

최 종  
연구보고서

리그닌생합성 유전자 조절에 의한 고효율성  
사료용 옥수수 개발  
Development of highly efficient forage maize  
by controlling lignin biosynthesis genes

대구외국어대학 생명과학과  
대구가톨릭대학교 식물유전공학과  
부산원예시험장

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “리그닌생합성 유전자 조절에 의한 고효율성 사료용 옥수수 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 대구외국어대학교

총괄연구책임자 : 설 일 환

세부연구책임자 : 설 일 환

연 구 원 : 임 용 숙

연 구 원 : 장 준 형

연 구 원 : 김 지 만

협동연구기관명 : 부산원예시험장

협동연구책임자 : 강 남 준

연 구 원 : 구 은 혜

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 신 동 일

연 구 원 : 우 상 령

연 구 원 : 구 경 탁

## 요 약 문

### I. 제 목

리그닌생합성 유전자 조절에 의한 고 효율성 사료용 옥수수 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

국민의 식생활 및 건강과 직결되고 있는 축산물의 생산은 인간생활과 자연환경에 대하여 많은 영향을 미치고 있는 것은 사실이며, 축산식품의 생산, 지력의 증진, 사역용, 레저용 또는 에너지의 생산측면에서 역점을 두고 개량하고 있다. 하지만 사료작물 (목초, 풋베기사료작물, 뿌리채소등)들은 축산의 발달에 따라 필요량이 증가되어 기존의 농경지만으로는 턱없이 부족하게 되어 고효율을 가진 신품종의 사료작물의 개발, 농경지 및 산지개간등 대체방안이 필요시 되고 있다. 또한 축산농가의 가축수가 증가됨으로 인하여 가축폐기물에 의한 공기, 하천 및 토양의 오염 그리고 냄새 공해 등은 소비자들의 축산에 대한 이미지를 부정적으로 바꾸어 놓는 중요요인으로 작용하고 있음을 부인할 수만은 없는 현실에 놓여 있다.

현재까지 사료작물관련 신품종의 개발은 전통 육종방법에 전적으로 역점을 두고 있는바 단기간에 문제점을 해결할 수 없는 단점을 가지고 있다. 또한 새로운 국내초지 경작지의 개간비용을 감안해 볼 때 농가부채의 가중 등 현실적으로 어려운 상황에 있다. 정부차원에서 초지조성비용의 태반을 보조해 주는 다방면의 지원방안을 쓰고 있지만 근본적인 축산업의 대체방안으로 부족하다고 판단된다.

따라서 본 연구를 통하여 저 리그닌 함량을 가진 양질의 사료작물을 개발함으로써

- 1) 가축 소화율이 극대화가 가능하며
- 2) 가소화 에너지의 섭취량을 높여 주는 이점이 있으며,
- 3) 소화가 용이함으로 인한 영양분섭취가 보다 쉽고 많은 양이 단시간에 소화됨으로 인한 적은양의 분뇨로 인한 축산가의 환경오염 감소를 유도 할 수

있으며,

- 4) 사료작물을 선별적으로 식재함으로써 기존의 사료경작지의 효율적 이용이 가능하여 결과적으로 축산가의 경제적 비용절감을 가져다 줄 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구계획의 궁극적인 목표는 사료작물로서 널리 알려진 사료작물용 옥수수를 대상으로 고효율의 신품종 작물을 개발함으로써 축산업계 뿐만 아니라 농업분야에 다방면으로 기여함과 동시에 개발된 첨단기술과 know-how들의 축적 및 선진국들과의 기술력차이를 극복하는데 일익을 담당하는데 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

Lignin은 식물체의 중요한 구성성분 중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 사료작물에 있어서는 리그닌은 불필요한 요소이다. 저 리그닌을 가지는 식물의 생성은 고 효율성 사료의 효과적인 대안으로 될 수도 있다. Lignin합성경로에 관여하는 효소의 활성을 유전공학적 방법(Antisense RNA)을 통해 억제함으로써 저 lignin함량 사료작물의 생성을 기대할 수 있다. 기술개발시의 기대효과(사료비 절감, 환경오염감소, 수입대체 및 수출증가)가 매우 큰 분야로서 본 연구에서 기초적인 연구를 수행하였다.

리그닌 생합성 유전자 중 4CL (4-Cinnamoyl CoA ligase) 과 F5H (ferulic-5-hydroxylase) 유전자들은 lignin합성에 가장 중요한 역할을 하며 또한, 다양한 종간에도 homology가 높기 때문에 이들 유전자를 억제함으로써 효과적으로 lignin합성을 감소시킬 수 있을 것으로 판단되고 있다. 그러나 지금까지의 연구결과는 국내에서는 이들 유전자들에 대한 연구가 전무하며 국외에서도 이들 유전자를 대상으로 사료작물의 리그닌 감소에 대한 연구가 진행되고 있지 않다. 본 연구팀은 4CL 과 F5H 유전자를 genomic DNA 수준에서 국내외 최초로 분리하여 성격규명을 완료하였으며 이들 유전자를 사용하여 리그닌 관련 antisense vector를 성공리에 개발하였다.

본 연구팀이 분리 및 성격규명이 완료된 두 개의 유전자 중 4CL 유전자는 2.2kb로서 2개의 intron과 3개의 exon으로 구성되어 있다. 또한 F5H는 1개의 intron과 2개의 exon으로 구성되어 있는 유전자로 2kb에 해당된다. 또한 저 리그닌 관련

antisense vector (pM4CLAS와 pMF5HAS)의 개발을 완료하여 이들 벡터를 사용하여 옥수수에 형질전환체를 생성을 완료하였다. 옥수수의 형질전환체는 성장속도가 대조구와 비교해 볼 때 상당히 느리며 형태학적으로 잎에 흰줄과 반점이 나타나는 것을 확인하였다. 식물에서 리그닌 함량을 조사한 결과 대조구와 비교해 볼 때 다소 감소된 것을 확인한바 이는 antisense RNA에 의한 리그닌 감소를 증명해주었다. 일반 육종에 의해 저 리그닌 사료작물의 생성은 사실상 많은 육종과 세대교번 및 인력이 필요하기 때문에 생산성 효율이 낮다고 할 수 있다. 기존의 육종방식으로는 어렵거나 불가능한 이러한 품종개발을 위해 실용성이 있는 유전공학적방법의 이용은 목적달성에 적절한 방법을 제공 할 것이다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 가. 연구개발 결과

###### 1 년차

- 옥수수 품종의 시료 확보 및 온실증식
- 옥수수 4품종의 무균식물의 확보 및 대량증식과 재분화 체계의 확립
- cDNA library 제조
- 4CL과 F5H 유전자 탐사

###### 2 년차

- Genomic DNA를 사용한 long PCR 기법의 개발
- 4CL과 F5H 유전자의 분리 및 cloning 완료
- 4CL과 F5H 유전자의 성격규명 완료
- 형질전환체의 분석방법 확립 (PCR 과 GUS 분석)

###### 3 년차

- 4CL과 F5H antisense 유전자를 가진 vector의 조제와 Agrobacterium binary vector의 조제
- 옥수수 식물의 형질전환체 생성 및 선발
- 형질전환체의 분자생물학적 검증과 리그닌 분석

#### 나. 활용에 대한 건의

4CL과 F5H 유전자들의 genomic 수준의 성격규명이 완료되어 국내에서 유일하게 리그닌 관련 새로운 유전자를 보유함과 동시에 다른 식물체에도 유용하게 사용될 수 있으리라 기대된다. 성격 규명된 4CL과 F5H 유전자들을 사용하여 antisense RNA vector의 개발을 성공리에 완료하여 앞으로 옥수수뿐만 아니라 유용 작물에도 사용이 가능할 것으로 판단된다. 현재 보유하고 있는 두 개의 리그닌 생합성 유전자를 사용하여 sense 벡터도 쉽게 구축할 수 있으며 이들 벡터들을 사용하여 리그닌 관련 다양한 형질전환체를 생성할 수 있어 저 리그닌 혹은 고 리그닌을 가진 화훼 작물을 비롯한 새로운 식물을 창출할 수 있다고 사료된다. 현재 첨단기법인 RNAi 벡터를 사용한 gene silencing에 대하여도 본 연구 결과에 기초를 토대로 현재 추진 중에 있으며 앞으로 농업관련 신제품 창출에 일익을 담당하리라 사료된다.

## SUMMARY

(영문 요약문)

Both 4CL and F5H genes were isolated from maize genomic DNA by using long PCR protocol. According to data from DNA sequence analysis, both genes highly homology with maize cDNAs (4CL with 98% and F5H with 100%). Since both genes isolated from genomic DNAs, lengths of both genes are longer than those of cDNAs implying both genes contain introns. In 4CL, two introns at 412 and 93 base positions were inserted full genomic DNA and F5H has one intron and also inserted at 355 base position.

*In vitro* culture of four varieties have been developed for transforming antisense 4CL and F5H genes to maize. In our research, the frequency of callus induction showed quite different patterns among tested maize varieties. The Suwon 19 showed the best callus production and growth on tested N6 medium with 10uM 2,4-D while IkSan/TamRa and Pioneer showed very slow growth pattern on the same medium. For regeneration, four varieties on N6 with different concentrations of BA and TDZ showed strong genotypic variations on producing adventitious shoots from embryogenic calli. Again, Suwon 19 is the best regeneration capacity than other calli derived from selected maize.

Antisense 4CL and F5H vectors were constructed and the down-regulation of internal lignin biosynthesis was attempted to reduce in maize tissues via *Agrobacterium*-mediated transformation. Four maize varieties (KwangAnOk, Suwon 19 ho, IkSan/TamRa and Pioneer) were selected for producing transgenic plants. The plants regenerated from hygromycin resistant callus were obtained by culturing on the N6 medium containing high concentrations of sucrose (6%) and NAA (1mg/l). The phenotypes of putative transgenic plants were visually distinguishable with control plants in that strips and spot on the their leaves. Also, the putative four transgenic plants showed very slow growing and retarded

their growth patterns. To confirm that stable integration of the antisense F5H gene had occurred, PCR, southern and northern analysis were carried out using F5H primers as probe. A 0.6 kb DNA fragment was amplified from the PCR method and this band was strongly hybridized with F5H probe. Therefore it was confirmed that antisense F5H gene was integrated into genomic DNAs and reduced lignin contents of *Zea mays* L.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1	Summary of the project	10
Part 1	Importance of the research	10
1.	Scientific aspect	12
2.	Socio-cultural aspect	14
3.	Future perspectives	14
Chapter 2	Current techniques status of inside and outside of the country	15
Chapter 3	Research amis and results	17
Part 1	Project #1	17
1.	Introduction	17
2.	Materials and Methods	18
3.	Results	23
Part 2	Project #2	49
1.	Introduction	49
2.	Materials and Methods	51
3.	Results	54
Part 3	Project #3	64
1.	Introduction	64
2.	Materials and Methods	67
3.	Results	70
Chapter 4	Achievement and contribution	73
Part 1	Achievement	73
1.	Year First	73
2.	Year Second	77
3.	Year Third	82
Part 2	Contribution to the related fields	85
Chapter 5	Application plans	86
Chapter 6	Overseas's research activity	88
Chapter 7	References	89

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	10
제 1 절	연구 개발의 필요성 .....	10
1.	기술적 측면 .....	12
2.	경제, 산업적 측면 .....	14
3.	사회, 문화적 측면 .....	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	17
제 1 절	제1 세부과제 .....	17
1.	서언 .....	17
2.	재료 및 방법 .....	18
3.	연구 결과 .....	23
제 2 절	제1 협동과제 .....	49
1.	서 언 .....	49
2.	실험방법 .....	51
3.	결과 및 고찰 .....	54
제 3 절	제 2 협동과제 .....	64
1.	서 언 .....	64
2.	실험 방법 .....	67
3.	결과 및 고찰 .....	70
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	73
제 1 절	목표 달성도 .....	73
1.	제 1 차년도 .....	73
2.	제 2 차년도 .....	77
3.	제 3 차년도 .....	82
제 2 절	관련 분야에의 기여도 .....	85
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	86
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	88
제 7 장	참고문헌 .....	89

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구 개발의 필요성

국민의 식생활 및 건강과 직결되고 있는 축산물의 생산은 인간생활과 자연환경에 대하여 많은 영향을 미치고 있는 것은 사실이며, 축산식품의 생산, 지력의 증진, 사역용, 레저용 또는 에너지의 생산측면에서 역점을 두고 개량하고 있다.

하지만 사료작물 (목초료, 풋베기 사료작물, 뿌리채소등)들은 축산의 발달에 따라 필요량이 증가되어 기존의 농경지만으로는 턱없이 부족하게 되어 고효율을 가진 신 품종의 사료작물의 개발, 농경지 및 산지개간등 대체방안이 필요시 되고 있다. 또한 축산농가의 가축수가 증가됨으로 인하여 가축폐기물에 의한 공기, 하천 및 토양의 오염 그리고 냄새공해 등은 소비자들의 축산에 대한 이미지를 부정적으로 바꾸어 놓는 중요요인으로 작용하고 있음을 부인할 수만은 없는 현실에 놓여 있다.

현재까지 사료작물관련 신품종의 개발은 전통 육종방법에 전적으로 역점을 두고 있는바 단기간에 문제점을 해결할 수 없는 단점을 가지고 있다. 또한 새로운 국내초 지 경작지의 개간비용을 감안해 볼 때 농가부채의 가중등 현실적으로 어려운 상황에 있다. 정부차원에서 초지조성비용의 태반을 보조해 주는 다방면의 지원방안을 쓰고 있지만 근본적인 축산업의 대체방안으로 부족하다고 판단된다.

따라서 향후 축산업의 현재의 증가추세로 보아 이들 대체 방안은 많은 인력, 경비 그리고 소요기간을 요구하여 적지 않는 문제점을 내포하고 있다.

상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 현실적으로 가장 적절한 대안 중의 하나로써 양질의 고효율의 사료작물 (높은 소화율, 고단백질, 고칼로리) 신품종을 단시간에 개발함으로써 기대할 수 있다.

즉 저 리그닌 함량과 가용성 셀룰로즈 양이 증가된 양질의 사료작물을 개발함으로써

- 1) 가축 소화율이 극대화가 가능하며
- 2) 가소화 에너지의 섭취량을 높여 주는 이점이 있으며,
- 3) 소화가 용이함으로 인한 영양분섭취가 보다 쉽고 많은 양이 단시간에 소

화됨으로 인한 적은양의 분뇨로 인한 축산가의 환경오염 감소를 유도 할 수 있으며,

- 4) 사료작물을 선별적으로 식재함으로써 기존의 사료경작지의 효율적 이용이 가능하여 결과적으로 축산가의 경제적 비용절감을 가져다 줄 수 있을 것으로 사료된다.

모든 식물에 존재하는 Lignin은 식물체의 중요한 구성성분중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 높은 소화율을 위해서 리그닌양 자체를 감소시킴으로서 가능하리라 사료된다. 현재 같은 종의 식물에서도 lignin함량에 있어 상당한 변이를 보이기 때문에 40-50% lignin함량의 감소가 식물체 전체의 성장에는 영향을 미치지 않는다고 보고된 바가 있다.

또한 이들 lignin 들은 ferulate crossing 연결에 의해서 식물세포의 구성인 ferulic 산 분자들과 단단히 결합하고 있다. 이들 분자들과 lignin 분자들과의 연결정도에 따라서 가축의 소화에 직접적인 영향을 주고 있다고 옥수수과 switchgrass의 연구에서 보고 된바가 있다. 즉 lignin 분자와 ferulate산 분자와의 결합력을 약화시킴으로서 가용성 cellulose 및 hemicellulose가 많아지며 결과적으로 높은 에너지를 취할 수 있으며 소화율도 한층 높아지리라 사료된다.

따라서 저리그린 및 높은 가용성의 셀룰로즈 함량을 가진 양질의 사료작물 창출은 첨단생명공학기법 즉 antisense RNA기법을 사용하여 리그닌 합성경로에 관여하는 효소들 중 4-(hydroxyl) cinnamoyl CoA ligase (4CL) 와 ferulic 산의 합성에 관여하는 ferulic-5-hydroxylase (F5H) 효소들의 활성을 감소시킴으로서 가능하다고 사료된다.

현재 국내의 생명공학기술이 선진국 수준에 근접해 있고 최근 들어 가시적으로 결과가 나타나고 있지만, 생명공학기술의 이용과 방법에 의해 실용적으로 산업에 이용 될 수 있는 기술개발 실적은 아직까지는 현재까지는 미미하다고 판단된다.

본 연구계획의 궁극적인 목표는 사료작물로서 널리 알려진 사료작물용 옥수수를 대상으로 고효율의 신품종 작물을 개발함으로써 축산업계 뿐만 아니라 농업분야에 다방면으로 기여함과 동시에 개발된 첨단기술과 know-how들의 축적 및 선진국들과의 기술력차이를 극복하는데 일익을 담당하는데 있다.



현재까지 다양한 종류의 식물체에서 4CL에 관계된 유전자를 cDNA와 genomic DNA 수준에서 분리, 성격 규명된 결과 이들 담배와 대두에서만 4CL의 유전자 그룹들이 있다고 보고되었다. 하지만 담배의 경우 두 종류의 4CL (4CL1 과 4CL2) 유전자들이 81% 와 89% 정도의 단백질 상동성을 보여주고 있을 뿐만 아니라 이들 단백질들은 같은 기질 하에서 아주 비슷한 특성을 보여줌으로 이들의 단백질들은 같은 기능성을 보여주고 있다고 보고되었다. 하지만 콩의 경우 2종류의 4CL 유전자 (GM4CL14 와 GM4CL16) 들은 대두의 뿌리에서 병원균의 침입에 의한 반응과 세포 배양 시에 있어서 이들의 반응이 서로 각기 다른 양상을 보여주고 있다. 즉 병원균이나 elicitor에서 유기된 GM4CL16은 flavonoid 생성에 관계있다고 보고되었다. 하지만 부분적인 염기서열만 가지고 이들 두 대두유전자 4CL들이 encode 하고 있는 단백질의 생화학적기능은 아직까지 알 수 없다. 따라서 기능적으로 서로 다른 4CL 상동효소들의 분자생물학적으로나 생화학적인 증거는 아직까지는 불충분하다고 판단된다.

이들의 4CL 유전자들은 식물종류에 관계없이 리그닌과 flavonoid 생합성에 관여하고 있으므로 이들 효소의 활성을 억제함으로써 식물체내의 함량을 감소시킬 수 있다고 사료된다. 일반적으로 lignin 성분은 식물의 목본조직의 15-30%를 구성하고 있으나, 자연 상태의 식물에 있어 lignin의 함량변이가 크다는 것은 어느 정도까지 그 성분을 줄여도 식물체의 성장과 발육에 장애가 되지 않을 것이라는 것을 암시하고 있다. Hu et al (1998)의 연구논문 결과에서 보면 저 리그닌을 함유하는 포플러식물은 반면에 15%이상이 증가된 cellulose 양을 가지고 있다고 보고된 바, 따라서 이들 기법을 사료작물에 도입하여 신품종을 개발하면 양질의 식물을 육성할 수 있으리라 생각된다.

4CL 효소들은 G형태의 lignin 생성에 관여하는 효소이지만 반면에 F5H 효소들은 S 형태의 lignin 생성에 관여하고 있다 (그림 1). 애기장대의 연구에서 보면 T-DNA tagging 법에 의해서 F5H 효소가 생성되지 않는 변이체 fdh1을 생성하여 F5H 유전자를 분리하였다. 이들 유전자를 재도입하여 overexpression 한 결과 이들 재분화 개체들은 특이적이 S 형태의 lignin 들만 축적된다는 보고가 있었다 (John et al., 1999). 따라서 F5H 효소가 S lignin 생성에 아주 중요한 조절역할을 한다는 것이 최근에 알려졌다. 따라서 이들 4CL과 F5H 효소들의 활성을 식물체내에서 제한하거나 혹은 감소시키면 고효율의 사료작물의 창출을 기대할 수 있다고 판단된다.

## 본 연구의 기술적 측면은

- ☞ Lignin생합성 관련 유전자중 4CL 및 F5H 유전자 분리,
- ☞ antisense 4-CL 및 F5H vector의 조제
- ☞ 다양한 형질전환기법을 통하여 저 리그닌 및 고 셀룰로즈를 함유하는 사료작물의 생성을 목표로 하고 있다.

이러한 기술적 배경의 핵심은 lignin 생합성관련 유전자(4CL)를 clone하여 antisense RNA vector를 구축한 후 사료작물에 대량으로 형질전환시켜 형질전환 개체를 획득하는데 있다.

## 2. 경제, 산업적 측면

본 연구에서 특정유전자 즉 4CL과 F5H 유전자를 형질전환기법을 사용하여 사료작물 (사료작물용 옥수수)에 antisense 형태로의 4CL과 F5H 유전자를 주입시킨 후 식물조직배양의 기법으로 재분화를 유도하여 생성시킴으로서 단일 유전자의 특성만을 가지는 작물의 창출과 더불어 시간 및 경제적 이점의 효과를 기대할 수 있다. 배합사료의 대체로 인한 농가경비절감과 효과적인 가축의 소화에 의한 분뇨 양의 감소로 인한 오·폐기물이 격감됨으로서 환경오염을 줄일 수 있는 부가적인 효과도 있다. 또한 폐농경지나 불모지에 식재함으로써 경지의 효율적 이용도 가져줄 수 있다고 기대된다.

## 3. 사회, 문화적 측면

IMF 와 WTO를 격어 오면서 위축된 축산농가에 사료 구입비를 절감시킴으로서 인한 농민의 경제적 부담의 감소와 환경오염에 대한 사회적 관심이 높아지는 현실에 격감된 환경 오·폐수로 인한 축산농업의 긍정적인 면을 인식시킬 수 있다고 본다. 따라서 제안된 본 연구의 결과는 이러한 범사회적 관심에 대해 실제적으로 달성 가능한 하나의 사례를 제공할 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

사료작물 관련 국내의 경우 전통적인 육종에 의한 품종개량 및 조직배양을 통한 대량증식에 초점을 맞추어 대부분 연구를 수행하고 있다. 현재 사료작물에 대한 신 품종의 개발은 인력, 비용 및 공간을 많이 필요로 하는 문제점을 안고 있다. 또한 저 리그닌만 가지고 있는 특정 형질의 품종개발은 단기간에 성취하기는 어렵다고 사료된다. 또한 새로운 국내초지 경작지의 개간비용을 감안해 볼 때 농가부채의 가중 등 현실적으로 어려운 상황에 있다. 정부차원에서 초지조성비용의 태반을 보조해 주는 다방면의 지원방안을 쓰고 있지만 근본적인 축산업의 대체방안으로 부족하다고 판단된다.

첨단생명공학 기술은 국내에서도 상당한 수준에 있어 즉 유전자 분리기술 및 cloning 그리고 형질전환에 관련한 기술을 세계적으로 견줄 수 있는 기술을 보유하고 있다고 사료된다. 하지만 저 리그닌을 가진 사료작물의 품종개량은 현재 국내에서는 전혀 연구가 되고 있지 않다.

리그린 생합성에 가장 중요한 역할을 하는 유전자들 대부분은 다양한 종간에도 homology가 높기 때문에 이들 유전자의 억제로써 lignin합성을 감소시킨다는 것이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 지금까지의 연구결과는 감소의 정도가 상당히 낮은 것으로 나타났다 (Joel et al., 1998). 또한 Antisense유전자의 발현도 transgenic plant간에 변이가 심한 것으로 나타났다 (Halpin et al., 1994). 기존의 육종방식으로는 어렵거나 불가능한 이러한 품종개발을 위해 실용성이 있는 유전공학적 방법의 이용은 목적달성에 적절한 방법을 제공 할 것이다.

첨단기법 중의 하나인 antisense DNA 기술을 도입하여 gene silencing 에 관련한 부분은 아직 많이 미흡하며 특히 사료작물에 있어서는 전무한 실정이다. 국외에서 보면 지금까지 분리된 lignin 생합성관련 유전자는 여러 가지가 있다. Phenylalanine ammonialyase (PAL), OMT, CAD및 anionic peroxidase (POD), 4CL 그리고 F5H들로서 이들 유전자는 담배, 애기장대 및 옥수수를 포함한 소수의 식물 종에서만 연구되었다. 1986년 Ecker와 Davis에 의해 CAT 유전자를 antisense RNA방법에 의한 성공적 조절이래로 antisense technique에 의한 유전자 표현 및 효소기능의 조절에 관한 많은 성공적인 연구사례가 있다. Chalcone synthase유전자

발현 조절에 의한 꽃 색깔의 변화, tomato의 성숙 ripening 관련 유전자의 표현조절에 의한 수확 후 저장기간의 연장 등의 실용적 사례도 있다 (Leyva et al., 1995).

본 과제에서 제안한 방법은 현재 연구가 되고 있지 않는 리그닌 관련 4CL과 F5H 유전자를 분리하여 antisense 기법을 통해 성공적으로 옥수수에 재도입, 유전적으로 안정적인 식물개체 획득에 성공적으로 수행한 상태로 이에 수반된 조직배양기법, 분자생물학적 기법에 관련된 첨단기술 및 know-how를 보유할 수 있다.

따라서 제안된 본 연구와 관계있는 연구기술 개발 실적으로는

- 1) gene cloning, expression 및 manipulation
- 2) plant expression 벡터개발 및 분석
- 3) 새로운 형질전환기법의 개발 및 조직배양 및 형질전환체 분석등이 있다.

본연구가 제안하는 이런 시도가 성공한다면 1) Lignin합성에 관계하는 유전자의 분리 및 성격규명 2) Antisense system을 이용한 유전자 발현 억제 3) 리그닌 함량이 감소된 신품종 창출 4) 관련된 기술 및 know-how 축적 등에 대한 결과를 획득할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 제1 세부과제

최종목표: 리그린 관련 유전자 4CL 과 F5H 유전자의 분리 및 성격규명

#### 1. 서언

사료작물들은 축산의 발달에 따라 필요량이 증가되어 기존의 농경지만으로는 턱없이 부족하게 되어 고효율을 가진 신품종의 사료작물의 개발, 농경지 및 산지개간 등 대체방안이 필요시 되고 있다. 가축폐기물에 의한 환경 및 냄새공해 등은 소비자들의 축산에 대한 이미지를 부정적으로 바꾸어 놓는 중요요인이다. 전통 육종방법에 신품종 개발에 역점을 두고 있는바 단기간에 문제점을 해결할 수 없는 단점을 가지고 있다. 따라서 향후 축산업의 현재의 증가추세로 보아 이들 대체 방안은 많은 인력, 경비 그리고 소요기간을 요구하여 적지 않는 문제점을 내포하고 있다.

이와 같은 문제점을 해결하기 위한 현실적으로 가장 적절한 대안 중의 하나로서 양질의 고효율의 사료작물 (높은 소화율, 고단백질, 고칼로리) 신품종을 단시간에 개발함으로써 기대할 수 있다. 첨단생명공학 기법을 사용하여 인위적으로 창출한 고효율의 사료작물들로 대체함으로써 환경공해 및 전통육종방법의 문제점을 우회할 수 있는 가장 적절한 대안으로 사료된다.

모든 식물에 존재하는 Lignin은 식물체의 중요한 구성성분 중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 높은 소화율을 위해서 리그닌양 자체를 감소시킴으로서 가능하리라 사료된다. 현재 같은 종의 식물에서도 lignin함량에 있어 상당한 변이를 보이기 때문에 40-50% lignin함량의 감소가 식물체 전체의 성장에는 영향을 미치지 않는다고 보고된 바가 있다.

또한 이들 lignin 들은 ferulate crossing 연결에 의해서 식물세포의 구성인 ferulic 산 분자들과 단단히 결합하고 있다. 이들 분자들과 lignin 분자들과의 연결정도에 따라서 가축의 소화에 직접적인 영향을 주고 있다고 옥수수과 switchgrass의 연구에서 보고 된바가 있다. 즉 lignin 분자와 ferulate산 분자와의 결합력을 약화시킴으로서 가용성 cellulose 및 hemicellulose가 많아지며 결과적으로 높은 에너지를

취할 수 있으며 소화율도 한층 높아지리라 사료된다. 따라서 저리그린 및 높은 가용성의 셀룰로즈 함량을 가진 양질의 사료작물 창출은 첨단생명공학기법 즉 antisense RNA기법을 사용하여 리그닌 합성경로에 관여하는 효소들 중 4-(hydroxyl) cinnamoyl CoA ligase (4CL) 와 ferulic 산의 합성에 관여하는 ferulic-5-hydroxylase (F5H) 효소들의 활성을 감소시킴으로서 가능하다고 사료된다.

본 세부과제에서는 리그닌 생합성에 필수적인 4CL과 F5H 유전자들의 분리 및 성격규명을 수행하여 이들 유전자들을 상대로 식물형질백터 (antisense 벡터)를 구축하는데 목표가 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Total RNA 분리

옥수수 잎에서 total RNA는 Draper 등(1988)의 phenol-SDS 방법에 따라 추출하였으며 ethanol 침전에 의해 pellet을 얻은 후, DEPC (diethylpyrocarbonate) 처리한 물에 녹여 농도를 측정하여 poly(A<sup>+</sup>) RNA 추출을 위하여 사용하였다.

옥수수에서 분리한 약 1 mg의 total RNA로부터 oligo(dT) cellulose를 사용하여 Molecular cloning 실험 protocol (Maniatis *et al*, Cold Spring Harbor, New York)에 따라 polyadenylated cytoplasmic RNA를 추출하였다. 최종 분리된 total RNA는 DEPC (diethylpyrocarbonate)를 처리한 물로 RNA를 녹인 후 spectrophotometer로 260 nm 와 280 nm에서 각각 OD를 측정하여 양과 순도를 결정한 결과 total RNA 1 mg 으로부터 약 150  $\mu$ g의 poly(A<sup>+</sup>) RNA를 얻었으며 260 nm 와 280 nm의 OD 값에 대한 비율은 약 1.7의 순도를 갖는 poly(A<sup>+</sup>)RNA를 얻었다.

### 나. 옥수수 cDNA library 제조

옥수스로부터 분리한 poly(A<sup>+</sup>)RNA에 대한 cDNA library 제조는 ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene, La Jolla, Calif.)를 이용하여 약간의 실험방법을 변형하여 제조하였다.

First cDNA의 제조는 10  $\mu$ g의 poly(A<sup>+</sup>)RNA를 사용하여 oligo(dT) tail에 *Xho*I

제한효소 부위를 갖는 oligo(dT) primer-adaptor를 이용하여 50  $\mu$ l의 reaction volume하에서 제조하였다. Second strand cDNA의 제조는 좋은 수율로 합성된 first cDNA의 반응 mixture에 second strand buffer (20 mM Tris-HCl, pH 6.9, 90 mM KCl, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM  $\beta$ -NAD, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 10 mM dNTPs,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP, RNase H (3 unit), DNA polymerase (100 unit)를 첨가한 후 물로 반응하여 ethanol 침전에 의해 회수하였다. 회수된 cDNA를 *Eco*RI 제한효소 부위를 포함하는 adaptor를 첨가하여 만들어진 cDNA들과 blunt-end ligation을 한 후 polynucleotide kinase로 5'-말단부위를 인산화 시켰다. cDNA size fractionation column (GIBCO BRL, Bethesda, MD)을 사용하여 cDNA의 크기별로 분획을 회수한 후 그 중 일부를 취하여 TAE buffer를 사용한 agarose gel 에서 cDNA 분포를 확인하였다. 분획 중 0.5 kb 이상 되는 cDNA만을 ethanol 침전에 의해 cDNA를 회수한 다음 Uni-ZAP vector와 12°C에서 overnight ligation하여 packaging을 위해 사용하였다. 재조합 phage vector의 packaging은 Gigapack Gold III packaging kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제조하였다. Titering에 의한 cDNA library size를 측정된 결과 전체 size는 8 x 10<sup>6</sup> pfu/ $\mu$ g of cDNA로 큰 size의 library를 얻었다.

#### 다. Total Phage DNA 추출 및 partial 4CL and F5H cDNA 증폭

옥수수 cDNA library로부터 phage total DNA의 추출은 Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989)의 실험 방법들에 따라 수행하였다. Phage 입자들은 원심분리 (10,000g, 10분, 4°C)에 의해 침전시켜 상등액은 완전히 제거한 다음, pellet은 건조시켜 TE buffer (pH 8.0) 0.5 ml에 현탁시키고 10% SDS 5  $\mu$ l를 첨가하여 68°C에서 5분간 배양하였다. 5 M NaCl 10  $\mu$ l를 넣은 다음 phenol:chloroform 과 chloroform으로 정제하여 isopropanol로 DNA를 침전시켜 pellet를 얻은 후 TE buffer에 녹여 PCR 증폭을 위한 주형으로 사용하였다.

4CL과 F5H 유전자를 cDNA library로부터 screening하기 위하여 사용할 부분 유전자는 4CL과 F5H DNA 서열이 알려져 있는 애기장대와 옥수수의 염기 서열의 부분 서열을 참조로 하여 새로운 2 set의 primer oligonucleotide를 합성하였다.

N-XbaI-4CL1-Start : 5'CTCTAGAATGGCGCCACAAGAACAAGCAGTT3'

C-XbaI-4CL1-Stop : 5'CTCTAGATCACAATCCATTTGCTAGTTTTGC3

PCR 반응은 추출한 total cDNA를 template로 하여 가장 효율이 좋았던 100 ng 을 사용하였으며 primer 농도는 각각 2 pmole이 되도록 첨가하고 *Taq* polymerase는 2 unit을 사용하여 95°C-5 min, 44°C-30 sec, 72°C-2 min 조건에서 1 cycle, 95°C-1 min, 44°C-30 sec, 72°C-2 min 조건에서 30 cycle, 72°C-10 min에서 1 cycle을 수행 하였다.

#### 라. 4CL 과 F5H cDNA의 screening

Plaque hybridization을 위한 일련의 과정들은 Grunstein and Hogness 방법에 따라 수행하였다. False positive plaque를 방지하기 위하여 duplicate filter를 약 4분 간 같은 agar plate에 올려놓고 blotting을 하여, 1차 screening 과정을 위해 2 개의 filter를 사용하였다. 사용한 master agar plate는 최종적으로 autoradiography에 의한 positive plaque picking을 위해 4°C에 보관하였으며, filter는 1.5 M NaCl과 0.5 M NaOH를 포함하는 denaturation 용액에 2-3분간 변성시킨 후 1.5 M NaCl과 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0)의 neutralization 용액으로 옮겨 약 5 분간 중화시켜서 UV crosslinker (120,000  $\mu$ J of UV energy)로 약 30초간 crosslink 시켰다. 준비된 membrane들은 prehybridization buffer (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA)를 포함하는(3 ml/membrane) glass dish에 넣고 42°C에서 2 시간 이상 반응시켰다.

Probe DNA는 4CL과 F5H primer로 증폭된 0.6 kb와 0.5 kb DNA 절편을 agarose gel 에서 fractionation 하여 각각의 DNA 조각을 elution 한 후 50  $\mu$ Ci 의  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, dNTPs, 10x buffer, BSA, Klenow 효소를 첨가하여 조제하였다.

마. Total cDNA로부터 PCR에 의한 full length OMT cDNA 증폭

4CL 과 F5H 서열이 알려져 있는 애기장대와 옥수수의 엽기 서열의 5'-말단과 3'-말단의 부분 서열을 참조로 하여 상당한 유사성을 갖고 있을 것이라고 예상되는 부위를 기점으로 하여 새로운 2 set의 primer oligonucleotide를 합성하였다. 4CL F1 (5'GGGGTCGACAAGATGGGTCAACA3') 과 R1 (5'GGGGTCGACGGCCTTCTTGCGGAA3') primer set의 경우 start codon에서 stop codon 까지만 amplification되도록 design 하였으며 양쪽 끝에는 제한효소 *SalI* site를 도입하여 계속되는 subcloning 과정에 용이하도록 하였다. 또 다른 set인 F5H는 primer F1 과 R2 (5'GGGGTCGACTCACTTAATGCTTAG3')의 경우에는 3'-noncoding region 324 bp가 더 들어가도록 설계되었으며 양쪽 말단은 첫 번째 primer set와 마찬가지로 *SalI* site가 도입되었다. PCR 반응은 추출한 total cDNA를 template로 하여 가장 효율이 좋았던 100 ng을 사용하였으며 primer 농도는 각각 2 pmole, dNTPs 는 0.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 는 1 mM이 되도록 첨가하고, Taq polymerase (Promega)는 2 unit을 사용하여 95°C -5 min, 44°C-30 sec, 72°C-2 min 조건에서 1 cycle, 95°C-1 min, 44°C-30 sec, 72°C-2 min 조건에서 30 cycle, 72°C-10 min에서 1 cycle을 수행하였다.

바. Touch-Down and Long PCR

4CL과 F5H 유전자를 genomic DNA에서 증폭을 하기 위하여 아래와 같은 PCR protocol을 사용하였다 (표 1). 각각의 PCR 반응은 MgSO<sub>4</sub> 는 1 mM이 되도록 첨가하여 사용하였다. Standard 와 Touch-down PCR의 buffer는 promega 제품의 buffer를 사용하였으며 long PCR 경우 10x buffer는 Maniatis protocol에 따라서 조제하여 사용하였다 (Maniatis et al., 1998).

	Standard PCR	Touch-down PCR	Long PCR
10 x buffer	From promega protocol	From promega protocol with or without DMSO	From Maniatis protocol with or without DMSO
Cycles	95°C for 3 min denaturation 1 cycle 95 °C for 20 sec 52 °C for 20 sec 72 °C for 40 sec 35 cycles 72 °C for 3 min.	95°C for 3 min denaturation 1 cycle 95 °C for 20 sec 72 °C for 30 sec touched 10 cycles (2 °C down after each cycle) 95 °C for 20 sec 52 °C for 20 sec 72 °C for 40 sec 20 cycles 72 °C for 3 min.	95°C for 3 min denaturation 1 cycle 95 °C for 30 sec 60 °C for 30 sec 68 °C for 4 min 35 cycles 68 °C for 4 min.
Taq polymerase (5U/reaction)	General taq polymerase (without proofreading function)	General taq polymerase (without proofreading function)	General taq polymerase (without proofreading function)
Primers	25 pmole each / reaction	25 pmole each / reaction	25 pmole each / reaction
Template DNA	50 ng/reaction	200 ng/reaction	300 ng/reaction

표 1. 4CL 과 F5H 유전자 증폭을 위한 3 종류의 PCR protocol들.

### 3. 연구 결과

가. cDNA Library 제조 및 리그닌 유전자 (4CL 과 F5H)의 probe 확보

1) 4CL과 F5H 유전자의 sequence alignment 및 cDNA를 통한 primer들의  
조제

가) 4CL 유전자의 Primer 조제

애기장대에서 4CL 관련 유전자가 현재 3종류가 발견되어 있는바 아래 그림과 같이 단백질 alignment를 수행한 결과 상호간에 상동성이 아주 높은 것으로 나타났다 (그림 1). 따라서 이들 유전자중 가장 많이 알려져 있는 애기장대의 4CL1 유전자에서 Start codon 과 stop codon을 전후로 primer를 조제하여 total RNA에서 먼저 RT-PCR에 사용하였다.

CL1 (N-XbaI-4CL1-Start): 5'CTCTAGAATGGCGCCACAAGAACAAGCAGTT3'

CL2 (XbaI-4CL1-Stop): 5'CTCTAGATCACAATCCATTTGCTAGTTTTGC3'

예상되는 증폭 길이는 cDNA의 1.6-1.7 kb 정도의 크기이며 이들 primer들은 XbaI 제한효소 부위를 가지고 있어 증폭되는 DNA를 바로 cloning에 용이하도록 제조되었다.

나) F5H 유전자의 Primer들의 조제

알려진 옥수수의 F5H 염기서열을 토대 (그림 2)로 하여 full cDNA를 증폭하기 위해 다양한 종류의 primer를 조제하였다 (그림 2). 이들 primer들 중 primer 1, 2는 start와 stop codon 에 BamHI, primer 3, 4는 XbaI 부위를 삽입하였으며 primer 5, 6, 7은 F5H의 internal sequences 내에 start condon 5'upstream 부분의 UTR (untranslated region)을 염기서열을 삽입하여 primer들을 제조하였다 (그림 2). Antisense vector 조제에 특이 UTR 부분이 삽입되면 유전자의 silencing이 효과적이라는 연구결과에 있어 2 종류의 primer들은 UTR을 삽입하도록 조제하였다. 또한 양쪽에 제한효소 부위를 가지고 있어 증폭된 PCR product들이 cloning이 용이하도록 조제하였다.

## 2) RT-PCR을 통한 4CL과 F5H 유전자의 probe 확보

### 가) RT-PCR을 통한 4CL과 F5H 유전자의 증폭

옥수수 잎에서 total RNA를 순수정제 한 다음 (그림 3) reverse transcriptase를 사용하여 순수 정제된 mRNA에서 1st strand cDNA를 조제한 후 PCR 증폭으로 인해 F5H와 4CL 유전자의 분리를 시도하였다. 즉 먼저 1ug의 total RNA과 50 pmole oligo dT를 섞은 후 65℃에서 10분간 먼저 denature 시킨 다음 온도를 저하 시킨 후 이들 반응물들을 2ul 5xM-MLV RTase 반응물, 2ul의 100mM DTT, 1ul 의 10mM dNTP, 20 unit의 RNase inhibitor, 200 unit의 M-MLV RTase 그리고 20 ul의 DEPC 물을 첨가하여 반응을 약 1시간동안 37℃와 42℃에서 수행하였다. 이들 1st cDNA의 1ul를 취하여 일반적인 PCR을 수행하였다. Premier 들은 그림 2에서 조제된 primer 1 과 2 그리고 primer 3과 4를 사용하여 증폭에 사용하였다.

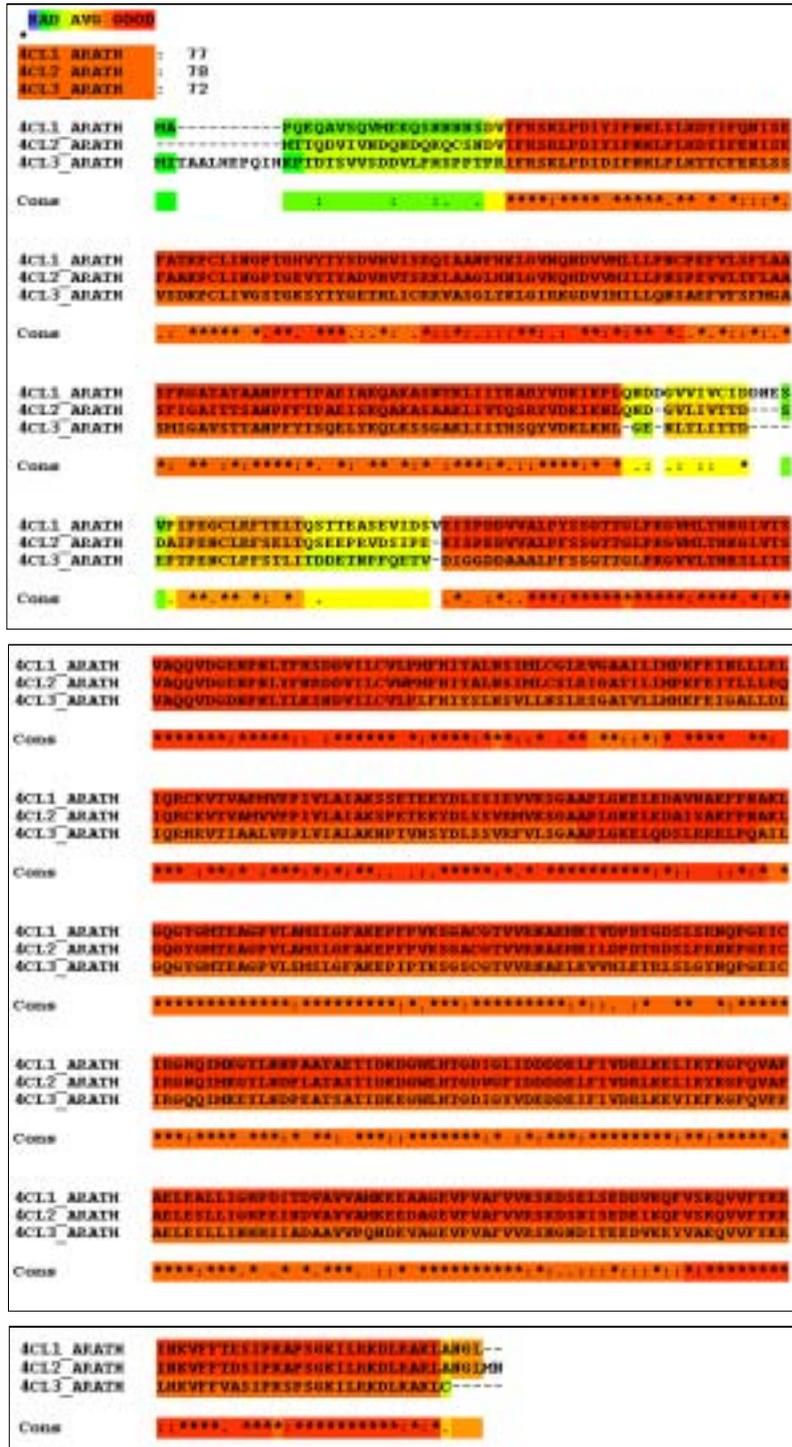


그림1. 애기장대의 4-coumarate: CoA ligase, 4CL1, 2, 3 유전자들의 아미노산 분석.

```

1 cagtcaactct actactcgaat ggaaccagca acatggcctg tgtctctcgg cattgcccctc
61 tgcgcagcgg cagcgtcttt cctttcgcgc gcccgccgcc cggctctaca cccccgcgg
121 gcccacaagc catggccgat catcggcaac cttaacctca tggcgagct gcccacagc
181 tccatgaacg agctgtccaa gcggtacggt ccgctcatgc agctccggtt cgggtcgttg
241 cctgttctcg tccggcgttc ggttgagatg gcaaagctct tctcaagac caacgacgg
301 cgtttctccg accggccgag gttcgcaatc gccaaagta cgcgtacga ctctccgac
361 cttctatggg ctcttccgg gccgtacctg gccaggcac gcaagatctg cgcaccagag
421 ctcttcagcg ccacggcgtc cgagtccttc gagcacatcc gcgacgagga ggtgcgcgtg
481 atgctcgcac agctcgcaca agcggctggg cgcaccgtgc ggctcaggga ctacctgcag
541 atgttggcgc tccggctgat ctccgcata gttctgggca ataagtaagt catggaggag
601 gtggcggacg gtgaggggga ctacgcccgc gcgataacgc ctgccagatt caggagatg
661 gtggcagagt tcttcgcctc tcacggtgcg tttaacatg gtgattacat cccctggcta
721 gatggctgg acctgcaggg ctacgttgcct aggatgaaga gaatgaaggc gaggtttggt
781 cgatttctcg aacgagctct ggacgtgcac aacgagcggc gactacgcga gggagggaac
841 ttttgggcaa aggatatgtt ggacgtgctg ctgcagctgg ccgatgacac tagtctgaa
901 gtccagctca gcaggacaa tgttaaggct atcacacagg acctaatcat cgcaggcacg
961 gatagtaatg caaacacgct ggagtgggct gtcctggagc tctcaagaa cccataagtc
1021 ttagccaagg ccatggagga gctgaacct gtcatagggc cggaccgact ggtgaaggaa
1081 agcgacctcc ctgcctccc ctacatcgag gctgtgctca aggagacctt gcgctgcac
1141 cctgccgcgc cgaatctggc accccacgtg gcccgcgagg acacatccgt ggacggatac
1201 gacgtgctcg ctggcacggt cttgttcatc aacgtgtggg caatcgcccg cgacctgga
1261 ctgtggagcg cgcgggagga gttccggccc gagcgttccg tcgagagcaa gatcgactg
1321 agggcccatg acttccagct gctgcgctc gccctctggc gccgaatgtg ccccggtac
1381 aacctcgcgc taaaggatgat ggctttgagt ctggccaalc tgctacacgg cttcgagtgg
1441 aggtctcggc acggcgtgac ggcagaggag ctgagcatgg atgaggcctt caagctcgg
1501 gtaccgcgta aattcccgtc catggtcgtg gccgagccca ggttgcagc tcgctgtat
1561 actggcctt gagcccgta cgtgtcttcg gttgtggca tgcgtggagt atagcacatg
1621 attttcagct ctgggaactt tgttttaata aaacacaaat atatgttta tgttggtaa
1681 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

- F1: N-BamHI-CYP92A1-Start : 5'CGGATCCATGGAACCAGCAACATGGGCTGTG3'
- F2: N-BamHI-CYP92A1-NONSTOP : 5'CGGATCCAGCGCCAGTATACAGGCGAGCTGGCAA3'
- F3: C-XbaI-CYP92A1-Start : 5'CTCTAGAATGGAACCAGCAACATGGGCTGTG3'
- F4: C-XbaI-CYP92A1-STOP : 5'CTCTAGATCAAGCGCCAGTATACAGGCGAGCTGG3'
- F5: N-BamHI-CYP92A1-5UTR-START : 5'CGGATCCAGTCACTCTACTACTCGATGCAACCA
- F6: 5'UTR- CYP92A1 : 5'CAGTCACTCTACTACTCG **CAGTCACTCTACTACTCG**3'
- F7: 5'rUTR- CYP92A1 : 5'CGAGTAGTAGAGTGACTGCGAGTAGTAGAGTACTG3'

그림 2. 옥수수 F5H (ferulic-5-hydroxylase homologous) 염기서열과 사용된 primer 부위 및 다양한 종류의 조제된 primer들. Primer 1, 2는 start와 stop codon 에 BamHI, Primer 3, 4는 XbaI 부위를 삽입하였으며 Primer 5, 6, 7은 F5H의 internal sequences 내에 start codon 5'upstream 부분의 UTR (untranslated region)을 염기서열을 삽입하여 primer를 조제하였다.

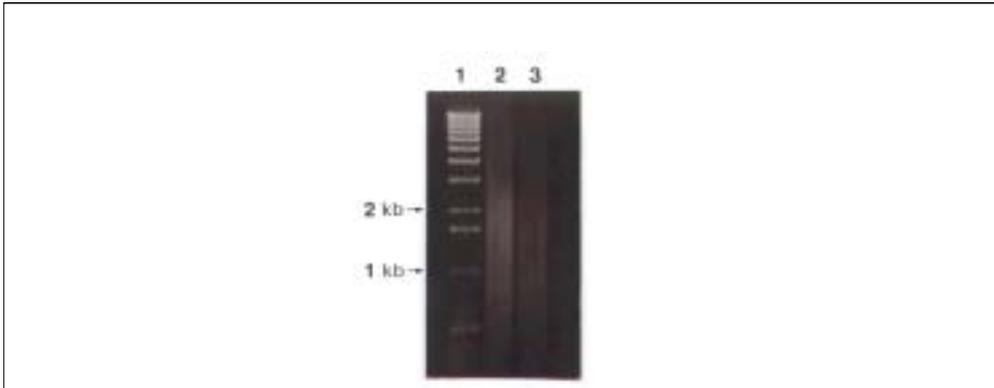


그림 3. 순수 정제된 옥수수 poly(A<sup>+</sup>) RNA. lane 1: 1 kb ladder lane 2: Poly(A<sup>+</sup>) RNA(2  $\mu$ l) lane 3: Poly(A<sup>+</sup>) RNA(1  $\mu$ l)

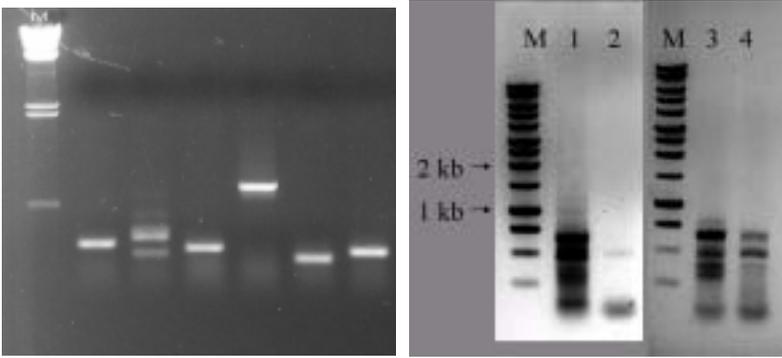


그림 4. 1st cDNA를 구축한 후 RT-PCR을 사용하여 4CL과 F5H 유전자를 증폭 시켜 1%의 agarose gel에 전기영동 시킨 결과 다양한 크기의 band들이 검출 되었다.

좌: M: lambda DNA lane 1 - 6: 다양한 농도의 cDNAs (0.1 ug - 5 ug) with CL1 & CL2 primers. 우: 1kb ladder, 1: primer F1 & F2, 2: primer F3 & F4, 3: primer F5 & F4, 4: primer F6 & F7

상기의 사진 (그림 4)에서 보는 바와 같이 다양한 크기의 DNA가 증폭되는 것을 확인하였지만 기대되는 1.6-1.7kb 이상의 크기는 증폭되지 않았으며 4CL과 F5H 모두 0.6kb 이하의 단편들만 증폭이 되었다 (그림 4). 이런 현상은 두 가지로 해석될 수 있다. 하나는 total RNA 분리 시 RNA가 분해되었을 경우이며 또 하나는 대상의

4CL과 F5H 유전자들이 극소량이 존재하여 증폭이 거의 되지 않는다는 것을 의미할 수 있다. 이들 증폭된 PCR product를 사용하여 2차 증폭을 수행하였으나 기대되는 4CL과 F5H 유전자들의 증폭은 감지되지 않았지만 크기가 적은 단편들이 대량 증폭되었다.

#### 나) 4CL 와 F5H cDNA probe 확보

상기 그림 4에서 증폭된 다양한 단편들을 pUC18 (T-vector)에 TA cloning을 통하여 클론시킨후 추후 cDNA library에서 full cDNA 선별에 필요한 probe들을 확보하였다 (그림 5).

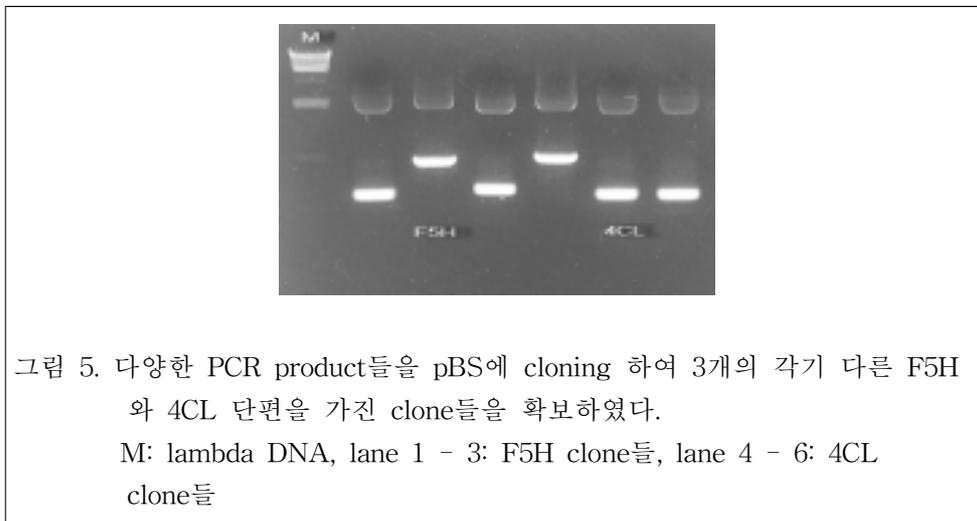
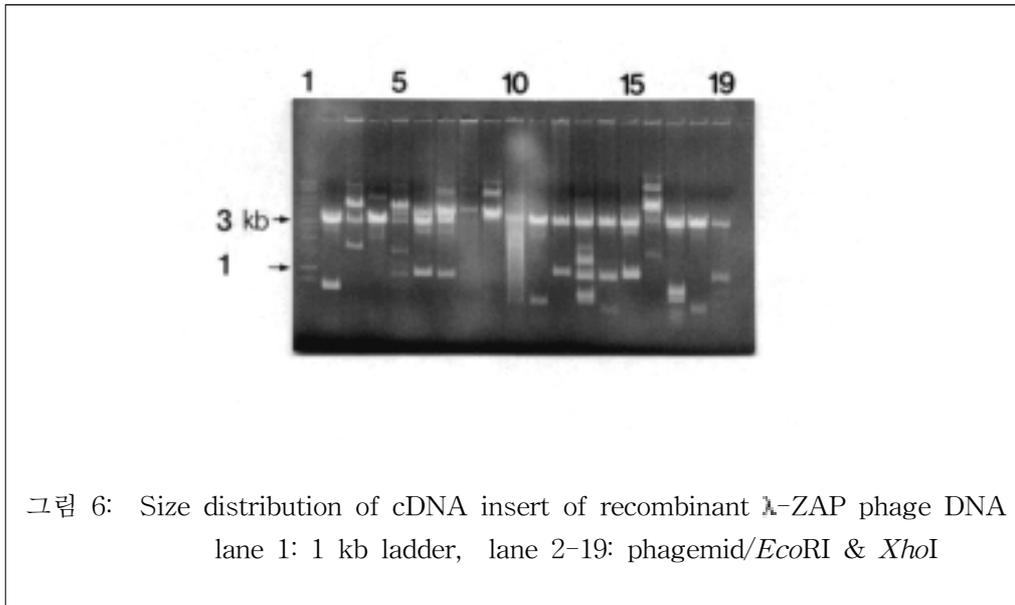


그림 4에서 증폭된 여러 단편 조각을 각각 분리하여 이들을 T-vector에 삽입한 후 BamHI으로 절단하면 삽입된 부위를 분리할 수 있다. 그림 5에서 보는 바와 같이 F5H와 4CL PCR 단편조각을 가진 clone들을 3개씩 확보하여 이들을 probe로 사용하여 cDNA library에서 full cDNA clone 확보를 위해 지속적인 연구를 수행하였다.

#### 나. phage vector에 cDNA library 작성 및 검증

옥수수로부터 분리한 poly(A<sup>+</sup>)RNA에 대한 cDNA library 제조는 ZAP-cDNA Synthesis Kit (Startagene, La Jolla, Calif.)를 이용하여 약간의 실험방법을 변형하여 제조하였다.

재조합 phage vector의 packaging은 Gigapack Gold III packaging kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제조하였다. titering에 의한 cDNA library size를 측정한 결과 전체 size는  $8 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ g of cDNA로 큰 size의 library를 얻었다. 구축된 library내의 재조합 phage들의 최종 titer를 조사한 결과 약  $1 \times 10^8$  pfu/ $\mu$ 로 높은 phage titer를 갖는 cDNA library가 제조되었다. 이런 colony들 중 임의로 18개를 선정하여 LB 액체배지에서 키워 플라스미드를 추출하여 *EcoRI*과 *XhoI*으로 잘라 agarose gel에서 확인하였다 (그림 6).



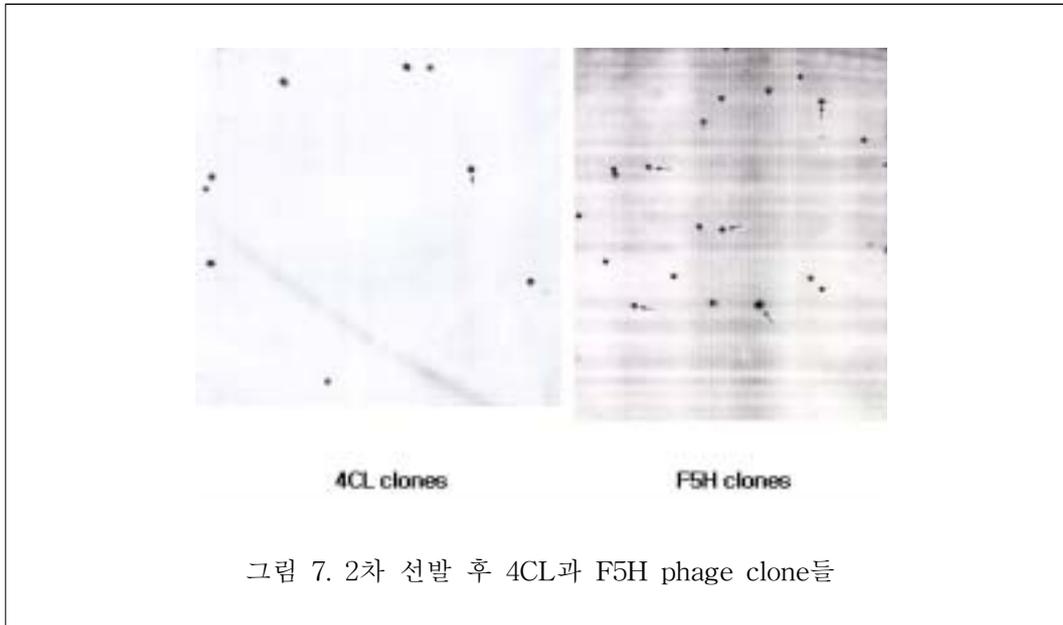
다. 4CL 와 F5H probe를 사용하여 cDNA 선별 및 분석

1년차에서 애기장대의 4CL 유전자와 F5H 유전자 cDNA 염기서열에서 조작된 primer들은 옥수수에서 증폭이 되었으나 예상크기와는 달리 적은 단편들이 증폭되어 1차적으로 이들을 probe로 하여 cDNA library에서 4CL과 F5H 유전자들의 full sequence 발굴을 시도하였다.

#### 1) 옥수수의 full-length 4CL 과 F5H cDNA의 screening

클론된 DNA 단편조각을 probe로 하여 plaque hybridization을 수행한 결과, 1차 screening에서 여러 개의 putative 클론을 얻었으며 2차 screening을 통하여 최종적으로 3종류의 positive clone들을 얻었다 (그림 7). 이차 screening을 위해 phage

titer를 결정한 다음 150 mm plate에 300-500 plaques 들이 형성될 수 있도록 titer를 조절하여 bacteria에 infection 시키고. 그 후 상기 과정과 동일하게 hybridization을 수행하여 autoradiography에 의해 film을 현상한 후 하나의 잘 분리된 positive plaque를 5 종류 picking 하였다.



cDNA library들에서 선발된 클론들을 plasmid pBS-KS에 subclone하여 염기서열을 분석하여 full-length 4CL 과 F5H 유전자를 함유하는 클론의 염기서열과 PCR에 의해 증폭된 유전자들의 염기서열을 비교 분석하였다. 하지만 이들 클론들은 염기서열 분석한 결과 다른 클론으로 판명되었다. cDNA library의 구축은 성공리에 수행되었으나 4CL과 F5H 유전자들의 발현을 여러 차례 시도 하였으나 발굴하지 못하였다. 이는 4CL과 F5H 유전자들의 발현도가 아주 낮아 cDNA library 구축 시 cloning이 되지 않았다는 것으로 판단된다.

2) 옥수수 genomic DNA에서 유전자 증폭 (touch-down 과 long PCR)을 통한 4CL 과 F5H 유전자 발굴

1년차 연구결과에서 4CL과 F5H 유전자들의 발현이 생체 내에서 미미하다고 판단되어 이들 유전자의 발굴을 위해 total genomic DNA에서 직접 이들 유전자의 증폭을 수행하여 유전자 획득을 시도하였다. 먼저 1차년 도에서 조제된 primer

(

**Maize 4CL1 cDNA sequence**

1 atgggttcg tagacggcg gatcgcggtg ccggtgccg cggcggagga gaagcgggtg  
 N-XbaI-4CL-Maize-Start (11), N-BamHI-4CL-Maize-Start (13)

61 gaggagaagg c gatggtgtt ccggtccaag cttcccgaca tcgagatcga cagcagcatg  
 121 gcgctgcaca cctactgctt cgggaagatg ggcgagggtg cggagcgggc gtgcctgac  
 181 gacgggctga cgggcgcgct gtacacgtac gcggaggtgg agtccctgtc ccggcgcgcc  
 241 gcgtcggggc tgcgcgcat gggggtgggc aaggcgcgac tggatgag cctgctccg  
 301 aactgcccc agttgcctt caccttctg ggcgccccc gcctgggcgc cgcaccacc  
 N301-m4clR (17)

361 acggccaacc cgttctacac cccgcagag gtgcaccgcc aggcggaggc ggccggcgcc  
 421 cggtcatcg tgaccgaggc ctgcgccgtg gagaaggtg gggagtgc ggccggagcgg  
 481 ggcatcccc tggatccgt cgacgggcgc ttcgacgct gcgtggatt cccgagctg  
 541 atcgggccc aggagctgga ggctgacgc gacatccacc ccgacgact cgtcgcctg  
 601 ccctactct ccggcaccac cggtgccc aaggcgtca tgctacca ccgagcct  
 P1 (15)

661 atcaccagc tcgcgagca ggtgatggc gagaaccga acctgtact ccgaaggac  
 721 gacgtgtgc tgtgctgtt gccgctgtt cacatctact cgtgaactc ggtgctgctg  
 781 gccggcctg gcgcggtc caccatcgt atcatgcga agttcgacct gggcgcgctg  
 841 gttgacctg tgcgagta cgtgatcacc atcgcgcct tcgtccgcc catcgtggtg  
 901 gagatccca agagccccg cgtgaccgc ggcgacctc cgtccatcc catggtcatg  
 961 tccggcggc cgccatggg caaggagctc caggacgct tcatggcaa gatcccaat  
 1021 gccgtgctg ggcaggggta cgggatgacg gaggcaggcc ccgtgctggc gatgctcctg  
 1081 gccttgcca aggagccgta cccggtcaag tccgggtgt gcggcaccgt ggtcgggac  
 1141 gcggagctga agatctcga cccgacacc ggcgcgcccc tcggccgga ccagccggc  
 1201 gagatctca tccggggga gcagatcatg aaaggttacc tgaacgacc cgagtcgac  
 P2 (16)

1261 aagaacacca tcgaccagga cggctggctg cacaccggcg acatcggcta cgtggagc  
 1321 gacgacgaga tttcatcgt cgacaggctc aaggatca tcaagtaca gggcttcag  
 1381 gtcccggc cggagctgga ggcgctctc atcacgacc cggagatca gacgccc  
 1441 gtcgtca tgaacgaca ccttctggt gaatccccg tcgcttcat cgtcggacc  
 C1441-m4clF (18)

1501 gaaggttctc aagtcaccga ggatgagatc aagcaattc tcgccaagga ggtgtttt  
 1561 tacaagaaga tccacaagt cttctacc gaatcatcc ccaagaacc gtcgggcaag  
 1621 atcctgagga aggactgag agccaggctc gcccgggtg ttcactga  
 N-XbaI-4CL-Maize-STOP (12), N-BamHI-4CL-Maize-STOP (14)

그림 8. 옥수수 4CL cDNA의 조제된 primer 염기서열과 위치

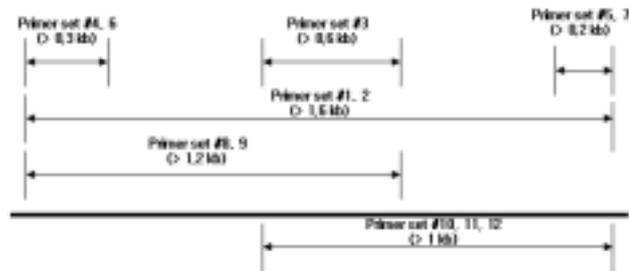
그림 2)와 더불어 15종이상의 primer들을 조제하여 full sequence의 증폭을 시도하였다 (그림 8).

가. 4CL 유전자의 증폭

먼저 그림 8 에서 기술된 염기서열을 토대로 하여 primer들을 제작한 후 표2와 같이 다양한 primer set를 사용하여 먼저 RT-PCR에 의한 cDNA와 genomic DNA 증폭에 사용하였다. 현재 옥수수에서는 4CL과 F5H cDNA에서만 분리하여 염기서열이 결정되었으며 genomic DNA에서는 염기서열 분석이 국내외에서 전무한 상태에서 표2에서의 예상증폭 크기는 모두 cDNA를 기초로 하였다.

SET No	Primer for 4CL		SET No	Primer for 4CL		SET No	Primer for 4CL	
	Primer set	예상증폭 크기		Primer set	예상증폭 크기		Primer set	예상증폭 크기
1	11, 12	> 1.6 kb	5	12, 18	> 0.2	9	13, 16	> 1.2
2	13, 14	> 1.6	6	13, 17	> 0.3	10	12, 13	> 1.6
3	15, 16	> 0.6	7	14, 18	> 0.2	11	12, 15	> 1
4	11, 17	> 0.3	8	11, 16	> 1.2	12	14, 15	> 1

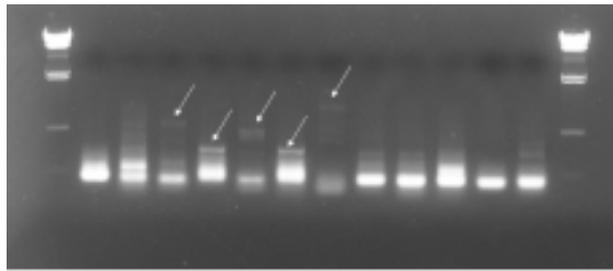
표2. 4CL 유전자의 primer set 번호와 PCR 증폭을 통한 예상크기. Primer 위치는 그림 8에서 참조.



옥수수 4CL cDNA (1.6kb) 와 primer set들 사용한 예상 증폭크기

그림 9. 옥수수 4CL 유전자들의 primer set 위치 및 예상증폭크기

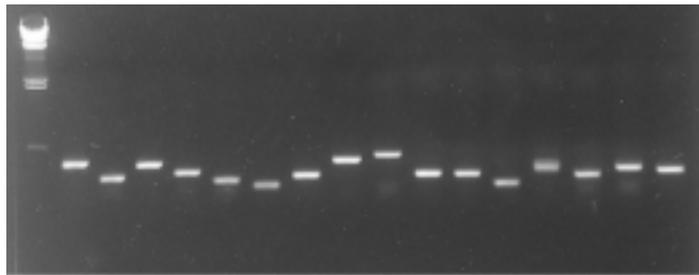
상기의 4CL primer set들에 의해 증폭되는 DNA 크기는 표1에서와 같이 0.3 kb 에서 1.6 kb 이상의 정도의 다양한 크기의 증폭을 기대하였다. 초기에는 genomic DNA에서 일반적인 PCR 증폭방법을 사용하여 시도하였으나 증폭이 되지 않아 여러 가지 PCR의 다양한 기법을 도입하여 증폭을 유도하였다. 특히 touch-down PCR 즉 annealing 온도를 72℃에서 58℃로 점차 하향시킨 후 (10cycle) 이후 정상적인 PCR cycle (94℃에서 30초, 58℃에서 30초 그리고 72℃에서 1분)로 20 cycle을 수행한바 기대되는 크기는 아니지만 작은 크기의 PCR 증폭을 획득할 수 있었다 (그림 10).



PCR amplification with 12 primer sets

그림 10. 옥수수 genomic DNA를 사용하여 표2에 있는 primer set (1부터 12까지)를 사용하여 touch-down을 시도한바 예상크기 보다 적지만 DNA가 증폭이 가능하였다.

왼쪽에서 lane1:  $\lambda$  DNA, lane2: set #1, Lane 3: set #2, lane4: set #3, lane5: set #4, lane6: set #5, lane7: set #6, lane8: set #7, lane9: set #8, lane10: set #9, lane11: set #10, lane12: set #11, lane13: set #12, lane 14:  $\lambda$  DNA



다양한 4CL PCR 단편을 가지고 있는 clone 들의 확보

그림 11. TA cloning 기법을 사용한 다양한 크기의 4CL 유전자 PCR 단편을 가지고 있는 clone들. lane1:  $\lambda$  DNA, lane 2 - 17, clone from 4CL DNA 단편

옥수수 genomic DNA에서 그림 10에서 보면 lane #4 (set #3)와 lane #8 (set #7)의 예상크기는 1.6kb 과 0.2kb 이상이지만 lane 4의 경우 0.6kb와 lane 8의 경우 약 1kb정도가 증폭되었으며 다른 primer set들은 모두 0.5kb 이하의 크기가 증폭되었다. 기대되는 DNA 증폭은 이루어지 않았지만 이들을 대상으로 일차적으로 이들 단편을 TA cloning 기법을 사용하여 clone 들을 확보하여 보유하고 있다 (그림 11).

이들 증폭된 크기들이 기대되는 4CL유전자라고 하기에는 거리가 있다고 판단되

었다. 하지만 genomic DNA에서 어느 정도의 증폭이 가능함에 따라 3종류의 옥수수  
를 대상으로 4CL과 F5H 유전자를 증폭하기 위해서 touch-down PCR을 비롯한 다  
양한 방법의 PCR을 시도하였다. 즉 primer 농도조절과 PCR duration 및 PCR  
temperature들을 조정하여 증폭한바 본 연구진이 예상한 크기를 획득할 수 있었다  
(그림 12 와 13).

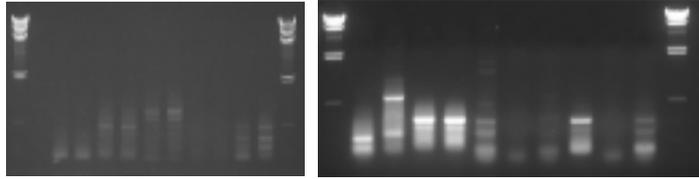


그림12: 4CL primer를 10개를 사용한 일반 PCR 과 touch-down PCR  
증폭양상의 비교. Touch-Down PCR은 일반 PCR에 비해 size가 보다  
긴 DNA 증폭을 보여주고 있다.

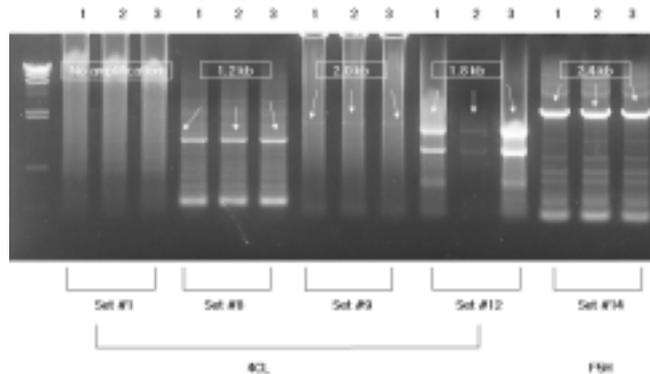
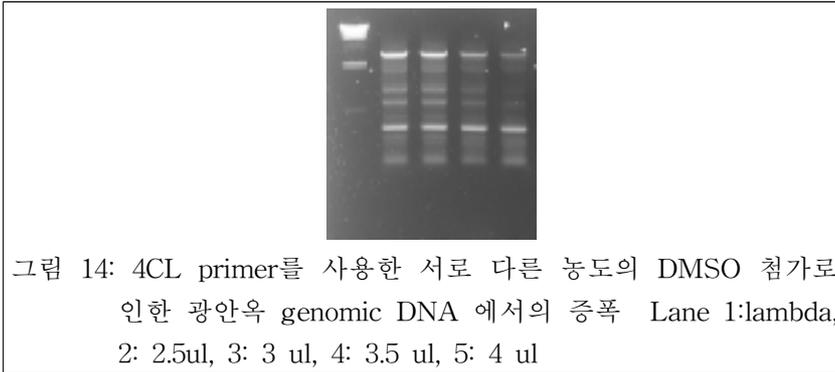


그림 13. 옥수수의 genomic DNA를 다양한 4CL primer set를 사용하여 증폭.  
1: 익산/탐라; 2: 수원; 3: 파이오니어 옥수수.  
set #1, 8, 9, 12 primer들은 그림 9와 표1 참조

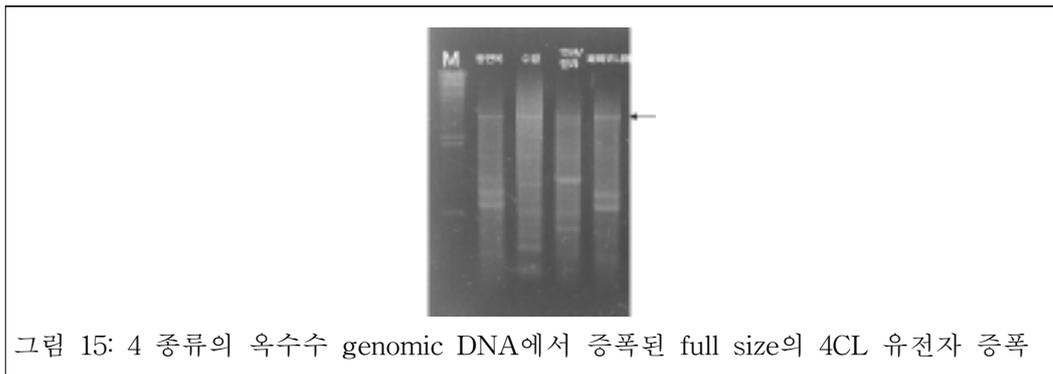
그림12에서 보는 바와 같이 3품종의 (익산/탐라, 수원, 파이오니어)에서 증폭되는  
band들은 같은 크기로 나타났다. 이는 품종에 따라서 4CL 유전자 크기가 거의 일  
치한다는 것을 의미한다고 판단된다. 또한 서로 다른 primer set들을 사용하여 (표  
2 참조) 증폭한 결과 primer들에 따라서 1.2 kb 정도에서 2.4 kb 정도로 PCR band  
들이 나타났으며 primer set들 즉 그림 9와 표1에서 보는 바와 같이 이들의 예상크  
기와 상당히 일치하거나 큰 DNA가 증폭된 것이 확인되었다. 즉 사용된 template  
DNA들은 cDNA가 아니라 genomic DNA를 대상으로 하기 때문에 증폭되는 PCR  
band들은 크기가 큰 것이 확인되었으며 이들의 유전자가 intron을 포함하고 있다는

것이 추측이 된다.

기대되는 genomic DNA의 4CL full sequence의 증폭을 획득하기 위해서 long PCR 기법을 채택하여 사용하였다. 특히 다양한 DMSO 농도를 PCR reaction에 첨가함으로 인해 genomic DNA의 denaturation을 향상시킴과 동시에 primer의 binding을 촉진시키는 효과를 일으켜 genomic DNA에서 3kb 이상의 full 4CL 유전의 증폭을 성공적으로 획득할 수 있었다 (그림14).



또한 일반적으로 long PCR protocol은 proof reading 기능이 있는 Taq polymerase (예: pfu) 와 일반 Taq polymerase가 동시에 사용함으로써 가능하나 본 연구에서 일반 Taq polymerase로 3-4kb 이상의 DNA 까지도 문제없이 증폭할 수 있다는 결과를 획득했다. 상기의 개발된 long PCR protocol을 사용하여 다양한 옥수수에 증폭을 시도하여 4품종의 옥수수에서 기대되는 완전한 유전자들을 증폭하였다 (그림 15).



#### 나. F5H 유전자의 증폭

본 연구에서 long PCR을 통한 4CL 유전자의 증폭을 성공리에 수행한 바 이들의 protocol을 사용하여 옥수수의 리그닌 합성에 관계되는 같은 방법으로 F5H 유전자의 증폭 및 분리를 수행하였다. 옥수수과 애기장대에서 F5H 유전자의 cDNA 염기 서열이 결정되었는바 이들 서열을 토대로 하여 start 와 stop condon 영역을 중심으로 하여 다양한 PCR primer를 아래와 같이 작성하여 PCR 증폭에 사용하였다 (그림 16과 17, 표3).

6개의 각기 다른 primer를 사용하여 상기와 같은 방법으로 증폭을 한바 genomic DNA에서 F5H의 크기는 약 2.1 - 2.4 kb 정도의 크기를 확보하였다 (그림 18). 또한 genomic DNA를 template DNA를 사용하였기 때문에 기존의 옥수수의 cDNA 크기 (약 1.7kb)와 비교 해볼 때 크기가 0.5에서 0.7kb 정도가 큰 것으로 나타났으며 이는 이들 유전자내에 intron이 삽입되어 크기가 큰 것으로 판단된다. 또한 옥수수의 품종마다 크기가 다른 2개의 PCR band들이 증폭되었다. 특히 수원은 두 개의 band가 동시에 증폭되었으며 익산/탐라와 파이오니어의 경우는 크기가 다른 band들의 각각 나타났다 (그림 18).

1 cagtcactct actactcgat ggaaccagca acatgggctg tttcctcg cattgccctc  
**N-BamHI-CYP92A1-Start (1), C-XbaI-CYP92A1-Start (2), N-BamHI-CYP92A1-5UTR-START (3), 5'rUTR-CYP92A1 (4)**  
61 tggcagcgg cagcgctct ccttcgcg ggcggcgcc cggctacaa cccccgcg  
121 ggccccaagc catggccgat catcggaac ctaacctca tggcgagct gccccaccg  
181 tccatgaac agctgtcaa gcggtacgt cgcctcatgc agctccggt cgggtcgtg  
241 cctgttctc tggcgcgtc ggtgagatg gcaaagctct tctcaagac caacgacgc  
301 gcgttctcg accggccgag gttcgcaatc ggcaagtaca ccggtacga cttctccgac  
361 ctctatggg ctcttccgg gccgtacct gcccaggcac gcaggatctg cggcaccgag  
421 ctctcagcg ccacggcgtc cgagtcctc gagcacatcc gcgacgagga ggtgcgctg  
481 atgtcggac agctgcgcca agcggctggg cgcaccgtgc ggctcagga ctacctcag  
541 atgttggcg tcggcgtgat ctgcgcata gttctggca ataagtact catggaggag  
601 gtggcggag gtgaggggga ctacgcgcg gcgataacgc ctgccgagt caggagatg  
661 gtggcaggt tcttcgctc tcacggctg ttaacattg gtgattacat ccttggcta  
721 gattggctg accctcagg ctacgttct aggatgaaga gaatgaagg gaggttgg  
781 cgattctgg aacgagtct ggacgtcac aacgagcgg gactacgca gggagggaa  
841 ttgtggcaa aggatattt ggacgtcgt ctgcagctg ccgatgacac tagtctgaa  
901 gtccagctca gcagggaca tgtaaggct atcacacag acctaatac cgcaggcac  
961 gatagtaat caaacagct ggagtggtc gtcctggag tcctcaagaa ccctaagat  
1021 ttagccaag ccaatggagg gctgaacct gcatagggc cggaccgact ggtgacggaa  
1081 agcgaacct ctgcctccc ctacatcag gctgtgctc aggagacct gcgctgcac  
1141 cctgccgcg cgatgctgg accccacgtg gcccgcgag acacatcct ggacggatac  
1201 gacgtgctg ctggcaggt cttgttcat aacgtgtgg caatcggccg cgaccctgga  
1261 ctgtgggac gcgccgagga gttccggcc gagcggctg tcgagagca gatcgactg  
1321 aggggcatg actccagct gctgccgtc ggctcggcc ggcgaatgt ccccgggatc  
1381 aacctcgcg taaaggtgat ggcttgagt ctgccaatc tgctacacg cttcagtg  
1441 aggtctccg acggcgtgac ggcagaggag ctgagcatg atgagccct caagctcgc  
1501 gtaccgcta aattcccct catggtcgt gccgagcca ggttgcagc **tcgctgtat**  
1561 **actggcgtt** gatcccga cgtgtctcg gttgtgca tgcgtgagt atgacatg  
**N-BamHI-CYP92A1-NONSTOP (5), C-XbaI-CYP92A1-STOP (6)**  
1621 atttcagct ctggaactt tgtttaata aacacaaat atatgtta tttgtgtaa  
1681 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa a

그림 16. 옥수수 F5H (ferulic-5-hydroxylase homologous) 염기서열 과 사용된 primer 부위.

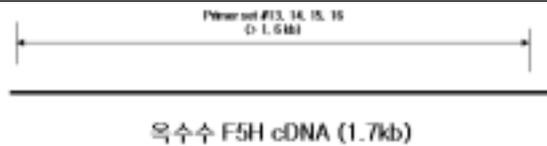
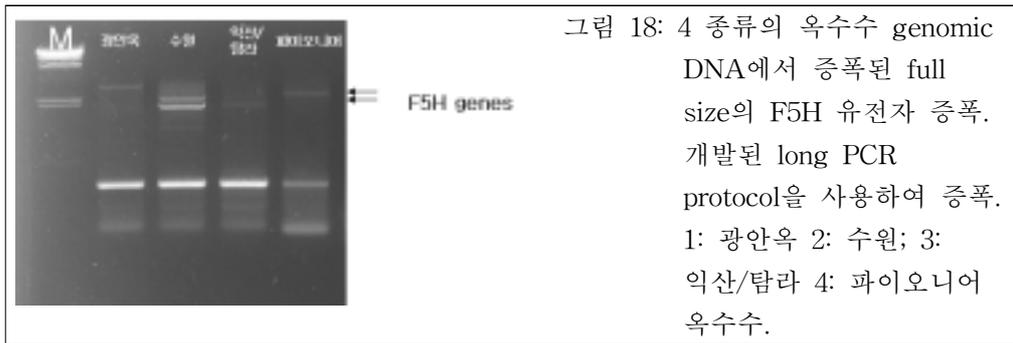


그림 17: 옥수수 F5H 유전자들의 primer set 위치 및 예상증폭크기

SET No	Primer for F5H	
	Primer set	예상증폭 크기
13	4, 8	> 1.6 kb
14	4, 5	> 1.6
15	5, 6	> 1.6
16	7, 6	> 1.6

표 3. F5H 유전자의 Primer set 번호와 PCR 증폭을 통한 예상크기. Primer 위치는 그림 8에서 참조.



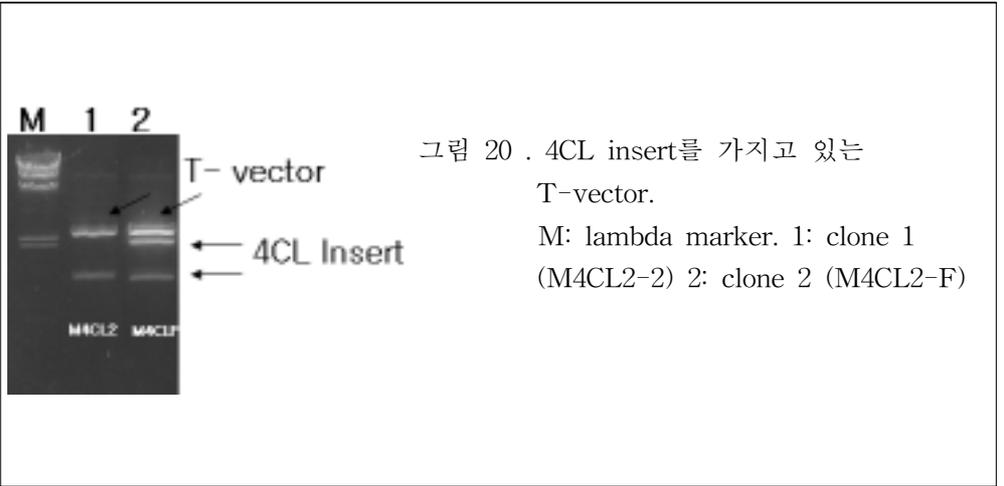
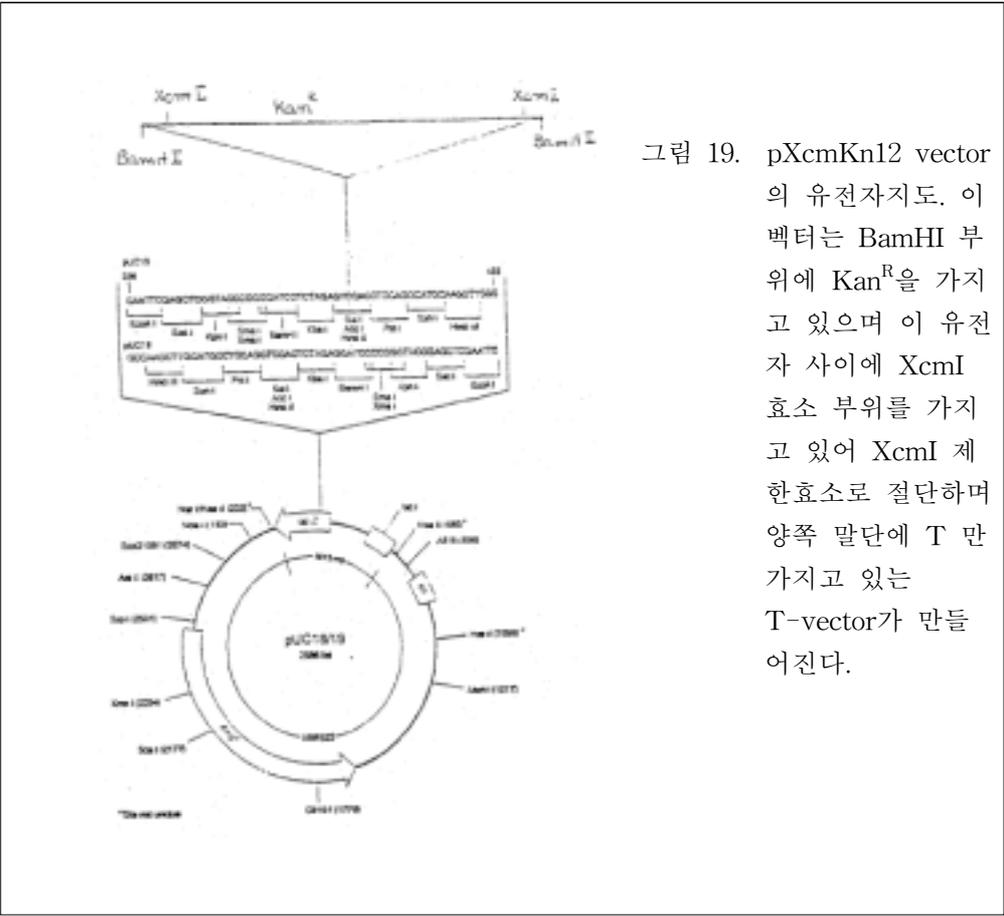
### 3. 4CL 과 F5H PCR 산물들의 cloning 및 염기서열분석

#### 가. 4CL 과 F5H PCR 산물들의 cloning

##### 1). 4CL PCR 산물의 cloning

PCR product 산물들을 cloning 하기 위하여 다양한 방법을 사용하여 시도하였으며 가장 적절한 방법은 TA cloning으로서 이 기법을 채택하여 본 연구를 계속적으로 수행하였다. 먼저 4CL 유전자는 3.5 kb 이상의 PCR product로서 pXcmKn12 (PUC 18/19 back bone)을 가지고 있는 T-vector에 cloning 하였다 (그림 19). XcmI 제한효소로 처리한 pXcmKn12 T-vector를 PCR 산물들과 ligation 하여 clone 을 획득하였다. PCR primer들은 양쪽 말단에 각각 BamHI 제한효소 절단부위를 가지고 있어 T-vector에 삽입 후 BamHI을 절단하여 삽입된 DNA를 확인할 수 있었다 (그림 20).

그림 20에서 보는 바와 같이 clone 1은 primer set #8 (표1) 과 clone 2는 primer set #2 (표1)에서 증폭된 PCR product를 T-vector에 clone 시켰다. Clone 2 (M4CL2-F)의 경우는 벡터를 제외한 2개의 band가 나타난 것으로 보아 내부에 BamHI 제한효소 부위가 있는 것으로 판단할 수 있다.



## 2). F5H PCR 산물들의 cloning

F5H primer들을 사용하여 long PCR을 수행한 결과 2.0kb 와 2.4kb의 2개의 band들이 수원 19호에는 동시에 나타났으며 또 다른 옥수수 품종에서는 각각 하나의 크기에 상당하는 band 들이 증폭되었다 (그림 18). 특이한 점은 이들 증폭된 유전자의 크기가 품종에 관계없이 일치하고 있다는 것이 관찰되었다. 이들 band들 모두가 F5H 유전자인지 아니면 두 개의 크기가 다른 F5H 유전자가 존재하고 있는지를 확인하기 위하여 수원19호의 두 개의 PCR 산물들을 대상으로 모두 T-vector에 삽입하여 클로닝 시켰다. 증폭에 사용된 primer들은 양쪽 말단에 각기 BamHI 부위를 가지고 있어 clone 후 이들 BamHI 제한효소로 절단하여 예상되는 DNA 크기가 삽입되어 있어 이들 clone들의 염기서열을 확인하였다 (그림 21).

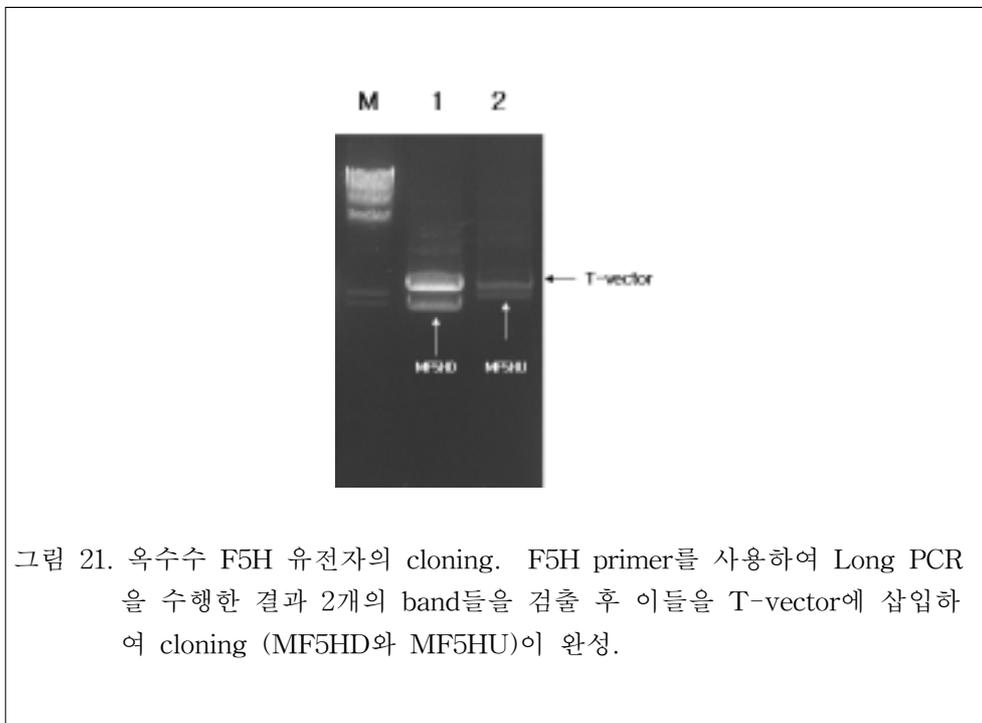
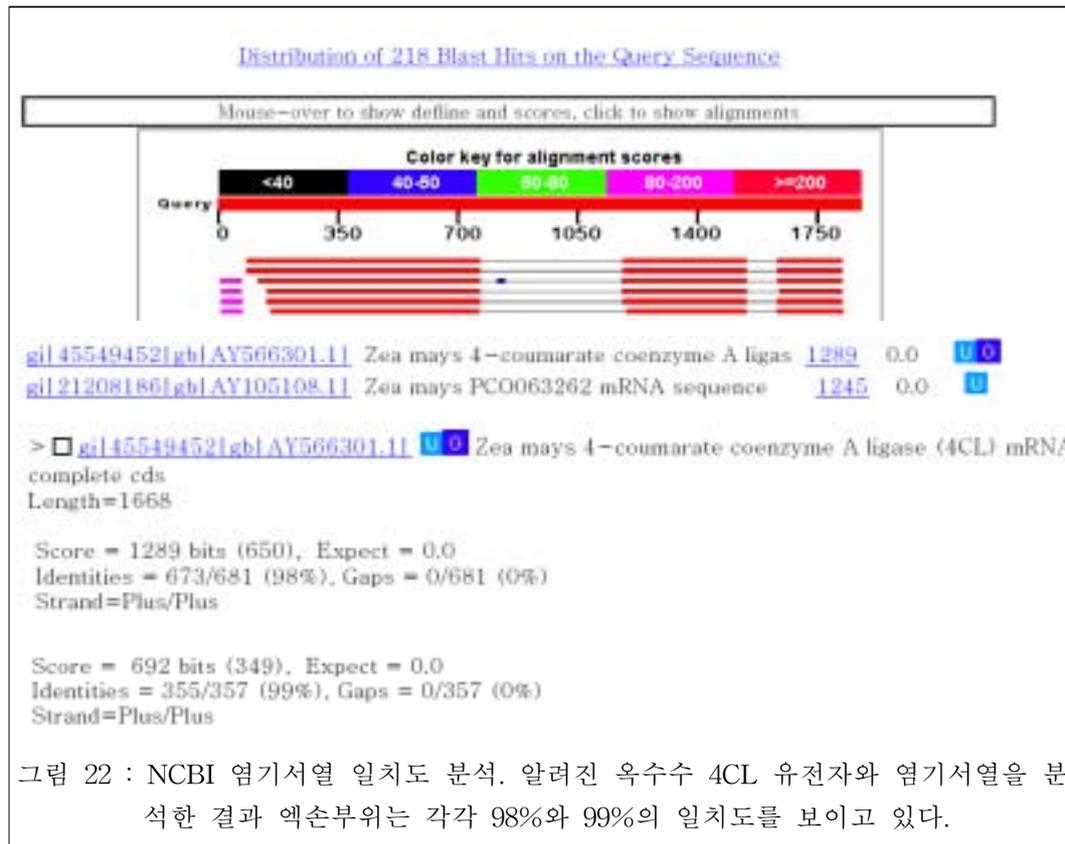


그림 21. 옥수수 F5H 유전자의 cloning. F5H primer를 사용하여 Long PCR을 수행한 결과 2개의 band들을 검출 후 이들을 T-vector에 삽입하여 cloning (MF5HD와 MF5HU)이 완성.

나. 4CL 유전자의 염기서열 분석

1) 4CL 클론 (M4CL2 와 M4CL-F)의 염기서열 분석

4CL PCR 산물 중 primer set #8 and #2 (그림 20) 를 사용하여 증폭된 산물을 상기의 TA cloning 에 의해서 clone이 완성되어 염기서열 분석을 완료하였다. M4CL2는 5'부터 약 800 bp들이 clone이 되어 있으며 M4CL2F는 full sequence가 clone이 되어 있는 것을 확인하였다. NCBI 염기서열을 분석한바 옥수수 4CL 유전자와 거의 일치 하는 것을 확인하였다 (그림 22). 5'부터 1.8 Kb의 염기서열을 분석한바 98% (그림 22) 이상의 알려진 옥수수의 cDNA와 염기서열이 일치하는 것을 확인하였으며 2개의 intron들이 삽입된 것이 확인되었다. 이들 인트론들은 각기 412 와 93 염기를 가지고 있으며 각각 5'부터 766 염기와 1536 염기에서 삽입되어 있는 것이 확인되었다 (그림 23).



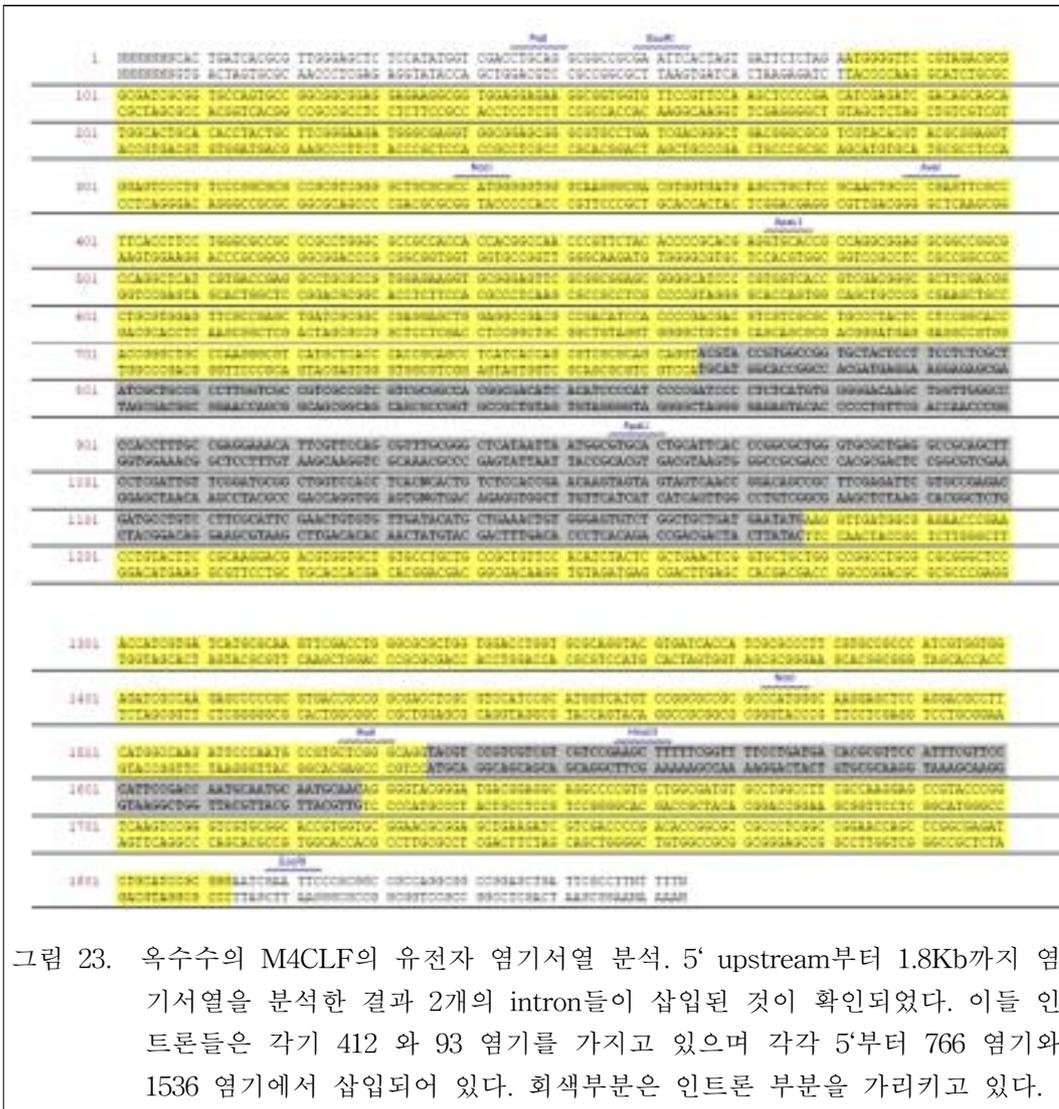


그림 23. 옥수수의 M4CLF의 유전자 염기서열 분석. 5' upstream부터 1.8Kb까지 염기서열을 분석한 결과 2개의 intron들이 삽입된 것이 확인되었다. 이들 인트론들은 각기 412 와 93 염기를 가지고 있으며 각각 5'부터 766 염기와 1536 염기에서 삽입되어 있다. 회색부분은 인트론 부분을 가리키고 있다.

애기장대와 옥수수에서 리그닌 관련 4CL 유전자의 염기서열이 밝혀져 있지만 genomic 수준에서 국내외를 막론하고 발표된 바가 없으며 본 연구에서 최초로 밝혀졌다. RNA 수준이 아닌 genomic 수준에서 밝혀짐으로 인해 intron splicing 기작과 더불어 식물자체의 인트론을 가지고 있는 RNAi vector를 직접조제 할 수 있는 장점이 있다. 본 연구진들은 식물자체의 intron을 RNAi vector 제작에 사용하며 보다 효율적인 gene silencing이 가능하다고 판단하였다. 따라서 genomic 수준의 염기서열 분석을 통해 향후 여러 가지 방향으로 연구를 수행할 수 있다고 사료된다.

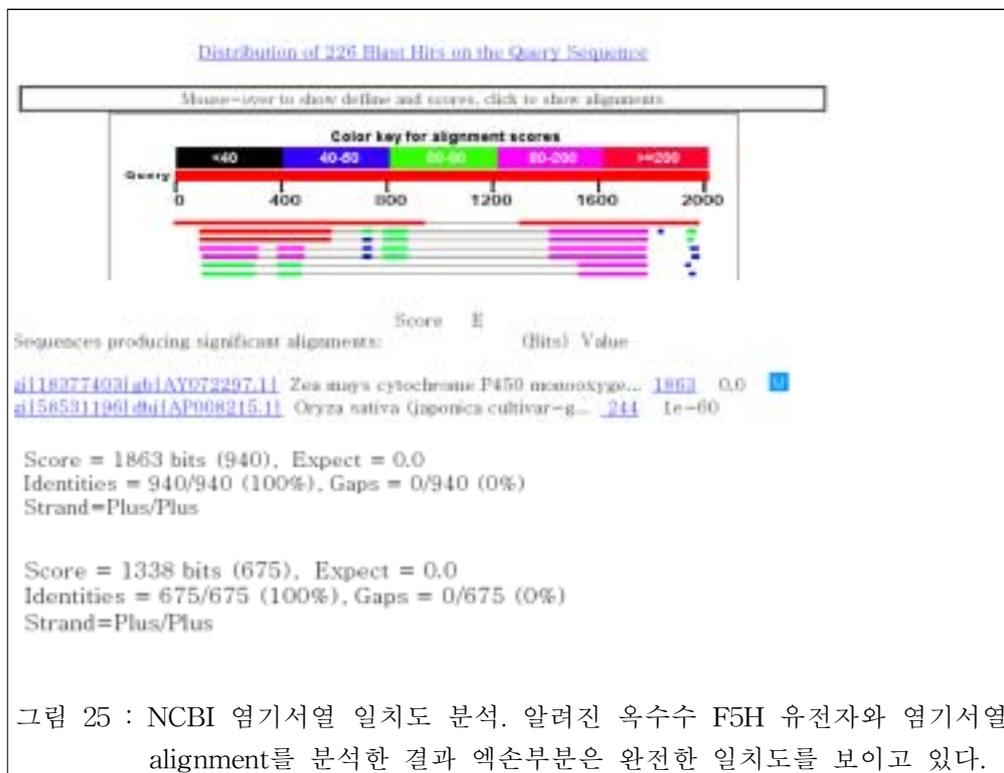
2) F5H 클론들 (MF5HU 와 MF5HD) 의 염기서열 분석



그림 24. 옥수수의 MF5HD의 유전자 염기서열 분석. PCR 클론의 염기서열을 분석한 결과 1개의 intron들이 삽입된 것이 확인되었다. 이들 인트론들은 각기 35염기를 가지고 있으며 5'부터 940 염기에 삽입되어 있다. 회색부분은 인트론 부분을 가리키고 있다.

클론된 2개의 F5H 유전자를 분석한 결과 2.4kb 정도의 F5H 클론 (MF5HU)은 유사한 primer 부위를 가지고 있는 다른 유전자로 염기서열 결정 후 판명이 났다. 나머지 clone (MF5HD)의 염기서열을 분석한 결과 옥수수의 F5H 유전자로 판명이 났다. 기존의 F5H 유전자의 염기일치도와 완전히 일치하는 것을 확인 하였으며 특이한 것은 1개의 인트론으로만 구분되어 있는 것이 확인되었다 (그림 24 와 25). 이

들 인트론은 355개의 염기를 가지고 있으며 940 염기에서 삽입되어 있는 것이 확인되었다 (그림 25).



4CL 유전자와 마찬가지로 F5H 유전자도 옥수수에서 염기서열이 밝혀져 있지만 genomic 수준에서 국내외를 막론하고 밝혀진 바가 없고 본 연구에서 확인되어 성격 규명 되었다. 따라서 4CL clone과 더불어 antisense vector 조제뿐만 아니라 식물자체의 intron을 가지고 있는 RNAi vector까지 조제 할 수 있는 기본적인 향후 연구토대는 구축하였다고 판단된다.

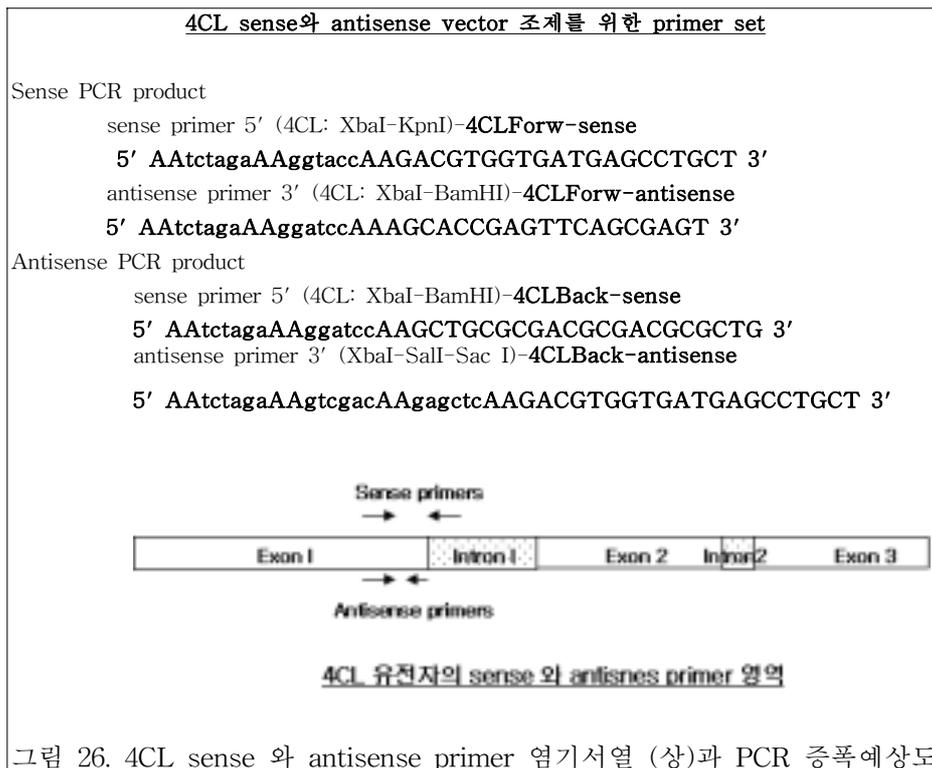
4. 4CL 과 F5H sense and antisense RNA vector 조제

옥수수에서 4CL과 F5H 유전자 성공적인 분리와 성격규명을 통하여 리그닌 관련유전자를 확인 한 후 이들 유전자를 사용하여 antisense RNA vector 구축을 수행하였다.

가. 4CL 과 F5H sense and antisense RNA vector 조제 및 cloning

1) 4CL antisense PCR 증폭 과 PCR cloning

Genomic 수준에서 염기서열 분석 후 이를 토대로 하여 4CL 유전자의 1번째 인트론을 중심으로 하여 sense 와 antisense primer들을 조제하였다 (그림 26). 이들 primer들은 binary vector에 삽입이 용이하게 하기 위하여 말단에 각기 다른 제한효소부위를 가지고 조제하였다.



4CL sense 와 antisense primer들을 사용하여 다양한 방법의 PCR을 수행한 결과, 예상하는 4CL sense (600 bases) 와 antisense PCR product (350 bases)를 획득하였다 (그림 27). Template DNA는 클론이 확인된 M4CLF를 사용하여 증폭하였다. 이들 증폭된 PCR 산물들은 pBS-KS vector에 삽입하여 추후 binary vector에 삽입에 사용되었다.

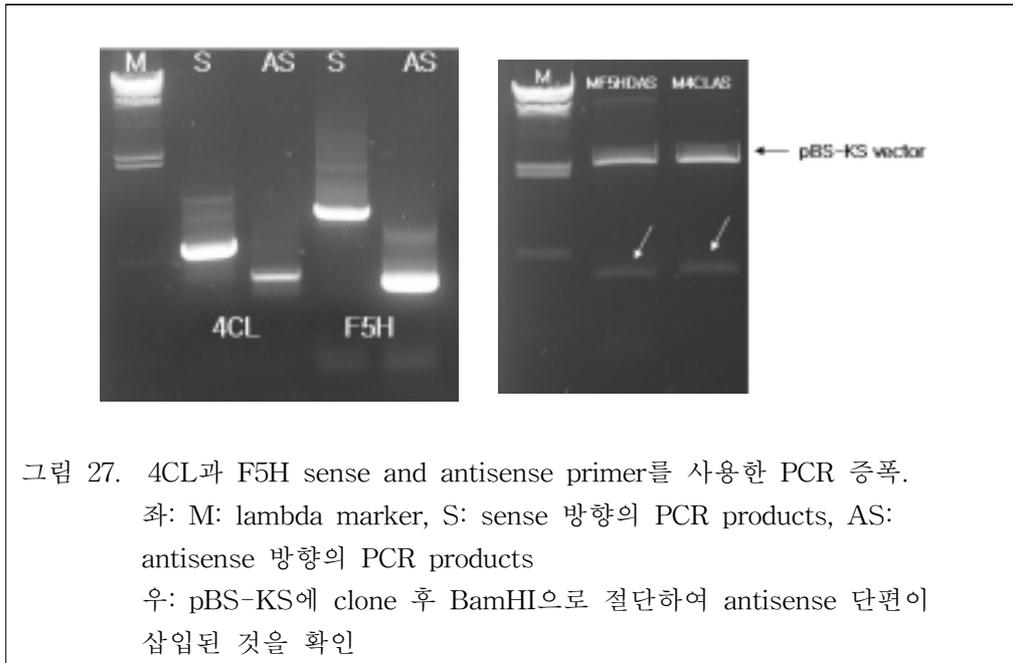


그림 27. 4CL과 F5H sense and antisense primer를 사용한 PCR 증폭.  
 좌: M: lambda marker, S: sense 방향의 PCR products, AS: antisense 방향의 PCR products  
 우: pBS-KS에 clone 후 BamHI으로 절단하여 antisense 단편이 삽입된 것을 확인

## 2) F5H antisense PCR 증폭 과 PCR cloning

4CL 유전자와 마찬가지로 1번째 인트론을 중심으로 하여 sense 와 antisense primer들을 조제하였다 (그림 28). 하지만 증폭되는 PCR들의 크기는 4CL 과 혼돈을 피하기 위해 약간 크게 조제하였다. 즉 예상되는 증폭크기는 sense는 800 bases 들과 antisense는 400 base들로 조제하여 증폭하였다.

**F5H sense 와 antisense 벡터조제를 위한 primer sets**

Sense PCR product

sense primer 5' (F5H: XbaI-KpnI)-**F5HForw-sense**

5' AAtctagaAAggtaccAACGTGATCTCGGCATAGTTC 3'

antisense primer 3' (4CL: XbaI-BamHI)-**F5HForw-antisense**

5' AAtctagaAAggtaccAACATGGTTCAGCTCCTCCATG 3'

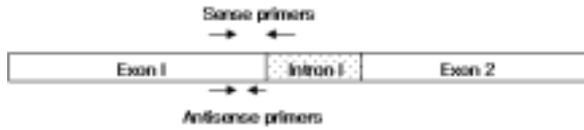
Antisense PCR product

sense primer 5' (4CL: XbaI-BamHI)-**F5HBack-sense**

5' AAtctagaAAggtaccAAttgtccctgctgagctggac 3'

antisense primer 3' (XbaI-SalI-Sac I)-**F5HBack-antisense**

5' AAtctagaAA**gtcgacAA**gagctcAACGTGATCTCGGCATAGTTC 3'



**F5H 유전자의 sense 와 antisense primer 영역**

그림 28. F5H 유전자의 sense 와 antisense primer 염기서열과 증폭모식도

4CL과 마찬가지로 F5H 유전자의 증폭은 클론된 MF5HD 유전자를 template DNA로 하여 그림 28에서 보는바와 같이 sense 와 antisense primer 사용하여 다양한 방법의 PCR을 수행한 결과, 예상하는 F5H 유전자의 sense 와 antisense PCR product를 획득하였으며 이들 PCR 산물들을 pBS-KS에 clone 하여 확인하였다 (그림 27).

2. Binary Antisense RNA vector의 조제

클로닝 된 4CL antisense (M4CL2AS)와 F5H antisense (MF5HDAS)들을 대장균 세포들을 LB/amp 배지에서 증식시켜 세포들을 회수한 다음 alkaline lysis 방법에 의해 DNA를 추출, 확보하여 식물용 vector에 클로닝을 위해 사용하였다. pCAMBIA vector (1300)은 T-DNA border 내에 hygromycin 항생제 저항성을 가지고 있으며 반대방향으로 LacZ 유전자를 가지고 있어 blue-white 선발이 용이하게 구축되어 있는 벡터이다 (그림 29).

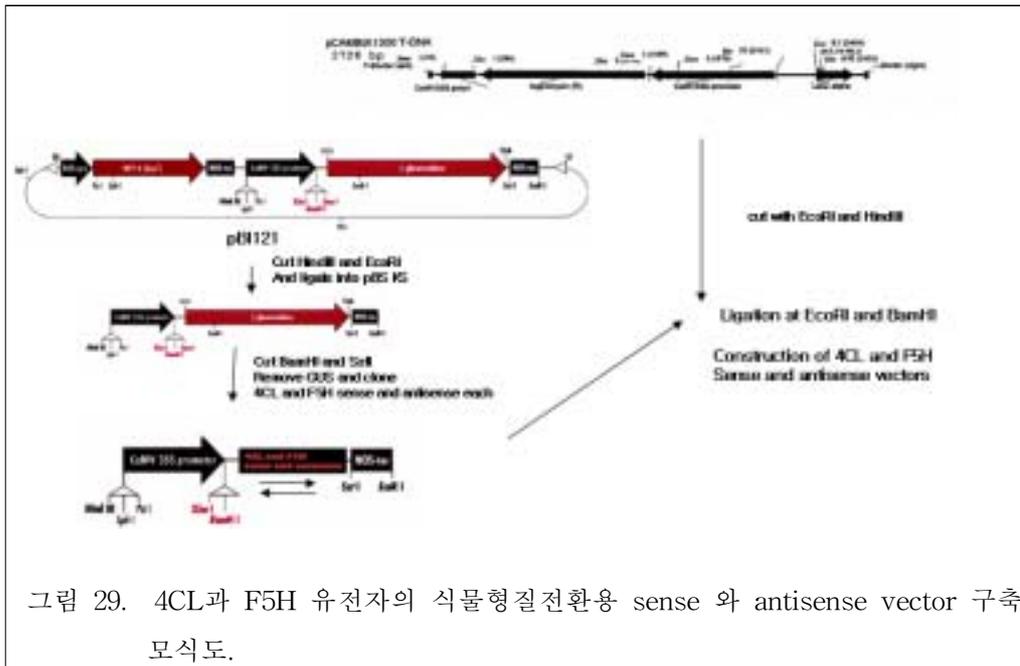


그림 29. 4CL과 F5H 유전자의 식물형질전환용 sense 와 antisense vector 구축 모식도.

클로닝은 그림 29에서 보는 바와 같이 pBI121에서 HindIII와 EcoRI으로 절단하여 Promoter와 Gus 그리고 terminator가 있는 영역을 pBS-KS vector에 같은 제한 효소로 절단하여 삽입하여 확인하였다. 이들 벡터는 다시 BamHI과 SacI (SstI) 효소로 절단하여 GUS 구조유전자를 제거한 후 이부위에 clone된 4CL과 F5H antisense를 같은 효소 BamHI 과 SacI (SstI)으로 절단하여 각각 삽입하여 확인하였다. 확인 후 이 벡터는 HindIII 와 EcoRI으로 절단하여 insert를 추출한 후 같은 효소들로 pCambia1300을 절단한 벡터에 이들 insert를 ligation 시켜 확인하였다. 이들 2종류의 binary vector들은 옥수수의 4CL 과 F5H antisense가 삽입된 벡터들로서 각각 pM4CL2AS과 pMF5HDAS로 명칭하였다. 이들 binary vector들은 각각 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환시켜 옥수수에서 형질전환을 유도하도록 구축하였다.

## 제 2 절 제1 협동과제

최종목표: 옥수수 기내배양과 antisense vector를 사용한 형질전환체계의 개발

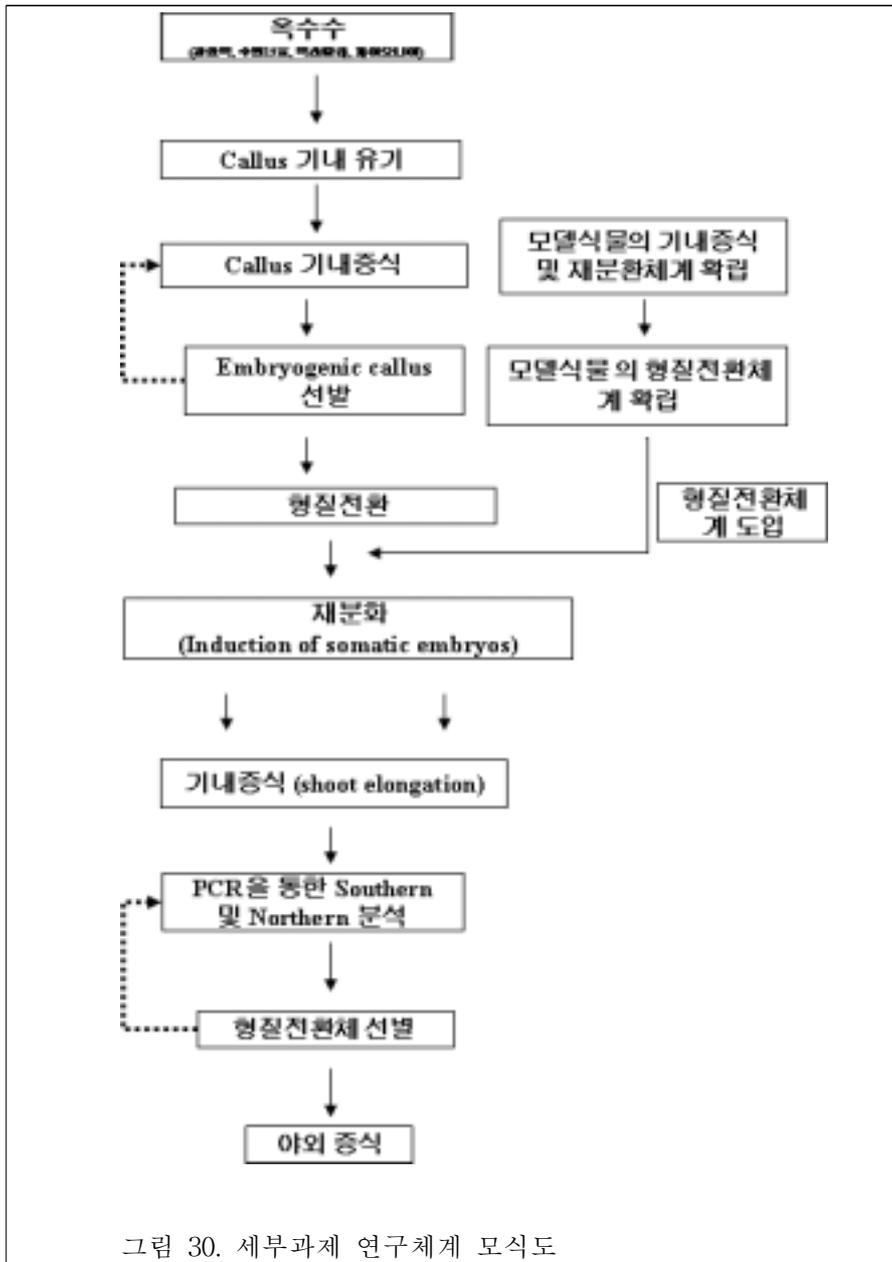
### 1. 서 언

옥수수는 한국뿐만 아니라 전 세계적으로 분포하고 있으며 식량 및 사료작물로서 인간생활에 필수적인 작물이다. 오랫동안 많은 연구자들에 의해서 유전, 육종을 통한 다양한 품종개발이 행해지고 있으며 앞으로도 많은 연구가 진행되고 있는 것이 사실이다.

Lignin은 식물체의 중요한 구성성분중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 가축사료로 사용 시 소화불량을 야기하다 뿐만 아니라 배설물로 바로 배출됨으로 인해 오폐수 및 악취를 만들어 내는 중요한 요인으로 작용한다. (Alan et al. 2003). 따라서 저 리그닌을 가지는 식물체를 사료작물로 사용 시 적은 사료의 양으로 고효율의 소화를 촉진시키는 역할을 할 수 있다 (Hibachi, 1985).

Lignin 합성경로에 관여하는 효소의 활성을 유전공학적 방법 (Antisense RNA)을 통해 억제함으로써 저 lignin함량 가지는 식물체의 생산이 가능하여 이에 관련된 기술 개발 시 많은 기대효과를 획득할 수 있다고 사료된다. 4CL과 F5H 유전자는 lignin 합성에 가장 중요한 역할을 하며 (그림 1) 또한, 다양한 종간에도 homology가 높기 때문에 이들 유전자의 활성을 생체 내에서 억제함으로써 lignin 합성을 감소시킬 수 있을 것으로 판단되고 있다. 하지만 기존의 육종방식으로는 어렵거나 불가능한 이러한 신품종 개발을 위해 실용성이 있는 유전공학적 방법의 이용은 목적달성에 적절한 방법을 제공 할 것이다. 예를 들면 포플러 계통의 임목에 있어 저 리그닌을 가진 식물체의 생성이 확인되었으며 리그닌 함량의 감소로 인해 특이적인 생리현상이 발견되었다 (Burghs et al. 1991). 이들 특성 중 리그닌감소로 인한 cellulose의 증가 및 성장률의 변화 등이 대조적인 특성이 발견되었다 (Nv et al. 1994)

본 협동연구에서는 옥수수에서 분리된 antisense 4CL 과 F5H 유전자를 사용하여 4가지 옥수수 품종에 형질전환기법을 사용하여 재도입한 후 형질전환체를 생성하여 궁극적으로 저 리그닌을 가지는 식물체를 생성하는데 있다 (그림 30).



## 2. 실험방법

### 가. 선발된 옥수수 품종별 기내증식과 재분화 체계의 확립

#### 1) 식물재료

사료용 옥수수인 광안옥, 수원19호, 익산/탐라, Pioneer를 비롯한 4개의 품종을 경북대학교 김순권 박사로부터 분양받아 1차년도 실험의 대상으로 선정하였다. 이들의 작물들은 현재 축산농가에 공급되어 대중화 되고 있는 중요한 품종으로서 이들을 대상으로 선발하여 본 연구에 사용할 시료를 확보하였다.

#### 2) 종자멸균 및 배지조성

기내시료 획득을 위하여 각각의 옥수수 종자를 흐르는 물에서 30분간 수세한 후, 무균 상에서 70% 에탄올로 1분, 10% NaCl로 30분간 표면 살균한 다음 멸균수로 각각 3번씩 세척하였다. 이들을 40°C에서 3일 간 저온보관 후 옥수수 배를 취하여 callus 유도배지에 치상하였다.

사용된 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962), B5 (Gamborg et al., 1968), L-proline이 첨가된 N6 (Armstrong and Green 1994) 배지에 100 mg/l myo-inositol, 2% sucrose (이하 모든 배양 배지에 사용), 그리고 응고제로서 0.4% Phyta-agar가 첨가한 후 소독하여 사용하였다.

#### 3) 캘러스 유도

먼저 식물성장조절 무첨가 MS 배지에 표면 살균된 수원 19호 옥수수 종자를 치상하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  배양실에서 종자를 3일간 암배양하였다. 배양 후 옥수수 배를 취하여 각기 다른 callus 유도 배지에 치상하였다. 3종류의 식물배지 (B5, N6, MS)배지에 각기 서로 다른 농도의 2,4-D (0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$ )를 첨가하여 사용하였다. 치상한 모든 시료는 암상태에서 증식을 유도하였으며 한품종당 100 개 이상의 배를 취하여 각기 다른 2,4-D 농도에 치상하여 실험하였다.

#### 4) 재분화 유도

상기의 암조건에서 12주 계대배양된 4품종의 callus를 약 5mm 정도로 절단하여 BA와 TDZ (control, 0.5, 1, 2, 5 mg/l)를 첨가한 N6배지에 치상하여 각각 30 clump 씩 치상하여 8주 후에 재분화율을 측정하였다. 배양은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  배양실에서 연속광 조건 ( $30 \text{ umbo} \cdot \text{l} \cdot \text{ms}^{-1}$ )에서 수행하였다. 이후 이들 callus 들을 N6배지에 6%의 sucrose와 NAN (1mg/l)를 첨가한 배지에 치상하여 재분화를 지속적으로 유도하였다.

#### 나. 모델 식물을 사용한 형질전환체의 획득에 관한 실험

다량의 형질전환체의 획득을 위해서 먼저 *Agrobacterium* strain 들에 대한 대량 형질전환 기법의 개발을 우선 실시하였다. 옥수수 형질전환에 앞서 먼저 담배 및 토마토식물을 모델로 하여 형질전환체계를 확립하고자 하였다. 모델식물 (토마토와 담배)에 사용된 vector는 binary vector인 pCAMBIA2301을 가지고 있는 *Agrobacterium* LUBA4404 strain으로 NPTII에 의해 식물에서 kanamycin 선발이 가능한 binary vector이다 (그림 31). 이 plasmid들은 reporter 유전자로서  $\beta$ -glucuronidase (GUS)와 selection marker로서 항생제 선발과 더불어 GUS의 staining의한 선발을 가능하게 해 줄 수 있다.

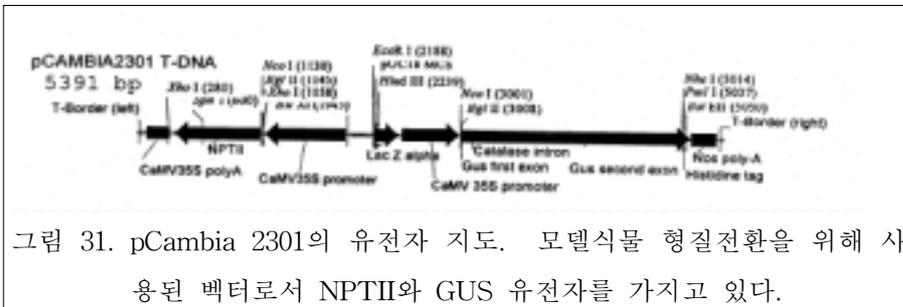


그림 31. pCambia 2301의 유전자 지도. 모델식물 형질전환을 위해 사용된 벡터로서 NPTII와 GUS 유전자를 가지고 있다.

먼저 모델식물인 토마토에서 competent 세포유기를 위해 먼저 재분화배지 즉 1/2 MS medium에 Staba vitamins (Staba, 1969), sucrose ( $20 \text{ g.l}^{-1}$ ), myo-inositol ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ), and BA ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ )를 첨가하여 조제하였다. 토마토 잎절편을 30일 동안 재분화배지에 배양하는 중 3일 간격으로 시료를 같은 1/2MS 배지에 식물성장조절물질 무첨가 배지에 치상 후 8주 후에 재분화율을 조사하였다. 각 처리구는 40-50개의 잎절편을 사용하였다.

확인된 competence 세포유기 기간으로 추정되는 6일과 12일 각각 *Agrobacterium*과 공배양을 수행하였다. 즉 *Agrobacterium*이 재 현탁 된 성장조절 물질을 무첨가한 1/2MS 액체배지에 침적하여 30분간 균을 접종하였다. 접종 후 멸균된 paper towel에서 수분을 제거한 후 1/2MS 재분화 유도배지에서 2일간 공배양 하였고, 이후 200 mg/l cefotaxim이 첨가된 재분화배지로 계대하여 1 주일 배양한 다음 100 mg/l kanamycin과 200 mg/l cefotaxim이 첨가된 재분화를 유기하였다. 임의로 선발한 잎절편에서 유기된 줄기를 GUS의 substrate인 x-gluc와 staining을 수행하여 형질전환 여부를 확인하였다.

#### 다. 4CL 과 F5H antisense 유전자를 사용한 형질전환체의 획득에 관한 실험

제1세부과제에서 조제된 antisense pCambia vector (pMCL4AS 와 pMF5HDAS)들을 *A. tumefaciens* LBA4404 strain으로 도입하여 옥수수 형질전환에 사용하였다. 이들 박테리아들은 50 ug/ml kanamycin 과 100 ug/ml이 처리된 LB 액체 배지에서 200 rpm으로 2 일간 배양된 균주를 8,000 rpm에서 5분 원심하여 세포들을 회수하고, 성장조절제 무첨가 N6 액체 배지에 재 현탁하여 공배양에 사용하였다.

기내에서 성장하고 있는 4 품종의 embryogenic callus를 약 5mm 정도로 취하여 먼저 재분화 배지에 치상하여 6일과 12일 동안 배양한 후 이들 시료들을 사용하여 형질전환 실험을 수행하였다. *Agrobacterium*이 재 현탁 된 성장조절제 무첨가 N6 액체배지에 침적하여 30분간 균을 접종하였다. 접종 후 멸균된 paper towel에서 수분을 제거한 후 N6 고체배지 (재분화 유도배지; SIM)에서 2일간 공배양 하였고, 이후 200 mg/l cefotaxim이 첨가된 SIM 배지로 계대하여 1 주일 배양한 다음 20 mg/l hygromycine과 200 mg/l cefotaxim이 첨가된 SIM 배지에 다시 암배양 1주일 후 명배양을 하여 재분화를 유도하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 선발된 옥수수 품종들의 clone 별 기내증식과 재분화 체계의 확립

##### 1) 기내시료 확보 및 시료 증식

광안옥, 수원19호, 익산/탐라 그리고 파이오니어 옥수수를 대상으로 실험 대상품종으로 1차년 도에 선정하여 실험의 대상으로 하였다.

##### 2) 기내시료의 확보

4개 품종에서 callus 유기를 위하여 수원19호 품종을 먼저 선택해서 3개의 각기 다른 배지를 사용하여 실험하였다. 식물의 재분화율을 높이기 위하여 먼저 적절한 배지조성과 조절물질농도를 탐색하는 것이 가장 중요한 부분이다. 따라서 수원19호 품종 1개를 선택하여 N6, MS, B5배지에 먼저 2,4-D (0, 10, 20, 30, 40, 50 uM/L)를 첨가한 배지에 치상하여 캘러스 유도 및 증식에 관한 실험을 수행한바 치상 후 약 3주후에 캘러스 형성이 관찰되었으며, 이들 캘러스는 대부분 흰색이나 노란색을 띄고 있는 것이 관찰되었다. 이들 캘러스의 특성은 흰색을 띤 캘러스들은 일반적으로 friable한 반면에 노란색을 띤 캘러스들은 hard한 세포 덩어리 (cell clumps)들로 혼재되어 구성되어 있는 것이 관찰 되었다 (그림 32).



사용된 배지 상에서 N6, MS 그리고 B5 배지 순으로 캘러스 유기가 양호 한 반응을 보여 주었다 (그림 33). N6 배지에서 보면 대조구와 비교 해 볼 때 실험한

농도 중 저 농도 일 때 즉 10 uM 의 2,4-D 농도가 가장 많은 callus 유기를 보여 주고 있으며 반면에 대조구는 전혀 callus 의 형성이 관찰되지 않는 것으로 보아 단지 2,4-D의 영향으로 인해 callus가 유기된 것을 알 수 있다. 비슷한 경향이 B5배지에서도 나타났으며, 저 농도일 때 즉 10과 20 uM의 2,4-D에서 가장 높은 callus 유기율 (>1g/plate)을 보여 주었으며 고농도로 갈수록 callus 유기율이 낮아지는 경향을 볼 수 있다. 하지만 MS의 경우는 처리된 2,4-D의 모두에서 비슷한 callus 유기율이 관찰되었다. 대조구를 제외한 모든 처리 구에서는 1.5 g 이상의 callus가 유기되었다 (그림 33).

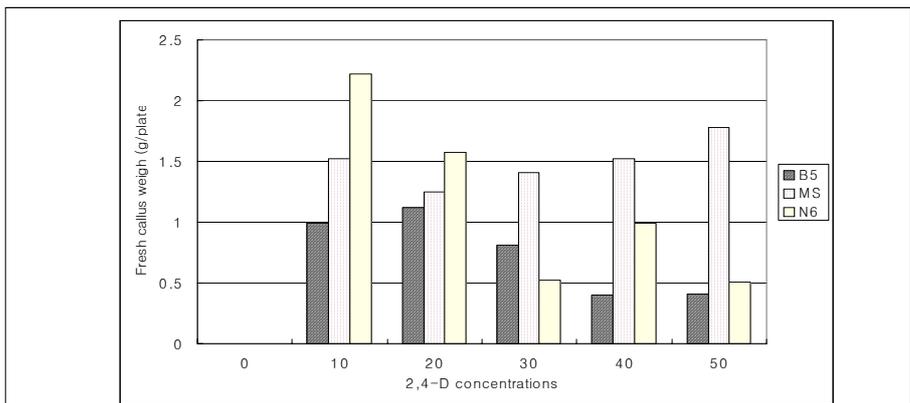


그림 33: 옥수수 성숙배를 B5, MS, N6배지에 다양한 농도의 2,4-D를 처리하여 8주간 배양하였다.

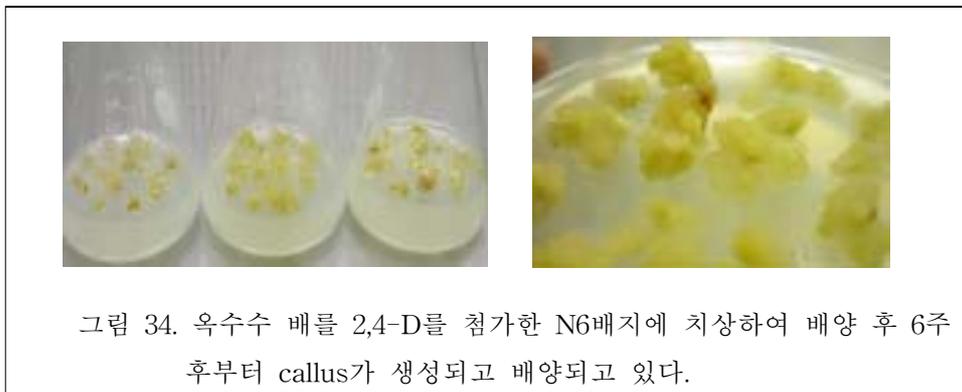


그림 34. 옥수수 배를 2,4-D를 첨가한 N6배지에 치상하여 배양 후 6주 후부터 callus가 생성되고 배양되고 있다.

따라서 이들 배지조성 중 N6배지에 10uM의 2,4-D를 사용하여 4개의 옥수수 callus를 기내에서 유기 후 지속적으로 증식하였다 (그림 34). 품종별로의 기내식물의 확보를 성공적으로 수행하여 재분화 시도를 위한 기내시료를 충분히 확보하였다

(그림 35). 캘러스성장에 있어서 특이한 점은 수원19호 품종이 다른 callus보다 배양 속도가 빠른 것으로 확인하였으며 이들 callus 대부분 hard하며 globular 형태의 특성을 가지고 있었다. 또한 광안옥과 파이오니어는 수원19호보다는 느리지만 비슷한 성장속도를 가지고 있지만 friable 과 hard한 형태의 callus를 동시에 가지고 있는 것을 확인하였다. 익산/탐라의 경우는 성장속도가 치상한 다른 품종보다 상당히 느린 양상을 보여주고 있으며 대부분 hard한 형태의 callus를 보여주고 있다 (그림 32). 또 다른 특이한 점은 hard한 callus들의 대부분이 접성이 있는 막으로 둘러 싸여 있는 것이 관찰되었다.



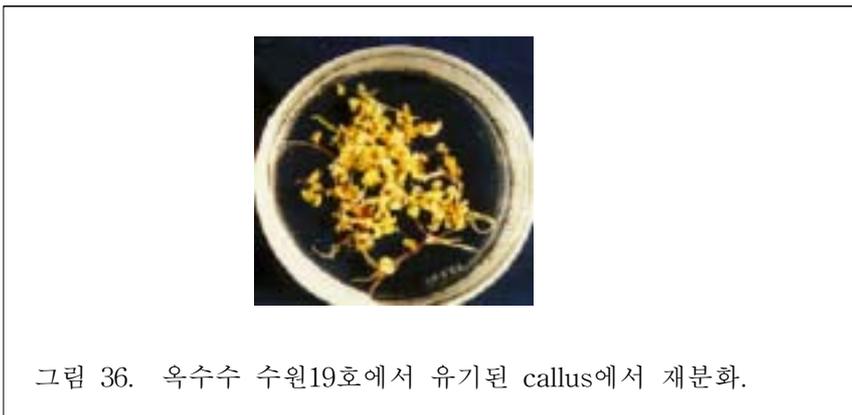
그림 35. 옥수수 4품종 (광안옥, 파이오니어, 수원19호 그리고 익산/탐라)에서 캘러스 유기. N6배지에 2,5-D 10uM을 첨가한 캘러스 유기배지에 8주 동안 증식한 상태

3) 캘러스에서 재분화

기내에 증식된 캘러스를 사용하여 N6배지에 다양한 농도의 cytokinin을 첨가하여 재분화 유기를 수행하였다. BA와 TDZ (0, 0.5, 1, 2, 5 mg/l)의 각기 다른 농도를 사용하여 재분화를 유도한 바 4주후부터 재분화가 되기 시작하여 8주 후에 처리한 농도에서 약 최고 27%의 재분화율을 보여주었다 (표 4, 그림 36).

cytokinin 농도 (mg/l)	No. of c a l l u s clumps	수원 19호		광안옥		익산/탈라		파이오니어	
		No. of calli with organs (shoot and/or root)	Frequency of regenerati on (%)	No. of calli with organs (shoot and/or root)	Frequenc y of regenerat ion (%)	No. of calli with organs (shoot and/or root)	Frequenc y of regenerat ion (%)	No. of calli with organs (shoot and/or root)	Frequen cy of regenera tion (%)
control	30	0	0	0	0	0	0	0	0
BA									
0.5	30	7	23.3	5	16.6	3	10	4	13.3
1	30	5	16.6	7	23.3	4	13.3	5	16.7
2	30	8	26.7	4	13.3	2	0.7	5	16.7
5	30	2	0.7	5	16.6	1	3.3	3	10
TDZ									
0.5	30	4	13.3	6	20	4	13.2	2	6.7
1	30	2	0.7	2	6.7	1	3.3	5	16.6
2	30	0	0	2	6.7	0	0	0	0
5	30	0	0	0	0	0	0	0	0

표 4. 옥수수 4품종에서 유기된 embryogenic callus를 사용한 재분화율. N6배지에 각기 다른 BA와 TDZ 농도별 첨가 후 12주 후 재분화율을 관찰



옥수수 4품종의 재분화율에서 보면 BA와 TDZ와 비교해 볼 때 전체적으로 BA에서 callus의 재분화가 TDZ 보다 재분화율이 확연히 좋게 나타났다. TDZ는 강한 cytokinin 역할을 하는 것으로 발표되고 있지만 옥수수 재분화에는 좋은 영향을 미치지 않는다고 판단된다 (표 4). 수원19호와 광안옥이 익산/탐라와 파이오니어보다 재분화의 결과가 우수한 것으로 나타났다. 발표된 논문과 마찬가지로 품종별로 재분화에 많은 영향을 미친다는 것이 본 연구에서 같은 결과가 도출되었다 (Michael and Virginia, 1994).

처리한 cytokinin 농도에서 보면 BA 1- 2mg/l에서 4개의 옥수수 품종에서 대부분 재분화율이 좋은 것으로 나타났다 (표 4). 또한 BA 처리구와는 다르게 낮은 농도에서 TDZ에서 재분화율이 좋게 나타났으며 농도가 높을수록 재분화가 현저히 떨어지며 높은 농도에서는 캘러스가 갈색으로 변해 조직이 죽는 현상이 관찰되었다.

하지만 이들 유기된 callus를 같은 N6배지에 sucrose 농도 6%와 NAA 1mg/l를 첨가하여 배양한 후 3주 뒤에 이들 callus에서 체세포로 보이는 유기체가 다수 발생되는 것을 관찰하였다. 이는 2,4-D에서 유기된 callus의 일부분이 embryogenic 즉 체세포배가 형성될 수 있는 callus가 유기된 후 추후 높은 농도의 sucrose 와 NAA 하에서 체세포배가 완성되었다고 사료된다. 배양 8주 후 이들 callus 중 수원19호에서 재분화가 유도되는 것이 관찰되었다 (그림 36). 특이한 것은 캘러스에서 줄기와 뿌리가 동시에 생성되는 것이 관찰되었는데 이는 callus가 embryogenic 한 형태로 증식되고 있었으며 추후 N6배지에서 체세포배로 분화되어 결국에는 줄기와 뿌리가 동시에 재분화되는 것이 관찰되었다. 하지만 수원19호를 제외한 다른 품종에서는 callus에서 재분화가 유기되지 않았다.

#### 나. model 식물의 기내증식과 재분화 유도

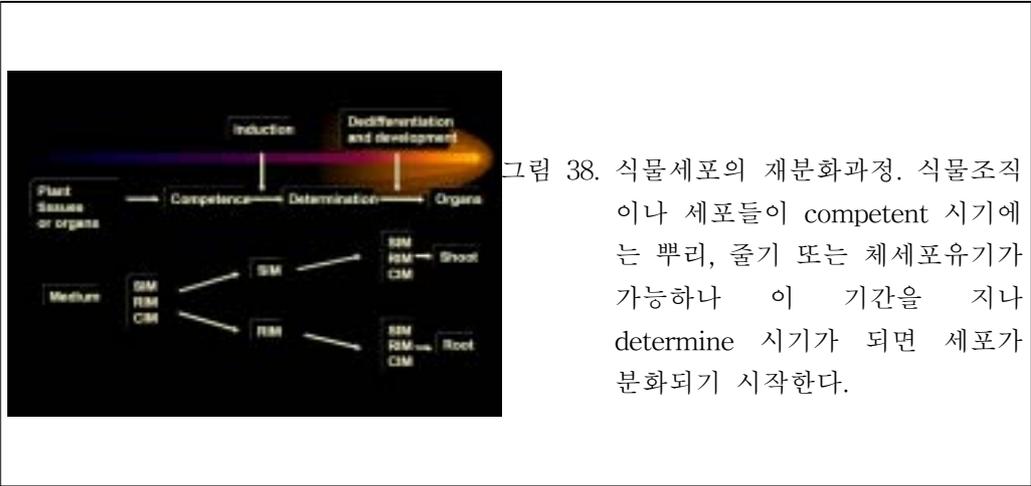
옥수수형질 전환을 체계적으로 수행하기 위하여 담배 및 토마토식물을 model로 선정하여 기내증식과 재분화 그리고 형질전환에 대한 여러 가지 실험을 수행하였다. 먼저 담배와 토마토종자를 소독한 후에 MS 배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 약 1 주후 발아된 담배를 같은 MS배지에 치상하여 성장을 유도하였다. 약 2개월 후, 성장한 담배줄기를 1 cm 로 절단하여 BA 2 mg/l를 첨가한 배지에 치상하여 기내증식을 유도한 바 기내 대량증식을 유도하였으며, 동시에 엽육조직에서 약 1cm 정도로 절단한 후 침으로 10 번 정도 자극하여 담배 재분화 배지 (MS + BA 4 mg/l)

에 치상하여 약 3 주정도 배양한 결과 다량의 재분화 개체를 획득 할 수 있었다 (그림 37).



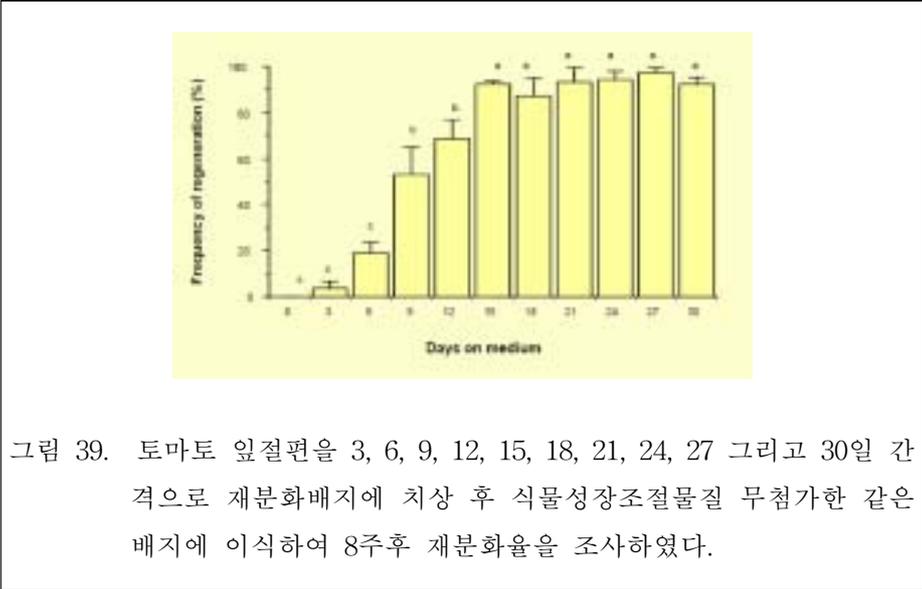
다. Competent 세포실험을 통한 높은 형질전환율 형성

식물세포들은 재분화 배지에 치상 후 기관분화나 체세포분화하기 전에 competent 시기를 거친다. 이기간은 특히 식물세포나 조직들이 분화하기 전 세포분열이나 대사과정이 굉장히 활발하며 식물성장조질물질에 의해서 유기되어질 수 있다 (Christanson and Warnick, 1983 and 1987). 하지만 이 기간을 지나 determine 세포가 되면 돌이킬 수 없는 재분화과정으로 돌입이 된다 (그림 38).



즉 competence 기간에 체세포 분열이 활발해 짐에 따라 세포대사 및 DNA 복제가 활성화되기 시작한 시기이다. 이시기에 맞추어 외부의 유전자가 도입된다면

nuclear genome에 삽입될 수 있는 확률이 높으며 결국에는 형질전환율도 상승될 수 있다. 따라서 옥수수 형질전환하기 전에 담배와 토마토와 같은 모델식물을 사용해서 competent 세포기간을 간접적으로 인식해서 이들 기간에 *Agrobacterium*을 사용해서 형질전환을 하고자 하였다.



치상한 잎조각들은 15일 배양 시 까지 꾸준히 재분화율이 증가하는 것을 보이다가 15일을 기점으로 하여 재분화율이 변동이 없는 것이 확인되었다 (그림 39). 이는 15일 이내에 식물세포가 competence 시기를 지나서 determination 세포로 결정된다는 것이 간접적으로 증명하는 것으로 사료된다 (그림 39). 이들 기간내에 어느 시점에서

competence 기간이 형성되는지는 확신할 수가 없다. 따라서 형질전환 실험을 하기 위해서 6일과 12일 동안 배양한 시료를 *Agrobacterium* LBA4404 (pCambia 2301)을 30분간 공배양 후 1주일 뒤에 X-gluc로 staining 시켜 본바 확연히 형질전환율이 틀린 것을 감지할 수 있었다 (그림 40). 이 기간 내에 외부 DNA가 삽입된다면 결론적으로 형질전환율을 향상시킬 수 있다고 판단된다 (그림 40).

#### 라. 옥수수 형질전환체 생성 및 선발

Competence 기간은 식물과 조직에 따라 차이가 있을 수 있으며 실험한 기간 내 어느 시기에 competence 세포가 가장 많이 생성되었는지는 알 수가 없다. 하지만 15일 기간 내에 모델식물에서 모두 형질전환능이 상승한다는 판단 하에 옥수수 형질전환체 생성에 도입하기로 하였다.

먼저 기내에서 증식되고 있는 옥수수 callus (수원19호)를 재분화배지 (N6 + 6% sucrose 와 NAA 1mg/l)에 치상하여 6일 과 12일 동안 암배양을 하였다. 이후 이들 callus들은 antisense pM4CLAS (4CL antisense 벡터)와 pMF5HDAS (F5H antisense 벡터) 유전자를 가지고 있는 *A. tumefaciens*와 이틀간 공배양 시킨 후 hygromycin 20 ug/m과 cefotaxim 200ug/ml을 첨가한 같은 배지에 치상하여 형질전환 개체유기를 시도하였다. 배양 후 2주부터 callus들이 서서히 갈색으로 변해서 결국에는 거의 모든 캘러스들이 고사하였으며 2주 간격으로 항생제를 첨가한 배지에 지속적으로 치상하여 선발을 유도하였다. 항생제에 의해서 callus의 성장도 저조하였을 뿐만 아니라 대조구와 비교해 볼 때 재분화율도 상당히 낮게 나타났다 (그림 41). 대부분의 embryogenic callus 들이 갈색으로 변하기 시작하면 거의 대부분의 callus clump들의 고사되는 것을 관찰하였다 (그림 41). 선발 8주 후 소수의 callus에서 재분화가 시작되면서 먼저 뿌리가 생성되면서 줄기부분은 상당히 적거나 거의 없는 형태의 옥수수가 재분화되기 시작했다 (그림 41).



지속적인 재분화를 통한 식물체를 유도하기 위하여 callus clump들로부터 생성된 재분화개체들을 분리하여 N6배지로 계대하여 배양하였다. 줄기 성장 배지에서 재분화 개체들은 느리지만 성장하였고 2주일 후부터 일부분은 녹색으로 점차 변하기 시작하였다. 그러나 재분화 개체에 따라서 반응 정도도 달라 녹색으로 변하는 개체가 있는 반면 계속적인 명배양 하에서도 녹색을 띠지 않는 개체들도 있어 결국에는 고사하는 경우도 있었다 (그림 41). 4CL 형질전환된 수원 19호 캘러스들은 전부 고사하여 개체가 죽었으며 다행이도 F5H antisense를 가지고 있는 옥수수에서 재분화 개체가 느리지만 성장하여 약 3개월 후에 shoot가 있는 개체가 4개가 생성되었다.

재분화된 shoot들을 외관상으로는 정상개체보다 약하여 약간 휘는 경향을 보여주고 있다 (그림 42). 그러나 성장은 정상개체보다 대조구 식물보다 많이 느리고 표현형에도 상당히 많이 틀린 것이 관찰되었다. 엽육조직에 흰 반점이나 흰줄이 생성되어 있으며 줄기성장이 극히 미미해서 일반개체들과 비교해 볼 때 30 - 40 cm 정도의 발육을 보여 주고 있다 (그림 42).



그림 42. F5H antisense를 가지고 있는 수원19호 옥수수 형질전환체 (좌). 30-40cm 정도의 크기로서 잎에 심한 줄과 반점이 두드러지게 나타나 있다 (우).

## 제 3 절. 제 2 협동과제

최종목표: Antisense F5H 형질전환체의 선발과 리그닌 분석

### 1. 서 언

식물에서 중요한 구성 요소중에 하나는 리그닌으로 모든 고등 식물에서 발견되는 방향족 고리를 가진 poly-phenylpropanoid 중합체이며 이차 세포벽의 중요한 구성성분중 하나이다. Cellulose 다음으로 많은 양이 존재하며, 전체 건중량의 15 - 36%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 리그닌은 cellulose 및 세포벽내의 다른 다당류와 강하게 결합되어 있어 식물체로부터 분리하기가 어렵기 때문에 정확한 구조는 해석하기가 어렵다고 알려져 있으며 일반적으로 *p*-coumaryl, coniferyl, 그리고 sinapyl alcohol의 세 가지 phenylpropane alcohol로 구성되어 있다고 알려져 있다. 이들은 몇 가지 종류의 peroxidase에 의해서 산화되고 random fashion으로 결합하여 *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, syringyl 리그닌을 형성한다. 세포벽에 축적된 리그닌은 식물체 지지, impermeabilization에 중요한 역할을 담당하며, 병원균에 대한 화학적, 기계적 방어 작용을 한다. 세포질에서 생합성된 리그닌은 이동하여 이차세포벽에 축적되는데 이 과정에서 리그닌의 heterogeneity가 조절된다. 세포벽에서의 위치, 세포나 조직의 발달 단계, 환경적 stress 등에 따라 리그닌 subunit의 조성이나 양이 달라지며, 이러한 차이는 같은 종내에서, 또는 서로 다른 종간에서 나타날 뿐만 아니라 동일한 개체일지라도 세포나 조직의 차이에 따라서도 나타나게 된다. 또한, wounding, fungal attack, specific enzyme inhibitors, mutations, hormones, metal ions, 그리고 light와 같은 인자들에 의해서도 조성이 달라진다.

Lignin 전구체 합성의 초기에 hormone과 광에 의한 PAL의 활성화와 lignin합성의 조절에 대해서는 1970년대에 이미 알려진 바 있다. 하지만 직접적인 영향을 미치는 것은 4-CL, F5H, CAD와 OMT가 대표적인 것으로 알려져 있으며, 유전공학적 approach도 이 효소를 code하는 유전자를 cloning하여 조작하는 것이 효율적이라고 판단된다. 이들 중 특히 4-Cinnamoyl CoA ligase (4-CL)는 lignin 생합성경로에서 가수화된 cinnamic acid를 thioester로 변화시키는데 아주 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다. 이런 기능이 식물체내에서 원활하게 이루어짐으로 인하여 결과적으로 flavonoid 나 리그닌과 같은 phenylpropanoid들의 생합성에 관계되는 대사물

질을 계속적으로 유지, 공급시켜 주는 역할을 한다.

현재까지 다양한 종류의 식물체에서 4-CL에 관계된 유전자를 cDNA와 genomic DNA 수준에서 분리, 성격규명된 결과 이들 담배와 대두에서만 4-CL의 유전자 그룹들이 있다고 보고되었다. 하지만 담배의 경우 두 종류의 4-CL (4-CL1 과 4-CL2) 유전자들이 81% 와 89% 정도의 단백질 상동성을 보여주고 있을 뿐만 아니라 이들 단백질들은 같은 기질하에서 아주 비슷한 특성을 보여줌으로 이들의 단백질들은 같은 기능성을 보여주고 있다고 보고되었다. 하지만 콩의 경우 2종류의 4-CL 유전자 (GM4CL14 와 GM4CL16) 들은 대두의 뿌리에서 병원균의 침입에 의한 반응과 세포 배양시에 있어서 이들의 반응이 서로 각기 다른 양상을 보여주고 있다. 즉 병원균이나 elicitor에서 유기된 GM4CL16은 flavonoid 생성에 관계있다고 보고되었다. 하지만 부분적인 염기서열만 가지고 이들 두 대두유전자 4-CL들이 encode 하고 있는 단백질의 생화학적기능은 아직까지 알 수 없다. 따라서 기능적으로 서로 다른 4-CL 상동효소들의 분자생물학적으로나 생화학적인 증거는 아직까지는 불충분하다고 판단된다.

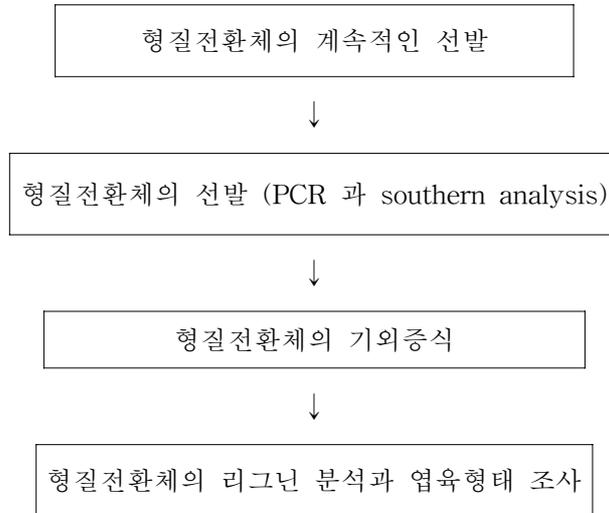
이들의 4-CL 유전자들은 식물종류에 관계없이 리그닌과 flavonoid 생합성에 관여하고 있음으로 이들 효소의 활성을 억제함으로써 식물체내의 함량을 감소시킬 수 있다고 사료된다. 일반적으로 lignin 성분은 식물의 목본조직의 15-30%를 구성하고 있으나, 자연상태의 식물에 있어 lignin의 함량변이가 크다는 것은 어느 정도까지 그 성분을 줄여도 식물체의 성장과 발육에 장애가 되지 않을 것이라는 것을 암시하고 있다. Hu et al (1998)의 연구논문 결과에서 보면 저 리그닌을 함유하는 포플러식물은 반면에 15%이상이 증가된 cellulose 양을 가지고 있다고 보고된 바, 따라서 이들 기법을 사료작물에 도입하여 신품종을 개발하면 양질의 식물을 육성할 수 있으리라 생각된다.

4CL 효소들은 G형태의 lignin 생성에 관여하는 효소이지만 반면에 F5H 효소들은 S 형태의 lignin 생성에 관여하고 있다 (그림 1). 애기장대의 연구에서 보면 T-DNA tagging 법에 의해서 F5H 효소가 생성되지 않는 변이체 fdh1을 생성하여 F5H 유전자를 분리하였다. 이들 유전자를 재도입하여 overexpression 한 결과 이들 재분화 개체들은 특이적이 S 형태의 lignin 들만 축적된다는 보고가 있었다 (John et al., 1999). 따라서 F5H 효소가 S lignin 생성에 아주 중요한 조절역할을 한다는 것이 최근에 알려졌다. 따라서 이들 4CL과 F5H 효소들의 활성을 식물체내에서 제한하거

나 혹은 감소시키면 고효율의 사료작물의 창출을 기대할 수 있다고 판단된다.

본 세부과제에서는 옥수수 품종을 시료로 하여 생성된 형질전환체에 대한 분자생물학적인 방법을 통한 선발과 이들 선발된 개체에 대한 형태분석과 리그닌 분석에 초점을 맞추고 있다.

## 연구수행내용



## 2. 실험 방법

### 가. 형질전환체의 검정

#### 1) DNA 분리

형질전환을 통하여 먼저 얻어진 개체 가운데 성장이 양호한 4개 개체를 선발하여 F5H 유전자의 존재 유무를 PCR과 Southern 분석으로 확인하였다. 먼저 선발된 5개 개체와 대조구로서 형질전환되지 않은 개체를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 엽장이 약 1cm 정도 되는 잎 하나를 취하여 5  $\mu$ l의 0.5N NaOH와 45  $\mu$ l의 ddH<sub>2</sub>O가 들어있는 microcentrifuge tube에 넣고 pestle을 이용하여 잘 갈아주었다. 이 tube들을 전자렌지에서 5분간 가열한 후 12,000 rpm으로 원심분리하여 상등액만을 취하였다. 20  $\mu$ l의 상등액을 5  $\mu$ l의 0.25N HCl이 들어있는 microcentrifuge tube에 넣은 후 tapping을 하여 mix 한 다음 즉시 얼음에 담구어 이들의 추출용액을 template DNA로 사용하였다.

#### 나. Polymerase Chain Reaction

형질전환 개체와 대조구 개체에서 분리된 genomic DNA를 사용하여 PCR을 다

음과 같이 수행하였다. 상기의 방법으로 분리한 template DNA 중 1 ul를 취하여 10X PCR buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 pmole primer, 10 mM dNTPs, 1 unit DNA polymerase를 혼합한 후, 물로 25 μl로 총 volume을 맞추어 PCR을 수행하였다. 기내에서 계속적인 선발을 위하여 Hygromycin 항생제를 사용하여 선발함과 동시에, PCR을 사용하여 계속적으로 형질전환 callus와 재분화 개체인 형질전환체의 선발을 하였다. 사용된 primer는 hygromycin 내성을 나타내는 Hygromycin 유전자로 이들의 내부구조의 sequence의 일부분을 PCR 증폭 primer로 사용하였다. PCR 증폭 조건은 94 °C 에서 30 초, 52 °C 에서 30초, 그리고 72 °C 에서 30 초로 25 cycle 를 수행한 후 1% agarose gel 상에서 전기영동을 수행하였다.

#### 다. Southern 과 Northern analysis

PCR 분석을 통하여 나타난 4개 재분화 개체를 PCR product를 이용하여 hygromycin 유전자를 증폭하여 southern을 분석한 후 이들 개체에서 total RNA를 분리하여 antisense F5H 유전자를 사용하여 northern 분석을 실시하였다. Gibco BRL의 PhotoGene<sup>TM</sup> Nucleic Acid Detection System을 사용하여 분석을 수행하였고, 4CL plasmid 에서 증폭된 0.7 kb의 PCR product를 Gibco BRL의 BioNick<sup>TM</sup> Labeling System 으로 probe를 만든 후 hybridization에 이용하였다.

#### 라. 형질전환체의 형태분석과 리그닌 분석

기내에서 선발된 형질전환체를 기외에 이식시켜 증식시킨 후 이들 형질전환체들의 엽형분석을 엽장, 엽폭, 거치정도, 엽밀도등에 관하여 관찰 조사하였다. 리그닌 분석을 위해서 생재(生材)시료를 채취하여 가위로 잘게 썰어서 dry oven에 24시간 건조시킨 후 완전히 건조된 시료를 homogenizer로 분쇄하여 미립자 mesh (425μm, 212μm)로 2회에 걸쳐 분리한다. 이들 미립자 분말을 리그닌 분석에 사용하였다. Mesh를 사용하여 걸러낸 미립자 분말을 상온에 3~4시간 방치하여 그때의 중량을 먼저 측정한 후 dry oven에 12시간 건조시킨 뒤의 중량을 측정하여 시료의 함수율을 측정한다.

$$\text{즉, (생중량 g - 건조중량 g) / 건조중량 g} \times 100\% = \text{함수율(\%)}$$

미립자 분말을 0.5g 정량하여 비이커에 넣고, 10mL 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가하여 4시간

동안 상온에서 교반하고(황산을 첨가하면 흰색의 미립분말이 검은색을 띄며 가수분해가 됨) 증류수 382.5mL 첨가하여 최종 3%  $H^2SO^4$  농도로 만들어 호일로 비이커의 입구를 밀봉하고 고압멸균기(1.5기압, 121℃)로 120분 동안 가수분해를 시킨다. 그리고 충분히 식힌 상태의 가수분해된 용액을 1G4 glass filter를 정량하고 suction pump를 이용하여 걸러주었다. 이때 glass filter상에 남는 물질은 산불용성 lignin이고 glass filter를 통과한 용액중에 산가용성 lignin도 UV-photometer로 재정량한다. 이때 걸러진 1G4 glass filter를 dry oven에 overnight 처리 후 정량하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 실험대상 시료 확보

본 연구에서 사용할 대상의 옥수수들은 국내 상업용과 대학교에서 육종에 의해서 개량된 품종으로 수원19호, 광안옥, Pioneer, 익산/탐라 시료들을 확보하여 이들 시료들을 사용하여 기내의 증식, 온실증식 그리고 리그닌 분석에 사용된다.

#### 나. 시료온실증식

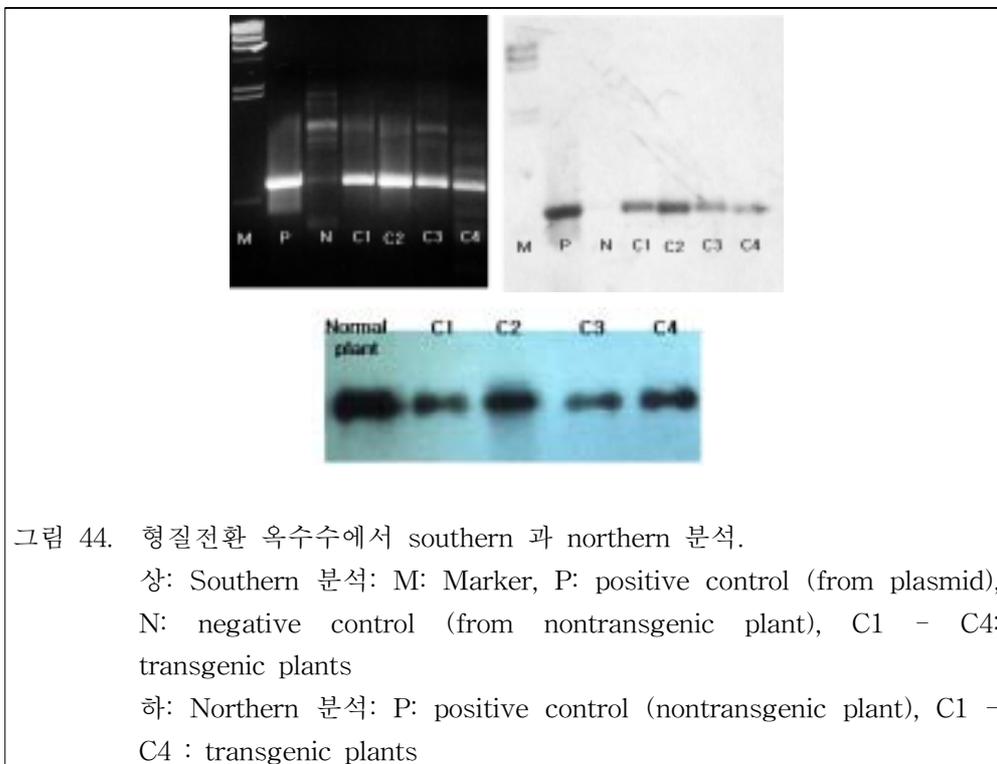
다양한 종류의 옥수수의 리그닌관련 연구를 위해서 온실에 식재하여 현재 다량의 옥수수를 재배하여 시료로 활용하였다. 사료용 작물로서 국내외에서 많이 경작되고 있는 광안옥과 파이오니아를 먼저 선정하였으며 현재 약 3개월에 걸쳐 온실에서 경작하고 있다 (그림43). 본 실험을 위한 시료로서 옥수수를 지속적으로 경작하고 있다.



그림 43. 옥수수 광안옥 (좌) 과 파이오니아종 (우)을 온실에서 3개월 성장시킨 모습.

계속적인 항생제 선발하에서 유기된 재분화개체들은 성장조절 무첨가 배지에 치상하여 발육을 유기하였다. 이들 배지는 저 농도의 hygromycin (20 µg/ml)를 사용하였지만 성장속도가 대조구와 비교해 볼 때 상당히 느린 현상이 관찰되었다. 저 농도의 항생제일지라도 옥수수성장에 많은 영향을 미치는 것으로 보아 이들 식물은 항생제에 상당한 감수성을 가지고 있다고 판단된다. 따라서 기내성장을 더욱 촉진시키기 위해서 치상 3개월 후 부터 계대배양시 항생제 무첨가 배지에 치상하였다.

형질전환체 확인을 위해 성장한 옥수수 4개 재분화 개체에서 genomic DNA를 분리한 후 Hygromycin primer를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 선발된 형질전환체 모두에서 hygromycin 유전자가 증폭된 것을 보아 이들 모두 외부에서 antisense F5H 유전자를 가지고 있다는 것을 추측하게 할 수 있었다 (그림 44). 이들 형질전환체들에서 total RNA를 분리한 후 F5H 유전자를 probe로 하여 northern 분석 수행하였다. 정상적인 옥수수과 형질전환체로 확인된 식물에서 northern 분석을 통하여 본 결과 형질전환체마다 RNA level이 서로 간에 많은 차이를 보여 주고 있다. 이는 antisense F5H가 정상적인 F5H 유전자를 서로 다른 정도로 유전자 발현을 suppressing 하고 있다는 것을 의미한다.



상기의 방법으로 확신한 재분화 개체들은 화분에 이식하여 온실에서 계속적인 성장을 유도하였다. 온실에서 성장한 옥수수에 대한 리그닌 분석을 수행하여 data를 수집하였다. 형질전환체들의 잎을 사용하여 리그닌 분석은 다음과 같이 수행하였다.

대조구는 리그닌 함량이 12.223이 나타났다. 형질전환체의 리그닌 함량은 11에

서 9까지 다양하게 나타났으며 대조구와 비교했을 때 리그닌 함량이 감소된 것으로 나타났다. 형질전환체의 리그닌 함량의 평균치는 10.19로서 대조구와 비교해 볼 때 약 2정도 낮은 수치를 보여 주었다. (표 5).

개 체	리그닌 함량 (%)
control	12.223
F5HAS1	10.231
F5HAS2	11.112
F5HAS3	9.982
F5HAS4	9.451
F5HAS 평균	10.19

표 5. F5H antisense 유전자가 삽입된 옥수수 형질전환체와 대조구의 리그닌 분석 조사

Antisense F5H 유전자가 들어 있는 형질전환체는 대조구에 비해 약간의 lignin 함량이 적은 것으로 조사되었다. 현재의 결과로 보아 리그닌 함량의 차이는 크게 나타나지 않았지만, 이는 식물체가 성장 상당히 저해되어 있는 상태에서 시료를 사용하여 조사하였기에 표4에서 와 같은 결과가 도출되었으리라 분석된다. 하지만 열형분석을 통하여 대조구와 비교해 볼 때 이들 형질전환체의 형태적인 차이점이 상당히 있는 것으로 미루어 볼 때 antisense F5H 유전자가 식물체내에서 발현을 억제하고 있는 것을 의미한다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

#### 1. 제 1 차년도

##### 가. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

##### 1) 연구개발 목표

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003년)	1. 대상사료작물 재료 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 옥수수 품종별로 기내증식 및 형질전환을 준비</li> <li>▶ 기존의 재분화 체계를 사용하여 재분화를 유도 검증 및 재분화체계의 확립</li> </ul>
	2. 기내시료의 확보 및 재분화 체계의 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 옥수수의 기내증식을 유도후 기내시료 대량 확보</li> <li>▶ 성숙배를 사용하여 callus 유도 및 재분화체계의 확립</li> </ul>
	3. 형질전환의 예비실험	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ plant expression vector 를 사용하여 대상식물의 발현 여부검증</li> <li>- <i>Agrobacterium</i> parameter 조사</li> </ul>
	4. cDNA Library 제조 및 4CL 유전자 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 4CL과 F5H 유전자의 primer들의 조제</li> <li>▶ RT-PCR을 이용한 cDNA 생성 및 cloning</li> <li>▶ clone된 유전자의 염기서열 확인</li> <li>▶ 4CL 와 F5H cDNA probe 확보</li> <li>▶ phage vector에 cDNA library 작성 및 검증</li> <li>▶ 4CL 와 F5H probe를 사용하여 cDNA 선별 및 분석</li> </ul>

2) 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도(점수)
1차년도 (2003년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 기초적인 실험단계로서 사료작물을 선발하고 이에 따라 기내에서 재료 확보와 재분화과정을 확립</li> <li>▶ cDNA library를 구축하여 cDNA 분리 및 분석</li> <li>▶ 2년차에 수행할 <i>Agrobacterium</i> 형질전환체계의 예비실험을 수행한다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 사료작물의 식물재료 확보 유무 (5)</li> <li>* 기내 재분화체계의 확립 유무 (5)</li> <li>* 4-CL 및 F5H probe의 작성 유무 (5)</li> <li>* cDNA library 구축유무 (10)</li> </ul>

나. 연구 개발 목표의 달성도

구 분	연구 개발 목표	목표달성도
1차년도 (2003년)	1. 대상사료작물 재료 확보	▶ 4가지 옥수수 품종 재료 확보 완료(광안옥, 익산/탐라, 수원, 파이오니어)
	2. 기내시료의 확보 및 재분화 체계의 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ N6배지에 2,4-D 10 uM을 첨가하여 callus 유도 및 기내시료 대량 확보</li> <li>▶ N6배지에 BA를 사용하여 재분화체계의 확립</li> </ul>
	3. 형질전환의 예비실험	▶ 담배 및 토마토를 엽육조직을 재분화배지에 치상 12일 후 <i>Agrobacterium</i> 과 공배양함으로써 높은 발현을 검증 완료
	4. cDNA Library 제조 및 4CL 유전자 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 다양한 4CL과 F5H 유전자의 primer들의 조제 후 RT-PCR을 이용한 cDNA probe 확보 완료 (각 유전자의 3개씩 probe 확보)</li> <li>▶ phage vector에 높은 효율을 옥수수 cDNA library 작성 완료</li> </ul>

1) 대상사료작물 재료 확보

본 연구에서 사용한 대상의 옥수수들은 국내 상업용과 대학교에서 육종에 의해

서 개량된 품종으로 수원19호, 광안옥, Pioneer, 익산/탐라의 중요한 작물 및 사료작물들로 구성되어 있다. 이들 시료들은 국내의 유명한 인사로부터 직접 입수하여 본 연구에 기내 재분화와 형질전환체 생성에 사용되었다. 조지기배양의 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 재분화 체계 확립 시 품종별 변이가 많이 있어 다양한 종류의 품종을 대상으로 연구를 시도하였다. 이들 시료들을 확보하여 이들 시료들을 사용하여 기내외 증식, 온실증식 그리고 리그닌 분석에 사용되었다.

## 2) 기내시료의 확보 및 재분화 체계의 확립

4개 품종에서 callus 유기를 하기 위하여 수원19호 품종을 먼저 선택해서 3개의 각기 다른 배지를 사용하여 실험하였다. 다양한 배지 조성 즉 N6, MS, B5배지에 먼저 2,4-D (0, 10, 20, 30, 40, 50 uM/L)를 첨가한 배지에 치상하여 캘러스 유도 및 증식에 관한 실험을 수행한바 흰색을 띤 캘러스들은 일반적으로 friable한 반면에 노란색을 띤 캘러스들은 hard한 세포 덩어리 (cell clumps)들로 혼재되어 구성되어 있는 캘러스들을 성공적으로 유기하였다.

수원19호를 사용하여 확인된 2,4-D 10 uM을 첨가한 N6배지를 사용하여 품종별로의 callus의 유기 및 증식을 성공적으로 수행하여 기내시료를 충분히 확보하였다. 품종별로 캘러스 증식에 있어 확인되었는 바 수원19호가 다른 품종보다 성장속도면에서 우수한 것으로 판명되었으며 익산/탐라의 경우는 유기 및 증식속도가 상당히 느린 것을 확인하였다.

기내에 증식된 캘러스를 사용하여 N6배지에 다양한 농도의 cytokinin을 첨가하여 재분화 유기를 수행하였다. BA와 TDZ의 각기 다른 농도를 사용하여 재분화를 유도하였는 바 BA에서 callus의 재분화가 TDZ보다 재분화율이 확연히 좋게 나타났다. TDZ는 강한 cytokinin 역할을 하는 것으로 발표되고 있지만 옥수수 재분화에는 좋은 영향을 미치지 않는다고 확인되었다. 수원19호와 광안옥이 익산/탐라와 파이오니어보다 재분화의 결과가 우수한 것으로 나타났다. 처리한 cytokinin 농도에서 보면 BA 1- 2mg/l에서 4개의 옥수수 품종에서 대부분 재분화율이 좋은 것으로 나타났다. 유기된 callus 같은 N6배지에 sucrose 농도 6%와 NAA 1mg/l를 첨가하여 배양한 후 3주 뒤에 이들 callus에서 체세포로 보이는 유기체가 발생하는 것을 관찰하였다. 특이한 것은 캘러스에서 줄기와 뿌리가 동시에 생성되는 것이 관찰되었는 바 이는 callus가 embryogenic 한 형태로 증식되고 있었으며 추후 N6배지에서 체세

포배로 분화되어 결국에는 줄기와 뿌리가 동시에 재분화되는 것이 관찰되었다. 하지만 수원19호를 제외한 다른 품종에서는 callus에서 재분화가 유기되지 않았다. 본 재분화 연구에서는 품종별 변이가 심하게 나타나서 한 개의 품종에서만 재분화가 유기되어 추후 수원19호 품종을 대상으로 다음 연구에 착수하였다.

### 3) 형질전환의 예비실험

옥수수형질 전환을 체계적으로 수행하기 위하여 담배 및 토마토식물을 model로 선정하여 기내증식과 재분화 그리고 형질전환에 대한 여러 가지 실험을 수행하였다. 본 연구에서는 국내에서 전혀 연구를 수행하지 않고 있는 competence와 determination의 이론을 도입하여 형질전환 예비실험을 수행하였다. Competence 시기에 맞추어 외부의 유전자가 도입된다면 nuclear genome에 삽입될 수 있는 확률이 높으며 결국에는 형질전환율도 상승될 수 있다.

치상한 잎조각들은 재분화배지 15일 배양 시 까지 꾸준히 재분화율이 증가하는 것을 보이다가 15일을 기점으로 하여 재분화율이 변동이 없는 것이 확인되었다. 이는 15일 이내에 식물세포가 competence 시기를 지나서 determination 세포로 결정된다는 것이 간접적으로 증명하는 것으로 사료된다. 형질전환 실험을 하기 위해서 15일 이전인 6일과 12일 동안 배양한 시료를 *Agrobacterium* LBA4404 (pCambia 2301)을 30분간 공배양 후 1주일 뒤에 X-gluc로 staining 시켜 본바 확연히 형질전환율이 틀린 것을 감지할 수 있었다. 모델식물에 있어서는 이 기간내에 외부 DNA가 삽입된다면 결론적으로 형질전환율을 향상시킬 수 있다고 판단된다. 따라서 옥수수의 형질전환 실험은 competence 세포유기 시 형질전환을 유도하였다.

### 4) cDNA Library 제조 및 4CL 유전자 분리

먼저 애기장대에서 4CL 관련 유전자가 현재 3종류가 발견되어 있는바 그중 4CL1 유전자에서 Start condon 과 stop condon을 전후로 primer를 조제하여 total RNA에서 먼저 RT-PCR에 사용하였다. 예상되는 증폭 길이는 cDNA의 1.6-1.7 kb 정도의 크기이며 이들 primer들은 XbaI 제한효소 부위를 가지고 있어 증폭되는 DNA를 바로 cloning에 용이하도록 제조되었다. 다양한 크기의 DNA가 증폭되는 것을 확인하였지만 기대되는 1.6-1.7kb 이상의 크기는 증폭되지 않았으며 4CL과 F5H 모두 0.6kb 이하의 단편들만 증폭이 되었다. 적은 단편이지만 이들 유전자들이

4CL과 F5H 유전자를 사용하여 증폭된 단편들로서 이들을 probe를 확보하기 위해서 이들 증폭된 유전자를 사용하여 cloning 하였다.

옥수수로부터 분리한 poly(A<sup>+</sup>)RNA에 대한 cDNA library 제조는 ZAP-cDNA Synthesis Kit (Startagene, La Jolla, Calif.)를 이용하여 약간의 실험방법을 변형하여 제조하였다.

재조합 phage vector의 packaging은 Gigapack Gold III packaging kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제조하였다. titering에 의한 cDNA library size를 측정한 결과 전체 size는 8 x 10<sup>6</sup> pfu/ $\mu$ g of cDNA로 큰 size의 library를 구축하였다. random을 선발한 phage에서 DNA를 분리하여 제한효소로 절단한 바 이들 phage들은 cDNA를 가지고 있는 것이 확인되어 4CL과 F5H 유전자의 probe를 사용하여 cDNA에서 clone을 가능하게 했다.

## 2. 제 2 차년도

### 가. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

#### 1) 연구개발 목표

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	
2차년도 (2004년)	1. cDNA library 제조 및 4CL 유전자의 분리	▶ phage vector에 cDNA library 작성 및 검증 ▶ 4CL 와 F5H probe를 사용하여 cDNA 선별 및 분석	
	2. Antisense RNA vector의 조제	▶ RT-PCR에 의해 cloning 된 4CL과 F5H 유전자의 inverse 방향으로 plant expression vector에 삽입하 여 확인 ▶ 선별된 <i>Agrobacterium</i> strain에 재도입후 확인	
	3. 대상식물 형질전환	▶ <i>Agrobacterium</i> 을 통한 형질전 환	- PCR에 의한 1차적인 선별 - Southern 과 northern에 의한 이 차적인 선별 후 지속적인 배양 - 공배양을 통한 재분화유기 및 형 질전환체의 선별

2) 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도(점수)
2차년도 (2004년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ cDNA library 구축하여 4-CL과 F5H 유전자를 분리하고 이에 따른 염기서열을 수행 분석</li> <li>▶ 또한 antisense 4-CL 및 F5H 유전자를 binary vector에 구축완료</li> <li>▶ 사료작물에 Agrobacterium, biolistic gun을 통하여 형질전환체를 지속적인 생성 및 확인.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 4-CL 및 F5H 유전자의 염기서열 확정 유무(10)</li> <li>* antisense RNA vector 개발의 유무 (10)</li> <li>* Agrobacterium의 vector의 생성유무 (10)</li> <li>* 형질전환체의 생성 과 확인 (15)</li> </ul>

나. 연구개발 목표의 달성도

구 분	연구 개발 목표	목표 달성도
2차년도 (2004년)	1. cDNA library 제조 및 4CL 유전자의 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 4CL 와 F5H probe를 사용하여 cDNA library에서 분리시도</li> <li>▶ Long PCR을 통한 genomic DNA에서 4CL과 F5H 유전자의 분리 및 cloning 완료</li> <li>▶ 염기서열 분석을 통한 유전자 확인 완료</li> </ul>
	2. Antisense RNA vector의 조제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 4CL과 F5H 염기서열 분석을 토대로 sense와 antisense primer 작성 완료 및 PCR 증폭</li> <li>▶ Sense 와 antisense vector들의 cloning 완료</li> <li>▶ Binary vector에 4CL과 F5H antisense 벡터 구축 완료</li> </ul>
	3. 대상식물 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 옥수수 캘러스에서 Agrobacterium을 통한 형질전환체 선발 및 개체 생성 계속</li> </ul>

1) 구축된 cDNA library에서 4CL과 F5H 유전자를 분리 및 염기서열 분석

1년차에서 애기장대의 4CL 유전자와 F5H 유전자 cDNA 염기서열에서 조작된 primer들은 옥수수에서 증폭이 되었으나 예상크기와는 달리 적은 단편들이 증폭되어 1차적으로 이들을 probe로 하여 cDNA library에서 4CL과 F5H 유전자들의 full

sequence 발굴을 시도하였다. 클론된 DNA 단편조각을 probe로 하여 plaque hybridization을 수행한 결과, 1차 screening에서 여러 개의 putative 클론을 얻었으며 2차, 3차 screening을 통하여 최종적으로 3 종류의 positive clone들을 얻었다. 계속적인 screening에 의해 positive plaque을 5 종류 picking 하였다. cDNA library들에서 선발된 클론들을 plasmid pKS에 subclone하여 염기서열을 분석하여 full-length 4CL 과 F5H 유전자를 함유하는 클론의 염기서열과 PCR에 의해 증폭된 유전자들의 염기서열을 비교 분석하였다. 하지만 이들 클론들은 염기서열 분석한 결과 다른 클론으로 판명되었다. cDNA library의 구축은 성공리에 수행되었으나 4CL과 F5H 유전자들의 발굴을 여러 차례 시도 하였으나 발굴하지 못하였다. 이는 4CL과 F5H 유전자들의 발현도가 아주 낮아 cDNA library 구축시 cloning이 되지 않았다는 것으로 판단된다.

## 2) 4CL과 F5H 유전자의 genomic DNA에서 증폭 (Touch-down 과 Long PCR)

1년차 연구결과에서 4CL과 F5H 유전자들의 발현이 생체내에서 미미하다고 판단되어 이들 유전자의 발굴을 위해 total genomic DNA에서 직접 이들 유전자의 증폭을 수행하여 유전자 획득을 시도하였다. 먼저 1차년도에서 조제된 primer와 더불어 15종이상의 primer를 조제하여 full sequence의 일반PCR을 통한 증폭을 시도하였지만 4CL과 F5H 모두 예상되는 크기보다 적은크기만 획득하였다. 이후 touch-down PCR을 통한 여러 가지 PCR 기법을 도입하여 2Kb 정도의 4CL과 F5H 유전자의 증폭이 가능하게 되었다. 또한 같은 기법을 사용하여 3품종의 (익산/탐라, 수원, 파이오니어)에서 증폭되는 band들도 검증한 결과 거의 같은 크기로 관찰되었다. 이는 품종에 따라서 4CL 유전자 크기가 거의 일치한다는 것을 의미한다고 판단되었다. 즉 사용된 template DNA들은 cDNA가 아니라 genomic DNA를 대상으로 하기 때문에 증폭되는 PCR band들은 크기가 큰 것이 확인되었으며 이들의 유전자가 intron을 포함하고 있다는 것이 간접적으로 추측이 된다.

기대되는 완전한 genomic DNA의 full sequence의 증폭을 획득하기 위해서 long PCR 기법을 채택하여 이중 다양한 DMSO 농도를 PCR reaction에 첨가하여 증폭을 수행한 바 genomic DNA에서 3kb 이상의 full 4CL와 2kb 와 2.4k 정도의 2개의 full F5H 유전자가 증폭되는 것이 확인되었다. 이들 유전자들은 pXcmKn12 (T-vector)에 삽입하여 염기서열을 수행한바 4CL 과 1개의 F5H clone은 알려진 염기서열과

98%이상 일치하는 것으로 판명되었다. 특이한 것은 2.4kb 정도의 F5H 유전자로 추정되는 clone은 염기서열 분석에 의해 다른 유전자로 판명되었다.

4CL (M4CL2) 클론은 5'부터 1.8 Kb의 염기서열을 분석한바 2개의 intron들이 삽입된 것이 확인되었다. 이들 인트론들은 각기 412 와 93 염기를 가지고 있으며 각각 5'부터 766 염기와 1536 염기에서 삽입되어 있는 것이 확인되었다. F5H clone 1개의 인트론으로만 구분되어 있고 인트론은 355개의 염기를 가지고 있으며 940 염기에서 삽입되어 있는 것이 확인되었다

4CL 유전자와 마찬가지로 F5H 유전자는 옥수수에서 염기서열이 밝혀져 있지만 genomic 수준에서 국내외를 막론하고 밝혀진 바가 본 조사에서 확인되어 본 연구진의 성과라고 말할 수 있다.

### 3) Antisense 4-CL 및 F5H 유전자를 binary vector에 구축

Genomic 수준에서 염기서열 분석 후 이를 토대로 하여 4CL과 F5H 유전자의 1번째 인트론을 중심으로 하여 sense 와 antisense primer들을 조제하였다. 이들 primer들은 binary vector에 삽입이 용이하게 하기 위하여 말단에 각기 다른 제한효소부위를 가지고 조제하였다.

4CL sense 와 antisense primer들을 사용하여 다양한 방법의 PCR을 수행한 결과, 예상하는 4CL sense (600 bases) 와 antisense PCR product를 획득하였다 (그림 25). Template DNA는 클론이 확인된 M4CLF를 사용하여 증폭하였다. 이들 증폭된 PCR들은 pBS-KS vector에 삽입하여 추후 Binary vector에 삽입에 사용되었다.

4CL 유전자와 마찬가지로 F5H유전자도 1번째 인트론을 중심으로 하여 sense 와 antisense primer들을 조제하였다. 하지만 증폭되는 PCR들의 크기는 4CL 과 혼돈을 피하기 위해 약간 크게 조제하였다. 즉 예상되는 증폭크기는 sense는 800 bases들과 antisense는 400 base들로 조제하여 성공적으로 증폭하였다. 4CL과 마찬가지로 이들 PCR 산물들을 pBS-KS vector에 삽입하여 추후 Binary vector에 삽입에 사용되었다

클로닝된 4CL antisense (M4CL2AS)와 F5H antisense (MF5HDAS)들을

pCAMBIA vector (1300)은 T-DNA border 내에 삽입하였다. 이 binary vector는 hygromycin 항생제 저항성을 가지고 있으며 반대방향으로 LacZ 유전자를 가지고 있어 blue-white 선발이 용이하게 구축되어 있는 벡터이다. 클로닝은 먼저 pBI121에서 HindIII와 EcoRI으로 절단하여 Promoter와 Gus 그리고 terminator가 있는 영역을 pBS-KS vector에 같은 제한효소로 절단하여 삽입하여 확인하였다. 이들 벡터는 다시 BamHI과 SacI (SstI) 효소로 절단하여 GUS 구조유전자를 제거한 후 이부위에 clone된 4CL과 F5H antisense를 같은 효소 BamHI 과 SacI (SstI)으로 절단하여 각각 삽입하여 확인하였다. 확인 후 이 벡터는 HindIII 와 EcoRI으로 절단하여 insert를 추출한 후 같은 효소들로 pCambia11300을 절단한 벡터에 이들 insert를 ligation시켜 확인하였다. 이들 2종류의 binary vector들은 옥수수의 4CL 과 F5H antisense가 삽입된 벡터들로서 각각 pM4CL2AS과 pMF5HDAS로 명칭하였다. 이들 binary vector들은 각각 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환시켜 옥수수에서 형질전환을 유도하도록 구축하였다.

#### 4) 사료작물 형질전환체 생성 및 확인.

Competence 기간은 식물과 조직에 따라 차이가 있을 수 있으며 실험한 기간 내 어느 시기에 competence 세포가 가장 많이 생성되었는지는 알 수가 없다. 따라서 15일 기간 내에 모델식물에서 모두 형질전환능이 상승한다는 판단 하에 옥수수 형질전환체 생성에 도입하기로 하였다. 먼저 기내에서 증식되고 있는 옥수수 callus (수원19호)를 재분화배지 (N6 + 6% sucrose 와 NAA 1mg/l)에 치상하여 6일 과 12일 동안 암배양을 하였다. 이후 이들 callus들은 antisense pM4CLAS (4CL antisense 벡터)와 pMF5HDAS (F5H antisense 벡터) 유전자를 가지고 있는 *A. tumefaciens*와 이틀간 공배양 시킨 후 hygromycin 20 ug/m과 cefotaxim 200ug/ml을 첨가한 같은 배지에 치상하여 형질전환 개체유기를 시도하였다. 배양 후 2주부터 callus들이 서서히 갈색으로 변해서 결국에는 거의 모든 캘러스들이 고사하였으며 2주 간격으로 항생제를 첨가한 배지에 지속적으로 치상하여 선발을 유도하였다. 항생제에 의해서 callus의 성장도 저조하였을 뿐만 아니라 대조구와 비교해 볼 때 재분화율도 상당히 낮게 나타났다. 대부분의 embryogenic callus 들이 갈색으로 변하기 시작하면 거의 대부분의 callus clump들의 고사되는 것을 관찰하였다. 선발 8주 후 소수의 callus에서 재분화가 시작되면서 먼저 뿌리가 생성되면서 줄기부분은 상당히 적거나 거의 없는 형태의 옥수수가 재분화되기 시작했다.

### 3. 제 3 차년도

#### 가. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

##### 1) 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2005년)	1. 대상식물의 형질전환 및 지속적인 선발	▶ <i>Agrobacterium</i> 형질전환 및 지속적인 선발
	2. 형질전환체 확인	▶ PCR에 의한 선발 ▶ Southern 분석 ▶ 형태학적인 분석 (잎모양, 길이, 성장속도등)
	3. 형질전환체의 발현분석	▶ Northern 분석을 통하여 mRNA의 발현정도를 분석 ▶ 리그닌 함량분석 및 셀룰로즈 함량분석
	4. 온실 증식	▶ 선발된 형질전환체의 온실대량증식 ▶ 지속적인 형태학적인 분석과 분자생물학적인 분석

#### 나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도(점수)
3차년도 (2005년)	▶ 형질전환체들의 지속적 선발을 통하여 성장, 발육형태를 비교하고, F5H antisense 이에 따른 lignin함량 등을 검정하고 측정한다.	* 형질전환체의 성장, 발육형태 비교 유무 (20) * 4-CL, F5H, lignin 함량의 data 유무 (10)

다. 연구개발 목표의 달성도

구 분	연구 개발 목표	목표 달성도
3차년도 (2005년)	1. 대상식물의 형질전환 및 지속적인 선발	▶ <i>Agrobacterium</i> 형질전환개체 선발 완료
	2. 형질전환체 확인	▶ 형질전환체의 PCR에 의한 선발완료 및 Southern 분석완료
	3. 형질전환체의 발현분석	▶ Northern 분석을 통하여 mRNA의 발현정도를 분석완료 ▶ 형태학적인 분석 (잎모양, 길이, 성장속도) 완료 ▶ 리그닌 함량분석 및 셀룰로즈 함량분석
	4. 온실 증식	▶ 선발된 형질전환체의 온실증식완료

1) 형질전환체들의 지속적 선발을 통하여 성장, 발육형태를 검증

계속적인 항생제 선발하에서 유기된 재분화개체들은 성장조절 무첨가 배지에 치상하여 발육을 유기하였다. 이들 배지는 저 농도의 hygromycin (20 µg/ml)를 사용하였지만 성장속도가 대조구와 비교해 볼 때 상당히 느린 것이 관찰되었다. 따라서 기내성장을 더욱 촉진시키기 위해서 치상 3개월 후 부터 계대배양 시 항생제 무첨가 배지에 치상하였다.

형질전환체 확인을 위해 성장한 옥수수 4개 재분화 개체에서 genomic DNA를 분리한 후 Hygromycin primer를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 선발된 형질전환체 모두에서 hygromycin 유전자가 증폭된 것을 보아 이들 모두 외부에서 antisense F5H 유전자를 가지고 있다는 것을 추측하게 할 수 있었다. 이들 형질전환체들에서 total RNA를 분리한 후 F5H 유전자를 probe로 하여 northern 분석 수행하였다. 정상적인 옥수수와 형질전환체로 확인된 식물에서 northern 분석을 통하여 본 결과 형질전환체마다 RNA level이 서로 간에 많은 차이를 보여 주고 있다. 이는 antisense F5H가 정상적인 F5H 유전자를 서로 다른 정도로 유전자 발현을 suppressing 하고

있다는 것을 의미한다.

## 2) 형질전환체의 lignin함량의 검정 및 측정

분자생물학적인 방법으로 확인된 재분화 개체들은 화분에 이식하여 온실에서 계속적인 성장을 유도하였다. 온실에서 성장한 옥수수에 대한 리그닌 분석을 수행하여 data를 수집하였다. 형질전환체들의 잎을 사용하여 리그닌 분석은 다음과 같이 수행하여 분석한 결과

대조구는 리그닌 함량이 12.223이 나타났다. 형질전환체의 리그닌 함량은 11에서 9까지 다양하게 나타났으며 대조구와 비교해 볼 때 리그닌 함량이 감소된 것으로 나타났다. 형질전환체의 리그닌 함량의 평균치는 10.19로서 대조구와 비교해 볼 때 약간 정도의 낮은 수치를 보여 주었다.

Antisense F5H 유전자가 들어 있는 형질전환체는 대조구에 비해 약간의 lignin 함량이 적은 것으로 조사되었다. 현재의 결과로 보아 리그닌 함량의 차이는 크게 나타나지 않았지만, 이는 식물체가 성장 상당히 저해되어 있는 상태에서 시료를 사용하여 조사하였기에 표5에서와 같은 결과가 도출되었으리라 분석된다. 하지만 엽형분석을 통하여 대조구와 비교해 볼 때 이들 형질전환체의 형태적인 차이점이 상당히 있는 것으로 미루어 볼 때 antisense F5H 유전자가 식물체내에서 발현을 억제하고 있는 것을 의미한다.

## 제 2 절 관련 분야에의 기여도

### 1. 4CL 과 F5H genomic 수준에서 유전자 분리 성공

본 과제에서 제안되어진 4CL과 F5H 유전자를 RNA 수준이 아닌 genomic 수준에 분리를 성공하였으며 이는 국내외를 막론하고 리그닌 관련 유전자들이 genomic DNA 수준에서 분리 및 성격규명은 최초로 사료된다.

### 2. Genomic DNA 수준에서 유전자 분리가능

본 연구에서 개발된 long PCR 기법을 토대로 하여 직접 genomic DNA에서 타 유용 유전자 분리가 가능하다. 이는 genomic 이나 cDNA library의 구축없이 유전자 분리가 가능하여 향후 유전자관련 연구에 많은 도움이 되리라 사료된다.

### 3. 인위적인 리그닌조절을 통한 신제품 창출의 기대

본 연구과제에서 확인되었듯이 생체 내에 리그닌 합성을 감소시킬 수 있다는 것을 증명하였다. 또한 확보한 full sequence를 통하여 리그닌 증가를 시킬 수 있는 신작물을 창출할 수 있어 FTA시대에 접해있는 국내의 농업인들에게 고부가가치 및 희소성의 농작물의 창출로 인한 국내외의 경제력 향상을 기대할 수 있다고 사료된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 후속연구의 필요성

- 가. 리그닌 관련 antisense RNA 벡터를 사용하여 식물체에 리그닌 감소가 확인되었으므로 향후 이들 벡터를 사용하여 다양한 농작물에 응용이 가능하다. 새로운 식물의 개발은 많은 형질전환체의 생성이 필요하므로 다양한 품종의 연구와 더욱 정밀한 재분화 체계의 개발이 추가적으로 필요하다고 사료된다.
- 나. 본 연구에 제시된 antisense cloning 뿐만 아니라 sense 유전자도 cloning을 성공적으로 수행하여 보유하고 있다. 따라서 이들 sense와 antisense를 사용하여 RNAi vector 구축을 추가적으로 필요하다고 사료된다. 보다 효과적인 리그닌 감소기법은 antisense 기법보다 RNAi vector 기법이 효율적이라고 사료되며 추가적인 연구에 의해 최초로 리그닌 관련 RNAi vector 구축을 통하여 신품종 창출을 기대할 수 있다.
- 다. 개발된 long PCR 기법을 통하여 genomic DNA에서 증폭 및 분리가 가능하여 보다 리그닌 관련 다른 유전자 예를 들면 OMT, CAD, PAL 유전자들의 분리도 가능하리라 사료된다. 이들 유전자들의 antisense 및 RNAi vector를 구축 가능함으로 향후 리그닌 관련 품종개량을 할 수 있다고 사료되어 이 분야에 후속적인 연구가 필요하다고 사료된다.
- 라. 리그닌의 역할은 식물체 유지하는 것뿐만 아니라 병원균에 대한 저항성에 관여된다는 보고가 있다. 따라서 본 연구에서 발표된 저 리그닌을 가지는 형질전환체는 병에 저항성의 감수성 여부를 추후 함께 연구하여 병원균 감수성이 저하되지 않지만 보다 저 리그닌을 가지는 식물체 생성을 개발하여 우수 사료작물을 생성에 관한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

### 2. 기술적인 개선의 필요성

4CL과 F5H 유전자들의 성공적인 분리와 antisense vector의 구축을 하였으나

옥수수 재분화율이 많이 떨어지는 것이 관찰되었다. 특히 이들 옥수수는 hygromycin에 아주 약한 내성을 보여 주어 대부분의 callus들이 고사되는 현상이 일어났다. 따라서 본 연구에서 수행한 4개의 품종이외에도 여러 우수품종의 옥수수에 형질전환체를 유도한다면 다양한 종류의 저 리그닌을 포함하는 신품종 옥수수 창출이 가능하리라 사료된다.

### 3. 타 분야로의 응용

구축된 antisense vector를 통하여 리그닌 감소가 확인 되었으며 4CL과 F5H 유전자들은 다른 식물과 homology를 비교해 볼 때 상당히 높아 본 연구에서 개발한 벡터를 사용해서 다른 유용작물에 응용이 가능하다. 특히 화훼분야에 이들 리그닌 관련 유전자를 도입하여 리그닌 감소 혹은 sense vector를 통하여 증가시킴으로서 고부가가치 농업에 일조를 할 것으로 사료된다.

### 4. 논문 발표 및 기술이전

이미 본 연구를 통하여 얻은 결과를 3년차 초반기에 한국식물생명공학회에 4건을 발표하였으며 현재까지 연구결과들을 정리하여 논문을 발표하기 위하여 준비를 진행하고 있다. 또한 확인된 4CL과 F5H 유전자들의 genomic 염기서열을 NCBI에 발표중에 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구는 국내에서 아직까지 알려져 있지 않는 리그닌관련 유전자의 발굴과 새로운 식물의 창출로서 사료작물의 개발 이외에도 환경오염을 고려한다면 그 중요성 및 필요성이 더욱 더 높아진다고 판단된다. 국외에서는 이 분야의 연구를 활발하게 진행하고 있는 미국 North Carolina, 대학교의 Dr. Chiang는 aspen에서 분리한 OMT유전자의 antisense유전자를 이용하여 포플라류와 침엽수에의 도입을 진행 중에 있으며 최근 발표한 연구결과에 따르면 리그닌의 함량 감소외에 리그닌의 구조변화에 의해 목재의 색깔이 원래의 색에서 진홍색 또는 연홍색으로 변함을 보고하였다. 이들은 OMT 유전자가 lignin을 효과적으로 knock-out을 시키지 못한다는 10여년간의 연구결과로 인해 4CL을 사용한 RNAi vector를 사용할 예정이다. 따라서 본 연구결과는 미국의 첨단생명공학과 견줄만한 리그닌 관련 유전자의 분리와 antisense vector 그리고 RNAi vector 조제 기술을 보유하고 있어 향후 리그닌 분야에 선도적 역할을 할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

## 제 7 장 참고문헌

Alain M. Boudet<sup>1</sup>, Shinya Kajita<sup>2</sup>, Jacqueline Grima-Pettenati<sup>1</sup> and Deborah Goffner. Lignins and lignocellulosics. vol6. no12. pp576 - 581. Trends in plant science (2003)

Armstrong, C.L. and Green, C.E. (1985) Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 164, 207-214.

Bugos, R. C., Chiang, V. L. C. and Campbell, W. H. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol. Biol.*, 17:1203-1215 (1991).

Draper, J., Scott, R., Armitage, P., and Walden, R. 1988. Plant genetic transformation and gene expression. Oxford, The Alden Press

Dwivedi U. N., Campbell, W. H., Yu, J., Datla, R. S. S., Bugos, R. C., Chiang, V. L. C. and Podila, G. K. : Modification of lignin biosynthesis in transgenic tobacco through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol. Biol.* 26:61-71.

Efraim L., Lothar B., Yehuda M., and Jonathan G. Flavanone Glycoside Biosynthesis in Citrus. 91:1323-1328 (1989)

Elkind Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S. A., Rivak, O., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. : Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 87:9057-9061 (1991).

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.

Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A. M., Boon, J.J., Chabbert, B., Tollier, M. T. and Schuch, M. : Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.*, 6:339-350 (1994).

Higuchi, T. : Biosynthesis of lignin. In T Higuchi, eds, Biosynthesis and

biodegradation of wood components. Orlando, Academic Press, pp. 141-160 (1985).

Joel, Piquemalm Catherine L., Kate M., Ann O., Wolfgang S., Jacqueline G., Alan B. : Down-regulation of Cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants, *Plant J* pp 71-83 (1998)

Leyva A., Jarillo J. A., Salinas J. and Martinez-Zapater J. M. Low Temperature Induces the Accumulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone Synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a Light-Dependent Manner. *Plant Physiol.* 108: 39-46 (1995)

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : *Molecular cloning: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor lab. N.Y. (1989).

Michael F., Virginia W, *The maize handbook,* Cold Spring Harbor lab. N.Y. 1994

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-499.

Nakano, J. M. : The detection of lignin. In S. Y. Lin and C. W. Dence, eds, *Methods in lignin Chemistry.* Berlin, Springer-Verlag, pp23-32 (1992).

Ni, W. T., Pavia, N. L. and Dixon, R. A. : Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene. *Transgen. Res.* 3:120-126 (1994).

Parsons, T. J, De Bradshaw H. Jr., Gordon, M. P. : Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in poplar trees. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:7895-7899 (1989).

Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. J., Masoud, S. A. and Howles, P.A. : Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology.* 115:41-50 (1997).

Ye, J. H. and Varner, J. E : Differential expression of two o-methyltransferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 108:459-467 (1995).

Ye, Z. H. : Association of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissue in several dicot plants. *Plant Physiology.* 115:1341-1350