DGSLVAVGLQDGR	Yes	0.804	XP_001937682.1 3-carboxymuconate cyclase [Pyrenopeziza tritici-repentis Pt-1C-BFF1] / 187	Lactonase, 7-oxo-6-oxo-2-oxo-3-oxo-4-oxo-5-oxo-6-oxo-7-oxo-8-oxo-9-oxo-10-oxo-11-oxo-12-oxo-13-oxo-14-oxo-15-oxo-16-oxo-17-oxo-18-oxo-19-oxo-20-oxo-21-oxo-22-oxo-23-oxo-24-oxo-25-oxo-26-oxo-27-oxo-28-oxo-29-oxo-30-oxo-31-oxo-32-oxo-33-oxo-34-oxo-35-oxo-36-oxo-37-oxo-38-oxo-39-oxo-40-oxo-41-oxo-42-oxo-43-oxo-44-oxo-45-oxo-46-oxo-47-oxo-48-oxo-49-oxo-50-oxo-51-oxo-52-oxo-53-oxo-54-oxo-55-oxo-56-oxo-57-oxo-58-oxo-59-oxo-60-oxo-61-oxo-62-oxo-63-oxo-64-oxo-65-oxo-66-oxo-67-oxo-68-oxo-69-oxo-70-oxo-71-oxo-72-oxo-73-oxo-74-oxo-75-oxo-76-oxo-77-oxo-78-oxo-79-oxo-80-oxo-81-oxo-82-oxo-83-oxo-84-oxo-85-oxo-86-oxo-87-oxo-88-oxo-89-oxo-90-oxo-91-oxo-92-oxo-93-oxo-94-oxo-95-oxo-96-oxo-97-oxo-98-oxo-99-oxo-100-oxo-101-oxo-102-oxo-103-oxo-104-oxo-105-oxo-106-oxo-107-oxo-108-oxo-109-oxo-110-oxo-111-oxo-112-oxo-113-oxo-114-oxo-115-oxo-116-oxo-117-oxo-118-oxo-119-oxo-120-oxo-121-oxo-122-oxo-123-oxo-124-oxo-125-oxo-126-oxo-127-oxo-128-oxo-129-oxo-130-oxo-131-oxo-132-oxo-133-oxo-134-oxo-135-oxo-136-oxo-137-oxo-138-oxo-139-oxo-140-oxo-141-oxo-142-oxo-143-oxo-144-oxo-145-oxo-146-oxo-147-oxo-148-oxo-149-oxo-150-oxo-151-oxo-152-oxo-153-oxo-154-oxo-155-oxo-156-oxo-157-oxo-158-oxo-159-oxo-160-oxo-161-oxo-162-oxo-163-oxo-164-oxo-165-oxo-166-oxo-167-oxo-168-oxo-169-oxo-170-oxo-171-oxo-172-oxo-173-oxo-174-oxo-175-oxo-176-oxo-177-oxo-178-oxo-179-oxo-180-oxo-181-oxo-182-oxo-183-oxo-184-oxo-185-oxo-186-oxo-187-oxo-188-oxo-189-oxo-190-oxo-191-oxo-192-oxo-193-oxo-194-oxo-195-oxo-196-oxo-197-oxo-198-oxo-199-oxo-200-oxo-201-oxo-202-oxo-203-oxo-204-oxo-205-oxo-206-oxo-207-oxo-208-oxo-209-oxo-210-oxo-211-oxo-212-oxo-213-oxo-214-oxo-215-oxo-216-oxo-217-oxo-218-oxo-219-oxo-220-oxo-221-oxo-222-oxo-223-oxo-224-oxo-225-oxo-226-oxo-227-oxo-228-oxo-229-oxo-230-oxo-231-oxo-232-oxo-233-oxo-234-oxo-235-oxo-236-oxo-237-oxo-238-oxo-239-oxo-240-oxo-241-oxo-242-oxo-243-oxo-244-oxo-245-oxo-246-oxo-247-oxo-248-oxo-249-oxo-250-oxo-251-oxo-252-oxo-253-oxo-254-oxo-255-oxo-256-oxo-257-oxo-258-oxo-259-oxo-260-oxo-261-oxo-262-oxo-263-oxo-264-oxo-265-oxo-266-oxo-267-oxo-268-oxo-269-oxo-270-oxo-271-oxo-272-oxo-273-oxo-274-oxo-275-oxo-276-oxo-277-oxo-278-oxo-279-oxo-280-oxo-281-oxo-282-oxo-283-oxo-284-oxo-285-oxo-286-oxo-287-oxo-288-oxo-289-oxo-290-oxo-291-oxo-292-oxo-293-oxo-294-oxo-295-oxo-296-oxo-297-oxo-298-oxo-299-oxo-300-oxo-301-oxo-302-oxo-303-oxo-304-oxo-305-oxo-306-oxo-307-oxo-308-oxo-309-oxo-310-oxo-311-oxo-312-oxo-313-oxo-314-oxo-315-oxo-316-oxo-317-oxo-318-oxo-319-oxo-320-oxo-321-oxo-322-oxo-323-oxo-324-oxo-325-oxo-326-oxo-327-oxo-328-oxo-329-oxo-330-oxo-331-oxo-332-oxo-333-oxo-334-oxo-335-oxo-336-oxo-337-oxo-338-oxo-339-oxo-340-oxo-341-oxo-342-oxo-343-oxo-344-oxo-345-oxo-346-oxo-347-oxo-348-oxo-349-oxo-350-oxo-351-oxo-352-oxo-353-oxo-354-oxo-355-oxo-356-oxo-357-oxo-358-oxo-359-oxo-360-oxo-361-oxo-362-oxo-363-oxo-364-oxo-365-oxo-366-oxo-367-oxo-368-oxo-369-oxo-370-oxo-371-oxo-372-oxo-373-oxo-374-oxo-375-oxo-376-oxo-377-oxo-378-oxo-379-oxo-380-oxo-381-oxo-382-oxo-383-oxo-384-oxo-385-oxo-386-oxo-387-oxo-388-oxo-389-oxo-390-oxo-391-oxo-392-oxo-393-oxo-394-oxo-395-oxo-396-oxo-397-oxo-398-oxo-399-oxo-400-oxo-401-oxo-402-oxo-403-oxo-404-oxo-405-oxo-406-oxo-407-oxo-408-oxo-409-oxo-410-oxo-411-oxo-412-oxo-413-oxo-414-oxo-415-oxo-416-oxo-417-oxo-418-oxo-419-oxo-420-oxo-421-oxo-422-oxo-423-oxo-424-oxo-425-oxo-426-oxo-427-oxo-428-oxo-429-oxo-430-oxo-431-oxo-432-oxo-433-oxo-434-oxo-435-oxo-436-oxo-437-oxo-438-oxo-439-oxo-440-oxo-441-oxo-442-oxo-443-oxo-444-oxo-445-oxo-446-oxo-447-oxo-448-oxo-449-oxo-450-oxo-451-oxo-452-oxo-453-oxo-454-oxo-455-oxo-456-oxo-457-oxo-458-oxo-459-oxo-460-oxo-461-oxo-462-oxo-463-oxo-464-oxo-465-oxo-466-oxo-467-oxo-468-oxo-469-oxo-470-oxo-471-oxo-472-oxo-473-oxo-474-oxo-475-oxo-476-oxo-477-oxo-478-oxo-479-oxo-480-oxo-481-oxo-482-oxo-483-oxo-484-oxo-485-oxo-486-oxo-487-oxo-488-oxo-489-oxo-490-oxo-491-oxo-492-oxo-493-oxo-494-oxo-495-oxo-496-oxo-497-oxo-498-oxo-499-oxo-500-oxo-501-oxo-502-oxo-503-oxo-504-oxo-505-oxo-506-oxo-507-oxo-508-oxo-509-oxo-510-oxo-511-oxo-512-oxo-513-oxo-514-oxo-515-oxo-516-oxo-517-oxo-518-oxo-519-oxo-520-oxo-521-oxo-522-oxo-523-oxo-524-oxo-525-oxo-526-oxo-527-oxo-528-oxo-529-oxo-530-oxo-531-oxo-532-oxo-533-oxo-534-oxo-535-oxo-536-oxo-537-oxo-538-oxo-539-oxo-540-oxo-541-oxo-542-oxo-543-oxo-544-oxo-545-oxo-546-oxo-547-oxo-548-oxo-549-oxo-550-oxo-551-oxo-552-oxo-553-oxo-554-oxo-555-oxo-556-oxo-557-oxo-558-oxo-559-oxo-560-oxo-561-oxo-562-oxo-563-oxo-564-oxo-565-oxo-566-oxo-567-oxo-568-oxo-569-oxo-570-oxo-571-oxo-572-oxo-573-oxo-574-oxo-575-oxo-576-oxo-577-oxo-578-oxo-579-oxo-580-oxo-581-oxo-582-oxo-583-oxo-584-oxo-585-oxo-586-oxo-587-oxo-588-oxo-589-oxo-590-oxo-591-oxo-592-oxo-593-oxo-594-oxo-595-oxo-596-oxo-597-oxo-598-oxo-599-oxo-600-oxo-601-oxo-602-oxo-603-oxo-604-oxo-605-oxo-606-oxo-607-oxo-608-oxo-609-oxo-610-oxo-611-oxo-612-oxo-613-oxo-614-oxo-615-oxo-616-oxo-617-oxo-618-oxo-619-oxo-620-oxo-621-oxo-622-oxo-623-oxo-624-oxo-625-oxo-626-oxo-627-oxo-628-oxo-629-oxo-630-oxo-631-oxo-632-oxo-633-oxo-634-oxo-635-oxo-636-oxo-637-oxo-638-oxo-639-oxo-640-oxo-641-oxo-642-oxo-643-oxo-644-oxo-645-oxo-646-oxo-647-oxo-648-oxo-649-oxo-650-oxo-651-oxo-652-oxo-653-oxo-654-oxo-655-oxo-656-oxo-657-oxo-658-oxo-659-oxo-660-oxo-661-oxo-662-oxo-663-oxo-664-oxo-665-oxo-666-oxo-667-oxo-668-oxo-669-oxo-670-oxo-671-oxo-672-oxo-673-oxo-674-oxo-675-oxo-676-oxo-677-oxo-678-oxo-679-oxo-680-oxo-681-oxo-682-oxo-683-oxo-684-oxo-685-oxo-686-oxo-687-oxo-688-oxo-689-oxo-690-oxo-691-oxo-692-oxo-693-oxo-694-oxo-695-oxo-696-oxo-697-oxo-698-oxo-699-oxo-700-oxo-701-oxo-702-oxo-703-oxo-704-oxo-705-oxo-706-oxo-707-oxo-708-oxo-709-oxo-710-oxo-711-oxo-712-oxo-713-oxo-714-oxo-715-oxo-716-oxo-717-oxo-718-oxo-719-oxo-720-oxo-721-oxo-722-oxo-723-oxo-724-oxo-725-oxo-726-oxo-727-oxo-728-oxo-729-oxo-730-oxo-731-oxo-732-oxo-733-oxo-734-oxo-735-oxo-736-oxo-737-oxo-738-oxo-739-oxo-740-oxo-741-oxo-742-oxo-743-oxo-744-oxo-745-oxo-746-oxo-747-oxo-748-oxo-749-oxo-750-oxo-751-oxo-752-oxo-753-oxo-754-oxo-755-oxo-756-oxo-757-oxo-758-oxo-759-oxo-760-oxo-761-oxo-762-oxo-763-oxo-764-oxo-765-oxo-766-oxo-767-oxo-768-oxo-769-oxo-770-oxo-771-oxo-772-oxo-773-oxo-774-oxo-775-oxo-776-oxo-777-oxo-778-oxo-779-oxo-780-oxo-781-oxo-782-oxo-783-oxo-784-oxo-785-oxo-786-oxo-787-oxo-788-oxo-789-oxo-790-oxo-791-oxo-792-oxo-793-oxo-794-oxo-795-oxo-796-oxo-797-oxo-798-oxo-799-oxo-800-oxo-801-oxo-802-oxo-803-oxo-804-oxo-805-oxo-806-oxo-807-oxo-808-oxo-809-oxo-810-oxo-811-oxo-812-oxo-813-oxo-814-oxo-815-oxo-816-oxo-817-oxo-818-oxo-819-oxo-820-oxo-821-oxo-822-oxo-823-oxo-824-oxo-825-oxo-826-oxo-827-oxo-828-oxo-829-oxo-830-oxo-831-oxo-832-oxo-833-oxo-834-oxo-835-oxo-836-oxo-837-oxo-838-oxo-839-oxo-840-oxo-841-oxo-842-oxo-843-oxo-844-oxo-845-oxo-846-oxo-847-oxo-848-oxo-849-oxo-850-oxo-851-oxo-852-oxo-853-oxo-854-oxo-855-oxo-856-oxo-857-oxo-858-oxo-859-oxo-860-oxo-861-oxo-862-oxo-863-oxo-864-oxo-865-oxo-866-oxo-867-oxo-868-oxo-869-oxo-870-oxo-871-oxo-872-oxo-873-oxo-874-oxo-875-oxo-876-oxo-877-oxo-878-oxo-879-oxo-880-oxo-881-oxo-882-oxo-883-oxo-884-oxo-885-oxo-886-oxo-887-oxo-888-oxo-889-oxo-890-oxo-891-oxo-892-oxo-893-oxo-894-oxo-895-oxo-896-oxo-897-oxo-898-oxo-899-oxo-900-oxo-901-oxo-902-oxo-903-oxo-904-oxo-905-oxo-906-oxo-907-oxo-908-oxo-909-oxo-910-oxo-911-oxo-912-oxo-913-oxo-914-oxo-915-oxo-916-oxo-917-oxo-918-oxo-919-oxo-920-oxo-921-oxo-922-oxo-923-oxo-924-oxo-925-oxo-926-oxo-927-oxo-928-oxo-929-oxo-930-oxo-931-oxo-932-oxo-933-oxo-934-oxo-935-oxo-936-oxo-937-oxo-938-oxo-939-oxo-940-oxo-941-oxo-942-oxo-943-oxo-944-oxo-945-oxo-946-oxo-947-oxo-948-oxo-949-oxo-950-oxo-951-oxo-952-oxo-953-oxo-954-oxo-955-oxo-956-oxo-957-oxo-958-oxo-959-oxo-960-oxo-961-oxo-962-oxo-963-oxo-964-oxo-965-oxo-966-oxo-967-oxo-968-oxo-969-oxo-970-oxo-971-oxo-972-oxo-973-oxo-974-oxo-975-oxo-976-oxo-977-oxo-978-oxo-979-oxo-980-oxo-981-oxo-982-oxo-983-oxo-984-oxo-985-oxo-986-oxo-987-oxo-988-oxo-989-oxo-990-oxo-991-oxo-992-oxo-993-oxo-994-oxo-995-oxo-996-oxo-997-oxo-998-oxo-999-oxo-1000-oxo-1001-oxo-1002-oxo-1003-oxo-1004-oxo-1005-oxo-1006-oxo-1007-oxo-1008-oxo-1009-oxo-1010-oxo-1011-oxo-1012-oxo-1013-oxo-1014-oxo-1015-oxo-1016-oxo-1017-oxo-1018-oxo-1019-oxo-1020-oxo-1021-oxo-1022-oxo-1023-oxo-1024-oxo-1025-oxo-1026-oxo-1027-oxo-1028-oxo-1029-oxo-1030-oxo-1031-oxo-1032-oxo-1033-oxo-1034-oxo-1035-oxo-1036-oxo-1037-oxo-1038-oxo-1039-oxo-1040-oxo-1041-oxo-1042-oxo-1043-oxo-1044-oxo-1045-oxo-1046-oxo-1047-oxo-1048-oxo-1049-oxo-1050-oxo-1051-oxo-1052-oxo-1053-oxo-1054-oxo-1055-oxo-1056-oxo-1057-oxo-1058-oxo-1059-oxo-1060-oxo-1061-oxo-1062-oxo-1063-oxo-1064-oxo-1065-oxo-1066-oxo-1067-oxo-1068-oxo-1069-oxo-1070-oxo-1071-oxo-1072-oxo-1073-oxo-1074-oxo-1075-oxo-1076-oxo-1077-oxo-1078-oxo-1079-oxo-1080-oxo-1081-oxo-1082-oxo-1083-oxo-1084-oxo-1085-oxo-1086-oxo-1087-oxo-1088-oxo-1089-oxo-1090-oxo-1091-oxo-1092-oxo-1093-oxo-1094-oxo-1095-oxo-1096-oxo-1097-oxo-1098-oxo-1099-oxo-1100-oxo-1101-oxo-1102-oxo-1103-oxo-1104-oxo-1105-oxo-1106-oxo-1107-oxo-1108-oxo-1109-oxo-1110-oxo-1111-oxo-1112-oxo-1113-oxo-1114-oxo-1115-oxo-1116-oxo-1117-oxo-1118-oxo-1119-oxo-1120-oxo-1121-oxo-1122-oxo-1123-oxo-1124-oxo-1125-oxo-1126-oxo-1127-oxo-1128-oxo-1129-oxo-1130-oxo-1131-oxo-1132-oxo-1133-oxo-1134-oxo-1135-oxo-1136-oxo-1137-oxo-1138-oxo-1139-oxo-1140-oxo-1141-oxo-1142-oxo-1143-oxo-1144-oxo-1145-oxo-1146-oxo-1147-oxo-1148-oxo-1149-oxo-1150-oxo-1151-oxo-1152-oxo-1153-oxo-1154-oxo-1155-oxo-1156-oxo-1157-oxo-1158-oxo-1159-oxo-1160-oxo-1161-oxo-1162-oxo-1163-oxo-1164-oxo-1165-oxo-1166-oxo-1167-oxo-1168-oxo-1169-oxo-1170-oxo-1171-oxo-1172-oxo-1173-oxo-1174-oxo-1175-oxo-1176-oxo-1177-oxo-1178-oxo-1179-oxo-1180-oxo-1181-oxo-1182-oxo-1183-oxo-1184-oxo-1185-oxo-1186-oxo-1187-oxo-1188-oxo-1189-oxo-1190-oxo-1191-oxo-1192-oxo-1193-oxo-1194-oxo-1195-oxo-1196-oxo-1197-oxo-1198-oxo-1199-oxo-1200-oxo-1201-oxo-1202-oxo-1203-oxo-1204-oxo-1205-oxo-1206-oxo-1207-oxo-1208-oxo-1209-oxo-1210-oxo-1211-oxo-1212-oxo-1213-oxo-1214-oxo-1215-oxo-1216-oxo-1217-oxo-1218-oxo-1219-oxo-1220-oxo-1221-oxo-1222-oxo-1223-oxo-1224-oxo-1225-oxo-1226-oxo-1227-oxo-1228-oxo-1229-oxo-1230-oxo-1231-oxo-1232-oxo-1233-oxo-1234-oxo-1235-oxo-1236-oxo-1237-oxo-1238-oxo-1239-oxo-1240-oxo-1241-oxo-1242-oxo-1243-oxo-1244-oxo-1245-oxo-1246-oxo-1247-oxo-1248-oxo-1249-oxo-1250-oxo-1251-oxo-1252-oxo-1253-oxo-1254-oxo-1255-oxo-1256-oxo-1257-oxo-1258-oxo-1259-oxo-1260-oxo-1261-oxo-1262-oxo-1263-oxo-1264-oxo-1265-oxo-1266-oxo-1267-oxo-1268-oxo-1269-oxo-1270-oxo-1271-oxo-1272-oxo-1273-oxo-1274-oxo-1275-oxo-1276-oxo-1277-oxo-1278-oxo-1279-oxo-1280-oxo-1281-oxo-1282-oxo-1283-oxo-1284-oxo-1285-oxo-1286-oxo-1287-oxo-1288-oxo-1289-oxo-1290-oxo-1291-oxo-1292-oxo-1293-oxo-1294-oxo-1295-oxo-1296-oxo-1297-oxo-1298-oxo-1299-oxo-1300-oxo-1301-oxo-1302-oxo-1303-oxo-1304-oxo-1305-oxo-1306-oxo-1307-oxo-1308-oxo-1309-oxo-1310-oxo-1311-oxo-1312-oxo-1313-oxo-1314-oxo-1315-oxo-1316-oxo-1317-oxo-1318-oxo-1319-oxo-1320-oxo-1321-oxo-1322-oxo-1323-oxo-1324-oxo-1325-oxo-1326-oxo-1327-oxo-1328-oxo-1329-oxo-1330-oxo-1331-oxo-1332-oxo-1333-oxo-1334-oxo-1335-oxo-1336-oxo-1337-oxo-1338-oxo-1339-oxo-1340-oxo-1341-oxo-1342-oxo-1343-oxo-1344-oxo-1345-oxo-1346-oxo-1347-oxo-1348-oxo-1349-oxo-1350-oxo-1351-oxo-1352-oxo-1353-oxo-1354-oxo-1355-oxo-1356-oxo-1357-oxo-1358-oxo-1359-oxo-1360-oxo-1361-oxo-1362-oxo-1363-oxo-1364-oxo-1365-oxo-1366-oxo-1367-oxo-1368-oxo-1369-oxo-1370-oxo-1371-oxo-1372-oxo-1373-oxo-1374-oxo-1375-oxo-1376-oxo-1377-oxo-1378-oxo-1379-oxo-1380-oxo-1381-oxo-1382-oxo-1383-oxo-1384-oxo-1385-oxo-1386-oxo-1387-oxo-1388-oxo-1389-oxo-1390-oxo-1391-oxo-1392-oxo-1393-oxo-1394-oxo-1395-oxo-1396-oxo-1397-oxo-1398-oxo-1399-oxo-1400-oxo-1401-oxo-1402-oxo-1403-oxo-1404-oxo-1405-oxo-1406-oxo-1407-oxo-1408-oxo-1409-oxo-1410-oxo-1411-oxo-1412	

H10	4	64.01	10	41349 / 5.03	3995217 / 9	HP MGG_01732	LYCVGEGLNTR/KVDTIGGPVS SVIYGK/FVVPDLGSDRVR	Yes	0.804	XP_001937682.1) 3-carboxymuconate cyclase [Pyrenopeziza tritici-repentis Pt-1C-BFP] / 187	Lactonase, T-b-oxid beta-oxidation	M
H11	3	51.58	17	29541 / 4.92	3997210 / 3	HP MGG_017367	TVAYVHCDYGR/LVYNVGGQV AFANEAAAYLR/ATQPLVAGLP GSGAGAAGK	Yes	0.867	XP_001481574.1) spherulin 4-like cell surface protein [Aspergillus fumigatus Af293] / 824	Spherulins, specific family 4	U
H12	1	16.94	3	35657 / 5.37	3997031 / 5	transaldolase	LIDDAIAYAK	No	0.229	XP_366548.1) transaldolase [Magnaporthe oryzae 70-15] / 656	Transaldolases	M
H13	5	74.82	6	10548 / 5.06	3995203 / 5	HP MGG_01655	LYWPDGAGTPGVRI/DEVTR NTIK/IPGAVNNDLAGR/TYPLE GASVLLPQK/VLISGSDPEDGV NPQEYR	Yes	0.799	CAE76318.1) related to glyoxal oxidase precursor [N. oryzae] / 1172	Glucanase Superfamily Glyoxal oxidases	R
H14	2	65.31	5	53945 / 5.29	4550973 / 3376	HP MGG_013376	LPQTPGAAAMWR/DVTGFYGNLPDGR	Yes	0.661	YP_433708.1) regulatory P domain-containing protein [Helicobacter chejuensis KCTC2396] / 280	Unknown	U
H15	5	62.515	15	53057 / 5.06	3994550 / 0	HP MGG_014757	NDLVGFETLVIGNTVNGEQR/NDPNGVFSVGK/VELALLGIDNPSPNAEITPTR/FVGFTSNRATVEINGIQQR	Yes	0.764	CB155721.1) unannotated protein product [Sordaria macrospora] / 327	Unknown	U
H23	3	44.22	10	53057 / 5.06	3994550 / 0	HP MGG_014757	NDLVGFETLVIGNTVNGEQR/NDPNGVFSVGK/VELALLGIDNPSPNAEITPTR/ATISLYAMD VDPCTGETR	Yes	0.764	CB155721.1) unannotated protein product [Sordaria macrospora] / 327	Unknown	U
H16	5	74.88	16	41349 / 5.03	3995217 / 9	HP MGG_01732	KVDTIGGPVSSVIYGK/GGEGIAAAHYTGSSLTYYAVSDLK/FVVPDLGSDR/DGSLVASGLQGDGR	Yes	0.804	XP_001937682.1) 3-carboxymuconate cyclase [P. tritici-repentis Pt-1C-BFP] / 187	Lactonase, T-b-oxid beta-oxidation	M
H18	1	21.14	1	55389 / 5.55	45511572 / 11608	HP MGG_011608	VVQVSIQQR	Yes	0.806	CAD10747.1) laccase [Gaeumannomyces graminis var. tritici] / 780	Multicopper oxidase	R
H17	2	20.18	6	54778 / 4.71	4550321 / 3262	HP MGG_013262	TQAEELLEGVQITNK/VFLDAVPALHAAIGGADK	Yes	0.825	XP_001275595.1) FAD binding domain protein [A. clavatus NRRL 1] / 500	FAD binding domain	R
H19	4	58.77	7	59465 / 5.58	3997351 / 5	HP MGG_01096	INDPSSGPLSDGSGLGEPK/ALIEGDALAK/FYPINSIGQVGR/FINVASGGAVR	No	0.65	ABY89280.1) putative glucosylase [Gibberella moniliformis] / 764	Glucosylase, glucan 1,4-aldoglucosidase	C
H20	1	17.83	3	52454 / 5.94	3997791 / 7	HP MGG_015843	SDGTPDFGIPIPDGPHVR	Yes	0.813	XP_003003960.1) alpha-N-arabinofuranosidase [Verticillium albo-atrum Vae Ms.102] / 568	Glycosyl hydrolase family 43	C

[0107]

표 2

Spot No.	Uni. Pep	Cov (%)	MM PI	NCBI No.	Pro. name	Matched sequence	Seq. Pep	Secr e-to meP (NN Sco.)	Matched Pro. (NCBI Blast) / Sco.	CDD (NCBI Blast)	Predicted Func. Class	
MP1	2	28.3	3	78606 / 493	3997316 / 5	HP MG G_078 77	TSSGDINFLTAKVFAVPLTAGD SYVPK	Yes	0.796	BAK02318.1) predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] / 808	Esterases and lipases	L
MP2	6	91.7	3	78606 / 493	3997316 / 5	HP MG G_078 77	YSDAVPNPSGGEFALFTANK/TSSGDINFLTAKVSSANIYTSLYPRM AVFGGVLKYPEAQGASAPFF SPDSKKVFAVPLTAGDSYVPK	Yes	0.796	BAK02318.1) predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] / 808	Esterases and lipases	L
MP3	2	34.6	3	78606 / 493	3997316 / 5	HP MG G_078 77	TSSGDINFLTAKVFAVPLTAGD SYVPK	Yes	0.796	BAK02318.1) predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] / 808	Esterases and lipases	L
MP4	3	47.9	6	78606 / 493	3997316 / 5	HP MG G_078 77	TSSGDINFLTAKVSSANIYTSLYPRM VFAVPLTAGDSYVPK	Yes	0.796	BAK02318.1) predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] / 808	Esterases and lipases	L
MP5	2	31.5	4	73634 / 506	3997341 / 3	HP MG G_011 47	BALTDVFGSVKNADRIIPGTFY APVIR	Yes	0.69	XP_001939836.1) alpha-L-rabinofuranosidase A precursor [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP] / 767	Alpha-L-rabinofuranosidase C-terminus	C
MP6	3	37.9	6	80884 / 492	1458026 / 74	HP MG G_137 65	ALGGVGVILEHMVAATGLEFVKVGGFDISYPR	Yes	0.845	XP_714217.1) possible thiamine biosynthesis enzyme [Candida albicans SC5314] / 240	Serine carboxypeptidase 520	P
MP7	2	26.3	3	86792 / 521	3997616 / 9	HP MG G_069 89	VLFAADFVKLVWNVPSGDSSVIR	Yes	0.777	EGV19063.1) dipeptidyl aminopeptidase IV/Esterase [Verticillium dahliae] / 1086	Dipeptidyl peptidase IV/Esterases and lipases	P
MP8	3	43	7	82172 / 539	3997436 / 9	HP MG G_006 59	GDGVTDDTAAINAALQAGNRVA KPQYETLPVSSFITAR/GDGGSTD DTNALQNAINTAQDQGR	Yes	0.873	AAP33112.1) beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase glycosyl hydrolase family 28	C
MP9	5	82.6	3	82172 / 539	3997436 / 9	HP MG G_006 59	GDGVTDDTAAINAALQAGNRVA KPQYETLPVSSFITAR/GDGGSTD DTNALQNAINTAQDQGRV/LWD HGIYRNGGFTGSNLQVAQCLK	Yes	0.873	AAP33112.1) beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase glycosyl hydrolase family 28	C
MP10	4	61.9	3	82172 / 539	3997436 / 9	HP MG G_006 59	GDGVTDDTAAINAALQAGNRVA KPQYETLPVSSFITAR/GDGGSTD DTNALQNAINTAQDQGRV/GGFTGSNLQVAQCLK	Yes	0.873	AAP33112.1) beta-1,3-exoglucanase [Trichoderma hamatum] / 902	Polygalacturonase glycosyl hydrolase family 28	C
MP11	2	18.5	2	85386 / 556	1458115 / 72	HP MG G_116 08	YDASSTAEPTEVSQVQR	Yes	0.806	CAD10747.1) laccase [Gaeumannomyces graminis var. tritici] / 780	Multicopper oxidase	R
MP12	3	41.5	2	89465 / 556	3997361 / 5	HP MG G_010 96	NDNPSGPLSDGSGLGEPKALIEGDALAKFINVASGGAVR	No	0.65	ABY88280.1) putative glucanase GMY1 [Gibberella moniliformis] / 764	Glucanase glucan 1,4-alpha-glucosidase	C

[0108]

MP1 0	3	41.5 2	6	69485 / 5.68	3997351 5	HP MG G_016 96	NDNPSGRLSDGSGLGEPKALIE GDALAKFINVASGGAVR	No	0.65	ABY99280.1) putativ e glucosylase GM /1 [Gibberella monil iformis]/764	Glucosylase (glucan 1,4-alpha-glucosidase)	C
MP1 3	1	18.1 9	4	53067 / 5.06	3994655 0	HP MG 04757	VELALLGIDNPSFNAETPTR	Yes	0.764	CB156721.1) unnamed protein product [Gordaria macrospora]/327	Unknown	U
MP1 4	2	38.5 1	7	41349 / 5.03	3995217 9	HP MG G_017 32	KVDTIGGPVSSVIYGVKDAETGL LKEFVANAK	Yes	0.804	XP_001937682.1) 3-carboxymuconate cyclase [P. tritici-repentis Pt-1C-BFP]/187	Lactonase, 7-brominated beta-prodellier	M
MP1 5	4	62.6 6	11	35779 / 4.79	1456044 58	Predict ed prot. ein	DIRIPVTEVPR/NSPSAITGTTA PVKYFGFFVAGSGLR	Yes	0.765	ZP_01462220.1) hy drolase, alpha/beta f old family protein [S. gmataella aurantiaca DW4/3-1]/65.9	Alpha/beta hydrolase family	L
MP1 6	1	14.6 3	3	68208 / 5.17	3997371 9	HP MG 00994	LGDLTGPNPVTEALAK	Yes	0.733	EFQ33498.1) glycosyl hydrolase family 47 [Glomerella graminicola M1.001]/635	Glycosyl hydrolase family 47	C
MP1 7	3	34.1 4	10	38779 / 4.79	1456044 58	Predict ed prot. ein	PVTEVPR/NSPSAITGTTAPVK YFGFFVAGSGLR	Yes	0.765	ZP_01462220.1) hy drolase, alpha/beta f old family protein [S. aurantiaca DW4/3-1]/65.9	Alpha/beta hydrolase family	L
MP1 8	2	33.2 4	4	66388 / 5.55	1456115 72	HP MG G_116 08	VVQVSIQR/YDASSTAETPSVS DVKR	Yes	0.806	CAD10747.1) laccase [G. graminis var. tritici]/780	Multicopper oxidase	R
MP1 9	2	32.1 1	4	66388 / 5.55	1456115 72	HP MG G_116 08	VVQVSIQR/YDASSTAETPSVS DVKR	Yes	0.806	CAD10747.1) laccase [G. graminis var. tritici]/780	Multicopper oxidase	R
MP2 0	9	146 30	30	43161 / 5.13	3997366 3	HP	MILDTGSSNLWVPSSSCGSIACV LHNKIQYSGSGMEGFVNDVM TIGDLKNDPACATVCEPLAFAP FQR/FDGLGMGFDR/LDEPVFA FYLADKITEPLRR/DLPDITFR KYYSIDLGK	Yes	0.678	XP_001227563.1) v acuolar protease A p recursor [Chaetomiu m globosum CBS 14 8.51]/634	Fungal Protein, class A, aspartic proteinase superfamily	P
MP2 1	13	182 6	42	44662 / 5.17	3994652 4	HP MG G_047 44	STDLYDK/YEAAAKNLSQTLN FSHQDEIVSKIDHEANIASVVD LAER/LEVADLK/DLLSK/LVLT HASNLGTIHDYK/VGPHISMILY ASDR/EANEK/QETLLSETLLK/G WGSQELVETVEK/WGSPFSYVR/ LVEEMLDLGHGDIR/SMVHYN TVDEVER/LVEALDK/TLASKE	No	0.542	XP_001257384.1) a minotransferase, pu tative [N. fischeri/NR RL181]/418	Aspartate aminotransferase	P
MP2 2	6	50.1 3	18	66667 / 5.37	3997031 6	Trans idolase	VKPDATTNPSLILASKLUDDA AYAKTIVMGASFR/TVISDEPL R/FDFNEDQMAVEK	No	0.228	XP_366648.1) trans idolase [M. grisea 70 0-15]/656	Transaldolase	M
MP2 3	1	13.9 7	4	30096 / 5.31	1456081 42	Predict ed prot. ein	QHMIIEINLER	Yes	0.635	XP_001216528.1) pr edicted protein [Asp ergillus terreus NH2 024]/57.4	Unknown	U

[0109]

MP2 4	2	25.5 6	20	18004 / 5.62	3997048 7	HPMG G_027 10	SIGWNLGDSGRVITYAEKEEAG GIAVSGAEAVLAK	No	0.899	AAS66898.1) proba ble peroxisomal me mbrane protein [C. g lobosum]/200	Peroxisomal membrane protein (PRX) family	R
MP2 5	7	111 2	38	18004 / 5.62	3997048 7	HPMG G_027 10	VGDAFPDGVSTFYVPTGGGVST GWNLDGSGRYAVVDHGKVTY AEKEEAGGIAVSGAEAVLAKL	No	0.899	AAS66898.1) proba ble peroxisomal me mbrane protein [C. g lobosum]/200	Peroxisomal membrane protein (PRX) family	R
MP2 7	7	93.8 7	49	18004 / 5.62	3997048 7	HPMG G_027 10	VGDAFPDGVSTFYVPTGGGVST VSVPGAFPTPCQEGHLK/SIGW NLGDSGRYAVVDHGKVTYAE KVEEAGGIAVSGAEAVLAK	No	0.899	AAS66898.1) proba ble peroxisomal me mbrane protein [C. g lobosum]/200	Peroxisomal membrane protein (PRX) family	R
MP2 6	5	66.3 6	42	18648 / 6.60	3996871 7	HP	LPVHSQTLFQAKLTFEAIASIK SGPMPPPEVYR/LYEVQNYG YSFKEVDEQGATWAVITLR	No	0.531	CAD70840.1) proba ble cyanate lyase [N. crassa]/257	Cyanase C-terminal domain	M
MP2 8	4	59.3 20	20	32309 / 6.01	3997619 9	HPMG G_059 74	LVGTYYETPLCWAISTGSORVM GEIYTPWSSWKVTDLLGLDQ GIKYISTSLDYSEADAR	No	0.778	XP_366319.1) hypo thetical protein FG06 143.1 [Gibberella ze ae PH-1]/477	FauA (ABC-type nitrate/sulfate/bicarbonate transport system)	M

[0110]

표 3

Spot No.	Uni. No.	Cov. (%)	MW (kDa)	NCBI No.	Pro. name	Matched sequence	Secretory	Matched Protein (NCBI)	CDD (NCBI)	Predicted Func. Class
M1	5	77.38	10	78508	3997316	HP M1 GG_07 877	Yes	BAK02318.1) predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] / 809	Esterases and lipases	L
M1-1	5	70.64	8	84114	3994616	HP MG GG_082 00	Yes	XP_001875324.1) L-asparaginase [Laccaria bicolor S238NH82] / 259	Heme-dependent asparaginase	R
M2	11	162.5	17	71805	3997658	HP MG GG_057 85	Yes	XP_001936597.1) sucrose-6-phosphate hydrolase [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP] / 543	Glycosyl hydrolase family 32	C
M3	5	82.93	14	55395	1456119	HP M GG_11 608	Yes	CAD10747.1) laccase [Gaeumannomyces graminis var. tritici] / 780	Multicopper oxidase	R
M4	3	35.92	8	55825	3997105	HP M GG_02 987	Yes	XP_001936557.1) acetylcholinesterase precursor [P. tritici-repentis Pt-1C-BFP] / 502	Esterases and lipases	L
M5	5	59.46	9	75856	1456137	HP M GG_01 384	Yes	XP_001937084.1) L-tryptophan-5-monooxygenase precursor [P. tritici-repentis Pt-1C-BFP] / 503	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	R
M6	7	117.3	24	53485	1456059	HP M GG_11 861	Yes	ABE72865.1) beta-1,3-glucanotransferase [Gibberella moniliformis] / 518	Glycosyl hydrolase family 2	C
M7	12	213.3	31	47105	1456164	Enolase GG_11 40	No	XP_366389.2) enolase [M. ginseng 70-15] / 895	Enolase	M
M8	16	108.7	32	30095	1456081	Predicted protein GG_11 42	Yes	XP_001218528.1) predicted protein [Aspergillus terreus NH2624] / 574	Unknown	U
M9	3	44.7	13	26535	3997353	HP M GG_01 085	Yes	XP_002150891.1) Thiobol family protein [Fenestrium mamefferi ATCC 18224] / 160	Type 1 glutamine amidotransferase	R
M10	3	39.25	13	27310	3994059	HP M GG_04 944	Yes	XP_001875324.1) L-asparaginase [Laccaria bicolor S238NH82] / 259	Unknown function	U

[0111]

M11	20	301.3	33	55587 / 5.68	3996430.6	HP MGG_09	ADAPETTTTFGR/QFQPSQN PLGGDFDYAEAFQSLDYE VKKVFAPLNSWPDNQNLDK AR/KATMLTSDALINDPEY LKLLHRDLGPTTR/YLGPE VPKESFIWQDPLPAR/EGD LIDDADVDK/LKAALSTDGL DVS/LASTAMACATTYR/K VSLADLIVLGGTAAVEK/DA GVDIKVPFSAGR/VATQOE QTDVTQFSYLEPQADGFR/ NYGR/ALGANYDGSVDVGV TANKGK/ADLVFGSHAELR/ AIAEVYAENGNGEKVMNL DR/FDLK GIAYQQAVGAAGAATTQK/ TFVDPLADEKACKR/VYQID PTANHDACMK/YKAVDVL/ AK/KWTETTTALYSR/SKLT YALDQYYK	Yes	0.442	XP_001217043.1 peroxidase/catalase 2 [Aspergillus terreus NIH2624] / 948	Heme-dependent peroxidases similar to plant peroxidases.	R
M12	9	135.4	16	53489 / 5.44	1456059.60	HP MGG_11	TFVDPLADEKACKR/VYQID PTANHDACMK/YKAVDVL/ AK/KWTETTTALYSR/SKLT YALDQYYK	Yes	0.393	ABE72866.1 beta-1,3-glucanosyltransferase [G. moniliformis] / 519	Glycosyl hydrolases family 2	C
M13	12	182.9	25	55502 / 5.41	1456028.70	HP MGG_13	TPLPIPIK/EPLKK/GAAHLV GYDGVSPGPTIIVPR/FVNN AALPNSVHLHGSYSRY/DIP LVLTAK/FLDAVSR/SFALY FSPV/GSSSAK/FIVGDKVA APDTSV/PSALR/INGITFAD VNNR/MLANVPR/AKPFGA DFKVDIVNQNLDSYWA GIAYQQAVGAAGAATTQK/ TFVDPLADEK/VYQIDPTAN HDACMK/KWTETTTALYSR/ SKLT/YALDQYYK	No	0.592	CAB75422.1 polyphenol oxidase [Acremonium murorum] / 693	Multicopper oxidase	R
M13-1 ^a	6	97.5	13	53489 / 5.44	1456059.60	HP MGG_11	TFVDPLADEK/VYQIDPTAN HDACMK/KWTETTTALYSR/ SKLT/YALDQYYK	Yes	0.393	ABE72866.1 beta-1,3-glucanosyltransferase [G. moniliformis] / 519	Glycosyl hydrolases family 2	C
M14	10	144.3	23	51334 / 5.78	1456085.34	HP MGG_12	LDGY/GSFGSK/FEPTVWPE PFDGVK/EGLLNLGMR/HIA SFGGDK/DAVTIGGR/EPPL FAGAIHQSGSVTAR/QYKE YVDYLGCSPPDLSCLKLYH QYDPALT/WPQPRVEGGPLW EKASLASVPTWKEQCCLFW R SVYQLMTDR/TDGS/LTATC EPQK/FCGGTWAGLLKYD QK/SELYTLTATLNKSSKG OSYNMQVPK/GFGSGDDIV ELTCK/ADGSGGVVTPMSK VYALQSSLK	Yes	0.702	ABW74156.1 triacylglycerol lipase FGL4[G. zeae] / 755	Esterases and lipases	L
M15	9	128.7	18	58716 / 5.73	3996280.4	HP MGG_09	SVYQLMTDR/TDGS/LTATC EPQK/FCGGTWAGLLKYD QK/SELYTLTATLNKSSKG OSYNMQVPK/GFGSGDDIV ELTCK/ADGSGGVVTPMSK VYALQSSLK	Yes	0.621	XP_001275620.1 alpha-amylase, putative [A. clavatus NRRL 1] / 493	Alpha amylase	C
M16	1	16.33	2	51442 / 8.46	1456138.28	HP MGG_01	SPGVLSLNEINR	Yes	0.78	XP_003239001.1 class V chitinase [Trichophyton rubrum CBS 118692] / 318	Glycosyl hydrolase, family 18	C
M17	13	181.3	36	48214 / 5.95	399728.9	HP MGG_07	QIMGNTGIPVGTGDR/FND GK/ELPLGVGTQNKAVTSV LSVK/EIDSGFR/FQTFEAPQ KTYEGR/GSADGVLFVFAQ LLYANEK/ALSAGLVFVPLS NPQGVAYDAQSNQWRA GDDSTIGVDLNR/MDFLW DFPK/GLVNDVPGR/GYGE YTPAGEDSVNQGAAGR	Yes	0.742	XP_001931895.1 zinc carboxypeptidase A1 precursor [P. triticis Pt-1C-BFP] / 353	A functionally uncharacterized subgroup of the M14 family of metallo-carboxypeptidases (MCPs).	P

[0112]

M18	5	76.4	17	43554	3997736	HP_M	AVLDAADIPGANIR/TWVVG	Yes	0.882	AAN31395.1 AF419160	M28 Zn-Peptida	P
		1		5.62	9	GG_08	GHADSIYSGDR/VFLMDPR/			1 leucine aminopeptid	se	
					587		NIVAMLQQDMTG YIGR/FGL			ase [A. sojae] / 308		
							ITDFTDPPDLVNFMK					
M19	3	35.8	11	38442	3997452	HP	LAGTEYNVTPK/RAETTPGA	Yes	0.456	ABC65824.1 cell wall g	Glycosyl phosph	C
		2		6.33	3		NGYPQTPCQIR/APFTAIYE			ucanosyltransferase Metidylinositol-glu		
							SIK			wg1 [Metarhizium anisopanosyltransfer	se	
										ase] / 262		
							IAAVPYPK/YSSFFNR/AVLD					
							AADIPGANIR/TWVGGHAD					
M20	11	173	35	43554	3997736	HP_M	SIYSGDR/QPGADDASAS	Yes	0.882	AAN31395.1 AF419160	M28 Zn-Peptida	P
				5.62	9	GG_08	ATIFEAMR/VFLMDPR/NIVA			1 leucine aminopeptid	se	
					587		MLQQDMTG YIGR/DGR/ER			ase [A. sojae] / 308		
							FGLITDFTDPPDLVNFMK/LV					
							DGYTDIPYEEESLQYACSD					
							HGSATR					
M21	5	82.7	7	10273	1456051	HP_M	KLMTGDGAGNPSLR/LIK/DH	No	0.59	KP_857472.1 endo-1,6	O-Glycosyl hyd	C
		4		2/5.9	44	GG_13	VGPAISK/TDYYMIGQYSRN			beta-D-glucanase [Neu	ase family 30	
					712		AVVHVVTGSYSWPDGTGV			ropora crassa OR744		
							ESVATVNPDGSR			/ 546		
							KEYGDLTKWEER/CLMDLPA					
M22	8	120	27	42967	3997229	HP_M	R/GYQPYWDWAK/IPPVG	Yes	0.756	KP_002146483.1 tyros	Common cent	R
		9		5.02	5	GG_07	GGEVKTILLGPGVGAIEGVP			inase, putative [F. man	domain of tyrosi	
					419		AGPDNGLGENPRPWK/RDV			affer ATCC 18224] / 29	nase	
							GGPVNMR/VWFLWQEQDR			2		
							IAIK/DLADTTS GPFCYITQ					
M22	6	102	17	51442	1456139	HP_M	SIGYYQAVAAAR/GGSPVDTA	Yes	0.78	XP_003239001.1 class	Glycosyl hydro	C
		5		8.46	28	GG_01	LVGLAS YGR/SSSCASLDAN			V chitinase [Trichophy	ase, family 18	
					336		CGFTGPSAGGDCQR/SPGV			on rubrum CBS 118892		
							LSLNEINR			] / 318		
							Adeno					
M23	6	95.4	15	48951	3994017	Adeno	WADLSLAAPGR/KELEAENS	No	0.548	KP_359622.1 adenos	S-adenosyl-L-ho	M
		8		5.94	0	Adeno	MPGLMQTR/GETEEYINWQ			thomocysteinase [M. gr	thomocysteine hyd	
						Adeno	LEQQLAFK/LLVPAIM/NDS			sea 70-15] / 932	ase	
						Adeno	VTK/HILLAEGR					
M24	2	28.8	11	16252	3997791	HP	KVYGQCLPINVEATLCA	Yes	0.812	gb EGC42299.1 BYS1	Unknown	U
		3		5.70	1	MGG_				domain-containing prot		
					06840					ein [Ajellomyces capsu		
										atus H88] / 60.1		
							VGDAFPDGVSTFYVPTGGK					
M25	9	140	62	18004	3997049	HP_M	KIVIVSVRGAFPTCQEQHL	No	0.899	AAS66898.1 probable	Peroxi	R
		8		5.62	7	GG_02	K/ANDIYDDFIASDDGISFS			peroxisomal membrane	redoxin (P	
					710		K/SIGWNLGDSGR/YAIVVD			protein [Chaetomium gi	RX) family	
							HGKVTYAEK/EEAGGIAVS			abosum] / 200		
							GAEAVLAKL					
M26	2	24.0	6	31024	1456138	HP_M	EQIDLSEK/AFLDLVGPLGIG	Yes	0.744	ABA54913.1 proline-a	Unknown	U
		4		6.44	04	GG_11	R			nd threonine-rich prota		
					224					n [Coccidioides posada		
										si] / 69.7		
							SSGTTVWCDSGDFATIGKY					
							KPQDATTNP SLILAASK/LID					
							DAIAYAKK/QGGSVDDQVD					
M27	14	214	52	35657	3997031	Transal	ASLDR/LLVEFGK/ELK/LYE	No	0.228	KP_366548.1 transal	Transaldolases	M
		5		5.37	5	olase	EGISK/TVMGASFR/NTGE			ase [M. grisea 70-15]		
							TELAGCDYL TISPNLEELL			/ 656		
							NSSEAVPK/LDAQGAAALD					
							IQK/KTYISDEPLFR/FDFNE					
							DQMAVEK/FAADATLTK					

[0113]

M28	1	19.3	8	25454	3394001	HP	FMVQCNSGTLSQLPLEQG	Yes	0.917	CB153391.1 unnamed protein product[Sordaria macrospora]/213	Carbohydrate binding	C
M29	4	63.1	16	24138	456028	Predicted protein	LANPNLAIR/CFPDGGEGLR/KDASASEPFDQYEIR	Yes	0.897	YP_346445.1 flavin reductase-like, FMN-binding [Pseudomonas fluorescens Pf0-1]/38.1	Unknown	U
M30	3	30.3	13	49097	339465	Saccharopine dehydrogenase	DAGITVMNEIGLDPGDHLYAIK/YQIPEADNVR/VLDIGFLSDEEQFLK/PVLDGTISCR	No	0.547	XP_362873.1 saccharopine dehydrogenase [M. ginseng 70-15]/929	NAD(P) binding, domain of Shikimate dehydrogenase	C
M31	5	79.9	28	26538	339735	HP MG	DLQTSASAEAYIR/LEHLITGGSILAGR/SLTPSPVGVKDGNYWSSSGVLSGIDLIHAWK/VMFQDEEEQR	Yes	0.91	XP_002150691.1 Thiobifol family protein [P. n. ameffei/ATCC 18224]/160	Type 1 glutamine amidotransferase	R
M31-1	3	54.5	25	31025	339569	HP MG	SSGGAGQAMVAGHSLGGVIANELALR/GWVSVDGAYMTFDDIQHVSQLLR/VMDTFLQLGDHLGPSGVEYLR	No	0.905	YP_001506354.1 alpha/beta hydrolase fold [Frankia sp. EAN1ped]/17	Esterases and lipases	L
M31-2	3	52.9	17	34364	339695	HP MG	NTNNEVGVDAAYLLNCIQR/GTSLANVPVGHVDTYNAFLDGR/QINQAVASQANAR	Yes	0.84	XP_001934368.1 GPI-anchored cell wall beta-1,3-endoglucanase EglC [P. infol-repentis Pt-1-C-BFP]/345	Glycosyl hydrolases family 17	C
M32	4	49.0	17	27310	339405	HP MG	QSVDPANADR/GILDGTAMK/GLGNTGATSQVYRVITAGGVGEACSK	Yes	0.905	XP_001875324.1 L-ascorbate oxidase [Laccaria bicolor S2381-H82]/259	Unknown function	U
M32-1	2	36.7	16	31025	339569	HP MG	SSGGAGQAMVAGHSLGGVIANELALRVVMDTFLQLGDHLGPSGVEYLR	No	0.905	YP_001506354.1 alpha/beta hydrolase fold [Frankia sp. EAN1ped]/17	Esterases and lipases	L
M33	4	57.0	11	31024	456138	HP MG	VNLSFEGHSITATIREQIDLSEK/AFDLVGLPLGIR	Yes	0.744	ABA54913.1 proline- and threonine-rich protein [C. posadasii]/69.7	Unknown	U
M34	12	169.7	40	38442	339745	HP	IVEDFTK/GDDK/TGFK/LAISTEYNVTPK/AAPGAGVSS/VLQSDDLDEIDWEHVGNDQMR/VQSNYFSK/RAETTRGANGYPQTFCQIR/GTWVGGIAEGGNK/GTIDWAGGLADPSK/APFTAIYESIKVTDYSTGATEYQYTDR/SGNWESIK	Yes	0.456	ABC65824.1 cell wall glucanoyltransferase Metidylinositol-glucanoyltransferase 2 [M. anisopliae]/26	Glycosylphosphatidylinositol-glucanoyltransferase	C
M34-1	2	31.2	6	43597	456077	HP MG	AGFLLSYPEEQIR/GPEAGVQIWGSK	Yes	0.848	XP_001265180.1 thioredoxin reductase, putative [N. fischeri NRRL 181]/317	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	R
M35	4	66.8	31	25454	3394001	HP MG	SK/FTLTAWNPA SPVHGK/G_052HWWVGGETSSYCPDIVKNYGGFINNGQPTGWNACPG/GSDGR	Yes	0.917	CB153391.1 unnamed protein product[Sordaria macrospora]/213	Carbohydrate binding	C
M36	5	76.0	21	24138	456028	Predicted protein	ALPQVSAVAKPR/LANPNLAIR/CFPDGGEGLR/KDASASEPFDQYEIR	Yes	0.897	YP_346445.1 flavin reductase-like, FMN-binding [P. fluorescens Pf0-1]/38.1	Unknown	U

[0114]

M37	12	169	21	6538	456115	HP MG	QVSIQR/S GADCSPAVDFTY	Yes	0.806	CAD10747.1 laccase [Gaeumannomyces graminis var. tritici]/780	Multicopper oxidase	R
M38	9	143	18	43587	456077	HP MG	QVSIQR/S GADCSPAVDFTY	Yes	0.848	XP_001265180.1 thioredoxin reductase, putative [N. fischeri NRRL 181]/317	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	R
M39	12	173	27	48214	3997289	HP MG	SADGVLFVADLLYANEKIG	Yes	0.742	XP_001931696.1 zinc-dependent carboxypeptidase A1 precursor [P. tritici-repentis Pt-1C-BFP]/353	A functionally uncharacterized subfamily of metalloproteases (MCPs)	P
M40	14	201	41	38442	3997452	HP	WVGGAEAGGNK/GTIDWAG	Yes	0.456	ABC65824.1 cell wall glycosylphosphatidylinositol-glycosyltransferase 2 [M. anisopliae]/26	Glycosylphosphatidylinositol-glycosyltransferase	C
M41	17	226	39	32305	3997619	HP MG	QVSIQR/S GADCSPAVDFTY	No	0.463	CBY01598.1 similar to ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems periplasmic components-like protein [Leptospira maculans JN3]/377	TauA (ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system)	M
M42	13	182	30	53801	3996690	HP MG	QVSIQR/S GADCSPAVDFTY	No	0.643	XP_001934505.1 FAD-binding domain containing protein [P. tritici-repentis Pt-1C-BFP]/261	FAD binding domain	R
M43	3	513	7	43841	4560350	HP MG	QVSIQR/S GADCSPAVDFTY	Yes	0.701	XP_001273822.1 tyrosinase, putative [A. obscurus NRRL 1]/335	Common central domain of tyrosinase	R

[0115]

[0116] 벼도열병균의 시크리토스 커버리지

[0117] 2-D 젤 이미지의 EasyPro-2D 분석을 통해 GP, PVDF 및 LCM에서 각각 42, 35 및 72개의 고품질 단백질 스팟을 검출하였다. 이 스팟의 LC-MS/MS 및 바이오인포매틱스 분석 결과, GP, PVDF 및 LCM에서 각각 23(표 1), 28(표 2) 및 50(표 3) 단백질 스팟의 배치를 대표하는 15, 18 및 35 NR(Non Redundant) 분비단백질을 확인하였다(도 6). 펩타이드의 MS 스펙트라를 도 7에 나타내었다. 상기 단백질 중, 단 3 스팟을 3가지 인 비트로 방법으로 확인하여, 3가지 방법이 서로 상호보완적임을 확인하였다(도 6). 3 단백질[NCBI 번호 39970487(XP_366634), 39970315(XP_366548) 및 145611572(XP_001411352) XP 번호는 유전자 위치 번호를 나타낸다];의 기능은 알려지지 않았지만, 각각 페록시리독신(peroxiredoxin) 패밀리, 트랜스알도라아제(transaldolase) 및 멀티쿠퍼 옥시다아제(multicopper oxidase)와 관련된 단백질 도메인을 갖는다. GP 및 PVDF 막(예컨대, 소수성 인 비트로 조건)은 5종의 분비단백질[접근번호 39973515(XP_368148), 39973719(XP_368250), 39974389(XP_368585), 39952179(XP_363806) 및 39945550(XP_362312)이 동일하였다. 이는, 소수성의 차이에 의한 GP- 및 PVDF 막-특이적인 단백질의 분비이다. GP 및 PVDF 막을 사용한 벼도열병균에 대한 시크리토스는 LCM을 사용하여 생성된 시트리토스와 밀접한 관련이 있다. 이러한 3가지 방법을 집합하여 벼도열병균으로부터 초기 감염 과정동안 분비된 53 NR 단백질을 규명하였다.

[0118] 벼도열병균의 다양한 분비 경로/기작

[0119] 분비단백질의 신호서열 및 절단 부위를 검색하기 위해 SignalP 예측 프로그램

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 사용하였다.^{36,48} 또한, 확인된 분비단백질의 신호 펩타이드를 확인하기 위해 signalP 프로그램을 사용하였다. 확인된 NR 분비단백질의 66.7%(GP), 66.7%(PVDF 막) 및 71.4%(LCM)가 신호 펩타이드를 갖는 것을 확인하였다. 이는 이러한 단백질이 골지/소포체 경로를 통해 세포 밖으로 분비되는 것을 말한다.

[0120] 시크리툼 연구는 신호 펩타이드가 없는 분비단백질을 식물, 포유류, 균류 및 박테리아에서 확인해왔다.^{17,21,24,26,22} Agrawal et al.의 리뷰에서 LSPs와 같이 잘 알려진 일부 단백질이 시크리툼의 중요한 부분을 구성한다고 말한다.¹⁷ LSPs의 서열특징을 기초로 하여, LSPs를 예측하는 시크리툼P 예측 프로그램이 개발하였다.³⁷ 남아있는 신호 펩타이드가 결핍된 NR 분비단백질에 시크리툼P를 적용하여 0.5 이상의 점수를 갖는 LSPs를 13.3%(GP; 표 1), 27.8%(PVDF 막; 표 2) 및 20.2%(LCM; 표 3)로 예측하였다. 이러한 LSPs는 CW 모디피케이션(α -아밀라아제, 글루코아밀라아제, 아미노트랜스퍼라아제, β -1,3-엑소글루카나아제, 엔도-1,6- β -D-글루카나아제 및 사카로핀 디히드로제나아제), ROS(Reactive Oxygen Species) 해독과정(L-아스코르브산 산화효소, 퍼옥시다아제, 퍼옥시소말 막 단백질, 폴리페놀 산화효소 및 FAD-바인딩 도메인-구성 단백질), 대사(시안산 라이아제 및 아데노실호모시스테인아아제) 및 지질 모디피케이션(α/β 하이드로라아제)와 관련이 있다. 신호 펩타이드를 갖지 않는 4가지 다른 NR 단백질은 낮은 시크리툼P 점수를 나타내었다; 트랜스알도라아제(0.228), 에노라아제(0.396) 및 ABC-형 질산염/술폰산염/중탄산염 전송 시스템 주변 요소-유사 단백질(0.463)은 세포 대사와 관련 있는 반면, HbrB(0.227)는 성장과 관련 있다. 몇몇 효소는 당분해 및 티아민 생합성과 관련있다.^{17,49}

LSPs는 수많은 균류 및 박테리아에서 예측되어왔다.^{28,50} 최근 두 연구에서 균 Botrytis cinerea의 LSPs를 확인하여 보고하였다.^{33,34} 포유류 및 효모에 관한 연구에서 LSP 분비가 비-고전적인(non-classical) 분비 기작에 의해 조절됨을 보여주었다.^{51,52} 이러한 비-고전적 분비 기작은 포유류, 효모 및 식물간에 보존적인 것으로 보인다.^{17,52} 따라서, 본 발명은 버도열병균의 고전적 골지/소포체 기작과 함께 LSPs를 ECS로 내보내는 비-고전적 기작을 제시한다.

[0121] 버도열병균의 단백질 분비

[0122] GP, PVDF 막 및 LCM 상에서 버도열병균으로부터 분비된 단백질을 CDD 및 상동관계 검색 프로그램을 이용한 도메인에 근거하여 기능에 따라 분류하였다.³³⁻³⁵ 확인된 단백질은 알려지지 않은 기능을 갖는 단백질을 포함하여 5가지(GP), 6가지(PVDF 막) 및 6가지(LCM)의 기능으로 분류하였다. 3가지 기능군(CW 모디피케이션, 기작 및 ROS 해독 과정)의 단백질은 3가지 인 비트로 시스템에서 모두 나타났다.

[0123] 본 발명은 몇 가지 중요한 발견을 제시한다. 첫 번째, 버도열병균은 소수성(GP 및 PVDF 막) 및 친수성(LCM) 환경간의 차이뿐 아니라, 소수성 표면(GP(하드) 및 PVDF 막(소프트))의 차이도 감지한다. 또한, 버도열병균은 표면 조건 및 재료의 미묘한 차이도 인식하는 것으로 알려져 있다.^{53,54} 두 번째, 표면의 특성에 의존하여 버도열병균은 분비하는 단백질의 질 및 양을 변화시킬 것이다. 예컨대, CW 모디피케이션, 기작 및 ROS 해독과정에 관련된 단백질이 균사 성장 및 버도열병균-벼 잎의 상호작용에 관련있음을 3가지 인 비트로 시스템에서 확인하였다. 더욱이, 균류는 단백질 모디피케이션 및 지질 모디피케이션과 관련된 단백질을 숙주 단백질 및 지질을 분해하고 생장에 필요한 영양분을 얻기 위해 초기에 분비한다. 이는 GP(단단한 표면)에 확인된 단백질 또는 지질 모디피케이션과 관련한 어떠한 단백질일 것이다. 또한 이러한 이유로 균 병원체는 제한된 식물종을 감염시킨다. 종합적으로, 버도열병균은 일반적(또는 하우스키핑) 및 특이적 단백질의 두 종류 단백질을 숙주-표면형에 의존적으로 분비한다. M.grisea 부착기형성은 표면의 견고 정도, 소수성 및 식물 신호에 의존적이며 이는 특정 단백질 분비는 숙주-표면형에 근거하여 부착기 형성이 유도된다.³⁹⁻⁴¹

[0124] 버도열병균의 성장 및 감염에 관여하는 분비단백질

[0125] 분비단백질 및 그 기능적 분류를 통해 두가지 특징을 발견하였다. 첫 번째, CW 모디피케이션 및 버도열병균의 성장 및 발생을 위한 영양 흡수 및 에너지 생산을 위한 기작에 관련된 몇몇 단백질을 확인하였다. 두 번째, 표면 조건에 의존적인 감염(예컨대, 침투 및 콜로니형성)에 관여하는 몇몇 단백질이 동시에 방출되는 것을 확인

하였다.

[0126] *CW* *모디피케이션*

[0127] 단백질은 β -1,3-엑소글루카나아제(H1, H2, H3, H21, H22, MP8, MP9 및 MP11 스팟), 만노시다아제(H4 및 MP16), 글루코아밀라아제(H19 및 MP10), α -N-아라비노푸라노시다아제(H20 및 MP5), 수크로오즈-6-포스포페이트 하이드롤라아제(M2), β -1,3-글루카노실트랜스퍼라아제(M6, M12 및 M13-1), α -아밀라아제(M15), 클래스 V 치티나아제(M16 및 M22-1), 엔도-1,6- β -D-글루카나아제(M21), 익명 단백질(M28 및 M35) 및 사카로핀 디하이드로제나아제(M30)와 관련된 CW 모디피케이션에 속한다. 많은 균종은 감염된 식물 조직으로부터 글리코사이드 히드롤라아제, 폴리사카라이드 라이아제 및 이스터라아제를 포함하는 소화효소를 분비하여 영양분을 얻는다. 균종은 많은 글리코사이드 히드롤라아제를 분비하는 것으로 알려져 있다.^{4,10} 이러한 단백질은 숙주 CW 요소 및 질소 단식 조건의 LCM에서 검출되었다.^{33,34,44} 글리코실 히드롤라아제는 두 개 이상의 탄수화물 또는 탄수화물 및 비-탄수화물 모이어티(moiety) 간의 글리코시드 결합의 가수분해를 촉매한다. 분해된 올리고사카라이드는 세포 밖 매트릭스에서의 숙주-병원체 상호작용을 돕는다.⁵⁵ 이는 주요 계(kingdom, 예컨대, 고세균, 진정세균 및 진핵생물)에서 45 과(family)이상의 흔한 효소이다. 이러한 단백질의 풍요는 엄격하게 조절되고 영양 제한 조건에서 영양 흡수를 위해 용량을 증가시킨다.^{57,58} 본 발명에서 발명자들은 5 가지 셀룰라아제, 13 가지 아밀라아제, 32 가지 인벌타아제, 43가지 자일로시다아제 및 47 가지 ER α -만노시다아제의 5 종류 글리코실 히드롤라아제를 규명하였다.

[0128] 셀룰라아제 및 자일로시다아제는 셀룰로오즈 및 자일란과 같은 다당류 간의 결합을 절단하는 가수분해 효소이다. 식물에서 셀룰로오즈 및 자일란은 CW의 요소이다. 균류는 일반적으로 3 종류의 셀룰라아제(엔도-(1,4)- β -D-글루카나아제, 엑소-(1,4)- β -D-글루카나아제 및 β -글루코시다아제)를 생산한다.⁵⁹ 또한, 숙주 CW의 가수분해는 감염 초기단계에 필수적이다.³⁴ β -1,3-엑소글루칸마아제는 벼도열병균의 부착기 형성 및 성숙 단계에서 유도되는 것이 보고되었다.⁶⁰ 아밀라아제는 녹말의 α -1,4-글리코시드 연결부를 가수분해하여 말토스 및 다양한 길이의 올리고사카라이드를 생산한다. 균류의 대부분은 셀룰라아제, 자일로시다아제 및 아밀라아제를 분비한다.^{59,61,62} 확인된 CW 모디피케이션 효소는 인 비트로 조건마다 차이가 있었다.

[0129] 부착기 형성은 β -1,3-엑소글루카나아제, 만노시다아제, 글루코아밀라아제 및 α -L-아라비노푸라노시다아제를 포함하는 GP 및 PVDF 막에서 유도된다. 수크로오즈-6-포스페이트 히드롤라아제, β -1,3-글루카노실트랜스퍼라아제, α -아밀라아제, 클래스 V 치티나아제, 엔도-1,6- β -D-글루카나아제, 익명 단백질 및 사카로핀 디히드로제나아제를 포함하는 LCM에서는 부착기 형성이 유도되지 않았다.

[0130] *단백질 모디피케이션*

[0131] 단백질 스팟은 티아민 생합성 효소(MP6), 다이펩티딜 아미노펩티다아제 B(MP7), 액포 프로테아제 A(MP20), 아미노트랜스퍼라아제(MP21), 징크 카르복시펩티다아제(M17 및 M39) 및 로이신 아미노펩티다아제(M18 및 M20)로 구성된 단백질 모디피케이션에 관련한다. 프로테아제 및 펩티다아제는 단백질을 작은 펩타이드 및 아미노산으로 분해하는 단백질 가수분해 효소이다. 본 발명에서는 프로테아제/펩티다아제인 3 NR 분비단백질을 발견하였다(표 2 및 표 3). 액포 프로테아제 A는 아마도 균의 병원성에 관련될 것이다.⁶³ 로이신 아미노펩티다아제는 단백질 또는 펩타이드 내 로이신 잔기의 가수분해를 통해 생물학적 및 물리학적 신호경로를 조절 할 것이다.

[0132] *ROS(Reactive oxygen species) 해독 과정*

[0133] ROS 해독과정에 관련된 단백질은 락카아제(H6, H19, MP12, MP18, MP19, M3 및 M37), 퍼옥시솜 막 단백질(H8, MP24, MP25, MP27 및 M25), 글리옥살 옥시다아제(H13), FAD-바인딩 도메인-포함 단백질(H17 및 M42), L-아스코르브산염 옥시다아제(M1-1), L-아미노산 옥시다아제(M5), 퍼옥시다아제/카탈라아제2(M11), 폴리페놀 옥시다아제(M13), 티로시나아제(M22 및 M43), Thi/Pfp 패밀리 단백질(M9 및 M31) 및 티오리독신 리덕타아제(M34-1 및 M38)이다(표 1 내지 표 3). 경우에 따라서, 균류는 숙주 CW를 분해하고 균류 CW를 보호하는 효소를 분비한다.

카탈라아제는 숙주 침입 동안 벼도열병균의 CW 형성과 관련이 있다.⁶⁶ 또한, 폴리페놀 옥시다아제, 티로시나아제 및 L-아스코르브산염 옥시다아제와 같은 다수의 중요한 분비단백질을 규명하였다.

[0134] 폴리페놀 옥시다아제 및 티로시나아제(모노페놀 모노옥시제나아제)는 멜라닌 생합성에서 중요한 효소이다.⁶⁷ 멜라닌 생합성의 돌연변이는 멜라닌이 병원성의 중요한 요소이므로, 벼도열병균의 병원성을 감소시킨다고 보고된다.⁶⁸ 박테리아 및 균류에서, 멜라닌은 UV 방사선 및 ROS-매개 세포 손상을 포함하는 스트레스에 대한 보호 효과를 갖는다.⁶⁸ 벼도열병균으로부터 분비된 카탈라아제-퍼옥시다아제는 숙주로부터 방출된 ROS를 해독한다.⁶⁸ L-아스코르브산염 옥시다아제는 친수성 조건 하에서만 검출되었다(LCM; 표 3). 이러한 효소는 보호기능과 관련이 있으며, ROS 제거함으로써 벼도열병균은 숙주 조직에 기생한다.

[0135] 기작

[0136] 기작에 관련된 단백질은 락토나아제(H9, H10, H16 및 MP14), 트랜스알도라아제(H12, MP22 및 M27), 에놀라아제(H5 및 M7), 시아나아제(MP26), ABC-형 질산염/술폰산염/중탄산염 수송 시스템 주변세포질 요소-유사 단백질(MP28 및 MP41) 및 아테노실-호모시스테이나아제(M23)이다(표 1 내지 표 3). 락토나아제는 아실 호모세린 락톤(Acyl Homoserine Lactones; AHLs)의 호모세린 락톤 링 안의 에스테르 결합을 가수분해하여, AHL-매개 퀴럼센싱을 저해한다. 확인된 트랜스알도라아제는 펜토즈 포스페이트 경로의 요소이다.

[0137] 실시예 2: 결실변이주 제작

[0138] 단백질 검출

[0139] 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*) 포자가 벼 잎에 접종된 후 발아와 함께 침입 침입 초기단계에서 침입 및 벼도열병 발생과 관련된 분비단백질을 연구하기 위해 도 8과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 벼도열병균(race KJ201, KJ401 및 S102)을 쌀겨 배지에서 배양한 후 포자를 유도하였다. 유도된 KJ201 포자는 소수성 유리판 및 PVDF 막에 분무하고, 배양 한 후 포자는 제거하고 세척수에 포함된 단백질을 동결건조하였다. 또한 KJ201, KJ401 및 S102를 배양 배지에서 배양하고, 원심분리하여 포자를 제거하고 배양 배지를 동결건조하였다. 동결건조된 단백질을 정제한 후 2DE 겔에서 전기영동하였고, 검출된 단백질을 트립신 처리하여 LC-MS/MS로 정성분석을 수행하였다.

[0140] 결실돌연변이주 제작

[0141] 식물 침입과정 시 생성되는 단백질을 발현하는 벡터는 진균 프로모터를 갖는 ATMT 바이너리 벡터인 SK1834 벡터(Kang et al., 2005 및 도 9)를 이용하였다(도 10 및 도 11). 그리고 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens*) 주 중 하나인 AGL에 형질전환하였다. 상기 AGL을 카나마이신이 첨가된 AB 고상 배지에 스트리킹하여 28도에서 3일 동안 배양하였다. 3일 후, 단일 콜로니를 얻어 이를 MM 브로스 배지(표 4) 5 ml에 2일 동안 배양하였다. 2일 동안 키운 세포 2 ml을 5000 rpm에 10분 동안 원심분리한 후, 카나마이신과 아세토시링곤(Acetosyringone) 20 μ l가 포함된 IM 브로스 배지(표 5) 5 ml에 현탁하여 6시간 동안 30℃에서 배양하였다. 벼도열병균(*Magnaporthe grisea*) 포자를 수거하여 2×10^6 /ml 농도로 맞추고 6시간 동안 배양한 세포와 1:1 비율로 혼합하였다. 그 후 공동배양 배지(표 6)에 왓맨(Whatman) 페이퍼를 버블 없이 밀착시키고 그 위에 1:1 비율로 혼합한 배양액을 볼텍싱하여 잘 혼합한 다음 100 μ l을 올려 1.5 ml 튜브의 끝부분을 이용하여 잘 문질러 주었다. 그 후 25℃ 챔버에서 36시간 배양하여 주었다. 36시간 후에 막만 조심히 걷어 세포탁심(cefotaxim) 및 하이그로마이신(hygromycin)이 포함된 TB3 배지(표 7)에 올려두었다. 그리고 4일 동안 25℃에서 배양하고 자라난 곰팡이를 쌀겨배지에 각각 접종 후, 형질전환 여부를 확인하였다. 형질전환체들 가운데 표 8에 언급된 각각의 분비단백질 만이 벡터에 의해 치환되어 결실돌연변이체가 유도된 균주를 분리하여 이들의 결실돌연변이 상태를 확인하였다.

표 4

[0142]

MM broth (Minimal media broth)		
K 버퍼(K ₂ HPO ₄ 200 g 및 KH ₂ PO ₄ 145 g을 첨가하여 1 L로 제조, pH 7.0 NaOH로 조정)	10 ml	
MgSO ₄ -NaCl 버퍼	20 ml	
1% CaCl ₂ ·2H ₂ O (w/v)	1 ml	
20% NH ₄ NO ₃	2.5 ml	
증류수	941.5 ml	
오토클레이브 후 첨가		
20% 글루코오즈 (w/v) -필터링 (20 μm)	10 ml	
0.01% FeSO ₄ (w/v) -필터링 (20 μm)	10 ml	
포자 요소 -필터링 (20 μm) ZnSO ₄ ·7H ₂ O 100 mg, CuSO ₄ ·5H ₂ O 100 mg, H ₃ BO ₃ 100 mg, MnSO ₄ ·H ₂ O 100 mg 및 Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 100 mg을 첨가하여 1 L로 제조.	5 ml	
총합	1 L	
M-N 버퍼	MgSO ₄	30 g
	NaCl	15 g
	총합	1 L

표 5

[0143]

IM 브로스(Induction media broth)- 클린벤치에서 제조	
1.25 M K 버퍼 (K_2HPO_4 184 g을 첨가하여 1 L로 제조. pH 5.5의 인산으로 pH 조절하여 최종 pH 4.9)	0.8 ml
M-N 버퍼	20 ml
1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (w/v)	1 ml
20% NH_4NO_3	2.5 ml
0.01% $FeSO_4$ (w/v) -필터링 (20 μm)	10 ml
포자 요소 -필터링 (20 μm)	5 ml
증류수	897.7 ml
50% 글리세롤 (w/v)	10 ml
1M MES (beta-Morpholino-ethansulfonsaure hydrate, pH 5.5 - NaOH로 조정, 필터링 (20 μm))	40 ml
100 mM 아세트시린곤	2 ml
총합	1 L

표 6

[0144]

10× 공동배양 배지(50 ml) - 클린벤치에서 제조	
1.25 M K 버퍼 (pH 4.9)	0.4 ml
M-N 버퍼	10 ml
1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (w/v)	0.5 ml
20% NH_4NO_3	1.25 ml
20% 글루코오스	2.5 ml
0.01% $FeSO_4$ (w/v) -필터링(20 μm)	5 ml

포자 요소 -필터링(20 μ m)	2.5 ml
50% 글리세롤 (w/v)	5 ml
1M MES (pH 5.5)	20 ml
총 (증류수)	50 ml
90 ml 아가 수용액을 오토클레이브 후 10 ml씩 첨가해서 사용한다. 100 μ l 카나마이신, 200 μ l 아세트시린곤 첨가	

표 7

[0145]

TB3 배지	
효모 추출물	3 g
카사미노산	3 g
글루코즈	10 g
수크로오즈	200 g
아가	15 g
총	1 L
오토클레이브 후 첨가	
하이그로마이신 (50 mg/ml)	400 μ l
세포탁심 (250 ml/ml)	100 μ l

표 8

1. S28 (serine carboxypeptidase)
2. M11 (Peroxidase/catalase2)
3. Subtilase : alkaline proteinase
4. Lipase : triacylglycerol lipase
5. MP53 (vacuolar protease/Aspartyl protease)
6. M156-4 (Glucoamylase)
7. M1 (Prolyl) : Esterases and lipases
8. M6 (Cellulase) : beta-1,3-glucanosyltransferase

[0146]

[0147] 접종 및 반응

[0148] 확보된 벼도열병균 분비단백질에 대한 결실돌연변이체를 이용하여 돌연변이가 벼의 병발생에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 접종실험을 실시하였다. 접종에 사용한 벼는 KJ201에 인컴파티블(Incompatible) 반응을 보이는 동진벼, 컴파티블 반응을 보이는 화청벼 및 대조구로 니폰베어 벼를 이용하였다. KJ201에 형질전환 된 녹아웃(Knock-out)된 균을 한달 동안 쌀겨배지에서 키운 뒤, 자란 균사를 벗겨내어 광주기 상태에서 포자를 유도하였다. 3일 후, 포자를 굵어 내어 2×10^5 농도를 맞춘 뒤 동진, 화청 및 니폰베어 벼에 접종하였다. 그 결과 표 1에서 제작된 8개의 결실돌연변이 주 가운데 유일하게 셀룰로오스(1,3- β -glucanosyltransferase) 유전자 결실돌연변이를 갖는 KJ201 균주가 컴파티블 반응을 보이던 니폰베어 벼 및 화청벼 품종에 대하여 병원성을 상실하는 흥미로운 결과를 나타내었다(도 12).

[0149] 이 결과는 벼도열병 발생에 있어 벼도열병균이 침입초기에 분비되는 단백질들 가운데 실제 침입에 매우 필수적인 단백질이 존재함을 보여주는 매우 흥미로운 최초의 결과라고 볼 수 있다. 또한 왜 식물병원성 진균이 병발생을 위해서 일정 농도 이상이 접종되어야 하는 가를 설명해줄 수 있는 결과이다. 즉 벼도열병균 포자가 일정 농도 이상이 묻혀있어야 분비되는 셀룰라아제의 농도가 실제 벼 잎의 세포벽을 분해할 수 있는 정도가 될 수 있기 때문이다.

[0150] 참고문헌

[0151] [1] Ebbole, D. J., *Magnaporthe* as a model for understanding host pathogen interactions. *Annu. Rev.*

Phytopathol. 2007, 45, 437-456.

- [0152] [2] Wilson, R. A., Talbot, N. J., Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 185-195.
- [0153] [3] Talbot, N. J., On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003, 57, 177-202.
- [0154] [4] Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L. et al., The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 2005, 434, 980-986.
- [0155] [5] Goff, S. A., Riche, D., Lan, T. H., Presting, G. et al., A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 2002, 296, 92-100.
- [0156] [6] Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K. et al., A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 2002, 296, 79-92.
- [0157] [7] Kikuchi, S., Satoh, K., Nagata, T., Kawagashira, N. et al., Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science* 2003, 301, 376-379.
- [0158] [8] Agrawal, G. K., Rakwal, R., Rice proteomics: a cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25, 1-53.
- [0159] [9] Agrawal, G. K., Rakwal, R., Rice proteomics: A move toward expanded proteome coverage to comparative and functional proteomics uncovers the mysteries of rice and plant biology. *Proteomics* 2011, 11, 1630-1649.
- [0160] [10] Howard, R. J., Valent, B., Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1996, 50, 491-512.
- [0161] [11] Wang, G.-L., Valent, B., Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. New York: Springer Science and Business Media 2009.
- [0162] [12] Ellis, J. G., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007, 10, 326-331.
- [0163] [13] Valent, B., Khang, C. H., Recent advances in rice blast effector research. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010, 13, 434-441.
- [0164] [14] Jurgens, G., Geldner, N., Protein secretion in plants: From the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic* 2002, 3, 605-613.
- [0165] [15] Tseng, T. T., Tyler, B. M., Setubal, J. C., Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 2009, 9, S2.
- [0166] [16] Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S., Walton, J. D., The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* 2000, 12, 237-248.
- [0167] [17] Agrawal, G. K., Jwa, N.-S., Lebrun, M. H., Job, D., Rakwal, R., Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 2010, 10, 799-827.
- [0168] [18] Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Mechin, V., In: Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Mechin, V. (Eds.), *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, Humana Press 2007.
- [0169] [19] Agrawal, G. K., Rakwal, R., *Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications*. In: Agrawal, G. K., Rakwal, R. (Eds.), Wiley, Hoboken, NJ 2008.
- [0170] [20] Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D. H., Bron, S., van Dijk, J. M., Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*, a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 515-547.

- [0171] [21] Simpson, J. C., Mateos, A., Pepperkok, R., Maturation of the mammalian secretome. *Genome Biol.* 2007, 8, 211.1-211.4.
- [0172] [22] Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D. H., Braun, P. G. et al., Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the ‘ ‘secrets’ ’ of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004, 68, 207-233.
- [0173] [23] Economou, A., Bacterial secretome: The assembly manual and operating instructions. *Mol. Membr. Biol.* 2002, 19, 159-169.
- [0174] [24] Sibbald, M. J., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M. et al., Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006, 70, 755-788.
- [0175] [25] Poueymiro, M., Genin, S., Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: A hundred tricks to kill a plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009, 12, 44-52.
- [0176] [26] Vincent, D., Balesdent, M. H., Gibon, J., Claverol, S. et al., Hunting down fungal secretomes using liquid-phase IEF prior to high resolution 2-DE. *Electrophoresis* 2009, 30, 4118-4136.
- [0177] [27] Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D. et al., Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009, 106, 1954-1959.
- [0178] [28] Choi, J., Park, J., Kim, D., Jung, K., Kang, S., Lee, Y. H., Fungal secretome database: Integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics* 2010, 11, 105.
- [0179] [29] Jung, Y. H., Jeong, S. H., Kim, S. H., Singh, R. et al., Systematic secretome analyses of rice leaf and seed callus suspension-cultured cells: Workflow development and establishment of high-density two-dimensional gel reference maps. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 5187-5210.
- [0180] [30] Jung, Y. H., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N. S., Secretome: Toward deciphering the secretory pathways and beyond. In: Agrawal, G. K., Rakwal, R. (Eds.), *Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications*, Wiley, Hoboken, NJ 2008, pp. 83-90.
- [0181] [31] Parker, D., Beckmann, M., Enot, D. P., Overly, D. P. et al., Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nat. Protocols* 2008, 3, 435-445.
- [0182] [32] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- [0183] [33] Fern, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carb, M., Wieneke, U., Cantoral, J. M., Schmidt, J., 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors *Proteomics* 2010, 10, 2270-2280.
- [0184] [34] Wang, Y., Wu, J., Park, Z. Y., Kim, S. G., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Kim, S. T., Kang, K. Y., Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation. *J. Proteome Res.* 2011, 10, 3136-3148.
- [0185] [35] Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Bryant, S. H., CDD: Specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, D205-D210.
- [0186] [36] Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Heijne, G. V., Brunak, S., Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 2004, 340, 783-795.
- [0187] [37] Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G., Brunak, S., Feature-based prediction

of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 349-356.

- [0188] [38] Tucker, S. L., Besi, M. I., Galhano, R., Franceschetti, M. et al., Common genetic pathways regulate organ-specific infection-related development in the rice blast fungus. *Plant Cell* 2010, 22, 953-972.
- [0189] [39] Caracuel-Rios, Z., Talbot, N. J., Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr Opin Microbiol* 2007, 10, 339-345.
- [0190] [40] DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B., and Sweigard, J. A., *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11, 2013-2030.
- [0191] [41] Kim, S. T., Yu, S., Kim, S. G., Kim, H. J., Kang, S. Y., Hwang, D. H., Y Jang, Y. S., Kang, K. Y., Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) proteome during appressorium formation. *Proteomics* 2004, 4, 3579-3587.
- [0192] [42] Sharma, M.,Soni, R., Nazir, A., Oberoi, H. S., Chadha, B., Evaluation of glycosyl hydrolases in the secretome of *Aspergillus fumigatus*and saccharification of alkali- treated rice straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 163, 577-591
- [0193] [43] Espino, J. J., Gutierrez-Sanchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., Gonzalez, C., The *Botrytis cinerea*early secretome, *Proteomics* 2010, 10, 3020-3034.
- [0194] [44] Shah, P., Gutierrez-Sanchez, G., Orlando R., Bergmann, C., A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics* 2009, 9, 3126-3135.
- [0195] [45] Pietrogrande, M. C., Marchetti, N., Dondi, F., Righetti, P. G., Spot overlapping in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis separations: A statistical study of complex protein maps. *Electrophoresis* 2002, 23, 283-291.
- [0196] [46] Campostrini, N., Areces, L. B., Rappsilber, J., Pietrogrande, M. C. et al., Spot overlapping in two-dimensional maps: a serious problem ignored for much too long. *Proteomics* 2005, 5, 2385-2395.
- [0197] [47] Berggren, K. N., Schulenberg, B., Lopez, M. F., Steinberg, T. H. et al., An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* 2002, 2, 486-498.
- [0198] [48] Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 1997, 10, 1-6.
- [0199] [49] Paper, J. M., Scott-Craig, J. S., Adhikari, N. D., Cuomo, C. A., Walton, J. D., Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics* 2007, 7, 3171-3183.
- [0200] [50] Bendtsen, J. D., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Sicheritz-Ponten, T., Ussery, D. W., Genome update: prediction of secreted proteins in 225 bacterial proteomes. *Microbiology* 2005, 151, 1725-1727.
- [0201] [51] Nickel, W., Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 2005, 6, 607-614.
- [0202] [52] Nickel, W., Rabouille, C., Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009, 10, 148-155.
- [0203] [53] Lee, Y.-H., Dean, R. A., CAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 1993, 5, 693-700.
- [0204] [54] Gilbert, R. D., Johnson, A. M., Dean, R. A., Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1996, 48, 335-346.
- [0205] [55] Kim, S., Park, J., Park, S. Y., Mitchell, T. K., Lee, Y. H., Identification and analysis of *in*

planta expressed genes of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics* 2010, 11, 104.

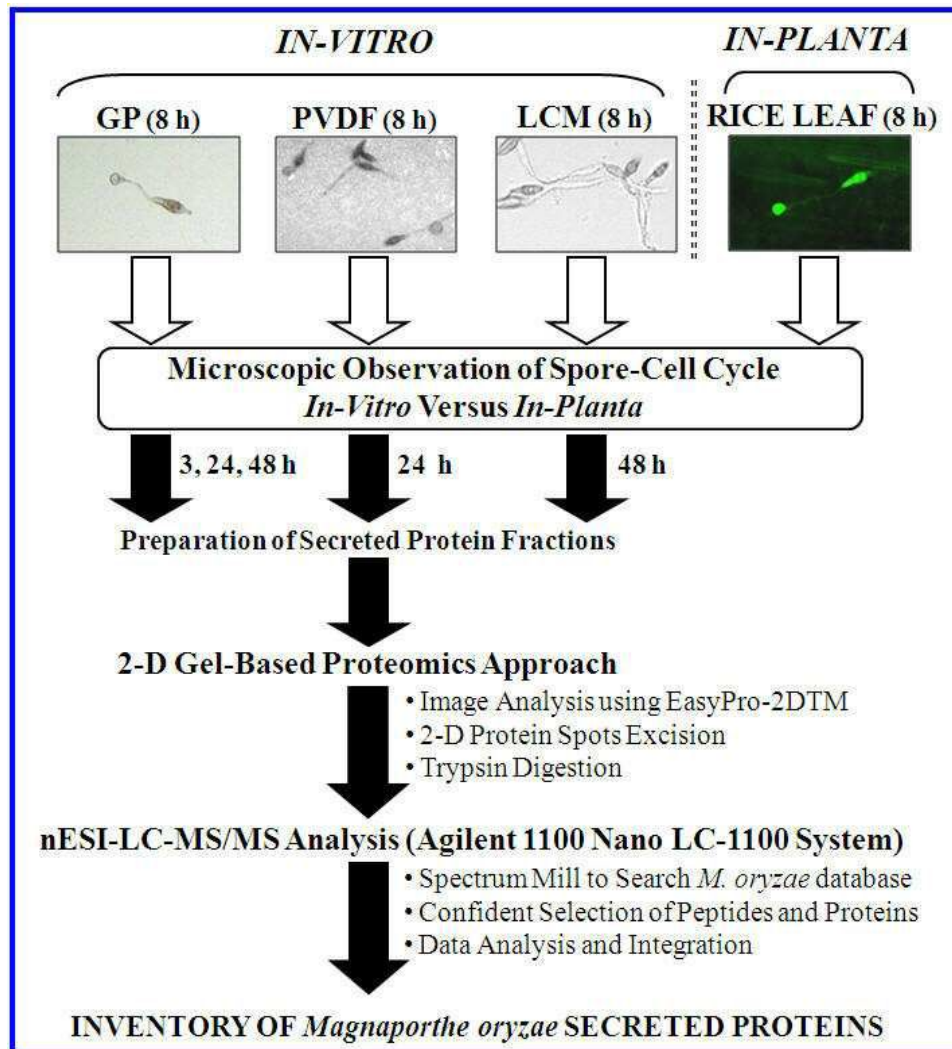
- [0206] [56] Henrissat, B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 1991, 280, 309-316.
- [0207] [57] Larsson, C., von Stockar, U., Marison, I., Gustafsson, L., Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen, or carbon- and nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 1993, 175, 4809-4816.
- [0208] [58] Abbas, A., Koc, H., Liu, F., Tien, M. Fungal degradation of wood: Initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. *Curr. Genet.* 2005, 47, 49-56.
- [0209] [59] Bhat, M. K., Bhat, S., Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 1997, 15, 583-620.
- [0210] [60] Correct reference- Oh Y, Donofrio N, Pan H, Coughlan S, Brown DE, Meng S, Mitchell T, Dean RA., Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol.* 2008, 9, R85
- [0211] [61] Adams, P. R., Extracellular amylase activities of *Rhizomucor pusillus* and *Humicola lanuginosa* at initial stages of growth. *Mycopathologia* 1994, 128, 139-141.
- [0212] [62] Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M. G. K., Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 461-488.
- [0213] [63] Saitoh, H., Fujisawa, S., Ito, A., Mitsuoka, C., Berberich, T., Tosa, Y., Asakura, M., Takano, Y., Terauchi, R., SPM1 encoding a vacuole-localized protease is required for infection-related autophagy of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 300, 115-121.
- [0214] [64] Matsui, M., Fowler, J. H., Walling, L. L. Leucine aminopeptidases: Diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 2006, 387, 1535-1544.
- [0215] [65] Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Sollewijn Gelpke, M. D. et al., Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotech.* 2004, 22, 695-700.
- [0216] [66] Skamnioti, P., Henderson, C., Zhang, Z., Robinson, Z., Gurr, S. J., A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2007, 20, 568-580.
- [0217] [67] Lucas-Elfo, P., Solano, F, Sanchez-Amat, A., Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*: Identification of *ppoS*, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiology* 2002, 148, 2457-2466.
- [0218] [68] Hamilton, A. J., Gomex, B. L., Melanins in fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.* 2002, 51, 189-191.
- [0219] [69] Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Nishizawa, Y., Minami, E., The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2011, 24, 163-171.
- [0220] [70] Tamano, K., Satoh, Y., Ishii, T., Terabayashi, Y. et al., The beta-1,3-exoglucanase gene *exgA* (*exg1*) of *Aspergillus oryzae* is required to catabolize extracellular glucan, and is induced in growth on a solid surface. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007, 71, 926-934.
- [0221] [71] Gatherer, I. M., Pollerman, S., Dunn-Coleman, N., Turnera, G., Identification of a novel gene *hbrB* required for polarised growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics Biol.* 2004, 41, 463-471.
- [0222] [72] Baldrian, P., Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006, 30, 215-

242.

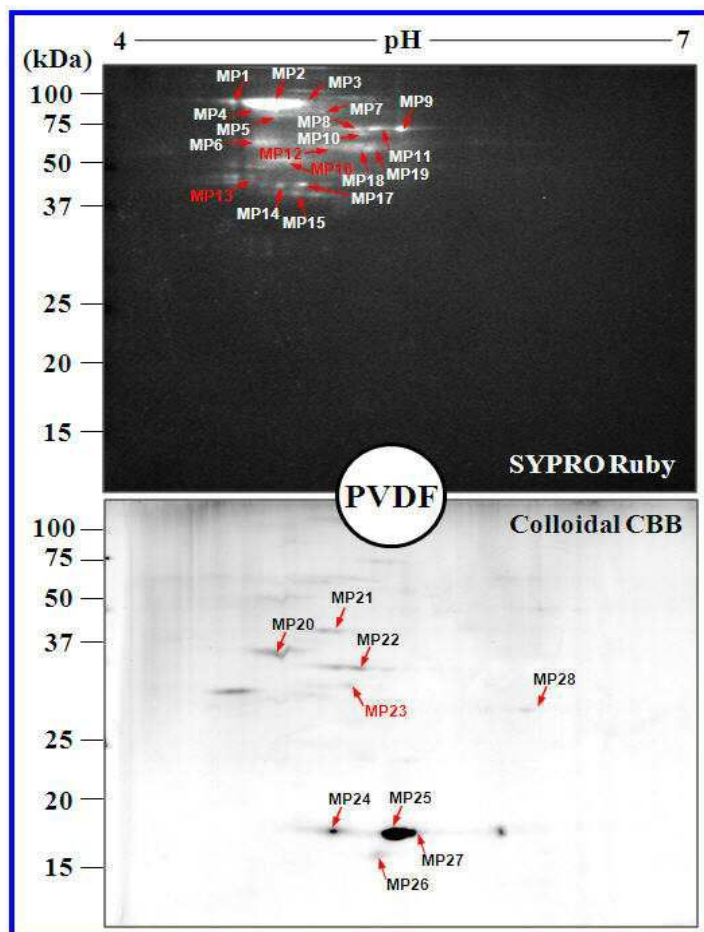
[0223] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

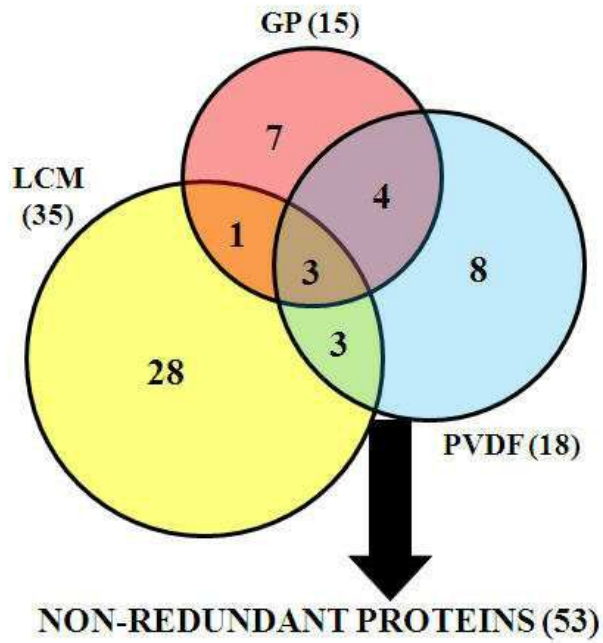
도면1



도면4



도면6

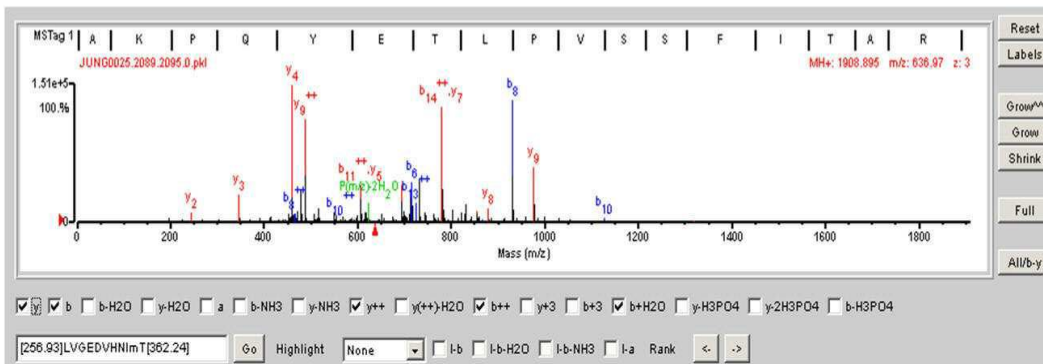


도면7

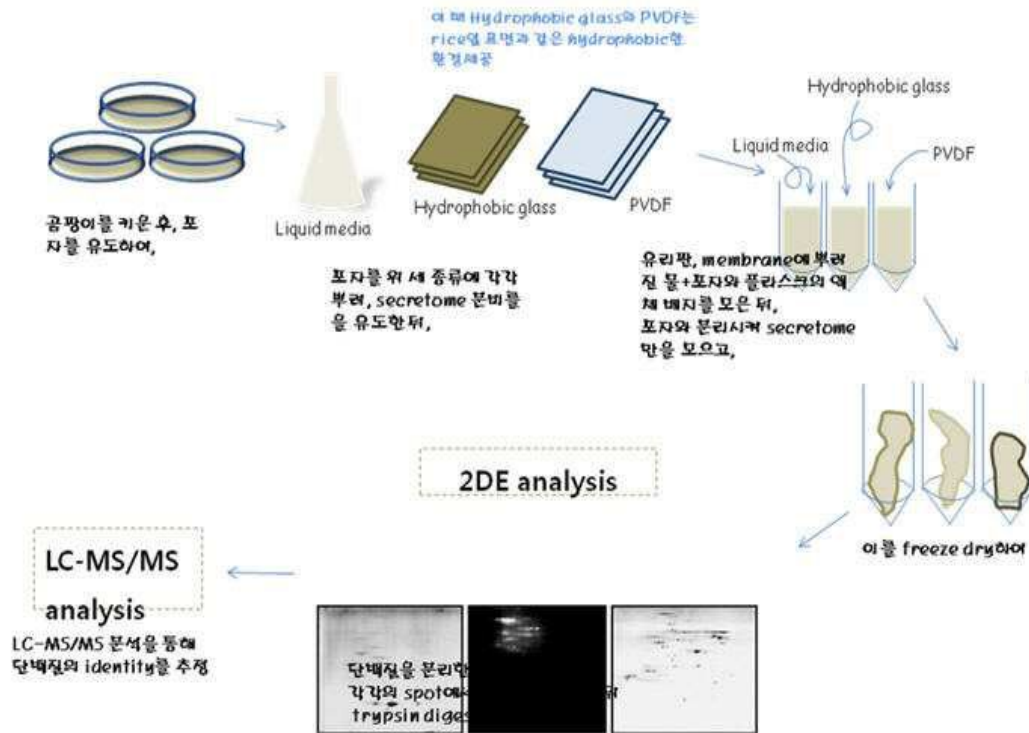
Spot number ; H1

Filename	z	Score	SPI (%)	Spectrum Intensity	Sequence Map
JUNG0025.2089.2095.0	3	18.15	83.3	9.27e+006	(K)A K/P Q Y E\T L P/V/S S/F I T\A R(S)

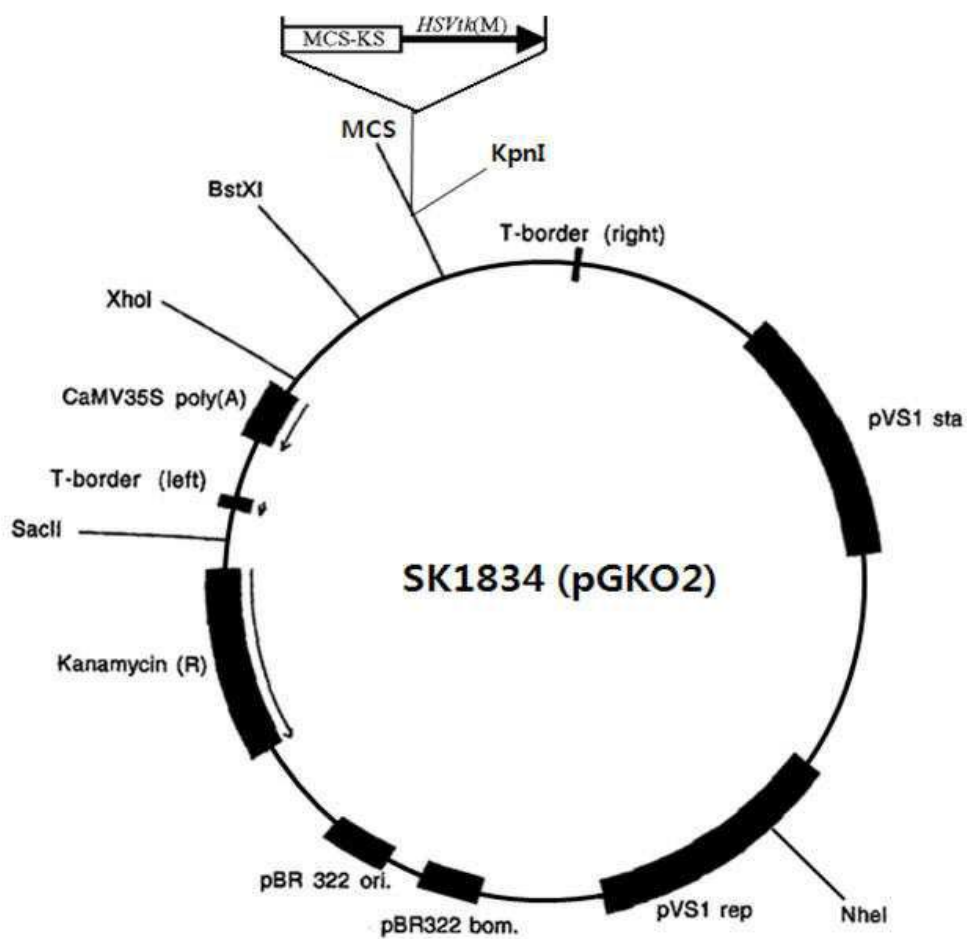
m/z Measured (Da)	MH ⁺ Matched (Da)	MH ⁺ Error (Da)	MH ⁺ Error (ppm)	Peptide pl	Protein MW (Da)	Species	Accession #	Protein Name
636.97	1908.023	0.8729	457.5	8.63	82172.7	Magnaporthe grisea 70-15	39974389	hypothetical protein MGG_00659



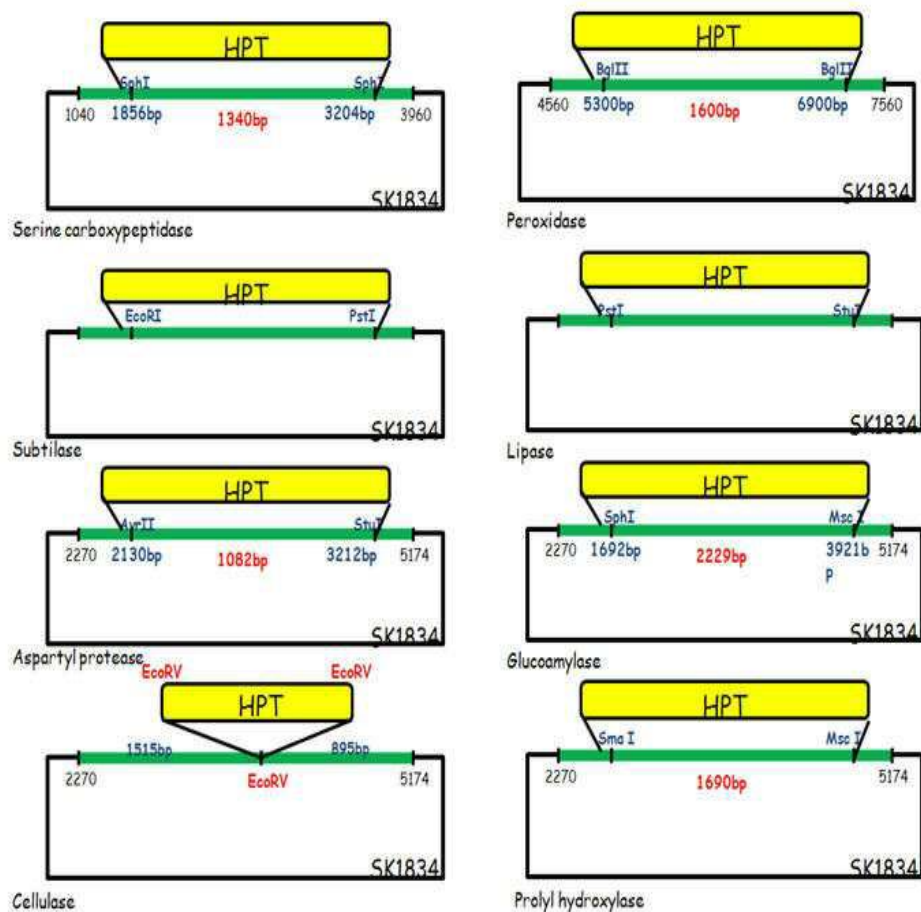
도면8



도면9

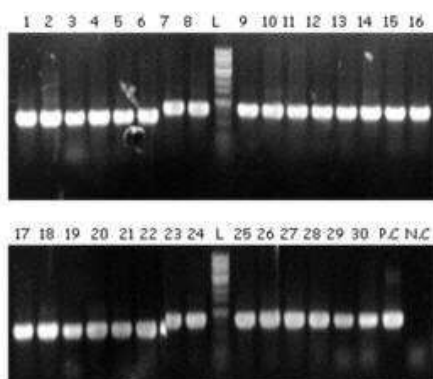


도면10

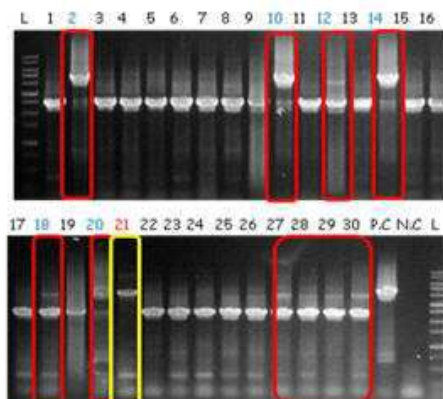


도면11

- Hygromycin primer



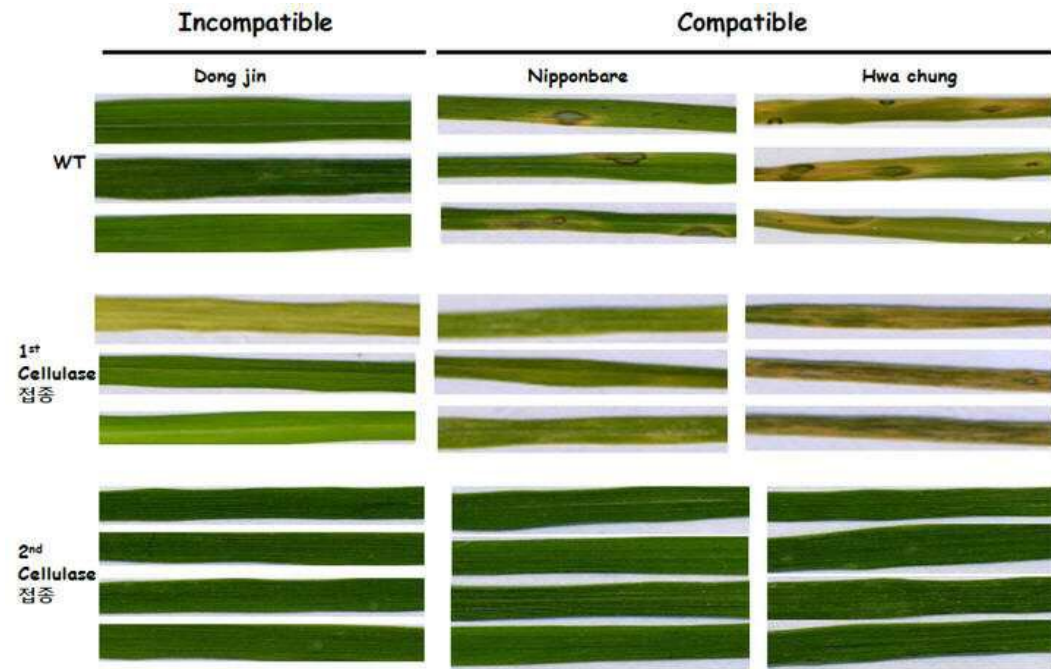
- Cellulase specific primer



Ectopic: 2, 10, 12, 14, 18, 20, 27, 28, 29, 30

Knock out: 21

도면12



서열 목록

- <110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University
 <120> Method for Screening of Control Agents Against Rice Blast Disease
 <130> PN120001
 <160> 2
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> Magnaporthe oryzae 1,3-b-glucanosyltransferase
 <400> 1

```

atgggcttca ccaagagctc tctaattctcg gccgccttgc tggcgagcca ggcctcggcc      60
accctgcagc ccatcgtaa ggagggaac aagttcttct acgagaacgg caccagttt      120
tacatgaagg gtattgcata ccagcaggct gtcggcgccg ccggtgccgc taccacaaa      180

aaaactttcg tcgaccgtt ggccgacgag aaggcctgca agcgtgacat tccaacttg      240
caaaaggetg gtaccaaac gatccgtgtt taccagattg accctaccgc caaccacgat      300
gcctgcatga agatgctcga tgatgtggc atctatgtca tcgccgatct tggagagccc      360
tctacctcga tcgaccgtga gaaccagag tggaacacca agctctacga ccgttacaag      420
gccgtcgtcg acgtgtttgc aaagtacacc aacacgatcg gtttcttctc gggtaacgag      480
gtcacaaacc aggcgaacaa caccatggcc tctgcctacg tcaaggccgc aaccgtgac      540
    
```

accaagaagt acatcaagca aaagggttac agatggatgg gtgtcggtta cgccaccaac 600

 gacgacaagg atatccgga tcctcttgcc gcctacttca actgtggcga ccaggatgcg 660
 gccatcgact actggggata caacatttac tcttgggtcg gtgacagcga cttaccaag 720
 tgcagtagc accagcacat caagaacttt gcaagctact ccgtccccgt tttctggcc 780
 gagiaccgct gcattgacgg tattggcggg gctgaaggcc gcaagtggac cgagaccacc 840
 gccctctact cggacaggat gaccggaacc ttctctggtg gtattgttta catgtacttc 900
 caggaggaca acgactacgg tctgttcaag gctagcgcca acggcggtgg cagcaccatg 960
 aagaactttg acgccctcgt caactcgaac tggcttgccg cctcagccct gcctccact 1020

 cccgaccagg ccgtctcgga gtgcatgacc aagtctgcca cgtgtgcgcc ctccagcagc 1080
 ttgtccgaga aggactacgg cgagatcttc agcttcatct gcggcgccgg cgactcttgc 1140
 aagggcatca acggaacgc taccaccggc cagtacggcg ctttcacagg ctgcgactcc 1200
 aagtccaagc tcacctacgc cctggaccag tactacaagt cgcagcgcaa ctccgctacc 1260
 gcctgcgact tcaagggcaa ggccaccgtc gtcacccgc agcaggccgc ctgcacctgc 1320
 tcttcgctcc tctcggtgc caccgccgc gccgacaagg ccaacgttg cgccggctcc 1380
 ggctccgaca cgtccaagaa cgctgcgtcg tccttcaggg ctccgggagg tctgcccag 1440

 atggctctcg gcatgtacgt cgccgtgct gttggtgtg gtgcgaccat gttcatgtg 1500
 taa 1503

 <210> 2
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Magnaporthe oryzae 1,3-b-glucanosyltransferase
 <400> 2
 Met Gly Phe Thr Lys Ser Ser Leu Ile Ser Ala Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Gln Ala Ser Ala Thr Leu Gln Pro Ile Val Lys Glu Gly Asn Lys Phe
 20 25 30

 Phe Tyr Glu Asn Gly Thr Gln Phe Tyr Met Lys Gly Ile Ala Tyr Gln
 35 40 45
 Gln Ala Val Gly Ala Ala Gly Ala Ala Thr Thr Gln Lys Thr Phe Val
 50 55 60
 Asp Pro Leu Ala Asp Glu Lys Ala Cys Lys Arg Asp Ile Pro Asn Leu

65						70						75						80	
Gln	Lys	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Ile	Arg	Val	Tyr	Gln	Ile	Asp	Pro	Thr				
					85					90					95				
Ala	Asn	His	Asp	Ala	Cys	Met	Lys	Met	Leu	Asp	Asp	Ala	Gly	Ile	Tyr				
					100					105					110				
Val	Ile	Ala	Asp	Leu	Gly	Glu	Pro	Ser	Thr	Ser	Ile	Asp	Arg	Glu	Asn				
					115					120					125				
Pro	Glu	Trp	Asn	Thr	Lys	Leu	Tyr	Asp	Arg	Tyr	Lys	Ala	Val	Val	Asp				
					130					135					140				
Val	Leu	Ala	Lys	Tyr	Thr	Asn	Thr	Ile	Gly	Phe	Phe	Ser	Gly	Asn	Glu				
145					150					155					160				
Val	Thr	Asn	Gln	Ala	Asn	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Ala	Tyr	Val	Lys	Ala				
					165					170					175				
Ala	Thr	Arg	Asp	Thr	Lys	Lys	Tyr	Ile	Lys	Gln	Lys	Gly	Tyr	Arg	Trp				
					180					185					190				
Met	Gly	Val	Gly	Tyr	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Lys	Asp	Ile	Arg	Asp	Pro				
					195					200					205				
Leu	Ala	Ala	Tyr	Phe	Asn	Cys	Gly	Asp	Gln	Asp	Ala	Ala	Ile	Asp	Tyr				
					210					215					220				
Trp	Gly	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Ser	Trp	Cys	Gly	Asp	Ser	Asp	Phe	Thr	Lys				
225					230					235					240				
Ser	Gln	Tyr	Asp	Gln	His	Ile	Lys	Asn	Phe	Ala	Ser	Tyr	Ser	Val	Pro				
					245					250					255				
Val	Phe	Leu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Glu				
					260					265					270				
Gly	Arg	Lys	Trp	Thr	Glu	Thr	Thr	Ala	Leu	Tyr	Ser	Asp	Arg	Met	Thr				
					275					280					285				
Gly	Thr	Phe	Ser	Gly	Gly	Ile	Val	Tyr	Met	Tyr	Phe	Gln	Glu	Asp	Asn				
290					295					300									
Asp	Tyr	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Ser	Ala	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Met				
305					310					315					320				

Lys Asn Phe Asp Ala Leu Val Asn Ser Asn Trp Leu Ala Ala Ser Ala
 325 330 335
 Leu Pro Pro Thr Pro Asp Gln Ala Val Cys Glu Cys Met Thr Lys Ser
 340 345 350
 Ala Thr Cys Ala Pro Ser Ser Ser Leu Ser Glu Lys Asp Tyr Gly Glu
 355 360 365
 Ile Phe Ser Phe Ile Cys Gly Ala Gly Asp Ser Cys Lys Gly Ile Asn
 370 375 380
 Gly Asn Ala Thr Thr Gly Gln Tyr Gly Ala Phe His Gly Cys Asp Ser

 385 390 395 400
 Lys Ser Lys Leu Thr Tyr Ala Leu Asp Gln Tyr Tyr Lys Ser Gln Arg
 405 410 415
 Asn Ser Ala Thr Ala Cys Asp Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Val Thr
 420 425 430
 Pro Gln Gln Ala Ala Ser Thr Cys Ser Ser Leu Leu Ser Ala Ala Thr
 435 440 445
 Ala Ala Ala Asp Lys Ala Asn Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 450 455 460

 Ser Lys Asn Ala Ala Ser Ser Phe Arg Ala Pro Gly Gly Leu Ala Gln
 465 470 475 480
 Met Ala Leu Gly Met Tyr Val Ala Ala Ala Val Gly Val Gly Ala Thr
 485 490 495
 Met Phe Met Leu
 500