

T0009593

최            중  
연구보고서

# 합성 유전자를 이용한 과산화작용 제초제 저항성 형질전환 벼 육성과 포장안정성 제초제 실증 실험

Development of Transgenic Rice Resistant to Peroxidizing Herbicides  
by Using a Synthetic Protoporphyrinogen Oxidase Gene and  
Utilization Tests in Field

연구기관  
전남대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “합성 유전자를 이용한 과산화작용 제초제 저항성 형질전환  
벼 육성과 포장안정성 제초제 실증 실험” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 07월 14일

주관연구기관명 : 전남대학교  
총괄연구책임자 : 백 경 환  
세부연구책임자 : 구 자 옥  
연 구 원 : 강기윤, 강세이,  
김찬수, 이용혁,  
이천희, 양기웅,  
임보영, 정선요,  
정하일

# 요 약 문

## I. 제 목

합성 유전자를 이용한 과산화작용 제초제 저항성 형질전환 벼 육성과 포장안정성 제초제 실증 실험

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

과산화작용제초제(Peroxidizing herbicides)는 식물체내의 Prototporphyrinogen oxidase 효소(Protox)를 억제하여, 이로 통한 식물체내의 비 이상적인 광활성물질(photodynamic compounds)이 축적되어, 식물의 원형질막을 파괴하여 식물체를 죽이는 제초기작을 가진 제초제군들이다. 전 세계적으로 13개 농약회사에서 27종의 다양한 peroxidizing herbicides를 생산하고 있으며, 한 개의 targeting 효소(Protox)를 공격하는 제초제중에서 가장 많은 상품이 개발된 제초제이다(표 1).

1960년도부터 상업화된 이들 제초제는 대두, 벼, 목화, 땅콩 등의 세계적 주요 작물지에 광범위하게 사용되는 제초제로서, 극미량 처리로도 제초효과가 뛰어나고 살초범위가 넓은 탁월한 제초제이다. 또한 비수용성으로 식물체나 토양입자에 쉽게 흡착되며 광산화에 의해 곧바로 분해되기 때문에 잔류독성이 낮은 장점이 있는 제초제이다(Lee 1997, Scalla & Matringe 1994). 1960년대에 개발된 이후, 비교적 이들 제초제의 생리 생화학 및 분자적 연구는 많은 진전이 있음에도 불구하고, 이들 제초제에 대한 저항성을 발현하는 형질전환작물은 아직 상업화되지 않은 실정이다.

제초제의 표적효소가 Protox로 발견됨에도 불구하고, 또한 가장 많은 제초제군이 등록 시판됨에도 불구하고 이들에 저항성을 발휘하는 제초제저항성 작물개발이 현재까지 실현되지 못한 이유는 첫째는 Protox 효소가 두 개의 서로 다른 소기관(엽록체 및 미토콘드리아)에 각각 존재하여, 두 유전자를 한꺼번에 발현시

켜야 하는 기술적인 어려움 때문이며, 둘째는 Monsanto사의 glyphosate 처럼 단일회사의 단일제품이면, 제초제 저항성 작물개발의 상업성효과가 큰데 반해 Peroxidizing 제초제는 많은 회사에서 수십 종류의 제초제가 개발 판매되기 때문에 수천만 달러를 투자하여 연구개발 투자를 하지 않는 점도 또 다른 원인이 될 수 있는 것으로 판단된다. 셋째로 Syngenta 사에서 엽록체발현 저항성 Protox(제초제저항성인 점돌연변이 Protox)를 이용한 제초제저항성 형질전환작물에 대한 기존 특허 때문에(Volrath et al. 1997), Syngenta 특허를 침해하지 않고 개발할 수 있는 다른 대안이 부족하다고 생각하였기 때문이기도 하다.

상기 열거한 여러 가지 기술적인 및 Syngenta사의 선행특허에 대한 제한점에도 불구하고, 본 연구팀은 1997년 농림기술개발과제 특정과제 사업으로부터 연구비를 기점으로, Peroxidizing 제초제에 대한 연구를 7년 이상 계속 수행한 결과, 상기의 기술적인 어려움과 선행특허를 침해하지 않는, 새롭고 탁월한 방법으로 이들 제초제에 대한 저항성작물을 육성하는 데 성공하였다.

따라서 본 연구는 본 연구팀에서 *M. xanthus* Protox 유전자를 이용하여, 개발한 Peroxidizing 저항성벼의 포장단위 실험을 지속하여 실제농가에 사용할 수 있는 제초제실증실험 및 생육특성조사를 수행하고자 하며, 또한 제초제 저항성을 최대한 발휘할 수 있도록 1417 bp의 *M. xanthus* 유전자의 GC 함량(70%)을 식물수준에 맞도록 조정하고, codon usage를 식물 유전자와 유사하게 바꾸어 줌으로, *M. xanthus* Protox의 발현량을 식물체에서 가장 적절하게 발현되게 함으로 제초제 저항성효과를 극대화하는 실험을 하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

첫째는 본 연구팀에서 *M. xanthus* Protox 유전자를 이용하여, 개발한 Peroxidizing 저항성벼의 세대간 안정성( $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ )이 유지되는 지를 조사하며, 벼 재배지에서 효과적으로 사용될 수 있는 제초제의 농도 및 시기를 규명하고, homozygous lines의 세대진전에 따라 안정적으로 유전자가 발현되는지 및 제초제 저항성이 지속적으로 유지되는 지를 아울러 조사한다. 또한  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  세대에서의 제초제저항성 형질전환벼의 생육특성 및 수량에 영향을 미치는지를 조사한다. 제초제저항성벼의

포장단위 실험을 지속하여 수도에서 사용가능한 peroxidizing 제초제의 종류와 약량 검정을 통하여, 장차 실제농가에 사용할 수 있는 제초제실증실험의 예비 자료를 얻고자 함이며, 둘째는 제초제 저항성을 최대한 발휘할 수 있도록 합성유전자를 제조하고 이를 이용하여 형질전환 벼를 육성하고자 한다. 471개의 아미노산에 1416 bp 길이(TAA 포함)를 가진 *M. xanthus* 유전자는 GC 함량(70%)이 매우 높아서 식물에 도입되었을 경우 발현량이 낮은 단점이 있으므로, 높은 GC 함량을 식물수준에 맞도록 조정하고(>50%), codon usage를 식물 유전자와 유사하게 바꾸어 줌으로, *M. xanthus* Protox의 발현량을 식물체에서 가장 적절하게 발현되게 함으로 제초제 저항성효과를 극대화하는 실험을 하고자 한다.

구체적인 실험 방법을 요약하면 다음과 같다.

- 합성 Protox 유전자를 만들기 위해 70-80 mer primers를 24-32개를 합성하여, bridge 연결방법식으로 유전자를 합성하고자 한다(Donohue et al. 1995).
- 합성된 *M. xanthus* Protox 유전자가 효과적으로 translation 되는지를 대장균 (*E. coli*) 발현 vector을 사용하여 검정하며, 또한 효소활성이 있는지 정제된 Protox 단백질을 사용하여 측정한다.
- 효소활성이 정상인지를 확인한 후 binary vector에 도입하여 벼에 형질전환한다.
- 형질전환은 *Agrobacterium* 매개 방법을 이용한다.
- 형질전환벼가 확보되면, 합성 유전자의 발현이 제초제 저항성을 얼마나 높이는지 제초제 저항성 검정을 한다.
- 합성 Protox 단백질이 엽록체 및 미토콘드리아에 발현되는지, 효소활성이 native Protox 발현 형질전환벼에 비해 얼마나 발현되는지 등의 세포생물학적 방법을 사용한다.
- 형질전환벼의 생육 안정성, 수량지표 및 제초제 저항성 반응 등을 검정한다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. *Myxococcus xanthus* Protox 유전자의 화학적 합성 및 형질전환체 육성

*M. xanthus* Protox 유전자는 1416개의 nucleotide로 이루어져있고, 그 중에서 adenine이 14%, cytosine이 34%, guanine이 37%, thymine이 15%로 구성되어 있으며, 전체 유전자 서열에서 GC의 비율이 70%을 넘는다. 이렇게 높은 GC 함량의 비율은 미생물 유전자의 특징이기도 하며, 이런 유전자를 식물에 도입시 transgene의 발현율이 매우 낮거나 적절하게 발현되지 않는것이 보통이다. 따라서 합성 Protox를 고안 할 때 GC 함량의 비율을 식물평균인 48-50%로 유지되도록 하였다. 미생물 Protox 유전자의 높은 GC 함량은 대부분 codon usage의 차이에 기인한다. 총 길이 1416 bp Protox 유전자를 합성하기 위하여 70-80 mer 길이의 oligo를 제작하여, 각 oligo 간의 3' 및 5' - 끝 부분이 10-12개의 complimentary sequence를 주어, 서냉복원(annealing)시 결합되도록 한 후, DNA polymerase 로 double strand 단편을 합성한다. Internal 부위에 적절한 제한효소 부위로 자른 다음, ligation를 하고, 양끝의 primers를 이용하여 fragment A(253 bp)를 합성한다. 합성된 fragment는 pBluescriptSK vector에 클로닝하여 염기서열을 분석한다. 이러한 단편(200-300 bp) 총 6개의 단편(A-F)을 만들고 최종적으로 6개의 단편을 ligation 하여 합성 *M. xanthus* Protox 유전자를 제조하였다. 합성 Protox 가 Protox 활성을 가지는지 알고자, *E. coli* 발현벡터(pET28b) 에 클로닝하여, 재조합 Mx Protx 효소를 정제하였고, 정제된 recombinant Protox 가 효소활성을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 정제된 재조합 Protox 단백질을 이용하여 항체를 제작하였다. pBluescript에 함유된 합성 프로토포르피리노젠 옥시다아제 유전자를 제한 효소 *HindIII* 및 *KpnI*를 이용하여 절단하고, 같은 부위로 절단된 binary vector pGA1611에 합성 유전자를 삽입시켜, 합성된 프로토포르피리노젠 옥시다아제의 전장 유전자를 발현할 수 있는 바이너리 벡터 pGA1611:SynMp를 제조하였다. pGA1611:SynMP 재조합 벡터로 아그로박테리움 속 미생물을 형질전환하고 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 벼를 형질전환하였다. 최종적으로 20여종의 independent 형질전환 lines을 획득하였다.

## 2. 합성 *M. xanthus* Prottox 유전자를 발현하는 형질전환체의 제초제 저항성 검증

Oxyfluorfen 1  $\mu\text{M}$ 이 함유된 배지에서는 형질전환하지 않은 대조구의 벼 종자는 발아하지 못한다. 100-200  $\mu\text{M}$  농도의 oxyfluorfen이 들어 있는 배지에서 형질전환체의 제초제 저항성을 비교 검증하였다. 모든 형질전환체에서 대조구와는 비교가 안 될 만큼의 높은 저항성을 발휘함을 확인 할 수 있었다. Native 와 합성 *Mx* Prottox을 발현하는 형질전환체의 biomass를 비교해 보면, S11과 S19의 생체중이 M4과 M7의 생체중보다 높은 경향을 보여 주었다. 100  $\mu\text{M}$  농도의 oxyfluorfen에서 성장한 S11 및 S19의 생체중은 무처리의 생체중과 같으나, M4와 M7은 10-15%의 생체중이 감소하는 경향을 나타내었다. Oxyfluorfen이 없는 배지에서 자란 native *Mx* Prottox 발현형질전환체는 초기생장이 지연되거나 억제되는 경향을 보여 주지만 후기 생장은 대조구와 비슷해지는 경향을 보였다. 반면, 합성 *Mx* Prottox을 발현하는 벼는 초기 생장이 약간 증대하는 경향을 나타내었다. 이와같은 경향은 T<sub>2</sub> 세대에서 나타나는 일시적인 현상인지 아니면 transgene의 효과인지는 후대 세대에서 검증이 필요하리라 생각된다. 또 다른 한편으로 제초제 저항성을 보기위해 1 mM 농도의 oxyfluorfen을 경엽처리하였다. 대조구인 형질전환하지 않은 벼의 잎은 완전히 고사됨을 볼 수 있거나, 형질전환체는 모두 전혀 피해를 받지 않음을 확인 할 수 있었다. 이는 native *Mx* Prottox 및 합성 *Mx* Prottox을 도입한 형질전환체는 모두 높은 저항성을 가지게 됨을 확인 할 수 있게 되었다. 결론적으로 합성 *Mx* Prottox 유전자를 도입 할 경우, native *Mx* Prottox 발현체와 같거나 높은 정도의 과산화작용제초제에 저항성이 부여됨을 확실히 알 수 있게 되었으며, 합성 *Mx* Prottox는 native *Mx* Prottox 보다 낮은 G+C 함량의 유전자 구조를 가지지만, 아미노산 서열은 차이가 없기 때문에, G+C 함량의 차이는 transcription level이 아닌, translation efficiency에 영향을 미친다. 합성 *Mx* Prottox의 단백질 발현율이 낮은 이유는 전이효율이 떨어지기 때문임을 확인 하였다. 따라서 벼에서 *Mx* Prottox 단백질 발현은 높고 낮음이 문제가 아니라 제초제 저항성을 충분히 줄 수 있을 만큼 발현시키는 것이 중요하고, 적절하게 발현시킴으로서 *Mx* Prottox 유전자의 과다발현에 의한 형질전환세포내의 transgene의 과다발현에 의한 광활성물질의 축적에 대한 세포내 손상을 최소한 유지하는 측면에

서 G+C 함량이 낮은 합성 *Mx* Protox 유전자의 활용성이 높을 것으로 예측된다.

### 3. *Mx* protox 유전자를 selectable marker gene으로서 이용 및 형질전환벼 육성

과산화작용 제초제인 butafenacil를 selection agent로 사용하고, selectable marker gene은 *Mx* Protox 유전자를 이용하여 벼형질전환을 시도하였다. 사용한 butafenacil 농도는 0.1  $\mu$ M이고 pCAMBIA0380:*Mx* Protox를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 와 동진벼 배반에서 유래한 calli 와 공조배양을 일반적인 방법으로 수행하였다. 공조배양이 끝난 후, selection 과정에는 2,4-D 2 mg/L 및 butafenacil 0.1  $\mu$ M 농도로 들어있는 2N6 배지에서 암상태에서 3주간 배양 후, 3일간 빛 상태에 노출시켜 광활성제초제의 제초효과를 유도하였다. 이렇게 함으로 선발중 형질전환되지 않는 cells를 효과적으로 제거 할 수 있었으며, 다시 3 주간 암상태에서 선발을 지속하였다. 약 6주간의 선발과정을 끝내고 calli 들을 butafenacil 0.1  $\mu$ M 농도가 들어있는 재분화배지에서 shoot 출현을 유도하였다. 약 3주 후부터 클로로필이 형성되기 시작하였으며, 클로로필이 형성된 세포주에서부터 shoot 가 출현하기 시작하였다. 그 후 출현된 shoot를 butafenacil 0.1  $\mu$ M 농도로 들어있는 Murashige & Skoog 배지에 치상하여 건강한 root를 획득하였다. 총 18개의 독립적인 calli에서 유래한 형질전환벼를 획득하였으며, 분자적 실험 및 제초제 저항성 실험을 수행하기 위해 생육이 좋은 개체를 random으로 6개체를 선택하여 다음 실험을 위한 재료로 사용하였다. 형질전환벼 및 대조구인 wild type으로부터 옆 절편을 취하여 제초제 butafenacil에 대한 저항성을 조사하였다. 사용한 농도는 5 - 50  $\mu$ M 분포로 조사하였다. 옆 절편에 butafenacil을 처리할 경우 1  $\mu$ M 농도에서 옆이 완전히 고사하였다. *Mx* Protox 유전자를 발현하는 모든 형질전환체에서 획득한 leaf discs 에서는 처리한 모든 농도에서 전혀 고사현상을 보이지 않았다. 그러나 형질전환하지 않은 대조구에서는 모두 고사하였다. Leaf discs에서 나타내는 제초제 저항성이 제초제를 식물체에 옆면 처리하여도 똑 같은 현상을 보이는지 조사하기 위해 T<sub>0</sub> 형질전환체를 이용하여 butafenacil 을 5  $\mu$ M 농도로 처리하였다. 처리 후 광 상태 하에서 5일째 잎을 조사하여 식물의 고사정도를 비교한 결과 형질전환체에서는 모든 라인에서 고사현상이 전혀 발견되지 않았으나, 대조구인

wild type은 완전히 고사하는 것으로 보아 *Mx* Protox 유전자를 발현하는 형질전환벼는 butafenacil 제초제 저항성이 발휘하는 것으로 증명되었다. Butafenacil 에 대한 저항성은 같은 계통의 다양한 과산화작용제초제에 공히 저항성을 발휘하게 됨으로 추후 *Mx* Protox 유전자를 형질전환세포주의 선발 marker 유전자로 butafenacil을 selection agent 로 광범위하게 이용할 수 있다.

#### 4. *Mx* Protox 발현 형질전환벼의 생육 및 포장안정성 검정

*M. xanthus* Protox 유전자를 발현시킨 형질전환 벼 8계통, TC(동진벼에 vector 만 삽입), 그리고 재배벼(동진벼)의 실제 포장에서의 생육과 포장안정성을 검정하기 위하여 다양한 분석과 대면적에서의 수량성을 평가 및 분석하였다. 형질전환벼의 수량성은 T<sub>3</sub> 세대부터 T<sub>5</sub> 세대까지 3년 동안 평가를 실시하였다. 그 결과 T<sub>3</sub> 세대에서는 재배벼에 비하여 형질전환 벼의 수량이 높게 나타났으나, T<sub>4</sub> 세대 및 T<sub>5</sub> 세대에서는 수량지수로 93%에서 91%로 약 7-9%의 수량이 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 유효분얼수에 있어서 비형질전환 벼(WT)와 형질전환 벼(M4)는 유의성이 없는 반면에 주당영화수 및 천립중이 작아지므로서 최종적인 수량이 떨어지는 주요 요인으로 생각된다. 부가적으로, 이삭길이 또한 비형질전환 대조구 벼(WT)가 18.7 cm, 형질전환 벼(M4)가 16.6 cm로 약 2 cm 정도 작음을 확인할 수 있었다.

실제 관행재배 시 논 포장조건하에서 native Protox 발현 형질전환벼(T<sub>4</sub> 세대)의 제초제 반응에 의한 포장안정성 검정은 형질을 전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 육묘하여 이앙하고 이앙 후 10일에 5가지의 Protox 저해형 제초제를 처리하여 수확기에 수량구성요소를 조사함으로써 실제포장에서 형질전환 벼(M4)의 사용가능성을 검토하였다. 5가지 Protox 저해형 제초제 모두에서 형질전환 벼의 M4계통은 무처리와 비교한 결과 전혀 생산성 차이가 없었고, 비형질전환 대조구 벼의 WT와 형질전환벼의 TC계통은 5가지 제초제 모두에서 20-40%가 감소하였으며, 특히 acifluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxyfluorfen에서 약 30-40% 정도로 수량감소가 크게 나타났다. 각각의 수량구성요소를 종합해 볼 때, 주당 이삭수와 이삭길이에 는 차이가 없었으나 주당영화수, 천립중의 감소에 기인하여 수

량이 크게 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 형질전환 벼(M4)는 실제 포장에서 안정성이 확보됨을 확인할 수 있었다.

형질전환벼(native Protox 발현)의 정확한 제초제 저항성 정도를 평가하기 위한 일련의 연구는 온실조건에서 이루어졌으며, whole-plant 검정 결과 oxyfluorfen에 가장 높은 저항성을 보였고, 다른 Protox 저해 제초제(과산화작용 제초제)인 acifluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon에도 높은 교차저항성을 보였다. 그러나, ALS 저해 제초제인 imazapyr와 photosynthesis 저해 제초제인 paraquat dichloride에선 저항성이 전혀 없었다. 이는 *M. xanthus* Protox의 과다발현이 예상대로 과산화작용 제초제군만 한정해서 나타나는 것을 보여주며, Protox 효소를 공격하는 다양한 계통의 과산화작용 제초제군에 광범위하게 저항성을 보여줌을 알 수 있었다. 형질전환 벼(M4)와 비형질전환 대조구 벼(WT)의 3엽기 때, acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon을 처리하였으며, 이 때 저항성인 형질전환 벼(M4)와 감수성인 비형질전환 대조구 벼(WT)의 지상부 생체중에 기초한 GR<sub>50</sub>값은 각각 15, >200, >12, 그리고 5배 높았다. 그리고, imazapyr와 paraquat dichloride는 각각 1배로 저항성 차이가 없었다. 이상의 whole-plant 검정은 정확한 저항성 정도를 판단하기 위함과 다른 분석법의 효과를 평가하는 데 기준으로 삼고자 사용하였다.

세포내 생리적인 변화를 검정하기 위한 세포내 구성물질의 누출(conductivity change)과 세포막 지질과산화작용(MDA production) 또한 whole-plant 검정과 거의 유사한 경향으로 비형질전환 벼(WT)는 acifluorfen과 carfentrazone-ethyl에선 1  $\mu$ M, 그리고 oxyfluorfen과 oxadiazon에서는 0.1  $\mu$ M 이상의 농도로 처리했을 때부터 점진적으로 그 생성량이 증가하였다. 그러나, 형질전환 벼(M4)는 acifluorfen의 100  $\mu$ M 이상 농도부터 약간 증가함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 T<sub>4</sub> 세대 형질전환벼(native Protox 발현)의 GR<sub>50</sub> 값(지상부 생체중이 50% 감소하는 제초제 농도)에 의한 제초제 저항성 정도 평가와 세포내 구성물질의 누출 그리고 세포막 지질과산화작용이 상호간에 유사한 상관관계를 나타냄을 의미한다. 그리고 native Protox 발현 형질전환벼에 대한 Protox 저해 제초제의 GR<sub>50</sub> 농도 처리에 따른 생리적 반응을 비교하였다. 형질전환 벼(M4)와 비형질전환벼(WT)의 잎 조직에서 4가지 Protox 저해형 제초제 처리에 따른 엽록소 함량의 감소와 세포막 지질과산화작용은 무처리에 비교한 결과 oxyfluorfen에서 약 50% 정도로 지상부

생체중에 의한 50% 감소와 거의 유사한 경향으로 감소됨을 확인 할 수 있었고, 나머지 3가지 제초제는 50%보다 조금 높게 나타났다. 그리고 형질전환벼(M4)는 이상의 4가지 제초제에 거의 피해를 받지 않았다. 여러 스트레스와 상호 연관성이 확인된 항산화 효소의 활성과 isozyme 패턴을 분석하므로써 형질전환벼(M4)와 비형질전환 대조구 벼(WT)의 항산화 효소의 관련성 여부를 알아보기 위한 실험에서 총 4가지의 항산화 효소의 활성을 확인한 결과, 4가지 Protox 저해형 제초제 처리에 의한 영향은 비 형질전환 벼(WT)에서 APX, GR, 그리고 POD 활성이 거의 동일한 경향으로 높게 나타났으며, CAT 활성은 제초제의 영향으로 조금 증가함을 확인할 수 있었다. 그리고 형질전환 벼(M4)에 있어서는 CAT와 GR 활성에는 무처리와 동일하게 나타났으나 APX와 POD 활성은 다소 이루어짐을 확인할 수 있었다. Isozyme 패턴에 있어서, 4가지 항산화효소 모두에서 발현이 높음을 확인할 수 있었으며, 특히 POD와 APX에서 확연하게 차이가 남을 알 수 있었다. 비 형질전환 대조구 벼(WT)에서의 항산화 효소들의 활성과 isozyme 패턴은 4가지 Protox 저해형 제초제의 처리에 감응하여 그 제초제 스트레스를 이겨내기 위하여 활성을 높이는 반면 형질전환벼(M4)에선 위의 4가지 제초제 처리가 거의 스트레스로 작용하지 않기 때문에 활성에 변화가 없는 것으로 추측된다. 이상의 엽록소 함량, 세포막 지질과산화작용, 그리고 항산화 효소의 활성과 isozyme 패턴 분석에서 비 형질전환 대조구 벼(WT)의 지상부 생체중을 50% 감소시키는 농도로 4가지 Protox 저해형 제초제를 처리하였을 때, whole-plant response assay와 정의 상관적으로 저해됨을 확인 할 수 있었다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of transgenic rice resistant to peroxidizing herbicides by using a synthetic protoporphyrinogen oxidase gene and its utilization tests in field.

## II. Objects and Significance

Herbicides targeting the enzyme protoporphyrinogen IX (Proto IX) oxidase (Protox) have been used commercially since 1960 to control annual grasses and dicotyledonous weeds in soybean (*Glycine max*), peanut (*Arachis hypogaea*), cotton (*Gossypium hirsutum* L.), rice (*Oryza sativa*), and other crops (Matringe et al., 1989; Duke et al., 1991; Scalla and Matringe, 1994). Diphenyl ethers, *N*-aryltetrahydrophthalimides, oxadiazon, and flumioxazin are herbicidal Protox inhibitors that, as partial structural analogs of Proto IX, bind to and competitively inhibit Protox activity (Nandihalli et al., 1992). This inhibition prevents oxidation of Proto IX into protoporphyrin IX (Proto IX), thus resulting in the accumulation of Proto IX, which diffuses out of the chloroplasts to the cytoplasm. In the cytoplasm, Proto IX is oxidized to Proto IX via peroxidase-like enzymes that are insensitive to Protox inhibitors. Cytoplasmic Proto IX readily interacts with oxygen under light to form singlet oxygen, which causes peroxidation of membrane lipids and cellular death (Jacobs et al., 1991; Lee et al., 1993).

Tobacco plants possess two Protox isozymes sharing only 27% amino acid identity. One of these isozymes is expressed in chloroplasts and the other is expressed in mitochondria (Lermontova et al., 1997). Genes for both Protox isozymes have played a pivotal role in the development of plants resistant to

Protox-inhibiting herbicides (Choi et al., 1998; Ha et al., 2004; Lermontova and Grimm 2000; Li et al., 2003; Warabiet al., 2001; Watanabe et al., 1998). In this report, we describe the development of transgenic rice plants that overexpress a modified, heterologous Protox gene from the bacterium *Myxococcus xanthus*. When this gene is expressed in transgenic rice plants, *M. xanthus* Protox (*Mx* Protox) is dually targeted into plastids and mitochondria via ambiguous transit signals, increasing resistance to the herbicidal Protox inhibitor oxyfluorfen (Jung et al. 2004). Overexpression of the modified *Mx* Protox transgene in rice confers the greatest resistance to oxyfluorfen that has been reported for rice plants thus far (Ha et al., 2003; Ha et al., 2004; Lee et al., 2000).

*M. xanthus* Protox is a 49-kDa membrane protein that is strongly inhibited by the Protox-inhibiting herbicide acifluorfen (Dailey and Dailey, 1996). The G+C content of *Mx* Protox cDNA (71%) is considerably higher than the G+C contents of Protox cDNAs from plastidic *Arabidopsis* (Narita et al., 1996) or rice (GenBank accession number NM187739) (49 and 58%, respectively). As a result, codon usage in the *Mx* Protox gene differs significantly from that in plant Protox genes (Goff et al., 2002; Murray et al., 1989) as well, leading us to conclude that the bacterial Protox gene might not be efficiently expressed in plants. Therefore, in synthesizing the full-length coding sequence for *Mx* Protox, we altered the codon usage to more closely resemble that of plants without changing the *Mx* Protox amino acid sequence, and we used this synthetic gene to create transgenic rice plants. Rice plants expressing the modified *Mx* Protox gene exhibited greater resistance to oxyfluorfen than did rice plants expressing the native *Mx* Protox gene, despite a lower level of Protox expression. Since a *Myxococcus xanthus* (*Mx*) Protox were shown to confer a high level of resistance to peroxidizing herbicides in transgenic rice, we tried to develop transgenic rice plants by using the *Mx* Protox gene as a selectable marker gene coupled with the herbicide butafenacil as a selection agent. Finally, we observed the agronomic traits of these transgenic rice plants in field as well as field performance of herbicide resistance

### III. Research Contents and Scopes

In our previous study, we had generated transgenic rice plants expressing a native Protox of *M. xanthus* which conferred a high resistance against peroxidizing herbicides. In our continuation of this study, we would like to investigate this herbicide resistance from generation to generation ranging from T<sub>2</sub> to T<sub>4</sub>. In addition, we will check optimum herbicide concentration for weed control in paddy field in order to maximize the utilization of the transgenic rice plants. During our study, we will also measure the productivity of transgenic rice plants throughout several generation. Another key goal is to synthesize a *M. xanthus* Protox gene by using synthetic oligo nucleotides. This synthetic *Mx* Protox harbors a similar codon usage to plant Protox gene and similar G+C contents which resembles a plant-like gene. After making the synthetic *Mx* Protox gene, we will introduce this synthetic gene into rice genome to produce transgenic rice plants. Then, we will compare herbicide resistance between a native *Mx* Protox and synthetic *Mx* Protox harboring rice plants. Also, we will try to develop a new system for rice transformation using a *Mx* Protox as a selectable marker gene and peroxidizing herbicides as selection agents. Followings are experimental scopes in details.

- Construction of a synthetic gene encoding *Myxococcus xanthus* Protox protein
- Bacterial expression studies and enzyme purification of a synthetic *Mx* Protox
- Antibody preparation and immunoblot analysis using a synthetic *Mx* Protox
- Binary Vector construction and rice transformation
- Protoporphyrinogen oxidase activity and protoporphyrin IX content
- Agronomic traits on transgenic rice plants expressing a native *Mx* Protox
- Agronomic traits on transgenic rice plants expressing a synthetic *Mx* Protox

- Herbicide performance transgenic rice plants in field
- Calli viability test in response to various peroxidizing herbicides
- Vector construction and rice transformation using a *Mx* Protox/Butafenacil system
- Molecular analysis of transgene integration and expression
- Leaf disk and foliar spray assays for butafenacil resistance

#### IV. Results and Suggestion on Utilization of Results

Protoporphyrinogen oxidase (Protox) is the target enzyme of peroxidizing herbicides. Protoporphyrinogen oxidase (Protox) of *Myxococcus xanthus* (*Mx* Protox) is a 49-kDa membrane protein that catalyzes conversion of protoporphyrinogen IX (Proto IX) into protoporphyrin IX (Proto IX). Upon heterologous expression in transgenic rice plants, *Mx* Protox is dually targeted into plastids and mitochondria, increasing resistance against the herbicidal Protox inhibitor oxyfluorfen. Here, we describe the chemical synthesis of the *Mx* Protox gene by assembling several small, synthetic DNA fragments derived by ligation-PCR. Codon usage in the resulting 1416-bp gene was modified to correspond to that of the *Arabidopsis* Protox gene, a change that resulted in a decrease in G+C content from 71 to 49%. The modified *Mx* Protox gene was used to generate transgenic rice plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. Integration, expression, and inheritance of the transgenes were demonstrated by Southern, Northern, and Western blot analyses. In plants transformed with the modified, low G+C-content *Mx* Protox gene, levels of Protox expression and enzyme activity were low compared to the levels observed for plants transformed with the native *Mx* Protox gene. Nonetheless, like the native gene, the modified gene conferred a high level of resistance to the herbicide oxyfluorfen in a seedling growth test. It has been widely known that the overexpression of *Mx* Protox confers a high level of herbicide resistance in rice. Among the peroxidizing herbicides, butafenacil has

an efficiency ~1000-fold that of oxadiazon, as judged by calli susceptibility tests upon herbicide treatment. Butafenacil (0.1  $\mu\text{M}$ ) was used to select transgenic rice plants expressing *Mx* Protox under the control of the constitutive maize ubiquitin promoter. The ectopic expression of the *Mx* Protox transgene was investigated in the  $T_0$  generation by Northern blot and Western blot analyses. The  $T_0$  transgenic plants expressing the *Mx* Protox gene were resistant to butafenacil based on in vitro leaf disk and in vivo foliar spray tests. Greenhouse and field studies were conducted to compare the growth of transgenic rice plant (*Mx* lines) and wild-type rice plant, and determine rice yield and yield components in transplanted rice culture ( $T_3$ ,  $T_4$ , and  $T_5$  generations). Yield of transgenic rice plant was reduced about 7% to 9% in the field condition ( $T_4$ , and  $T_5$  generations). The reduced yield loss of transgenic plant was directly due to the decreased number of spikelets formed per panicle, 1,000 grain weight, and panicle length. On the other hand, rice yield and yield components of the wild-type and the transgenic rice plants were measured by acifluorfen (5,000g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (500g ai ha<sup>-1</sup>), oxadiazon (1,000g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (500g ai ha<sup>-1</sup>), and pyraflufen-ethyl (500g ai ha<sup>-1</sup>) in a paddy field. Rice yield of the wild-type rice plants was 38, 38, 21, 34, and 22% more loss to acifluorfen, carfentrazone-ethyl, oxadiazon, oxyfluorfen, and pyraflufen-ethyl, respectively, than the untreated control. On the other hand, the transgenic rice plants had no difference on rice yield of treated and untreated control. Result of rice yield indicates that the transgenic rice plant are safe in response to Protox-inhibitor herbicides. In the whole-plant response, shoot fresh weight of the transgenic (M4) rice plants were 15, >200, >12, and 5-fold less affected by acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, and oxadiazon than the wild-type (WT) rice plants, respectively. However, imazapyr and paraquat dichloride showed similar response between M4 and WT. In the physiological response, when the transgenic and wild-type rice plants were applied by four-Protox inhibitors, the increase on electrolyte leakage and lipid peroxidation occurred only in the wild-type rice plants.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Overview of project</b> .....	23
Section 1. Aim and necessity of study .....	23
Section 2. Contents of study .....	29
<b>Chapter 2. Status of study in korea and other countries</b> .....	32
Section 1. Our previous results .....	32
Section 2. Progresses in korea and other countries .....	33
<b>Chapter 3. Research contents and Results</b> .....	35
Section 1. Chemical synthesis of <i>Mx</i> Protox and development of transgenic rice plants .....	35
1. Preface .....	35
2. Materials and methods .....	37
3. Results and discussion .....	39
Section 2. Herbicide resistance test of transgenic rice expressing a synthetic <i>Mx</i> Protox .....	56
1. Preface .....	56
2. Materials and methods .....	57
3. Results and discussion .....	62
Section 3. Development of transformation system using a <i>Mx</i> Protox as a selectable marker .....	90
1. Preface .....	90
2. Materials and methods .....	91
3. Results and discussion .....	92
Section 4. Field performance and agronomic trait tests of transgenic rice plants .....	102

1. Preface .....	102
2. Materials and methods .....	103
3. Results and discussion .....	110
<b>Chapter 4. Implementation and contribution to its related field .....</b>	<b>139</b>
<b>Chapter 5. Application of results .....</b>	<b>141</b>
<b>Chapter 6. Recent progresses on related field .....</b>	<b>144</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>146</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	23
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	23
제 2 절 연구개발 범위 .....	29
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	32
제 1 절 본 연구진의 선행연구결과 .....	32
제 2 절 국내·외 타 연구기관의 연구내용 및 결과 .....	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	35
제 1 절 <i>Myxococcus xanthus</i> Protox 유전자의 화학적 합성 및 형질전환벼 육성 .....	35
1. 서 설 .....	35
2. 연구 수행 방법 .....	37
가. 합성 유전자 design 및 Protox 유전자 합성 .....	37
나. 대장균 발현 및 Protox 효소활성 측정 .....	37
다. 벼에서 엽록체 및 미토콘드리아 분리 .....	38
3. 연구 수행 결과 .....	39
가. 식물의 선호 코돈으로 변환한 <i>M. xanthus</i> 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제(Protox) 유전자의 합성 .....	39
1) 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 염기서열 설계 .....	40
2) 이중가닥 DNA 단편의 제작을 위한 단일가닥 올리고뉴클레오타이드의 합성 .....	40
3) 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 합성하기 위한 이중가닥 DNA 단편의 제조 .....	43
4) 이중가닥 DNA 단편의 벡터로의 클로닝 및 염기서열 확인 .....	46
5) 전장(full length) 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 합성 .....	47

나. 합성유전자의 대장균발현 및 항체획득 .....	52
제 2 절 합성 <i>M. xanthus</i> Protox 유전자를 발현하는 형질전환체의	
제조제 저항성 검정 .....	56
1. 서 설 .....	56
2. 연구 수행 방법 .....	57
가. 합성 Protox 발현 형질전환체 육성 .....	57
나. 합성 Protox 유전자 발현 형질전환체 육성 및 T <sub>1</sub> 종자 획득 .....	57
다. Southern blot 및 Northern blot 발현분석 .....	57
라. 과산화작용 제조제 발아 저항성 검정 .....	58
마. 합성 Protox 발현 T <sub>1</sub> 형질전환체 종자의 유전력 검정 .....	58
바. 형질전환체의 제조제 반응 .....	59
사. Western blot 분석 .....	59
아. 단백질 targeting을 위한 완두로부터 미토콘드리아 및	
엽록체 분리 .....	59
자. 단백질 targeting을 위한 Dual import 분석 .....	60
차. Protoporphyrinogen oxidase(Protox) 효소활성 측정 .....	61
3. 연구 수행 결과 .....	62
가. 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 이용한	
변의 형질전환 .....	62
1) 변 형질전환용 벡터의 제조 .....	62
2) 변 형질전환 및 재분화 .....	62
나. 식물의 선호 코돈으로 변환한 <i>M. xanthus</i> 유래의 합성	
프로토포르피리노겐 옥시다아제(Protox) 유전자의 특성 .....	63
다. 합성 Protox 유전자 발현 형질전환체의 유전력 검정 .....	63
라. 합성 Protox 발현 형질전환체의 transgene 유전자의 게놈	
삽입수 분석 .....	69
마. 합성 Protox 발현 형질전환체의 mRNA 합성량 분석 .....	69
바. 합성 Protox 발현 형질전환체와 native Protox 발현	
형질전환체와의 초기생장 비교 분석 .....	72

사. 암상태에서 합성 Protox 발현변과 native Protox 발현 형질전환변과의 초기생장 비교 분석 .....	73
아. 합성 Protox 발현 T <sub>1</sub> 세대에서 제초제저항성 발아 검정 .....	73
자. 합성 Protox 발현 T <sub>1</sub> 세대에서 제초제저항성 경엽처리 검정 .....	76
차. 합성 Protox 발현 T <sub>1</sub> 세대에서 salt 저항성 발아 검정 .....	76
카. 합성 Protox 효소활성 검정, 형질전환변 육성 및 Southern blot 분석 .....	76
타. 합성 및 native Protox 발현 형질전환변의 Protox 효소활성 분석 .....	79
파. 합성 Protox 발현 형질전환변과 native Protox 발현 형질전환변과의 제초제 저항성 비교분석 .....	84
하. 합성 Mx Protox의 import assay 및 형질전환변로부터 organells 분리를 통한 dual targeting 분석 .....	85
 제 3 절 Mx protox 유전자를 selectable marker gene으로서 이용 및 형질전환변 육성 .....	90
1. 서 설 .....	90
2. 연구 수행 방법 .....	91
가. Scutellum 유도 변 calli의 과산화작용 제초제에 대한 민감도 (Susceptibility) 검정 .....	91
나. pCAMBIA0380-Syn Mx Protox 벡터 구조물 구축 .....	91
다. Butafenacil을 이용한 엽 절편 및 foliar 처리에 의한 제초제 저항성 검정 .....	92
3. 연구 수행 결과 .....	92
가. 과산화작용 제초제들에 대한 변 calli의 susceptibility 정도 검정 .....	92
나. T-DNA 내에 Mx Protox DNA만 함유하는 binary vector 제작 .....	93
다. Butafenacil을 선발화합물로 이용한 형질전환변의 선발 및 재분화 과정 .....	93
라. Butafenacil 선발에 의해 재분화된 형질전환변의 Northern blot 및 Western blot 분석 .....	97
마. Butafenacil 선발에 의해 재분화된 형질전환변의 제초제저항성 분석 .....	97

제 4 절 <i>Mx</i> Protox 발현 형질전환벼의 생육 및 포장안정성 검정 .....	102
1. 서 설 .....	102
2. 연구 수행 방법 .....	103
가. T <sub>3</sub> 세대 형질전환벼(native <i>Mx</i> Protox 발현)의 포장 수량성 검정 ....	103
나. T <sub>4</sub> 세대 형질전환벼(native Protox 발현)의 GR <sub>50</sub> 값 .....	104
다. 형질전환벼(native Protox 발현)의 T <sub>4</sub> 세대의 생육시기별 생장반응 .....	104
라. 형질전환벼(native Protox 발현)의 T <sub>4</sub> 세대의 관행재배에 따른 수량성 .....	105
마. 논 포장조건하에서 native Protox 발현 형질전환 벼(T <sub>4</sub> 세대)의 제초제 반응 .....	105
바. 세포내 구성물질의 누출 .....	106
사. 세포막 지질과산화작용 .....	106
아. 논 포장재배 조건하에서 대면적 관행재배에 따른 native Protox 발현 형질전환 벼(T <sub>5</sub> 세대)의 수량성 .....	107
자. Native Protox 발현 형질전환 벼에 대한 Protox 저해 제초제의 GR <sub>50</sub> 농도 처리에 따른 생리적 반응 비교 .....	107
차. T <sub>2</sub> 세대 형질전환벼(합성 <i>Mx</i> Protox 발현)의 포장 수량성 검정 ...	109
3. 연구 수행 결과 .....	110
가. Native <i>M. xanthus</i> Protox 발현 T <sub>3</sub> 형질전환벼의 수량성 측정 .....	110
나. 벼의 잎으로부터 엽록체 및 미토콘드리아 분리 .....	110
다. 형질전환벼의 세대 안정성 측정을 위한 hygromycin leaf disk assay .....	112
라. Native <i>M. xanthus</i> Protox 발현 T <sub>4</sub> 세대 형질전환 벼의 GR <sub>50</sub> 값에 의한 제초제 저항성 정도 평가 .....	112
마. 형질전환벼(native Protox 발현)의 T <sub>4</sub> 세대의 생육시기별 성장반응 ....	116
바. 형질전환벼(native Protox 발현)의 T <sub>4</sub> 세대의 관행재배에 따른 수량성 .....	116
사. 논 포장조건하에서 native Protox 발현 형질전환벼(T <sub>4</sub> 세대)의 제초제 반응 .....	120

아. Protox 저해 제초제에 대한 비형질전환 벼(재배종 동진벼)와 형질전환벼(native Protox 발현)의 생리적 반응 비교 .....	120
자. 논 포장재배 조건하에서 대면적 관행재배에 따른 native Protox 발현 형질전환 벼(T <sub>5</sub> 세대)의 수량성 .....	123
차. Native Protox 발현 형질전환벼에 대한 Protox 저해 제초제의 GR <sub>50</sub> 농도 처리에 따른 생리적 반응 비교 .....	126
카. T <sub>2</sub> 세대 형질전환벼(합성 Protox 발현)의 포장 수량성 검정 .....	130
제 4 장 <b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	139
제 5 장 <b>연구개발결과의 활용계획</b> .....	141
제 1 절 연구 성과 .....	141
제 2 절 타 연구에의 응용 .....	142
제 6 장 <b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	144
제 7 장 <b>참고문헌</b> .....	146

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

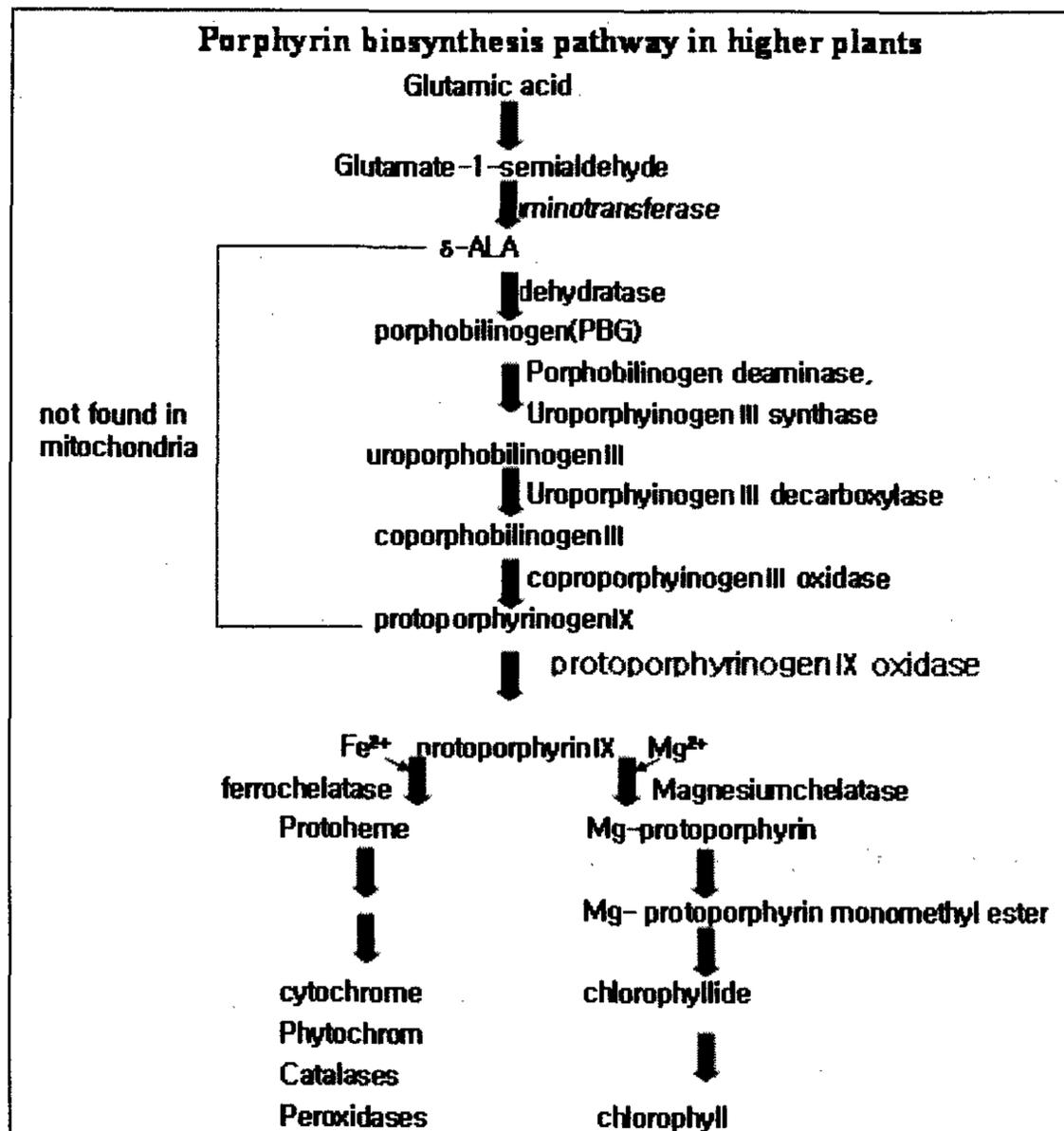
## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

과산화작용제초제(Peroxidizing herbicides)는 식물체내의 Prototporphyrinogen oxidase 효소(Protox)를 억제하여, 이로 통한 식물체내의 비 이상적인 광활성물질(photodynamic compounds)이 축적되어, 식물의 원형질막을 파괴하여 식물체를 죽이는 제초기작을 가진 제초제군들이다. 전 세계적으로 13개 농약회사에서 27종의 다양한 peroxidizing herbicides를 생산하고 있으며, 한 개의 targeting 효소(Protox)를 공격하는 제초제중에서 가장 많은 상품이 개발된 제초제이다(표 1; 그림 1-1).

1960년도부터 상업화된 이들 제초제는 대두, 벼, 목화, 땅콩 등의 세계적 주요 작물지에 광범위하게 사용되는 제초제로서, 극미량 처리로도 제초효과가 뛰어나고 살초범위가 넓은 탁월한 제초제이다. 또한 비수용성으로 식물체나 토양입자에 쉽게 흡착되며 광산화에 의해 곧바로 분해되기 때문에 잔류독성이 낮은 장점이 있는 제초제이다 (Lee 1997, Scalla & Matringe 1994). 1960년대에 개발된 이후, 비교적 이들 제초제의 생리 생화학 및 분자적 연구는 많은 진전이 있음에도 불구하고, 이들 제초제에 대한 저항성을 발현하는 형질전환작물은 아직 개발되지 않은 실증이다. 제초제의 표적효소가 Protox로 발견됨에도 불구하고, 또한 가장 많은 제초제군이 등록 시판됨에도 불구하고 이들에 저항성을 발휘하는 제초제저항성 작물개발이 현재까지 실현되지 못한 이유는 첫째는 Protox 효소가 두 개의 서로 다른 소기관(엽록체 및 마이토콘드리아)에 각각 존재하여, 두 유전자를 한꺼번에 발현시켜야 하는 기술적인 어려움 때문이며, 둘째는 Monsanto사의 glyphosate 처럼 단일회사의 단일제품이면, 제초제 저항성 작물개발의 상업성효과가 큰데 반해 Peroxidizing 제초제는 많은 회사에서 많은 제초제가 개발 판매되기 때문에 수천만 달러를 투자하여 연구개발 투자를 하지 않는 점도 또 다른 원인이 될 수 있는 것으로 판단된다. 셋째로 Syngenta 사에서 엽록체발현 저항성 Protox (제초제저항성인 점돌연변이 Protox)를 이용한 제초제저항성 형질전환작물에 대한 기존 특허

**Table 1.** Peroxidizing herbicides utilized in the world.

<b>Agro-chemicals</b>	<b>Peroxidizing herbicides</b>
Bayer	Acifluorfen-Na, Bifenox, Pyraclonil, Oxadiargyl, Oxadiazon, Fluazolate, Thidiazimin.
BASF	Cinidon-ethyl
DuPont	Profluazol, Azafenidin
FMC	Benzfendizone, Carfentrazone-ethyl, Sulfentrazone
Hungarian Chem. Ind.	Ethoxyfen-ethyl
Kaken	Pentoxazone
Mitsubishi	Chlornitrogen
Monsanto	Fluazolate
Nichino	Pyraflufen-ethyl
Rohm & Haas	Oxyfluorfen
Sumitomo	Flumiclorac-pentyl, Flumioxazin
Syngenta	Chlomethoxyfen, Fomesafen, Fluthiacet-methyl
Valent	Lactofen



**Fig. 1-1.** Porphyrin pathway leading to the biosynthesis of chlorophyll and heme. Protoporphyrinogen IX oxidase(Protox) enzyme is the last common step before the branching of the pathway for chlorophyll and heme synthesis.

때문에(Volrath et al. 1997), Syngenta 특허를 침해하지 않고 개발할 수 있는 다른 대안이 부족하다고 생각하였기 때문이기도 하다. 상기 열거한 여러 가지 기술적인 및 Syngenta사의 선행특허에 대한 제한점에도 불구하고, 본 연구팀은 1997년 농림기술개발과제 특정과제 사업으로부터 연구비를 기점으로, Peroxidizing 제초제에 대한 연구를 7년 이상 계속 수행한 결과, 상기의 기술적인 어려움과 선행특허를 침해하지 않는, 새롭고 탁월한 방법으로 이들 제초제에 대한 저항성작물을 육성하는 데 성공하였다.

따라서 본 연구는 본 연구팀에서 *M. xanthus* Protox 유전자를 이용하여, 개발한 Peroxidizing 제초제 저항성벼의 포장단위 실험을 지속하여 실제농가에 사용할 수 있는 제초제실증실험을 하고자하며, 또한 제초제 저항성을 최대한 발휘할 수 있도록 1417 bp의 *M. xanthus* 유전자의 GC 함량(70%)을 식물수준에 맞도록 조정하고, codon usage를 식물 유전자와 유사하게 바꾸어 줌으로, *M. xanthus* Protox의 발현량을 식물체에서 최대한 안정적으로 발현되게 함으로 제초제 저항성효과를 극대화하는 실험을 하고자 한다.

## 1. 기술적 측면에서 연구개발의 필요성

현재까지 Peroxidizing 제초제에 대한 작물저항성을 부여하기 위한 전략은 엽록체 Protox의 과다발현방법과 제초제저항성 Protox 유전자의 엽록체 발현에 초점을 두고, 전 세계적으로 연구가 진행되어 왔다. 그러나 독일의 Dr. Grimm 그룹에서 *Arabidopsis* Protox를 과다발현한 형질전환담배를 보면, 저항성이 acifluorfen 300 nM에서 발아저항성이 관찰되었으며, 제초제에 대한 저항성이 획기적으로 증대되지 않았다(Lermontova & Grimm, 2000). 또한 본 연구진에서 제초제에 저항성인 것으로 알려진 *Bacillus subtilis* Protox 유전자를 담배 및 벼에 형질전환하여 본 결과 In planta 제초제 저항성이 크게 증대되지 않음을 관찰하였다(Choi et al. 1998, Lee et al. 2000). Grimm 그룹과 본 연구그룹의 결과에 비추어 보면, 엽록체에 Protox 유전자 과다발현이 실제로 제초제 저항성을 크게 증대시키지 않음을 보여준다. 따라서 본 연구그룹은 현재 NCBI 유전자 data base에 등록된 Protox 유전자를 N-terminal presequence 특성 및 Protox 단백질 특성(soluble / membrane protein 여부)등을 검사하여 본 결과 점액세균인 *Myxococcus xanthus*

Protox의 경우 3개의 막횡단나선을 가진 막단백질 특성과, N-terminal sequence에 미토콘드리아 targeting sequence을 가지고 있을 뿐 아니라, 엽록체로 갈 수 있는 transit sequence 특성의 아미노산 sequence를 내재하고 있어, 본 *M. xanthus* Protox를 식물에 형질전환하면, 미토콘드리아 및 엽록체에 targeting 되어 제초제 저항성을 부여 할 수 있을 것으로 가정하였다. 현재까지의 연구결과에 의하면, *M. xanthus* Protox 단백질이 형질전환체의 세포에서 미토콘드리아 및 엽록체에 동시에 발현되는 결과를 획득하였다. 이는 *M. xanthus* Protox의 N-terminal 아미노산 서열이 ambiguous presequence를 가지고 있어, Protox 유전자를 양쪽 소기관에 Targeting 시켜 주는 것으로 믿어진다. 현재까지 Protox 유전자를 엽록체 및 미토콘드리아에 Dual targeting 시키는 연구는 없으며, 세계최초로 시도한 결과이며, peroxidizing 제초제에 저항성을 부여할 수 있는 가장 현실성있는 연구결과로 판단하고 있다. 또한 제초제저항성 효과를 극대화하고, *M. xanthus* Protox 유전자를 형질전환세포주 선발 marker로 사용하기 위하여, *M. xanthus* Protox 유전자 서열 전체를 인공적으로 합성하고자 한다. 미생물 유전자를 인공적으로 합성 할 경우, 대체로 식물 세포내에서 단백질 발현율이 상승하여 제초제 저항성 효과가 극대화 될 것으로 예상하고 있다.

## 2. 경제 · 산업적 측면에서 연구개발의 필요성

Protox 효소를 저해하는 peroxidizing herbicides는 Diphenylether group를 포함 9개의 화합물군에 27종의 제초제가 등록 및 상업화된 제초제이다(표 2). 대두, 벼, 목화, 땅콩 등의 세계적 주요 작물지에 광범위하게 사용되는 제초제이며, 현재 한국에서 벼 재배지에 Pre-emergence 제초제로서 Oxadiazon제초제(호미단)이 등록, 사용되고있다. 이들 제초제는 극미량 처리에도 탁월한 제초효과를 보이기에 작물의 생육전반기에 사용하기에는 어려운 점이 있지만, 제초제저항성작물의 경우, 이들 제초제의 사용범위를 넓혀 주기 때문에 상업적 가치가 매우 크다고 할 수 있다. 또한 최근 제초제의 지속적 사용에 의한 제초제저항성 잡초의 출현이 급증하고 있는 실증이며(예, Triazines 제초제, Als inhibitors), 이에 따라 지금까지 제초제저항성 잡초출현의 사례가 극히 적은 peroxidizing 제초제의 사용이 권장되고 있는 추세이다. 따라서 이들 제초제에 대한 저항성작물의 육성은 상당한 경제적

가치가 기대될 것으로 추산된다.

**Table 2.** Types of peroxidizing herbicides by structural family

Diphenylethers	Acifluorfen-Na, Bifenox, Fluoroglycofen-ethyl, Chlomethoxyfen, Halosafen, Fomesafen, Oxyfluorfen, Lactofen
Thiadiazoles	Fluthiacet-methyl, Thidiazimin
Pyrimidindiones	Benzfedizone, Butafenacil
N-Phenyl-phthalimides	Cinidon-ethyl, Flumiclorac-pentyl, Flumioxazin
Oxazolidinedione	Pentoxazone
Triazolinones	Carfentrazone-ethyl, Sulfentrazone, Azafenidin
Oxadiazoles	Oxadiazon, Oxadiagyl
Phenylpyrazoles	Fluazolate, Pyraflufen-ethyl
Others	Profluazol, Pyrazogyl

## 제 2 절 연구개발 범위

첫째는 본 연구팀에서 *M. xanthus* Protox 유전자를 이용하여, 개발한 Peroxidizing 저항성변의 세대간 안정성(T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>)이 유지되는 지를 조사하며, 벼 재배지에서 효과적으로 사용될 수 있는 제초제의 농도 및 시기를 규명하고, homozygous lines의 세대진전에 따라 안정적으로 유전자가 발현되는지 및 제초제 저항성이 지속적으로 유지되는 지를 아울러 조사한다. 또한 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 세대에서의 제초제저항성 형질전환변의 생육특성 및 수량에 영향을 미치는지를 조사한다. 제초제저항성변의 포장단위 실험을 지속하여 수도에서 사용가능한 peroxidizing 제초제의 종류와 약량 검정을 통하여, 장차 실제농가에 사용할 수 있는 제초제실증실험의 예비 자료를 얻고자 함이며, 둘째는 제초제 저항성을 최대한 발휘할 수 있도록 합성유전자를 제조하고 이를 이용하여 형질전환 벼를 육성하고자 한다. 471개의 아미노산에 1416 bp 길이(TAA 포함)를 가진 *M. xanthus* 유전자는 GC 함량(70%)이 매우 높아 식물에 도입되었을 경우 발현량이 적절하지 단점이 있으므로, 높은 GC 함량을 식물수준에 맞도록 조정하고(>50%), codon usage를 식물 유전자와 유사하게 바꾸어 줌으로, *M. xanthus* Protox의 발현량을 식물체에서 최대한 발현되게 함으로 제초제 저항성효과를 극대화하는 실험을 하고자 한다. 셋째는 Mx Protox 유전자를 형질전환 세포주를 획득하기 위한 선발 marker 유전자로서의 이용에 대한 것으로, 과산화작용제초제를 selection agent로 이용하여 Agrobacterium transformation 방법으로 형질전환벼를 육성함으로 Mx Protox 유전자를 제초제저항성을 부여하는 형질전환 selection marker gene 으로서 이용하고자 한다.

구체적인 연구개발 범위를 요약하면 다음과 같다.

### 1. *M. xanthus* 합성 Protox 유전자 제조

- 1416 bp 합성 Protox 유전자 설계(GC 함량 50% 및 Codon usage 식물 형태로 변경)
- 200 bp 혹은 300 bp 단편 6개를 bridge 공법으로 연결 함

### 2. 합성 Protox 유전자 대장균 발현 및 효소정제 및 항체 제조

- 합성 Protox 유전자의 대장균 발현(PET28b)

- 합성 유전자의 His-tagged 및 Nickel 컬럼을 이용한 대량 정제
  - 합성 Protox 단백질의 제초제 저해 정도 규명
  - 정제된 Protox 단백질의 polyclonal 항체 제조
3. *M. xanthus* Protox(natural form) 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 포장 안정성 실험
- *M. xanthus* Protox 유전자의 T<sub>2</sub> 발현 안정성 검정
  - *M. xanthus* Protox 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 제초제 저항성 실험
  - 제초제 처리구 와 비처리구와의 잡초방제실험
  - 경엽처리 및 발아전 제초제 약제 처리 간 제초활성 및 제초효과 검정
4. 합성 Protox 유전자 발현 형질전환 베타(T<sub>0</sub>) 육성
- 합성 유전자의 binary vector 도입
  - *Agrobacterium* 이용한 베타형질전환
  - Hygromycin 선발 통한 재분화 베타 유도
5. T<sub>0</sub> 형질전환체의 유전자 발현 검정
- Southern blot 분석
  - Northern blot 분석
  - Western blot 분석
6. T<sub>0</sub> 형질전환체의 제초제 저항성 leaf disc assay
- Electrolyte leakage 분석
  - MDA level 분석
7. T<sub>1</sub> 종자의 제초제 저항성 발아실험
- Oxadiazon, oxyfluorfen 발아저항성 검정
  - T<sub>1</sub> seedling의 제초제 경엽처리 저항성 실험
8. T<sub>3</sub> 형질전환체(native Protox 발현)의 포장 안정성 검정 및 제초실험
- 5종이상의 peroxidizing 제초제에 대한 제초제 처리 및 안정성 실험

9. 합성 Prototox 발현 T<sub>2</sub> homozygous lines 선발
10. 합성 과 native Prototox Homozygous lines 간의 제초제 저항성 비교
11. Prototox 단백질의 dual targeting 검정
12. Homo lines의 경엽 및 발아 저항성의 검정
- 13 제초제 저항성 작물의 적정 제초제 약량과 처리방법 확립
14. *Mx* Prototox 유전자를 형질전환세포주 선발을 위한 selection marker gene  
으로서 이용 및 형질전환벼 육성

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 본 연구진의 선행연구결과

1. 과산화작용제초제 저항성 형질전환벼 개발 - 본 연구진은 세계최초로 Peroxidizing herbicides(과산화작용 제초제)에 강력한 저항성을 발휘하는 형질전환 벼를 개발하였으며(Jung et al., 2004), 이러한 방법을 특허 출원하였다(국내출원 2002. 05, PCT 출원 2003. 04 예정). 본 실험을 위해 막단백질이며, ambiguous N-terminal presequence를 가지고 있는, *M. xanthus* 유래 Protox 유전자를 벼에 형질전환하였으며, 이들 벼는 경엽처리 및 발아처리 실험에서 탁월한 제초제 저항성을 보였다. Oxyfluorfen 경엽처리 실험 결과는, 본 연구진에서 개발한 벼는 *M. xanthus*에서 클로닝된 Protoporphyrinogen oxidase(Protox)를 벼에 형질전환한 것으로, 독일의 Grimm 박사 연구실에서 *Arabidopsis* Protox를 이용하여 제초제 저항성을 보고한 ACP 및 APP 발현 형질전환 벼보다 최소 100배 이상의 저항성을 보이고 있다. Oxyfluorfen 제초제를 벼의 3-4엽기에 처리시 벼의 치사농도는 5  $\mu$ M정도임을 생각하면, *Mx* Protox 발현 형질전환벼는 최소 10 mM에서도 약해를 받지 않는 것으로 보아 2000배 이상의 높은 저항성을 발휘하는 것으로 보여진다.

Oxadiazon 처리 발아실험을 위해서는 현재 한국에서 벼 재배지에 Pre-emergence 제초제로서 등록되어 있는 Oxadiazon제초제(호미단)을 사용하였다. 본 *Mx* Protox 형질전환벼는 Oxadiazon 제초제에 강력한 발아저항성을 보였으며, 약해 경감 뿐 아니라, 직파재배시 이들 제초제와 저항성벼를 이용하면 매우 효과적으로 잡초방제가 가능하여 생산비 절감효과가 클 것으로 예상된다.

2. *Mx* Protox의 Dual targeting에 의한 제초제 저항성 발휘 - 본 연구진은 *M. xanthus* Protox 발현 형질전환벼가 예상치 못한 강력한 제초제 저항성을 발휘하는 것이 본 *M. xanthus* Protox 단백질 발현이 벼의 엽록체와 미토콘드리아에 동시에 발현됨으로서 획득됨을 확인하였다. *M. xanthus* Protox의 dual

targeting 기작은 이 단백질의 아미노말단이 ambiguous targeting sequence를 가지고 있어, 식물세포내에서 서로 다른 소기관(엽록체 및 미토콘드리아)에 발현되는 것으로 추정된다.

## 제 2 절 국내·외 타 연구기관의 연구내용 및 결과

### 1. 국내 연구동향

국내에서 peroxidizing 제초제에 대한 저항성 형질전환 작물개발 연구를 수행하는 곳은 본 연구진 외에는 없으며, 제초제 합성 및 생리 생화학 연구는 한 두 연구자가 있는 상태이다.

### 2.. 국외 연구동향

- 가. Norvartis 회사 - 국외 연구팀으로서는 Norvatis 연구진이 가장 선두로 저항성 작물개발 연구를 진행하고 있으며, 진핵생물에서 유래된 제초제 저항성 유전자를 이용한 제초제 저항성작물에 대한 특허를 보유하고 있는 상태이다 (Volrath et al. 1997 미국특허).
- 나. Syngenta 회사 - Peroxidizing 제초제 중에서 diphenyl ether 그룹의 제초제 (acifluorfen, oxyfluorfen 등)는 glutathione-S-transferase에 의해 diphenyl ether 결합을 파괴하여 제초제를 분해하는 것으로 알려져 있다(Fear et al. 1983). 따라서 이들 syngenta 그룹은 옥수수에서 클로닝한 glutathione-S-transferase를 밀에 형질전환하는 실험을 하였다. 형질전환밀은 chloroacetanilide 계통의 제초제인 alachlor에 저항성을 발휘하지만, diphenyl ether 계통의 oxyfluorfen에 대한 저항성은 없는 것으로 보고 하였다(Miligan et al. 2001).
- 다. Dr. Grimm 그룹 - 독일의 Humboldt 대학의 Grimm 박사는 peroxidizing 제초제 저항성 연구의 선두 과학자이다. 이들 그룹은 담배에서 엽록체 Protox 유전자와 미토콘드리아 Protox 유전자를 클로닝하여 Protox 유전자가 식물세포

의 두 개의 서로 다른 기관에서 발견됨을 분자적으로 규명한 최초의 과학자이다(Lermontova et al. 1997). 또한 이들 그룹은 *Arabidopsis* Protox 유전자를 담배에 형질전환하여 이들 형질전환담배가 acifluorfen 제초제에 저항성을 보인다는 연구결과를 발표하였다(Lermontova et al. 2000). 형질전환 담배는 wild-type에 비해 300 nM의 acifluorfen이 함유한 배지에서 발아를 하는 반면에, wild-type는 발아하지 못하는 실험결과를 보고하였다. 이들 연구는 그동안 peroxidizing 제초제 저항성작물을 육성하기 위해서는,  $K_m$  값이 동일한 돌연변이 저항성 유전자를 식물의 endogenous 유전자와 교환하여야만 한다는 그동안의 가설을 바꾸는 중요한 계기를 제공하였고, plastidal Protox 유전자를 도입하여, Protox 효소가 과다발현되어도 Porphyrin pathway에 해로운 영향을 주지 않고 정상적인 담배 phenotype를 보여 주는 실험적 증명을 제시하였다. 그러나 제초제 저항성이 획기적으로 증대되지 않았으며, 300 nM acifluorfen 농도에서 발아 저항성을 보였으며, 실제적으로 포장에서 응용될 정도로 높은 저항성은 아닌 것으로 알려졌다.

라. Sumitomo 회사 - Sumitomo 회사는 미국의 Duke 대학의 Dr. Boyton 교수와 공동으로 *Chlamydomonas* rs-3 mutant로부터 S-23142 제초제(peroxidizing herbicide)에 저항성을 부여하는 Protox 유전자를 클로닝하였으며, 이 Protox 유전자는 291번째 아미노산이 Val 에서 Met으로 point mutation된 것임을 확인 하였으며, single point mutation 으로 통해 제초제에 저항성을 부여 할 수 있음을 최초로 보고하였다(Randolph-Anderson et al. 1998). 그러나 현재까지 이들 유전자를 이용한 제초제 저항성 작물 및 식물에 대한 보고는 현재까지 없는 실정이다.

마. Dr. Matsumoto group - 쓰구바 대학의 Dr. Matsumoto 박사 연구팀은 Peroxidizing 제초제 저항성 cell lines 선발의 선도 주자이다. 이들은 step-wise 선발에 의해 제초제 저항성 담배 lines 과 soybean lines를 보고하였다(Watanabe et al. 1998, Warabi et al. 2002). 이들이 제초제 저항성을 발휘하는 원인으로서는 Mitochondrial Protox의 과다발현 및 gene amplification이 관여하는 것으로 보고하였을 뿐 이들 lines들로부터 형질전환작물을 육성한 연구결과는 아직 없는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 *Myxococcus xanthus* Protox 유전자의 화학적 합성 및 형질전환벼 육성

#### 1. 서 설

과산화작용제초제(Peroxidizing herbicides)는 식물체내의 엽록체와 미토콘드리아에 존재하는 Protoporphyrinogen oxidase 효소(Protox)를 억제함으로써, 기질인 Protoporphyrinogen IX(protox IX) 이 엽록체와 미토콘드리아에서 축적되지 않고 벗어나와, 세포질로 이동하여, 세포질 특히 세포막에 존재하는 peroxidase 같은 산화효소에 의해 protoporphyrin IX 으로 산화된다. 이들 산화효소는 과산화작용제초제에 저해를 받지 않으며, 산화된 생성물인 protoporphyrin IX(Proto IX)은 엽록소와 heme에 더 이상 이용되지 못하여 세포질에 지속적으로 축적되게 된다. Proto IX은 광활성물질로서 빛이 있는 상태에서 분자산소를 일중항산소( $^1O_2$ )로 만들며, 반응성이 강한 일중항산소는 전자가 많은 단백질, 지질, 핵산 등을 공격하여, 특히 지질분자가 많은 세포막의 지질과산화작용을 일으켜 세포막의 파괴를 유도하여 식물을 고사케 하는 기작을 가진 제초제군 들이다. 이들 제초제에 저항성을 발휘하는 형질전환작물의 육성은 Protox 효소의 과다발현에 의해 획득되어 질 수 있지만, 이들 Protox 효소의 과다발현은 광활성물질의 과다축적에 의한 세포의 고사를 야기할 수 있기에 이론적으로 가능하지 않을 것으로 생각되어 왔다. 그러나 독일의 Grimm 박사 연구실에서 *Arabidopsis* Protox 유전자를 담배에 형질전환하여 과다발현시킨 결과 형질전환담배의 표현형이 대조구와 차이가 없을 뿐 아니라, 제초제 acifluorfen 에 대해 저항성을 보임을 최초로 보고하여 Protox 효소의 과다발현에 의한 지질과산화작용에 대한 염려는 해소되었다(Lemontova & Grimm, 2000).

이후 Syngenta(신젠타)회사의 애기장대에서 클로닝한 Protox 유전자에 2개의

아미노산을 변형시켜, 과산화작용제초제에 저항성 유전자를 만들어, 이들 유전자를 옥수수에 도입하여 저항성 작물을 육성하였다(Li et al., 2003). 하지만 이들 그룹이 이용한 제초제 저항성 Protox를 이용한 방법은 몇 가지 문제점이 있을 수 있다. 첫째로 식물세포내에서 Protox 유전자가 두개의 서로 다른 소기관, 엽록체와 미토콘드리아에 발현된다는 사실을 간과하였다. 엽록체 발현 Protox가 도입된 저항성 유전자에 의해 제초제 처리에 의해 피해를 받지 않더라도, 미토콘드리아 Protox 효소가 피해를 받으므로 식물이 저항성을 발휘하는 데는 한계가 있다고 할 수 있다. 미토콘드리아 Protox 효소가 피해를 받으면, 미토콘드리아내에 광활성물질이 축적되거나, 세포질로 기질인 Protoporphyrin IX이 이동되어, 세포질 혹은 막에 존재하는 산화효소에 의하여 산화되어 광활성물질을 축적하여 식물을 죽이는 역할을 하게 된다. 둘째는 신젠타의 저항성 Protox 유전자는 엽록체에 발현되는 유전자만 이용하여 제초제 저항성 작물을 육성하였다는 점이다. 셋째는, 엽록체의 Protox 과다발현은 Protox 효소의 생성산물인 Proto IX를 엽록체에 축적하게 한다. 축적된 Proto IX은 prophyrin pathway의 feedback control 인자로 작용하지 못함으로, 지속적으로 광활성물질인 Proto IX이 축적된다. 축적된 Proto IX은 식물의 항산화활성이 감소하는 생육 후반기에 엽록체 막의 파괴를 유도하게 됨으로 식물을 조기에 고사시키게 된다.

본 연구진은 엽록체에 Protox 유전자를 과다발현 함으로 야기될 수 있는 문제를 피할 뿐 아니라, 기존 paradigm에서 벗어난 새로운 방법으로 과산화작용 제초제에 저항성을 부여 할 수 있는 방법을 모색하는 과정에서, 상기의 신젠타기술과 다른 방법으로, 과산화작용 제초제에 저항성을 발휘하는 작물을 개발하는 방법을 개발하였다. 본 연구진이 개발한 방법은 Protox 유전자를 식물의 엽록체와 미토콘드리아에 동시 발현시키는 방법으로서, 본 목적을 달성하기위해서, *Myxococcus xanthus*의 Protox 유전자를 이용하였다. *M. xanthus* Protox 유전자는 식물에 도입하면, 생성된 Protox 단백질이 식물세포의 엽록체와 미토콘드리아에 동시에 targeting 되어 발현됨을 확인하였고, 이를 통해 과산화작용 제초제에 고도의 저항성을 발휘하는 것을 증명하였다(Jung et al., 2004). 따라서 Protox 유전자의 엽록체나 미토콘드리아의 어느 한쪽으로 과다발현은 정상적이지 않은 광활성물질의 축적을 야기 할 수 있는 문제는 여전히 남아있게 된다. 특히 Mx Protox의 과다발현은 높은 제초제저항성을 부여하지만, codon usage가 다른 미생물 유전자가 식

물내에서 효과적으로 발현이 이루어지는지는 의문시 된다. *Mx* Prottox 유전자는 471개의 아미노산에 1416 bp 길이(TAA 포함)를 가진 유전자이다. GC 함량(70%)이 매우 높아서 식물에 도입되었을 경우 발현량이 적절하지 단점이 있으므로, 높은 GC 함량을 식물수준에 맞도록 조정하고(>50%), codon usage를 식물 유전자와 유사하게 바꾸어 줌으로, *M. xanthus* Prottox의 발현량을 식물체에서 식물의 발현량과 비슷하게 발현되게 함으로서 Prottox 의 과다발현에 의한 광활성물질의 축적을 최소한도로 유지하면서 제초제 저항성효과를 최대화하는 실험을 하고자 한다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. 합성 유전자 design 및 Prottox 유전자 합성

*M. xanthus* Prottox 유전자는 1416개의 nucleotide로 이루어져있고, 그 중에서 adenine이 14%, cytosine이 34%, guanine이 37%, thimine이 15%로 구성되어있으며, 전체 유전자 서열에서 GC의 비율이 70%을 넘는다. 이렇게 높은 GC 함량의 비율은 미생물 유전자의 특징이기도 하며, 이런 유전자를 식물에 도입시 transgene의 발현율이 매우 낮은 것이 보통이다. 따라서 합성 Prottox를 고안 할 때 GC 함량의 비율을 식물평균인 48-50%로 유지되도록 한다. 미생물 Prottox 유전자의 높은 GC 함량은 대부분 codon usage의 차이에 기인한다.

총 길이 1416 bp Prottox 유전자를 합성하기 위하여 70-80 mer 길이의 oligo를 제작하여, 각 oligo 간의 3' 및 5' - 끝 부분이 10-12개의 complimentary sequence를 주어, 서냉복원(annealing)하여 결합되도록 한 후, DNA polymerase 로 double strand 단편을 합성한다. Internal 부위에 적절한 제한효소 부위로 자른다음, ligation를 하고, 양끝의 Primers를 이용하여 fragment A(253 bp)를 합성한다. 합성된 fragment는 pBluescriptSK vector에 클로닝하여 염기서열을 분석한다. 이러한 단편(200-300 bp) 총 6개의 단편(A-F)을 만들고 최종적으로 6개의 단편을 ligation하여 합성 *M. xanthus* Prottox 유전자를 제조한다.

### 나. 대장균 발현 및 Prottox 효소활성 측정

합성 Prottox 유전자의 아미노 말단부위(전이개시점)에 *NcoI* 부위를 추가한

primer을 제작하고, stop codon부위에 stop을 삭제하고 제한효소 *Hind*III 부위를 추가한 primer를 이용, polymerase chain reaction을 수행하여 PCR 생성물을 1% agarose gel 상에 분리 후 크기를 확인 후 생성물을 DE81 paper에 결합시킨 후 1.5 M NaCl이 들어있는 elution buffer에 해리 시켜 ethanol 침전법으로 PCR 생성물을 정제 후, 제한효소 *Nco*I 및 *Xho*I을 이용 양 말단을 자른 후 *Nco*I 및 *Xho*I로 절개된 pET28b에 ligation 시킨다.

이후 ligation된 DNA를 대장균 host인 *E. coli* BL21(DE3)으로 transformation한 후 kanamycin 저항성 YEP medium에 갈아준 후 생성된 colonies를 plasmid mini preparation에 의해 synthetic Prottox-insert band가 있는 확인한다. Prottox 유전자들이 정확한 DNA integrity를 제한효소 및 PCR 방법으로 확인 후 이들을 overnight 배양한 seed culture의 100  $\mu$ L 취하여 2 mL의 new medium에 넣어주어 bacteria titer이 OD600=1.0이 될 때까지 배양 후 최종농도가 1 mM 되도록 IPTG를 처리하여 Prottox 유전자의 전사, 전이를 유도하여 유전자 산물인 Prottox 단백질이 대장균에서 만들어지는지는 Prottox 효소활성 측정 방법으로 확인한다.

Prottox 유전자를 stop codon이 없이 pET28b 벡터의 카복실 말단에 6개의 histidine과 연결하도록 고안되어 affinity chromatography 방법으로 정제한다. 발현방법 및 정제방법은 Novagene protocol에 따르며 100 mL Terrific Broth에 overnight culture한 2 mL seed culture를 넣어 37°C에 3-4시간 배양 후 0.3 mM IPTG를 첨가하여 다시 28°C에서 5시간 배양하여 원심분리하여 *E. coli* pellet를 1x binding buffer(Novagen)에 용해하여 초음파 파쇄기로 대장균 세포벽을 파쇄한다. 파쇄된 대장균 lysate를 4°C 원심분리기에서 13,000rpm에 20여분간 원심분리하여 soluble extract를 Nickel column에 부어 정제하며 상세한 방법은 Novagen protocol 방법을 따른다.

#### 다. 벼에서 엽록체 및 미토콘드리아 분리

Chloroplast의 분리는 파종후 14일 정도된 벼잎 20 g을 잘게 잘라 Sorvall omni-mixer를 이용하여 중간속도에서 5초씩 2~3회 균질화시킨다. 식물 생체중당 3배의 1X grinding buffer(50 mM HEPES-KOH( pH 7.3), 330 mM Sorbitol, 0.2%(w/v)BSA(fatty acid free form), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA)를 사용하며, 현탁액을 만든 후, Percoll의 농도가 50%가 되도록 2X

grinding buffer와 percoll을 섞는다. 이때 20 mg 정도의 ascorbic acid를 넣어준다. 섞은 용액은 2개의 튜브에 담아 no brake 상태에서 18000rpm의 속도로 30분간 원심분리 한다.

Mitochondria의 분리는 파종 후 14일 정도된 벼 잎 50~100g을 잘게 잘라 Sorvall omni-mixer를 이용하여 최고속도에서 5초씩 2~3회 균질화시킨다. 이때 식물 생체중 당 3배의 1x grinding Medium를 사용하며, 사용용액의 조성은 0.3 M sucrose, 25 mM deca-sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA(disodium salt), 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% PVP-40, 0.2%(w/v)BSA이며, HCl을 사용하여 pH 7.5로 조정한다. 용액의 사용전, 20 mM ascorbic acid를 첨가해준다. 균질화된 용액을 4겹의 Miracloth(Calbiochem)를 사용하여 거른후, 2,450 × g의 속도에서 5분간 원심분리한다. 상등액만을 취해 새 튜브에 옮기고, 17,400 × g의 속도에서 20분간 원심분리한다. 침전물을 붓을 이용하여 30 ml의 분산액에 녹인후, 2,450 × g의 속도에서 원심분리한다. 분산액의 조성은 0.3 M sucrose, 10 mM Tris-HCl( pH 7.5), 0.2%(w/v) BSA이다. 상등액만을 취해 새 튜브에 옮기고, 17,400 × g의 속도로 20분간 원심분리한다. 침전물을 붓을 이용하여 2 ml의 분산액에 녹인후, 40% percoll용액 8 ml, 23% percoll용액 10 ml, 18% percoll 용액 8 ml로 된 튜브위에 transfer pipette을 이용하여 조심스럽게 옮긴다. 이때, percoll은 5x wash buffer에 섞어주며, wash buffer의 조성은 1.5 M sucrose, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.5%(w/v)BSA이다. Swing bucket rotor를 이용하여 35,000 × g의 속도로 no brake 상태에서 40분간 원심분리하면 위쪽에 어두운 녹색층(thylakoids), 아래쪽에 40%와 23%사이의 연한 노란색층(mitochondria)이 생긴다. 새 튜브에 아래층을 옮긴후, 분산액을 채워 27,200 × g의 속도로 15분간 원심분리한다. 상등액을 버리고, 침전물을 적당량의 분산액에 녹인후 microtube에 옮긴후 사용전까지 얼음위에 보관한다. 이때 일부의 현탁액을 취해 단백질 농도를 측정한다.

### 3. 연구 수행 결과

가. 식물의 선호 코돈으로 변환한 *M. xanthus* 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제(Protox) 유전자의 합성

## 1) 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 염기서열 설계

미생물 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제를 암호화하는 유전자의 아미노산 서열은 변경하지 않고 염기서열만을 식물의 선호 코돈으로 변환되도록 설계하였다. 즉, 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 염기서열을 애기장대 유래 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 코돈 사용례를 기준으로 하여(Narita et al., *Gene* 182, 169-175, 1996) 변환함으로써 합성 염기서열을 고안하였다. 예를 들어, 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자에서 알라닌(alanine)을 암호화하는 코돈 중 GCG 및 GCC을 가장 많은 빈도로 사용하지만, 애기장대의 경우에는 상기 GCG 및 GCC 코돈을 가장 적게 사용한다. 반대로 발린(valine)을 암호화하는 코돈 중 GTT는 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자에서는 전혀 사용하지 않으나, 애기장대에서는 가장 많은 빈도로 사용된다.

일반적으로 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자는 코돈의 둘째 및 세 번째 뉴클레오타이드를 선택시 구아노신(Guanosine) 및 사이토신(Cytosine)을 선택하지만, 애기장대의 경우에는 아데노신(Adenosine) 및 티민(Thymine)을 선택하는 특성이 나타난다. 이런 경향으로 인하여, 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 경우에 구아노신+사이토신 함량(G+C)이 70%에 이르고, 애기장대의 경우에는 46% 정도가 되어진다.

따라서, 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제를 식물 수준의 구아노신+사이토신 함량(G+C)이 되도록 하기 위하여, 애기장대 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제가 선호하는 코돈으로 변환하였으며, 변환된 코돈은 아미노산 서열을 그대로 유지하면서 설계하였다. 상기의 원칙으로 설계한 마이소코쿠스 산투스 유래의 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 염기서열은 서열번호 1에 나타낸 바와 같다.

## 2) 이중가닥 DNA 단편의 제작을 위한 단일가닥 올리고뉴클레오타이드의 합성

서열번호 1 에서 설계한 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 합성하기 위하여 상기 유전자를 6 부분으로 나누어 6개의 A, B, C, D, E, F 이중가닥 DNA

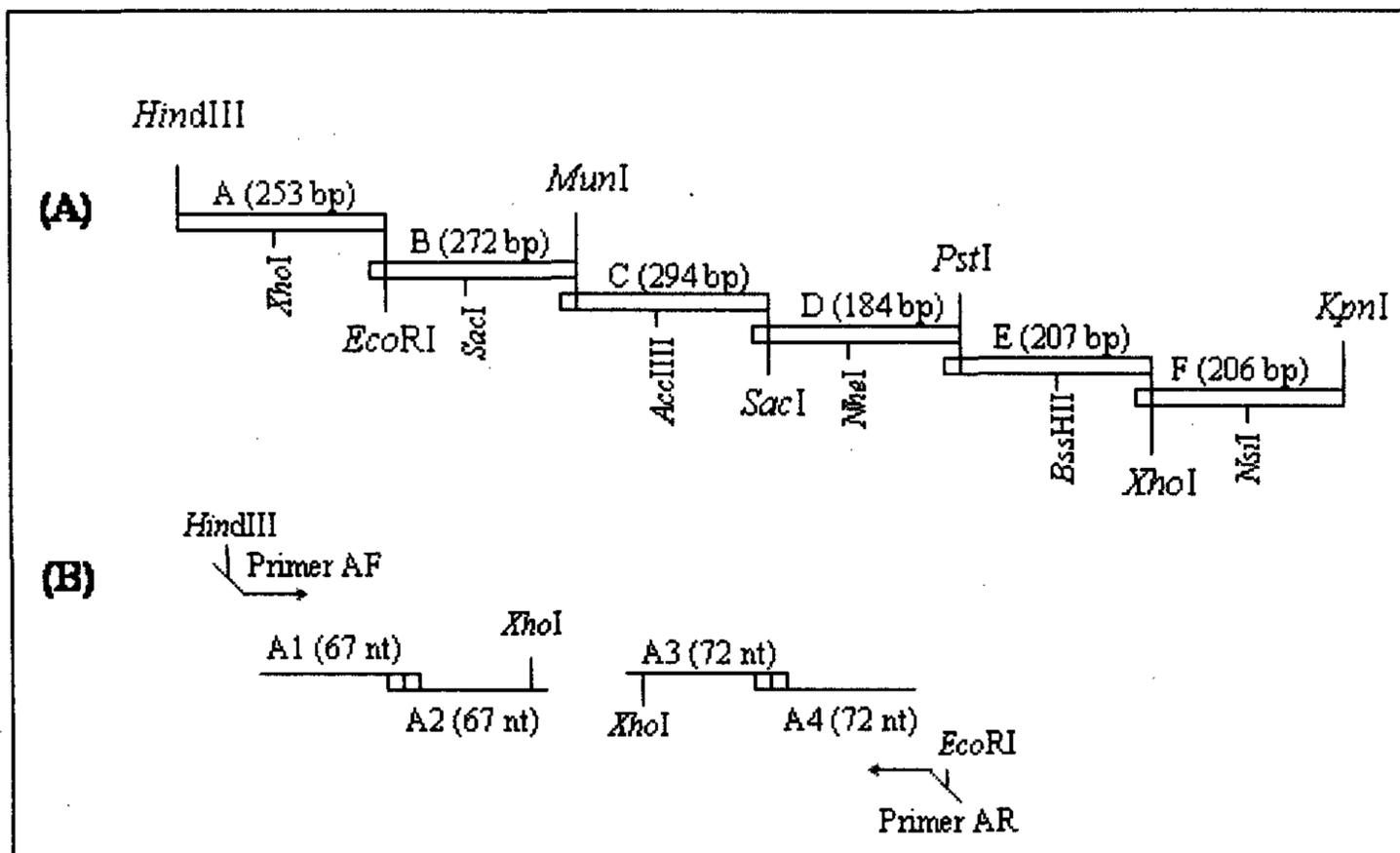
단편을 설계하였다. 상기 이중 가닥 DNA 단편을 제작하기 위해 각 이중가닥 DNA 단편마다 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 고안하여 총 24개의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다.

즉, 이중가닥 DNA 단편 A를 제조하기 위해 67개의 염기로 이루어진 A1(서열번호 2) 및 A2 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 3)를 고안하였으며 72개의 염기로 이루어진 A3(서열번호 4) 및 A4 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 5)를 고안하였다. 이때, 상기 A1의 3'말단과 A2의 5'말단의 14개의 DNA가 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였고 A2의 3'말단에는 *XhoI* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다(그림 3-1).

또한, 상기 A3의 3'말단과 A4의 5'말단의 12개의 DNA가 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였으며, A3의 5'말단에는 *XhoI* 제한효소 인식부위가 포함되도록 하였다. 이중가닥 DNA 단편 B의 제조를 위해서는 75개의 염기로 이루어진 B1(서열번호 6) 및 B2 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 7)를 고안하였으며 75개의 염기로 이루어진 B3(서열번호 8) 및 73개의 염기로 이루어진 B4 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 9)를 고안하였다. 이때, 상기 B1의 3'말단과 B2의 5'말단의 12개의 DNA가 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였고 B2의 3'말단에는 *SacI* 제한효소 염기서열이 포함되도록 하였다. 또한, 상기 B3의 3'말단과 B4의 5'말단의 13개의 DNA가 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였으며, B3의 5'말단에는 *SacI* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다.

이중가닥 DNA 단편 C의 제조를 위해서는 각각 72개 및 69개의 염기로 이루어진 C1(서열번호 10) 및 C2 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 11)를 고안하였으며 78개의 염기로 이루어진 C3(서열번호 12) 및 C4 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 13)를 고안하였다. 이때, 상기 C1의 3'말단과 C2의 5'말단의 12개의 DNA가 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였고 C2의 3'말단에는 *AccIII* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다. 또한, 상기 C3의 3'말단과 C4의 5'말단의 12개의 DNA가 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였으며, C3의 5'말단에는 *AccIII* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다.

이중가닥 DNA 단편 D의 제조를 위해서는 각각 52개 및 49개의 염기로 이루어진 D1(서열번호 14) 및 D2 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 15)를 고안하였으며 각각 67개 및 66개의 염기로 이루어진 D3(서열번호 16) 및 D4 단일가닥



**Fig. 3-1.** Construction of a modified *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase (*Mx* Protox) gene. (A) Nucleotide sequence of the modified *Mx* Protox gene. Translational start and stop codons are shown in bold. (B) Assembly scheme for construction of the *Mx* Protox gene from six synthetic oligonucleotide fragments. The restriction endonuclease sites and the sizes of each fragment are shown. (C) Strategy for construction of synthetic gene fragment A. Positions of relevant restriction endonuclease enzyme and primer annealing sites are indicated.

올리고뉴클레오타이드(서열번호 17)를 고안하였다. 이때, 상기 D1의 3'말단과 D2의 5'말단의 12개의 DNA는 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였고 D2의 3'말단에는 *NheI* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다. 또한, 상기 D3의 3'말단과 D4의 5'말단의 12개의 DNA는 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였으며, D3의 5'말단에는 *NheI* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다.

이중가닥 DNA 단편 E의 제조를 위해서는 각각 60개 및 68개의 염기로 이루어진 E1(서열번호 18) 및 E2 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 19)를 고안하였으며 각각 63개 및 68개의 염기로 이루어진 E3(서열번호 20) 및 E4 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 21)를 고안하였다. 이때, 상기 E1의 3' 말단과 E2의 5'말단의 12개의 DNA는 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였고 E2의 3'말단에는 *BssHIII* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다. 또한, 상기 E3의 3' 말단과 E4의 5'말단의 12개의 DNA는 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였으며, E3의 5'말단에는 *BssHIII* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다.

이중가닥 DNA 단편 F의 제조를 위해서는 각각 66개 및 70개의 염기로 이루어진 F1(서열번호 22) 및 F2 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 23)를 고안하였으며 각각 59개 및 58개의 염기로 이루어진 F3(서열번호 24) 및 F4 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 25)를 고안하였다. 이때, 상기 F1의 3' 말단과 F2의 5'말단의 12개의 염기는 서로 상보적인 염기서열을 갖도록 하였고 F2의 3'말단에는 *NsiI* 제한효소 인식 부위가 포함되도록 하였다. 또한, 상기 F3의 3' 말단과 F4의 5'말단의 12개의 염기는 서로 상보적인 서열을 갖도록 하였으며, F3의 5' 말단에는 *NsiI* 제한효소 인식부위가 포함되도록 하였다.

상기에서 고안한 24개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드는 바이오니아 사(청원군, 대한민국)에 주문 제작하여 사용하였다.

### 3) 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 합성하기 위한 이중가닥 DNA 단편의 제조

상기에 명시한 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 6개의 이중가닥 DNA 단편 A 내지 F(서열번호 26 내지 서열번호 31)를 제조하였다.

이중가닥 DNA 단편 A는 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(A1, A2, A3, A4)를 이용하여 합성하였다. A1 및 A2를 0.5mM dNTP을 첨가한 반응물에 넣고,

온도를 85°C에 2분간 가열한 후, 20초당 1°C씩 서냉복원 (annealing) 하였다. 25°C까지 서냉복원한 후, DNA 중합효소와 중합효소 버퍼를 첨가하고(Invitrogen, USA), 37°C에 30분간 반응시켜 이중 사슬 DNA(A1+A2)를 합성하였다. 상기에서 합성된 120bp 크기의 이중가닥 DNA(A1+A2) 혼합물을 에탄올에 침전시켜 DNA 침전물을 획득 한 후, *XhoI* 제한효소를 처리하여 3'부분을 점착성 말단화(sticky end)하였다. 그 후 75°C에서 10분간 가열하여 제한효소를 비활성화하였다. 상기와 동일한 방법으로 A3와 A4로부터, 132bp 크기의 이중가닥 DNA(A3+A4)를 합성하였고, 합성된 A3+A4 이중가닥 DNA를 *XhoI*으로 처리하여 5' 부분을 점착성 말단화(sticky end) 하였다. 상기와 동일한 방법으로 제한효소를 비활성화 하였다. 합성된 상기의 A1+A2 및 A3+A4 이중가닥 DNA를 21°C에서 90분간 결찰 (ligation) 하였다.

상기 결찰산물을 주형으로 하여, *HindIII* 제한효소 인식 부위를 포함하는 AF 프라이머(서열번호 32) 및 *EcoRI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 AR 프라이머(서열번호 33)로 PCR 증폭하였다.

상기에서 PCR 증폭은 10× Tag 중합효소 완충액 5 μl, dNTP 혼합액 5 μl에 Taq DNA 중합효소 및 상기 프라이머를 가한 후 잘 혼합하고 92°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분간의 조건으로 30회 반복하는 조건으로 수행하였다.

상기 PCR 증폭 결과 생성된 산물을 회수하여 제한 효소 *HindIII* 및 *EcoRI*으로 절단한 후 겔 정제하여 253bp 크기의 이중가닥 DNA 단편 A를 수득하였다.

이중가닥 DNA 단편 B는 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(B1, B2, B3, B4)를 이용하여 합성하였다. B1 및 B2를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 138bp 크기의 이중가닥 DNA(B1+B2)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *SacI*으로 처리하여 3' 부분을 점착성 말단화하였다. 또한, B3 및 B4를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 135bp 크기의 이중가닥 DNA(B3+B4)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *SacI*으로 처리하여 5'부분을 점착성 말단화하였다. 합성된 상기의 B1+B2 및 B3+B4 이중가닥 DNA를 상기와 동일한 방법으로 결찰하고, 상기 결찰산물을 주형으로 하여, *EcoRI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 BF 프라이머(서열번호 34) 및 *MunI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 BR 프라이머(서열번호 35)로 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 상기 A 단편의 제조시와 동일하게 수행하였다. PCR 증폭 결과 생성된 산물을 회수하고 제한효소 *EcoRI* 및 *MunI*으로 처리하여 절단 한 후

겔 정제하여 272bp 크기의 이중가닥 DNA 단편 B를 획득하였다.

이중가닥 DNA 단편 C는 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(C1, C2, C3, C4)를 이용하여 합성하였다. C1 및 C2를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 129bp 크기의 이중가닥 DNA(C1+C2)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *AccIII*으로 처리하여 3'부분을 점착성 말단화하였다. 또한, C3 및 C4를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 144bp 크기의 이중가닥 DNA(C3+C4)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *AccIII*으로 처리하여 5'부분을 점착성 말단화하였다. 합성된 상기의 C1+C2 및 C3+C4 이중가닥 DNA를 상기와 동일한 방법으로 절찰하고, 상기 절찰산물을 주형으로 하여, *MunI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 CF 프라이머(서열번호 36) 및 *SacI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 CR 프라이머(서열번호 37)로 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 상기 A 단편의 제조시와 동일하게 수행하였다. PCR 증폭 결과 생성된 산물을 회수하고 제한효소 *SacI* 및 *MunI*으로 처리하여 절단 한 후 겔 정제하여 294bp 크기의 이중가닥 DNA 단편 C를 획득하였다.

이중가닥 DNA 단편 D는 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(D1, D2, D3, D4)를 이용하여 합성하였다. D1 및 D2를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 89bp 크기의 이중가닥 DNA(D1+D2)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *NheI*으로 처리하여 3'부분을 점착성 말단화하였다. 또한, D3 및 D4를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 121bp 크기의 이중가닥 DNA(D3+D4)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *NheI*으로 처리하여 5'부분을 점착성 말단화하였다. 합성된 상기의 D1+D2 및 D3+D4 이중가닥 DNA를 상기와 동일한 방법으로 절찰하고, 상기 절찰산물을 주형으로 하여, *SacI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 DF 프라이머(서열번호 38) 및 *PstI* 제한효소 인식 부위를 포함하는 DR 프라이머(서열번호 39)로 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 상기 A 단편의 제조시와 동일하게 수행하였다. PCR 증폭 결과 생성된 산물을 회수하고 제한효소 *SacI* 및 *PstI*으로 처리하여 절단 한 후 겔 정제하여 184bp 크기의 이중가닥 DNA 단편 D를 획득하였다.

이중가닥 DNA 단편 E는 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(E1, E2, E3, E4)를 이용하여 합성하였다. E1 및 E2를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 116bp 크기의 이중가닥 DNA(E1+E2)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *BssHIII*로 처리하여 3'부분을 점착성 말단화하였다. 또한, E3 및 E4를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 119bp 크기의 이중가닥 DNA(E3+E4)를 합성하고 상기 이중가닥

DNA를 *Bss*HII로 처리하여 5'부분을 점착성 말단화하였다. 합성된 상기의 E1+E2 및 E3+E4 이중가닥 DNA를 상기와 동일한 방법으로 절찰하고, 상기 절찰산물을 주형으로 하여, *Pst*I 제한효소 인식 부위를 포함하는 EF 프라이머(서열번호 40) 및 *Xho*I 제한효소 인식 부위를 포함하는 ER 프라이머(서열번호 41)로 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 상기 A 단편의 제조시와 동일하게 수행하였다. PCR 증폭 결과 생성된 산물을 회수하고 제한효소 *Pst*I 및 *Xho*I으로 처리하여 절단 한 후 겔 정제하여 207bp 크기의 이중가닥 DNA 단편 E를 수득하였다.

이중가닥 DNA 단편 F는 4개의 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(F1, F2, F3, F4)를 이용하여 합성하였다. F1 및 F2를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 124bp 크기의 이중가닥 DNA(F1+F2)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *Nsi*I로 처리하여 3'부분을 점착성 말단화하였다. 또한, F3 및 F4를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 105bp 크기의 이중가닥 DNA(F3+F4)를 합성하고 상기 이중가닥 DNA를 *Nsi*I로 처리하여 5'부분을 점착성 말단화하였다. 합성된 상기의 F1+F2 및 F3+F4 이중가닥 DNA를 상기와 동일한 방법으로 절찰하고, 상기 절찰산물을 주형으로 하여, *Xho*I 제한효소 인식 부위를 포함하는 FF 프라이머(서열번호 42) 및 *Kpn*I 제한효소 인식 부위를 포함하는 FR 프라이머(서열번호 43)로 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 상기 A 단편의 제조시와 동일하게 수행하였다. PCR 증폭 결과 생성된 산물을 회수하고 제한효소 *Xho*I 및 *Kpn*I으로 처리하여 절단 한 후 겔 정제하여 206bp 크기의 이중가닥 DNA 단편 F를 수득하였다.

#### 4) 이중가닥 DNA 단편의 벡터로의 클로닝 및 염기서열 확인

상기 3)에서 제조한 각각의 이중 가닥 DNA 단편 A 내지 F를 pBluescript 벡터 (Stratagene, USA)내의 동일한 제한 효소 자리에 삽입한 다음 염기서열의 이상 여부를 확인하였다. 즉, 253bp 크기의 A 단편을 pBluscript 벡터 (Stratagene, USA)의 *Hind*III 및 *Eco*RI 자리에 절찰(ligation)하기 위해 상기 A 단편과 pBluscript 벡터를 5× 절찰효소 완충액 5  $\mu$ l 및 절찰효소 1.5  $\mu$ l와 혼합한 후, 21°C에서 90분 간 반응시켰다. 상기 A 단편이 삽입된 플라스미드를 공지의 방법으로 대장균에 형질전환 후, 형질전환된 대장균을 배양하였다. 상기 배양한 대장균으로부터 Qiagen 플라스미드 키트(미국)를 이용하여 A 단편이 삽입된 플라스미드를 회수함으로써 pBlue: A 플라스미드를 수득하였다(그림 3-2).

B, C, D 단편을 pBluescript(Strategene, USA)의 *EcoRI/PstI* 자리에 상기와 동일한 방법으로 절찰하고 이를 대장균에 형질전환시킨 후 상기 대장균으로부터 pBlue:B+C+D 플라스미드를 수득하였다. 또한, E, F 단편을 pBluescript (Strategene, USA)의 *PstI/KpnI* 자리로 상기와 동일한 방법으로 절찰하고 이를 대장균에 형질전환 한 다음 상기 대장균으로부터 pBlue : E+F 플라스미드를 수득하였다. 상기에 서 수득된 pBlue:A, pBlue:B+C+D, pBlue:E+F 플라스미드의 삽입 염기서열은 바이오니아 사(청원군, 대한민국)에 의뢰하여 분석하였다.

#### 5) 전장(full length) 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자의 합성

상기 4)에서 합성한 이중 가닥 DNA 단편 A 내지 F를 중합하여 전체 길이 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자(1416bp)를 합성하였다. 즉, A 단편이 삽입된 벡터(pBlue:A)에 *HindIII* 및 *EcoRI*을 처리하여 *HindIII/EcoRI* 점착성 말단을 가지는 DNA 단편 A(253 염기쌍)와, B, C, D 단편이 삽입된 벡터 (pBlue: B+C+D)에 *EcoRI* 및 *PstI*를 처리하여 *EcoRI/PstI* 점착성 말단을 가지는 DNA 단편 B+C+D(750 염기쌍) 및 E, F 단편이 삽입된 벡터(pBlue:E+F)에 *PstI* 및 *KpnI*을 처리하여 *PstI/KpnI* 점착성 말단을 가지는 DNA 단편 E+F(413 염기쌍)로 각각 분리하였다.

상기 유전자 단편 A, B+C+D, 및 E+F를 *HindIII/KpnI*으로 절개한 pBluescript의 *HindIII/KpnI* 자리에 절찰하였다.

상기에서 절찰된 DNA를 Qiagen 플라스미드 정제 키트(미국)를 사용하여 정제 하였으며, 염기서열은 바이오니아 사(청원군, 대한민국)에 분석을 의뢰하여 확인하고 1416bp 크기의 A+B+C+D+E+F로 이루어진 프로토포르피리노겐 옥시다아제 합성 유전자(서열번호 1)를 수득하였다.

[합성 유전자 전장서열 및 본 실험에 사용된 염기 서열번호]

<서열번호 1> (합성 유전자의 full length sequence)

atgcatcaca tgccaagaac aactggaatg aatgttgcag tagttggagg tgggatttct 60  
 ggtttggcag ttgcacatca tttgagatct aggggtactg atgcagtact tctcgagtca 120  
 tctgctagac ttggaggtgc agttggaact catgcacttg ctggatacct agtagaacia 180  
 ggtcctaata gttttcttga tcgtgaacca gcaactcgtg ctctagcagc agctcttaat 240  
 cttgaaggac gaattcgcgc tgctgatcct gctgcaaagc gtcgatatgt atacactcgt 300  
 ggtagactcc gatctgtacc agcttcacct ccagcatttc ttgcatcaga tattcttctt 360  
 ctaggtgctc gattgcgtgt tgctggagag ctcttttcac gtagagcacc tgagggtgtt 420  
 gatgaatctc tagctgcatt tggccgacgt catctaggac atagggctac gcaggtactt 480  
 ctgatgcag ttcagactgg tatctacgct ggagatgtgg aacaattgag tgtcgctgca 540  
 acttttccta tgctggttaa gatggaacgt gaacatcgaa gtcttattct cggtgcaatc 600  
 cgcgcaaaa aggctcaacg tcaggcagcg ctcccagctg gaacagcacc gaaattgtcc 660  
 ggagcactta gcacgtttga tgggtgattg caagtgtca tagatgcgct tgcagcttca 720  
 ttgggtgatg cagctcatgt aggagcacgc gttgaaggac tagcacgaga ggatggcgga 780  
 tggagactta ttatogaaga gcatggtcgt cgcgagagc tctctgttgc acaagtggta 840  
 ttggcagctc cagcgcattg tactgctaaa ttgcttcgtc cactcgatga tgcgctagcg 900  
 gcactcgtag caggtattgc ttatgctcct atcgcagttg ttcatctagg ttttgatgca 960  
 ggaacacttc cggctcctga tggttttgga ttcttggtgc ctgcagaaga gcaacgtcga 1020  
 atgcttggtg caattcatgc ttctactact tttccatttc gagctgaagg tggacgtgtt 1080  
 ctctattctt gtatgggtgg aggcgcgct caaccaggac tggttgaaca ggatgaggat 1140  
 gctttggctg cactagcacg agaagaactg aaggcacttg caggcgttac agctcgcctt 1200  
 tcatttactc gagtgtttgc ctggccactt ggtattcctc aatacaatct cggacatctt 1260  
 gaacgagtgg ctgctattga tgcggcacta caacgtttgc cgggccttca tctaattgga 1320  
 aatgcataca aggggtgttg actaaatgat tgtattcgca acgcagctca actagcagac 1380  
 gcgctcgttg ccggttaatac ttctcatgca ccgtag 1416

<서열번호 2> (Single strand oligonucleotide A1)

atgcatcaca tgccaagaac aactggaatg aatgttgcag tagttggagg tgggatttct  
 ggtttgg 67

<서열번호 3> (Single strand oligonucleotide A2)

tgactcgaga agtactgcat cagtaccct agatctcaa tgatgtgcaa ctgccaacc  
 agaaatc 67

<서열번호 4> (Single strand oligonucleotide A3)

cttctcgagt catctgctag acttggaggt gcagttggaa ctcatgcact tgctggatac ctagtagaac aa	72
<서열번호 5> (Single strand oligonucleotide A4)	
attaagagct gctgctagag cacgagttgc tggttcacga tcaagaaaac tattaggacc ttgttctact ag	72
<서열번호 6> (Single strand oligonucleotide B1)	
gctgctgatac ctgctgcaaa gcgtogatat gtatacactc gtggtagact ccgatctgta ccagcttcac ctcca	75
<서열번호 7> (Single strand oligonucleotide B2)	
aaagagctct ccagcaacac gcaatcgagc acctagagga agaatatctg atgcaagaaa tgctggaggt gaagc	75
<서열번호 8> (Single strand oligonucleotide B3)	
ggagagctct tttcacgtag agcacctgag ggtgttgatg aatctctagc tgcatttggc cgacgtcatc tagga	75
<서열번호 9> (Single strand oligonucleotide B4)	
cacatctcca gcgtagatac cagtctgaac tgcattcgaga agtacctgag tagccctatg tcctagatga cgt	73
<서열번호 10> (Single strand oligonucleotide C1)	
gcaacttttc ctatgctggt taagatggaa cgtgaacatc gaagtcttat tctcggtgca atccgcgcac aa	72
<서열번호 11> (Single strand oligonucleotide C2)	
tgctccggac aatttcggtg ctgttccagc tgggagcgtt gcctgacgtt gagccttttg tgccgaggat	69
<서열번호 12> (Single strand oligonucleotide C3)	
ttgtccggag cacttagcac gtttgatggt ggattgcaag tgctcataga tgcgcttgca gcttcattgg gtgatgca	78
<서열번호 13> (Single strand oligonucleotide C4)	
ttcgataata agtctccatc cgccatcctc tctgtgctagt ccttcaacgc gtgctcctac atgagctgca tcacccaa	78
<서열번호 14> (Single strand oligonucleotide D1)	
gcagagctct ctgttgcaaca agtggatttg gcagctccag cgcatgctac tg	52
<서열번호 15> (Single strand oligonucleotide D2)	
gccgctagcg catcatcgag tggacgaagc aatttagcag tagcatgag	49

<서열번호 16> (Single strand oligonucleotide D3)	
tgcgctagcg gcactcgtag caggtattgc ttatgctcct atcgcagttg ttcacttagg	
ttttgat	67
<서열번호 17> (Single strand oligonucleotide D4)	
ctcttctgca ggcaccagga atccaaaacc atcaggagcc ggaagtgttc ctgcatcaaa	
acctag	66
<서열번호 18> (Single strand oligonucleotide E1)	
gtgcctgcag aagagcaacg tcgaatgctt ggtgcaattc atgcttctac tactttcca	
<서열번호 19> (Single strand oligonucleotide E2)	
tgacgcgcgc ctcccacat acaagaatag agaacacgtc caccttcagc tcgaaatgga	
aaagtagt	68
<서열번호 20> (Single strand oligonucleotide E3)	
gaggcgcgcg tcaaccagga ctggttgaac aggatgagga tgctttggct gcactagcac	
gag	63
<서열번호 21> (Single strand oligonucleotide E4)	
aaacactcga gtaaataag ggcgagctgt aacgcctgca agtgccttca gttcttctcg	
tgctagtg	68
<서열번호 22> (Single strand oligonucleotide F1)	
actcgagtgt ttcgctggcc acttggattt cctcaataca atctcggaca tcttgaacga	
gtggct	66
<서열번호 23> (Single strand oligonucleotide F2)	
tgtatgcatt tccaattaga tgaaggcccg gcaaacgttg tagtgccgca tcaatagcag	
ccactcgttc	70
<서열번호 24> (Single strand oligonucleotide F3)	
gaaatgcata caaggtgtt ggactaaatg attgtattcg caacgcagct caactagca	59
<서열번호 25> (Single strand oligonucleotide F4)	
gggtacccta cggtgcatga gaagtattac cggcaacgag cgcgtctgct agttgagc	58
<서열번호 26> (Double strand DNA fragment A)	
atgcaccaca tgccgaggac aactggaatg aatgtcgccg tcgtgggagg tgggatttcg	60
ggtttggcag ttgcacatca tttgagatct aggggtactg atgcagtact tctcgagtca	120
tctgctagac ttggaggtgc agttggaact catgcacttg ctggatacct agtagaacia	180
ggtcctaata gttttcttga tcgtgaacca gcaactcgtg ctctagcagc agctcttaat	240
cttgaaggac gaa	253

<서열번호 27> (Double strand DNA fragment B)

ttcgcgctgc tgatcctgct gcaaagcgtc gatatgtata cactcgtggg agactccgat 60  
ctgtaccagc ttcacctcca gcatttcttg catcagatat tcttcctcta ggtgctcgat 120  
tgcgtgttgc tggagagctc ttttcacgta gagcacctga ggggtgttgat gaatctctag 180  
ctgcatttgg ccgacgtcat ctaggacata gggctacgca ggtacttctc gatgcagttc 240  
agactgggat ctacgctgga gatgtggaac aa 272

<서열번호 28> (Double strand DNA fragment C)

ttgagtgtcg ctgcaacttt tcctatgctg gttaagatgg aacgtgaaca tcgaagtctt 60  
attctcgggtg caatccgctc acaaaaggct caacgtcagg cagcgcctcc agctggaaca 120  
gcaccgaaat tgtccggagc acttagcacg ttgatgggtg gattgcaagt gctcatagat 180  
gcgcttgcag cttcattggg tgatgcagct catgtaggag cacgcgttga aggactagca 240  
cgagaggatg gcggatggag acttattatc gaagagcatg gtcgtcgcgc agag 294

<서열번호 29> (Double strand DNA fragment D)

ctctctgttg cacaagtggg attggcagct ccagcgcctg ctactgctaa attgcttcgt 60  
ccactcgatg atgcgctagc ggcactcgta gcaggtattg cttatgctcc tatcgcagtt 120  
gttcatctag gttttgatgc aggaacactt ccggctcctg atggttttgg attcctgggtg 180  
cctg 184

<서열번호 30> (Double strand DNA fragment E)

cagaagagca acgtcgaatg ctgggtgcaa ttcattgctt tactactttt ccatttcgag 60  
ctgaaggtgg acgtgttctc tattcttgta tgggtgggagg cgccgcgtcaa ccaggactgg 120  
ttgaacagga tgaggatgct ttggctgcac tagcaccgaga agaactgaag gcacttgcag 180  
gcgttacagc tcgcccttca ttactc 207

<서열번호 31> (Double strand DNA fragment F)

gagtgtttcg ctggccactt ggtattcctc aatacaatct cggacatctt gaacgagtgg 60  
ctgctattga tgcggcacta caacgtttgc cgggccttca tctaattgga aatgcataca 120  
aggggtgttg actaaatgat tgtattcgca accgagctca actagcagac gcgctcgttg 180  
ccgtaatac ttctcatgca ccgtag 206

<서열번호 32> Primer AF

atcaagctta tgcattcacat gccaaaga 27

<서열번호 33> Primer AR

cgccaattcg tccttcaaga ttaagagctg ctgctag 37

<서열번호 34> Primer BF

ggccaattcg cgctgctgat cctgctgca 29

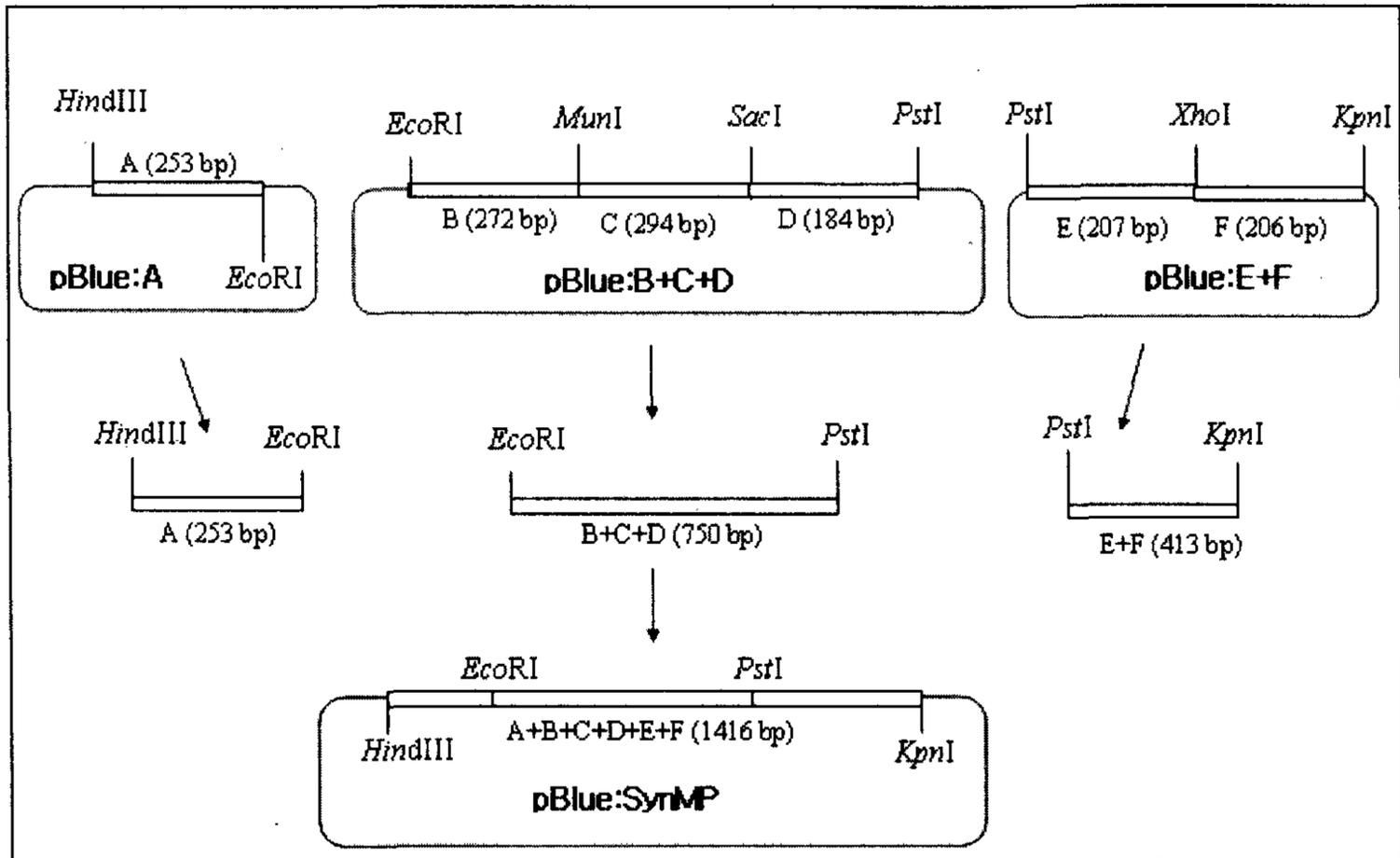
<서열번호 35> Primer BR	
actcaattgt tccacatctc cagcgtagat	30
<서열번호 36> Primer CF	
acaattgagt gtcgctgcaa cttttcctat g	31
<서열번호 37> Primer CR	
agagctctgc gcgacgacca tgctcttcga taataagtct	40
<서열번호 38> Primer DF	
gcagagctct ctggtgca	18
<서열번호 39> Primer DR	
ctctttctgca ggcaccag	18
<서열번호 40> Primer EF	
gtgcctgcag aagagcaa	18
<서열번호 41> Primer ER	
aaacactcga gtaaata	18
<서열번호 42> Primer FF	
actcgagtgt ttcgctgg	18
<서열번호 43> Primer FR	
gggtacccta cggtgcatg	19
<서열번호 44> primer for PCR of a synthetic protoporphyrinogen oxidase gene	
atcaagctta tgcacacat gccaga	27
서열번호 45> primer for PCR of a synthetic protoporphyrinogen oxidase gene	
gggtacccta cggtgcatga gaagt	25

#### 나. 합성유전자의 대장균발현 및 항체획득

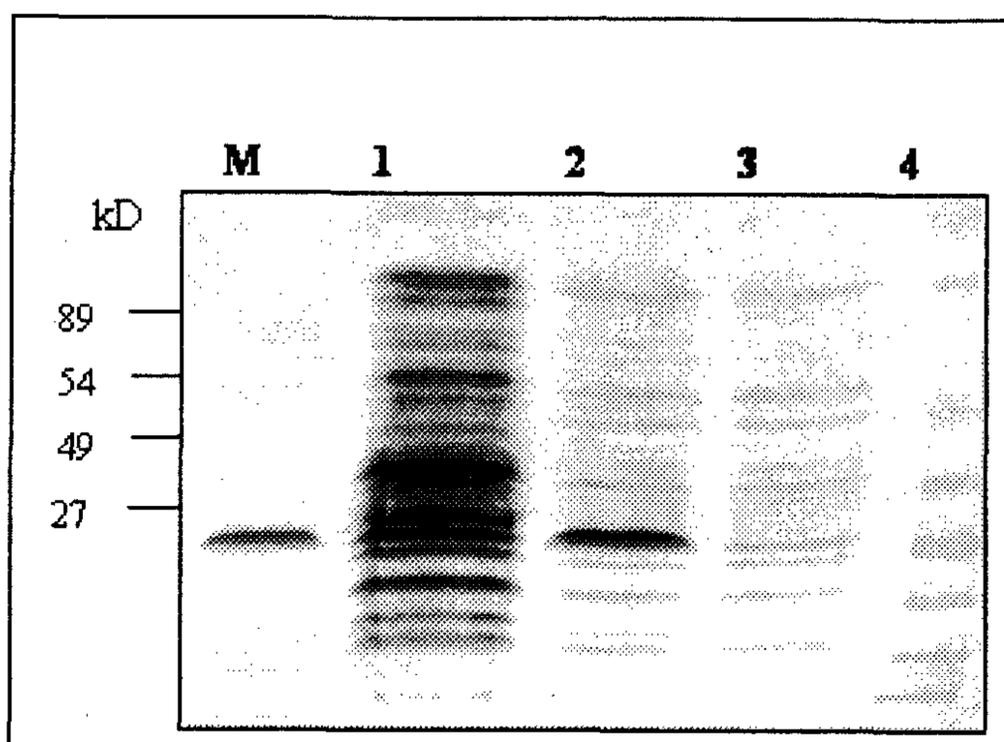
*M. xanthus* 유래한 합성 Protox가 효소 활성을 갖는 단백질을 coding 하는지를 검증하기 위하여 먼저 대장균 내에서 히스티딘으로 테깅된 (histidine-tagged) 제조합체 형태의 합성 Protox가 합성되었다. 그 후 이 제조합체를 affinity chromatography 방법으로 정제하여 그 특성이 조사되었다. 전장 Protox cDNA (full length cDNA)를 전사 종결 codon을 제외하고 대장균 발현 벡터인 pET28(b)에 삽입하여 Protox 발현 construct로 준비하였다. 이 제조합체 중 원하는 염기서열이 정확히 전사 번역되어 완전한 단백질로 발현되게 하기 위하여 6개 histidine tag은 벡터의 카복실 말단에 연결하였다.

그림 3-3은 대장균 내에서의 제조합 Prottox 의 발현과 정제를 보여주고 있다. IPTG로 유도하기 전후의 total 그리고 soluble 단백질을 볼 수 있는데, 제조합 Prottox는 IPTG에 의해 그 발현이 높은 수준으로 유도 되었다. 일반적으로 대장균의 총 soluble 단백질의 15-30% 정도가 recombinant Prottox 로 나타났다(그림 3-3).

단과정(one step)의 친화 정제 (affinity purification)는 Ni-NTA column을 사용해 수행하였으며 그에 의해 얻어진 His-tagged 단백질은 약 0.5-0.7 mg/0.1 L culture 였다. 이것은 대장균의 전체 soluble 단백질 중 Prottox 단백질이 약 2.7-3.8 % 로 얻어지는 짐을 보여준다. 그리고 정제된 His-tagged Prottox 단백질을 이용하여 효소활성을 측정한 결과, 높은 Prottox 효소활성을 지니고 있으며, inhibitor 인 oxyfluorfen 처리시 효소활성이 강력히 저해되는 고유의 특성을 지니고 있음을 확인하였다. 또한 상기의 정제된 Prottox 단백질로부터 polyclonal 항체를 Takara (Korea)에 의뢰하여, 항체를 획득하였다.



**Fig. 3-2.** Strategy for full length synthetic *Mx* Protoc gene by assembling six double stranded fragments.



**Fig. 3-3.** Functional expression of the modified *Mx* Prottox gene in *E. coli*. Expression of the modified *Mx* Prottox gene in *E. coli* and affinity purification of His-tagged Prottox protein. *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the pET28b-Prottox plasmid construct were cultured with or without isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG) before preparation of total and soluble protein extracts. Extracts were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels, which were stained for protein using Coomassie Brilliant Blue: M, molecular weight standards lane 1, total protein in 15- $\mu$ l aliquots of bacterial cells without IPTG; lane 2, total protein after IPTG treatment; lane 3, 20  $\mu$ g of the 15,000 g supernatant fraction solubilized with 0.5% n-octyl-D-glucopyranoside lane 4, Prottox protein (20  $\mu$ g) purified by Ni-NTA affinity chromatography.

## 제 2 절 합성 *M. xanthus* Protox 유전자를 발현하는 형질 전환벼의 제초제 저항성 검정

### 1. 서 설

471개의 아미노산으로 구성된 *M. xanthus* Protox 유전자를 coding하고 있는 1416 bp 길이(TAA 포함)를 가진 *M. xanthus* 유전자를 식물이 선호하는 codon usage에 맞게 고안하여, 기내에서 합성하여, 대장균에 발현하였으며, recombinant *Mx* Protox 효소가 Protox 효소활성을 보임을 확인 한 다음, 합성 *Mx* Protox 유전자를 식물형질전환용 binary vector pGA1611에 subcloning 하였다. *Mx* Protox 유전자를 옥수수 ubiquitin promoter 조절하에 두어 항상발현되도록 하였으며, 형질전환 세포주 선발은 항생제 hygromycin을 이용하였다. 1년차의 T<sub>0</sub> 형질전환벼를 independent line으로서 25개체 육성하여, 2004년 5월 포장에 이양하여, 2004년 10월에 T<sub>1</sub> 종자를 획득하였으며, 이들 T<sub>0</sub> 및 T<sub>1</sub> 형질전환체가 실제로 합성 Protox 유전자를 발현하는지, 선발마커인 하이그로마이신 저항성 검정, Southern blot analysis, Northern blot analysis, 기초적인 제초제 저항성 검정, 및 Protox 과다발현에 의한 Proto IX 축적의 가능성 등을 빛의 유무에 따라 생장시키는 방법 등을 이용하여 실험을 하였다. 또한 하이그로마이신 저항성 분리비 및 Southern blot 분석에 의하여 single copy로 삽입된 것으로 나타난 T<sub>1</sub> 종자를 심어 T<sub>2</sub> 종자를 획득하여 homozygous line을 hygromycin 분리비로 통하여 선발하였다. 선발된 homozygous lines들의 제초제저항성 정도를 native *Mx* Protox 유전자를 발현하는 형질전환벼와 비교 검정하였다. 본 연구로 통해서 합성 *Mx* Protox 유전자가 식물체내에서 native *Mx* Protox 유전자와 동일하게 발현되어 제초제 저항성을 부여하는지 재확인하는 일과 또한 합성 *Mx* Protox 유전자의 식물체내에서 발현율이 native *Mx* Protox 보다 많은지 혹은 적은지 규명하고자 한다. 본 실험을 통하여 *Mx* Protox의 G+C content가 벼 내에서 발현정도에 어떠한 영향을 미치는지 알 수 있으며 발현율과 과산화작용제초제의 저항성 정도에 미치는 영향을 알 수 있게 됨으로, 추후 *Mx* Protox 유전자의 적절한 발현을 통해 보다 안정적이고 제초제저항성이 높은 형질전환식물 육성에 좋은 자료를 제공하여 줄 뿐 만아니라 합

성유전자 발현 형질전환체 자체를 직접 이용할 수 있을 것이다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. 합성 Protox 발현 형질전환체 육성

형질전환용 binary vector 작성 (pGA1611:synMx binary vector construction) - PCR을 이용 Protox의 ORF부분을 design된 primer를 사용 증폭하여 적정 제한효소로 자른 후 binary vector에 ligation 하여 최종적으로 *Agrobacterium tumefaciens* 4404 에 형질전환 하였다. *Agrobacterium* 매개방법에 의한 벼 형질전환은 동진벼의 scutellum에서 유래한 calli를 사용하였다. *Agrobacterium* 매개방법에 의한 벼 형질전환은 본 연구실에 set up 된 방법(Ha et al., 2004, Lee et al., 2000)에 따라 형질전환 하였다.

### 나. 합성 Protox 유전자 발현 형질전환체 육성 및 T<sub>1</sub> 종자 획득

조직배양을 이용하여 분화시킨 25 lines 의 독립된 형질전환체 T<sub>0</sub>세대 벼를 포장에 이양하여 재배하였다. T<sub>0</sub>세대로부터 자가 수분된 종자를 채취하여 T<sub>1</sub>종자를 수확하였다.

### 다. Southern blot 및 Northern blot 발현 분석

실험에 사용 될 잎(T<sub>0</sub> 혹 T<sub>1</sub>)을 액체질소에 담아서 곱게 빻은 후 TRI reagent (Sigma, USA) 1 mL당 시료 0.1 g을 혼합하여 상온에서 약 5분간 방치한 후 13,500rpm으로 10분간 원심분리 시켜 상등액만을 0.2 mL의 chloroform과 혼합하여 상온에서 10분간 방치한 후 다시 원심분리 하였다. 이 후 용액부분만을 새로운 튜브에 옮겨 0.5 mL의 isopropanol과 잘 섞은 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 원심분리를 하여 침전물을 diethyl pyrocarbonate-treated water(DEPC-treated water)에 녹여 전체 RNA를 준비하였다. 이 중 10 µg의 전체 RNA를 취하여 에탄올로 침전 시킨 후 6.5% formaldehyde와 50% formamide가 함유된 10x Mops 완충액과 혼합하여 80°C에서 3분간 변성시켰다. 변성된 시료를 1.9% formaldehyde가 포함된 1x Mops 완충액이 담긴 전기영동 kit에서 0.8% formaldehyde

agarose gel을 통하여 전체 RNA를 분리시켰다. 25 mM sodium phosphate로 두 번에 걸쳐 젤을 세척한 후 모세관 현상을 이용한 방법으로 전체 RNA를 nylon membrane에 전이시켜 UV-crosslinker로 고정시켰다. 이 nylon membrane에 프라이머 AF 5'-d(GCCATGGATCACATGCCAAGA)-3'와 그 역 프라이머인 5'-d(GGGTACCCTACGGTGCATGAGAAGT)-3' (carboxy-terminal sequence)를 이용하여 PCR로 얻어진 합성 DNA probe로 융합반응 시켰다. 그 후 <sup>32</sup>P-dCTP로 표지한 다음, hybridization buffer에서 반응시켜 phosphoimaging analyzer로 분석하였다. 각각의 전체 RNA는 블롯팅 이전에 에티디움 브로마이드로 같은 양을 분석하였다.

Genomic DNA는 DNAzol ES(Molecular Research Center, USA)를 사용하여 분리하였다. Genomic DNA(5 µg)를 제한효소로 자른 후, 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동하여 나일론 membrane(Nylon 66 plus, Pharmacia Biotech)으로 블롯팅하였다. 융합 반응은 RNA와 함께 실험을 수행하였다(Jang et al., 2004)

#### 라. 과산화작용 제초제 발아 저항성 검정

발아 테스트를 위하여 멸균한 0.5x MS(Murashige and Skoog)배지에 각각 다른 농도의 oxyfluorfen(경농 주식회사, 경주, 한국)을 처리한 후 재배종 벼인 동진 벼와 천연 Mx Protox 발현 형질전환 벼(M4, M7)와 합성 Mx Protox 형질전환 벼를 치상하였다. 성장 조건은 주야를 분간하여 8일 동안 28°C 배양실에서 성장하였다. 일면에 제초제 처리는 4주 동안 그린하우스에서 성장한 벼에 oxyfluorfen을 1 mM로 처리하여 실험하였다.

#### 마. 합성 Protox 발현 T<sub>1</sub> 형질전환체 종자의 유전력 검정

합성 Mx Protox 라는 외래 유전가가 도입된 자가수분된 벼에서 T<sub>1</sub>세대에서의 유전자 전이 유무와 후대 발아 분리비를 알아보기 위해 Hygromycin 선발배지에서 유전자의 삽입여부와 삽입 Loci를 검정하였다 보았다. T<sub>1</sub> 종자의 종피를 제거한 후 캘루스를 유도할 때 사용하였던 방법과 동일하게 70% 에탄올과 2% NaOCl로 표면 살균하였다. 이 후 50 mg/l hygromycin이 함유된 half-strength MS배지에 표면 살균된 종자를 치상하여 약 10일동안 암배양하여 종자의 발아유무를 검

정하여 저항성인 종자와 감수성인 종자의 분리비를 살펴보았다.

#### 바. 형질전환벼의 제초제 반응

조직배양을 이용하여 분화시킨 T<sub>0</sub> 세대로부터 채취한 T<sub>1</sub> 종자를 재배종 동진벼 (wild type), 기존에 만들었던 native Mx 형질전환 벼와 이번에 만든 합성 Mx형 질전환 벼로 구분하여 수행하였다. 각각의 종자들은 half-strength MS배지에 oxyfluorfen을 0 μM, 100 μM, 300 μM, 500 μM에 침종, 발아시킨 후 농도 당 20 개체씩을 치상하였다.

처리가 끝난 배지는 암상태로 유지하였으며 하루 후에 200 μmol photosynthetic photon flux density(PPFD)/m<sup>2</sup>/sec의 광도 하에 노출시켜 제초제의 광활성을 유도 하고, 노출 7일 후 각 개체의 생육상태를 관찰하였다.

#### 사. Western blot 분석

형질전환벼의 T<sub>2</sub> 세대의 잎을 0.2 g 채취하여 액체질소가스를 부어가며 곱게 빻은 다음 균질화 완충액(80 mM potassium phosphate buffer (pH7.0), 20% (w/v) glycerol, 10 mM sodium metabisulfate, 10 mM sodium ascorbate, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-mercaptoethanol 그리고, 10 mL 당 1개의 complete protease inhibitor[complete,Mini; Boehringer Mannheim])의 1 mL로 시료를 균질화 시켰다. 균질화 된 시료를 두 겹의 Miracloth[CalBiochem]를 통하여 여과시킨 다음 3,000g에서 10분간 원심분리 하였다. 이 후 상등액을 100,000g에서 10분간 원심분리 하여 생긴 침전물을 100 μL의 균질화 완충액으로 녹였다. 단백질을 10% SDS-PAGE에서 분리시킨 후 PVDF membrane에 전이시켜 *M. xanthus* Protoclonal 항체와 면역반응을 시켰다. 2차 항체반응과 밴드의 감지는 enhanced chemiluminescence system으로 매뉴얼에 따라 수행하였다(ECL kit; Boehringer Mannheim).

#### 아. 단백질 targeting을 위한 완두로부터 미토콘드리아 및 엽록체 분리

Dual import 분석을 위한 엽록체의 분리를 위하여 완두 잎 10 g을 grinding buffer(50 mM HEPES-KOH, 330 mM Sorbitol, 0.1%(w/v)BSA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>,

2mM MnCl<sub>2</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.3) 30 mL를 이용하여 균질화 기계에 간 후, Miracloth를 이용하여 여과를 한다. 5분 동안 2,000g에서 원심분리를 한 다음 붓을 이용하여 부드럽게 침전물을 섞어주고, 순수한 엽록체를 얻기 위해 percoll (50%)를 이용하여 10분 동안 12,100g로 원심분리하여 연한 갈색의 엽록체를 얻어 낸다. 얻어낸 침전물을 wash buffer(0.3 M sucrose, 10 mM TES, 0.1% BSA)를 이용하여 동일 조건 하에서 원심분리하여 실험에 임하였다. 미토콘드리아의 분리 는 30 g의 완두 잎을 grinding buffer(50 mM Hepes-KOH, 330 mM Sorbitol, 0.1%(w/v)BSA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.3) 90 mL 를 이용하여 균질화 기계에 간 후, Miracloth를 이용하여 여과를 한다. 5분 동안 2,450g에서 원심분리를 한 다음 침전물은 버리고 상등액을 조심히 옮겨 17,400g에서 20분 동안 원심분리한 다음 wash buffer를 이용하여 조심스럽게 붓으로 섞어준 후 다시 한번 같은 방법으로 원심분리를 한다. 이렇게 해서 얻어진 침전물을 다시 붓으로 잘 섞은 후 percoll을 이용하여 40분 동안 35,000g에서 원심분리를 한다. Percoll(18%, 23%, 40%)의 농도에 따라 층이 분리되는데 연노란색의 띠를 잘 건어 내어 wash buffer를 충분히 넣고 15분 동안 27,200g로 원심분리하여 침전물을 얻 고 다시 한번 같은 방법을 수행하여 순수한 미토콘드리아를 얻어 낼 수 있다.

#### 자. 단백질 targeting을 위한 Dual import 분석

분리된 완두의 chloroplasts와 mitochondria를 준비한다. Mitochondria는 단백질 농도로 chloroplasts는 chlorophyll 농도도 sample 량을 동일화 한다. (20 ul chloroplast 현탁액, 80 ul 100% acetone, 2 ml 80% acetone을 섞은 후, micro tube에 1 ml를 옮긴다. 20000 × g의 속도로 1분간 원심분리한다. 80% acetone을 blank로 사용하여 원심분리한 상등액을 645nm, 663nm에서 absorbance를 측정한다. 나온 값을 이용하여 농도를 계산한다. Master mix를 만들어 65 ul를 falcon tube에 옮긴다. Master mix의 조성은 아래와 같다. 1 ml 2X import buffer[0.3 M sucrose, 15 mM Hepes-KOH(pH7.4), 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2%(w/v)BSA], 8 ul 1M MgCl<sub>2</sub>, 80 ul 100 mM Meth, 80 ul 100 mM ATP, 20 ul 100 mM GTP, 4 ul 100 mM ADP, 20 ul 0.5 M DTT, 20 ul 1 M Potassium Acetate, 20 ul 1 M NaHCO<sub>3</sub>(사용전에 만듦), 728 ul dH<sub>2</sub>O이다. 10 ul(100 ug) mitochondria, 25 ul(25 ug) chloroplast에 in vitro translated 된 합성 Protox precursor를 100 ul 첨가한다.

합성 Precursor의 제조는 In vitro transcription/translation(Promega)- TNT을 사용하였다. 제조사의 방법에 따라 Lysate 25 ul, TNT reaction buffer 2 ul, TNT RNA polymerase 1 ul, Amino acid mix-minus Met 1 ul, [<sup>35</sup>S]Met 2 ul, RNasin inhibitor 1 ul, SP6 DNA(1 ug) 2 ul, Nuclease-free H<sub>2</sub>O 16 ul, 최종적으로 50 ul를 30°C에서 90분간 배양한 후, 2x import buffer 50 ul와 섞어준다. 광원하에서 가볍게 vortexing을 하면서 25°C에서 20분간 배양한다. 그 후, 100 ul씩 2개로 aliquot한다. 얼음상태에서 4 ul 5 mM CaCl<sub>2</sub>를 최종농도 0.1 mM이 되도록 처리한다. 6 ul 2 mg/ml thermolysin(최종농도 120 ug/ml)를 처리한 후 얼음위에서 30분간 배양한다. 2.5 ul 0.5 M EDTA(최종농도 10 mM)을 thermolysin넣은 sample에 처리한다. 4% percoll 용액을 sample에 채워 7000rpm의 속도로 30초간 원심분리한다. 침전물을 1 ml 1x dual import buffer을 사용하여 씻어준다. 이때 사용된 용액의 조성은 0.3 M sucrose, 15 mM Hepes-KOH(pH7.4), 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2%(w/v)BSA이다. Mitochondria sample은 20,000 × g의 속도에서 15 min, chloroplast sample은 2000 × g의 속도에서 5 min동안 원심분리한다. 각각의 침전물을 20 ul의 3x sample buffer에 녹인 후, 12% SDS-PAGE에 사용한다. 이때 사용되는 용액의 조성은 150 mM Tris-HCl(pH6.8), 0.3%(w/v) BPB, 6%(w/v) SDS, 30%(w/v) glycerol이다.

#### 차. Protoporphyrinogenoxidase(Protox) 효소활성 측정

Protoporphyrinogen oxidase 효소활성은 Lermontova & Grimm(2000) 방법으로 수행하였다. 기질인 Protogen IX은 Sigma에서 구입한 Proto IX을 sodium mercury amalgam을 사용하여 환원하여 제조하였다. 효소반응은 30°C에 5분간 반응시켰으며, ice-cold methanol:DMSO(8:2)을 첨가하여 반응을 종료하였다. Proto IX 함량은 고성능액체크로마토그래피(High-pressure liquid chromatography)를 사용하였으며, column은 Novapak C<sub>18</sub>(4-um particle size, 4.6 x 250 mm, Waters Chromatography, USA)을 이용하였고 flow rate는 분당 1 ml로 하였다. Porphyrins은 0.1 M ammonium phosphate(pH 5.8)과 methanol로 용출시켰으며, fluorescence detector(474, Waters)로 excitation 400 nm과 emission 630 nm으로 각각 사용하여 정량하였다(Jung et al., 2004).

### 3. 연구 수행 결과

#### 가. 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 이용한 벼의 형질전환

##### 1) 벼 형질전환용 벡터의 제조

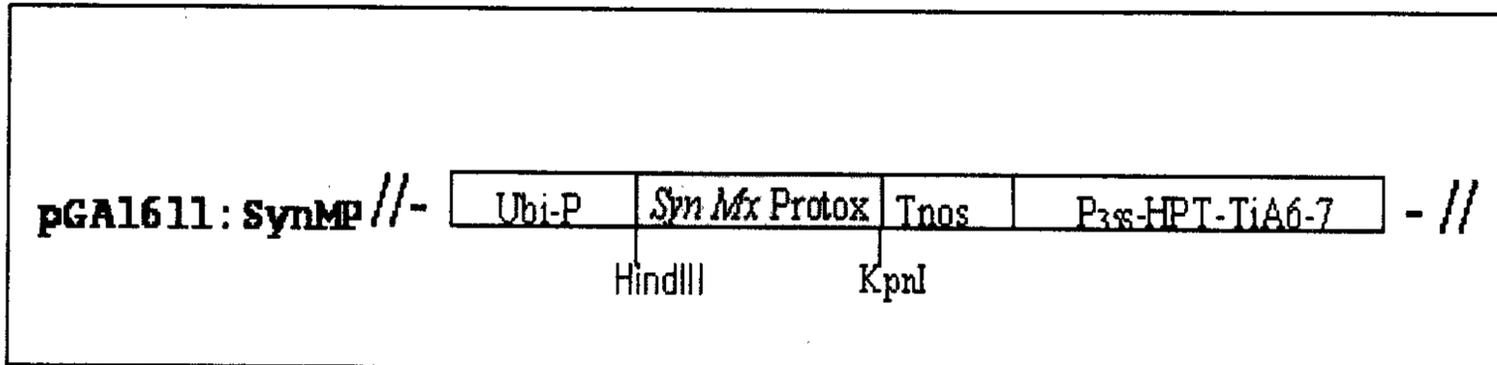
벼의 형질전환에 사용하기 위한 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 포함하는 벡터를 제조하였다. pBluescript에 함유된 합성 프로토포르피리노겐 옥시다아제 유전자를 제한 효소 *Hind*III 및 *Kpn*I를 이용하여 절단하고, 같은 부위로 절단된 binary vector pGA1611에 합성 유전자를 삽입시켜, 합성된 프로토포르피리노겐 옥시다아제의 전장 유전자를 발현할 수 있는 바이너리 벡터 pGA1611:SynMp를 제조하였다.

벼 형질전환용 벡터의 제조과정을 보다 구체적으로 설명하면, 합성 유전자를 주형으로 하고 센스 프라이머(서열번호 44) 및 안티센스 프라이머(서열번호 45)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 이때, 상기 프라이머들은 증폭 유전자의 간편한 서브클로닝을 위해 각각 *Hind*III 및 *Kpn*I 제한효소 인식 부위가 추가되었다. 하기에 기재된 프라이머의 각각의 염기서열에 밑줄 친 부분이 상기 제한효소 인식 부위를 나타낸다.

상기에서 수득된 PCR 반응 산물을 제한효소 *Hind*III 및 *Kpn*I으로 절단하고, 겔정제한 후, 벡터 pBluescript(Stratagene, USA)내의 동일한 제한효소 부위내로 삽입시켜 삽입된 염기서열의 이상 여부를 바이오니아 사(청원군, 대한민국)에 분석 서비스를 의뢰하여 확인하였다. 그 다음 상기 합성 유전자를 미리 동일한 제한효소로 처리한 pGA1611:C(기탁번호 KCTC 0692BP) 벡터에 리가아제(ligase)를 사용하여 결찰(ligation)시켜 옥수수 유비퀴틴 프로모터(Ubi-P)의 조절 하에 위치하게 함으로써, 바이너리 벡터 pGA1611:SynMP를 제작하였다(그림 3-4).

##### 2) 벼 형질전환 및 재분화

pGA1611:SynMP 재조합 벡터로 아그로박테리움 속 미생물을 형질전환하고 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 벼를 형질전환하였다. 형질전환을 위해 사용한 벼의 캘러스(callus)는 N6 배지(Rashid et al. 1996, Hiei et al. 1997)에서 파종된



**Fig. 3-4.** Schematic diagram of T-DNA region in binary vector pGA1611-Syn MP. Ubi-P: maize ubiquitin promoter, Tnos: nopaline synthase promoter, P35S: CaMV 35 S promoter, HPT: hygromycin phosphotransferase, TiA6-7: terminator.

벼의 배반(품종: 동진)으로부터 유도하였다. 3 내지 4 주령의 밀집된 벼의 캘러스를 상기 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404 현탁액 중에 3분 동안 침적시키고, 이후, 멸균 여과지를 현탁액에 접촉시켜 현탁액을 흡수 및 건조시킴으로써 과량의 균체를 현탁액에서 제거하였다. 이후, 현탁액 중의 캘러스를 공조배양 배지로 옮기고, 25°C의 암실에서 2일 내지 3일 동안 공조 배양시켰다. 공조 배양된 캘러스를 세포탁심(Cefotaxime) 250 mg/L가 함유된 멸균수로 세척하여 잔존 세균을 제거하고, 세균이 제거된 캘러스를 세포탁심(Cefotaxime) 250mg/L 및 하이그로마이신 50 mg/L을 포함하는 N6 배지로 옮겨 배양하였다. 3주 내지 4주 동안의 배양 과정 중에 선별된 캘러스들을 잎 및 뿌리 성장용 재분화 배지로 옮겨 배양시켰다(그림 3-5). 총 20여종의 independent 형질전환 lines을 획득하였으며, 정시 이양시에 T<sub>0</sub> 개체를 이양하여 종자를 획득하였다.

#### 나. 식물의 선호 코돈으로 변환한 *M. xanthus* 유래의 합성 프로토포르피리노젠 옥시다아제(Protox) 유전자의 특성

Native *M. xanthus* 프로토포르피리노젠 옥시다아제 유전자의 codon usage는 식물과 매우 다른 것으로 나타났다. 첫째로 G+C 함량이 71% 정도로 매우 높아, codon의 마지막 nt는 G 및 C를 A 및 T보다 선호하는 경향에서 G+C 함량이 높은 것을 알 수 있다. 따라서, *M. xanthus* Protox 를 암호화하는 유전자의 아미노산 서열은 변경하지 않고 염기서열만을 식물의 선호 코돈으로 변환되도록 설계하였다(그림 3-6). 총 1416 bp 길이의 합성 *M. xanthus* Protox 유전자의 codon usage는 애기장대 Protox 유전자의 codon usage에 준하여 설계하였다. 결과적으로 총 G+C 함량이 49%의 *M. xanthus* 합성 Protox는 애기장대의 G+C 함량(46%)와 유사하였다. 이 합성 유전자를 옥수수 ubiquitin promoter를 조절유전자와 형질전환 선발마커로서 Hygromycin을 가진 pGA1611을 binary vector로 사용하여, 벼에 형질전환 하였다. 총 기내에서 서로다른 calli에서 재분화된 총 25개체를 포장에 이양하여, 25개의 독립된 형질전환 T<sub>1</sub> 종자를 확보하였다.

#### 다. 합성 Protox 유전자 발현 형질전환벼의 유전력 검증

25개체의 독립된 lines 들로부터, 다양한 정도의 종자가 결실하였으며, 한 개체



**Fig. 3-5.** Calli in shoot regeneration medium(A). Regenerated shoot on rooting medium. The calli growing vigorously on 2N6 selection medium(2mg 2,4-D/l) were began to initiate chrolophyll formation and emerge shoot 2 weeks after regeneration medium. Shoot can initiate root 7 days after rooting medium.

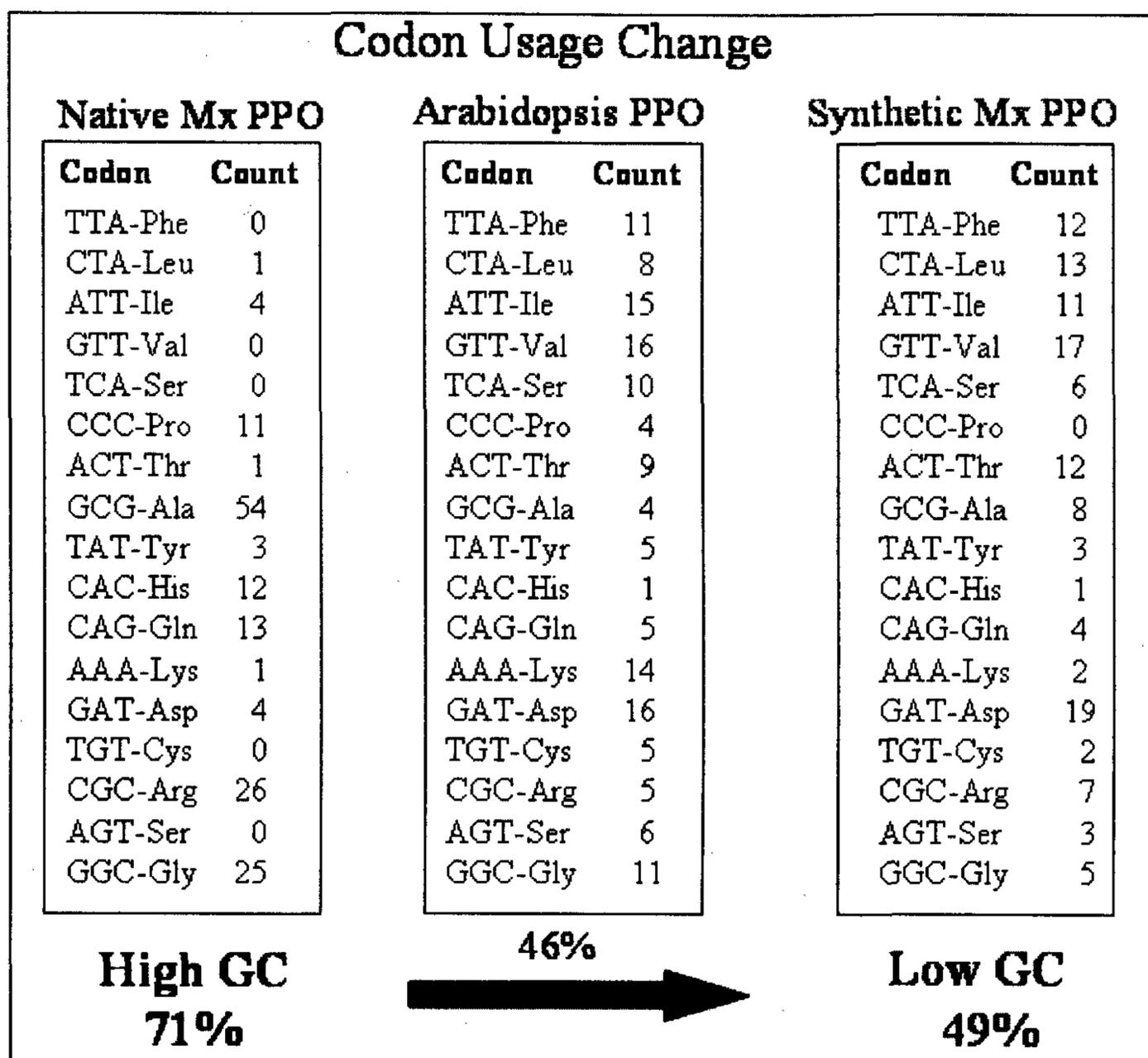


Fig. 3-6. Codon usage change for generating synthetic Mx Prottox.

(line 24)는 생육도중 고사한 개체로 있었다. T<sub>0</sub> 개체의 생육도중의 고사는 Protox transgene 의 발현과는 무관하며, 기내 배양에 따른 투명화현상에 기인하거나, Protox transgene 의 벼 게놈내 삽입 위치가 벼의 생육에 필수적인 유전자의 knock out 현상에 기인할 수도 있는 것으로 추정되나, 대부분의 형질전환 개체에서 종자를 수확할 수 있었다. 개체별 종자의량은 50개에서 많게는 800개 정도 확보할 수 있었다.

이들 종자의 유전력을 검정하기 위해 가장 쉬운 방법으로서, hygromycin 50 mg/mL 농도가 함유된 MS배지에서 성장하는 개체수를 세어봄으로서, 유전자의 삽입 loci의 정도를 측정할 수 있다. 종자를 확보된 총 24 lines 들의 T<sub>1</sub> 종자(30개)를 이용하여, hygromycin 저항성과 감수성 종자를 비율을 산정하였다(표 3).

Line 16, line 17, line 18 및 line 22의 종자들은 hygromycin에서 살아 남는 개체가 없으므로, 이들 lines 들은 T-DNA가 삽입되지 않았음을 알 수 있었다. 또한 30개의 종자가 모두 저항성을 보이는 lines들이 3개체(line 4, line 13, line 25)가 있었다. 이들은 T-DNA가 최소한 2곳 이상의 loci에 삽입됨을 추정할 수 있었다. 그 외 17개의 lines 들은 hygromycin 저항성 대 감수성 비율이 3:1로 나타남을 확인할 수 있었다. 이들 형질전환벼들은 T-DNA가 벼의 게놈에 single locus에 삽입되어, 1개의 유전자처럼 행동하는 하는 것으로 추정할 수 있었다. 카이자승 검정의 값이 높은 몇 개의 lines들은 검정 개체수를 증대시킬 경우 대부분 수치가 낮아지는 경향이 있다. Hygromycin에 의한 유전력 검정은 T-DNA의 삽입에 따른 selectable marker인 hygromycin 의 유무에 의한 copy 수를 추정하는 것이기에, Southern blot 분석에 의한 물리적인 삽입수와는 다르며, Hygromycin 저항성 검정에서 1개의 locus에 삽입되었더라도, Southern blot 분석에서 2개의 copy로 삽입되어 나타나는 경향도 빈번하다. 이와같은 경우는 T-DNA가 서로 매우 가까운 장소에 위치하여, 마치 1개의 유전자처럼 행동하는 것들이다. Hygromycin 검정으로 통하여 합성 유전자가 포함된 T-DNA가 최소한 20 개체에 안정적으로 삽입되어 멘델 유전으로 유전됨을 확인할 수 있었다.

**Table 3.** Segregation ratio of transgene in transgenic rice expressing the synthetic Mx Protox

Lines	Hygromycin		Total	Loci	$\chi^2$ (3:1)	Lines	Hygromycin		Total	Loci	$\chi^2$ (3:1)
	R	S					R	S			
1	19	11	30	1	2.18	14	15	17	32	1	13.5
2	20	11	31	1	1.82	15	24	8	32	1	0
3	22	8	30	1	0.04	15	0	31	31	0	93
4	30	1	31	>2	7.84	17	0	31	31	0	93
5	24	8	32	1	0	18	0	31	31	0	93
6	24	7	31	1	0.1	19	19	11	30	1	2.18
7	24	7	31	1	0.1	20	23	7	30	1	0.04
8	20	11	31	1	1.82	21	23	9	31	1	0.17
9	18	13	31	1	4.74	22	0	31	31	0	93
10	23	8	31	1	0.01	23	22	10	32	1	0.67
11	24	7	31	1	0.1	24	-	-	-	No seed	-
12	21	10	31	1	0.87	25	33	0	33	>3	11
13	32	0	32	>3	10.7						

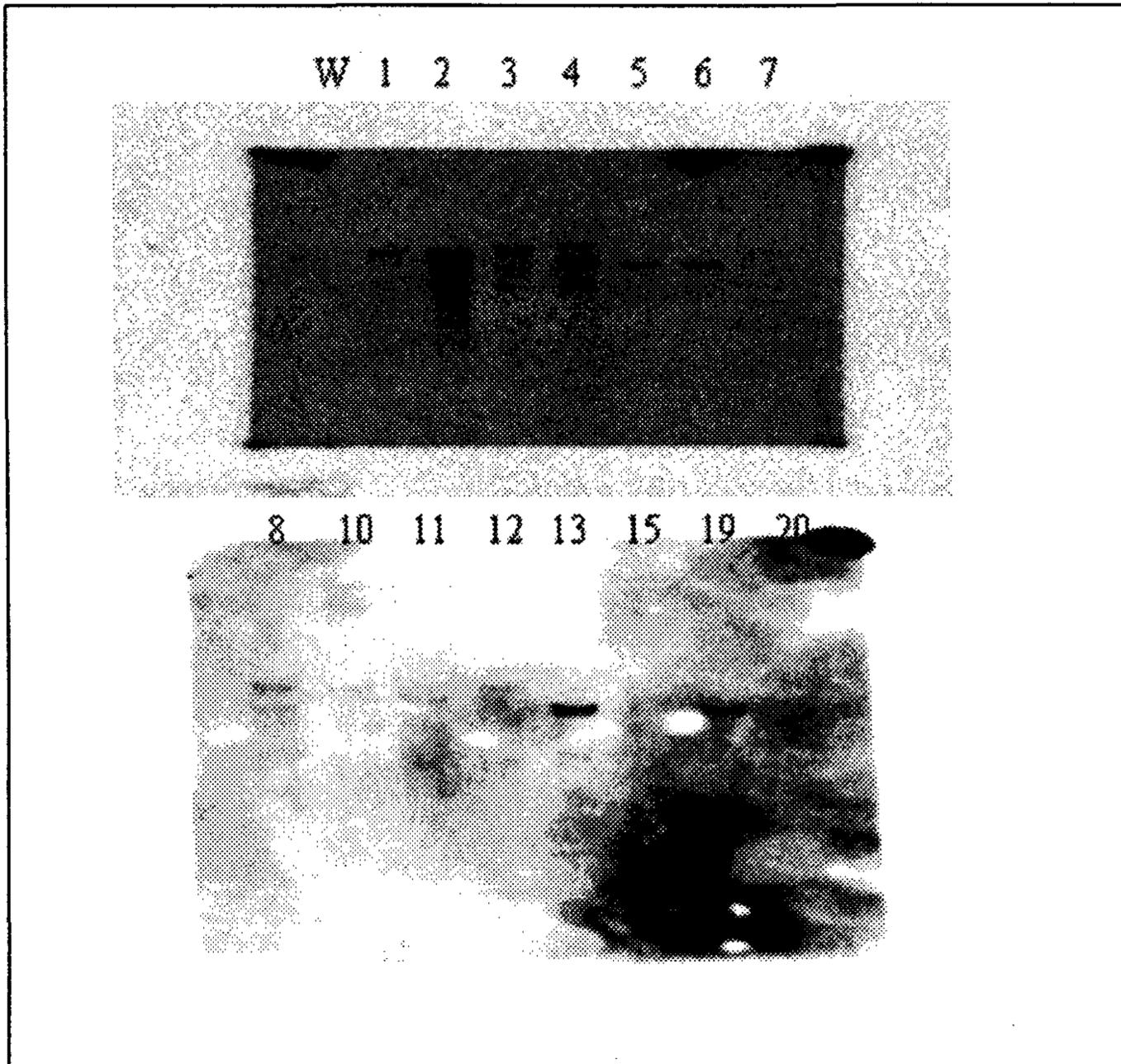
#### 라. 합성 Protox 발현 형질전환체의 transgene 유전자의 계놈 삽입수 분석

형질전환하지 않은 대조구(W)와 합성 유전자가 도입된 형질전환체(T<sub>0</sub>)들로부터 genomic DNA를 추출하여, 제한효소 *Hind*III 으로 절단하고, 겔 분리한 후, P<sup>32</sup>-dCTP로 방사능 label된 합성유전자를 probe로 사용하여 합성 Protox의 동정 여부를 Southern blot 분석을 이용하여 조사하였다. 합성유전자내에 *Hind*III가 존재하지 않으므로, DNA blot에 의해 나타나는 밴드의 수는 벼 genome에 삽입된 유전자의 copy 수와 일치하게 된다. 대조구인 형질전환하지 않은 동진벼에는 band가 검출되지 않았으나, 형질전환된 동진벼에서는 검정한 모든 라인에서 1개에서 3개 정도의 band가 동정되었다(그림 3-7).

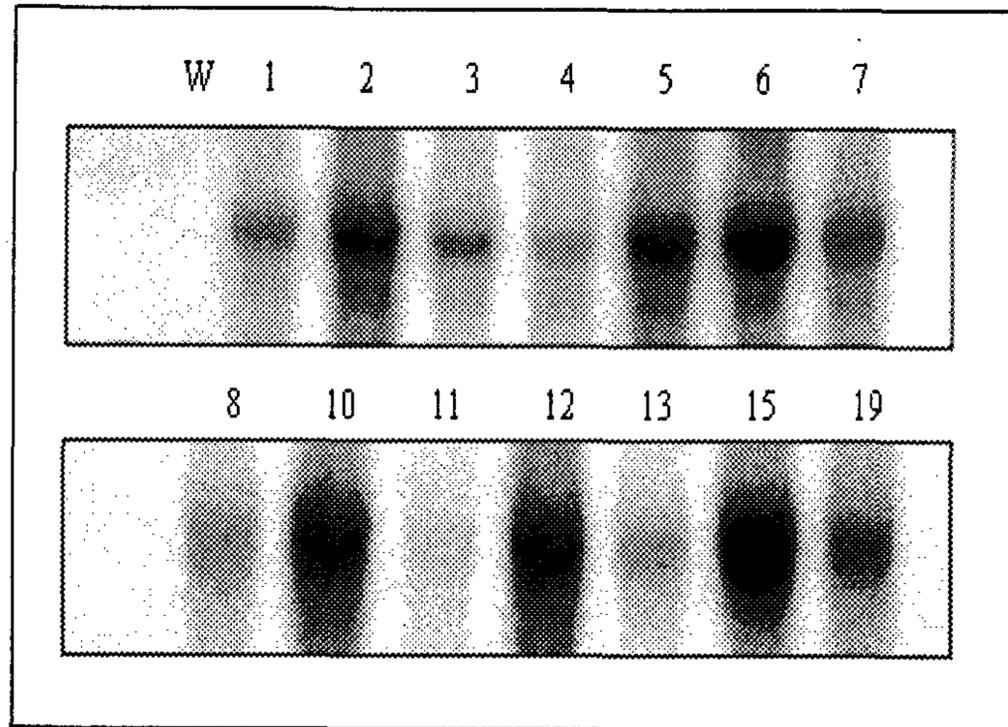
1개의 copy로 삽입된 라인들은 line 1, line 3, line 5, line 6, line 10, line 11, line 13, line 15, line 19, line 20 등이고, 2 copy로 삽입된 lines은 line 7, line 12 등이다. 그 외 line 2, line 4, line 8등은 3 copy 이상의 유전자가 벼의 계놈에 삽입되어 있는 것으로 나타났다. Southern blot 분석과 hygromycin 분리비와 비교하여 보았을 때, 2개 이상 유전자로 분리비를 보인 것은 line 4의 결과와는 일치하나, line 13의 경우에는 Southern blot 에서는 1 copy로 나타났으나, hygromycin 분리비 검정에서는 2개 이상의 유전자가 삽입되어 있는 것으로 나타나, Southern blot 에 나타나지 않은 다른 band가 존재 할 것으로 추정된다. 이와 달리, Southern blot 에서는 2 copy 이상으로 나타나지만, 1개의 유전자처럼 분리비를 보인 line 8, line 12 들도 존재하였다. 이들 line 들은 2개의 T-DNA가 매우 근접하게 삽입되었거나, concatamer 형태로 삽입되었을 것으로 추정된다. 추후 T<sub>0</sub>가 아닌 T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub> 세대에서 genomic DNA를 추출하여 정확히 Southern blot 분석을 다시 수행할 예정이다.

#### 마. 합성 Protox 발현 형질전환체의 mRNA 합성량 분석

형질전환하지 않은 대조구와 형질전환된벼 13종으로부터, 총 RNA를 분리하여, 합성 DNA를 probe로 사용하여, 벼의 계놈에 삽입된 합성 Protox 유전자가 전사되는지 알아보기 위해 Northern blot 분석을 실시하였다. 대조구인 동진벼의 RNA에서는 합성 Protox mRNA가 발현되지 않았으며, 분석한 모든 형질전환체의 mRNA에서는 합성 Protox가 전사되고 있음을 확인하였다(그림 3-8). 전사되는 상



**Fig. 3-7.** Southern blot analysis. Genomic DNA(20 $\mu$ g) in the T0 of transgenic rice plants and wild type rice(W) were digested with *Hind*III and hybridized with the synthetic Mx Protox gene of 1.4 kb PCR fragment.



**Fig. 3-8.** Northern blot analysis of total cellular RNA(20 $\mu$ g) in the T<sub>0</sub> transgenic line and wild-type rice.

대적인 량은 independent lines간 다소 상이하였다. 가장 높은 전사율을 보이는 lines 들은 line 15, line 12, line 10, line 6 등이었으며, 중간정도의 발현량은 line 2, line 5, line 7, line 19 이었다. 그 외 비교적 적은량의 합성 Protox mRNA가 발현되는 lines 들은 line 1, line 3, line 4, line 11, line 13 이었다. 본 결과로 통해, 합성유전자가 벼에 genome에 안정적으로 삽입되어, 성공적으로 전사됨을 확인 할 수 있었다.

#### 바. 합성 Protox 발현 형질전환벼와 native Protox 발현 형질전환벼와의 초기 성장 비교 분석

합성 Protox 발현 형질전환벼의 초기생장이 native Protox 발현 형질전환벼와 차이가 있는지 비교하였다. 본 실험의 목적은 Protox의 발현으로 야기될 수 있는 광활성물질인 Proto IX의 함량과 생육저해의 정도를 어느 정도 가름할 수 있는 지표로서 중요하기에 조사하였다. 합성 Protox 발현 형질전환벼는 multiple copy로 삽입되어, null phenotype이 적게 분리되는 line 4(synMX4)를 선정하였다. 비교상대로서는 가장 안정적으로 분리되는 native Protox 발현 벼인 Mx4를 선택하였다. 대조구인 형질전환하지 않은 동진벼와 비교하여 볼때, Protox 발현 형질전환벼의 초기발아세는 다소 떨어지는 경향을 볼 수 있었다(그림 3-9).

합성 Protox 발현벼와 native Protox 발현벼와 비교하였을 때, 합성 Protox 발현 동진벼가 훨씬 발아세가 양호함을 파종 후 3일째 확인할 수 있었다. 7일째의 경우, native Protox 발현 Mx4는 생장이 열세하나, synMx4는 wild-type 대조구와 거의 비슷한 성장을 보였다. 14일째에서는 Mx4의 생장이 wild-type에 못 미치지만, synMx4의 경우, wild-type과 같았다. 이러한 생장은 T2 homo lines들이 확보되고, 세대가 더욱 진전된 T<sub>3</sub> 혹 T<sub>4</sub> 세대에서 몇 개 lines들을 중심으로 조사하여, 자료의 객관성을 보완하려 하고 있다.

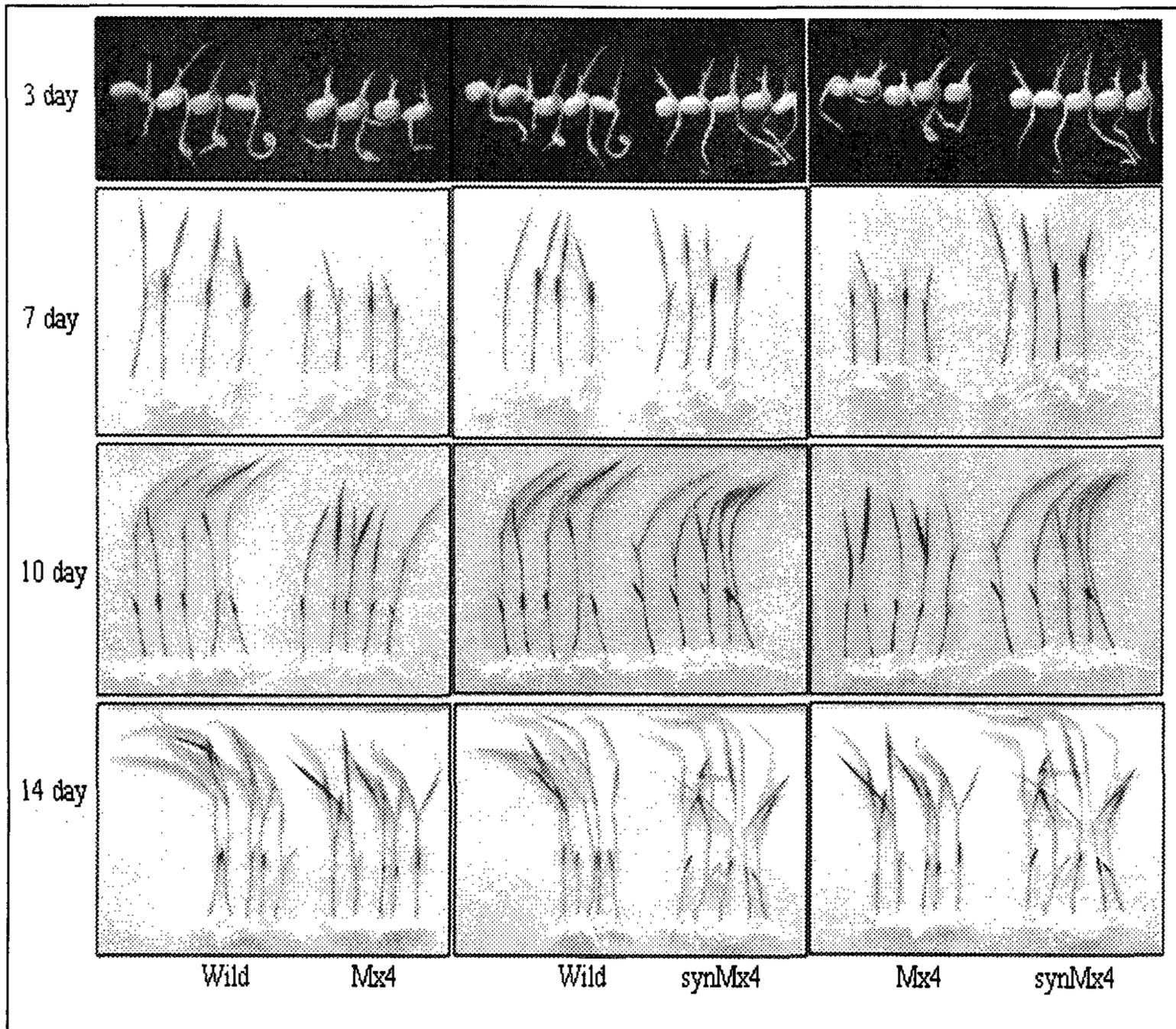
이러한 초기생장의 차이는 Protox transgene의 발현으로 인한 Porphyrin metabolic pathway의 중간대사 산물이 미치는 영향을 보여 주는 것으로, 합성 Protox 발현 형질전환체가 native Protox 발현 형질전환체보다 porphyrin metabolic pathway에 더욱 안정적으로 작용함을 간접적으로 알 수 있다. 추후 homo lines들이 선발되면, lines 들간 Protox의 발현 산물인 Proto IX의 함량이 native Protox 발현 벼와 합성 Protox 발현벼와 비교함으로써, 보다 세밀히 분석할 수 있게 될 것이다.

## 사. 암상태에서 합성 Protox 발현벼와 native Protox 발현 형질전환벼와의 초기생장 비교 분석

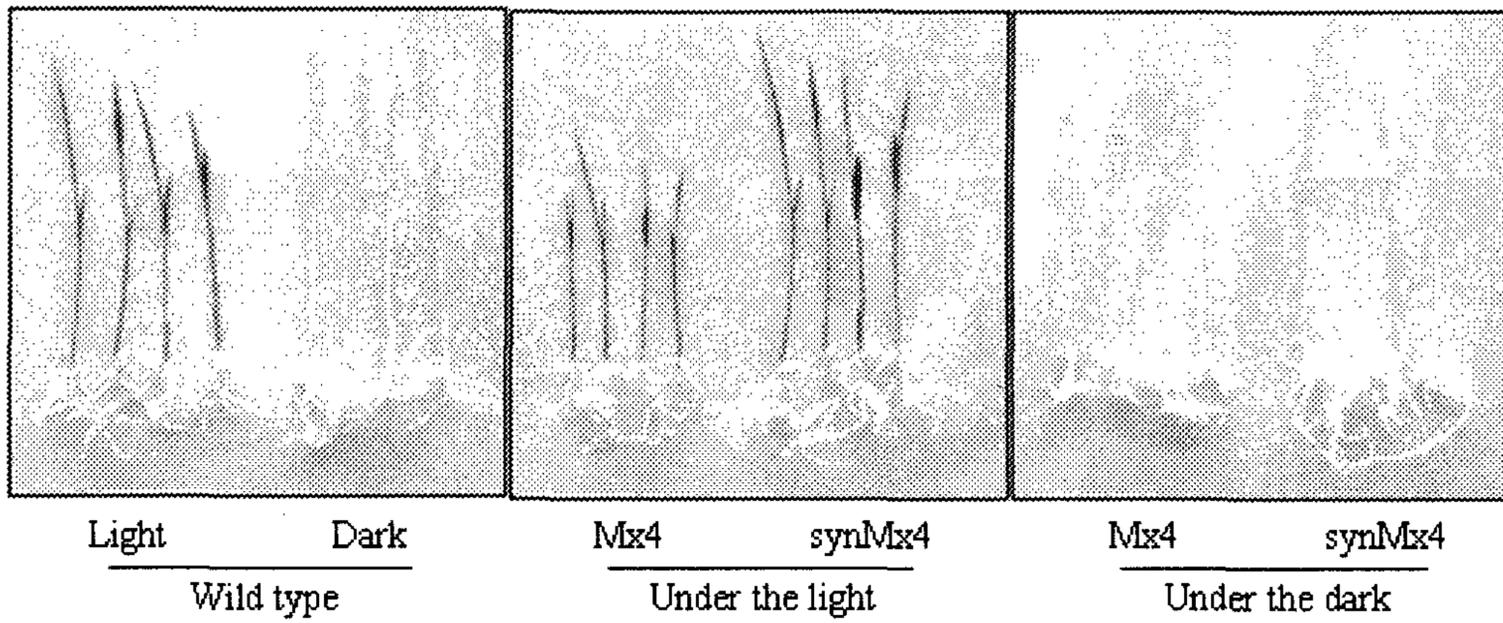
형질전환하지 않은 대조구 동진벼를 암실에서 발아 및 생장 시켰을 경우, 발아 및 생장속도는 암실에서 약간 키가 크거나 거의 같은 경향을 나타낸다(그림 3-10). 그러나, native Protox 발현벼의 경우, 빛 상태에서 발아 생장 시켰을 경우, 키와 생장이 대조구에 비해 적음을 볼 수 있었다. 그러나 이러한 빛 상태에서 생장이 저해되는 현상이, 암 상태에서는 회복되는 경우를 발견할 수 있었다. 이는 Mx4의 발아 및 생육저해가 빛과 관련이 있음을 알 수 있으며, 이는 곧 Proto IX 함량과 상관이 있음을 유추 할 수 있다. 즉 native Protox 발현벼에서 Protox 효소의 생성산물인 Proto IX이 다소 많이 축적됨을 시사한다. Proto IX은 광활성물질로서, 빛의 존재하에서 광활성을 나타내지만 암 상태에서는 광활성 생육저해 현상을 나타내지 않는 물질이다. 따라서 native Protox 발현 형질전환벼는 합성 Protox 발현 벼에 비해 Proto IX 함량이 많음을 유추할 수 있다.

### 아. 합성 Protox 발현 T<sub>1</sub> 세대에서 제초제저항성 발아 검정

비록 합성 Protox 유전자 발현 형질전환벼의 homo lines들이 선발되지 않았지만, 합성 Protox 발현 형질전환벼들의 제초제 저항성이 native Protox 발현 형질전환벼와 차이가 있는지 조사하기위해, 합성 유전자 발현 형질전환벼 T<sub>1</sub> 세대에서 간단하게 제초제저항성 정도를 비교검정하여 보았다. 사용한 lines 들은 상기에 사용한 lines 들로서, 합성 형질전환벼는 synMx4이고, native 발현벼는 T<sub>4</sub> 세대의 Mx4 line 이다. 이들 형질전환벼 및 대조구 벼를 과산화작용 제초제인 oxyfluorfen 농도가 10 - 1000  $\mu$ M이 들어 있는 MS 배지에서 빛 상태에서 발아 시켰다. 대조구인 비 형질전환벼는 1  $\mu$ M농도에서 발아 하지 못하기 때문에 그림 3-11 에서처럼 10  $\mu$ M 농도에서는 전혀 발아 하지 않음을 볼 수 있었다. 이에 반해 형질전환벼의 경우 100  $\mu$ M 농도에서도 발아 생육이 가능하며, 500  $\mu$ M 상태에서도 어느 정도 발아하는 고도의 제초제 저항성을 발휘한다. 합성 Protox 발현벼와 native Protox 발현벼와 제초제 저항성을 비교하면, 두 line 간에 저항성의 강약차이는 비슷하거나, 합성 Protox 발현벼가 다소 높은 경향을 보이는 듯 하다. 그러나 합성 Protox 발현 벼가 다소 높은 저항성을 보이는 것 같은 현상은 아마도, 앞에서 제



**Fig. 3-9.** Comparison of germination and seedling growth test between Mx4 and Syn Mx4.



**Fig. 3-10.** Seedling growth in the presence or absence of light. Mx4 and SynMx4 are transgenic rice expressing the native and synthetic Protox of *M. xanthus*.

시한 바 같이, Proto IX의 함량이 비교적 native Protox 발현변보다 적어서 다소 높은 저항성을 보이는 것 같다. 즉 transgene Protox 유전자의 과다발현이기보다는 Proto IX의 함량축적이 native Protox 발현변보다 합성 Protox 발현변이 낮은 현상에 의해 기인하는 것으로 추측되나, 추후 homo lines 들로부터 더욱 정확한 조사가 필요하다.

#### 자. 합성 Protox 발현 T<sub>1</sub> 세대에서 제초제저항성 경영처리 검정

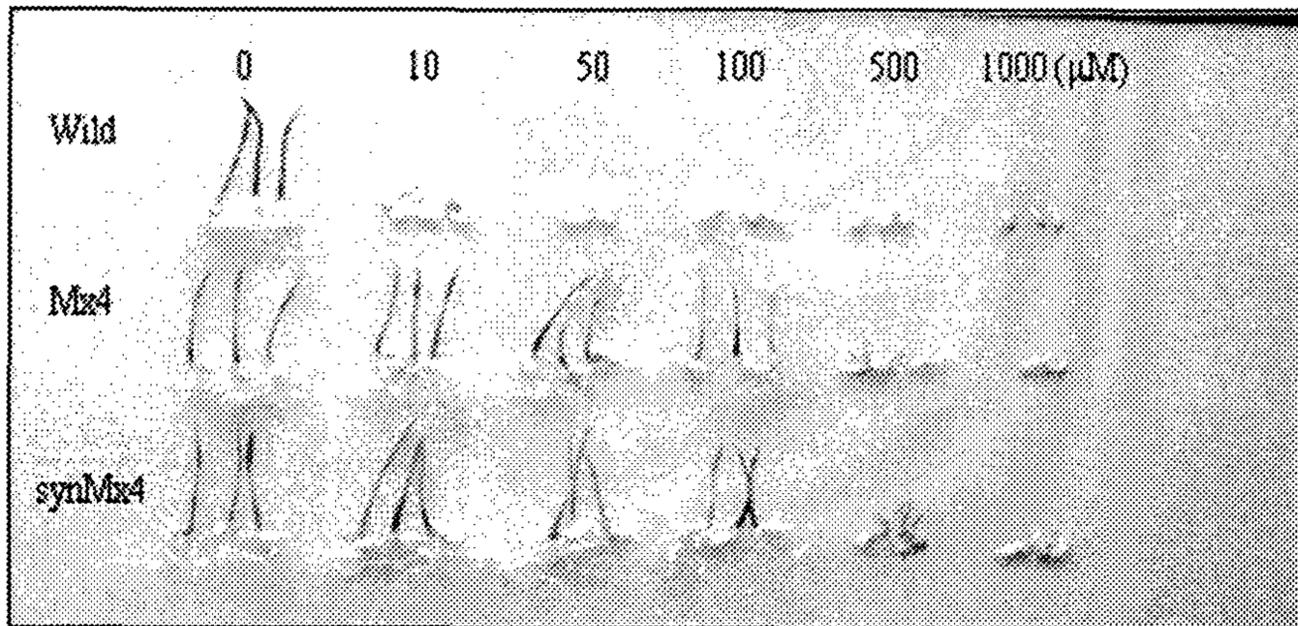
합성 Protox 발현 형질전환변 T<sub>1</sub> 종자를 이용하여 경영저항성 조사를 수행하였다. 대조구와 native Protox 발현변 및 합성 Protox 발현변을 3엽기까지 온실에서 키운다음 50 µM 농도의 oxyfluorfen을 spray 처리하였다(자료 미제시). 처리 후 5 일째 대조구인 동진변은 완전히 고사하였으나, Protox가 발현되는 형질전환변은 전혀 고사가 일어나지 않았다. 따라서 합성 Protox 발현변은 초기생장도 native Protox 발현변보다 좋을 뿐 아니라, 제초제 저항성 면에서 native Protox 발현변보다 같거나 높은 경향을 보이므로 본 연구진이 합성한 합성 Protox 유전자는 과산화작용제초제 저항성작용을 육성하는데 중요한 유전자로 사용될 수 있을 것이다.

#### 차. 합성 Protox 발현 T<sub>1</sub> 세대에서 salt 저항성 발아 검정

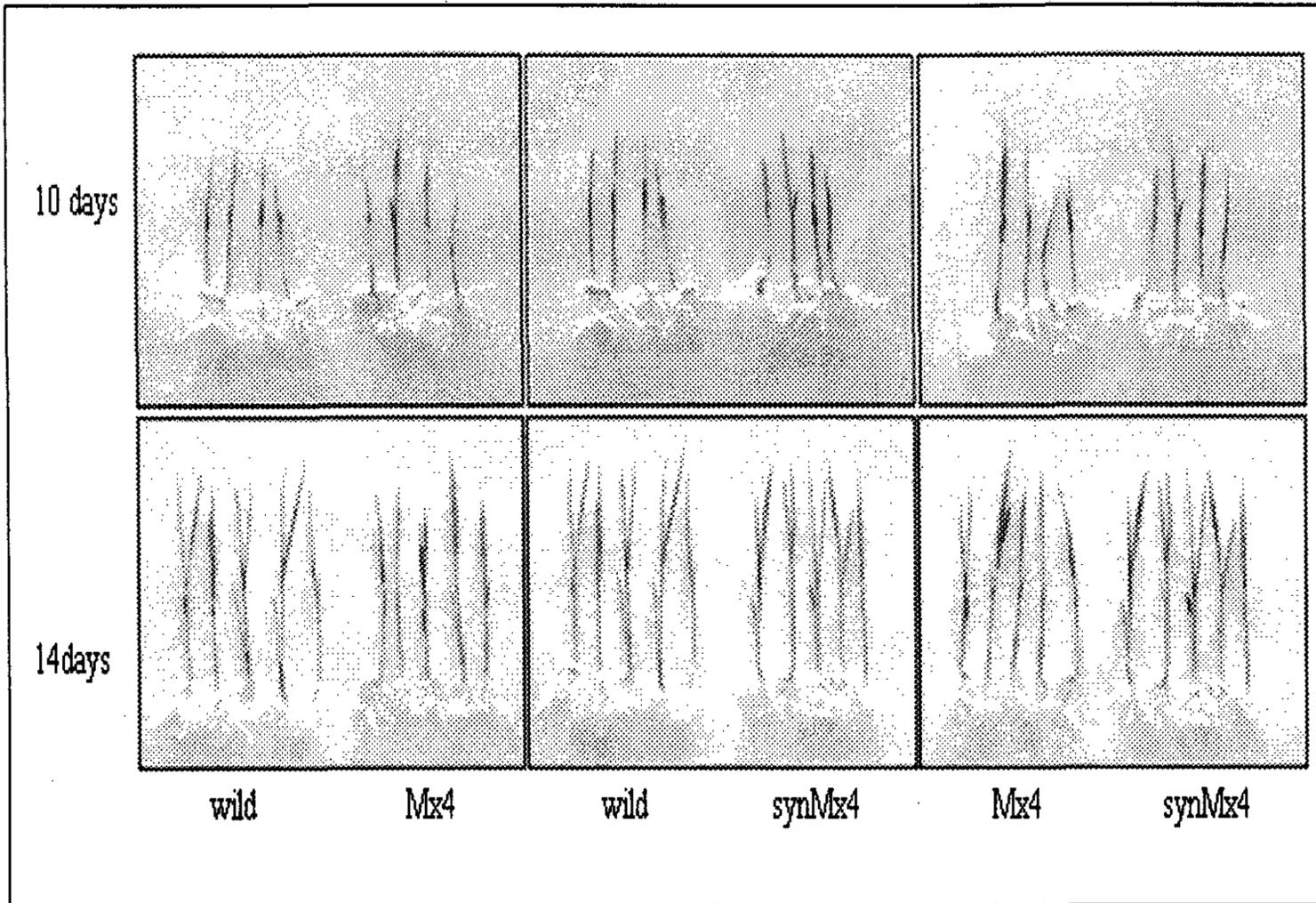
Protox 발현 형질전환변들이 제초제이외에 다른 비생물적 스트레스에 저항성을 부여하는지 조사하기 위해 간단히 염에 대한 저항성 여부를 조사하였다. 200 mM 농도의 염이 함유된 MS 배지에서 생장 시켰을 경우, native Protox 발현변 및 합성 Protox 발현변 어느 쪽에서도 염에 대한 저항성이 발휘되지 않음을 알 수 있었다. 염 이외에 다른 생물학적인 스트레스 등에 대한 조사도 간접적으로 조사하고 있지만, 제초제에 대한 저항성만 관여 할 것으로 추정된다(그림 3-12).

#### 카. 합성 Protox 효소활성 검정, 형질전환변 육성 및 Southern blot 분석

합성한 1416 bp 길이의 *M. xanthus* Protox 유전자가 기능적인 Protox 단백질을 만들고, 효소활성이 있는지 알고자 먼저 *E. coli*에 형질전환하여, recombinant Protox 유전자를 발현, 정제하였다. 정제한 recombinant *M. xanthus* Protox 단백질은 높은 in vitro 효소활성을 보여 주었다. 따라서 본 연구진이 기내에서 합성한



**Fig. 3-11.** Tests of oxyfluorfen resistance. In pre-emergence herbicidal tests, seeds from wild-type, native Mx4 and synthetic Mx4 were sterilized and sown in MS medium containing various concentrations of technical-grade oxyfluorfen. Tissues were exposed to continuous light of  $200\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  following a 10-h dark incubation. Photograph was taken seven days after seeding.



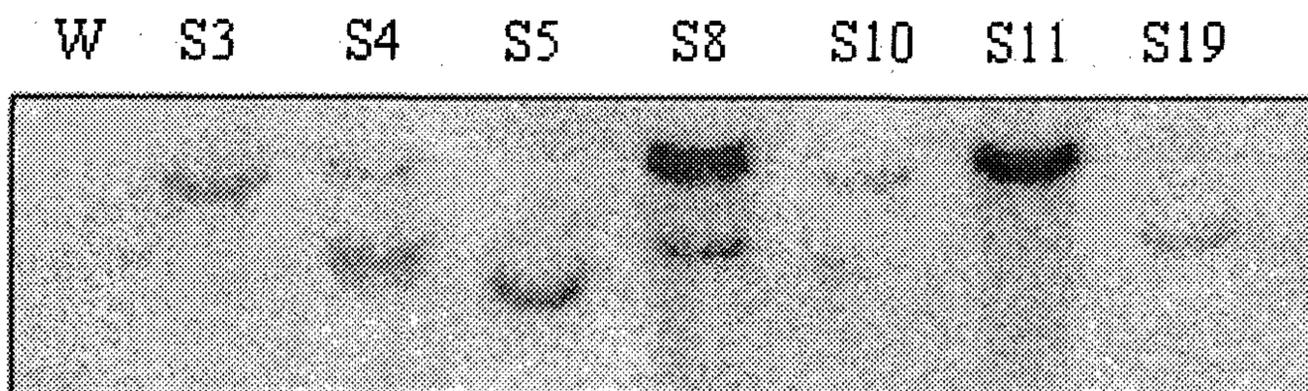
**Fig. 3-12.** Salt tolerance test with seeds of wild type and transgenic(Mx4 & synMx4). Seeds were grown in the presence of 200 mM NaCl in Petri dish containing water.

*M. xanthus* Protox 유전자가 기능적으로 완벽함을 보임에 따라, 본 합성 Protox 유전자를 식물에 형질전환하기 위해 binary vector pGA1611의 *Hind*III 와 *Kpn*I 제한효소 위치에 삽입하여, pGA1611:Syn Mx Protox 유전자 구조물을 제작하였다. 이 binary vector를 LBA4404 *Agrobacterium*에 형질전환하여, 벼의 배반유래 calli와 공조배양하여, 20여종의 T<sub>0</sub> 형질전환체를 육성하였고, 육성한 T<sub>0</sub> 벼로부터 종자를 수득하였다. T<sub>1</sub> 형질전환체를 포장에 파종하여 T<sub>2</sub> 형질전환벼를 육성하였으며, T<sub>2</sub> 종자로부터 homozygous lines를 선발하였다. 선발된 T<sub>2</sub> homozygous lines중에서 7개 lines를 선발하여 transgene Protox 유전자가 벼의 genome에 안정적으로 삽입되었는지, genome당 몇 copy로 들어갔는지 조사하기위해 genomic Southern blot 분석을 실행하였다. 분석한 모든 형질전환 lines에서 1개내지 3개의 유전자가 삽입되어 있음을 보여 주었다(그림 3-13). 7종의 lines 모두 독립적인 개체로서 Protox 유전자가 서로 다른 부위에 삽입되어 있음을 알 수 있다. S3, S5, S10, S19 lines들은 1 copy로 삽입되어 있으며, S4는 2 copy, S8은 3 copy의 Protox 유전자가 삽입되어 있음을 알 수 있다. S11은 DNA blot 상에서는 1 copy로 나타났으나, band의 intensity가 1 copy로 삽입된 다른 lines에 비해 매우 높아, 같은 위치에 반복되어 삽입된 것으로 추정된다. 그러나 분리비 검정에 의하면, S4번 외에 모두 1 copy로 삽입되어 분리됨을 보여주어, S8 경우, 3 copy로 삽입되어 있지만, 1개의 loci에 삽입된 것처럼 행동하고 있음을 보여준다. S4의 경우, 15:1의 분리비를 나타냄으로 Protox transgene이 genome 상의 서로 다른 위치에 삽입되어 유전됨을 보여준다. T<sub>2</sub> 세대의 genomic 분석 결과는 T<sub>0</sub> 형질전환벼에서의 Southern blot 분석결과와 일치함을 나타내었으며, 이는 형질전환시 삽입된 유전자가 세대를 지속함에 따라 안정적으로 유지 및 보존되고 있음을 나타내 준다.

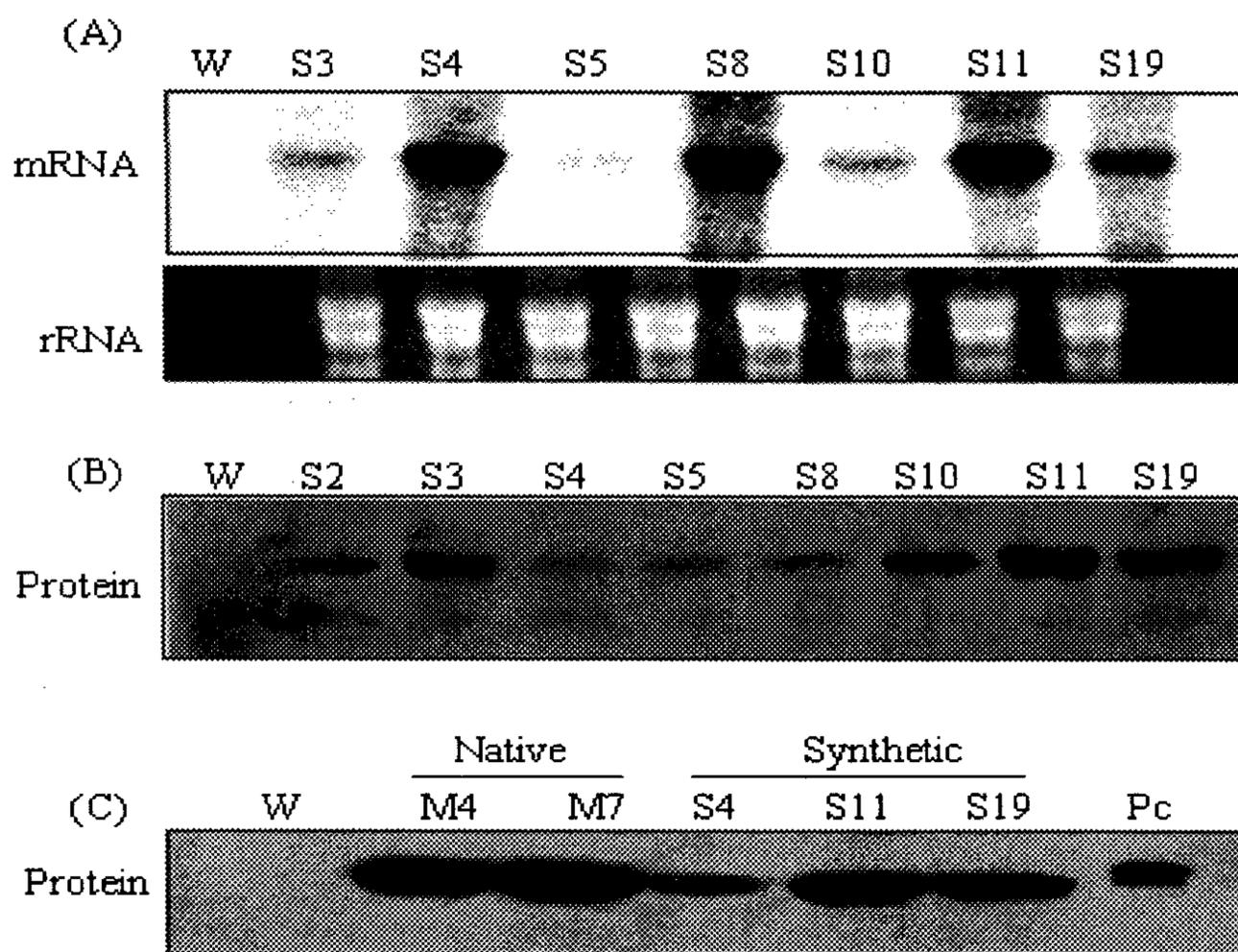
#### 타. 합성 및 native Protox 발현 형질전환벼의 Protox 발현 분석

T<sub>2</sub> homozygous line에서 합성 Protox의 전사율을 분석하기 위해 Northern blot를 수행하였다. 형질전환벼와 대조구에서 total RNA를 분리하여, 합성 Mx Protox DNA을 probe로 삼아 hybridization을 하였다. 합성 Mx Protox mRNA는 모든 형질전환벼에서 검출되었다. 그러나 형질전환되지 않은 대조구에서는 동정되지 않았다. 합성 Mx Protox mRNA 발현정도는 형질전환 line 간에 매우 상이하였다. Line S5는 가장적은 mRNA 발현을 보였으며, line S3, S10, S19는 비교적 높은

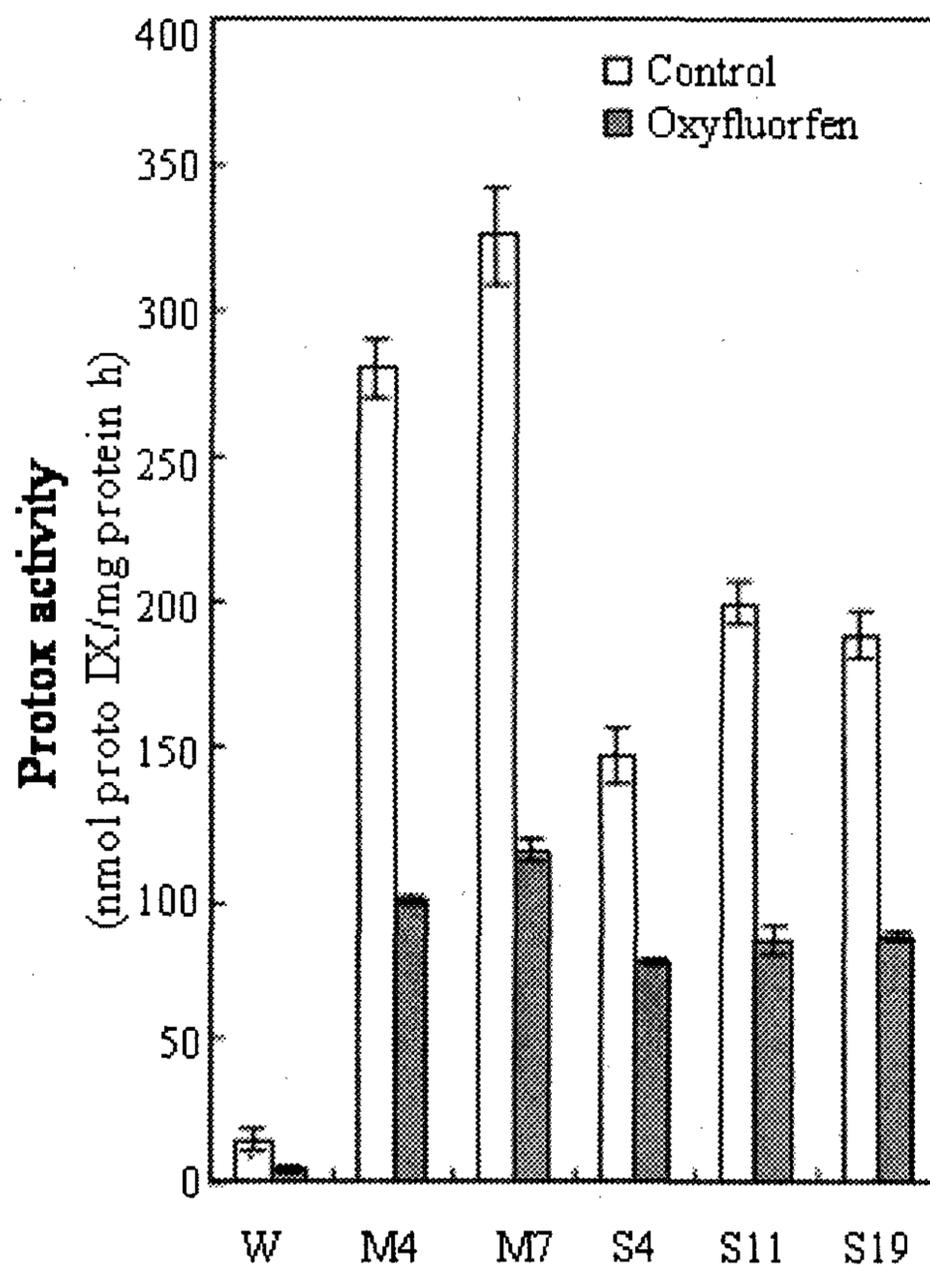
*Mx* Protox mRNA 함량이 검출되었고, 가장 높은 발현율을 보인 lines 들은 S4, S8, S11 등에서 나타났다(그림 3-14A). 이러한 다양한 합성 *Mx* Protox mRNA 발현율이 Protox 단백질 발현율과 일치하는지 조사하고자 재조합 *Mx* Protox 단백질로부터 제조한 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였다. 모든 형질 전환벼에서 추출한 단백질에서는 Protox 항체에 반응하는 단백질이 검출되었으나, 대조구에서는 전혀 항체와 반응하는 단백질이 동정되지 않았다(그림 3-14B). 따라서 형질전환벼에서 발현되는 *Mx* Protox mRNA가 벼 세포내에서 효과적으로 전이되어지고 있음을 알 수 있었다. 그러나 *Mx* Protox의 단백질량은 mRNA 발현량과 정확하게 일치 하지 않았다. 상대적인 Protox 단백질 발현율을 조사하고자 native *Mx* Protox 발현 형질전환벼(M4, M7)와 합성 *Mx* Protox 발현 형질전환벼(S4, S11, S19)와 비교하였다. T<sub>2</sub> homozygous 형질전환벼로부터 각각 단백질을 추출하여 Western blot을 수행한 결과 합성 *Mx* Protox을 발현하는 형질전환벼는 native *Mx* Protox을 발현하는 형질전환벼보다 단백질 발현량이 적음을 알 수 있었다(그림 3-14C). 예를들어 S11에서의 Protox 단백질 발현량은 M7에서 Protox 단백질 발현량의 50% 정도 임을 볼 수 있다. 이와 같은 것은 G+C 함량과 transgene protein의 발현량과는 부의 상관성이 있음을 보여 주는 것으로 낮은 G+C 함량은 낮은 단백질 발현량과 관련되어 있음을 시사하고 있다. 그 다음으로는 형질전환하지 않은 대조구와 형질전환된 벼로부터, crude mitochondria와 chloroplasts를 분리하여 mix 하였다. 함께 mixed 한 추출물을 가지고 Protox 효소활성을 측정한 결과, 모든 형질전환 세포주에서(M4, M7, S4, S11, S19) 대조구보다 높은 Protox 효소활성을 보여 주었다(그림 3-15). 형질전환 벼간 Protox 효소활성 정도를 비교한 결과, native Protox 발현 형질전환 벼에서 합성 Protox 발현 벼보다 높은 Protox 효소활성을 보여 주었다. 이는 그림3의 단백질 발현율과 일치하는 것으로, 보다 많은 *Mx* Protox 단백질을 발현하는 native Protox 발현 형질전환벼에서 높은 활성을 나타내는 현상과 일치하는 경향을 보였다. 합성 Protox 발현 벼인 S11과 S19는 상대적으로 S4에 비해 높은 단백질 발현율과 효소활성을 보였으나, 많이 발현되는 S11의 효소활성은 M7의 60% 정도 밖에 나타나지 않았다. 4주된 형질전환하지 않은 대조구와 형질전환된 벼에 Oxyfluorfen 50  $\mu$ M을 처리한 후, 18시간 후 Protox 활성을 측정하여 보았다. 형질전환벼에서 Protox 효소활성이 월등히 높게 나타났으나, 대조구인 형질전환하지 않는 벼에서는 Protox 효소활성이 크게 저해



**Fig. 3-13.** *Hind*III-digested rice genomic DNA was probed with the modified *Mx* Protox DNA sequence. DNA from nontransgenic rice plants was included as a negative control. W, nontransgenic wild-type rice; S3 S19,transgenic rice plants expressing the modified *Mx* Protox gene.



**Fig. 3-14.** Transgene expression analysis. (A) Northern blot analysis of levels of modified *Mx* Protox mRNA. Ten-microgram aliquots of total RNA from wild-type and T<sub>1</sub> transgenic rice plants were electrophoresed on a formamide gel, blotted, and probed with the modified *Mx* Protox DNA as described in Materials and Methods. (B and C) Western blot analyses. Ten  $\mu$ g of total protein from T<sub>1</sub> transgenic lines (A) or 20  $\mu$ g of total protein from T<sub>2</sub> homozygous transgenic lines (B) were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels. The separated proteins were electrotransferred onto PVDF membranes and incubated with a primary antibody raised against purified, recombinant Protox. M, molecular weight markers W, non-transgenic rice; M4 and M7, transgenic rice expressing the native *Mx* Protox gene [14]; S4-S19, transgenic rice plants expressing the modified *Mx* Protox gene Pc; purified recombinant Protox (20 ng).



**Fig. 3-15.** Effect of oxyfluorfen treatment on Prototox activity of wild-type rice compared to transgenic rice expressing native or modified *Mx* Prototox. Four-week-old rice plants were sprayed with 50  $\mu$ M Goal<sup>®</sup>, a commercial oxyfluorfen. Measurements were made 18 h after oxyfluorfen treatment as described in Materials and methods. Data represent mean  $\pm$  SE of three replicates. W, Nontransgenic, wild-type rice plants; M4 and M7, homozygous T<sub>4</sub> transgenic lines overexpressing native *Mx* Prototox; S4-S19, homozygous T<sub>2</sub> transgenic lines overexpressing modified *Mx* Prototox.

됨을 보였다. 하지만 형질전환체는 oxyfluorfen을 처리하지 않는 대조구의 Protox 활성보다 높게 나타남을 확인하였다. 제초제를 처리하여도 높은 Protox 효소활성을 나타내는 것 때문에 이들 형질전환체가 높은 제초제저항성을 보여 주는 것임을 알 수 있다. Oxyfluorfen을 처리한 후 나타나는 Protox 효소활성 역시 합성 Mx Protox 발현 형질전환체에서 보다 native Mx Protox을 발현하는 형질전환체에서 보다 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

#### 과. 합성 Protox 발현 형질전환체와 native Protox 발현 형질전환체와의 제초제 저항성 비교분석

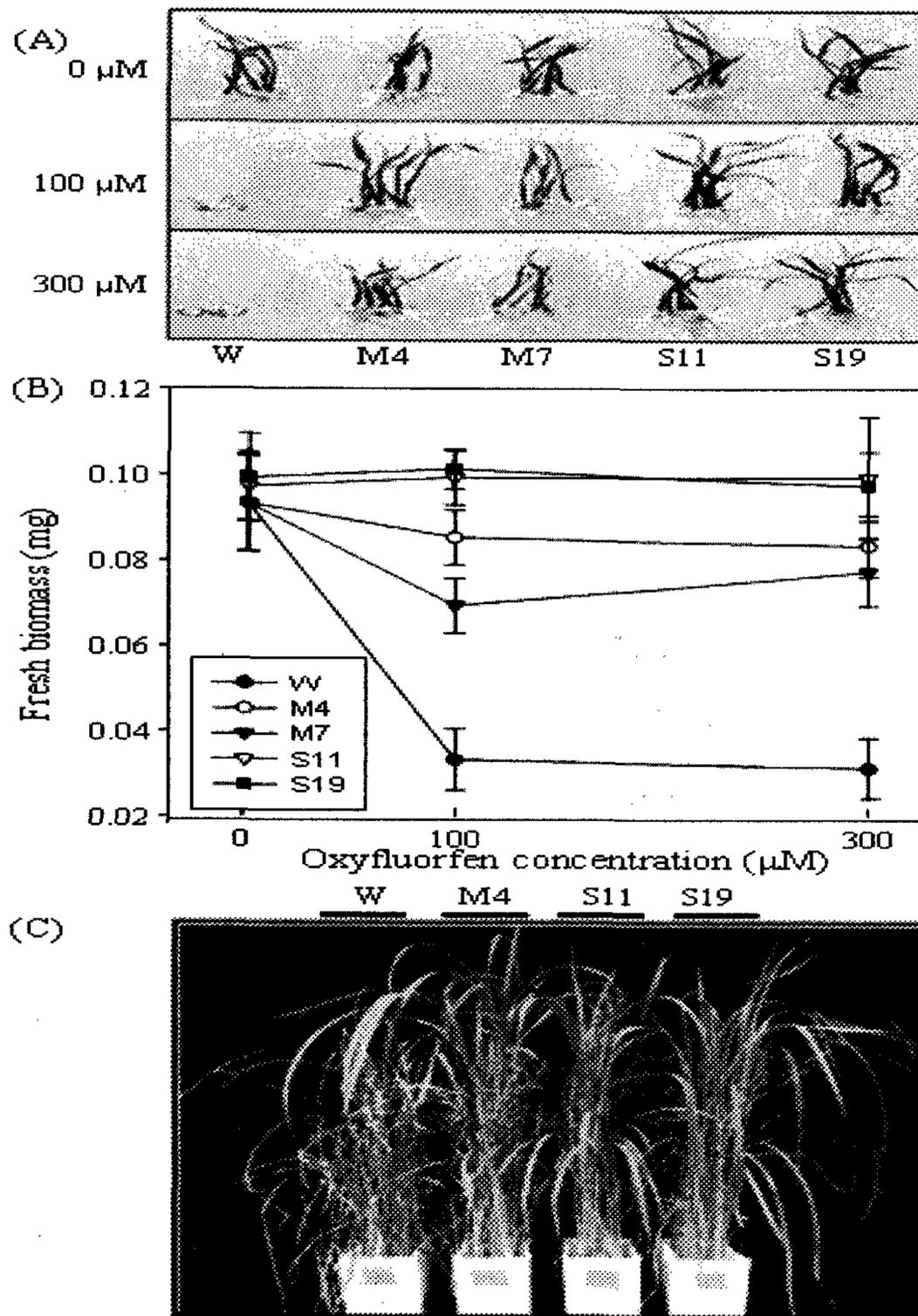
T<sub>2</sub> homozygous 형질전환체를 이용하여 제초제 저항성 정도를 비교하였다. Oxyfluorfen 1 µM이 함유된 배지에서 대조구의 벼 종자가 발아하지 못한다. 100-200 µM 농도의 oxyfluorfen이 들어 있는 배지에서 형질전환체의 제초제 저항성을 비교 검정하였다. 모든 형질전환체에서 대조구와는 비교가 안될 만큼의 높은 저항성을 발휘함을 그림 3-16A에서 확인 할 수 있었다. Native 와 합성 Mx Protox을 발현하는 형질전환체의 biomass를 비교해 보면, S11과 S19의 생체중이 M4과 M7의 생체중보다 높은 경향을 보여 주었다. 100 µM 농도의 oxyfluorfen에서 성장한 S11 및 S19의 생체중은 무처리의 생체중과 같으나, M4와 M7은 10-15%의 생체중이 감소하는 경향을 나타내었다(그림 3-16B). Oxyfluorfen이 없는 배지에서 자란 native Mx Protox 발현형질전환체는 초기생장이 지연되거나 억제되는 경향을 보여 주지만 후기 생장은 대조구와 비슷해지는 경향을 보였다. 반면, 합성 Mx Protox을 발현하는 벼는 초기 생장이 약간 증대하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 경향은 T<sub>2</sub> 세대에서 나타나는 일시적인 현상인지 아니면 transgene의 효과인지는 후대 세대에서 검정이 필요하리라 생각된다. 또 다른 한편으로 제초제 저항성을 보기위해 1 mM 농도의 oxyfluorfen을 경엽처리한 후, 대조구인 형질전환하지 않은 벼의 잎은 완전히 고사됨을 볼 수 있거나, 형질전환체는 모두 전혀 피해를 받지 않음을 확인 할 수 있었다(그림 3-16C). 이는 native Mx Protox 및 합성 Mx Protox을 도입한 형질전환체는 모두 높은 저항성을 가지게 됨을 확인 할 수 있게 되었다. 결론적으로 합성 Mx Protox 유전자를 도입 할 경우, native Mx Protox 발현체와 같거나 높은 정도의 과산화작용제초제에 저항성이 부여됨을 확실히 알 수 있게 되었으며, 합성 Mx Protox는 native Mx

Protox 보다 낮은 G+C 함량의 유전자 구조를 가지지만, 아미노산 서열은 차이가 없기 때문에, G+C 함량의 차이는 transcription level이 아닌, translation efficiency에 영향을 주기 때문에, 합성 *Mx* Protox의 단백질 발현율이 낮은 이유는 전이효율이 떨어지기 때문임을 확인 하였다. 따라서 벼에서 단백질 발현을 높이기 위해서는 G+C 함량이 어느 정도 높아야 됨을 알 수 있었다.

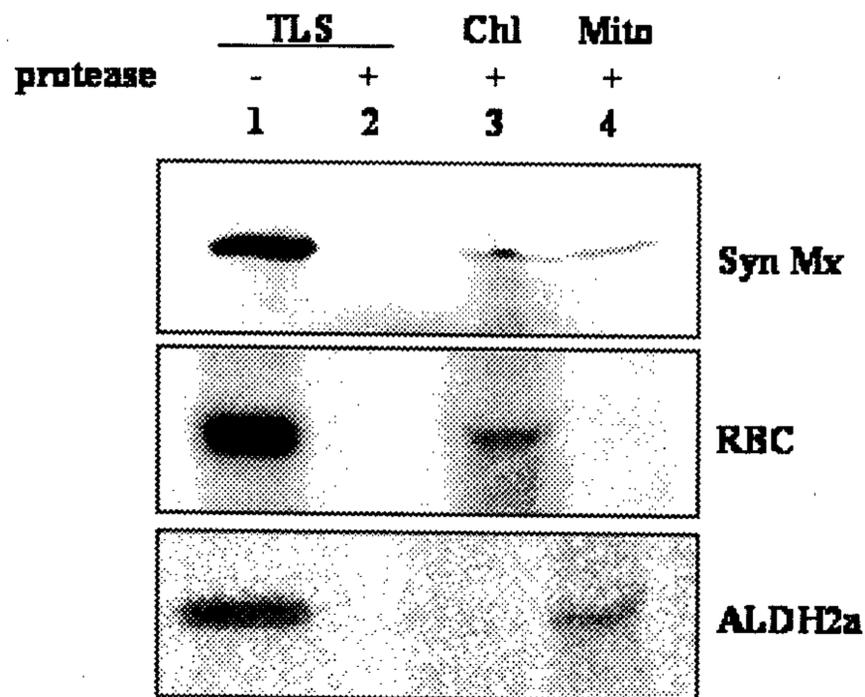
#### 하. 합성 *Mx* Protox의 import assay 및 형질전환벼로부터 organelles 분리를 통한 dual targeting 분석

합성유전자가 coding하는 *M. xanthus* Protox 유전자의 in vitro targeting 능력을 검정하고자 완두에서 분리한 chloroplasts 와 mitochondria을 이용하여 targeting 실험을 수행하였다. Targeting 효율과 정확도를 높이기 위해 dual import assay system (Rudhe et al., 2002)을 이용하였다. 합성 *Mx* Protox 유전자를 SP6 promoter에 의해 조절되는 SP6 plasmid vector에 클로닝한 후 in vitro translation을 하였다. Translation 생성물을 어린완두에서 분리한 chloroplasts와 mitochondria 와 혼합하여 targeting 반응을 시작하였다. In vitro 이동 실험을 한 후, organelles들을 proteases를 처리하였고, 그 후 organelles들을 percoll 를 이용 재분리하였다. RbcS(chloroplast small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) 와 ALDH2a (mitochondrial aldehyde dehydrogenase) 유전자와 단백질을 각각 chloroplasts 와 mitochondria 의 순수도 및 targeting의 표준 유전자로 사용하였다. In vitro에서 translation 된 50 kDa 크기의 *Mx* Protox 단백질은 chloroplasts 와 mitochondria에 targeting 되는 것을 확인 할 수 있었고, 표준 유전자의 단백질은 RbcS는 chloroplasts에서, ALDH2a는 mitochondria에서 각각 검출되었다. Protease thermolysin 처리에서도 RbcS 단백질은 chloroplasts 내로 targeting 되어 분해되지 않았고, ALDH2a는 mitochondria 로 안전하게 targeting 되어 protease 처리에서 분해되지 않음을 알 수 있다. 합성 *Mx* Protox 는 protease 처리에서도 분해되지않은 Protox 단백질이 chloroplasts 와 mitochondria 에 동시에 검출되는 것으로 보아 효과적으로 dual targeting되는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 3-17). 형질전환벼에서 *Mx* Protox 단백질의 위치를 규명하기 위하여 형질전환벼와 wild type 벼로부터 chloroplast와 mitochondria를 분리하여, *Mx* Protox 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하여 벼 세포내에서 이들 합성 Protox 단백질의 발

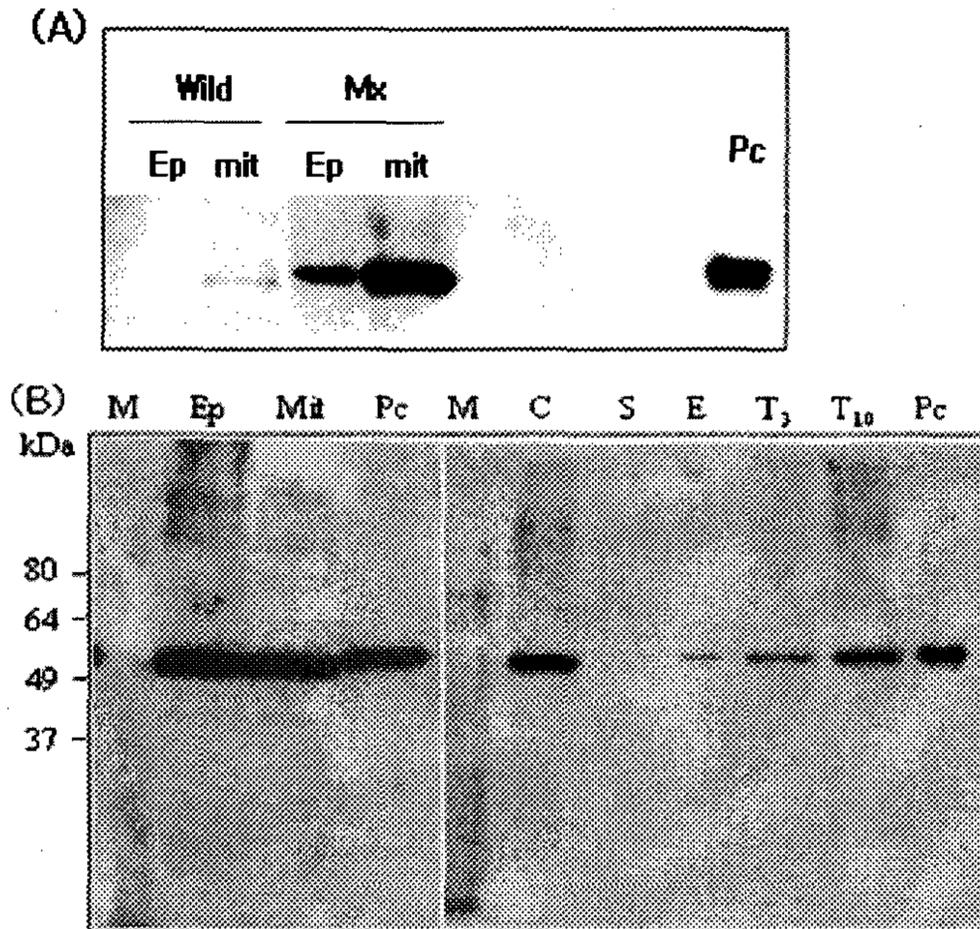
현부위를 조사하였다. Wild type 벼에서 분리한 chloroplasts 와 mitochondria 에서는 *Mx* Protox 항체와 cross reacting 하는 단백질의 발현을 볼 수 없었으나, *Mx* Protox 발현 형질전환체에서 분리한 chloroplasts(etiooplasts) 와 mitochondria 에서는 높은량으로 발현되는 Protox 단백질을 확인 할 수 있었다. 형질전환벼에서 chloroplasts 내에서의 발현위치를 파악하고자 chloroplasts를 stroma, envelope, thylakoid 등으로 분해하여 어느 위치에서 발현하는지를 조사하였다. *Mx* Protox 단백질은 chloroplasts 내의 envelop 와 thylakoid 에 주로 발현하고 있음을 나타내었으며, stroma 에서는 *Mx* Protox 단백질의 발현을 볼 수 없었다. 이는 *Mx* Protox 단백질이 3개의 trans membrane domains를 소유하며, 막단백질임을 알려주는 단백질의 특성과 일치하는 자료를 제공하여 주고 있다(그림 3-18).



**Fig. 3-16.** Seedling growth test for oxyfluorfen resistance in transgenic rice seeds expressing native or modified *Mx* Protox. (A and B) Surface-sterilized seeds were incubated in half-strength MS solid medium containing various concentrations of oxyfluorfen ( $\mu\text{M}$ ). Seeds were exposed to continuous light at  $250 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$  at  $28^\circ\text{C}$  following a 12-h dark incubation. (A) A photograph was taken 8 days after seeding. (B) Quantitative comparison of biomass of transgenic lines grown in the presence of oxyfluorfen. Data represent an average of six seedlings  $\pm$  SE. (C) Post-emergence herbicidal test. Four-week-old rice plants were sprayed with 1 mM solution of Goal, a commercial oxyfluorfen preparation. Photographs were taken 3 days after herbicide treatment. W, non-transgenic rice; M4, transgenic rice expressing the native *Mx* Protox gene S11 and S19, transgenic rice plants expressing the modified *Mx* Protox gene.



**Fig. 3-17.** Import of precursor proteins into purified chloroplasts and mitochondria. <sup>35</sup>S- labeled precursors were incubated with purified pea leaf chloroplasts, pea leaf mitochondria and were in some cases subsequently treated with 120 ug of thermolysin( + therm lanes) Lane 1. Precursor protein alone. Lane 2, as Lane 1 but with the addition of protease(thermolysin) after the import assay. Lane 3. Precursor protein incubated with pea leaf chloroplasts. Lane 4. Precursor protein incubated with pea leaf mitochondria. Lane 3,4 as Lane 2 with the addition of protease(thermolysin) after the import assay.



**Fig. 3-18.** Immunoblot analysis using the purified chloroplasts and mitochondria from rice leaves. (A) Wild type and Mx transgenic in 10 $\mu$ g loading. (B) M: marker, Ep: Etioplast(20 $\mu$ g), Mit: mitochondria(20 $\mu$ g), stroma(10 $\mu$ g) E: envelope (3 $\mu$ g), T: thylakoid (T<sub>3</sub>: 3 $\mu$ g T<sub>10</sub>:10 $\mu$ g).

### 제 3 절 Mx protox 유전자를 selectable marker gene으로 서 이용 및 형질전환벼 육성

#### 1. 서 설

과산화작용제초제(Peroxidizing herbicides)는 식물체내의 Prototporphyrinogen oxidase 효소(Protox)를 억제하여, 식물체를 죽이는 제초기작을 가진 제초제군들이다. 1960년도부터 상업화된 이들 제초제는 대두, 벼, 목화, 땅콩 등의 세계적 주요 작물지에 광범위하게 사용되는 제초제로서, 극미량 처리로도 제초효과가 뛰어나고 살초범위가 넓은 탁월한 제초제이다. 또한 비수용성으로 식물체나 토양입자에 쉽게 흡착되며 광산화에 의해 곧바로 분해되기 때문에 잔류독성이 낮은 장점이 있는 제초제이다. 최근 들어서 이들 과산화작용 제초제에 대한 저항성 작물육성이 Protox 유전자를 과다발현 시킴으로써 제초제 저항성 옥수수 및 벼가 개발 보고되었다(Li et al., 2003; Jung et al., 2004; Li & Nicholl 2005). Li et al. (2003)의 경우, 애기장대에서 클로닝한 Protox 유전자에 2개의 아미노산을 변형시켜, 과산화작용제초제에 저항성 유전자를 만들어, 이들 유전자를 옥수수에 도입하여 저항성 작물을 육성하였다. 이 유전자는 제초제 butafenacil을 selection agent로 이용하여 selectable marker gene 으로 사용 할 수 있음을 보여 주었다. 본 연구진에서 개발한 Mx Protox 유전자는 효소 자체는 과산화작용 제초제에 민감하여 감수성이지만 식물체내로 ectopic 발현되었을 경우 엽록체와 미토콘드리아에 발현되어 결과적으로 과산화작용 제초제 처리에 높은 저항성을 발휘하는 특성을 가지고 있다. 따라서 본 연구진은 수년전부터 Mx Protox 유전자를 selectable marker 유전자로서 활용하기 위해 다양한 과산화작용제초제(oxyfluorfen, acifluorfen, oxadiazon, carfentrazone)를 selection agent로 이용하여 형질전환을 수행하였으나 효과적인 선발이 이루어지지 않아 성공하지 못하였다. 최근 Li et al. (2003)의 보고에서 과산화작용 제초제중에서 pyrimidindiones 계통의 butafenacil 제초제가 효과적으로 형질전환되지 않은 세포를 죽임으로, 형질전환 후 형질전환세포만을 선택적으로 선발할 수 있음을 시사하였다. 본 연구는 Mx Protox 유전자를 형질전환세포를 선발하는 selectable marker 유전자로 이용할 수 있는 지 조사하기 위하여, 과산화작용

제초제에 대한 벼 calli의 반응정도를 조사하였고, selection agent로 이용하기에 가장 적합한 과산화작용제초제가 butafenacil 이란 사실에 기초하여 *Mx Protox*/Butafanacil을 조합하여 형질전환벼를 육성하였다. 또한 이들 형질전환벼가 제초제에 높은 저항성을 보여줌을 증명함으로써, *Mx Protox*의 식물세포내 발현을 통해 높은 제초제저항성 작물을 육성할 수 있음을 보여 주었다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. Scutellum 유도 벼 calli 의 과산화작용 제초제에 대한 민감도(Susceptibility) 검증

동진벼에서 유래한 배반유래 calli 들에 대한 다양한 peroxidizing 제초제들에 대한 반응도를 조사하기 위하여, calli 들을 2,4-D 2 mg/L 및 다양한 농도의 과산화작용 제초제가가 함유된 N6 배지에서 28°C에 7일간 배양하였다. 그 후 12시간 빛/12시간 암 상태에서 3일간 배양 후 Tetrazolium test를 이용하여 calli의 viability를 조사하였다. 사용한 Tetrazolium Red(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 4.9)에 녹인 다음 사용하였다. 처리한 calli 들을 Tetrazolium 용액에 담구어 28°C, 암상태에서 3일간 둔 후 증류수로 씻은 다음, 사진을 촬영하였다. 사용한 제초제는 oxyfluorfen, acifluorfen, oxadiazon, cafentrazone, 및 butafenacil 등이다. 죽은 세포는 흰색으로 살아있는 세포는 붉은 색으로 염색되었다. 사용한 oxyfluorfen 및 oxadiazon은 경농 및 한농으로부터 분양받았으며, acifluorfen은 Fluka 로부터 구입하였고, technical grade carfentrazone 및 butafenacil은 세부채임자 연구실로부터 입수하였다.

### 나. pCAMBIA0380-Syn MX Protox 벡터 구조물 구축

과산화작용 제초제인 butafenacil를 선발화합물로 사용하고, *Mx Protox* 유전자를 selection marker gene 으로 사용하기 위하여 이용한 binary vector는 pCAMBIA0380(CAMBIA center, Australia) 이다. 이 binary vector는 T-DNA 내에 nos terminator 만 있는 벡터로서 원하는 promoter 와 gene of interest는 외부로부터 연구자 스스로 subcloning 하여야 한다. *Mx Protox* 유전자를 N-terminal

*HindIII* 및 C-terminal *BstEII* primers을 이용하여 ORF를 획득한 후, pGA1611 binary vector에서 잘라온 maize ubiquitin promoter(*BamHI/HindIII*)와 double ligation 방법으로 *BamHI* 과 *BstEII* 로 open 한 pCAMBIA0380 binary vector에 결합(ligation) 하였다. pCAMBIA0380-Syn MX Protox plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 로 형질전환하여 동진에서 유래한 scutellum 과 co-culture 를 통하여 T-DNA를 벼에 도입하였다. 형질전환 calli 선발은 0.1  $\mu\text{M}$  butafenacil 농도에서 선발하였고, selection 배지에서 3일간 빛상태로 둔 것 외에는 형질전환 과정은 상기 기술한 바와 같다.

#### 다. Butafenacil을 이용한 옆 절편 및 foliar 처리에 의한 제초제 저항성 검정

T<sub>0</sub> 및 wild type 잎에 다양한 농도의 butafenacil 제초제를 처리하였다. 벼의 잎을 4-mm 지름의 cork borer로 이용하여 disc를 만들었으며, 이들 disc들을 1% sucrose, 1 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid(pH 6.5) buffer가 있는 polystyrene Petri에서 28°C 암상태에서 12 시간 둔 후, 빛 상태로 옮겨 5일간 둔 후 제초효과를 leaf necrosis 정도로 관찰하였다. 3엽기 정도의 형질전환벼의 foliar 제초제 처리는 5  $\mu\text{M}$  농도로 잎이 완전히 젖을 정도의 제초제를 분무하였다. 제초제 처리 후 12시간 암실에 둔 후, 빛 상태로 5일 간 둔 후 사진을 촬영하였다.

### 3. 연구 수행 결과

#### 가. 과산화작용 제초제들에 대한 벼 calli의 susceptibility 정도 검정

벼의 calli 에 대한 과산화작용 제초제에 대한 민감도를 조사하기 위하여 사용한 제초제는 oxyfluorfen, acifluorfen, oxadiazon, cafentrazone, 및 butafenacil 등이다. 이들은 4 개의 서로 다른 구조 family에 속하는 제초제로서 현재 상업적으로 이용되고 있는 과산화작용 제초제들이다. Compact calli 들을 2,4-D 2 mg/L 및 다양한 농도의 제초제가 들어있는 배지에 치상 한 후, 7일 간 28°C의 암상태에서 배양하고, 그 후 같은 온도에서 3일간 빛 상태에서 배양한 후 calli을 Tetrazolium 검정을 실시하였다. 가장 효과적으로 calli를 죽이는 제초제는 butafenacil 이었으며, 0.1  $\mu\text{M}$  농도에서 벼 calli를 100% 죽이는 현상을 나타내었다. oxadiazon 의 경우,

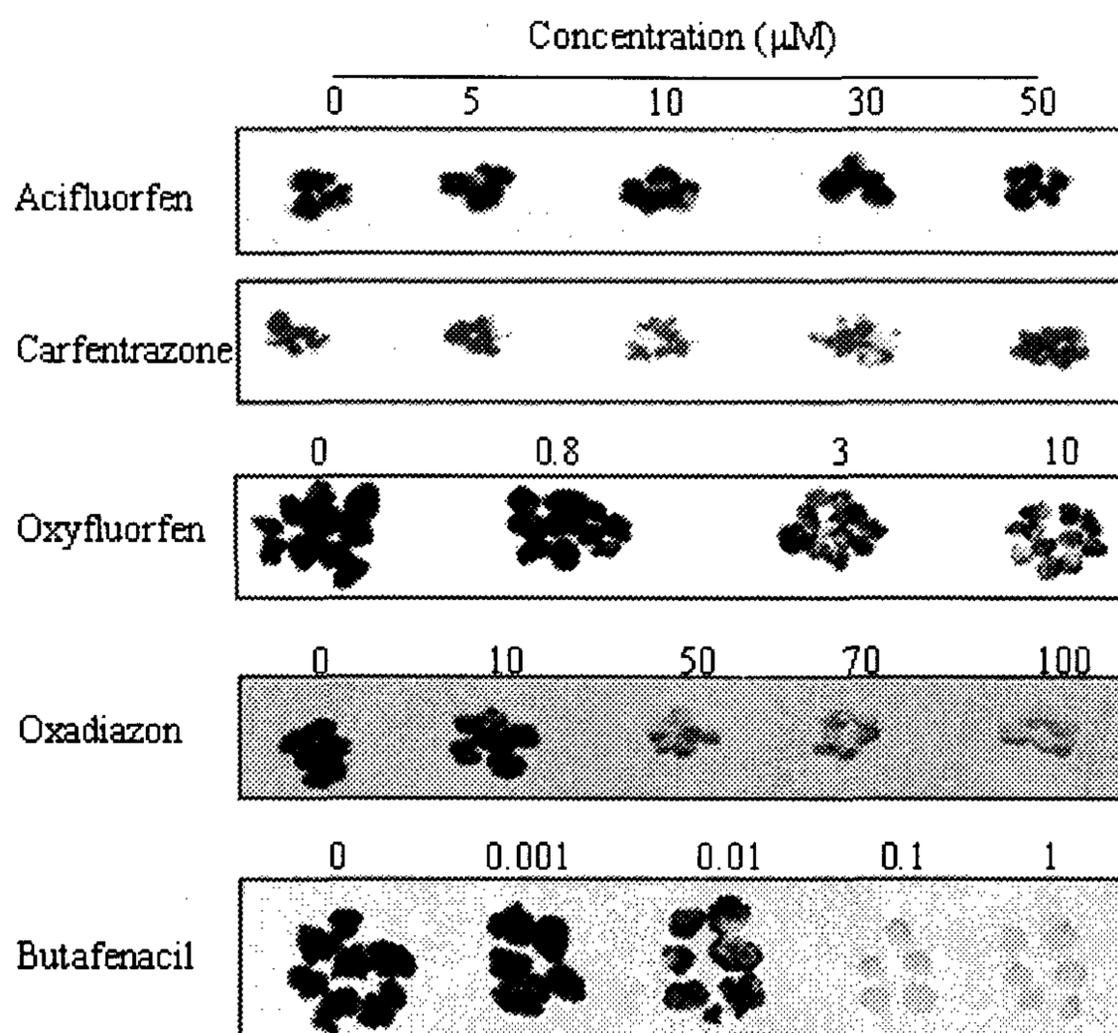
100% 치사율은 100  $\mu\text{M}$  농도에서 나타났으며, oxufluorfen은 10  $\mu\text{M}$  농도에서 40% 정도의 치사율을 나타내었다. carfentrazone 및 acifluorfen은 세포 치사율이 일정치 않으며, 50  $\mu\text{M}$  농도에서도 치사효과가 잘 나타나지 않은 특성을 보여 주었다(그림 3-19). 과산화작용 제초제들의 calli susceptibility 는 사용한 제초제에 대한 반응이 서로 아주 상이하였다. 본 실험에 의한 결론으로서 butafenacil 이 벼 calli 선발에 매우 효과적인 제초제임을 알 수 있다.

#### 나. T-DNA 내에 *Mx* Protox DNA만 함유하는 binary vector 제작

T-DNA 내에 아무런 selectable marker 유전자가 들어있지 않고 *Mx* Protox 유전자만 발현되도록 하는 binary vector를 제작하기 위해 pCAMBIA0380 binary vector를 선택하였다. pCAMBIA0380 vector에는 nopaline synthase 3' end terminator sequence 만 함유하고 있어, promoter 와 원하는 유전자를 외부에서 삽입하도록 고안되어 있는 binary vector 이다. 따라서 *Mx* Protox 유전자를 selectable marker 유전자로 발현 시키기 위해, regulatory 유전자로 항상발현하는 maize ubiquitin promoter를 5' 위치에 두어 *Mx* Protox 유전자가 항상발현되도록 고안하여 pCAMBIA0380:*Mx* Protox binary vector를 제작하였다 (그림 3-20).

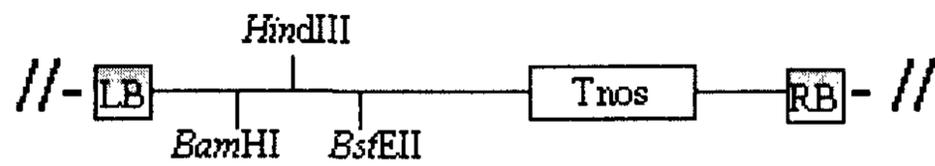
#### 다. Butafenacil을 선발화합물로 이용한 형질전환체의 선발 및 재분화 과정

Butafenacil를 selection agent로 사용하고, selectable marker gene은 *Mx* Protox 유전자를 이용하여 벼형질전환을 시도하였다. 사용한 butafenacil 농도는 0.1  $\mu\text{M}$ 이고 pCAMBIA0380:*Mx* Protox를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 와 동진체 배반에서 유래한 calli 와 공조배양을 일반적인 방법으로 수행하였다. 공조배양이 끝난 후, selection 과정에는 2,4-D 2 mg/L 및 butafenacil 0.1  $\mu\text{M}$  농도로 들어있는 2N6 배지에서 암상태에서 3주간 배양 후, 3일간 빛 상태에 노출시켜 광활성제초제의 제초효과를 유도하였다. 이렇게 함으로 선발중 형질 전환되지 않는 cells를 효과적으로 제거 할 수 있었으며(그림 3-21A) 다시 3 주간 암상태에서 선발을 지속하였다. 약 6주간의 선발과정을 끝내고 calli 들을 butafenacil 0.1 $\mu\text{M}$  농도가 들어있는 재분화배지에서 shoot 출현을 유도하였다. 약 3주 후부터 클로로필이 형성되기 시작하였으며, 클로로필이 형성된 세포주에서부

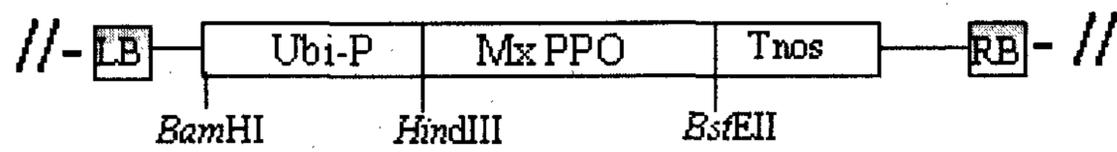


**Fig. 3-19.** Calli responses upon various peroxidizing herbicides. Healthy and compact calli were placed on N6 medium containing 2,4-D with or without various concentrations of peroxidizing herbicides. Calli were incubated for 7 days at 28°C in the dark followed by under 12-h light/12-h dark for 3 days. Calli viability was measured by Tetrazolium test. Live calli turned red and dead calli showed light yellow or white.

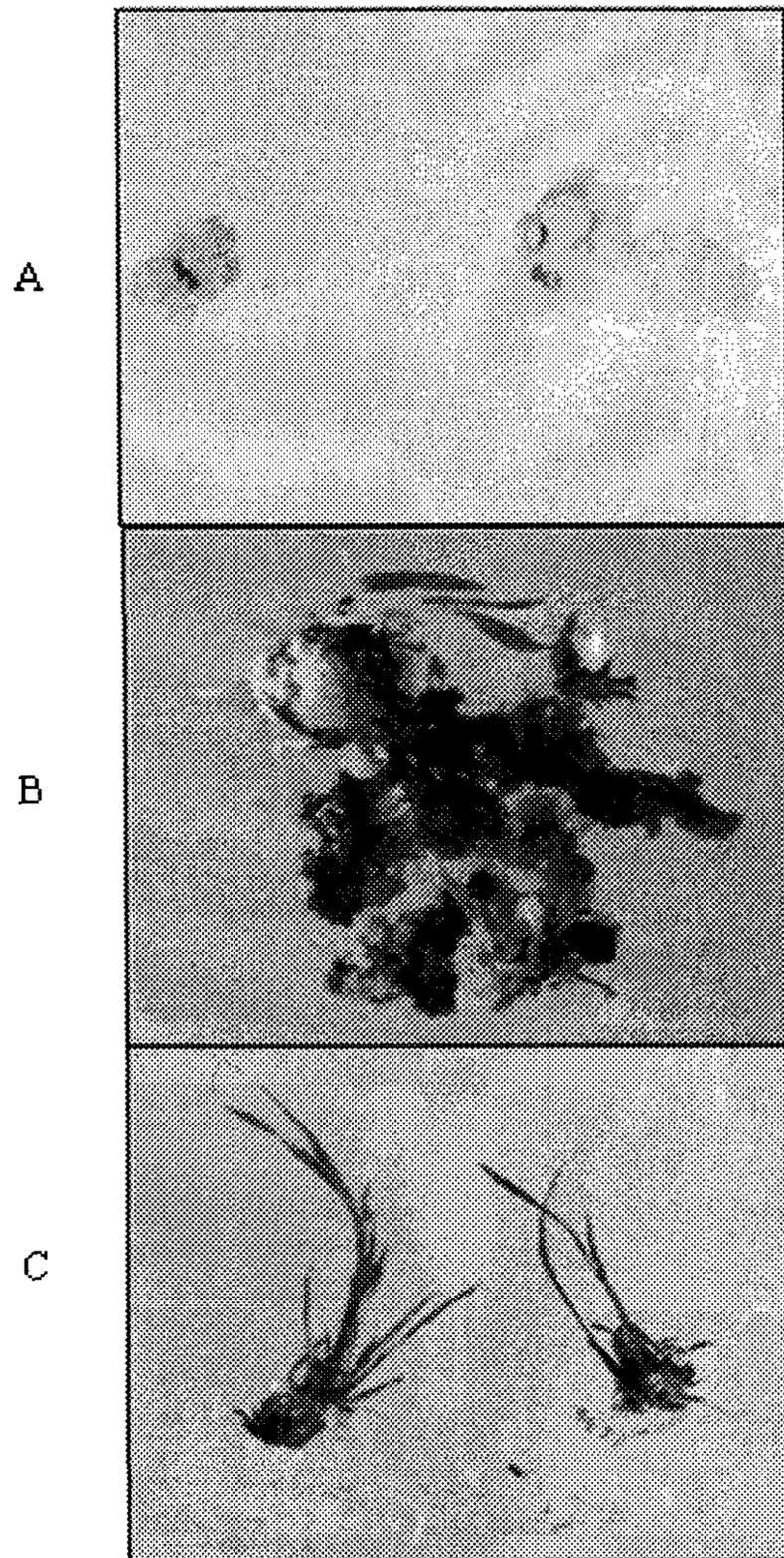
pCAMBIA0380



pCAMBIA0380:Mx PPO



**Fig. 3-20.** Schematic diagram of binary vector pCAMBIA T-DNA used for rice transformation. LB, left border; RB, right border; Ubi-P, maize ubiquitin promoter; *Mx PPO*, *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase; Tnos, nopaline synthase terminator.



**Fig. 3-21.** Butafenacil-based selection and regeneration of transgenic rice plants. (A) Butafenacil resistant rice calli on selection medium containing 0.1 M butafenacil about 4 weeks after cultivation. (B) Regenerated rice shoots obtained by selection with 0.1 M butafenacil 6 weeks after cultivation. (C) Rice rooting in Murashige and Skoog medium containing butafenacil at 0.1 M.

터 shoot 가 출현하기 시작하였다(그림 3-21B). 그 후 출현된 shoot를 butafenacil 0.1 $\mu$ M 농도로 들어있는 Murashige & Skoog 배지에 치상하여 건강한 root를 획득하였다(그림 3-21C). 초기에 18개의 독립적인 calli에서 유래한 형질전환체를 획득하였으며, 분자적 실험 및 제초제 저항성 실험을 수행하기 위해 생육이 좋은 개체를 random으로 6개체를 선택하여 다음 실험을 위한 재료로 사용하였다. 완전한 재분화 개체를 획득한 후 온실에 육묘하여 제초제저항성 및 분자생물학적 분석을 위한 재료로 사용하였다.

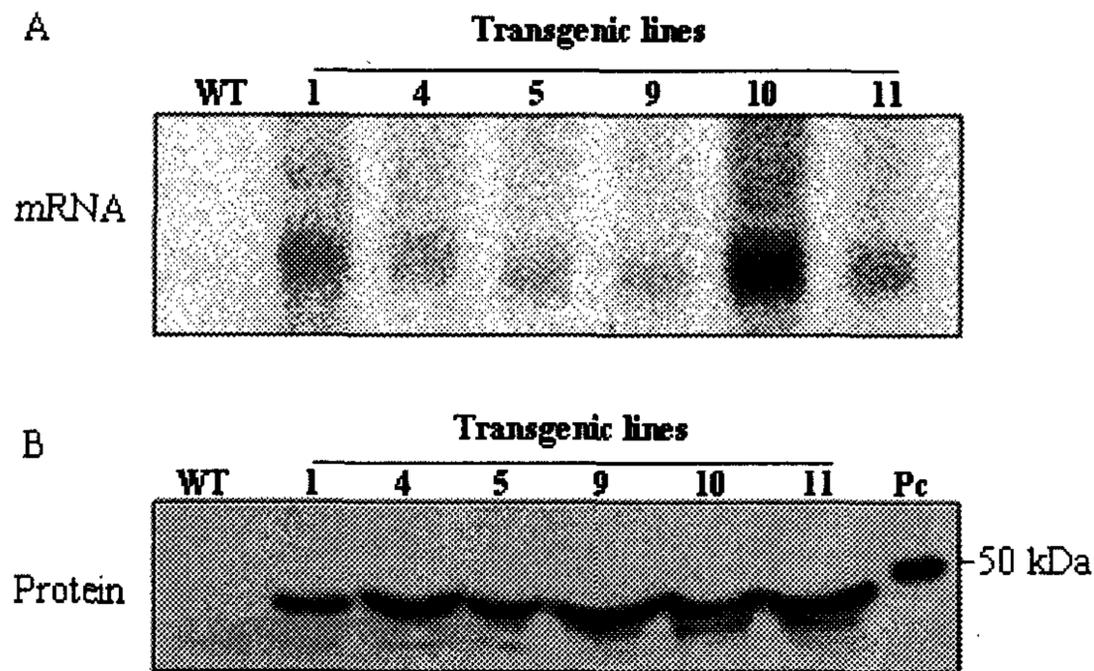
#### 라. Butafenacil 선발에 의해 재분화된 형질전환체의 Northern blot 및 Western blot 분석

Butafenacil을 선발 agent로 사용하여 획득한 형질전환체( $T_0$ )로부터 total RNA를 추출하여 *Mx* Protox mRNA가 발현되는지를 Northern blot 분석을 수행하였다. *Mx* Protox mRNA는 모든 형질전환체에서 발현이 확인 되었으며, 형질전환하지 않은 대조구에서는 *Mx* Protox mRNA의 발현이 검출되지 않았다. 가장 높은 발현을 보인 형질전환 line은 10번 이었으며, 다른 형질전환 lines 들도 상대적으로 높은 *Mx* Protox mRNA 발현율을 보였다(그림 3-22). *Mx* Protox mRNA 발현이 *Mx* Protox 단백질 발현으로 연결되는지를 확인하기 위해 형질전환체 및 대조구 옆으로부터 단백질을 추출하여 *Mx* Protox 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. 모든 형질전환체의 단백질에서부터 *Mx* Protox 단백질이 효과적으로 translation 되는 것을 확인 하였으며, 형질전환하지 않은 대조구(WT)에서는 *Mx* Protox 단백질이 검출되지 않았다(그림 3-22). *Mx* Protox 단백질의 절대적 함량은 *Mx* Protox mRNA 의 절대적인 량과 비교해 볼 때 발현량이 일치 하지 않음을 line 10의 경우에서 보여 주었다. 결론적으로 풍성한 량의 *Mx* Protox mRNA와 *Mx* Protox 단백질이 형질전환체로부터 검출되고 대조구에서는 검출되지 않음을 보아, butafenacil을 선발 agent로 *Mx* Protox 유전자를 선발유전자로 사용시 효과적인 형질전환체를 획득 할 수 있음이 증명되었다.

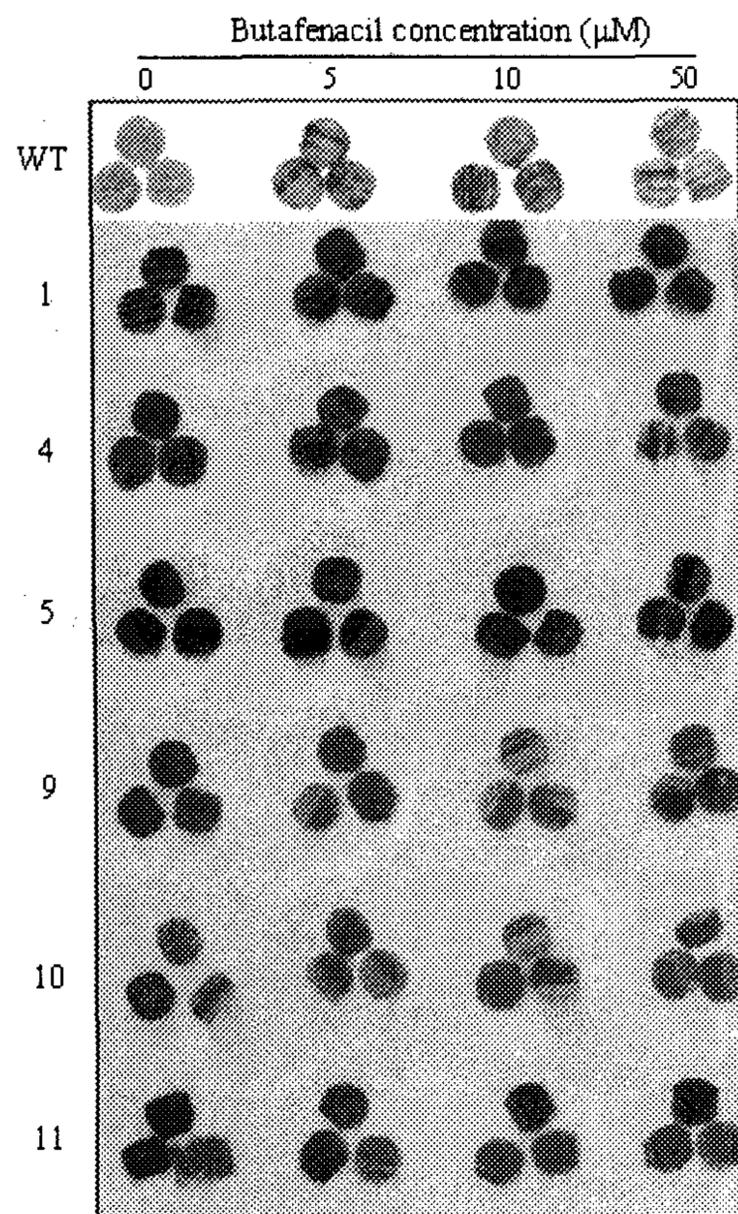
#### 마. Butafenacil 선발에 의해 재분화된 형질전환체의 제초제저항성 분석

형질전환체 및 대조구인 wild type으로부터 잎 절편을 취하여 제초제 butafenacil

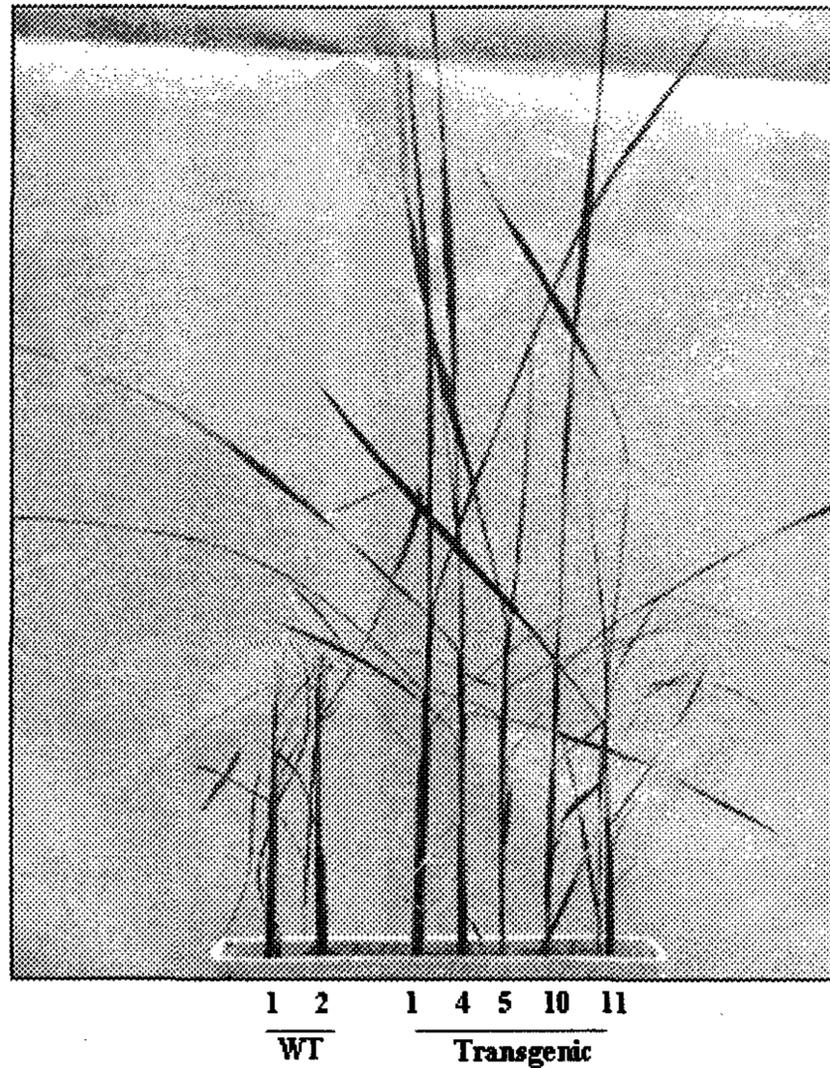
에 대한 저항성을 조사하였다. 사용한 농도는 5 - 50  $\mu$ M 분포로 조사하였다. 잎 절편에 butafenacil을 처리할 경우 1  $\mu$ M 농도에서 옆이 완전히 고사하였다. *Mx* Protox 유전자를 발현하는 모든 형질전환체에서 획득한 leaf discs 에서는 처리한 모든 농도에서 전혀 고사현상을 보이지 않았다(그림 3-23). 그러나 형질전환하지 않은 대조구에서는 모두 고사하였다. Leaf discs에서 나타내는 제초제 저항성이 제초제를 식물체에 옆면 처리하여도 똑 같은 현상을 보이는지 조사하기 위해  $T_0$  형질전환체를 이용하여 butafenacil 을 5  $\mu$ M 농도로 처리하였다. 처리 후 광 상태 하에서 5일째 잎을 조사하여 식물의 고사정도를 비교한 결과 형질전환체에서는 모든 라인에서 고사현상이 전혀 발견되지 않았으나, 대조구인 wild type은 완전히 고사하는 것으로 보아 *Mx* Protox 유전자를 발현하는 형질전환체는 butafenacil 제초제 저항성이 발휘하는 것으로 증명되었다(그림 3-24). butafenacil 에 대한 저항성은 같은 계통의 다양한 과산화작용제초제에 공히 저항성을 발휘하게 됨으로 추후 *Mx* Protox 유전자를 형질전환세포주의 선발 marker 유전자로 butafenacil을 selection agent 로 이용할 수 있을 것이다.



**Fig. 3-22.** Transgene expression analysis. (A) Northern blot analysis of levels of *Mx* PPO mRNA. Ten-microgram aliquots of total RNA from wild-type and T<sub>0</sub> transgenic rice plants were electrophoresed on a formamide gel, blotted, and probed with the *Mx* PPO DNA as described in Materials and methods. (B) Western blot analyses. Fifty  $\mu$ g of total proteins from T<sub>0</sub> transgenic lines and wild type were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels. The separated proteins were electrotransferred onto PVDF membranes and incubated with a polyclonal antibody of *Mx* PPO. WT, non-transgenic rice; 1-11, transgenic rice plants Pc purified recombinant *Mx* PPO (20 ng).



**Fig. 3-23.** Leaf disc assay of butafenacil resistance in transgenic rice plants. Leaf discs were exposed to continuous light at  $250 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$  at  $28^\circ\text{C}$  following a 12-h dark incubation. A photograph was taken 5 days after treatment. WT, non-transgenic rice; 1-11, transgenic rice plants.



**Fig. 3-24.** Post-emergence herbicidal test. The rice plants were sprayed with 5  $\mu$ M of a technical grade of butafenacil. Photographs were taken 5 days after herbicide treatment. WT, non-transgenic wild type; 1-11, T<sub>0</sub> transgenic lines.

## 제 4 절 Mx Protox 발현 형질전환체의 생육 및 포장안정성 검증

### 1. 서 설

현재까지 과산화작용 제초제(Peroxidizing herbicides)에 대한 작물저항성을 부여하기 위한 전략은 엽록체 Protox의 과다발현방법과 제초제저항성 Protox 유전자의 엽록체 발현에 초점을 두고, 전 세계적으로 연구가 진행되어 왔다. 그러나 독일의 Dr. Grimm 그룹에서 *Arabidopsis* Protox를 과다발현한 형질전환담배를 보면, 저항성이 acifluorfen 300 nM에서 발아저항성이 관찰되었으며, 제초제에 대한 저항성이 획기적으로 증대되지 않았다(Lermontova & Grimm, 2000). 또한 본 연구진에서 제초제에 저항성인 것으로 알려진 *Bacillus subtilis* Protox 유전자를 담배 및 벼에 형질전환하여 본 결과 In planta 제초제 저항성이 크게 증대되지 않음을 관찰하였다(Choi et al. 1998, Lee et al. 2000).

Grimm 그룹과 본 연구그룹의 결과에 비추어 보면, 엽록체에 Protox 유전자 과다발현이 실제로 제초제 저항성을 크게 증대시키지 않음을 보여준다. 따라서 본 연구그룹은 현재 NCBI 유전자 data base에 등록된 Protox 유전자를 N-terminal presequence 특성 및 Protox 단백질 특성(soluble / membrane protein 여부)등을 검사하여 본 결과 점액세균인 *Myxococcus xanthus* Protox의 경우 3개의 막횡단나선을 가진 막단백질 특성과, N-terminal sequence에 미토콘드리아 targeting sequence를 가지고 있을 뿐 아니라, 엽록체로 갈 수 있는 transit sequence 특성의 아미노산 sequence를 내재하고 있어, 본 *M. xanthus* Protox를 식물에 형질전환하면, 미토콘드리아 및 엽록체에 targeting 되어 제초제저항성을 부여 할 수 있을 것으로 가정하였다. 선행 연구결과에 의하면, *M. xanthus* Protox 단백질이 형질전환체의 세포에서 미토콘드리아 및 엽록체에 동시에 발현되는 결과를 획득하였다. 이는 *M. xanthus* Protox의 N-terminal 아미노산 서열이 ambiguous presequence를 가지고 있어, Protox 유전자를 양쪽 소기관에 Targeting 시켜 주는 것으로 믿어진다. Mx Protox 유전자가 엽록체와 미토콘드리아에 동시 발현될 경우, 고도의 제초제저항성이 발휘함을 보고하였다(Jung et al., 2004). 현재까지 Protox 유전자를

엽록체 및 미토콘드리아에 Dual targeting 시키는 연구는 없으며, 세계최초로 시도한 결과이며, peroxidizing 제초제에 저항성을 부여할 수 있는 가장 현실성 있는 연구결과로 판단하고 있다.

Protox 효소를 저해하는 peroxidizing herbicides는 Diphenylether group를 포함 9개의 화합물군에 27종의 제초제가 등록 및 상업화된 제초제이다. 대두, 벼, 목화, 땅콩 등의 세계적 주요 작물지에 광범위하게 사용되는 제초제이며, 현재 한국에서 벼 재배지에 Pre-emergence 제초제로서 Oxadiazon제초제(론스타)이 등록, 사용되고 있다. 이들 제초제는 극미량 처리에도 탁월한 제초효과를 보이기에 작물의 생육전반기에 사용하기에는 어려운 점이 있지만, 제초제저항성작물의 경우, 이들 제초제의 사용범위를 넓혀 주기 때문에 상업적 가치가 매우 크다고 할 수 있다.

또한 최근 제초제의 지속적 사용에 의한 제초제저항성 잡초의 출현이 급증하고 있는 실증이며(예, Triazines 제초제, Sulfonylureas 제초제), 이에 따라 지금까지 제초제저항성 잡초출현의 사례가 극히 적은 peroxidizing 제초제의 사용이 권장되고 있는 추세이다. 따라서 이들 제초제에 대한 저항성작물의 육성은 상당한 경제적 가치가 기대될 것으로 추산된다. 따라서 본 연구진에 의해 개발된 *Mx* Protox 유전자를 발현하는 형질전환벼(native *Mx* Protox 발현 형질전환벼) 그리고 합성 *Mx* Protox을 발현하는 형질전환벼의 생육특성 및 포장에서의 제초제저항성 측정은 실제로 농가에 사용 등록하는데 중요한 parameters을 제공함으로 본 세부과제에서는 형질전환벼의 포장 안정성 및 생육특성 등을 세대별로 연구 수행하였다. 구체적으로는 1년차에 상기의 목표를 수행하기 위하여, native *Mx* Protox 발현 T<sub>3</sub> 형질전환벼의 수량구성요소를 검정하였으며, 포트 실험을 통한 제초제 저항성 정도를 측정하였고, 그 외 과산화작용 제초제와 다른 기작을 가진 paraquat 같은 제초제에 대해서도 cross resistance(교차 저항성)을 발휘하는지 조사하였다. 2년차에는 T<sub>4</sub> 세대를 조사하였으며, 3년차에는 합성 *Mx* Protox 발현벼의 생육 및 제초 특성을 조사하였다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. T<sub>3</sub> 세대 형질전환 벼(native *Mx* Protox 발현)의 포장 수량성 검정

*M. xanthus* Protox 유전자를 발현시킨 형질전환벼 8계통, TC(동진벼에 vector

만 삽입), 그리고 재배벼(동진벼)를 침종 및 최아시켜 15일간 육묘한 후 논 포장에 표준 재식밀도(30cm×15cm)로 1본씩 이앙하였다. 그 밖의 시비 및 농약 살포 등의 재배는 농촌진흥청 표준재배법에 준하여 관리하였다. 최종적으로, 수확후에 수량구성요소(이삭수, 이삭당 영화수, 1,000립중)에 따른 수량성을 평가하였다.

#### 나. T<sub>4</sub> 세대 형질전환벼(native Protox 발현)의 GR<sub>50</sub> 값(지상부 생체중이 50% 감소하는 제초제 농도)에 의한 제초제 저항성 정도 평가

종자는 수도용 상토가 충전된 plastic pot(38 cm<sup>2</sup> 표면면적)에 파종하여 온실(주야, 30/20°C; 14/10 시간 광주기)에 두었다. 파종한 유묘의 3엽기 때, 4가지 Protox 저해 제초제, acifluorfen (10, 50, 100, 500, 1,000, 5,000, 및 10,000 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000, 5,000, 및 10,000 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000, 5,000, 및 10,000 g ai ha<sup>-1</sup>)와 oxadiazon (10, 50, 100, 500, 1,000, 5,000, 및 10,000 g ai ha<sup>-1</sup>)을 경엽처리하였고, ALS 저해 제초제, imazapyr (0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 및 1,000 g ai ha<sup>-1</sup>)와 Photosynthesis 저해 제초제, paraquat dichloride (0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 및 1,000 g ai ha<sup>-1</sup>)를 경엽처리하였다. 처리는 3반복으로 실시하였고, 동일한 실험은 2회 이상 실시하였다. 처리 후 6일째에 토양 표면에서 식물체를 잘라서 지상부 생체중을 조사하였다. 그 자료는 SAS(2000) 프로그램을 사용하여 비선형회귀인 Logistic 3(1) 또는 Logistic 4(2) equations:

$$Y = \frac{a}{1 + (X/X_0)^b} \quad (1)$$

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + (X/X_0)^b} \quad (2)$$

을 사용하여 GR<sub>50</sub> (지상부 생체중이 50% 감소하는 제초제 농도)를 계산하였다.

#### 다. 형질전환벼(native Protox 발현)의 T<sub>4</sub> 세대의 생육시기 별 성장반응

형질을 전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환 벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 침종하고 최아시켜 25일간 육묘한 후 논 포장에서 표준재식밀도(30×15cm)로 1본씩 이앙하였다. 이앙은 2004년 5월

29일에 실시하였고, 시비는 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 시비량, N-P-K = 11-4.5-5.7kg/10a를 기준을 준하여 관리하였다. P와 K는 전량 기비로 사용하였고 질소질비료는 기비 50%, 분얼비 30%, 그리고 수비 20%로 분시하였으며 그 밖의 재배관리는 농촌진흥청 표준재배법에 준하여 실시하였다. 이앙 후 2주 간격으로 8주까지 초장 및 분얼수를 조사하여 비형질전환 대조구 벼(WT)와 형질전환 벼(TC, M4)의 생육반응을 비교하였다.

#### 라. 형질전환벼(native Protox 발현)의 T<sub>4</sub> 세대의 관행재배에 따른 수량성

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 침종하고 최아시켜 25일간 육묘한 후 논 포장에서 표준재식밀도(30×15cm)로 1본씩 이앙하였다. 이앙은 2004년 5월 29일에 실시하였고, 시비는 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 시비량, N-P-K = 11-4.5-5.7kg/10a를 기준을 준하여 관리하였다. 수확기에 수량구성요소를 조사하여 실제포장에서 형질전환 벼(M4)의 생산성을 비교하였다.

#### 마. 논 포장조건하에서 native Protox 발현 형질전환 벼(T<sub>4</sub> 세대)의 제초제 반응

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통의 종자를 침종하고 최아시켜 25일간 육묘한 후 논 포장에서 표준재식밀도(30×15cm)로 1본씩 이앙하였다. 이앙은 2004년 5월 29일에 실시하였고, 시비는 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 시비량, N-P-K = 11-4.5-5.7kg/10a를 기준을 준하여 관리하였다. P와 K는 전량 기비로 사용하였고 질소질비료는 기비 50%, 분얼비 30%, 그리고 수비 20%로 생육시기에 따라 분시하였다. 5가지의 Protox 저해형 제초제인, acifluorfen 5,000 g ai ha<sup>-1</sup>, carfentrazone-ethyl(상품명; 애임) 500 g ai ha<sup>-1</sup>, oxadiazon(상품명;론스타) 1,000 g ai ha<sup>-1</sup>, oxyfluorfen(상품명;고을) 500 g ai ha<sup>-1</sup> 및 pyraflufen-ethyl 500 g ai ha<sup>-1</sup>를 이앙 후 10일에 경엽처리하였다. 이들 제초제 처리량은 표준 처리량에 2배 이상에 해당되는 약량이다. Plot 당 크기는 2m × 3m로 각 처리당 3반복으로 완전 임의배치 하였다. 수확 후에 수량구성요소의 차이를 조사하여 실제포장에서 형질

전환 벼(M4)의 사용가능성을 조사하였다.

#### 바. 세포내 구성물질의 누출

온실조건에서 20일 동안 생육시킨 벼의 잎을 면도칼을 이용하여 절편(5×5mm)을 만든 후, 각각 0.15 g씩 채취하여 5 mL의 1 mM MES buffer(pH 6.5)가 담겨져 있는 직경 6 cm의 polystyrene Petri dish에 옮긴 후, 2가지 Protox 저해 제초제, acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon을 아세톤으로 녹여 원하는 농도가 되도록 Petri dish에 가하고 무처리구의 경우에는 같은 양만큼의 acetone을 가했다. 이 때 acetone은 최종 농도가 1%(v/v)를 넘지 않도록 하였으며, 약제농도는 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000  $\mu\text{M}$ 로 하였다. 약제처리 후 25°C growth chamber에서 12시간 동안 암 배양한 후 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광을 조사하면서 conductivity meter(Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA)를 이용하여 전해물질의 누출 정도를 24시간 후에 측정하였다. 측정 방법은 각기 4가지 Protox 저해 제초제의 처리 농도에 따라 최초의 conductivity 값이 다르므로 처리구와 무처리구에서의 차이값을 acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon에 의한 conductivity의 증가로 표시하였다.

#### 사. 세포막 지질과산화작용

지질과산화작용은 TBA 방법을 이용하여 MDA 생성량을 측정하여 조사하였다. 약제처리 및 배양조건은 전해물질 누출 측정시 사용한 조건과 동일하게 하였다. 약제처리 후 25°C의 growth chamber에서 12시간 암배양한 후 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광도로 24시간 동안 조사한 후 배양액과 엽 절편을 각각 분리하여 더 이상 약제에 의한 반응이 일어나지 않도록 MDA 생성량을 측정할 때까지 -80°C의 냉동고에 보관하였다. 냉동고에서 꺼낸 엽 절편은 막자사발에 넣고 20% TCA에 0.5% TBA가 용해되어 있는 용액을 5 mL 넣어 마쇄한 다음, 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이 상정액을 100°C에서 25분간 끓인 다음, ice bath에 넣어 냉각시킨 후 다시 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 분광광도분석기를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 600nm에서의 흡광도 값으로 보정하였다. 한편 배양액은 20% TCA에 0.5% TBA가 용해되어 있

는 용액과 1:1(v/v) 비율로 하여 위와 같은 과정을 거친 후 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는  $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 molar extinction coefficient를 이용하여 산출하였다. 산출된 배양액과 엽 절편의 MDA 농도를 합하여 총 MDA 농도로 나타냈다.

#### 아. 논 포장재배 조건하에서 대면적 관행재배에 따른 native Protox 발현 형질 전환 벼(T<sub>5</sub> 세대)의 수량성

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 침종하고 최아시켜 25일간 육묘한 후 논 포장에서 표준재식밀도(30×15cm)로 3본씩 이앙하였다. 이앙은 전남농업기술원의 실험포장에서 2005년 5월 29일에 실시하였고, 시비는 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 시비량, N-P-K = 11-4.5-5.7kg/10a를 기준을 준하여 관리하였다. P와 K는 전량 기비로 시용하였고 질소질비료는 기비 50%, 분얼비 30%, 그리고 수비 20%로 생육시기에 따라 분시하였다. 그 밖의 재배관리는 농촌진흥청 표준 재배법에 준하여 실시하였다. 수확기에 수량구성요소의 상관관계를 조사하였고 실험포장에서 형질전환 벼(M4)의 생산성은 정조종으로 비 형질전환벼와 비교하였다.

#### 자. Native Protox 발현 형질전환벼에 대한 Protox 저해 제초제의 GR<sub>50</sub> 농도 처리에 따른 생리적 반응 비교

##### 1) 엽록소 함량

형질전환벼(M4)와 비 형질전환 대조구 벼(WT)를 시판되는 수도용 상토(풍농 엔피코)가 충진된 육묘상자(60cm × 30cm × 3cm)에 파종하여 주간/야간 온도가 30/25℃, 광주기가 14/10시간의 온실조건에서 3엽기까지 생육시켰다. 그 육묘가 3엽기에 도달했을 때, 4가지 Protox 저해형 제초제인 acifluorfen ( $590 \text{ g ai ha}^{-1}$ ), oxyfluorfen ( $50 \text{ g ai ha}^{-1}$ ), carfentrazone-ethyl ( $850 \text{ g ai ha}^{-1}$ ), 그리고 oxadiazon ( $1270 \text{ g ai ha}^{-1}$ )을 비 형질전환 벼(WT)의 지상부 생체중을 50% 감소시키는 농도 (GR<sub>50</sub> 농도)로 경엽처리하였다. 위의 비 형질전환 벼(WT)의 지상부 생체중을 50% 감소시키는 농도는 'Native Protox 발현 형질전환 벼(T<sub>4</sub> 세대)의 제초제 저항성 평가'에 의하여 구해진 것을 이용하였다. 처리 후 6일에 잎 조직(0.1 g 생체

중)을 수확하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 10 ml 들어있는 dish에서 상온의 암조건에서 48시간 동안 배양시켜 추출하였다. 엽록소 함량은 Hiscox과 Israelstam (1979)의 절차에 의하여 검정되었으며 총 엽록소 함량은 분광광도계(Model UV-2410PC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 이용하여 측정되었다.

## 2) 세포막 지질과산화작용

지질과산화작용은 TBA 방법(Buege and Aust 1978)을 이용하여 MDA 생성량을 측정하여 조사하였다. 약제처리 및 배양조건은 엽록소 함량 측정시 사용한 조건과 동일하게 하였다. 잎 조직(0.1g 생체중)을 막자사발에 넣고 20% TCA에 0.5% TBA가 용해되어 있는 용액을 5mL 넣어 마쇄한 후 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이 상정액을 100℃에서 25분간 끓인 다음, ice bath에 넣어 냉각시킨 후 다시 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 분광광도계(Model UV-2410PC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 600nm에서의 흡광도 값으로 보정하였다. MDA농도는  $156\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 molar extinction coefficient를 이용하여 산출하였다.

## 3) 항산화 효소의 활성

항산화 효소의 활성측정을 위한 약제처리 및 배양조건은 엽록소 함량 측정시 사용한 조건과 동일하게 하였다. 잎 조직(0.5 g 생체중)을 막자사막에 넣고 액체질소를 가하여 잘게 마쇄한 후 3 ml의 extraction buffer[100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 넣어 균질화 시켰다. 그 현탁액을 15,000g에서 4℃, 20분 동안 원심분리하여 얻은 상정액을 효소활성을 위한 소스로 직접 사용하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 이용하여 Bradford (1976)의 방법에 준하여 측정되었다. 모든 항산화효소(ascorbate peroxidase; APX, catalase; CAT, glutathione reductase; GR, 그리고 peroxidase; POD)는 24에서 26℃의 온도에서 1ml cuvette을 사용하였고 그 활성은 시간과 효소농도에 따라 직선적으로 측정되었다. 분광광학적 측정은 split beam mode에서 자외선/가시광선 파장 분광광도계를 이용하여 수행되었다. APX

활성은 290nm에서 ascorbate ( $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )가 산화되어으로써 감소되어지는 흡광도를 기록하여 Chen and Asada (1989)의 방법을 이용하여 측정되었다. CAT 활성은 240 nm ( $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )에서  $\text{H}_2\text{O}_2$  감쇄의 결과 흡광도의 감소를 기록하여 Mishra et al. (1993)의 절차에 의하여 측정되었다. GR 활성은 340 nm ( $\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )에서 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate가 산화되어으로써 감소되어지는 흡광도를 기록하여 Rao et al. (1996)의 방법을 이용하여 측정되었다. POD 활성은 Anderson et al. (1995)의 절차에 의하여 수행되었으며 470 nm ( $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )에서  $\text{H}_2\text{O}_2$  존재하에 guaiacol로부터 tetraguaiacol이 형성되어지는 흡광도를 기록하여 측정하였다.

#### 4) 항산화 효소의 isozyme 패턴 분석

위의 3) 항산화 효소의 활성과 동일한 약제처리, 배양조건, 및 추출방법으로 분리하여 항산화 효소의 isozyme 패턴 분석을 위한 소스로 사용하였다. APX는 Mittler et al.(1993)의 방법을 이용하였고 단백질량은 100  $\mu\text{g}$  protein을 loading하였다. CAT, GR, 그리고 POD는 Anderson et al. (1995)의 절차에 의하여 수행되었으며 단백질량은 CAT는 20, GR과 POD는 각각 50  $\mu\text{g}$  protein을 loading하여 isozyme 패턴을 분석하였다.

#### 차. T<sub>2</sub> 세대 형질전환 벼(합성 Mx Protox 발현)의 포장 수량성 검증

형질을 전환하지 않은 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환 벼(transgenic control, TC; transgenic rice, S201, S202, S203, S204, S205, S206, S208, S209, S210, S211, S212, S213, S215, S219, S221, S223, S225)의 19계통을 침종하고 최아시켜 25일간 육묘한 후 논 포장에서 표준재식밀도(30×15cm)로 1본씩 이앙하였다. 이앙은 2005년 5월 29일에 실시하였고, 시비는 농촌진흥청에서 일반 농가에 추천하는 시비량, N-P-K = 11-4.5-5.7kg/10a를 기준을 준하여 관리하였다. P와 K는 전량 기비로 사용하였고 질소질비료는 기비 50%, 분얼비 30%, 그리고 수비 20%로 생육시기에 따라 분시하였다. 그 밖의 재배관리는 농촌진흥청 표준재배법에 준하여 실시하였다. 수확기에 수량구성요소의 상관관계를 조사하였고 실제포장에서 형질전환 벼의 생산성을 비교하였다.

### 3. 연구 수행 결과

#### 가. Native *M. xanthus* Protox 발현 T<sub>3</sub> 형질전환체의 수량성 측정

Native *M. xanthus* Protox를 발현하는 T<sub>3</sub> 형질전환체의 생육 및 수량 특성을 포장에서 검정하였다. 측정된 수량지표는 개체당 이삭수, 이삭수당 영화수, 천립중 및 개체당 곡립중량 등을 조사하였다(표 4). 대조구로서 형질전환하지 않은 동진벼(WT)와 pGA1611 vector 만 들어있는 형질전환 대조구(TC)를 *Mx* Protox 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 lines과 비교 검정하였다. 사용한 *Mx* Protox 형질전환체는 독립 lines 으로서 7 lines를 조사하였다.

각 수량지표는 20개체의 평균을 기록한 것이다. 형질전환 lines 들은 대체로 개체당 이삭수가 WT에 비해 다소 많은 경향을 보였으나, TC를 기준으로 볼 때 개체당 이삭수는 차이가 발견되지 않았다. 그 외 이삭당 영화수는 WT 및 TC에 비해 다소 낮은 경향치를 보였으며, 천립중은 오차범위내의 수준으로 차이가 발견되지 않았다. 단위 면적당 수량지수는 TC를 기준으로 볼때 형질전환벼가 다소 높게 나타났으나, 이러한 수량지수가 다음 세대에서도 유지되는지 추후 T<sub>4</sub> 세대에서, 생육조사를 면밀히 검토해야 할 것으로 보여진다. 요약하면, 재배벼(WT)와 TC간의 변이성이 있는 것으로 확인되어 TC를 기준으로 하여 수량지수를 산출하였을때(표 4), MX32에서만 수량이 11% 정도 증가하는 반면에 다른 형질전환벼의 계통들은 다소간의 차이는 있지만 1~30% 감소하는 결과를 나타냈다. 이 결과로 수량성을 단언하기에는 무리가 따른다고 판단되어 재현성을 확인하기 위해 위와 동일한 방법과 절차로 T<sub>4</sub> 세대에서 재실험을 실시하였다.

#### 나. 벼의 잎으로부터 엽록체 및 미토콘드리아 분리

*M. xanthus* Protox는 식물체에 도입되어, 단백질이 합성되면, 이 Protox는 세포질에 머물지 않고 엽록체와 미토콘드리아로 동시 targeting (Dual targeting) 되는 특성을 지니고 있다. 따라서 합성 유전자를 발현하는 형질전환식물이 획득되면, 이들 형질전환벼의 잎으로부터 순수한 미토콘드리아와 엽록체를 분리하여 합성유전자에서 유래된 Protox 단백질이 두개의 소기관에 발현됨을 확인하게 될 것이다. 상기의 실험을 수행하기위한 예비실험으로서 벼의 잎으로부터 organells을 순수하

**Table 4.** Yield and yield components of the transgenic and the wild-type rice plants of T<sub>3</sub> (2003) generation.

Line <sup>a)</sup>	Panicles/ Plant	Spikelets/ Panicle	1,000 grain (g)	Yield (g/plant)	g/m <sup>2</sup>	Yield Index
NT	10.2	75.0	28.0	21.1	464.2	100
TC	13.0	72.0	28.0	26.3	578.6	125
MX31	14.6	65.0	27.0	25.8	567.6	122
MX32	17.8	58.0	28.0	29.2	642.4	138
MX33	13.2	56.0	29.0	21.7	477.4	103
MX34	14.4	72.0	25.0	26.1	574.2	124
MX35	11.9	61.0	29.0	20.7	455.4	98
MX36	11.0	68.0	25.0	18.5	407.0	88
MX37	12.8	61.0	27.0	21.4	470.8	101
MX38	13.4	67.0	27.0	24.4	536.8	116

<sup>a)</sup> WT, wild-type rice plants (cv. Dongjin); TC, transgenic control; MX31, MX32, MX33, MX34, MX35, MX36, MX37, and MX38, dual-targeted transgenic lines (chloroplasts and mitochondria targeted).

게 분리하는 방법들을 수행하였다.

재료 및 방법에서와 같이 벼의 잎으로부터 세포를 마쇄하고, 엽록체와 미토콘드리아를 Percoll 방법으로 수득한 뒤 organells의 오염 여부를 marker enzymes의 발현 여부를 통해 확인 하였다. 엽록체의 순수정도는 aminolevulinic acid dehydratase(ALAD) 효소활성의 정도로 측정한 결과, 분리한 엽록체에서 높은 ALAD 활성을 보였으며, 약간의 fumarase 활성이 섞여 있음을 확인 할 수 있었으나, 미미한 것으로 사료된다(그림 3-25). 반면 순수 분리한 미토콘드리아에서는 엽록체의 오염정도가 100% 제거되어, ALAD 활성이 거의 측정되지 않았으며, 미토콘드리아 mark enzyme인 fumarase 효소활성이 매우 높게 나타나는 것으로 보아, 순도가 높은 미토콘드리아가 본 연구방법으로 분리되어 짐을 확인 할 수 있었다.

#### 다. 형질전환벼의 세대 안정성 측정을 위한 hygromycin leaf disk assay

Homozygous T<sub>2</sub> 형질전환벼에서 채종한 T<sub>3</sub> 형질전환벼가 Transgene의 분리가 더 이상 일어나지 않고, 고정되어 있는지 조사하기 위해 각 형질전환 lines 별, 총 7개의 lines과 lines 별 30개체로부터 leaf를 채취하여 hygromycin leaf disk assay를 수행하여, lines 별 각 개체간의 transgene의 유무와 분리 상태를 재검정하였다(-; 하이그로마이신 감수성, +; 저항성, 0; 결주).

Hygromycin 저항성 검정을 해 본 결과, 3032, 3033, 및 3034 lines 이 고정된 것으로 나타났다(그림 3-26).

#### 라. Native *M. xanthus* Protox 발현 T<sub>4</sub> 세대 형질전환 벼의 GR<sub>50</sub> 값(지상부 생체중이 50% 감소하는 제초제 농도)에 의한 제초제 저항성 정도 평가

온실조건의 whole-plant 검정에서 oxyfluorfen에 가장 높은 저항성(그림 3-27)을 보였고, 다른 Protox 저해 제초제(과산화작용 제초제)인 acifluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon에도 높은 교차저항성을 보였다(그림 3-27). 그러나, ALS 저해 제초제인 imazapyr와 Photosynthesis 저해 제초제인 paraquat dichloride에선 저항성이 전혀 없었다. 이는 *M. xanthus* Protox의 과다발현이 예상대로 과산화작용제초제군만 한정해서 나타나는 것을 보여주며, Protox 효소를 공격하는 다양한 계통의 과산화작용 제초제군에 광범위하게 저항성을 보여줄 수 있다.

Fraction	Chloroplast fraction		Mitochondria fraction	
	ALAD	Fumarase	ALAD	Fumarase
Leaves	25.2	2.3	-	150

ALAD;  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ , fumarase; unit  $\text{mg}^{-1} \text{ protein}$

**Fig. 3-25.** Marker enzyme activity of mitochondria and chloroplasts isolated from rice leaves. ALAD is amino levulinic acid dehydrogenase for chloroplasts marker whereas fumarase is mitochondria enzyme marker.

## Hygromycin Test

Project Name : MX Line

Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(+)수	%
3031 - 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
3031 - 2	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	26	87
3031 - 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3032 - 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3032 - 2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	28	93
3032 - 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
3033 - 1	+	○	+	+	+	+	+	+	+	+		
3033 - 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	28	93
3033 - 3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
3034 - 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3034 - 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	30	100
3034 - 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3035 - 1	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+		
3035 - 2	+	-	+	+	-	-	-	+	○	+	16	53
3035 - 3	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-		
3036 - 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-		
3036 - 2	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	7	23
3036 - 3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-		
3037 - 1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+		
3037 - 2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	21	70
3037 - 3	+	○	+	-	+	-	-	+	+	+		
3038 - 1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		
3038 - 2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	21	70
3038 - 3	-	-	+	+	-	+	-	○	+	○		

Fig. 3-26. *Mx* Protox transgene segregation pattern using hygromycin resistance test. Leaf disks of T<sub>3</sub> transgenic rice leaves were collected and incubated in water containing 50 µg hygromycin.

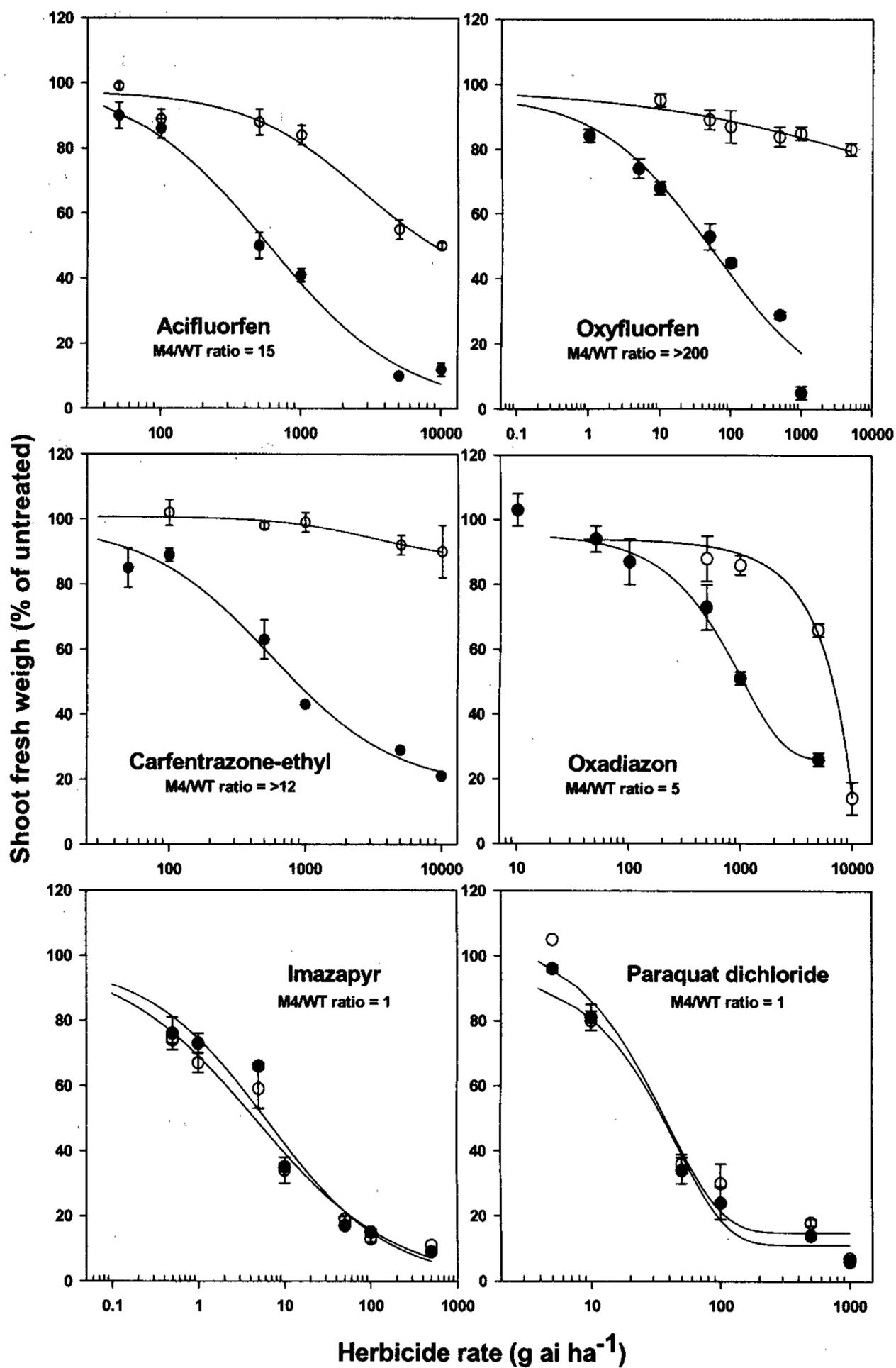


Fig. 3-27. Shoot fresh weight of wild-type (WT, ●) and transgenic (M4, ○) rice plants as affected by Protox-, ALS-, and Photosynthesis-inhibiting herbicides in whole-plant response assay. The herbicides were applied to three-leaf rice plant and shoot fresh weight was determined at 6 days after treatment. Vertical bars represent standard errors of the mean. Corresponding GR<sub>50</sub> values are presented in Table 2.

형질전환 벼(M4)와 비형질전환 벼(WT)의 3엽기 때, acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon을 처리하였으며, 이 때 저항성 형질전환 벼(M4)와 감수성 비형질전환 벼(WT)의 지상부 생체중에 기초한 GR<sub>50</sub>값은 각각 15, >200, >12, 그리고 5배 높았다(표 5). 그리고, imazapyr와 paraquat dichloride는 각각 1배로 저항성 차이가 없었다. 이상의 whole-plant 검정은 정확한 저항성 정도를 판단하기 위함과 다른 분석법의 효과를 평가하는 데 기준으로 삼고자 사용하였다.

#### 마. 형질전환 벼(native Protox 발현)의 T<sub>4</sub> 세대의 생육시기 별 성장반응

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 이앙 후 2주 간격으로 8주까지 초장 및 분얼수를 조사하여 비형질전환 대조구 벼(WT)와 형질전환벼(TC, M4)의 생육반응을 비교하였다. 그 결과 생육시기가 경과함으로서 3계통 모두 초장 및 분얼수에 있어 일정한 생육진전을 나타냈다(그림 3-28). 그러나 3계통을 비교하였을 때, 초장 및 분얼수에 있어 비형질전환 벼(WT)와 형질전환 벼의 TC계통은 유의성이 없는 반면, 초장에 있어서는 형질전환벼(M4)가 조금 작게 나타났다. 그리고 분얼수는 형질전환 벼가(M4) 다소 높게 나타났으나, 유의성은 없었다(그림 3-28). 이상의 결과로 초장은 다소 형질전환벼(M4)가 작았으나 분얼수에 있어서는 3계통이 모두 일정한 경향으로 생육함을 관찰하였다.

#### 바. 형질전환 벼(native Protox 발현)의 T<sub>4</sub> 세대의 관행재배에 따른 수량성

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 수확기에 수량구성요소를 조사하여 실제포장에서 형질전환 벼(M4)의 생산성을 비교하였다. 그 결과 비형질전환 대조구 벼(WT)에 비해 형질전환벼의 TC와 M4계통이 각각 수량지수로 93%와 91%로 약 7-9%의 수량이 감소함을 조사할 수 있었다. 이는 유효분얼수에 있어서 비형질전환 대조구 벼(WT)와 형질전환벼(TC, M4)는 유의성이 없는 반면에 주당영화수 및 천립중이 작아지므로서 최종적인 수량이 떨어지는 주요요인으로 생각된다. 부차적으로, 이삭길이를 측정한 결과 또한, 비형질전환 벼(WT)가 18.7 cm, 형질전환 벼(M4)가 16.6 cm로 약 2 cm 작음을 알 수 있었다(표 6).

**Table 5.** Whole-plant response of wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants to Protox-, ALS-, and Photosynthesis-inhibiting herbicides.

Herbicide	Line	Regression equation <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	GR <sub>50</sub> <sup>b</sup> (g ai ha <sup>-1</sup> )	M4/WT <sup>c</sup>
Acifluorfen	M4	$Y = 35+62/[1+(X/2776)^{1.020}]$	0.97	8837	15
	WT	$Y = 102/[1+(X/568)^{0.879}]$	0.99	588	
Oxyfluorfen	M4	$Y = 100/[1+(X/9516000)^{0.178}]$	0.95	>10000	>200
	WT	$Y = 97/[1+(X/56.31)^{0.531}]$	0.97	50	
Carfentrazone-ethyl	M4	$Y = 87+14/[1+(X/3230)^{1.222}]$	0.95	>10000	>12
	WT	$Y = 17+81/[1+(X/561.9)^{0.949}]$	0.99	850	
Oxadiazon	M4	$Y = 88/[1+(X/7042)^{2.976}]$	0.98	6421	5
	WT	$Y = 101/[1+(X/1263)^{0.734}]$	0.97	1270	
Imazapyr	M4	$Y = 98/[1+(X/6.381)^{0.622}]$	0.99	6	1
	WT	$Y = 99/[1+(X/4.628)^{0.544}]$	0.99	5	
Paraquat dichloride	M4	$Y = 108/[1+(X/33.97)^{0.988}]$	0.97	39	1
	WT	$Y = 96/[1+(X/37.44)^{1.195}]$	0.97	35	

<sup>a</sup>Regression equation generated using herbicide concentration in g ai ha<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup>GR<sub>50</sub> values were the Protox-, ALS-, and Photosynthesis-inhibiting concentrations that reduced shoot fresh weight by 50%.

<sup>c</sup>M4/WT ratios were calculated relative to the GR<sub>50</sub> value of the wild-type rice plants.

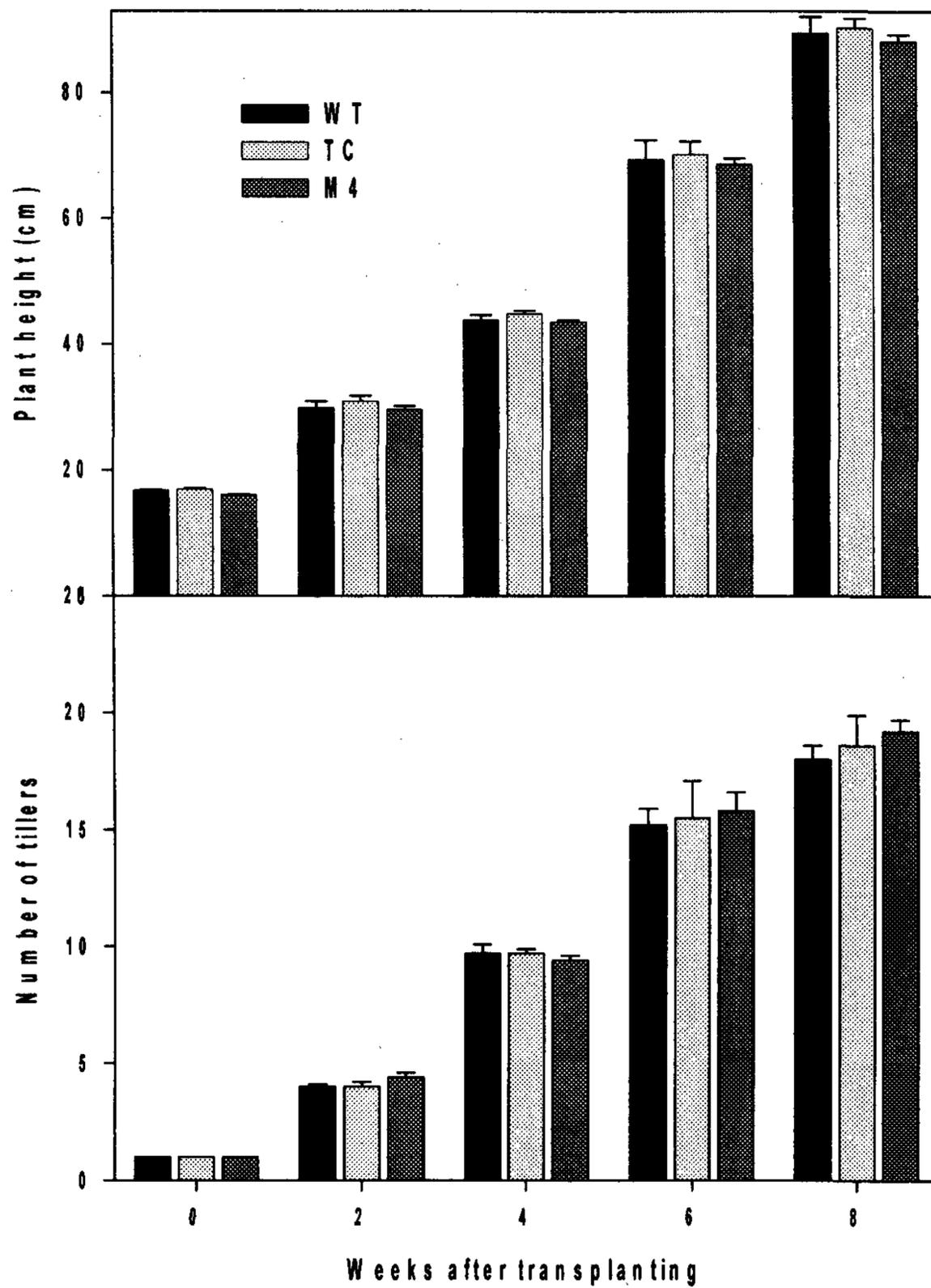


Fig. 3-28. Plant height and tiller numbers of wild-type (WT), transgenic control (TC), and transgenic (M4) rice plants of T<sub>4</sub> generation expressing a *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase gene. Vertical bars represent standard errors of the mean.

**Table 6.** Yield and yield components of the transgenic and the wild-type rice plants of T<sub>4</sub> (2004) generation.

Line <sup>a)</sup>	Panicles/ Plant	Spikelets/ Panicle	1,000 grain (g)	Panicle length (cm)	Yield (g/plant)	g/m <sup>2</sup>	Yield Index
WT	10.5	86.1	25.9	18.7	22.9	504	100
TC	9.4	82.3	27.6	18.8	21.3	469	93
M4	10.8	78.0	24.6	16.6	20.9	460	91

<sup>a)</sup> WT, wild-type rice plants(cv. Dongjin); TC, transgenic control; M4, transgenic line.

## 사. 논 포장조건하에서 native Protox 발현 형질전환 벼(T<sub>4</sub> 세대)의 제초제 반응

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 육묘하여 이앙하고 이앙 후 10일에 5가지의 Protox 저해형 제초제를 처리하여 수확기에 수량구성요소를 조사함으로써 실제포장에서 형질전환 벼(M4)의 사용가능성을 검토하였다. 5가지 Protox 저해형 제초제 모두에서 형질전환 벼의 M4계통은 무처리와 비교한 결과 전혀 생산성 차이가 없었고, 비형질전환 벼의 WT와 형질전환 벼의 TC계통은 5가지 제초제 모두에서 20-40%가 감소하였으며, 특히 acifluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxyfluorfen에서 약 30-40%정도로 수량감소가 크게 나타났다(표 7, 그림 3-29). 각각의 수량구성요소를 종합해 볼 때, 주당 이삭수와 이삭길이에는 차이가 없었으나 주당 영화수, 천립중의 감소에 기인하여 수량이 크게 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 형질전환 벼(M4)는 실제 포장에서 안정성이 확보됨을 확인할 수 있었다.

### 아. Protox 저해 제초제에 대한 비형질전환 벼(재배종 동진벼)와 형질전환 벼 (native Protox 발현)의 생리적 반응 비교

DPE계 제초제인 acifluorfen과 oxyfluorfen에 대한 형질전환한 벼(M4)와 전환하지 않은 벼(WT)의 반응은 광활성 제초제의 효과를 비교하는 데 주로 사용되는 세포내 전해물질의 누출 및 지질과산화작용의 최종산물인 MDA의 생성량으로 비교하였다.

#### 1) 세포내 구성물질의 누출

온실조건에서 생육시킨 벼의 잎을 면도칼을 이용하여 절편(5×5mm)을 만든 후, acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon을 처리한 엽 절편을 25℃의 암조건의 생육상에서 12시간 배양한 후 250 μmol/m<sup>2</sup>/sec의 광을 조사하면서 conductivity meter(Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA)를 이용하여 전해물질의 누출 정도를 24시간 후에 측정한 결과, 비형질전환 벼(WT)는 4가지 Protox 저해 제초제에서 농도가 증가함에 따라 세포내 전해물질의 누출이 큰 폭으로 증가함을 확인할 수 있었고, 형질전환 벼(M4)는 1000μM까지도

**Table 7.** Yield and yield components of the wild-type and the transgenic rice plants as affected by acifluorfen (5,000g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (500g ai ha<sup>-1</sup>), oxadiazon (1,000g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (500g ai ha<sup>-1</sup>), and pyraflufen-ethyl (500g ai ha<sup>-1</sup>) in a paddy field. The herbicides were treated at 10 days after transplanting.

Herbicide	Line <sup>a</sup>	Panicle length (cm)	Panicles per Plant	Spikelets per Panicle	1000 grain (g)	Yield (g m <sup>-1</sup> )	Yield Index
Untreated control	WT	19.4	10.3	82.8	26.9	512	100
	TC	19.0	9.3	87.0	27.7	503	100
	M4	17.9	12.3	76.6	23.2	486	100
Acifluorfen	WT	17.2	8.7	62.5	26.0	315	62
	TC	16.5	8.7	62.6	26.6	320	64
	M4	17.6	11.5	76.4	24.1	471	97
Carfentrazone-ethyl	WT	17.7	9.2	63.7	24.5	319	62
	TC	17.5	8.7	63.7	26.5	326	65
	M4	18.5	12.0	77.2	24.7	507	104
Oxadiazon	WT	18.5	10.5	69.4	24.7	402	79
	TC	18.6	9.8	67.6	26.3	387	77
	M4	18.2	12.2	76.4	23.8	494	102
Oxyfluorfen	WT	17.7	10.1	61.4	24.4	336	66
	TC	18.0	8.3	77.4	24.3	348	69
	M4	19.0	12.9	77.7	23.2	515	106
Pyraflufen-ethyl	WT	19.0	9.5	75.9	24.9	397	78
	TC	18.8	8.7	82.7	25.3	403	80
	M4	18.2	12.0	78.0	24.1	504	104

<sup>a</sup>WT, wild-type rice plants (cv. Dongjin); TC, transgenic control; M4, dual-targeted transgenic lines (chloroplast and plastid targeted).

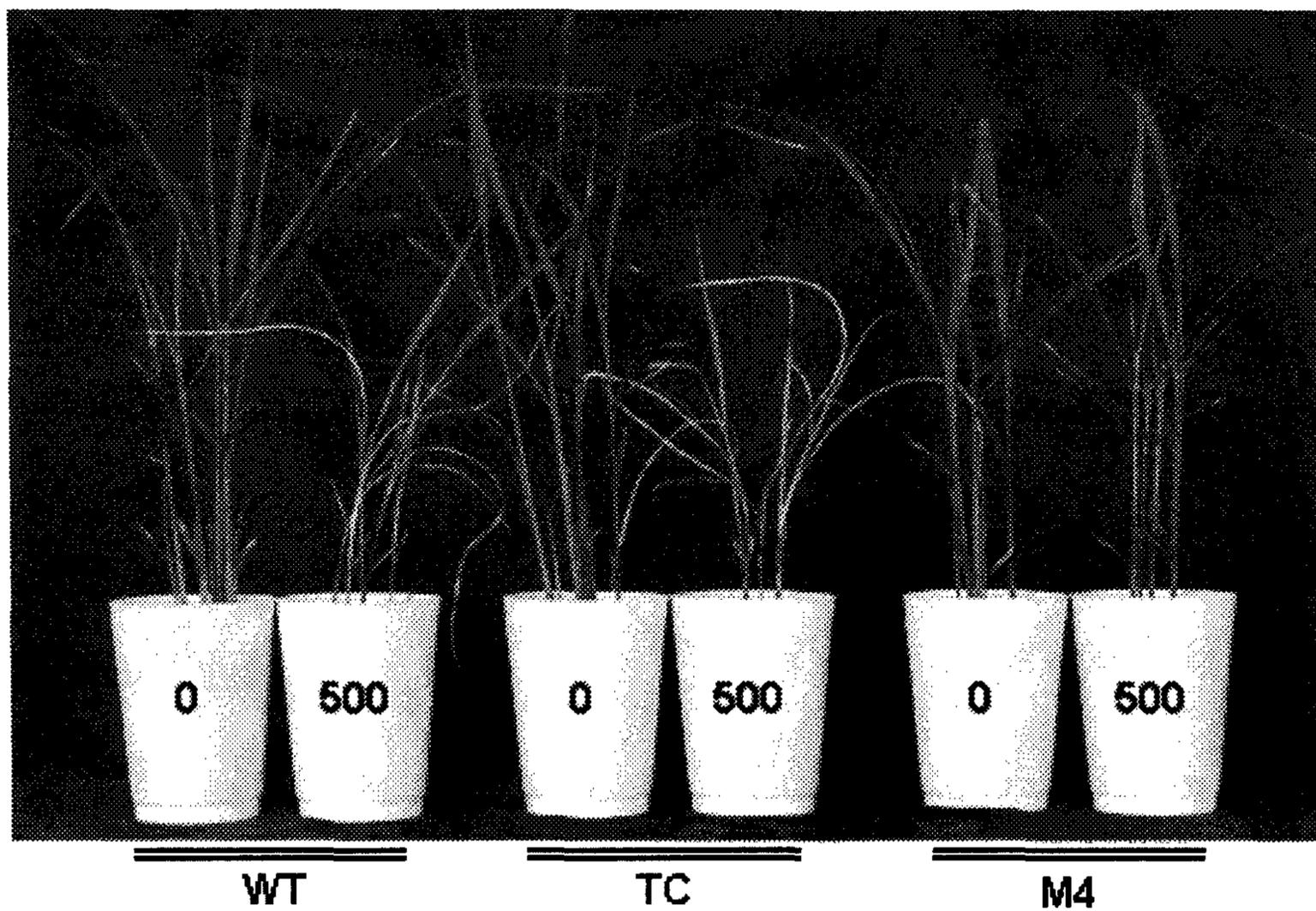


Fig. 3-29. Photo of wild-type (WT), transgenic control (TC), and transgenic (M4) rice plants as affected by oxyfluorfen ( $500\text{g ai ha}^{-1}$ ) in whole plant response assay. Oxyfluorfen was sprayed at 3-leaf stage and photo was taken at 6 days after treatment.

거의 증가하지 않았으며, 특히 oxyfluorfen에선 농도가 높아지는 데도 세포내 전해 물질의 누출이 거의 증가하지 않았다. 이는 T<sub>4</sub> 세대 형질전환 벼(native Protox 발현)의 GR<sub>50</sub> 값(지상부 생체중이 50% 감소하는 제초제 농도)에 의한 제초제 저항성 정도 평가의 결과와 유사함을 알 수 있었다(그림 3-30).

## 2) 세포막 지질과산화작용

DPE계 제초제는 식물의 porphyrin 합성과정의 식물체내에 Protox를 저해하여 Proto IX이 비정상적으로 축적되게 하는 것으로 알려져 있다. Proto IX은 빛을 흡수하여 분자산소로부터 일중항 산소를 만드는 광활성 물질이다. 일중항 산소는 반응성이 매우 높아 전자가 많은 곳을 공격하게 되는 데 세포막의 주요 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 지질과산화작용을 일으킨다. 궁극적으로 틸라코이드의 불포화지방산은 MDA와 ethane으로 분해되며, 이러한 연쇄반응에 의해 틸라코이드의 구조가 파괴되고 여러 다른 세포막과 조직들이 붕괴되는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 acifluorfen, oxyfluorfen, carfentrazone-ethyl, 그리고 oxadiazon의 처리에 의한 지질과산화작용의 지표로 MDA 생성량을 조사하였는데, 비형질전환 대조구 벼(WT)는 acifluorfen과 carfentrazone-ethyl은 1, 그리고 oxyfluorfen과 oxadiazon에서는 0.1  $\mu$ M 이상의 농도로 처리했을 때부터 점진적으로 증가하였다. 그러나, 형질전환벼(M4)는 acifluorfen의 100  $\mu$ M 이상 농도부터 약간 증가함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 T<sub>4</sub> 세대 형질전환 벼(native Protox 발현)의 GR<sub>50</sub> 값(지상부 생체중이 50% 감소하는 제초제 농도)에 의한 제초제 저항성 정도 평가와 세포내 구성물질의 누출 그리고 세포막 지질과산화작용이 상호간에 유사한 상관관계를 나타냄을 의미한다(그림 3-27, 3-30, 3-31).

## 자. 논 포장재배 조건하에서 대면적 관행재배에 따른 native Protox 발현 형질 전환 벼(T<sub>5</sub> 세대)의 수량성

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, M4)의 3계통을 수확기에 수량구성요소를 조사하여 각각의 요소에 따른 상관관계를 확인하였고 plot당 100주의 정조중으로 실제포장

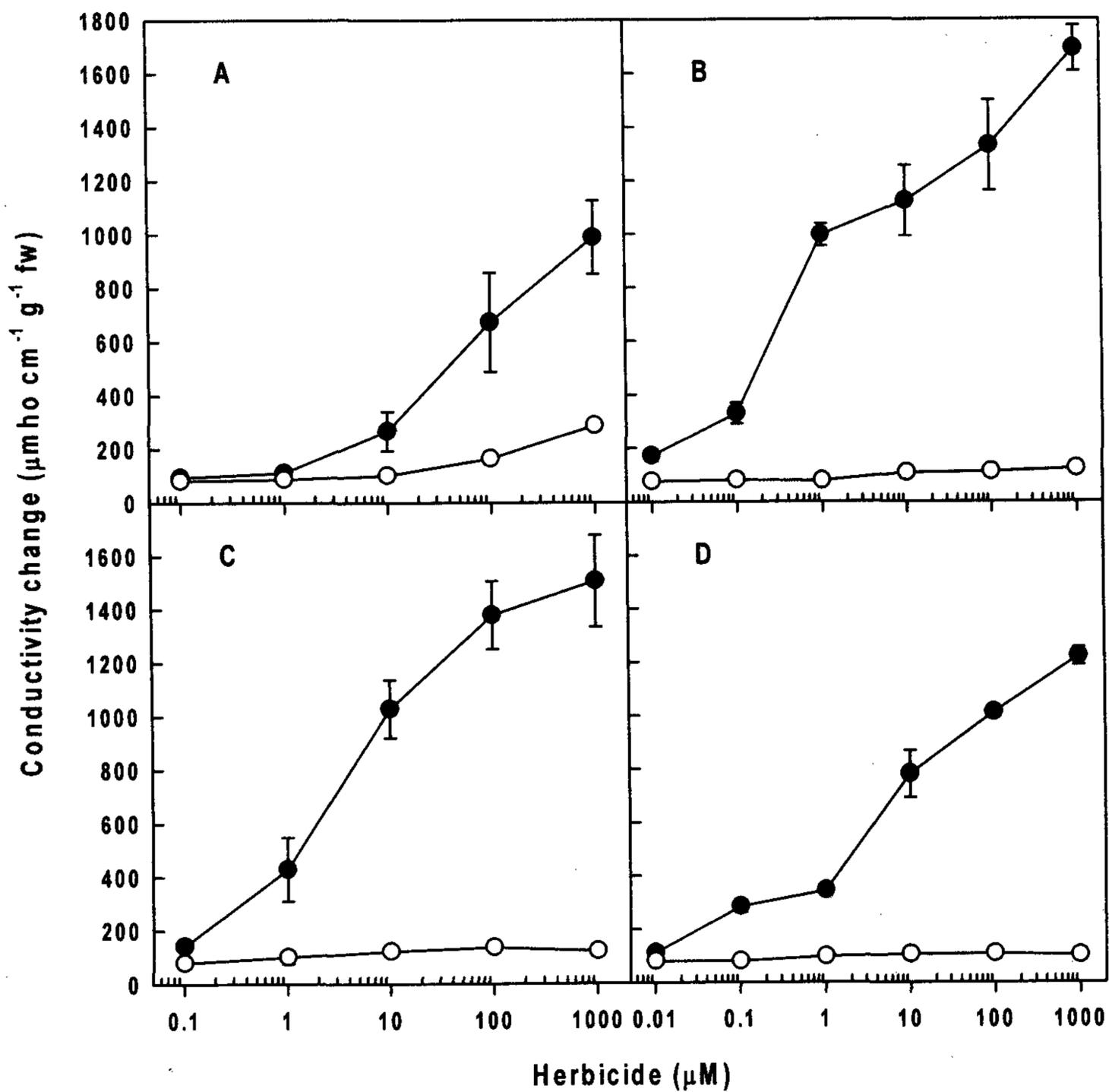
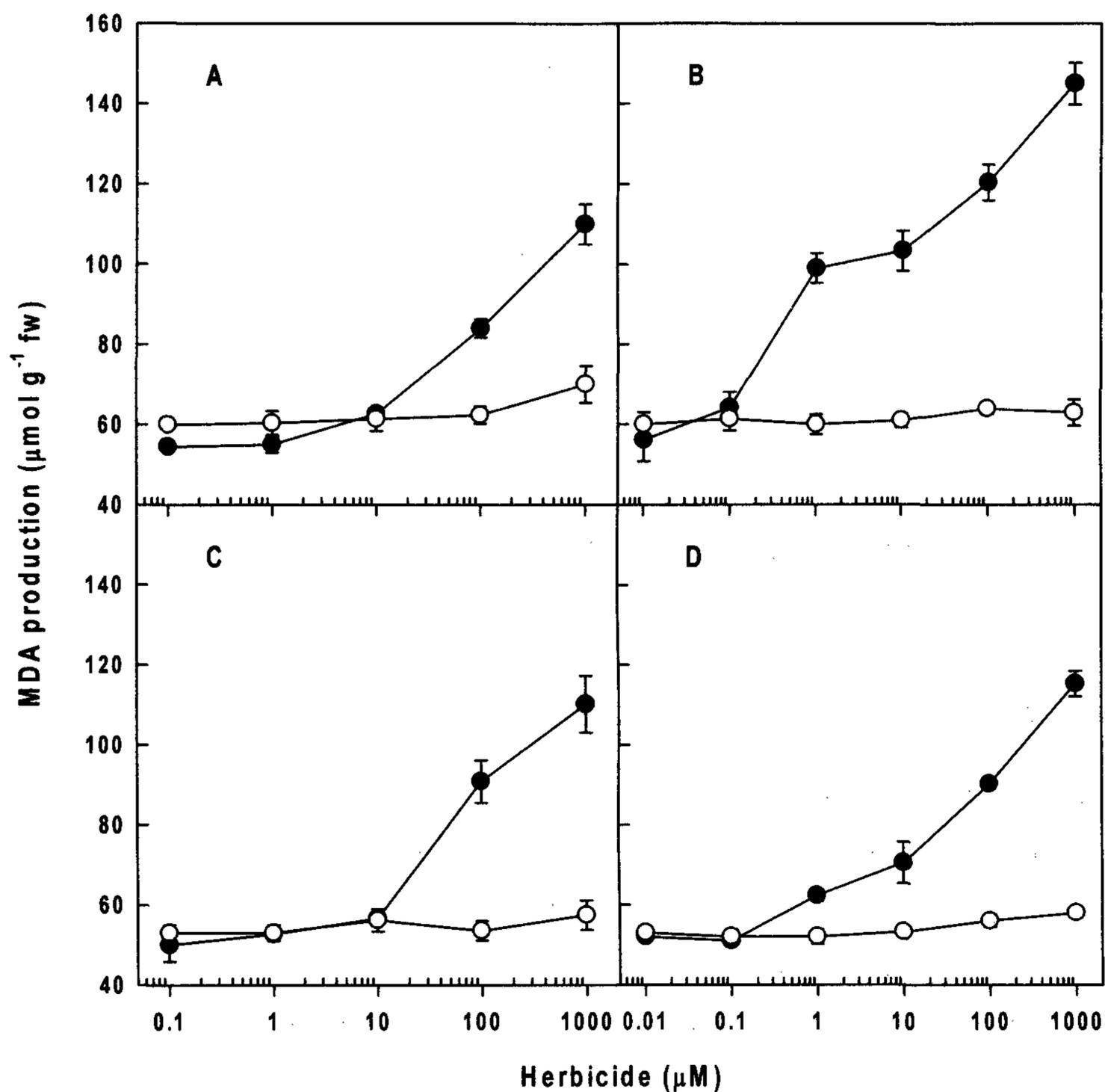


Fig. 3-30. Effects of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) on electrolyte leakage from leaf squares of wild-type (WT, ●) and transgenic (M4, ○) rice plants. The tissues were exposed to continuous light at  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR at  $25^\circ\text{C}$  for 24 h following 12 h dark incubation. Each data point is the mean  $\pm$  SE of three replications.



**Fig. 3-31.** Effects of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) on MDA production from leaf squares of wild-type (WT, ●) and transgenic (M4, ○) rice plants. The tissues were exposed to continuous light at  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR at  $25^\circ\text{C}$  for 24 h following 12 h dark incubation. Each data point is the mean  $\pm$  SE of three replications.

에서 형질전환벼(M4)의 생산성을 비교하였다. 그 결과 비 형질전환 대조구 벼(WT)와 형질전환벼의 TC는 유의적인 차이가 없이 거의 동일한 수량성을 보였지만, M4계통은 수량지수로 93%로 약 7%의 수량이 감소함을 조사할 수 있었다(표 8). 각각의 수량구성요소를 관찰한 결과, 주당 이삭수는 형질전환 벼가 높게 나타났으므로 주당 이삭수는 형질전환벼의 수량감소 요인으로 볼 수 없었다. 그러나 형질전환 벼는 주당 영화수와 천립중이 비형질전환 벼에 비해 적어서 결과적으로 수량이 감소하는 것으로 생각된다. 또한 이삭길이를 측정된 결과에서도 비 형질전환 대조구 벼(WT)가 21.4 cm이었던 반면 형질전환 벼(M4)는 20.0 cm로 1.4 cm 정도 작았다. 따라서 실제 논포장에서 형질전환 벼를 재배 시 수량감소는 주당 영화수, 천립중 및 이삭길이에 의한 것으로 사료되었다.

#### 차. Native Protox 발현 형질전환 벼에 대한 Protox 저해 제초제의 GR<sub>50</sub> 농도 처리에 따른 생리적 반응 비교

##### 1) 엽록소 함량

형질전환벼(M4)와 비 형질전환 대조구 벼(WT)의 잎 조직에서 4가지 Protox 저해형 제초제 처리에 따른 엽록소 함량의 감소는 무처리에 비교한 결과 oxyfluorfen에서 약 50% 정도로 지상부 생체중에 의한 50% 감소와 거의 유사한 경향으로 감소됨을 확인 할 수 있었고, 나머지 3가지 제초제는 50%보다 조금 높게 나타났다(그림 3-32). 그리고 형질전환 벼(M4)는 이상의 4가지 제초제에 거의 피해를 받지 않았다.

##### 2) 세포막 지질과산화작용

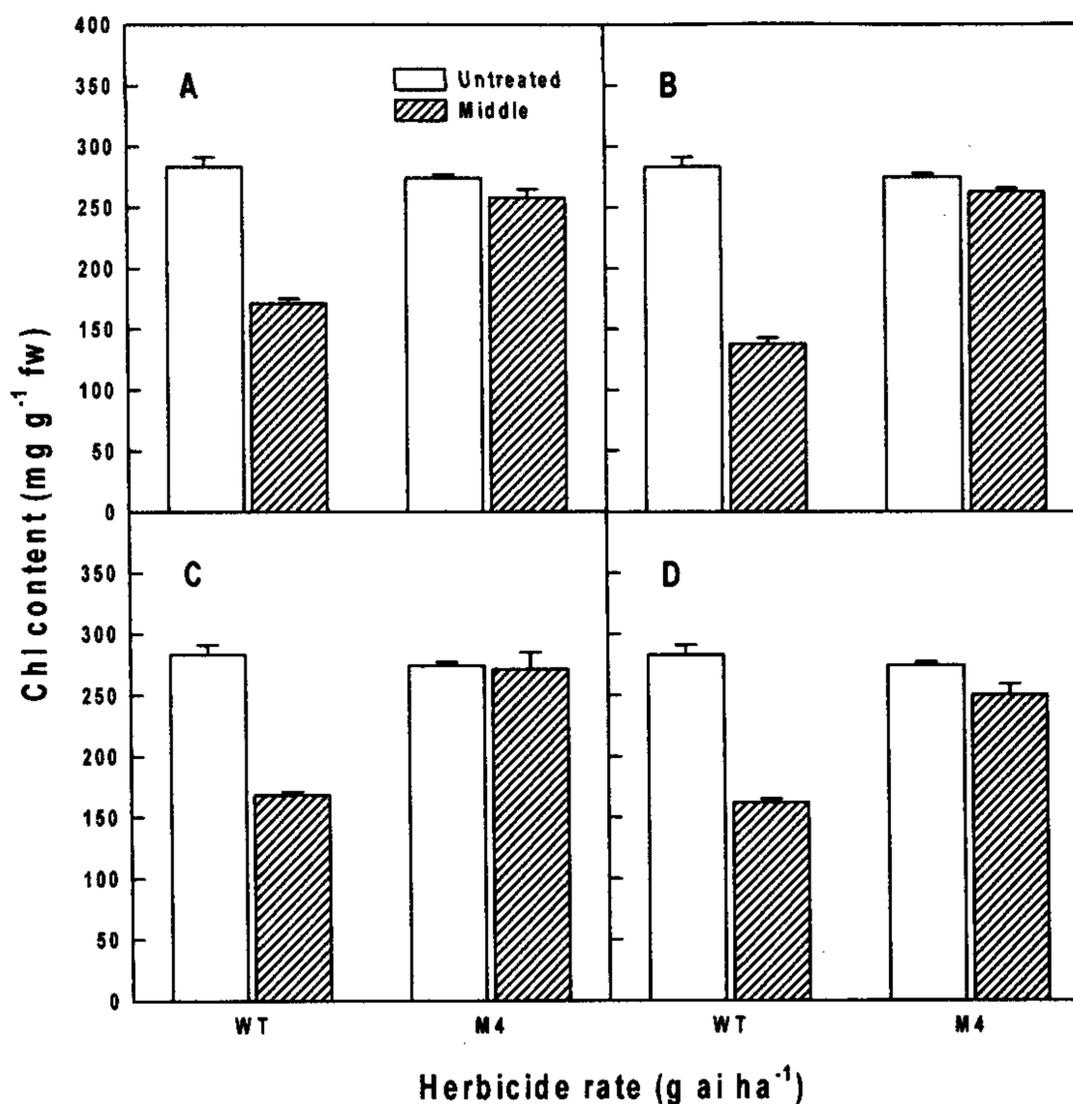
형질전환벼(M4)와 비 형질전환 대조구 벼(WT)의 잎 조직에서 4가지 Protox 저해형 제초제 처리에 따른 지질과산화 작용의 지표로 MDA 생성량을 조사 하였는데, 이 또한 엽록소 함량의 감소와 비슷한 경향이였다(그림 3-33).

**Table 8.** Yield and yield components of the wild-type and the transgenic rice plants of T<sub>5</sub> (2005) generation.

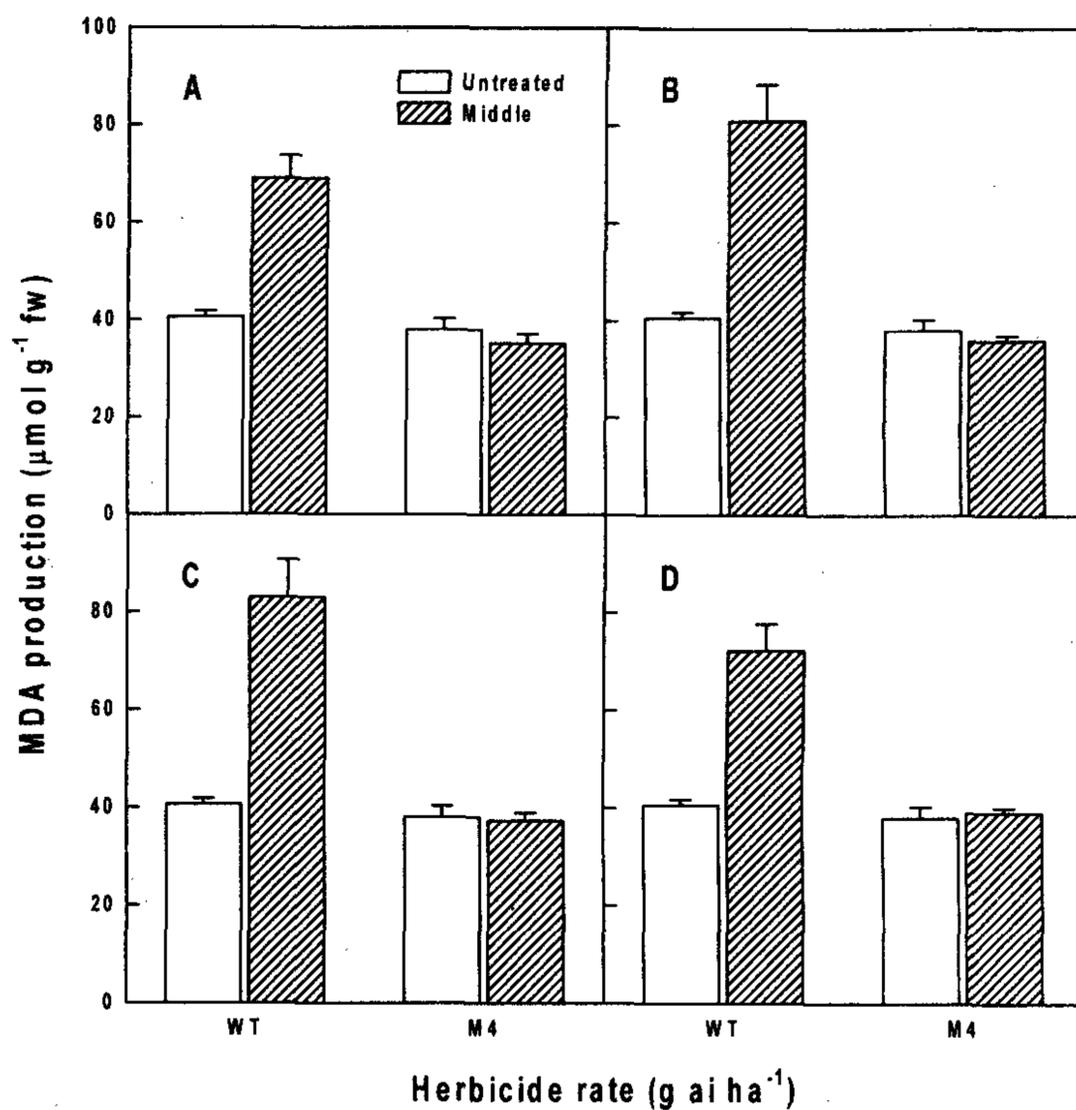
Line <sup>a</sup>	Panicle length (cm)	Panicles per Plant	Spikelets per Panicle	Ripened grain (%)	1000 grain (g)	Yield <sup>b</sup> (kg 10a <sup>-1</sup> )	Yield Index
WT	21.4	11.9	85.8	91.7	24.6	671a	100
TC	21.0	11.8	86.7	89.6	24.6	674a	100
M4	20.0	13.1	82.7	90.3	21.8	622b	93

<sup>a</sup>WT, wild-type rice plants (cv. Dongjin); TC, transgenic control; M4, dual-targeted transgenic lines (chloroplast and plastid targeted).

<sup>b</sup>Means within columns followed by the same letter were not significantly different at the 5% level according to the LSD test.



**Fig. 3-32.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on Chl content from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and Chl content was determined at 6 days after treatment. Each data point is the mean ± SE of three replications.



**Fig. 3-33.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on MDA production from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and MDA concentration was determined at 6 days after treatment. Each data point is the mean ± SE of three replications.

### 3) 항산화 효소의 활성과 isozyme 패턴 분석

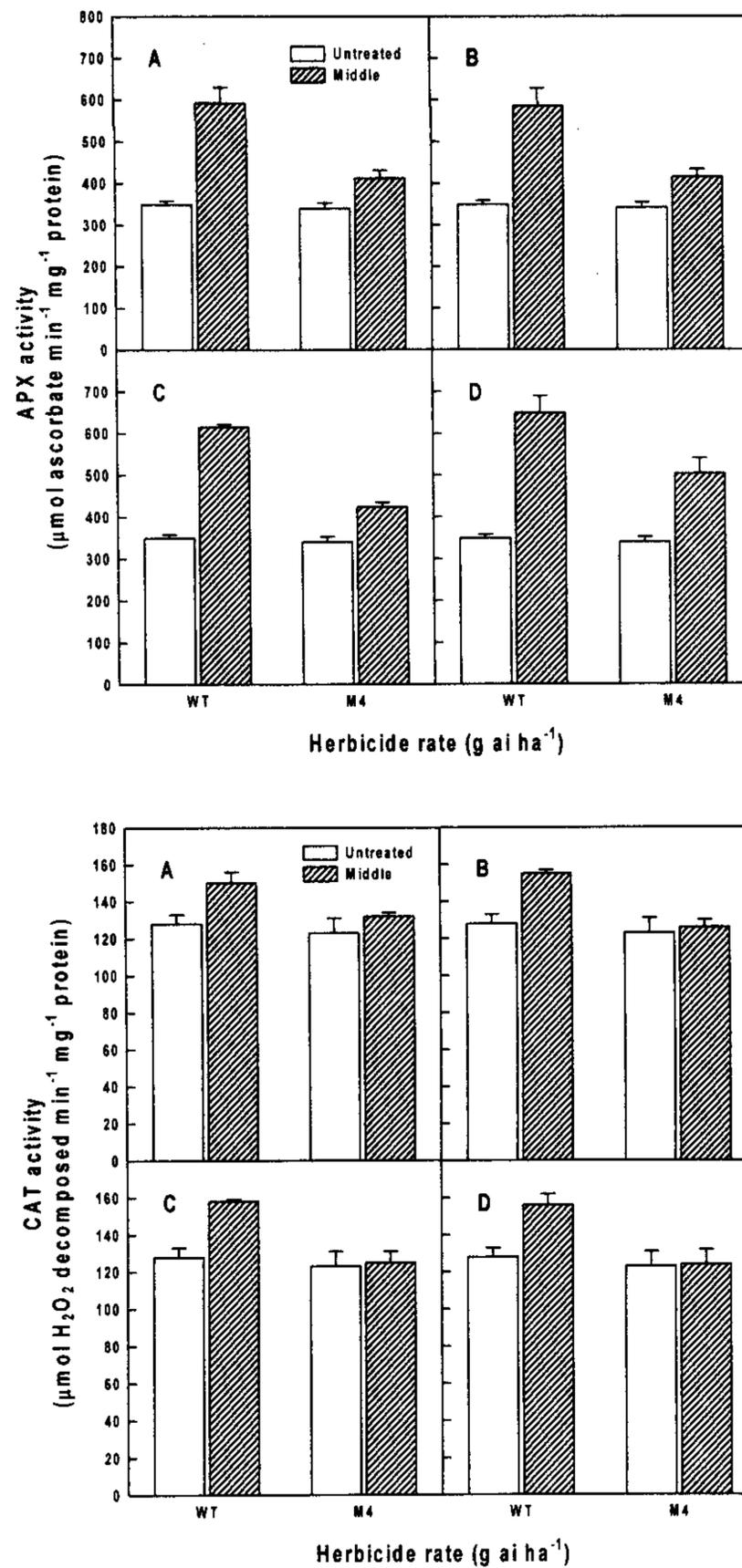
여러 스트레스와 상호 연관성이 확인된 항산화 효소의 활성과 isozyme 패턴을 분석하므로써 형질전환벼(M4)와 비 형질전환 대조구 벼(WT)의 항산화 효소의 관련성 여부를 알아보기 위하여 수행하였다. 총 4가지의 항산화 효소의 활성을 확인한 결과, 4가지 Prottox 저해형 제초제 처리에 의한 영향은 비 형질전환 벼(WT)에서 APX, GR, 그리고 POD 활성이 거의 동일한 경향으로 높게 나타났으며(그림 3-34, 3-35), CAT 활성은 제초제의 영향으로 조금 증가함을 확인할 수 있었다(그림 3-34). 그리고 형질전환 벼(M4)에 있어서는 CAT와 GR 활성에는 무처리와 동일하게 나타났으나 APX와 POD 활성은 다소 이루어짐을 확인할 수 있었다. isozyme 패턴에 있어서, 4가지 항산화효소 모두에서 발현이 높음을 확인할 수 있었으며, 특히 POD와 APX에서 확연하게 차이가 남을 알 수 있었다(그림 3-36, 그림 3-37, 그림 3-38, 그림 3-39). 비 형질전환 벼(WT)에서의 항산화 효소들의 활성과 isozyme 패턴은 4가지 Prottox 저해형 제초제의 처리에 감응하여 그 제초제 스트레스를 이겨내기 위하여 활성을 높이는 반면 형질전환 벼(M4)에선 위의 4가지 제초제 처리가 거의 스트레스로 작용하지 않기 때문에 활성에 변화가 없는 것으로 추측된다.

이상의 엽록소 함량, 세포막 지질과산화작용, 그리고 항산화 효소의 활성과 isozyme 패턴 분석에서 비 형질전환 벼(WT)의 지상부 생체중을 50% 감소시키는 농도로 4가지 Prottox 저해형 제초제를 처리하였을 때, whole-plant response assay 와 정의 상관적으로 저해됨을 확인할 수 있었다.

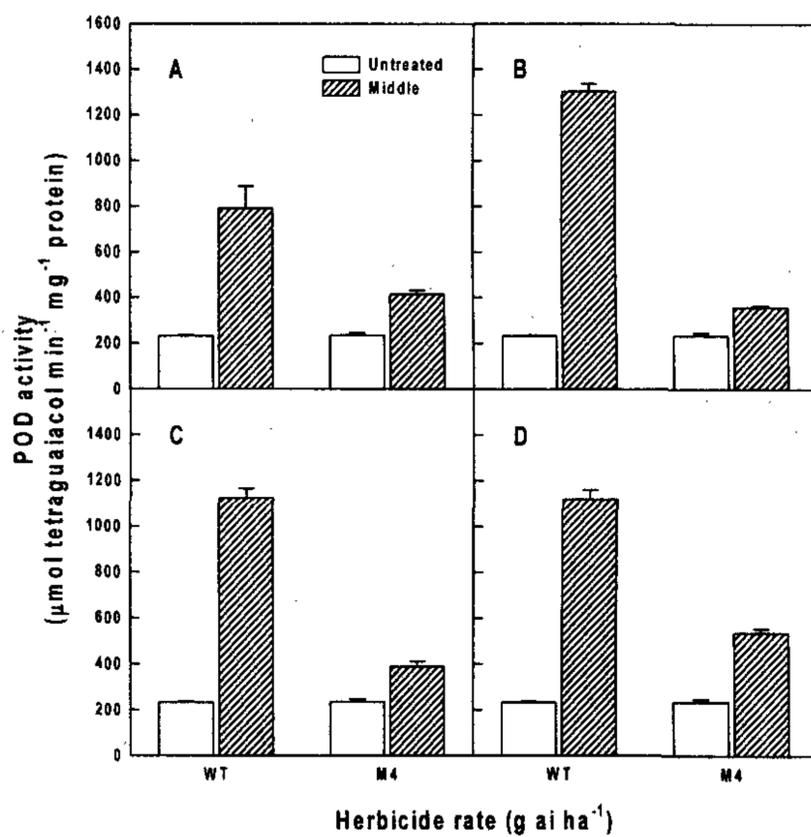
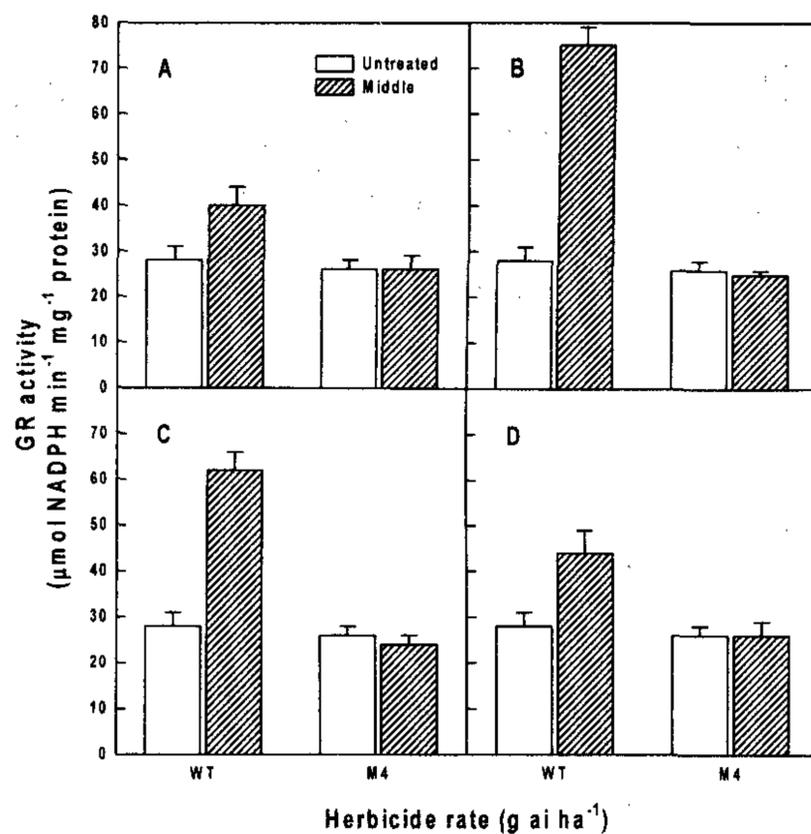
#### 카. T<sub>2</sub> 세대 형질전환 벼(합성 Mx Prottox 발현)의 포장 수량성 검정

형질전환하지 않은 대조구 벼(wild-type rice, WT)와 형질전환벼(transgenic control, TC; transgenic rice, 17계통)의 19계통을 수확기에 수량구성요소를 조사하여 실제포장에서 형질전환 벼의 생산성을 비교하였다. 그 결과 비형질전환 대조구 벼(WT)에 비해 형질전환 벼의 TC와는 수량 및 수량구성요소에 있어 유의성이 없었으나 형질전환 벼 17계통은 각각 수량지수로 95%에서 49%로 약 5-51%의 수량이 감소함을 조사할 수 있었다. 이는 T<sub>2</sub> 세대에서의 수량성이므로 완전히 고정되어있지 않음을 내포하고 있다. 그 수량감소요인으로는 어느 한 요인에 의한

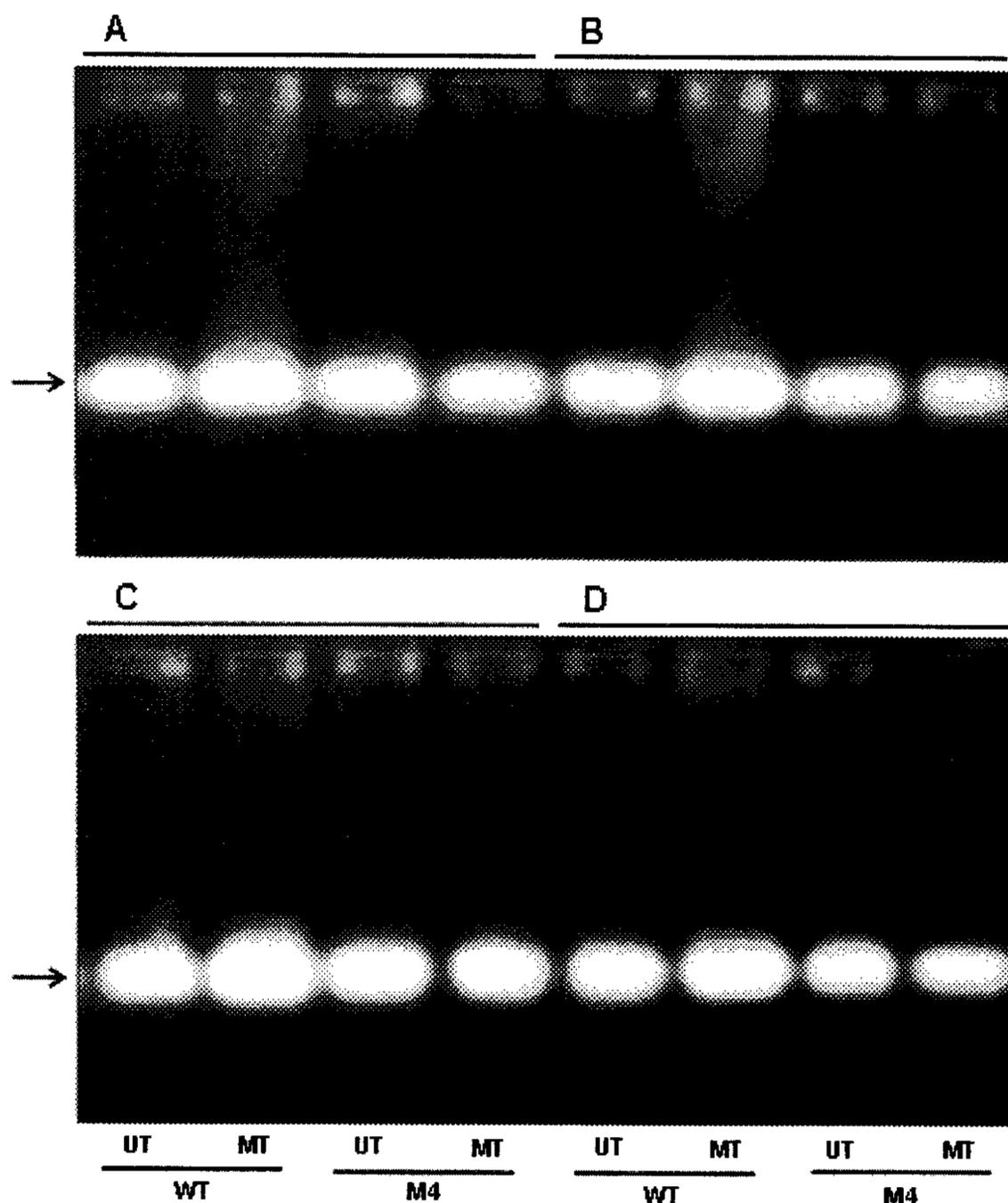
수량감소가 아니라 유효분얼수, 주당이삭수, 및 천립중 모두가 상관되어 있는 것으로 생각되어진다. 반면에 S215 및 S225 계통처럼 비형질전환 대조구 벼(WT)와 수량에 있어 근소한 차이를 보이는 계통도 확인할 수 있었다(표 9). 또한 이삭길이를 측정된 결과, 비형질전환 대조구 벼(WT)가 18.9cm, 형질전환 벼 17계통은 15.6-19.1cm로 변이의 폭이 다소 큼을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 완전히 고정된 계통의 수량성을 비교한 결과가 아님을 의미하며 T<sub>3</sub> 세대 이후의 선발계통의 수량성을 비교함이 옳을 것으로 생각된다.



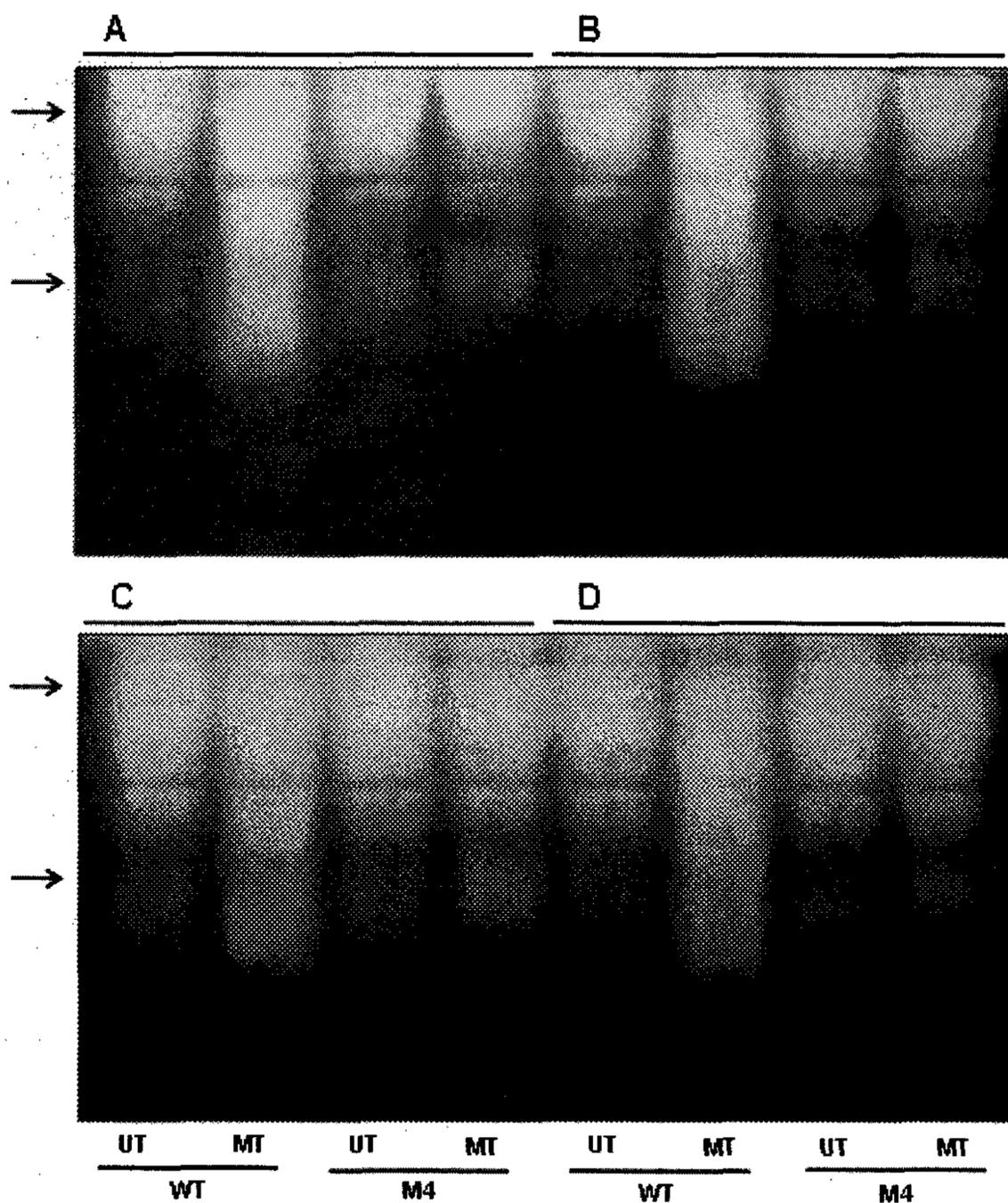
**Fig. 3-34.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on specific activity of APX and CAT from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and specific activity was determined at 6 days after treatment. Each data point is the mean ± SE of three replications.



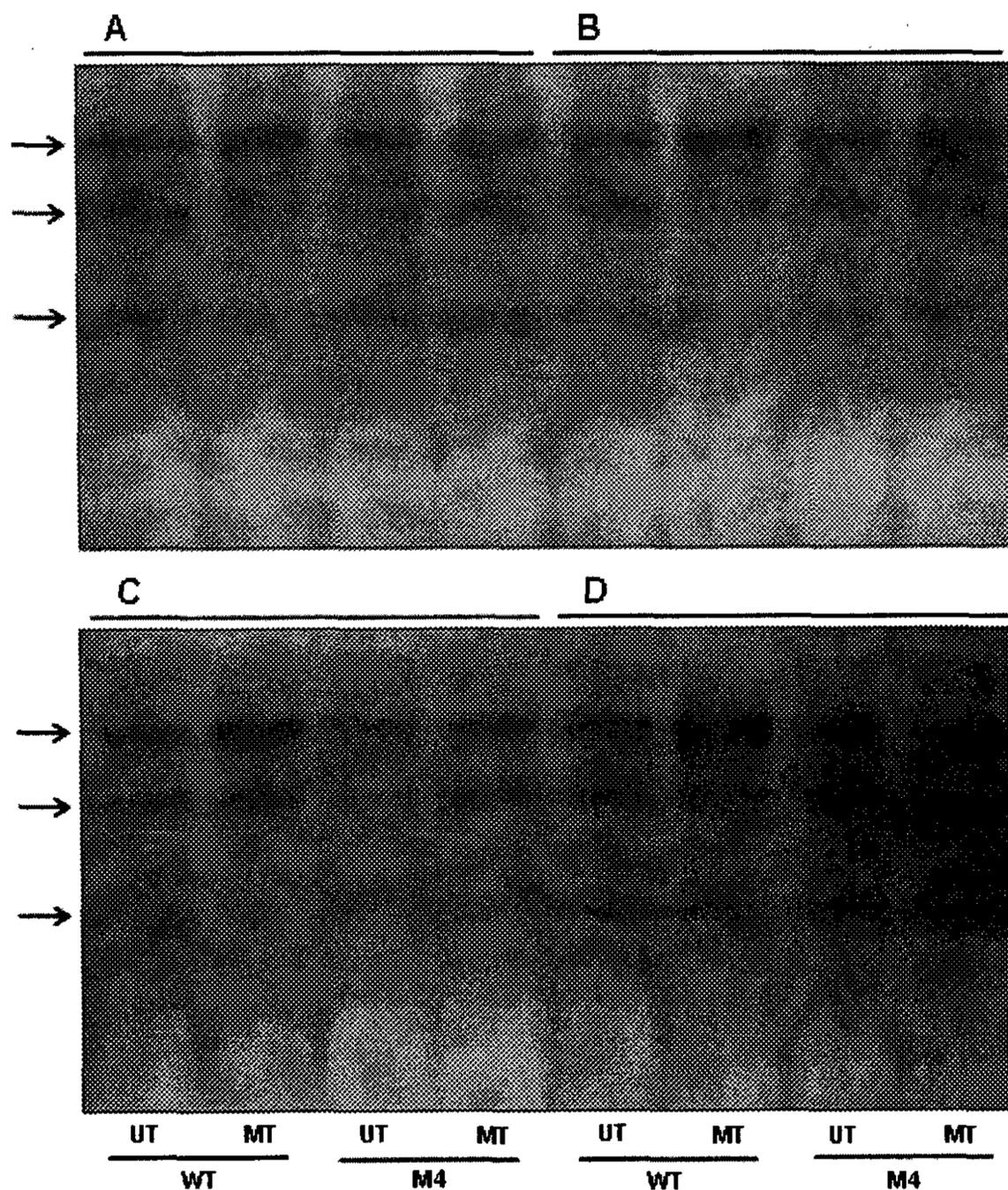
**Fig. 3-35.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on specific activity of GR and POD from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and specific activity was determined at 6 days after treatment. Each data point is the mean ± SE of three replications.



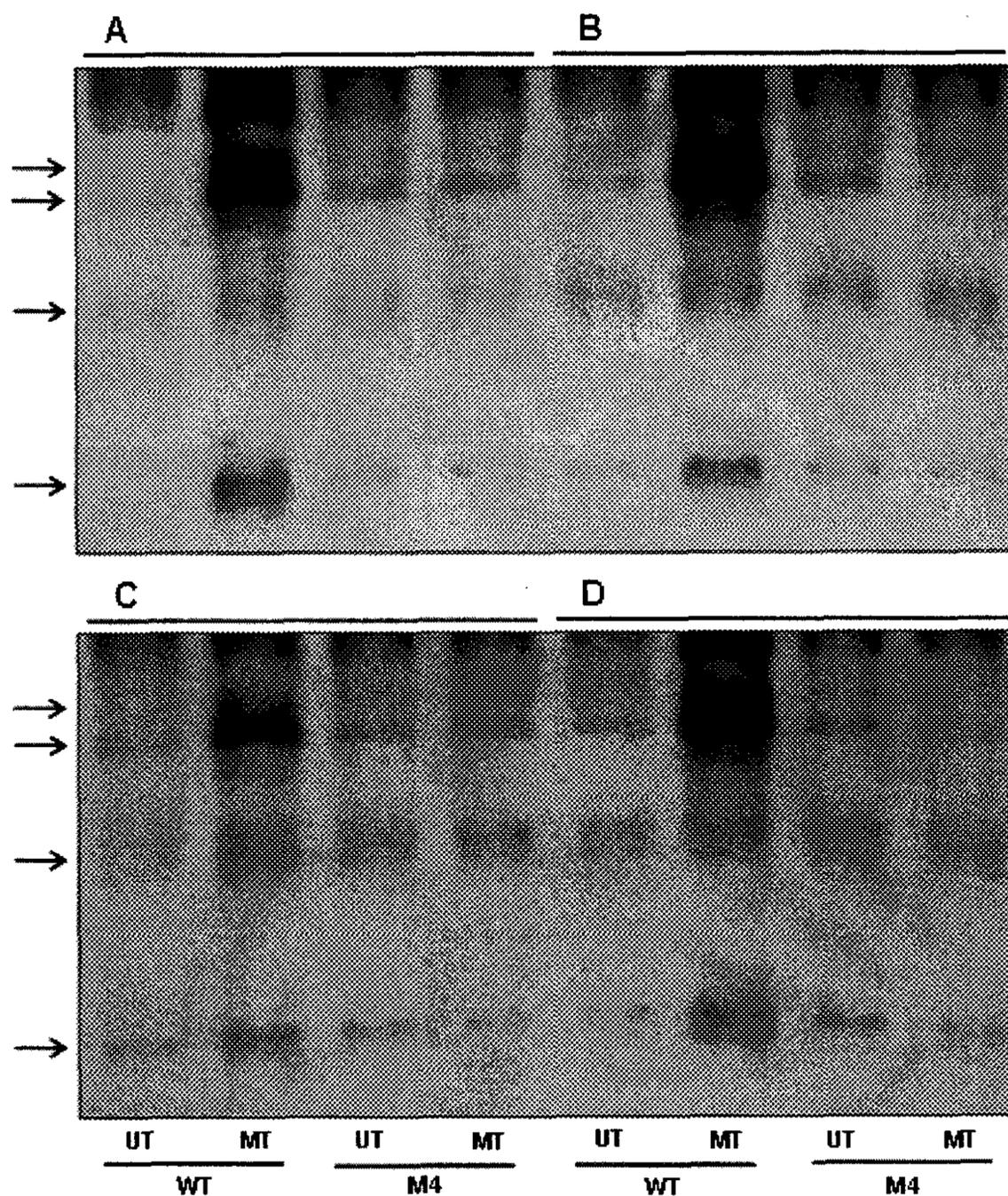
**Fig. 3-36.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on the profiles of APX from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and the APX profiles were determined at 6 days after treatment. Non-denaturing activity gels were prepared and run as described in materials and methods. UT, untreated; MT, middle-treated concentrations.



**Fig. 3-37.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on the profiles of CAT from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and the CAT profiles were determined at 6 days after treatment. Non-denaturing activity gels were prepared and run as described in materials and methods. UT, untreated; MT, middle-treated concentrations.



**Fig. 3-38.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on the profiles of GR from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and the GR profiles were determined at 6 days after treatment. Non-denaturing activity gels were prepared and run as described in materials and methods. UT, untreated; MT, middle-treated concentrations.



**Fig. 3-39.** Effect of acifluorfen (A), oxyfluorfen (B), carfentrazone-ethyl (C), and oxadiazon (D) exposure on the profiles of POD from wild-type (WT) and transgenic (M4) rice plants. The plants were grown at 30/25°C and a 14:10 h day:night period. When the seedlings had reached the three-leaf stage, the plants were treated with formulations of four Protox-inhibiting herbicides, acifluorfen (590 g ai ha<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (50 g ai ha<sup>-1</sup>), carfentrazone-ethyl (850 g ai ha<sup>-1</sup>), and oxadiazon (1270 g ai ha<sup>-1</sup>) by the GR<sub>50</sub> (Middle) concentrations and the POD profiles were determined at 6 days after treatment. Non-denaturing activity gels were prepared and run as described in materials and methods. UT, untreated; MT, middle-treated concentrations.

**Table 9.** Yield and yield components of the transgenic and the wild-type rice plants of T<sub>2</sub> (2005) generation.

Line <sup>a)</sup>	Panicles/ Plant	Spikelets/ Panicle	1,000 grain (g)	Panicle length (cm)	Yield (g/m <sup>2</sup> )	Yield Index
WT	15.2	97	28.3	18.9	912	100
TC	14.2	100	28.6	19.7	914	100
S201	16.4	59	24.6	18.1	527	58
S202	16.6	61	25.9	15.6	574	63
S203	13.0	98	27.3	17.9	762	84
S204	14.9	103	23.2	18.1	784	86
S205	12.3	88	26.1	18.9	621	68
S206	15.9	73	25.0	17.9	641	70
S208	11.0	102	29.0	19.1	712	78
S209	12.3	92	24.3	18.4	605	66
S210	14.1	58	25.1	16.8	450	49
S211	12.0	101	26.2	18.0	702	77
S212	12.8	42	19.8	16.6	235	26
S213	11.6	73	25.8	18.5	478	52
S215	12.8	113	27.1	18.7	862	95
S219	12.3	74	29.9	16.5	595	65
S221	13.4	102	25.0	18.2	757	83
S223	13.5	74	22.8	18.2	500	55
S225	14.5	100	25.8	18.2	824	90

<sup>a)</sup> WT, wild-type rice plants(cv. Dongjin); TC, transgenic control; S201, S202, S203, S204, S205, S206, S208, S209, S210, S211, S212, S213, S215, S219, S221, S223, and S225; transgenic lines.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

구분	연구개발 목표의 달성도	
	평가의 착안점 및 척도 (%)	구체적인 결과 및 관련분야 기술발전 기여도
1차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>M. xanthus</i> 합성 유전자 제조 (50)</li> <li>○ 합성유전자의 대장균 발현 및 항체획득 (30)</li> <li>○ T<sub>2</sub>형질전환체의 제초제 실증실험 (20)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Bridge-ligation 공법을 이용한 1416 bp 길이의 <i>Myxococcus xanthus</i> 유래의 Protoporphyrinogen oxidase (Protox) 유전자를 성공적으로 합성하였다.</li> <li>▶ 합성 유전자가 functional 한지 규명하기 위해, 합성유전자를 대장균에 발현 시켜, 정제된 단백질이 functional 함을 확인하였으며, 정제된 단백질을 통해 polyclonal 항체를 획득 하였다.</li> <li>▶ 합성 Protox 유전자를 binary vector에 구축하여 현재 형질전환체 20여 종이 기내에서 자라고 있으며, 5월 정식 이앙기때 포장 육묘할 예정이다.</li> <li>▶ 천연 Protox 발현 형질전환체의 제초제 저항성 여부를 온실실험을 통해 확인 하였음.</li> </ul>

구분	연구개발 목표의 달성도	
	평가의 착안점 및 척도 (%)	구체적인 결과 및 관련분야 기술발전 기여도
2차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 합성 Protox 유전자 발현 형질전환 체(T<sub>0</sub>) 육성 (30)</li> <li>○ T<sub>0</sub> 형질전환체의 유전자 발현 검정 (12)</li> <li>○ T<sub>0</sub> 형질전환체의 제초제 저항성 leaf disc assay (12)</li> <li>○ T<sub>1</sub> 종자의 제초제 저항성 발아실험 (12)</li> <li>○ T<sub>3</sub> 형질전환체의 제초제 실증실험 (34)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 식물 애기장대 Protox 유전자의 codon usage을 기준으로 합성된 <i>M. xanthus</i> 유래의 Protoporphyrinogen oxidase (Protox) 유전자를 발현하는 형질전환체 25 lines을 육성하였다.</li> <li>▶ 육성된 형질전환체에 합성 Protox 유전자가 삽입되어 있는지를 DNA 및 RNA level에서 확인하였다.</li> <li>▶ 합성 Protox 발현 T<sub>1</sub> 형질전환체의 제초제 저항성 정도를 native Protox 발현 형질전환체(T<sub>3</sub>)와 비교하였다.</li> <li>▶ 합성 Protox 발현 T<sub>1</sub> 형질전환체의 제초제 저항성 정도를 발아실험을 통해 초기 검정하였다.</li> <li>▶ T<sub>3</sub> 형질전환체(natural Protox 발현)의 생육 및 수량 안정성 검정 및 5종이상의 과산화작용제 초제에 대한 제초제 처리 및 안정성 실험을 수행하였다.</li> </ul>

구분	연구개발 목표의 달성도	
	평가의 착안점 및 척도 (%)	구체적인 결과 및 관련분야 기술발전 기여도
3차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 합성 Prottox 발현 T<sub>2</sub> homozygous lines 선발(10%)</li> <li>○ 합성 과 natural Prottox Homozygous lines간의 제초제 저항성 비교 (10%)</li> <li>○ Prottox 단백질의 dual targeting 검정 (10%)</li> <li>○ Mx Prottox 유전자의 선발마커로서의 이용 (30%)</li> <li>○ 제초제 저항성 작물의 적정 제초제 약량과 처리방법 확립 (10%)</li> <li>○ 합성 T<sub>2</sub> lines의 생리적 수량적 특성 조사(10%)</li> <li>○ T<sub>4</sub> 형질전환체의 제초제 실증실험(20%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 합성 Prottox 발현 T<sub>2</sub> homozygous lines 육성</li> <li>▶ Prottox 단백질 발현율과 제초제 저항성 상관관계 규명-GC함량과 단백질 발현율 상관성 있음 제시.</li> <li>▶ 제초제저항성작물의 재배방법 확립.</li> <li>▶ Mx Prottox 유전자를 선발마커로서 이용하여 제초제저항성벼육성 함. 본 제초제저항성벼는 추후 국내기술로 개발된질적형질의 작물로서 농산업에 사용될 수 있음.</li> <li>▶ Mx Prottox을 selectable marker gene 으로 사용할 때 selection agent는 과산화제초제중에서 butafenacil이 가장 적절함을 calli susceptibility test로 증명하였음.</li> <li>▶ Mx Prottox을 selectable marker gene 으로 사용시 부가적인 hygromycin marker 가 필요 없음.</li> <li>▶ Mx Prottox만 발현하는 형질전환체를 육성하였고, Prottox 유전자가 삽입되어 있는지를 DNA 및 RNA level에서 확인하였다.</li> <li>▶ Mx Prottox만 발현하는 형질전환체가 과산화작용제초제에 고도의 저항성을 발휘함을 검정 하였음.</li> <li>▶ T<sub>4</sub> 형질전환체(natural Prottox 발현)의 생육 및 수량 안정성 검정 및 5종이상의 과산화작용제초제에 대한 제초제 처리 및 안정성 실험을 수행하였다.</li> </ul>

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 연구 성과

과산화작용제초제의 표적 효소로 알려진 Prottox에 관한 생리적, 생화학적 연구가 광범위하게 이루어졌음에도 불구하고 이들 연구 결과들이 농업 분야에 실질적으로 이용되지 못하였다. 그러나 본 연구진에 의하여 개발된 *M. xanthus* Prottox를 이용한 제초제 저항성벼는 과산화작용제초제에 모두 적용될 수 있으므로, 응용범위는 매우 넓은 것으로 판단된다. 본 연구과제로 통해 성취한 기술적인 중요성으로서, *M. xanthus* Prottox 유전자를 이용한 제초제 저항성 작물 육성 할 수 있다는 최초의 과학적 발견이라는 점과, Prottox의 dual targeting은 과산화작용제초제 저항성작물육성의 관건이라는 새로운 paradigm을 제시하였다. 합성 *M. xanthus* Prottox가 native Prottox보다 작물에 더 안정적이고 보다 높은 제초제에 저항성을 부여함으로써, 추후 합성 유전자를 표적효소로 보다 넓게 사용할 수 있으며, *M. xanthus* Prottox 발현 형질전환벼가 한국의 벼작부체계와 병행하여 사용할 수 있는 기술적인 자료를 제공하였으며, 특히 제초활성이 높아 생육전기간에 사용할 수 없는 과산화작용제초제의 사용범위를 확대 할 수 있으며, 합성 Prottox를 이용한 초강력 제초제 저항성벼 육성은 벼 외의 다른 작물로 제초제저항성작물육성의 중요 유전자로 응용되게 될 것이며, Prottox 유전자를 형질전환작물육성을 위한 selection marker로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

본 과제로 통해 이룩한 논문 및 특허 실적은 아래와 같다.

가. 대한민국 특허등록 1건: 본 연구의 1-2년차 연구로 통해 *Myxococcus xanthus* 유래의 Prottox 유전자 (1416 bp)를 완전히 합성하였으며, 합성된 Prottox 유전자는 native form 의 아미노산 서열과 일치하도록 하였다. 본 합성 유전자가 발현된 형질전환체가 육성되고, 제초제저항성을 규명하였고, 합성유전자의 상업적이용 가능성을 위해 특허를 국내에 출원하여 등록하였다.

1. 합성 프로토포르피리노젠 옥시다아제 유전자 및 이를 이용한 식물의 제초제

저항성 증대방법 (2006. 03. 03) 발명자: 백경환, 양기웅, 출원인: 전남대학교,  
대한민국특허등록번호: 제 10-0559155 호

나. 국제 SCI 논문게제 2건: 합성 유전자를 이용한 형질전환벼의 제초제 저항성  
에 대한 연구결과를 논문을 국제 SCI 저널인 Pesticide Biochemistry and  
Physiology 에 in press 중이며, *Mx Protox* 유전자의 dual targeting에 대한  
논문도 Pesticide Biochemistry and Physiology에 in press 중이다.

1. Jung S, Lee Y, Back K (2006) A tobacco plastidal transit sequence can  
not override the dual targeting capacity of *Myxococcus xanthus* proto-  
protoporphyrinogen oxidase in transgenic rice. Pesticide Biochemistry and  
Physiology 86(3) In press.
2. Yang K, S Jung, Lee Y, Back K (2006) Modifying *Myxococcus xanthus*  
protoporphyrinogen oxidase to plant codon usage and high level of  
oxyfluorfen resistance in transgenic rice. Pesticide Biochemistry and  
Physiology 86(3) In press.

다. 국제 SCI 논문제출 1건: *Mx Protox* 유전자를 selectable marker 유전자로  
이용하는 연구 결과도 Pesticide Biochemistry and Physiology에 2006. 06. 02  
에 투고하여 심사 중이다.

1. Lee K, Yang K, Lee N, Back K. Use of *Myxococcus xanthus*  
protoporphyrinogen oxidase as a selectable marker for transformation of  
rice. Pesticide Biochemistry and Physiology (submitted)

## 제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구 결과에서 얻어진 제초제 저항성 형질전환벼는, 고도의 선택성을 나타내  
는 과산화작용제초제의 사용범위를 확대하며, 극소량의 제초제를 약해 없이 안전

하고 쉽게 사용하여 최대의 제초 효과를 거둘 수 있다. 따라서, 작물 경작에 대한 비용을 경감할 수 있고 제초제 사용에 따른 작물 약해 및 환경 오염도를 줄일 수 있다. 또한 본 연구진이 개발한 *Mx Protox* 유전자에 대한 저항성 기작에 대한 특허권을 가지고 있음으로, 국내 순수기술로 제초제저항성작물을 육성하는 원천기술을 가지게 되었다. 이와 같은 공로를 인정받아 본 연구진이 개발한 합성 *Mx Protox* 유전자를 발현하는 형질전환벼는 작물유전체사업단에서 “형질전환 작물의 인체위해성(식품안전성) 및 환경위해성 평가(생명공학연구소, 책임자 김환묵 박사)” 대상 작목으로 선정되어 인체위해성 및 환경위해성 연구가 현재 진행 중이다.

#### 가. 작물유전체사업단에서 본 연구진이 개발한 합성 *Mx Protox* 유전자 발현 형질전환벼를 형질전환작물개발 등록을 위한 모델작물로 선정(2004-2007)

국내에서 개발된 많은 형질전환작물 중에서 본 연구진이 개발한 합성 *Mx Protox* 발현 제초제저항성 벼가 형질전환 작물의 인체위해성(식품안전성) 및 환경위해성 평가(생명공학연구소, 김환묵 박사)” 대상 작목으로 선정되어 현재 한국생명공학연구원에서 인체위해성 및 환경위해성 검정연구가 진행되고 있다. 고추와 다른 형질의 형질전환벼와 함께 인체위해성 및 환경위해성 검정연구가 진행되고 있지만 본 연구진이 개발한 형질전환벼가 가장 무난하고 결과가 좋은 것으로 알고 있다. 우선 환경 위해성 평가 결과를 “**Competitiveness of transgenic herbicide tolerant rice expressing protoporphyrinogen oxidase**”란 제목으로 8월 생물과학협회에 Poster를 발표 할 예정이다.

#### 나. 국내 원천기술로 개발된 최초의 형질전환작물 종자로 등록 될 가능성 있음.

형질전환작물의 품종등록 및 산업화의 첫 걸음이 인체위해성 및 환경위해성 같은 형질전환체의 유전자특성 평가가 이루어지면, 품종등록을 위한 단계로 진입하게 될 것이다. 그 후 본 형질전환벼의 생육특성, 지역적응성 등의 작물학적 특성이 검토되어서 실제적으로 농가에 보급되어 산업화에 활용될 수 있는지에 대한 검정작업이 이루어지게 될 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 가. 2003년: 과산화작용 제초제저항성 애기장대 Protox 제조 및 이를 이용한 형질전환옥수수 육성

Syngenta 그룹의 Li et al. (2003) 등이 애기장대에서 Protox 유전자를 클로닝하고, 과산화작용제초제에 저항성인 mutant Protox(Y426M + S305C) 효소를 제조하였다. 이 double mutant Protox 유전자를 selectable marker gene 으로 이용하여, Agrobacterium 매개 형질전환법을 이용하여 과산화작용제초제에 저항성인 옥수수를 개발하였다. 형질전환된 옥수수 세포주 선발은 과산화작용제초제중에서 butafenacil을 빛의 유무에 따라 사용하였고, 광활성제초제의 특성상 빛의 존재 하에서 형질전환 선발율이 증대됨을 보고하였다. Butafenacil 선발이 다른 selectable marker system을 사용한 것과 비교해 볼 때 copy number 의 차이는 없었다. 온실에서 선발된 형질전환옥수수 중에서 최고의 저항성을 보이는 line 은 다수의 mutant Protox 가 삽입되었다. 애기장대 유래의 double mutant Protox 유전자를 selectable marker gene 으로 그리고 butafenacil을 selection agent 로 이용하는 system을 이용하여 손쉽게 형질전환옥수수를 육성할 수 있음을 제시하였다.

### 나. 2005년: 과산화작용제초제 저항성 작물개발 review

Syngenta 그룹의 Li & Nicholl(2005) 등은 Protox 효소를 저해하는 제초제에 저항성인 식물세포주 배양과 작물개발에 대한 review 논문을 발표하였다. 과산화작용제초제에 대한 저항성작물은 애기장대의 double mutant Protox 에 의해 선발되어질 수 있고, 다른 source의 Protox 유전자 예를 들어 *Bacillus subtilis* Protox, *Myxococcus xanthus* Protox, protoporphyrin IX 결합 단백질 및 P-450 계통의 유전자의 발현을 통해서도 성취되어 질 수 있음을 제시 보고하였다.

#### 다. 2005년: 형질전환제초제 저항성 작물의 현황과 미래

미국 농무성 연구원인 Duke et al 그룹(2005)은 형질전환제초제저항성작물의 현황을 review 하면서 대부분의 제초제에 대한 저항성을 부여할 수 있는 transgenes들이 존재함에도 불구하고 현재 전 세계적으로 사용되고 있는 제초제 저항성작물은 glyphosate 와 glufosinate 제초제 두 개 뿐이다. 모두 발아 후 제초제들로서 다른 제초제와는 달리 단일 제초제로 시판되고 있는 것 들이다. 다른 제초제는 같은 계통의 제초제에 다수의 제초제에 저항성을 보임으로 형질전환작물 개발로 통한 이익환수가 용이하지 못함에 따른 개발이익이 낮은 점이 문제가 되고 있으며, 형질전환작물 개발의 막대한 비용, 개발 년수 및 높은 economic risk 등이 glyphosate 및 glufosinate 제초제 이외의 저항성작물이 개발 및 사용되기에는 당분간 어려울 것으로 전망 하였다.

## 제 7 장 참고문헌

- Buege JA, Aust SD** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR** (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyles of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1257.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chen GX, Asada K** (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Choi KW, Han O, Lee HJ, Yun YC, Moon YH, Kim M, Kuk YI, Han SU, Guh JO** (1998) Generation of resistance to the diphenylether herbicide, oxyfluorfen, via expression of the *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in transgenic tobacco plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 558-560.
- Dailey HA, Dailey TA** (1996) Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*: expression, purification and characterization of the cloned enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 8714-8718.
- Donohue MJO, Gousseau H, Huet JC, Tepfer D, Pernollet JC** (1995) Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding  $\beta$ -cryptogen, an elicitor produced by *Phytophthora crypogea*. *Plant Mol. Biology* 27, 577-586.
- Duke SO, Cerdeira AL** (2005) Transgenic herbicide-resistant crops. *Outlooks on Pest Management* 208-211.

- Duke SO, Lydon J, Becerril JM, Sherman TD, Lehen LP, Matsumoto H** (1991) Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39, 465-473.
- Frear DS, Swanson HR, Mansager ER** (1983) Acifluorfen metabolism in soybean : diphenyl ether bond cleavage and the formation of homo-glutathione, cysteine, and glucose conjugates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20, 299-310.
- Ha SB, Lee SB, Lee DE, Guh JO, Back K** (2003) Transgenic rice plants expressing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene show low herbicide oxyfluorfen resistance. *Biol. Plant.* 47, 277-280.
- Ha SB, Lee SB, Lee Y, Yang K, Lee N, Jang SM, Chung JS, Jung S, Kim YS, Wi SG, Back K** (2004) The plastidic *Arabidopsis* protoporphyrinogen IX oxidase gene, with or without the transit sequence, confers resistance to the diphenyl ether herbicide in rice. *Plant Cell Environ.* 27, 79-88.
- Hiscox JD, Israelstam GF** (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration. *Can J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Huang J, Sutliff TD, Wu L, Nandi S, Bengtson K, Terashima M, Ralston AH, Drohan W, Huang N, Rodriguez RL** (2001) Expression and purification of functional human  $\alpha$ -1-antitrypsin from cultured plant cells. *Biotechnol. Prog.* 17, 126-133.
- Jacobs JM, Jacobs NJ, Sherman TD, Duke SO** (1991) Effects of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiol.* 97, 197-203.
- Jang SM, Ishihara A, Back K** (2004) Production of coumaroylserotonin and feruloylserotonin in transgenic rice expressing pepper hydroxycinnamoyl-CoA:serotonin N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *Plant Physiol.* 135, 346-356.
- Jensen LG, Olsen O, Kops O, Wolf N, Thomsen KK von Wettstein D**

- (1996) Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)- $\alpha$ -glucanase during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3487-3491.
- Jung S, Lee Y, Yang K, Lee SB, Jang SM, Ha SB, Back K** (2004) Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level of oxyfluorfen resistance. *Plant Cell Environ.* 27, 1436-1446.
- Lee HJ** (1997) Mechanism of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides and their selectivity. *Kor. J. Weed Sci.* 17, 243-255.
- Lee HJ, Duke MV, Duke SO** (1993) Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiol.* 102, 881-889.
- Lee, HJ, Lee SB, Chung JS, Han SU, Han O, Guh JO, Jeon JS, An G, Back K** (2000) Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. *Plant Cell Physiol.* 41, 743-749.
- Lemontova I, Kruse E, Mock HP, Grimm B** (1997) Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8895-8900.
- Lemontova I and Grimm B** (2000) Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. *Plant Physiol.* 122, 75-83.
- Li X, Volrath SL, Nicholl DBG, Chilcott CE, Johnson MA, Ward ER, Law MD** (2003) Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize. *Plant Physiol.* 133, 736-747.
- Li X, Nicholl D** (2005) Development of PPO inhibitor-resistant cultures and crops. *Pest Manag. Sci.* 61, 277-285.
- Mathis JR, Back K, Starks C, Noel J, Poulter CD, Chappell J** (1997)

Pre-steady-state study of recombinant sesquiterpene cyclases. *Biochemistry* 36, 8340-8348.

**Matringe M, Camadro JM, Labbe P, Scalla R** (1989) Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260, 231-235.

**Miligan AS, Daly A, Parry MAJ, Lazzeri PA, Jepson I** (2001) The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicidetolerance, both in planta and in vitro. *Molecular Breeding* 7, 301-315.

**Mishra NP, Mishra RK, Singhal GS** (1993) Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves of strong visible light at different temperature in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* 102, 903-910.

**Murray E, Lotzer J, Eberle M** (1989) Codon usage in plant genes. *Nuc. Acids Res.* 17, 477-498.

**Nandihalli UB, Duke MV, Duke SO** (1992) Relationships between molecular properties and biological activities of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1993-2000.

**Narita S, Tanaka R, Ito T, Okada K, Taketani S, Inokuchi H** (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 182, 169-175.

**Randolph-Anderson BL, Sato R, Johnson AM, Harris EH, Hauser CR, Oeda K, Ishige F, Nishio S, Gillham NW, Boynton JE** (1998) Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* conferring resistant to porphyrin herbicides. *Plant Mol. Biology* 38, 839-859.

**Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.

**Rudhe C, Chew O, Whelan J, Glaser E** (2002) A novel *in vitro* system for

simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant Journal* 30, 213-220.

**Scalla R and Matringe R** (1994) Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase as herbicides: diphenyl ethers and related photobleaching molecules. *Rec. Weed Sci.* 6, 103-132.

**Strizhov N, Keller M, Mathur J, Koncz-Kalman Z, Bosch D, Prudovsky E, Schell J, Sneh B, Koncz C and Zilberstein A** (1996) A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* endotoxin, confers Spodoptera resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15012-15017.

**Volrath SL, Johnson MA, Ward ER, Heifetz PB** (1997) DNA molecules encoding plant protoporphyrinogen oxidase and inhibitor-resistant mutants thereof. US patent 5939602.

**Warabi E, Usui K, Matsumoto H** (2002) Differential accumulation of protoporphyrin IX between oxyfluorfen resistant and non-resistant soybean cell lines. *J. Pesticide Sci.* 27, 106-110.

**Watanabe N, Che FS, Iwano M, Takayama S, Nakano T, Yoshida S, Isogai A** (1998) Molecular characterization of photomixotrophic tobacco cells resistant to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 118, 751-758.