

최        종  
연구보고서

내하고성 목초의 개발

Development of a forage plant tolerant to  
summer depression

경상대학교 대학원 응용생명과학부  
축산연구소

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “내하고성 목초의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 5 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 손 대 영

협동연구기관명 : 축산연구소

협동연구책임자 : 박 근 제

# 요 약 문

## I. 제 목

### 내하고성 목초의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라에 도입된 대부분의 목초는 생육적온이 15~21℃의 북방형 목초들로서 봄에 기온이 5℃ 이상으로 올라가면 자라기 시작하여, 20℃ 내외가 되는 5월과 6월에 생육이 가장 왕성하게 되고, 25℃ 이상이 되는 7월과 8월에는 생육이 거의 중지하는 하고기(summer depression)를 맞게 된다. 하고현상에 의하여 생산량은 저하하게 되고, 초지의 나지화(裸地化)가 촉진되며 잡초의 침입에 의하여 부실 초지로 변하게 된다. 하고현상에 의한 목초의 수량 감소는 대관령을 비롯한 북부지방에서는 10~12%, 중부지방 21% 그리고 제주지방에서는 20%에 이르렀다. 따라서 우리나라에서 초지를 조성하여 목초를 생산하기 위해서는 내하고성 품종의 개발이 시급하다.

지금까지 목초의 신품종 개량은 교잡육종에 의하여 이루어져왔으며 교잡육종에 의한 품종 개량은 많은 시간과 노력, 그리고 넓은 포장에 요구될 뿐만 아니라 이렇게 고정된 품종의 내성은 한계가 있으므로 보다 강한 내성 품종의 육성을 위해서는 유전공학 기술의 도입이 필요하다.

하고현상을 일으키는 식물들은 내열성 유전자의 발현량이 적은 것이 특징이므로 이들 식물에 내열성 유전자를 도입하게 되면 하고현상이 극복될 것이므로 생산량은 증대될 것이다.

최근 형질전환기법을 이용한 내열성 유전자의 도입에 의한 새로운 식물체의 개발에 대한 연구가 시작되고 있으나 국내에서는 아직 적극적인 연구가 부족한 실정이다. 목초의 내하고성 관련 연구는 유일하게 본 연구팀에 의해서 단편적으로 진행되고 있으며, 내하고성 목초의 개발을 위해서는 좀 더 체계적인 연구가 필요하다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

1. mRNA differential display에 의한 내하고 관련 유전자들의 대량 분리
2. 오차드그라스 cDNA library의 구축 및 full length 유전자의 분리
3. 내하고 관련 유전자들의 구조 결정 및 특성 연구
4. 내하고 관련 유전자들의 형질전환용 vector의 개발
5. 선발된 내하고 관련 유전자들의 애기장대로의 형질전환
6. 오차드그라스의 조직배양 및 재분화 효율증진 조건확립
7. 오차드그라스의 형질전환 기술개발
8. 형질전환 오차드그라스의 제조
9. 형질전환 오차드그라스의 고온내성 검증

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 내하고 관련 유전자들의 분리 및 특성 연구

내하고 관련 유전자를 분리하기 위하여 고온 처리한 오차드그라스로부터 분리한 RNA로 differential display 실험을 수행하여 고온 처리에 의하여 유도되는 20개의 cDNA 단편을 분리하였다. Northern blot 분석으로 분리한 유전자들의 고온 유도 발현 여부를 조사한 다음, full length 유전자를 screening하였다. Sequencing 결과, 선발된 각각의 내하고 관련 유전자들은 *Hsp101*, *Hsp90*, *Hsp70*, *small Hsp* 등의 Hsp family homolog들, *Aha* (activator of hsp90 Atpase), *Hop* (Hsp90/Hsp70 organizing protein), *p23*과 같은 Hsp90 machinery의 cochaperone homolog들, 그리고 *Sti* (stress inducible protein)와 *carbonic anhydrase*의 homolog들인 것으로 밝혀졌다. 고온 처리 외에도 여러 가지 스트레스에 대한 발현량의 변화와, 각각의 단백질에 대한 샤페론 기능을 조사하였으며, 식물체 내에서의 기능을 연구하고자 애기장대에 형질전환시켰다. 본 연구에서 분리된 유전자들은 아직까지 식물체에서 완전하게 밝혀지지 않은 Hsp90 샤페론 기구를 해석하는 중요한 재료가 될 것이다. 특히 p23의 경우, 동물에서는 Hsp90의 cochaperone으로 변성된 단백질의 응집을 막는 역할을 한다는 보고는 있으나 그 기능에 대해서는 명확히 밝혀지지 않고 있으며 아직까지 식물체에서는 보고가 되지 않고 있다. 식물의 Hsp90 샤페론 시스템에서의 p23의 역할과 기능의 구명은

식물이 어떻게 고온 스트레스를 감지하고 또 어떤 방법으로 그 신호를 전달하는가를 이해하는데 크게 기여 할 수 있을 것이다.

## 2. 식물체 재분화 및 형질전환기술 개발

국내에 도입된 오차드그라스 27 품종과 국내 합성 품종인 Hapsung 2, Jangbeol 101, Jangbeol 102의 종자로부터 캘러스를 형성시켜 재분화 실험을 실시한 결과 Potomac의 재분화 효율이 가장 높은 것으로 나타났다.

오차드그라스의 형질전환 효율은 품종에 따라 매우 다르게 나타났는데, 'Potomac' 품종은 12%의 형질전환 효율을 나타낸 반면, 'Amba' 품종은 5.5%에 그쳤다. Co-cultivation 과정에서의 acetosyringone의 첨가는 형질전환 효율을 크게 높이는 것으로 나타났다.

## 3. 형질전환 오차드그라스 생산 및 확인

내하고성 오차드그라스를 개발하기 위하여, *Dgp23*, *DgAha*, *DgSti*, 그리고 *DgHSP17.8*의 4종의 유전자를 pCAMBIA1300PT 벡터에 재조합한 후, *A. tumefaciens* GV3101에 감염시켜 오차드그라스에 형질전환시켰다. 오차드그라스의 배반조직으로부터 유도한 캘러스를 *Agrobacterium* 현탁액에 감염시킨 다음, hygromycin이 첨가된 N6 선발배지에서 형질전환된 callus를 선발, 재분화 과정을 거쳐 생산된 형질전환 오차드그라스는, 형질전환되지 않은 식물체와 형태적인 차이를 보이지는 않았다. 형질전환체로부터 genomic DNA 및 total RNA를 분리하여 Southern 및 Northern 분석을 실시한 결과, *Dgp23*과 *DgHsp17.8*는 각각 오차드그라스의 chromosome내로 정확히 도입되어 정상적으로 발현되었다.

## 4. 형질전환 오차드그라스의 고온내성 검정

오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.)의 치사온도를 결정하기 위하여, Potomac 과 Jangbeol 102의 종자를 petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식, 성장실에서 4주간 재배한 다음 재료로 사용하였다. 45°C, 50°C 및 55°C에서 60분간 고온처리를 한 결과 외관상 나타나는 식물체의 손상은 거의 없었다. 60°C에서 30분간 이상 처리했을 때에는 잎의 끝이 마르고 약간 시들었으나 식물체의 손상은 약한 편이었으며, 65°C에서 30분간 처리에서도 심각한 증상은 나타나지 않았다. 70°C에서 30분간 처리했을 때에 오차드그라스는 잎의 중간 정도까지 말랐으며, 60분간 처리했을 때에는 지

상부의 잎이 2/3 이상 마른 상태였다.

*DgHsp17.8* 유전자를 도입한 형질전환 식물체의 leaf disc를 60℃에서 50분간 열처리한 결과, 대조구 식물체의 잎 조직은 갈변되는 괴사현상을 나타내었으나, 형질전환 식물체는 60~80%의 내성을 보였다. 이는 *DgHsp17.8* 유전자의 도입이 오차드그라스에 내하고성을 부여하였기 때문으로 생각된다.

##### 5. 활용에 대한 건의

가) 식물의 고온 적응 기작을 기초 생화학적, 생리적 측면의 연구를 통하여 식물의 고온내성 기작을 연구함으로써 고온내성 작물 개발의 기초 기술이 된다.

나) 내하고 관련 유전자의 확보와 이 유전자들을 도입한 작물의 개발을 통해 종자 시장에서 부가가치가 높은 상품을 만들 수 있게 될 것이다.

다) 고온 내성을 갖는 형질 전환 농작물과 원예작물을 만들 수 있도록 유전자를 제공한다.

라) 본 연구에서 오차드그라스의 형질전환체계를 확립하여 다른 유전자 즉 제초제내성, 내병성 등의 유용유전자의 도입이 가능하게 되므로 우수한 형질을 가지는 오차드그라스의 개발이 가능하다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) is one of the most important perennial grass grown in Korea. It is quite vigorous in growth, rapid in establishment and rapid recover after cutting or grazing, but susceptible to heat stress. In order to develop orchardgrass tolerant to summer depression we tried to clone genes essential in heat resistance and establish an efficient transformation technique. The results obtained are summarized as follows:

#### 1. Molecular cloning and characterization of heat inducible genes

To screen various kinds of heat inducible genes from orchardgrass, we carried out mRNA differential display. Twenty partial cDNA fragments showing differential expression pattern were isolated. Among these, homologs of *Hsp101*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Sti*, *Hop*, *Aha*, *p23*, *sHsp17.9*, *sHsp17.8* and *carbonic anhydrase* were identified. Northern blot analyses confirmed that the expression of these genes were induced by heat treatment. To investigate the function of these genes, we have developed transgenic Arabidopsis that show constitutive expression of the *DgSti* and *DgAha*, respectively. Results from this study will contribute to understanding the mechanism of heat stress signaling pathway in plants and to producing transgenic plants resistant to heat stress.

#### 2. Development of plant regeneration and transformation technique of orchardgrass

To develop the techniques for plant regeneration and transformation, seed-derived calli were used. Potomac has the highest plant regeneration efficiency among 27 orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties imported and three varieties developed in Korea (Hapsung 2, Jangbeol 101 and Jangbeol 102).

The efficiency of transformation was differed from cultivar to cultivar, that is,

Potomac appeared 12% of transformation efficiency while Amba did 5.5%. The addition of acetosyringone during co-cultivation was a key to successful transformation of orchardgrass.

### 3. Production and confirmation of transgenic orchardgrass plants

To develop transgenic orchardgrass resistant to high temperature, the pCAMBIA1300PT vector with the *Dgp23*, *DgAha1*, *DgSti1* or *DgHsp17.8* isolated from orchardgrass were constructed under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter and were introduced into orchardgrass using *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Transgenic plants from hygromycin-selected calli of orchardgrass did not show any morphological difference from wild-type plants. Integration of each gene was confirmed by PCR and Southern blot analyses with genomic DNA. Northern blot analyses revealed that the *Dgp23* and the *DgHsp17.8* were constitutively expressed.

### 4. Thermotolerance test of transgenic orchardgrass plants

To determine lethal temperature of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Potomac and Janbeol 102) seedlings grown in a small pots for 4 weeks were treated at 45°C, 50°C or 55°C for 1 h, respectively. Heat treatments at 60°C and 65°C for 1 h, several plants were withered and showed damage symptom on their leaves. When the plants were exposed to 70°C for 1 h, most of leaves were severely withered, but it was not lethal conditions for the whole plants.

When the leaf discs of transgenic orchardgrass plants with *DgHsp17.8* gene were exposed to 60°C for 50 min, 60~80% of the transgenic plants were survived compare to non-transgenic plants. This result suggest that the *DgHsp17.8* introduced to orchardgrass plant acts as a protector from heat stress in plants.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Part 1 Outline of Research Program.....	10
Part 2 Current Status of This Research Program.....	17
Part 3 Results and Contents.....	19
Part 4. Accomplishment and Major Contribution.....	94
Part 5. Utility of This Research.....	96
Part 6 Information Obtained Oversea during Research.....	98
Part 7 References.....	100

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	10
제 2 장	국내의 기술개발 현황.....	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	19
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	94
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	96
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	98
제 7 장	참고문헌.....	100

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 필요성

#### 1. 축산물의 소비는 계속해서 증가할 것이다.

경제성장과 더불어 국민의 식생활 형태가 변화되면서 축산물의 소비가 급격히 증가하였고 이에 따른 정부의 축산장려정책에 힘입어 우리나라의 축산은 급속도로 성장, 발전하여 왔다.

1992년에서 1997년까지 5년 사이에 국민 1인당 GNP는 36%의 증가율을 보인데 비하여 (92년 6,988달러, 97년 9,511달러), 1인당 육류 소비량 중 쇠고기는 5.2kg에서 7.9kg으로 **51.9%**, 돼지고기는 13.4kg에서 15.3kg으로 **14.2%**, 닭고기는 5.3kg에서 6.1kg으로 **17.0%**, 우유는 44.0kg에서 52.1kg으로 **18.4%**가 증가하여 연평균 육류와 우유의 소비 증가율은 각각 6.3%와 4.6%에 달했으며 연간 소비량은 앞으로도 크게 증가할 것으로 예상된다 (농림부, 1998년).

#### 2. 우리나라의 축산은 외국에서 도입한 사료곡물에 의존하고 있다.

축산물의 수요가 급증하면서 정부의 양적 팽창정책과 양축가의 편하고 안일한 농후사료 위주의 사양으로 인하여 축산업의 근간이 되어야 할 조사료의 생산은 뒤로한 채 수입 사료곡물의 소비가 계속해서 늘어나고 있는 실정이다.

우리나라의 조사료와 농후사료의 급여 비율은 33 : 67로 정상적인 급여 비율인 60 : 40에 비하여 월등히 높은 농후사료 의존 사양 형태를 나타내고 있으며, 이는 사료비 상승에 따른 생산비 증가뿐만 아니라 초식동물인 소의 번식 및 대사 장애, 생산성 저하 및 경제수명 단축으로 인하여 결과적으로는 농가의 경영비 적자로 돌아오게 된다.

또한 지난 외환위기와 IMF 구제금융의 여파로 농후사료의 원료인 곡물의 수입이 일시 중단되자 수많은 가축이 굶어 죽었으며, 오늘날에도 사료 값의 폭등으로 축산농가들이 많은 어려움을 겪고 있다. 뿐만 아니라 세계무역기구 (WTO)의 출범으로 축산물 시장이 개방됨에 따라 값싼 선진국의 축산물 수입이 크게 증가되었고, 국내산 가축과 축산물 가격이 크게 하락하여 축산경영이 큰 어려움에 빠지게 되었다.

### 3. 향후 우리나라 축산의 성패는 조사료의 안정적인 생산에 달려 있다.

현재 우리나라 축산 경영비의 60% 이상을 차지하고 있는 사료비의 절감을 위해서 그리고, 지속적인 축산의 발전을 위해서는 조사료의 생산을 늘이기 위한 노력을 해야 한다. 우리나라는 국토의 70% 이상이 산으로 둘러싸여 있으나 높은 지가(地價)와 농가의 초지에 대한 인식 부족 그리고 우리나라 환경에 맞는 목초자원의 부족으로 인하여 초지 면적은 국토 면적의 0.6%에 불과하다.

지속적이고 안정적인 조사료의 공급을 위한 방법으로는 산지초지의 조성, 답리작 및 휴경지를 이용한 사료작물의 재배 그리고 우량 목초의 신품종 육성 및 보급을 들 수 있으며, 단위 면적당 목초의 생산성을 높이기 위해서는 다수확 품종의 개발, 병충해에 내성을 갖는 품종 그리고 추위와 더위에 강한 품종을 개발하는 방법이 있다. 식물의 형질전환 기술이 발달됨에 따라 이러한 유용한 형질이 도입된 식물의 개발이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 식물체에 내하고성 형질을 부여할 수 있는 유전자를 목초에 도입하여 여름철에도 생산성이 높은 내하고성 목초를 개발하여 우리나라 조사료 생산기반의 확충에 기여코자 한다.

#### 가. 연구개발의 필요성

##### 1) 기술적 측면

우리나라에 도입된 대부분의 목초는 생육적온이 15~21℃의 북방형 목초들로서 봄에 기온이 5℃ 이상으로 올라가면 자라기 시작하여, 20℃ 내외가 되는 5월과 6월에 생육이 가장 왕성하게 되고, 25℃ 이상이 되는 7월과 8월에는 생육이 거의 중지하는 하고기(summer depression)를 맞게 된다. 하고현상에 의하여 생산량은 저하하게 되고, 초지의 나지화(裸地化)가 촉진되며 잡초의 침입에 의하여 부실 초지로 변하게 된다. 하고현상에 의한 목초의 수량 감소는 대관령을 비롯한 북부지방에서는 10~12%, 중부지방 21% 그리고 제주지방에서는 20%에 이르렀다. 따라서 우리나라에서 초지를 조성하여 목초를 생산하기 위해서는 내하고성 품종의 개발이 시급하다.

지금까지 목초의 신품종 개량은 교잡육종에 의하여 이루어져왔으며 교잡육종에 의한 품종 개량은 많은 시간과 노력, 그리고 넓은 포장에 요구될 뿐만 아니라 이렇게 고정된 품종의 내성은 한계가 있으므로 보다 강한 내성 품종의 육성을 위해서는 유전

공학 기술의 도입이 필요하다.

하고현상을 일으키는 식물들은 내열성 유전자의 발현량이 적은 것이 특징이므로 이들 식물에 내열성 유전자를 도입하게 되면 하고현상이 극복될 것이므로 생산량은 증대될 것이다.

최근 형질전환기법을 이용한 내열성 유전자의 도입에 의한 새로운 식물체의 개발에 대한 연구가 시작되고 있으나 국내에서는 아직 적극적인 연구가 부족한 실정이다. 목초의 내하고성 관련 연구는 유일하게 본 연구팀에 의해서 단편적으로 진행되고 있으며, 내하고성 목초의 개발을 위해서는 좀 더 체계적인 연구가 필요하다.

식물의 내열성 유전자에 대한 연구는 내열성 기작해명 및 발현 기작 해석의 측면에서 많은 외국의 학자들에 의해서 연구가 진행되고 있으나 응용적인 측면, 즉 고온에 약한 식물에 내성을 부여하여 내하고성 식물은 만드는 시도는 그다지 없으므로 유용 작물의 개발에 유리한 위치를 선점할 수 있다. 따라서 선진 외국에서 특허화 하기 전에 이 문제를 해결해 두는 것이 한서의 차이가 극심한 우리나라 같은 기후 환경에서는 꼭 필요하리라 생각된다.

## 2) 경제·산업적 측면

향후 우리나라 축산의 성패는 조사료의 안정적 생산에 달려있다고 해도 과언이 아니다. 현재와 같은 농후사료 위주의 축우 사육은 사료비 증가로 인한 수익성 저하, 경제수명 단축에 의한 순수익 감소, 빠른 도태로 인한 산유량 감소 그리고 반추위의 생리적 장애에 의한 소화흡수 감소 및 치명적인 질병을 유발할 뿐만 아니라 지난 외환위기 때처럼 농후사료의 원료인 곡물가격이 급등하게 되면 축산 경영은 더욱 어렵게 된다. 또한, 수입 사료곡물에 의존한 사양은 축산물의 수출입이 완전 개방되었을 때 가격 경쟁력이 없다는 것이다. 값이 싼 수입 쇠고기가 국내 육류시장을 점유하게 되면 국내산 가축과 축산물 가격은 하락하고 우리나라 축산은 붕괴하게 될 것이며, 결국 국내 축산물 생산이 감소되어 수입 축산물의 의존도가 높아지게 되면 수출국에서는 축산물 가격을 인상시켜 국내 소비자 가격은 크게 인상될 것이다.

따라서, 우리 국민의 식량의 큰 부분을 차지하고 있는 축산물의 국내 생산을 외면한 채 외국에의 의존도를 높인다고 하는 것은 국민의 1차 생존권을 다른 나라에 맡기는 것과 같으며, 결국은 식량안보의 문제까지 제기될 수 있다고 하는 것을 간과해서는 안될 것이다.

조사료의 안정적 생산을 위한 한 방법으로 단위 면적 당 목초의 생산성을 증대시키는 것을 들 수 있는데, 우리나라의 환경 하에서 가장 큰 수량 저해를 일으키는 요인 중의 하나로 여름철 고온기를 들 수 있다. 자료에 의하면 1994년 7월 중남부 지역의 초지에서 고온으로 인하여 평균 20%의 수량 감소 (ha당 10,000kg의 수량 감소)를 초래하였는데 kg당 목초의 생산비를 43원 정도로 볼 때, 하고기 중 목초의 생산비 손해액은 43만원/ha로 추산되며, 2000년 우리나라 총 초지 면적을 53,000 ha로 산정했을 때, 그 손해액은 무려 228억원에 이른다고 할 수 있다. 조사료 생산을 위한 국내 초지 관리 면적이 90만 이후 지속적으로 줄어들고 있는 현실에서 하고에 의한 수량 감소는 향후 국제 축산물 경쟁력을 갖추어야 하는 우리나라 축산에 큰 걸림돌로 작용하고 있다고 생각된다.

내열성 유전자의 도입에 의한 내하고성 목초의 개발은 조사료의 생산을 증대하여 우리나라 축산물 가격을 낮출 수 있으며 수입 축산물과의 경쟁을 가능하게 할 것이다. 또한, 내하고성 목초의 개발뿐만 아니라 내하고 관련 유전자의 확보와 이 유전자들을 도입한 작물의 개발을 통해 종자 시장에서 부가가치가 높은 상품을 만들 수 있게 될 것이고, 우리나라의 독자적인 유전자 확보로 우수 생물의 자원화에 힘쓰는 나라들과 함께 경쟁할 수 있을 것이다.

### 3) 사회·문화적 측면

조사료 생산을 위한 초지조성과 사료작물포의 확대는 식량 확보 방안에만 집중된 것은 아니다. 농후사료 위주의 사양으로 발생한 가축의 소화흡성 역행, 경제수명 단축 그리고, 축산 폐기물의 방류로 인한 환경오염 또한 목과할 수 없는 사항이다. 이에 반해 초지조성으로 인하여 우리가 얻을 수 있는 수익이라면 금액으로 환산할 수 없는 outdoor-recreation 공간이 생긴다는 것이다. 사냥 및 놀이 공간으로서의 활용, 견학 및 자연 학습장으로서의 교육 공간 그리고 스포츠 공간으로서의 활용도 역시 높다고 할 수 있다.

최근 유전공학 기법에 의한 작물 생산에 환경단체의 반대 및 우려의 목소리가 높게 일고 있지만, 앞으로 이러한 작물의 개발 및 생산은 제한된 우리나라의 환경을 극복하기 위한 수단으로 계속 연구되어질 것이다. 이러한 시점에서 유전공학 기법을 이용한 목초의 개발은 인간에 의한 직접적인 섭취가 아닌, 초식가축이라는 1차 거름장치가 있다는 데 큰 의의를 들 수 있다.

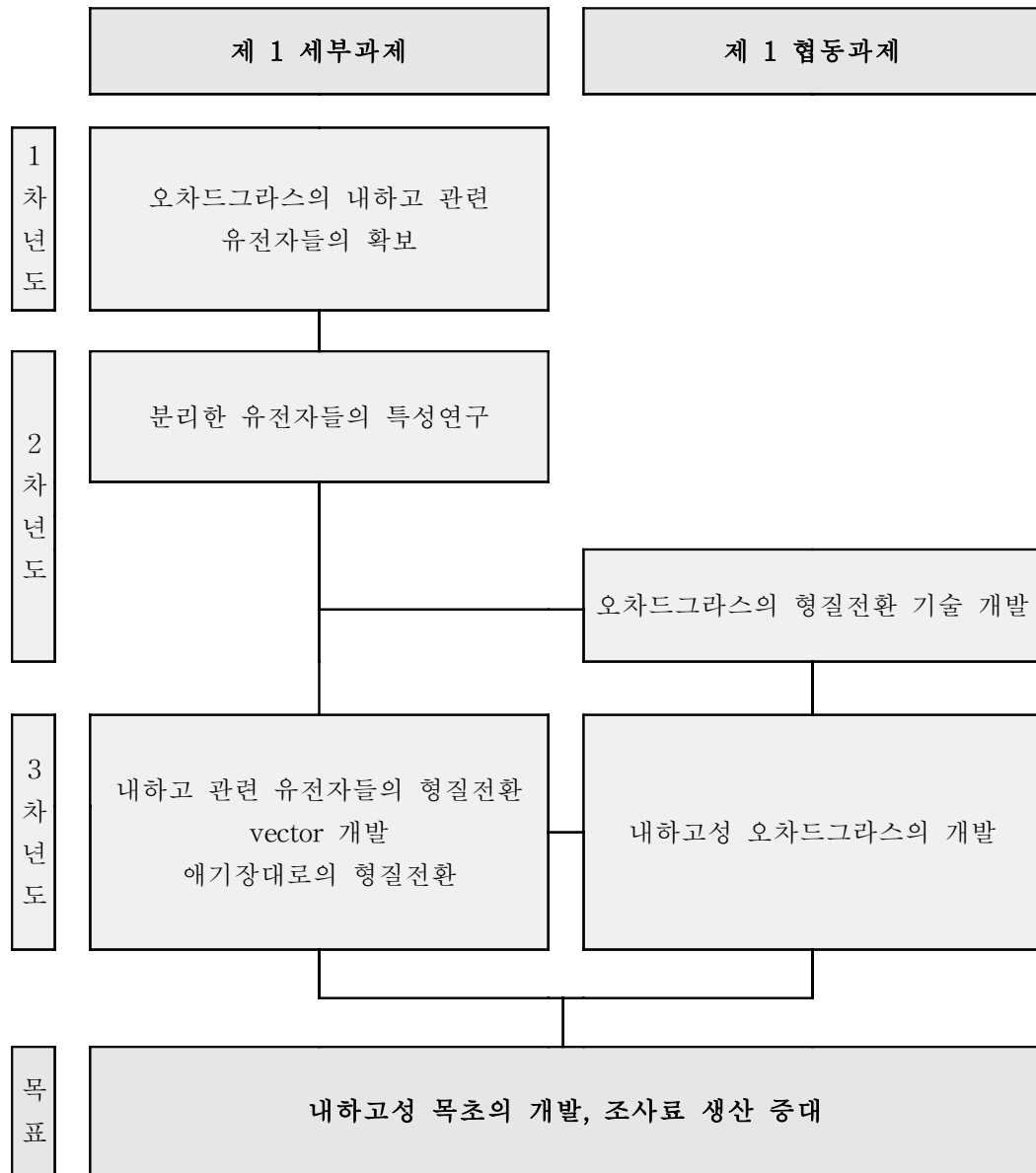
1990년 이후 우리나라 국민 1인당 연평균 육류와 우유의 소비 증가율은 각각 6.3%와 4.6%에 달했으며 연간 소비량은 앞으로도 크게 증가할 것으로 예상된다. 또한 우리나라는 전 세계 쇠고기 유통량의 평균 4%를 수입하고 있다. 이렇게 동물성 단백질의 섭취량이 증가하고 있는 시점에서 국내 축산물 생산 기반의 확충을 위한 한 방법으로서의 목초의 생산성 증대는 축산물 및 곡물의 국제 가격 불안정에 대비할 수 있는 완충장치 역할을 충분히 할 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 2 절 연구범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1 차년도 (2001.08~ 2002.08)	1. 내하고 관련 유전자들의 분리 (제1세부과제)	-Ordered differential display -Northern blot hybridization에 의한 검증 -cDNA library 구축 및 screening
2 차년도 (2002.08~ 2003.08)	1. 내하고 관련 유전자들의 특성연구 (제1세부과제)  2. 오차드그라스의 조직배양 및 재분화 효율 증진 (제1협동과제)  3. 오차드그라스의 형질전환 기술 개발 (제1협동과제)	-탐색된 내하고 관련 유전자의 sequencing 및 유전자의 특성 연구 -Northern blot analysis에 의한 선발된 유전자의 발현 연구 -오차드그라스의 callus 유기와 증식 그리고, 재분화의 효율을 높일 수 있는 조건 확립 -오차드그라스의 재분화 기간의 단축과 형질전환 효율을 향상시킬 수 있는 방법의 개발
3차년도 (2003.08~ 2004.08)	1. 내하고관련 유전자들의 형질전환용 vector 개발 (제1세부과제)  2. 선발된 내하고 관련 유전자들의 애기장대로의 형질전환 (제1세부과제)  3. 형질전환 오차드그라스의 제조 (제1협동과제)	-대상 유전자의 선정 및 식물체 형질전환 vector의 구축 -Agrobacteria를 이용한 애기장대로의 형질전환 -형질전환 애기장대로부터 DNA와 RNA의 분리 및 형질전환 여부 확인 -형질전환 오차드그라스의 유전적 안정성 조사 -형질전환 오차드그라스의 고온내성 검증



### 제 3 절 추진전략



## 제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

### 1. 국내 · 외 관련분야에 대한 기술개발 현황

지금까지 보고된 내열성 유전자는 HSP100 family, HSP90 family, HSP70 family, HSP60 family 및 low molecular weight HSP (15-30 kD) 등으로 개략적 분자량(kD)에 따라 분류되며 (Neuman 등, 1989) 이들 중 상당수는 열충격 이외의 stress들 예를 들자면 에탄올, 중금속 (Brodl, 1990; Czarnecka 등, 1988; Edelman 등, 1988; Neuman 등, 1989; Nover 등, 1984; Nover 등, 1989; Winter 등, 1988), water stress (Kimpel과 Key, 1985), salt stress (Czarnecka 등, 1984, Harringer와 Alm, 1988) 및 anaerobic stress (Russel과 Sacks, 1989)에 의해서도 발현된다.

Low molecular weight Hsp (LMW Hsp)은 다른 진핵생물은 거의 갖고 있지 않고 주로 식물에서 열충격에 의해서 발현되며 (Chen, 1990; Mansfield와 Key, 1987; Nagao 등, 1986) 이 들의 역할은 단백질들이 열충격 (보통 생육적온 보다 약 10°C 정도 높은 온도 - C<sub>3</sub>식물에서는 약 30°C 정도)에 의하여 변성 내지는 기능저하 되는 것을 막아주는 chaperone의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

지금까지 많은 연구자들이 stress에 대한 내성과 Hsp 사이에는 어떤 관계가 있다는 제안은 하였지만 각각의 Hsp의 역할에 대해서는 거의 연구되지 않았다. 또한, 식물에 있어서 내열성을 부여하는 결정적인 요소가 아직까지 밝혀지지 않고 있으며, Hsp 역시 어떻게 고온을 감지하여 반응하는지 그 기작에 관해서는 전혀 알려져 있지 않다 (Estruch, 2000). 최근 Queitsch (2000) 등은 Arabidopsis의 Hsp101이 내열성 획득에 필수적이며, 이 유전자의 발현량을 조절하여도 식물의 정상적인 성장과 발달에 아무런 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

내열성유전자의 연구는 주로 내열성유전자 자체의 과학적 흥미를 위한 연구가 대부분이므로 모델식물로 자주 사용되는 담배와 Arabidopsis의 형질전환식물에 관한 보고는 많으나 실용적 목적으로 내열성이 약한 식물에 내열성을 도입한 연구보고는 아직 없다.

## 2. 고온 신호전달 기작 연구

생체는 여러 가지 외적자극에 대응하기 위하여 다양한 응답시스템을 갖추고 있다. 그 중 세균에서 인간에 이르기까지 모든 생물에 보편적으로 존재하는 기본적인 생체 방어기구의 하나가 고온 스트레스에 대한 응답기구이다. 세포가 고온에 노출되면 heat shock protein (Hsp) 이라고 불리는 수종의 특별한 단백질의 생산이 일시적으로 증가한다. Hsp는 고온에 의하여 변성된 단백질의 분자응집의 저해, 혹은 변성 응집한 단백질 분자를 정상적인 상태로 되돌리는 등 분자 샤페론으로써 중요한 생리기능을 맡고 있다. 가장 잘 알려진 분자 샤페론은 Hsp90/Hsp70 기구로 Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hop (heat shock organizing protein) 그리고 p23으로 구성되어 있다. 지금까지 식물에서도 Hsp90 샤페론 기구가 존재한다는 것이 밝혀지긴 했으나 이를 구성하는 구성성분들이 밝혀지지 않고 있다. 본 연구에서 분리된 Hsp90, Hsp70, Hop 그리고 p23의 기능에 대한 연구는 식물 Hsp90 샤페론 기구를 해석하는 주요한 재료가 될 것이다. 특히 p23의 경우, 동물에서는 Hsp90의 cochaperone으로 변성된 단백질의 응집을 막는 역할을 한다는 보고는 있으나 그 기능에 대해서는 명확히 밝혀지지 않고 있으며 아직까지 식물체에서는 보고가 되지 않고 있다. 식물의 Hsp90 샤페론 시스템에서의 p23의 역할과 기능의 구명은 식물이 어떻게 고온 스트레스를 감지하고 또 어떤 방법으로 그 신호를 전달하는가를 이해하는데 크게 기여 할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 본 연구 결과로 식물의 고온 스트레스에 대한 적응 기작이 밝혀진다면 고온 스트레스에 강한 작물의 개발이 가능해질 것이며 이는 곧 식량증산에 직접적으로 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구방법

#### 1. 제 1 세부과제: 내하고성 관련 유전자들의 확보와 특성연구

##### 가. 내하고성 관련 유전자들의 분리

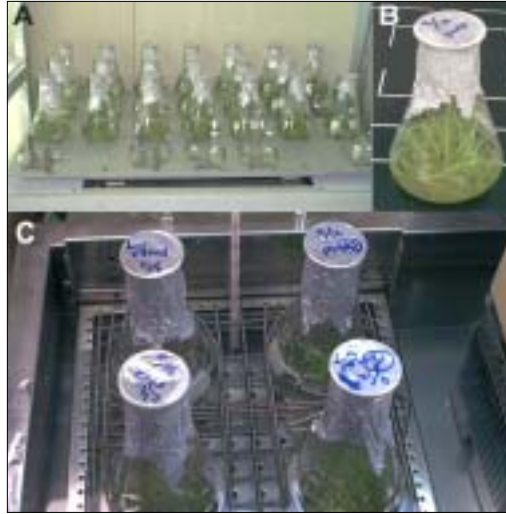
###### 1) 식물체의 재배

고온 스트레스 처리시 식물체가 받을 수 있는 drought stress를 제거하기 위해, 종피를 제거한 orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. potomac) 종자를 소독한 후, 액체 배지(B5 medium)에 파종하여 Fig. 1과 같이 식물환경조절실 (Temp.: 25°C / Day light: 16hrs) 내 shaking rotor 위에서 2주간 생육시켰다. 오차드그라스의 생육 예비 실험에서 2주 이상의 기내 배양은 기내 용적에 비해 성장이 너무 많이 진행되었기 때문에, 스트레스 처리를 위한 적정 기간을 파종 후 2주로 정하였다. 2주일간 재배한 식물체에 온도처리 (25, 30, 35, 40, 45, 50°C)를 shaking water bath 내에서 실시하였다. 처리시간은 30분과 1시간으로 하였으며, 온도처리가 끝난 즉시 수확하여 -80°C에 보관하였다. 이들 식물재료는 mRNA differential display를 위한 재료로 사용하였다 (Fig. 1).

1년차 연구기간 중 mRNA differential display로부터 확보하게 된 cDNA fragment들의 full length cDNA를 선별하기 위하여 orchardgrass cDNA library를 구축하였다. cDNA library 구축을 위한 식물 재료는 이상과 동일한 환경조건하에서 2주간 기내 배양한 오차드그라스를 25°C와 35°C의 온도를 각각 처리한 후, 수확하여 -80°C에 보관하였다.

###### 2) mRNA 분리

Total RNA를 phenol/LiCl 방법으로 분리하였으며, mRNA는 oligo midi kit (Qiagen)를 사용하여 분리하였다.



**Fig. 1. The front view of growing orchardgrass in controlled growth chamber(A), two week old orchardgrass(B) and heat treatment in shaking water bath(C)**

### 3) mRNA different display

두 종류의 RNA 중에 서로 다른 mRNA가 있을 것으로 예측되어지는 sample에서 이들 서로 다른 mRNA를 나타나게 하는 방법으로 본 연구에서는 GenHunter사의 RNA image kit를 사용하였다. Control 식물과 고온 처리 식물체로부터 추출한 total RNA를 RT PCR한 후, 5'의 임의의 primer와 3'의 oligo(dT) primer로 다시 PCR한 다음 6%의 sequencing gel에서 전기영동하였다. 건조시킨 gel을 X-ray film에 감광시켜 발현에 차이가 있는 band에 해당하는 DNA를 elution하여 T-vector에 subcloning 하였다 (Fig. 2).

### 4) Reverse-northern blot analysis를 통한 positive clone의 선발

Differential display에서 얻은 DNA 단편들을 PCR 증폭시킨 후, 이들을 dot-blot (Bio-rad) 장치를 이용하여 NC membrane에 blotting 하였다. Hybridization에 사용한 probe는 각각의 온도처리 (25, 30, 35, 40, 45, 50℃)된 식물에서 분리한 RNA를 reverse transcription 시키면서  $^{32}\text{P}$ -dATP로 labeling하였다. 발현량의 차이는 exposure된 film을 scanning 하여 Totallab software로 density를 측정하여 온도처리

에 따른 발현량의 차이가 높게 나타나는 cDNA 단편들을 선발하였다.

5) Northern blot analysis를 통한 내하고 관련 clone들의 발현 연구

각각의 온도처리 (25, 30, 35, 40, 45, 50°C)된 식물체로부터 total RNA를 분리하여, 1.2% agarose gel에 loading하여 전기영동한 후, NC membrane으로 transfer한 다음, <sup>32</sup>P-dATP로 labeling한 각각의 clone들을 probe로 하여 65°C에서 12시간동안 hybridization하였다. Northern membrane을 2 X SSC와 1 % SDS 용액으로 washing한 후, radioisotope image reader인 BAS-reader에서 scanning하여 유전자 발현을 조사하였다.

6) 오차드그라스 cDNA library의 구축

Double stranded cDNA 합성은 commercial cDNA 합성 kit를 사용하였다. Oligo(dT) primed poly(A+) mRNA를 MMLV reverse-transcriptase를 이용하여 첫째 strand의 cDNA를 합성하고 RNase H와 DNA polymerase I을 처리하여 double stranded cDNA를 구축하였다. 이렇게 만들어진 DNA를 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt-end로 만들었으며, *EcoRI* adaptor를 ligation시킨 후에 *XhoI*으로 digestion한 다음 이를 agarose gel을 이용하여 size-fractionation하여 0.5 kb 이상의 것들을 ZAP II vector에 ligation 하였다. Ligation된 cDNA는 lambda packaging extract로 packaging한 후 이를 *E. coli*에 infection시켜서 library를 구축하였다.

7) 오차드그라스 cDNA library로부터 full length cDNA의 screening

오차드그라스 cDNA library를 plate당 50,000 plaque가 되게 LB agar plate에 plating한 후, 이를 NC membrane에 blotting하고, isotope가 표지 된 각각의 내하고 관련 유전자를 probe로 하여 hybridization하였다. Film 판독 후, positive signal을 보이는 plaque들을 core out하였으며, 이들로부터 phage solution을 취하여 ExAssist helper phage로 in vivo excision하였다.

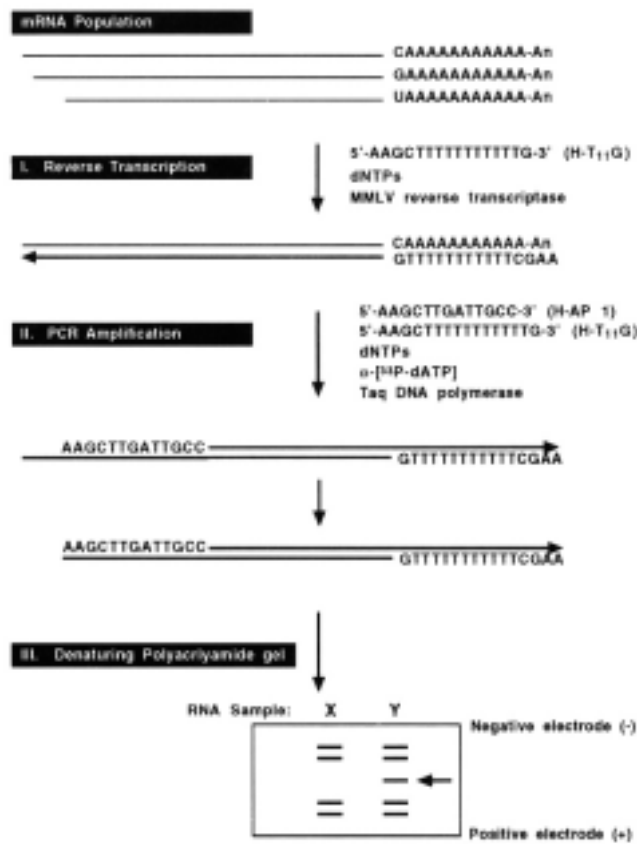


Fig. 2. A schematic diagram of mRNA differential display analysis

나. 내하고 관련 유전자들의 특성연구

1) 선발된 유전자의 구조 결정

내하고 관련 유전자들의 염기서열을 결정하기 위하여, Big-dye terminator 방법을 이용하는 DNA sequencing kit (PE biosystem)를 사용하여 각각의 유전자들을 PCR 한 후, urea gel 상에 DNA를 loading하였다. ABI 377 automatic sequencer로 영동된 DNA의 염기서열을 해독하고, Bioedit software로 sequencing 오류를 수정하였다. 유전자가 클 경우에는 유전자를 적정 restriction enzyme으로 절단한 다음 subcloning하여 sequencing하거나, 유전자의 적정부위와 match되는 primer를 제작하여 sequencing 하였다.

## 2) 선발된 유전자의 유전자 발현 연구

Heat stress에 의해 발현이 증가되는 내하고 관련 유전자들의 특성을 조사하기 위하여, 2주간 기내 배양한 오차드그라스를 40°C에서 시간별 (0, 1/6, 1/2, 1, 2, 6 h)로 고온처리를 하였다. 또한 이들 유전자의 다른 스트레스에 대한 반응을 조사하기 위하여 Abscisic acid ( $1 \times 10^5$  M), NaCl (150 mM), Cold (4°C), dehydration (bench위에서 건조), Salicylic acid (1 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 mM), Ethanol (7.5 %), 그리고, Ethephone (1 mM)을 각각 처리하여 시간별로 수확하였다. 각 처리로부터 total RNA를 분리한 다음, Northern blot 분석법으로 이들 유전자의 발현을 조사하였다.

## 3) 단백질의 *E. coli*에서의 대량 생산 및 순수 분리

내하고 관련 유전자를 *E. coli* 내에서 발현시키기 위하여 GST-fused protein expression vector인 pGEX 종류 중 restriction site 및 reading frame이 맞는 vector를 선정하여 subcloning한 후 과발현시켰다. cDNA의 open reading frame을 vector의 reading frame과 맞추기 위하여 ATG initiation에 해당하는 oligomer를 합성하여 PCR로 full coding region을 얻은 다음 이를 vector에 도입하였다. Reading frame과 mutation 여부를 sequencing하여 확인한 후, 과발현 조건 실험을 하였다. Constructs가 확인되면 *E. coli*에 transformation한 후, LB배지에 접종하여 OD<sub>600</sub> 값이 0.8이 될 때까지 증식시킨 다음, 최종 농도가 1 mM이 되게 IPTG를 첨가하여 단백질의 과발현을 유도하였다. Induction 후 cell을 harvest하여 단백질이 soluble fraction에 존재하는지 아니면 insoluble fraction에 존재하는지를 확인한 다음, 다량 존재하는 fraction을 glutathion sephadex 4B resin으로 affinity chromatography한다. GST-fusion form에서 원하는 단백질만을 순수분리하기 위하여 protease를 처리하였으며, column으로부터 소량의 단백질을 취하여 SDS-PAGE로 확인하였다.

## 4) Antibody 제조

순수 분리한 단백질을 SDS 전기영동으로 최종 순수 분리한 다음 해당되는 protein band를 잘라내어 electro-elutor (Bio-rad)로 농축하였으며, Bradford 방법으로 단백질을 정량한 후, 150  $\mu$ g의 단백질을 complete adjuvant에 섞어서 토끼의 피하 조직에 주사하였다. Boost injection을 위하여 incomplete adjuvant와 섞은 후 토끼에 15 일간격으로 3-4회 반복 주사한 다음, 토끼의 귀 혈관으로부터 채혈하여 antibody를



얻었다.

#### 5) Western blot analysis

SDS 전기영동으로 단백질을 분리시킨 후에 semi-dry transfer 방법으로 PVDF immobilon에 단백질을 이동시켜 단백질 blot을 제조하고 6% skim milk blocking buffer로 membrane을 blocking하였다. Buffer를 갈아주면서 primary와 secondary antibody로 labeling한 다음 ECL detection kit (Amersham Biotech co.)로 western blot을 수행하였다.

다. 내하고 관련 유전자들의 형질전환용 vector 개발

#### 1) Sense orientation을 갖는 overexpression construct 제조

식물체에서 가장 강력하다고 알려진 35S promoter를 가진 pCAMBIA vector 들 중 restriction enzyme site가 선발한 유전자와 일치하는 vector에 유전자를 삽입시켜 overexpression construct를 제조하였다.

#### 2) Transgenic plant 의 제조

Sense에 대한 construct를 먼저 electroporation법으로 *Agrobacterium*에 transfer한 후에 그들이 *Agrobacterium*에서 안정하게 존재하는지를 Southern blot hybridization으로 확인하였다. Transformation이 확인된 *Agrobacteria*를 *Arabidopsis*에 transformation시켰다. 유전자 도입의 일차 확인은 hygromycin resistance로 하였으며, 확인된 transgenic plant들이 transfer한 sense construct를 가지고 있는지는 이들 transformant들로부터 분리한 genomic DNA로 Southern blot hybridization하여 확인하였다. 이와 같은 확인 과정을 거친 transgenic plant들로부터 다시 total RNA를 분리한 후에, sense construct의 transgenic plant들에서는 expression이 가장 많이 된 line을 선발하였다.

#### 3) Southern blot hybridization

*Arabidopsis*의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 적당한 restriction enzyme으로 절단한 다음 size marker와 함께 적절한 농도의 agarose gel에 loading하여 전기영동하였다. 크기 별로 분리된 DNA를 nylon membrane에 이동시켜 blot을 만

든 후 DNA probe를  $^{32}\text{P}$ 로 labeling하여 hybridization하였다.

#### 4) Chaperone activity 조사

*E. coli*로 부터 순수분리된 각각의 단백질의 refolding activity를 조사하기 위하여 malate dehydrogenase (MDH)를 사용하였다. 열에 의한 단백질 응집을 유발시키기 위하여 cuvette chamber 내의 온도조절이 가능한 UV spectrophotometer를  $46.5^\circ\text{C}$ 로 유지시킨다. 일정 농도의 MDH를 10 mM HEPES buffer와 혼합하여 350 nm에서 15분 ~ 20분간 light scattering 값을 측정하였다. 동일 농도의 MDH와 순수분리한 내하고 관련 단백질을 molar ratio를 변화시켜가며 혼합한 후 같은 조건하에서 light scattering 값을 측정하였다.

라. 기타 분자 생물학적인 기본적인 기법들은 standard 방법을 이용하였다.

## 2. 제 1 협동과제: 오차드그라스의 형질전환체계 확립 및 형질전환 식물체의 고온내성 검정

### 가. 식물체 재분화 및 형질전환기술 개발

#### 1) 공시품종 및 종자소독

오차드그라스의 퀄러스 유도 및 재분화효율을 조사하기 위한 공시품종으로는 축산연구소에서 유전자원으로 보유하고 있는 30품종을 공시하였다. 품종명은 Able, Amba, Ambassador, Benchmark, Condor, Currie, Filippa, Frode, Glorus, Hall mark, Hay-King, Jesper, Juno, Justus, Kay, Lidacta, Lidaglo, Pizza, Plano, Potomac, Rancho, Sampson, Sparta, Tna, 기타미도리, 아끼미도리, 93M, 합성 2호, 장별 101호, 장별 102호 등이다.

오차드그라스의 퀄러스 유도 및 재분화효율의 조사는 2회로 나누어 조사하였는데, 1차 시험에서는 외국에서 도입한 27품종 (Able, Amba, Ambassador, Benchmark, Condor, Currie, Filippa, Frode, Glorus, Hall mark, Hay-King, Jesper, Juno, Justus, Kay, Lidacta, Lidaglo, Pizza, Plano, Potomac, Rancho, Sampson, Sparta, Tna, 기타미도리, 아끼미도리, 93M)과 국내 육성품종인 합성 2호를 시험재료로 하였으며, 2차

시험에서는 국내에서 육성된 3품종 (합성 2호, 장벌 101호, 장벌 102호)과 외국 도입종인 Potomac을 시험재료로 하여 실시하였다.

이들 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1 분, 0.1% SDS/HgCl<sub>2</sub> 용액에서 15 분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다.

## 2) 캘러스 유도 및 배지조성

소독을 마친 종자는 캘러스 유도 배지에 15~20 seeds/plate로 치상하여 암 상태에서 24~25℃의 온도로 7~10일간 배양 후, 형성된 캘러스에서 shoot와 root를 제거하고 새로운 배지로 옮겨 3주간 배양하여 callus를 유도하였으며, 동일 배지에서 2주 간격으로 계대배양하며 callus를 증식하였다. 캘러스 유도배지의 조성은 MS배지 (Murashige 및 Skoog, 1962)를 기본으로 하여 Table 1과 같은 성분들을 첨가하였으며 pH는 5.8로 조정하였다.

## 3) 캘러스의 크기 및 캘러스 형성률 조사

품종별로 400립씩 종자를 치상하여 캘러스를 유도 후, 각 품종마다 200립은 4주 후에, 나머지 200립은 6주 후에 캘러스의 크기 및 캘러스 형성률을 조사하였다. 캘러스 크기는 캘러스 장축의 지름을 자로 측정하여 cm로 표시하였으며, 캘러스 형성률은 종자 200립에 대한 형성된 캘러스 수를 종자발아율로 보정하여 백분율로 나타내었다.

## 4) 식물체 재분화 유도 및 배지조성

형성된 4주령의 캘러스와 6주령의 캘러스를 MS배지 (Murashige 및 Skoog, 1962)를 기본으로 하여 Table 1과 같이 성분들을 첨가하여 pH를 5.8로 조정한 재분화 유도 배지에 plate당 10개씩 치상하여 24 ~ 25℃의 광조건 하에서 신초가 나올 때까지 약 2~4주간을 배양하였다.

## 5) 식물체 재분화율 및 재분화 효율 조사

식물체 재분화율은 치상된 캘러스로부터 형성된 신초의 수를 백분율로 표시하였으며, 재분화 효율은 캘러스 형성률에 식물체 재분화율을 곱한 수를 백분율로 나타내었다 (재분화 효율 (%) = 캘러스 형성률 × 식물체 재분화율 ÷ 100).

**Table 1. Constituent for callus formation and plant regeneration**

Constituent	Callus formation ( $\ell^{-1}$ )	Plant regeneration ( $\ell^{-1}$ )
Sucrose	30 g	20 g
Sorbitol	—	20 g
Maltose	—	20 g
Casein	1 g	—
Thiamin	1 mg	—
Myo-Inositol	0.25 g	—
Proline	0.69 g	—
2,4-D	2 mg	—
NAA	—	1 mg
Kinetin	—	5 mg
BAP	0.0157 mg	—
Copper	1.25 mg	2.5 mg
Gellan gum	5 g	5 g

6) 오차드그라스의 형질전환기술 개발

오차드그라스의 형질전환 효율을 조사하기 위하여, 종자 유래의 캘러스와 pIG121-Hm 벡터로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101을 공배양하여, 50 mg/ℓ의 hygromycin이 첨가된 배지에서 형질전환 캘러스를 선발하고, 선발한 캘러스를 N6배지에 1 mg/ℓ의 NAA, 5 mg/ℓ의 kinetin, 250 mg/ℓ의 carbenicillin 및 50 mg/ℓ의 hygromycin을 첨가한 재분화 배지에 옮겨 식물체 재분화를 유도한 다음, 전체적인 형질전환 효율을 조사하였다. 형질전환체의 분석은 PCR 및 Southern blot 분석으로 확인하였다.

나. 형질전환 오차드그라스의 생산 및 확인

1) 식물재료 및 캘러스 유도

본 실험의 재료식물로는 오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.) 30품종에 대한 식물체 재분화 시험에서 재분화효율이 가장 높았던 (6주령 캘러스에서 28.0%) Potomac

을 이용하였다.

Potomac 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl<sub>2</sub> 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다. 소독을 마친 종자는 캘러스 유도 배지에 15 ~ 20 seeds/plate로 치상하여 암상태에서 24 ~ 25℃의 온도로 7~10일간 배양 후, 형성된 캘러스에서 shoot와 root를 제거하고 새로운 배지로 옮겨 3주간 배양하여 callus를 유도하였으며, 동일 배지에서 2주 간격으로 계대배양하며 callus를 증식하였다. 캘러스 유도배지의 조성은 앞 장의 재분화조건 시험에서 사용한 동일한 배지를 사용하였다.

## 2) 유전자 및 발현 vector

제 1 세부과제로부터 4종의 유전자 (*Dgp23*, *DgAha*, *DgSti*, *DgHsp17.8*)를 분양받아 이들 유전자를 pCAMBIA1300PT 벡터 (12Kb)에 재조합하였다.

## 3) DNA 및 RNA 분리

### 가) Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA는 alkaline lysis법 (Birnboim 및 Dolly, 1979)으로 분리하였다. 3 ml의 overnight culture를 원심분리하여 대장균 세포만을 회수한 다음, solution I (50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA)에 현탁하였다. 2 vol.의 solution II (0.2 M NaOH; 1% SDS)를 첨가한 다음, 다시 1.5 vol.의 solution III (3 M potassium acetate, pH 4.8)를 첨가하여 혼합한 후, 얼음에 5분간 정치하였다. 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 회수한 다음, phe/chl/iso (25:24:1; v/v/v) 추출을 실시하였다. 2 vol.의 100% ethanol을 첨가하여 -80℃에서 15분 정치한 다음 원심 분리하여 DNA pellet을 회수하였다. 70% ethanol 세정 후, 진공 건조시킨 DNA를 멸균수에 녹였다.

### 나) Genomic DNA의 분리

식물체의 잎으로부터 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)를 사용한 Murray 및 Thompson (1980)의 방법으로 genomic DNA를 분리하였다. 잎 5 g을 액체질소를 사용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 5 ml의 2×CTAB buffer (2% CTAB; 0.1 M Tris, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 1% PVP)를 넣고, 55℃의 항온수조에서 10분간 정치하였

다. Chloroform/isoamylalcohol (Chl/iso; 24:1; v/v)을 첨가하여 실온에서 30분간 교반한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 Chl/iso로 한번 더 추출한 다음 1/10 volume의 10×CTAB buffer (10% CTAB; 0.7 M NaCl)와 1 vol.의 침전용 buffer (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA)를 첨가하였다. 30분간 교반한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 침전물을 회수하고, 1 M NaCl-TE buffer (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)에 녹인 다음, 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 침전물을 회수하여 70% ethanol로 2회 세정하고, 진공 건조한 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2.5 mM EDTA)에 녹여 RNase A를 처리하였다.

#### 다) Total RNA의 분리

식물체의 잎으로부터 total RNA의 분리는 Guanidine Thiocyanate (GTC) 방법 (McGookin, 1984)으로 실시하였다. 잎 조직 1 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 4 ml의 GTC extraction buffer (4.2 M GTC; 0.5% N-Laurylsarcosyl; 25 mM Na-citrate; 0.1% antiform A emulsion)와 50  $\mu$ l의  $\beta$ -mercaptoethanol 및 400  $\mu$ l의 3 M Na-acetate (pH 5.2)를 첨가하여 완전히 혼합하였다. 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고, phe/chl/iso 추출을 실시하였다. 상층을 회수하여 2 vol.의 ethanol을 첨가하여 혼합한 다음, 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하였다. 침전물을 1 ml의 멸균수에 완전히 녹인 다음, 250  $\mu$ l의 10 M LiCl를 첨가하여, 얼음에 30분간 정치하였다. 15,000 rpm, 4도에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하여 70% ethanol로 2회 세정하고, 실온에서 건조한 후 DEPC를 처리한 멸균수에 녹였다.

#### 4) 오차드그라스의 형질전환

오차드그라스의 형질전환은 Lee 등 (2000)의 방법을 일부 변형하여 사용하였으며, Horsch 등 (1984)의 freezing-thawing 방법으로 재조합 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) GV3101에 형질전환시켰다. 4종의 유전자로 각각 형질전환된 *Agrobacteria*를 AB 한천배지 (Chilton 등, 1974)에 도말한 다음, 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. 균체를 회수하여 acetosyringone (100  $\mu$ M)이 첨가된 AA배지 (Muller와 Grafe, 1978)에 현탁 (OD<sub>600</sub> = 0.4)하여 캘러스의 감염에 사용하였다.

오차드그라스의 캘러스를 *Agrobacterium* 현탁액에 20분 이상 침지한 다음,

acetosyringone (100  $\mu$ M)이 첨가된 N6 공동배양배지에 치상하여 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. 감염된 캘러스를 250 mg/ℓ의 cefotaxime과 40 mg/ℓ의 hygromycin이 첨가된 N6 선발배지로 옮겨 25°C, 암상태에서 3주간 배양한 다음, 캘러스를 동일한 조건으로 2주간 다시 계대배양하였다. Hygromycin으로 선발된 캘러스를 1 mg/ℓ의 NAA, 5 mg/ℓ의 kinetin, 250 mg/ℓ의 cefotaxime 및 50 mg/ℓ의 hygromycin이 첨가된 MS 재분화배지로 옮겨 형질전환된 식물체의 재분화를 유도하였다. 재분화된 식물체는 호르몬을 첨가하지 않은 half-strength의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도한 다음, 원예용 상토 (5호, 부농)를 담은 화분으로 옮겨 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 일주일간 순화시켰다.

#### 5) PCR 및 RT-PCR 분석

재분화된 식물체의 잎으로부터 분리한 genomic DNA를 template DNA로 사용하였으며, Taq DNA polymerase reaction buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH9.0; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.01% gelatin; 0.1% Triton X-100)에 2.5 mM의 dNTP mix, 10 pmol의 sense 및 antisense primers 그리고 2 unit의 Taq polymerase를 첨가하였다. PCR 반응은 Personal Cyciler (Biometra, Germany)에서 35 cycle을 실시하였으며, 1 cycle은 denaturation을 95°C에서 1분간, annealing을 55°C에서 1분간, 그리고 extension을 72°C에서 1분간으로 하여 실시하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

RT-PCR을 위해서 오차드그라스의 잎으로부터 guanidine thiocyanate 방법 (McGookin, 1984)으로 total RNA를 분리하였다. Total RNA를 oligo(dT) primer와 reverse transcriptase (RT)를 이용하여 cDNA로 전환시킨 다음, PCR 반응을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2와 같다.

#### 6) Southern blot 분석

오차드그라스의 잎으로부터 CTAB 방법 (Murray 및 Tompson, 1980)으로 genomic DNA를 분리하였다. DNA 5  $\mu$ g을 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법 (Southern, 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane은 5×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS, 50 mM Na-Pi (pH 6.5), 0.1 mg/ml denatured herring sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액에서 3시간 (42°C) 동안 prehybridization한 다음, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP로 표식된 probe

DNA를 첨가하여 12시간 이상 hybridization하였다. Membrane은 2×SSC, 0.1% SDS 용액 (50℃)에서 10분간, 그리고 0.2×SSC, 0.1% SDS용액 (50℃)에서 1시간 동안 세정한 다음, -70℃에서 2 ~ 3일간 X-ray film (Kodak)에 노출시켰다.

**Table 2. PCR primers used in this study**

Target Gene	Primer sequence
Dgp23	For. : 5'-CGCCATGGATGAGTCGCCACCCGAGC-3' Rev. : 5'-CGAGATCTTCATGGCTTTGCTTCATCCGTGG-3'
DgAha	For. : 5'-GAATTCGTCGATCCAGTGATGGAGGAGA-3' Rev. : 5'-CTCGAGCTACCTATCTTTCAGCTCCTGCTCA-3'
DgSti	For. : 5'-GAATTCATGGCCGACGAGGCGAAGGCG-3' Rev. : 5'-CTCGAGTTATCTCGTTTGGACTATTCAGCGTTTATGAGC-3'
DgHsp17.8	For. : 5'-GCGGATCCATGGAGGGCAGGGTGTTC-3' Rev. : 5'-GCGTCGACTCACTCACTAATCATCGA-3'

다. 형질전환 오차드그라스의 고온 내성 검증

1). 공시품종 및 재배

오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.)의 치사온도를 결정하기 위한 연구에서는 오차드그라스의 형질전환 연구에 직접 이용한 외국 도입품종인 Potomac과 국내 육성품종인 Jangbeol 102를 시험재료로 공시하였으며, 종자를 petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식하여 생장실에서 4주 동안 재배하였다. 생장실의 온도는 20℃로 고정하고 16시간의 광조건과 8시간의 암조건이 되도록 조절하였다.

형질전환 식물체의 고온내성 검정을 위한 재료로는 *Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자로 형질전환이 확인된 오차드그라스 형질전환체를 공시하였으며, PCR, RT-PCR, Southern 및 Northern 방법으로 분석하였다.

2) 열처리 조건

오차드그라스의 치사온도를 결정하기 위하여 파종 후 4주령 된 식물체를 준비하였



다. 열처리 온도는 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C로 8처리를 두었으며, 열처리 시간은 5분부터 60분까지 5분 간격으로 12처리를 두었다. 열처리는 각 온도별로 설정한 배양기에서 처리시간에 맞추어 실시하였으며, 열처리한 식물체는 적정 생육온도에서 배양하면서 생육조사를 실시하였다.

### 3) 생육조사

각 온도 및 시간별로 열처리한 식물체를 열처리하지 않은 대조구와 함께 적정 생육온도에서 배양하면서, 열처리 후 7일까지 매일 생육조사를 실시하여, 각각의 처리에 따른 식물체의 상태를 육안으로 관찰하는 방법으로 조사하였다. 이 때 처리에 따른 영향을 전혀 받지 않은 정상인 상태를 1로 표시하였으며, 열처리에 의해 식물체가 죽은 상태를 9로 표시하였다.

### 4) 고온내성 검정

형질전환되지 않은 오차드그라스 (Potomac)를 온실에서 성장시킨 다음, 절단된 상태의 잎에서 heat-killing temperature를 조사하기 위하여, 잎조직을 길이 1 cm 정도로 절단, 항온수조를 이용하여 60°C에서 20, 30, 40, 50, 60분간 고온처리를 실시한 후, leaf disc의 피해정도를 관찰하였다. 결정된 heat-killing temperature에서 형질전환 식물체와 대조구 식물체의 잎조직을 동일한 방법으로 처리한 다음, MS 기본배지로 제조한 plate로 옮겨 25°C의 광조건 하에서 3일간 배양하며 관찰하였다.

## 제 2 절 연구내용 및 결과

### 1. 제 1 세부과제: 내하고성 관련 유전자들의 확보와 특성연구

#### 가. 내하고성 관련 유전자들의 분리

##### 1) Differential display

각각의 온도 처리 (25, 30, 35, 40, 45, 50°C)를 한 orchardgrass로부터 total RNA를 추출한 후, MMLV reverse transcriptase로 cDNA 합성을 하고, 이들을 5'의 임의의 primer (AP1~AP32, GenHunter)와 3'의 oligo(dT) primer (T<sub>11</sub>A, T<sub>11</sub>C, T<sub>11</sub>G,

GenHunter)로 PCR한 다음, 6% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Fig. 3와 같이 전기영동 후 gel로부터 고온 특이적으로 발현되는 DNA band들을 elution하여, PCR amplification(94°C/30sec. → 40°C/2min. → 72°C/30sec.; 40 cycles)하였다. 이렇게 얻어진 DNA들을 Northern blot analysis로 확인해 본 결과, false clone들이 많았기 때문에, 본 실험실에서는 이들을 효과적으로 제거하기 위해, differential display에서 얻은 DNA들을 reverse-northern blot 방법으로 1차 screening한 후 선발된 DNA들만을 Northern blot analysis하여 고온 stress에 의하여 specific하게 발현하는 DNA들을 분리하였다.

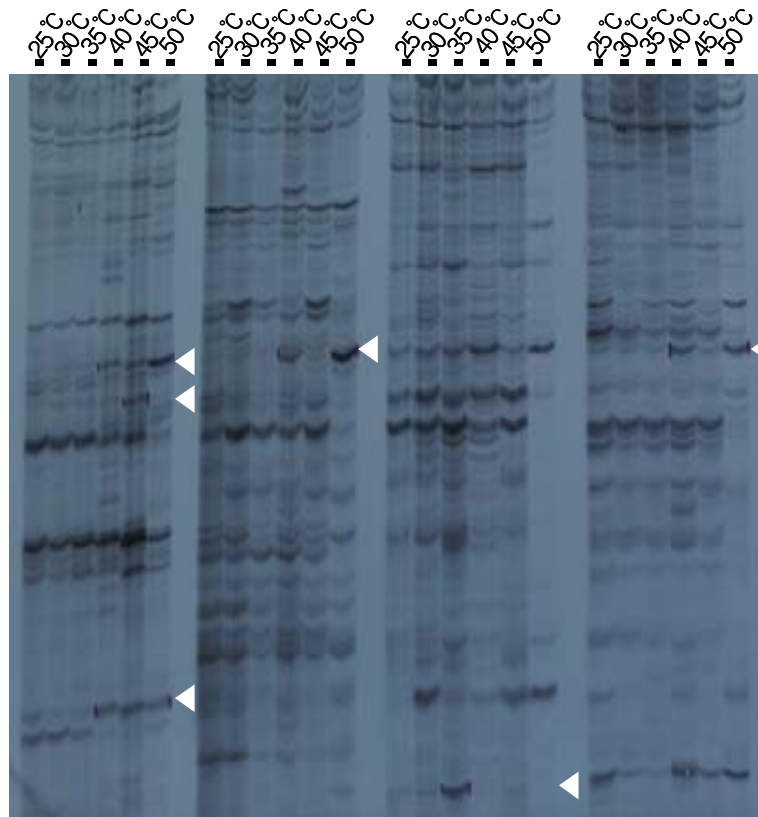


Fig. 3. Screening of differentially expressed DNA fragments (white arrows indicate the DNA bands induced by high temperature)

## 2) Reverse-northern blot analysis에 의한 고온 특이적 유전자의 선발

Differential display 방법으로 얻은 252개의 DNA 단편들을 PCR 증폭시킨 후, 이들을 dot-blot (Bio-rad) 장치를 이용하여 NC membrane에 blotting하였다. Hybridization에 사용한 probe는 각각의 온도처리 식물에서 분리한 total RNA를 reverse transcription시켜면서  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP로 labeling하였다. 발현량의 차이는 exposure된 film을 scanning하여 Totallab software로 density를 측정하였으며 온도처리에 따른 발현량의 차이가 높게 나타나는 유전자들을 선발하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, differential display를 통해 얻은 DNA로 reverse-northern blot hybridization을 수행한 결과, 35°C 이상의 고온에서 발현량이 증가하는 DNA들을 다량 확보할 수가 있었다. 그러나 50°C 처리구의 경우, 온도가 올라감에 따라 발현량이 증가하던 DNA들도 다시 발현량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 50°C 이상의 온도 처리가 식물체의 cell death를 초래하여 DNA 및 RNA와 같은 유전물질의 변성을 초래하기 때문이라 생각한다.

## 3) Northern blot analysis에 의한 고온 유도 발현의 검증

Reverse northern blot analysis를 통한 선발작업 이전에 확보한 다섯 개의 clone들은 고온 조건 (35와 40°C) 하에서 특이적으로 발현되었으며, reverse northern blot을 통해 확보한 DNA들 역시 고온에 의하여 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다. 그러나 50°C 처리구의 경우, 모든 DNA들에 의한 reverse transcription level이 급격히 감소하였기 때문에 이 온도는 orchardgrass에 있어서 치명적인 온도 스트레스라 사료된다. Differential display를 통해 발현량에서 차이가 나는 DNA band를 elution, labeling 한 후, 1차 Northern blot analysis를 실시하였다. Fig. 5에 나타낸 것과 같이, 기 선발된 다섯 개의 DNA 외에 reverse-northern blot analysis를 통해 확보한 70여개의 DNA 역시 Northern blot analysis하여 고온 특이성을 조사하였다. 이 결과, 본 연구진은 총 16개의 유전자들이 고온처리에 의하여 발현량이 증가하는 것을 확인 하였으며, 이들을 pGEM T-vector에 subcloning하여 이들이 1차 Northern blot analysis와 동일한 발현양상을 나타내는지 다시 한번 확인하였다.

## 4) 오차드그라스 cDNA library 구축

온도 처리를 하지 않은 (25°C) 과종 후 2주일째의 orchardgrass whole plant 30g을 액체질소 하에서 마쇄한 다음, guanidine thiocyanate 방법으로 total RNA를 분리한

후, mRNA isolation kit (Qiagen)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA로 ZAP II-cDNA synthesis kit (Stratagene)를 사용하여 cDNA library를 구축하였다. 먼저, Oligo(dT) primed poly(A<sup>+</sup>) mRNA를 MMLV reverse-transcriptase로 first strand의 cDNA를 합성하고 RNase H와 DNA polymerase I을 처리하여 double stranded cDNA를 합성하였다. 이렇게 만들어진 DNA를 T4 DNA polymerase를 사용하여 blunt-end로 만들고, EcoRI adaptor를 ligation시킨 후에 XhoI으로 digestion하고 이를 cDNA spun column으로 size-fractionation하여 0.4 kb 이상의 cDNA들을 ZAP II vector에 ligation하였다. Ligation된 cDNA를 lambda packaging extract로 packaging한 후, 이를 *E. coli*에 infection시켜서 cDNA library를 구축하였다. 본 연구진이 1차년도 연구기간 동안 differential display와 reverse-northern blot analysis를 통해 screening한 내하고 관련 유전자 단편들을 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP로 label한 후 probe로 사용하여, 기 구축된 cDNA library로부터 full length clone들을 screening하였다. 처음에는 25°C의 control 구에서 harvest한 오차드그라스의 mRNA로 library를 구축하였으나, heat stress에 의해 expression level이 증가하는 유전자들을 좀더 효율적으로 screening하기 위하여 25°C에서 2주간 생육시킨 오차드그라스를 35°C에서 1시간 고온 처리한 후 sampling하였다. 고온처리한 오차드그라스에서 분리한 mRNA로 cDNA library를 재구축 하였으며, 구축된 library의 titer를 조사한 결과,  $6.5 \times 10^9$  pfu/ml로 나타났다.

##### 5) 내하고 관련 유전자의 full length clone의 screening

Differential display 및 northern blot analysis를 통해 얻은 clone들의 full length clone을 찾기 위하여 library screening을 실시하였다. 약 50,000 recombinant/plate가 되게 library를 XL1-Blue MRF' cell에 infection시킨 후, LB agar plate에 plating하여 37°C incubator에서 배양하였다. Plaque의 size가 1 mm정도로 자랐을 때, library plate를 4°C 냉장고에 1시간이상 보관한 후, NC membrane으로 plaque를 blotting시켰다. Probe로 쓸 내하고 관련 유전자 단편을 megaprime DNA labeling system (Amersham)를 사용해 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP로 labeling 한 후, library가 transfer 되어있는 NC membrane의 prehybridization bag에 넣어 65°C에서 12시간 동안 hybridization시켰다. Hybridization 후 membrane을 세척, 건조시킨 다음 x-ray film에 exposure하여 현상하였다. Film 상의 positive signal을 library plate와 대조하여 해당되는 plaque들을 core out해서 phage solution을 얻었다. 찾고자 하는 DNA 단편을 가진 single

plaque를 얻기 위해, 위와 동일한 방법으로 2차 screening을 행하였으며 얻어진 lambda phage를 ExAssist helper phage를 사용하여 in vivo excision하였다. 이렇게 얻은 single colony들을 배양하여 alkaline lysis의 방법으로 plasmid를 분리하였다. 분리한 유전자들의 고온 유도 발현 여부를 Northern blot analysis로 확인한 다음, 양방향으로 sequencing하여 염기서열을 결정하였다.

Sequencing 결과, screening된 각각의 내하고 유전자들은 Hsp101, Hsp90, Hsp70, small Hsp 등의 Hsp family homolog들, Aha (activator of hsp90 ATPase), Hop (Hsp90/Hsp70 organizing protein), p23과 같은 Hsp90 machinery의 cochaperone homolog들, 그리고 Sti (stress inducible protein)와 carbonic anhydrase의 homolog들인 것으로 밝혀졌다.

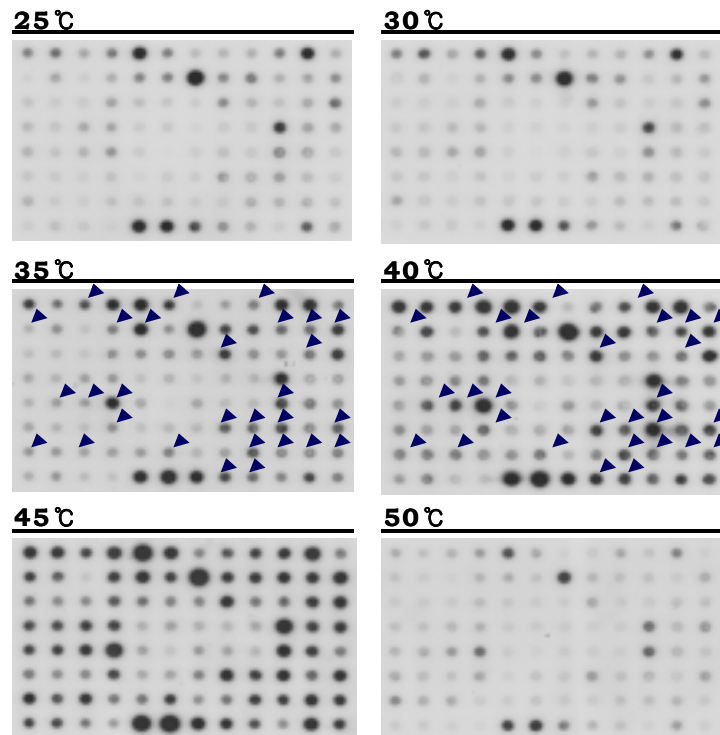


Fig. 4. Reverse-northern blot analysis of screened DNA fragments by differential display

Blue arrow indicates that DNA expression was increased at high temperature compare to control (25°C).

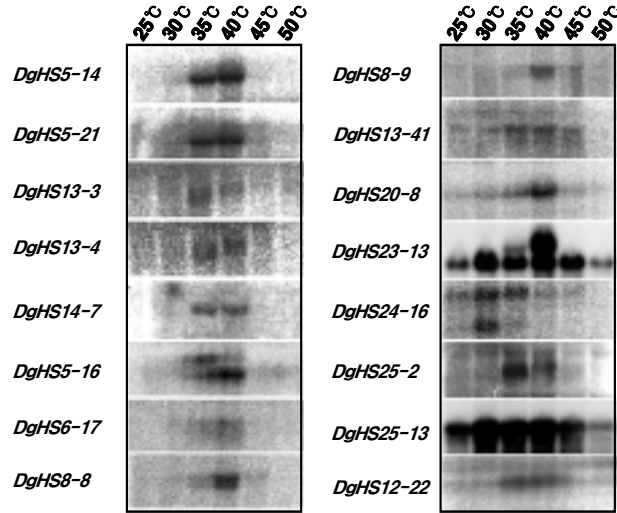


Fig. 5. Northern blot analysis of DNA fragments which were obtained by differential display

Table 3. Orchardgrass cDNA library로부터 screening 된 내하고 관련 유전자

Gene	cDNA Size (bp)	Sequence homology
<i>DgHsp101</i>	2,353	<i>Triticum aestivum</i> Hsp101c
<i>DgHsp90</i>	2,740	<i>Oryza sativa</i> Hsp90
<i>DgHsp70</i>	2,243	<i>Lilium longiflorum</i> Hsp70
<i>DgSti</i>	1,937	<i>Oryza sativa</i> stress induced protein (Sti)
<i>DgHop</i>	1,175	<i>Oryza sativa</i> Hop
<i>DgAha</i>	948	<i>Danio rerio</i> activator of heat shock 90 kDa protein ATPase (AHA)
<i>Dgp23</i>	911	<i>Brassica napus</i> p23
<i>DgHsp17.9</i>	633	<i>Pennisetum glaucum</i> Hsp17.9
<i>DgHsp17.8</i>	883	<i>Triticum aestivum</i> Hsp17.8
<i>Dg carbonic anhydrase</i>	1,728	<i>Hordeum vulgare</i> carbonic anhydrase

## 나. 내하고성 관련 유전자들의 특성연구

### 1) 선발된 유전자의 구조 결정

각각의 DNA를 Big dye sequencing kit를 사용하여 PCR한 후, ABI 377 automatic sequencer로 염기서열을 분석하였다. 유전자의 크기가 클 경우에는 적당한 restriction enzyme으로 절단하여 subcloning한 다음 sequencing하였다. 이상의 sequencing 방법으로 얻은 각각의 내하고 관련 유전자들의 염기서열을 NCBI database에서 검색하여, 어떤 유전자와 유사성이 있는지를 확인하였다.

#### 가) *DgHsp101*의 염기서열 분석

고온에 의하여 특이적으로 발현하는 유전자들 중 sequencing 결과 Hsp101의 homolog로 밝혀진 유전자를 얻을 수 있었다. 그러나 이 유전자의 전체 길이가 2 kb를 넘기 때문에 전체 염기서열을 밝히기 위하여, 여러 가지 restriction enzyme으로 잘라서 약 600~700bp 정도의 크기로 각각을 subcloning하여 sequencing하였다. 모든 sequence data를 Bioedit software 상에서 조합한 후 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 한 결과, 본 연구진이 screening한 *DgHsp101*는 빵밀 (*Triticum aestivum*)의 heat shock protein 101c 유전자와 80 % 이상의 homology가 있는 것으로 나타났다. *Hsp101*은 Hsp100 family에 속하는 유전자로서 Arabidopsis의 내열성 획득에 필수적인 유전자이며, 이 유전자의 발현량을 조절하여도 식물의 정상적인 성장과 발달 및 생산량에도 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 (Queitsch 등, 2000) 밝혀진 바 있다. 또한 yeast의 Hsp100 family인 yeast *Hsp104* deletion mutant에 Arabidopsis *Hsp101*을 형질전환하면, yeast *Hsp104*를 complementation하는 것으로 밝혀졌다 (Schirmer 등, 1994). 지금까지 Hsp101이 존재하는 것으로 밝혀진 식물은 dicot인 Arabidopsis, soybean, pea, *Brassica napus*, tobacco와 monocot인 wheat, maize, rice가 전부이다. 본 연구진이 screening한 *DgHsp101*는 2353 bp의 염기로 구성되어 있는데, 이는 지금까지 밝혀진 Hsp100 family의 유전자들의 크기 (2.8~3.0 kb) 보다 작은 것으로 나타났다. Translation하여 다른 Hsp100들과 비교한 결과, N-말단이 잘린 것으로 확인되었다. Full length 유전자를 얻기 위하여 여러 가지 방법을 동원하고 있다.

GGATCCTATCGCGGCGCACGAAGAACAATCCCGTCTCATTGGCGAGCCGGTGTGGCAAGACGGCGGTGGTGGAGGGCTCGCTCAGC	90
G S Y R G A R R T I P S S L A S P V S A R R P W W R G S L S	30
GCATCGTGCAGGAGACGTTCCGAGCAACCTCTCGACGTGCGCTCGTGGCACTCGATATGGGCGCGCTGGTCCGCGGCGCAAGTACC	180
A S C G E T F R A T S S T C A S W H S I W A R W S P A P S T	60
GGGGTGAATTCGAGGAGCGGCTCAAGGCCGTGCTTAAGGAGGTGGAGGAGCCGAGGGGAAGGTGATACTTGTTCATCGACGAGATACAC	270
G V N S R S G S R P C L R R W R R P R G R * Y L F I D E I H	90
CTCGTGTGGGCGCGGTAGGACGGAGGGTCCATGGACGCCCAACCTGTTCAAGCCAATGCTCGGAGGGGGCAGCTTAGTGCATT	360
L V L G A G R T E G S M D A A N L F K P M L A R G Q L R C I	120
GGCGCGACGACCTGGAGGAGTACAGGAAGTATGTTGAGAAGGACGCGCGTTCGAGAGGCGGTTCCAGCAAGTTTTCTGGCAGAGCCC	450
G A T T L E E Y R K Y V E K D A A F E R R F Q Q V F V A E P	150
AGCGTCCCGACACCGTCAGTATTCTGAGAGGGCTCAAGGAGAAGTACGAGGGGCACCATGGTGTGAGAATTCAGGATCGTGCCTCGTC	540
S V P D T V S I L R G L K E K Y E G H H G V R I Q D R A L V	180
GTCGCGCTCAGCTCTCGAGGTACATCATGGTCTGCCTGATAAAGCAATCGATCTAGTTGACGAGGCGTCCGCGAATGTG	630
V A A Q L S S R Y I M G R H L P D K A I D L V D E A C A N V	210
AGGGTACAACCTGACGCCAGCCTGAAGAGATTGACAACCTCGAGAGGAAGAGGATCCAGCTGGAGGTCGAGCTTATGCCCTCGAGAAG	720
R V Q L D S Q P E E I D N L E R K R I Q L E V E L H A L E K	240
GAGAAGGACAAAGCTAGTAAAGCTCGGCTAGTTGAGGTAAGAAAAGAGCTGGACGATCTGAGGGACAAGCTGCAACCCCTGCAGATGAAG	810
E K D K A S K A R L V E V R K E L D D L R D K L Q P L Q M K	270
TATCGCAAGGAGAAGGAGAATAGATGAGATCAGGACCTTGAAGCAACGTCGTGAGGAGCTGCAGTTCACTCTGCAAGAGGCTGAGCGC	900
Y R K E K E R I D E I R T L K Q R R E E L Q F T L Q E A E R	300
CGGATGGATTTGGCCGTGTGCTGACCTCAGATATGGTCTGCTAGAGATCGACGCTGCCATTGCAAAAGCTAGAGGGTGAAGGCTGGC	990
R M D L A R V A D L R Y G A L L E I D A A I A K L E G E T G	330
GAGAACCTGATGTTAACAGAGACGGTTGGCCCGGAGCAGATAGCTGAGGTCGTTAGCCGTTGGACAGGCAATTCCTGTCACTAGGCTGGC	1080
E N L M L T E T V G P E Q I A E V V S R W T G I P V T R L G	360
CAGAATGAGAAGGCGAGGCTGATTGGGCTCTCTGATAGACTGCATCAGAGGGTGGTGGACAGATGAAGCTGCAATGCAGTTGGAGAG	1170
Q N E K A R L I G L S D R L H Q R V V G Q Y E A V N A V G E	390
GCCGTTCTGAGGTCAAGGGCTGGTCTGGACGGCCCGCAGCCTACTGGTTCATTCCTGTTCTTGGACCGACCGGCTGGTAAAAC	1260
A V L R S R A G L G R P Q Q P T G S F L F L G P T G V G K T	420
GAGCTCGAGCTCGCCCAAGGCTCTTGCTGAGCAACTGTTGATGATGAAAACCTGTTTCCGCGTTGATATGCTGAATACATGGAGCAG	1350
E L E L A K A L A E Q L F D D E N L L V R V D M S E Y M E Q	450
CATTCAATGGCCCGGTAATTGGAGCTCCACCTGGTTATGTTGGTCATGAGGAAGGAGGCAACTGACAGAGCAAGTAAGGAGGAGGCCA	1440
H S M A R L I G A P P G Y V G H E E G G Q L T E Q V R R P	480
TACAGTGTCTCCTCTCGATGAGGTTGAGAAGGCGCATGTAGCAGTATTCAACACTCTGCTCCAGGTTCTCGACGATGGGAGGTTAACT	1530
Y S V I L F D E V E K A H V A V F N T L L Q V L D D G R L T	510
GATGGGCAAGGCGAGGCTGACTTCAGGAATACCGTGATCATGACTTCAAACCTTGGCGCAGACCTCCTTGTGGATGGTG	1620
D G Q G R T V D F R N T V I I M T S N L G A E H L L A G M V	540
GGGAACCTCAATGAAGGTGCTCGTATCTGGTATGCAGAAGGTGAGGAGGCATTCCCGTCCGGAGCTACTGAATCGTTGGATGAGATT	1710
G N S M K V A R D L V M Q K V R R H F R P E L L N R L D E I	570
GATGATCTTCCGACCTTTGTCCACAGCAACTGCGGAAGGTCGCTCGGTTGCAGATGAAAGATGTGGCAGTTCGCTTGCAGAAAGGGGC	1800
V I F D P L S H E Q L R K V A R L Q M K D V A V R L A E R G	600
ATTGCTTTGGCCGTGACTGATGCTGCCCTGGATGTCATCTTGTCACTGTCTTATGACCCGCTTATGGCGCCAGGCCAATCAGGAGATGG	1890
I A L A V T D A A L D V I L S L S Y D P V Y G A R P I R R W	630
ATCGAGAAGAGGATAGTGACAGAGCTCCTCAAGATGTTGATACCGGAAGAGATTGACGAGAGCTCCACAGTGTATGTTGATGCTGCTCCC	1980
I E K R I V T E L S K M L I R E E I D E S S T V Y V D A A P	660
GGCAAGGAAGAGTGGCCTATAGGGTCGACAAGAACGGAGGGTGGTGAACGCGCAGACAGGCGAGAGTGTGATCCTGATCCAGGTTG	2070
G K E E L A Y R V D K N G G L V N A Q T G Q K S D I L I Q V	690
CCTAACGGGCTGTGGGAGCGATGCGGCGCATTCGTTGAAAAGGATGAAGATCATGCAGGACGGTGGAGATGTTGATGACATGGAAGAA	2160
P N G A V G S D A A H S V K R M K I M Q D G G D V D D M E E	720
GAGTAGAAACCAACGATTGATCTCTTCTCTAGTTTCAGGTAGTAGGCTGCTGTTTCGTTTACGAACTGTTTTGTGCAACTGTCCA	2250
E *	721
AACTTCTGTTCTGGGATGGTTCGGATGTTTGAAGGTGAAGCGGACTGAATGAAATCAAGTATAGGATGCTTGTGTGCTTAAAAAAA	2340
AAAAAAAAAAAAA	2353

Fig. 6. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgHsp101*



#### 나) *DgHsp90*의 염기서열 분석

본 연구진은 Hsp90 family와 homology가 높은 2740 bp의 *DgHsp90*을 screening 하는데 성공하였다. Hsp90 family는 현재까지 Hsp family들 중 연구가 가장 폭넓게 진행되어지고 있는 단백질이며 모든 생물 종에 잘 보존되어 있는 유전자이기도 하다. 현재까지 밝혀진 Hsp90은 동물에서 steroid hormone receptor, protein kinase, cytoskeletal protein들과 interaction 하여, 열 변성된 단백질들을 보호하는 역할을 수행하는 것으로 알려지고 있다. Hsp90은 단독으로 스트레스에 관여하기도 하지만 최근까지의 보고에 의하면, Hsp90, Hsp70, Hop, Hsp40, p23으로 알려진 단백질들과 hetero multicomplex를 이루어 multiple chaperone machinery로 작용하는 것으로 알려지고 있다 (Harrell 등, 2002; Wochnik 등, 2004).

*DgHsp90*은 808개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 비의 Hsp90과 79%의 sequence identity를 나타내었다. 또한 BLAST domain search 결과, N-말단에 ATPase domain이 있는 것으로 나타났으며, 다른 종 유래의 Hsp90 단백질들과 유사성이 높았다. 기존의 Hsp90에 관한 여러 보고에서도 밝혀졌듯이, Hsp90은 ATP 의존적 기능을 수행한다. 따라서 이 단백질이 정상적으로 기능하기 위하여서는 ATPase domain이 필수적이라 할 수 있다.

#### 다) *DgHsp70*의 염기서열 분석

Hsp70은 protein folding 과정뿐만 아니라, 새로 합성되는 단백질의 folding과 불안정한 단백질들을 분해하는데도 관여한다. Hsp70 역시 Hsp90과 같이 단독으로 chaperone 기능을 수행하기도 하지만, Hsp90 chaperone multicomplex에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구진이 screening 한, *DgHsp70*은 2243 bp의 염기로 구성되어 있으며 656개의 아미노산을 encoding하는 것으로 밝혀졌다. BLAST search 결과, 카네이션의 Hsp70과 70 % 의 sequence identity를 나타내었으며, Hsp70의 특징적인 영역인 N-말단의 ATPase domain과 C-말단의 substrate binding region이 존재하는 것으로 나타났다. 이는 Hsp70이 지속적인 substrate와의 결합 및 해리에 관여한다는 것을 나타내고 있으며, Hsp70 역시 Hsp90과 같은 ATP 의존성 단백질을 시사한다. 또한 *DgHsp70* sequence는 molecular chaperone인 *DnaK*와도 유사성이 매우 높은 것으로 나타났다.

CGGCACGATGCGCAGGTGGGCGCTCTCCTCCGCTGCTCCTCGTCTCCTCCTCACCACGCTCCCGATCCAGCTAAGAGGCTCCAGGT 90  
 M R R W A L S S A L L L V L L L T T L P D P A K R L Q V 28  
 CAATGCCGAGGAGACGACGACGCTGACCGATCTGCCAAGGTAGAGGAGAAGCTTGGGCGGTTCCCATGGCTTCCACCGACTC 180  
 N A E E S S D E L T D L P K V E E K L G A V P H G L S T D S 58  
 TGAGTTGTCCAGAGGAGTCCGAGTCGATCGAGGAAGCCCTCAGGAACCTCGGCAGAGAAGTTGAGTTCCAGGCCGAGGTGCCAG 270  
 E V V Q R E S E S I S R K T L R N S A E K F E F Q A E V S R 88  
 ACTCATGGACATCATCAACTCACTCTACAGTAACAAGGACATCTTCTGAGGGAGCTCATCTCCAATGCATCCGATGCTTTGGATAA 360  
 L M D I I I N S L Y S N K D I F L R E L I S N A S D A L D K 118  
 GATTAGTTCCTTGCCTCACTGAGAAGGAGGTTTTGGGCGAAGGCGACACAGCTAAGCTTGAATCCAGATTAAGTTGGATAAGGAGAA 450  
 I R F L A L T E K E V L G E G D T A K L E I Q I K L D K E N 148  
 CAAGATCTCGATTCCGGATAGGGGTGTTGGTATGACCAAGGAAGATTTGATTAAGAACCCTTGAACCATTCGCAAACTCGAACTTC 540  
 K I L S I R D R G V G M T K E D L I K N L G T I A K S G T S 178  
 AGCTTTTGTGAGAAGATGCAGACTGGAGGTGACCTCAACCTCATTGGGCAGTTTGGTGTGGCTTCTACTCAGTATACCTTGTCTGA 630  
 A F V E K M Q T G G D L N L I G Q F G V G F Y S V Y L V A D 208  
 CTATGTTGAGTGGTCAGCAAGCACAATGATGACAAACAGTATGTGTGGGAGTCCAAGCTGATGGATCATTGCTATCTCGGAGGATAC 720  
 Y V E V V S K H N D D K Q Y V W E S K A D G S F A I S E D T 238  
 ATGGAATGAACCCCTTGGCCGGAAGTCAAGTACATCTCCGTGATGAGGCTAAGGAGTACTTGAAGAAGGCAAGCTAAAGGA 810  
 W N E P L G R G T E I K L H L R D E A K E Y L E E G K L K E 268  
 GTTGGTGAAGAAGTACTGAGTTTCAATTTCCCAATTTACTTGTGGGCAACCAAGGAGTTGATGTTGAAGTCCAGCTGATGAGGA 900  
 L V K K Y S E F I N F P I Y L W A T K E V D V E V P A D E E 298  
 GGAATCAAGTGAAGAAATCGACCCAGAGACTCGGAGGAAGAAGAGACAGAAGATGAGGAAGAGAAAAAACCAGCAAGACAGACT 990  
 S S E E S T P E T S E E E T E D E E E K K P K T K T V 328  
 AAAGGAACTACCCTGAATGGGAGCTTCTGAACGATATGAAGGCTGATGGCTTCGAAACCCCAAGGAAGTTACCGAAGAAGATATGC 1080  
 K E T T T E W E L L N D M K A V W L R N P K E V T E E E Y A 358  
 GAAGTTTACCCTCACTAGTAAGGACTTTGGCGACGACAAGCCTATGCTTGGAGTCACTTCACTGCTGAGGGAGATGTTGAGTTCAA 1170  
 K F Y H S L A K D F G D D K P M S W S H F S A E G D V E F K 388  
 AGCTTTGCTTTTTGTTCCCGGAGGCTCCACATGATCTCTATGAGAGTTACTACAATGCTAACAAGTCAAACCTTAAGTTGTTGTTAG 1260  
 A L L F V P P K A P H D L Y E S Y Y N A N K S N L K L F V R 418  
 AAGAGTTTTCATCCGATGAATTTGATGATCTTCTCCAAAGTACCTCAGCTTCTTGGTGGTATCGTTGACTCAGACACGCTGCCGCT 1350  
 R V F I S D E F D D L L P K Y L S F L M G I V D S D T L P L 448  
 CAATGTATCAGGAAATGCTTCAACAACATAGCAGTCTGAAGACCATCAAGAAGAACTGATCCGCAAGGCTCTTGACATGATAAGGAA 1440  
 N V S R E M L Q Q H S S L K T I K K K L I R K A L D M I R K 478  
 ACTTGTGAGGAATCTGATGAGTACAGCAACAAGAAAGACAGATGAAGAAAAGAGTGAATGGAGAAGAAGAGGGCCGATATGC 1530  
 L A E E D P D E Y S N K E K T D E E K S A M E K K R G Q Y A 508  
 CAAGTTCTGGAATGAGTTTGGCAATCAATCAAGTATGATGAGTATATTTCAAGGATGAAGTCAAGGCAAAAGGACATCTTTACCTTAC 1620  
 K F W N E F G K S I K L G I I E D A T N R N R L A K L L R F 538  
 TGAGAGTTCGAAGTCAGATGGCAAACTTGCTCCCTTGATGAGTATATTTCAAGGATGAAGTCAAGGCAAAAGGACATCTTTACCTTAC 1710  
 E S S K S D G K L V S L D E Y I S R M K S G Q K D I F Y L T 568  
 AGGGAGCAGCAAGGAACAGCTAGAGAAATCTCCATTCTGAGCAGCTAACCAAGAAAATTCAGAGGTTATCTACTTCCACCGACCTGT 1800  
 G S S K E Q L E K S P F L E Q L T K K N Y E V I Y F T D P V 698  
 TGATGACTCTGATGCAATACCTCATGACTATGAGGACAAGAAGTTCCAGAAGCTGTCGAAGGAGGCTTAAAGCTCGGCAAGGACTC 1890  
 D E Y L M Q Y L M D Y E D K K F Q N V S K E G L K L G K D S 628  
 GAAGTGAAGGACCTCAAGGAATCCTTTAAGGAGCTGACAGACTGGTGAAGAAGGCCCTGGACACCGAGGGCATCGACTCGGTGAAGAT 1980  
 K L K D L K E S F K E L T D W W K K A L D T E G I D S V K I 658  
 CAGCAACCGGCTGCACAACCCCTCGCTGGTTCGCTCACTCAAGTACGGGTGGAGTCCAACATGGAGAAGATCATGCAGGCACAGAC 2070  
 S N R L H N T P C V V V T S K Y G W S S N M E K I M Q A Q T 688  
 CCTCTCGGACGCCAGCAAGCAGGCGTATATGCGTGGCAAGCGGGTCTGGAGATCAACCCAGGCACCCATCATCAAGGAGCTCCGTTGA 2160  
 L S D A S K Q A Y M R G K R V L E I N P R H P I I K E L R D 718  
 CAAGTTGCCAGGACAACGAGGACGTGGGCTTGAAGCAGACGCGGAGGCTGGTGTACCAGACGGCGTGTGGAGAGCGGGTTCAACCT 2250  
 K V A Q D N E D V G L K Q T A R L V Y Q T A L M E S G F N L 748  
 CCCCAGCCTAAGGACTTTGCTCCAGCATCTACCGGTTCGGTGCAGAAGGCTGGACCTGAGCCCTGACGCGGCGTGGAGAGGAAGA 2340  
 P D P K D F A S S I Y R S V Q K S L D L S P D A A V E E E E 778  
 GGAGTTCGAGGACCCGAAGTGAAGAGAAGGAGGCCACCAAGGCGCAGAGGAGGAGGAGTATGAGCAGTACGACAAGGACGAGCT 2430  
 E V E E P E V E E K E A T K A A E E E P E Y E Q Y D K D E L 808  
 GTAGTTGCTCCTCTTTTCCGCTGACTCTGCTGTTGTTGGTCTAGGTGCAGAAGGTGACTGCTGGAATGTGATGTTTTGAGGGACG 2520  
 \* 809  
 TCCATTTTCCGTCGAAAACGAAACATGATACGGGGTTTTTCCCATGTACCTACCTAGCTTCTAATGATACTAGCTAGCTCAAA 2610  
 TAGCAGTTTCCCTTTTTCAGTAGTGCCCTTTTGCACACTTACCGTTTTGATTTTTAACAGTGTGTAGTTACAGAATGAATAATGGGGT 2700  
 TCTCAAGGTAGTCCCAAGTTCTAAAAAATAAAAAAATAAAAAA 2740



Fig. 7. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgHSP90*

```

CGCGATTCTCTTTCAGATCTCGAGTTCAGTTCCGATTTCCGTTTCGTTTCGAATCCCCGGTTCGAGCTTAGAGAGGAGGAGGAGATGGCGAAG   90
                                                                M A K
AAGGGAGGGGAGGGCCGGCGATCGGCATCGACCTCGGCACCACTACTCCTCGTGGCGTGTGGCAGCAGCACCACCGTGGAGATCATC   3
K G G E G P A I G I D L G T T Y S C V G V W Q H D R V E I I   33
GCCAATGACCAGGGAAACCGGACCAGCGCTCGTACGTCCGGCTTACCGACACCGAGCGCCTCATCGGCGACCGCCGAAGAACCAAGGTG   270
A N D Q G N R T T P S Y V G F T D T E R L I G D A A K N Q V   63
GCCATGAACCCCAACACCGTCTTCGATGCCAAGCGGTTGATCGGTAGGCGGTTTCCGACCCGTCAGTGCAGAGCGACATGAAGCTG   360
A M N P T N T V F D A K R L I G R R F S D P S V Q S D M K L   93
TGGCATTCAAGTTCATCCCGGCCCTGTGACAAGCCATGATCGTCCAGTACAAGGGAGAGGAGAAGCAGTTCGCTGCGGAGGAG   450
W P F K V I P G P A D K P M I V V Q Y K G E E K Q F A A E E   123
ATCTCCTCAATGGTCTCATCAAGATGAAGGAGATTGGGAGGCGCTACCTCGGCACCACCATCAAAAACGCTGTGGTGACGGTCCGCGCC   540
I S S M V L I K M K E I G E A Y L G T T I K N A V V T V P A   153
TACTTCAACGACTCGCAGCGCAGGCCACCAAGGACCGCGTGTATCGCCGGCTCAATGTGATGCGCATCATCAACGAGCCACCGCA   630
Y F N D S Q R Q A T K D A G V I A G L N V M R I I N E P T A   183
GCTGCCATCGCTACGGGCTTGACAAGAAGCCAGCAGCTCTGGCGAGAAGAAGTCTCATCTTCGACTTGGTGGCGCACGTTTGAT   720
A A I A Y G L D K K A S S S G E K N V L I F D L G G G T F D   213
GTGTGCTGCTCACCATTGAGGAGGATCTTCGAGGTGAAGGCCACCGCCGGGACACCCACCTTGGCGGAGGACTTCGACAACCGC   810
V S L L T I E E G I F E V K A T A G D T H L G G E D F D N R   243
ATGGTGAACCACTTCGTCCAGGATTCAAGAGGAAGAACAAGGACATCAGCGGCAATCCTCGGCCCTGCGCGGCTGCGCACAGCC   900
M V N R F E E M N M D L F R K C M E P V E K C L R D A K R   273
TGCAGCGCCGCAAGCGCACCTGTCTGCTGACTGCCAGACCACATCGAGATCGACTCTCTGTATGAGGGCATCGATTCTACTCGACC   990
C E R A K R T L S S T A Q T T I E I D S L Y E G I D F Y S T   303
ATCACCAGGGCTCGTTCGAGAGATGAACATGGACCTGTTCCGAAGTGCATGGAGCCGTTGGAGAAGTGCCTGCGCGACGCCAAGATG   1080
I T R A R F E E M N M D L F R K C M E P V E K C L R D A K R   333
GACAAGGACTGTGCACGACGTGGTCTGCTCGGCGGCTCCACCGTATCCCCAAGGTGCAGCAGCTTCTCCAGGACTTCTTCAACGGC   1170
D K S T V H D V V L V G G S T R I P K V Q Q L L Q D F F N G   363
AAGGAGCTGTGCAAGAGCATCAACCCGACGAGGCGGTGGCCTACGGCGCTGCTGTCCAGGCCCGCCATTCTCAGCGCGAGGGCAACGA   1260
K E L C K S I N P D E A V A Y G A A V Q A R H S Q R R G Q R   393
GAAGGTGCAGGACTGCTTCTCCTCGATGTCACCCCTCTGTCTCTCGGCCTGGAGACCGCGCGCGCTCATGACGACGCTCATCCCGG   1350
E G A G P A S P R C H P S V S R P G D R R R R R H D D A H P A   423
CAACACCACCATCCCGACCAAGAAGGAGCAGGTCTTCCACCTACTCCGACAACAGCCGCGGCTCCTGATTGAGGTTTCGAGGGCGA   1440
Q H H H P D Q E G A G L L H L L R Q P A G R P D S G V D A K R   453
GCGTGCCAGGACCAAGGACAACAATCTTGGCAAGTTCGAGTCTCCGGCATTCTCTGCTCCCGCGGCGTCCCCAGATCACTGTG   1530
A C Q D Q G Q Q S S G Q V R A L R H S S C S R G V P Q I T V   483
TGCTTCGACATCGACGCAACGGCATCCTCAAGTCTCGGCCGAGGACAAGACCGCCGGGTGAAGAACAAGATCACCATCAACCAACGAC   1620
C F D I D A N G I L N V S A E D K T A G V K N K I T I T N D   513
AAGGGCGGCTCAGCAAGGAGACATCGAGAAGATGGTGCAGGAGCGGAGCGGTACAAGCGGAGGACGAAGAGGTGAAGAAAAAAGTG   1710
K G R L S K E D I E K M V Q E A E R Y K A E D E E V K K K V   543
GACGCAAGAAGCAGCTGGAGACTACGCCTACAACATGAGGAACACCATCAAGGACGACAAGATCGCCGCAAGCTCTCGGCCGACGAC   1800
D A K N A L E N Y A Y N M R N T I K D D K I A A K L S A D   573
AAGAAGACGATCGAGGACCGGTCGACGGCCATCAGTGGCTCGACCAACACGCTCGCCGAGGCGGACGAGTTCGAGGACAAGATG   1890
K K T I E D A V D G A I S W L D T N Q L A E A D E F E D K M   603
AAGGAGCTGGAGGGCATCTCAACCCCATCATCGCCAGGATGACAGGGCCCTGGCGCGGACATGGGCGGATGCGCGGCATGGCTGGC   1980
K E L E G I C N P I I A R M Y Q G P G A D M G G M P G M A G   633
GGCATGGACATGGACGAGGATGTGCCGGCGGTGAAGCGGTGCTGCCCAAGATCGAGGAGGTCGAT TAAGTTCGTGTTGGGGAGTT   2070
G M D M D E D V P A G G S G A G P K I E E V D *   656
GAAATCGAATGTGATGTTTCGTCAGTCTCATCGTTTTAGGTGTTCTGTGTTTCCAAGGCCAGGTTTCAGGGTACTTTGTGATG   2160
GAAGTCTGATGGCTGCCTGTAACTTGTTTCGATTTTACCGGCACTGTACCGGTGTTTCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA   2243

```



Fig. 8. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgHSP70*

라) *DgSti*의 염기서열 분석

Sti (Stress inducible protein)은 TPR domain (Tetratricopeptide repeat domain)이 있는 Hop의 yeast homolog를 칭한다. 그러나 Sti는 Arabidopsis와 soybean에서도 밝혀진 바 있으며, 주로 stress에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 Sti는 주로 34개 정도의 특징적인 TPR domain ([WLF]-X(2)-[LIM]-[GAS]-X(2)- [YLF]-X(8)-[ASE]-X(3)-[FYL]-X(2)-[ASL]-X(4)-[PKE])으로 구성되어 있다. TPR domain은 bacteria, yeast, fungi, plant 및 동물에서도 관찰되며, 5~6개의 tandem repeat로 구성되어 있다.

*DgSti1*은 1937 bp의 염기로 구성되어 있으며, 578개의 아미노산을 encoding 한다. Rice의 Sti와 73%, Arabidopsis Sti와는 60%의 sequence identity를 보였으며, 3개의 TPR domain이 반복된 region이 전체 sequence에 걸쳐 3군데 존재하고 있었으며, C-말단에 Sti의 특징적인 영역이 있는 것으로 나타났다.

마) *DgHop*의 염기서열 분석

동물에서 밝혀진 Hsp90/Hsp70 organizing protein (Hop)은 Hsp90 chaperone machinery에서 Hsp90과 Hsp70을 연결해주는 역할을 하며, Hsp90의 ATPase 활성을 억제하는 기능을 한다. 따라서 Hop은 Hsp90의 cochaperone이라 불리며, cell 내에서 Hsp70이 client protein과 결합하여 Hsp90으로 전달해주게 되며, 이때 Hop이 Hsp70-client protein complex들을 Hsp90으로 인도하는 역할을 담당한다.

*DgHop*은 1175 bp의 염기로 구성되어 있으며, 224개의 아미노산을 encoding 한다. BLAST search 결과, *DgHop*은 rice의 Sti 및 Hop과 44 %의 동일한 homology를 나타내었다. 이는 식물체내에 동일한 역할을 하는 유전자가 multicopy로 존재하고 있다는 것을 암시하며, 본 연구에서도 *DgSti*와 *DgHop*는 sequence (8.7 % sequence identity)가 서로 다름에도 불구하고, 유사한 TPR domain을 가지고 비슷한 역할을 수행하는 것으로 추측된다. Fig. 10에서 보는 바와 같이, 두개의 단백질 간에 conserved 된 부분은 *DgSti*의 C-말단의 TPR domain과 *DgHop*의 반복된 TPR domain으로 나타났다.

GCACGCCCGCCGCCAGAGCTTCCCCGATCCCGATCCGCCATGGCCGACGAGGCGAAGGCGAAAGGTAATGCGCCTTCTCCGCCGGC 90  
M A D E A K A K G N A A F S A G 16  
AAGTTCGAGGAGCGGGCGGCACTTACGGAGCCATCGCGCTCGCCCGGGCAACCAGTGTCTACTCCAACCGCTCCGCCGCGCTC 180  
K F E E A A G H F T D A I A L A P G N H V L Y S N R S A A L 46  
GCCTCGATCCACCGTACTCCGACGCGCTCGCCGACGCGGAGAAGACCGTCGAGCTCAAGCCCGACTGGGCCAAGGGCTACTCCGCCCTC 270  
A S I H R Y S D A L A D A E K T V E L K P D W A K G Y S R L 76  
GGCGCTGCGACCTCGGCCGCGG 360  
G A A H L G L G D A A S A V A A Y E K G L A L D P S N E A L 106  
AAGGGCGGCTCGCCGACGCAAGAAGGCGCGG 450  
K G G L A D A K K A A A P P R R S P S G G G A D A I G Q M 136  
TTCCAGGGCCCGAGCTCTGGAGCAAGATCGCCGCGACCCCTCCACGCGCGCTACCTCGACGACGCGGACTTCATGCAGATGCTCGGG 540  
F Q G P E L W S K I A A D P S T R A Y L D Q P D F M Q M L R 166  
GAGGTGACGCGGAACCCAGCAGCTCAACATGTACTCTCGGACCCCGCATGATGCAGGTGCTCAGCCTCATGCTCAACATCAAGATC 630  
E V Q R N P S S L N M Y L S D P R M M Q V L S L M L N I K I 196  
CAGACGTCGCGACCCGACCTGCCGACAGCTTCCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 720  
Q T S D D P D L P Q T S S P P P P Q Q P K P E T K A R E V E 226  
CCCAGGCGAGTACCCGAGCCGATGGAGGTCTCTGACGAGGAGAAGGAGCGGAAGGAGGAAAGCGGCTGCCAGAAGGAGAAGGAGGCGG 810  
P E P V P E P M E V S D E E K E R K E R K A A A Q K E K E A 256  
GGGAACGCGCTCAAGAAGAAGGACTTCGAGACGCGCATCCAGCATTACACGAAAGCTTGGAGCTTGTGACGAGGACATCTCCTTC 900  
G N A S Y K K K D F E T A I Q H Y T K A L E L D D E D I S F 286  
CTGACTAACCGAGCGGTGTACATTGAGATGGGAAAGTACGATGAGTGCATTAAGGACTGTGATAAAGCTGTGGAGAGGGGAAGGGAA 990  
L T N R A A V Y I E M G K Y D E C I K D C D K A V E R G R E 316  
CTTCGTGCTGATTTCAAGATGGTGAAGGGCACTGACAAGAAAGGAACTGCTTGCTAAACTCGCTAAGAAGCTTAAGAAGTATGAT 1080  
L R A D F K M V A R A L T R K G T A L A K L A K N S K D Y D 346  
ATTGCCATCGAGCTTCCAGAAGGCTTAACCGAGCATCGGAACCCAGACACTTCAAAAAGCTAAATGAGGCTGAGAAGGCAAGAA 1170  
I A I E T F Q K A L T E H R N P D T L K R L N E A E K A K K 376  
GACTTGGAGCAACAAGATATTATGACCCGAAGTTAGCAGATGAGGAGAGAGAGAAAGGTAATGAGATGTTCAAGCAACAAAAGTATCCA 1260  
D L E Q Q E Y Y D P K L A D E E R E K G N E M F K Q Q K Y P 406  
GAAGTAATAAAGCATTACAATGAGGCTCTCAGGAGGAACCCCAAGGATTTCAAGGTGTACAGCAATAGGGTGCATGCTACACCAAGTTG 1350  
E V I K H Y N E A L R R N P K D F K V Y S N R A A C Y T K L 436  
GGAGCCATGCCTGAAGGCTTAAAGATGCGAGAGAAATGATTGAGCTAGACCCCACTTCTCCAAGGGTACACAAGGAAAGGTCGAATT 1440  
G A M P E G L K D A E K C I E L D P T F S K G Y T R K G A I 466  
CAGTTTTTCATGAAAGAACATGAAAAGGCAATGGAACCTTACCAGGCTGGGTTGAAGCATGATCCGAACACCAAGAATTGCTTGTGAGT 1530  
Q F F M K E H E K A M E T Y Q A G L K H D P N N Q E L L D G 496  
ATAAGGAGGTGTTGAGCAGATCAACAAGCCAACAGGGCGATATAAGTCAGGAGGACCTGAAGGAGAAACAGAATAAAGCTATGGCG 1620  
I R R C V E Q I N K A N R G D I S Q E D L K E K Q N K A M A 526  
GACCCAGAAATCCAGAACATTTACCAGTCTATCATGCGACAGGTATTGATGGATTTCCAGGAGAACCCTAGTGTGCTCAGCATCAT 1710  
D P E I Q N I L T D P I M R Q V L M D F Q E N P S A A Q H H 556  
CTCAAGGACCTTGGTGTGCAATGAAGATTCAAAAGCTCATAAAGCTGGAATAGTCCAACGAGAATAAAGCTGCTTCTGTGGGCAC 1800  
L K D P G V A M K I Q K L I N A G I V Q T R \* 578  
TTGTTGGTCTCTGTTGGGTCGCCCTCCCGTAAACTTTTATCTCCCGAGTCGAACTTCCAATGTACGCCATTCTCTGGTGTGTTTT 1890  
TGTGAGTACAGCTTTCCACACTGTCAATTCAAAAAATAAAAAAAAAA 1937



Fig. 9. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgSti*

```

GGGCTGCTGGGCATGGACAGCAGGACGCGGTCAAACCTTTTCTCGAACACAATGCTAAGCCAAACAATGAAACTGCCGATGGTATCACGT  90
CTCTCTTGTCTGCTGTTGCTGCTGGTTCCTCCCATGCTTGGAGGTTCTAATCGAGGCAGGTGCAAACCCAAATGCTACTGCGGGTGGAG  180
CAACCCCATTCATATTGCTGCAGATAGTGAAATCTTGAATGATCAAATGTTTGTCTCAAGCAGGAGGTGACCCAAACACCTCTGATG  270
      M I K C L L Q A G G D P N T S D D  17
ATGATGGATTTAAGCCAATACAGGTTGCTGCATTAAGGGATAACCTTGAAGTCGTGGAACATCTTTTACCATTGACTTCTCCAATCCCAG  360
  D G F K P I Q V A A L R D N L E V V E H L L P L T S P I P G  47
GTGTTTCGAATTGGACTGTTGATGGAATAGTGGAGTACACATTGTCTAAAATGGCCGAGGAGAAGGCGCAAGTAAACGAAGCAGCCAGTT  450
  V S N W T V D G I V E Y T L S K M A E E K A Q V N E A A S S  77
CACAGAGACGACAACCAAGTTGAGGTTTCACCTGAGGCGAAAAAGAGATCCTTGGAGGCCAAATCCAGAGGTGATGATGCCCTCAGAAGAA  540
  Q R R Q P V E V S P E A K K R S L E A K S R G D D A F R R K  107
AAGACTACCTAGTAGTGTGGATGCGTATACACAGGCAATCGAGTTTGACCCGAATGAGGCCGCACTGCATTGCAACAGAAGCCTCTGTT  630
  D Y L V A V D A Y T Q A I E F D P N E A A L H S N R S L C W  137
GGTTGCGGGCAGGCAAGGCGAGCGTGCCTAGAGGACGCGAGGATGTGCCGGGCACTGAGGCCGAGTGGGCTAAGGTTGCTTCAGGG  720
  L R A G Q G E R A L E D A R M C R A L R P E W A K G C F R E  167
AAGGCGCCGCGCTGCGCCTGCTGCAGAGGTTTCGAGGAAGCCGCAATGCCCTTACGAGGGGTGCAGCTCGAGCCGAGAACAAGAGC  810
  G A A L R L L Q R F E E A A N A F Y E G V Q L E P E N K E L  197
TTGTGAACGCGTTTCAAGGAAGCGGTGCAAGATGGGAGGAAGTCCATGGGACGGACAAGCCTGCGAATGGTACACAGTCCGAAATGAGATG  900
  V N A F R E A V Q D G R K F H G T D K P A N G T Q S E *  224
GACAATTGCCGACGAACCGAAGTTGTGCTAGCTGCTTGGATGAGTTGTCTGTTTCAGAATGGCATCAACAATCCCTTCTACTTGTCTGCAG  990
AGTTCGGTTAGAAATTTATAGTTGGGTTTTGCAACTCGATTAGCCCTGTATGGTATGAGTATTTTTACCGTGGTTATCCGACAGAGAGAG  1080
GGAAATCTGAAGCGAGAATATGTGTATTGTGTCAAGTGATGTTACAAATGACCCGTCACGACTCACGAGGGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1170
AAAAA  1175

```



Fig. 10. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgHOP*

```

DgSti  MADEAKAKGNAAFSAGKFEEAAGHFTDAIALAPGNHVLYSNRSAALASIHRYSDALADAE 60
DgHop  -----

DgSti  KTVELKPDWAKGYSRLGAAHLGLGDAASAVAAYEKGLALDPSNEALKGGLADAKKAAAAP 120
DgHop  -----MIKCLLQAGGD 11
          : .. *..

DgSti  PRRSPSGGGADAIGQMFQGPPELWSKIAADPSTRAYLDQPDFMQMLREVQRNPSSLNMYLS 180
DgHop  PNTSDDDG-----FKPIQVAALRDNLEVVEHLLPLTSPIPGVSNWTV 53
* . * . . *          . . * * : : : * : . . : :

DgSti  DPRMMQVLSLMLNLIKIQTSDDPDLPTSSPPPPQPKPETKAREVEPEPVPEPMEVSDEE 240
DgHop  DGI VEYTL SKMAE EKAQVN-----EAASSQRRQPVEVSPEA 89
* : . * * : * * .          * . . : * : * *

DgSti  KERKERKAAAQKEKEAGNASYKKKDFETAIQHYTEKALELDDEDI SFLTNRAAVYIEMGKY 300
DgHop  KKR-----SLEAKSRGDDAFRRKDYLVAVDAYTQAEFD----- 123
* : * : : * . * : : : * : . * : * : * : *

DgSti  DECIKDCDKAVERGRELRADFKMVARALTRKGTALAKLAKNSKDYDIAIETFQKALTEHR 360
DgHop  -----

DgSti  NPDTLKRLNEAEKAKKDLEQQEYYDPKLADEEREKGNEMFKQKQYPEVIKHYNEALRRNP 420
DgHop  -----P 124
          *

DgSti  KDFKVYSNRAACYTKLGAMPEGLKDAEKCIELDPTFSKGYTRKGAIQFFMKEHEKAMETY 480
DgHop  NEAALHSNRSLCWL RAGQGERALEDARMCRALRPEWAKGCFREGAALRLLQRFEAAANAF 184
: : : * * : * : * . * * * * * * * * * * * * : : : * : :

DgSti  QAGLKHPNNQELLDGIRRCVEQINKANRGDISQEDLKEKQNKAMADPEIQNILTDPIMR 540
DgHop  YEGVQLEPENKELVNAFREAVQDGRKFHGTDKPANGTQSE----- 224
* : : * : * : * : : * . * : * . : : :

DgSti  QVLMDFQENPSAAQHHLKDPGVAMKIQKLI NAGI VQTR 578
DgHop  -----

```

**Fig. 11. Comparison of the deduced amino acid sequence of the *DgSti* and *DgHop***

Stars (\*) mark positions of perfectly-conserved amino acids and colons (: ) and dots (.) mark highly-conserved position in the order.

바) *DgAha*의 염기서열 분석

Activator of Hsp90 ATPase (Aha)는 Hsp90의 chaperone machinery에서 binding partners로서 기능을 하며 yeast에서 human까지 다양하게 보존 되어있다. Aha는 Hsp90의 중간 부분에 binding하며, 세포가 아주 심한 stress를 받아 Hsp90의 역할이 제한받는 상황이 되면 Hsp90의 ATPase activity를 높여주어 Hsp90과 다른 protein간의 complex를 이루는데 도움을 주는 cochaperone으로서의 역할을 담당한다.

*DgAha*는 958 bp의 염기로 구성되어 있으며, 213개의 아미노산을 encoding 한다. *DgAha*는 zebrafish의 Aha와 28%, human과 26%의 homology를 나타내며, 단백질의 중간 부분부터 C-말단에 걸쳐 잘 보존되어 있다.

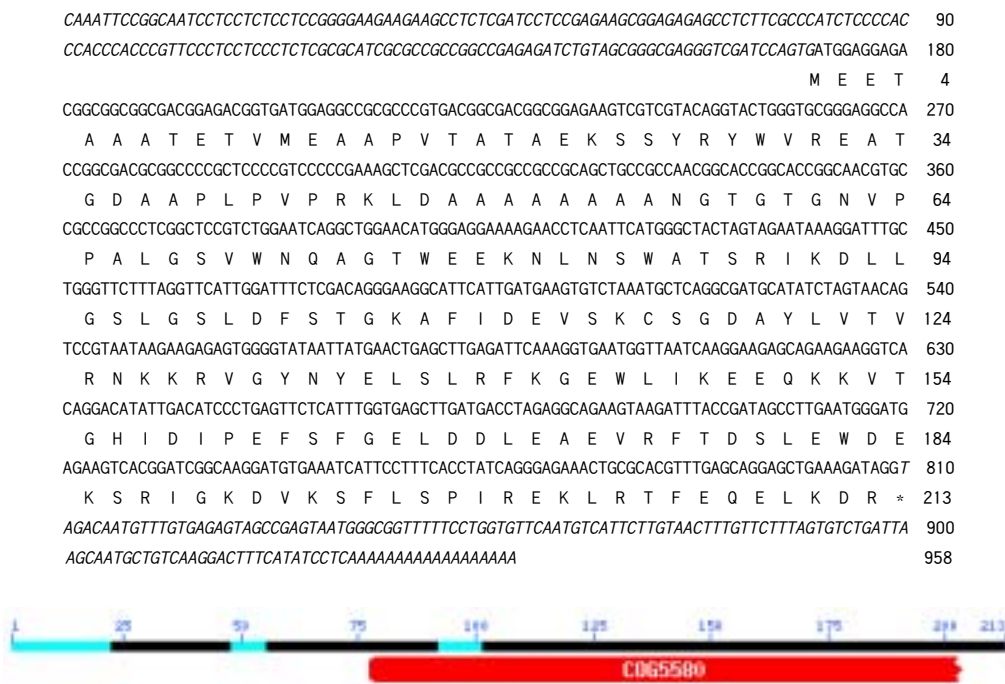


Fig. 12. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgAha*



사) *Dgp23*의 염기서열 분석

동물계에서 p23은 Hsp90의 cochaperone으로 Hsp90과 결합하여 많은 세포조절단백질의 folding에 관여하는 것으로 추측되고 있다. 최근까지의 연구로 p23은 Hsp90의 ATPase activity가 있는 N-말단에 binding하는 것으로 알려지고 있으나, 그 기능은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다. 최근 식물에서도 동물계와 같은 Hsp90 샤페론 기구가 존재하는 것으로 밝혀지긴 했으나 아직 p23의 관련 여부뿐만 아니라 이 단백질에 대한 연구는 전혀 되어있지 않다.

본 연구진은 orchardgrass cDNA library로부터 고온에 특이적으로 발현하는 *Dgp23* homolog를 screening하였으며 sequencing 결과, *Dgp23*은 911 bp의 염기로 구성되어 있으며, 180개의 amino acid를 encoding하는 것으로 나타났다. BLAST database search 결과 유채 *p23* homolog와 55% 그리고 *Arabidopsis*의 p23 homolog와는 47%의 sequence identity가 있는 것으로 나타났다. 현재까지 식물에서 밝혀진 p23 homolog들은 이상에 언급한 두 식물뿐이며, 아직 그 기능은 전혀 밝혀지지 않고 있다.

아) *DgHsp17.8*의 염기서열 분석

Hsp family들 중 가장 작은 molecular weight의 small heat shock protein (sHsp) 들은 모든 생물 종에 걸쳐 잘 보존되어 있는 단백질로 Hsp들이 가지고 있는 chaperone 기능이 다른 Hsp들보다 높은 것으로 알려져 있다. 이는 sHsp들간의 heterocomplex oligomerization에 의해 최종적으로 200~800 kDa까지 multi protein complex를 이루어, substrate가 binding 할 수 있는 부위가 늘어나기 때문이라 추측된다. 또한 sHsp들에는 공통적으로  $\alpha$ -crystallin domain이 있으며, 이 domain이 chaperone activity를 조절하는 것으로 알려져 있다.

Orchardgrass cDNA library로부터 분리한 *DgHsp17.8*은 883 bp의 염기로 구성되어 있으며, 184개의 아미노산을 encoding한다. BLAST search 결과, 빵밀의 sHsp17.8과 79%, 옥수수의 sHsp18과는 67%의 homology를 나타내었다. 또한 다른 sHsp들과 같이 이 단백질의 중간 부분에는  $\alpha$ -crystallin domain이 잘 보존되어 있었다.

```

CCCAGTCAGACTCCAACCTTAGCACCTAGATCCCCACGCAGGAGGAGGGCGAGTCTCGCGTCCGGAATTCGAAGAGCAAGCATGAGT 90
M S 2

CGCCACCCGAGCACCAAGTGGGCGCAGAGGTCCGACAAGGTGACTTGACCATCGAGCTCCCTGACGCCAAGGATGTGAAGCTCAACTTG 180
R H P S T K W A Q R S D K V Y L T I E L P D A K D V K L N L 32

AAGCTGATGGCCATTTCAACTTCTCGGCAAAGGGCTCTGATGATATGCAGTATGAGCTTGACCTTGAGCTCTTCGATGCTGTCAATGTT 270
K P D G H F N F S A K G S D D M Q Y E L D L E L F D A V N V 62

GAGGAGAGCAAGGCAGCTGTCGCCCGAGGACTATATGCTACCTTGTCAGAAAAGCTGAGAGCACCTGGTGGCTAGGCTGCTAAAGAAG 360
E E S K A A V A P R T I C Y L V K K A E S T W W P R L L K K 92

GAAGGCAAGCCACCTGTGTTCTGAAGGTTGACTGGGACAAATGGCAAGATGAGGATGATGAAGATGCTGGATTGGTGGTGACTTTGGT 450
E G K P P V F L K V D W D K W Q D E D D E D A G F G G D F G 122

GATATGGATTTCTCGAAGCTGGGCATGGGAGGTGATGACGGTGATGAGATTGAGGAGGATGAGGATGAAGATGATAATATGGTTGACAGT 540
D M D F S K L G M G G D D G D E I E E D E D E D D N M V D S 152

GCTAACAAAGAGGTTGAAGACGTCAAGCCAGAAGGGAGCAAGGGAGAGGAAGCTCCAGCAGCAACCACGGATGAAGCAAAGCCA TGAAAA 630
A N K E V E D V K P E G S K G E E A P A A T T D E A K P * 180

ACCTGGAGGCAATCTCCATCCATGCCCTTCTTTGTAATGATCACCAGATCTCTGGTTAGATGCTACGTAGATTTTTGGTGAATTCTGGA 720
GAATGGATCACTGCCGTTAGATGTGGTGTGGAGCTTTGGCTGATACTTGC GGCTATTGTTAGTACTACCTGACGGTACTATCTTTAT 810
AATCGTAGATATTCTGGATTCTGCTATTGTGGTTCGCATATGCATATGGTTTAGAAAATAGTTATGTCTGTTTAGCCCTGCAAAAAAA 900
AAAAAAAAAA 911

```



Fig. 13. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Dgp23*

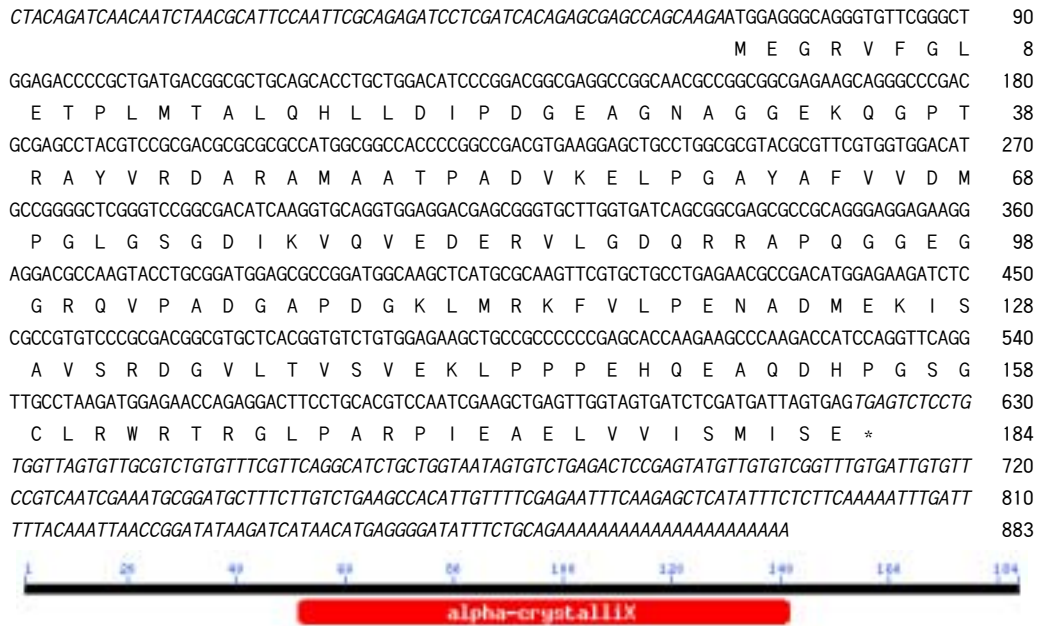


Fig. 14. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *DgHsp17.8*

자) 기타 heat inducible genes

지금까지 열거한 내하고 관련 유전자들 이외에도, 본 연구진은 총 유전자 길이가 1728 bp (Fig. 15)인 carbonic anhydrase homolog와 633 bp(Fig. 16)의 sHsp17.9 homolog를 screening하였다. Carbonic anhydrase homolog의 경우 보리의 carbonic anhydrase와, sHsp의 경우 pearl millet의 sHsp17.9와 높은 homology를 나타내었다.

```

GCCTACTGCAAGATCAAGTACTCCGGTATTGGGTCAGCCATTGAGTACGCCGTGTGTCTCAAGGTTGAGTGCATCGTTGTGATTGGCCACAGCCGCTGCGGTGGAATCAAGGCACTC 120
CTGTCACTCAAGGATGGCGCAGACGACTCCTTCCACTTCGTGCGAGGACTGGGTGAGGATCGGGTACCTGCCAAGATGAAGGTGAAGAGTGAGTGTCTCGTTGCTTTTGTGACCAG 240
TGGCCTGTCTTGGAAAAGGAGGCCGTGAACACGTCCTCCAGAACCTCACCACCTATCCGTTTGTCAAGGAAGGTGGCCACGGAACTCTCAAGCTCGTGGCGGACACTACGACTTC 360
GTCTCCGGCAAGTTCGACACATGGGAGCTGTAATCTTCCCATCGGTTAACTTACACATACATACGTATACATACGTACATATACCAAGATATTGTCCGACCAACCGATCCACGTGGA 480
TGCAAGTCCAGTGCCATGGAGTTCGTGCTTGTATTTTGCAGTGTGAATGCGGGATGGCTCGATGTGAATTTGTAATAAGCCATAGTTGGTCTACCATTTTGCAGCCCGGTTGTAT 600
GTGTGATGCATAAATGATCTTCCGTGATCAAAAAGACATCATATATAAATATTTTCAATAATATTATCACGAAGAGTTTACCTTTTGAIAAAAAAAAAAAAAACCTCGTCCGTTAGCA 720
CCTAGATCCCCACGCAGGAGGAGGCGAGTCTCGGTCGGGAATCCGAAGAGCAAGCATGAGTCGCCACCCGAGCACCAGTGGGCGCAGAGTCCGACAAGGTGACTTGACCATCG 840
AGCTCCCTGACGCCAAGGATGTGAAGCTCAACTTGAAGCCTGATGGCCATTTCAACTTTCGGCAAGGGCTCTGATGATGACAGTATGAGCTTGACCTTGAGCTCTCGATGTGCA 960
ATGTTGAGGAGAGCAAGGACGTGTCGCCCCGAGGACTATGCTACCTTGTCAAGAAAGCTGAGAGCACCTGGTGGCCTAGGCTGCTAAAGAAAGGAGGCAAGCCACCTGTGTTCTGA 1080
AGGTTGACTGGGCAAAATGGCAAGATGAGGATGATGAAGATGCTGATTGGTGGTACTTTGGTGATATGGATTTTCGAAGCTGGGATGGGAGGTGATGACGGTATGAGATTGAGG 1200
AGGATGAGGATGAAGATGATAATATGTTGACAGTGTAAACAAAGAGGTTGAAGACGTCAAGCCAGAGGAGCAAGGGAGAGGAAAGCTCCAGCAGCAACCAGGATGAAGCAAAGCCAT 1320
GAAAAACCTGGAGCAATCTCCATCCATGCCCTTCTTTGTAATGATCACCAGATCTCTTGGTTAGATGCTACGTAGATTTTGGTGAATTCGGAGAATGGATCACTGCCGGTAGATGTG 1440
GTGTTGGAGCTTTGGCTGATACTTGGGGCTATTGTTAGTACTACTGACGGTACTATCTTATAATCCGCTAGATATCTGGATTCTGCTATTGGTGGCGCATATGCATATGGTTAG 1560
AAAATAGTTATGTCCTGTTTAGCCCTGCATATTAATGTTACTACCTCCGATGTTACTAGT 1620TATTGCGTTGACGAGAAACCGGGATTGCACACTCTGTGTACACTGTACATGCA 1680
GCTGTAGTTACAACTTGCTAGTTCTAATATAAGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1728

```

Fig. 15. Nucleotide sequence of *Dg carbonic anhydrase*

```

CAGCAGCGGCAGCCTCTCCCTCGTTCGCGGCGACCTCCGAGACCGCGGCTTCGCCGGCGCGCGGATCGACTGGAAGGAGACCCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCCGAGCTGC 120
CGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGACGGCAACGTGCTGCAGATCAAGCGCGCAGCGGAACAAGGAGCAGGAGGAGAAGTCTGACACCTGGCACCGCTGGAGCGC 240
AGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCAAGGCTCCGGAAGAACGCAAGGCGGAGCAGATGAAGGCTTCCATGGAGAACGGCGTCTCACCGTCAACCGTCCCAAGGAGGAGGCAAGAAG 360
CCCAGGTGAAGTCCATCCAGATCCCGGCTAGACGCTCGCTGCTTGGAACTTGAGGTTGATTCGCTTTTAAATCAGAGCCTGTAACAAGTGTGATTGGGTCAAGTGTGAGTGTGAA 480
TGTGTTCCGTTGTCTGCTGCTGATGTTATGTTATGATGAGTGTCTGATTGATACGGAGTGTGAGCCTGAACTCTGTTACTATATACACTTCTGTACTGGTTAAGCTTGATTNCTA 600
GCGGAGCAATCTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 633

```

Fig. 16. Nucleotide sequence of *DgHsp17.9*

2) 선발된 유전자의 분자생물학적 특성연구

Orchardgrass cDNA library로부터 screening한 내하고 관련 유전자들의 특성을 연구하기 위하여 여러 가지 온도처리, hormone 그리고 다른 stress 처리를 한 오차드 그스로부터 RNA를 추출하여 Northern blot analysis를 수행하였다.

가) *DgHsp101*

Hsp들 중 식물에서 가장 연구가 많이 진행된 family인 Hsp100은 고온에 특이적으로 발현하는 유전자이다. Differential display를 통하여 분리한 *DgHsp101* partial DNA를 probe로 한 Northern blot 분석 결과, 이 유전자는 35°C와 40°C의 고온처리에 의하여 발현량이 증가하는 것으로 관찰되었다. cDNA library로부터 screening한 2.3 kb의 N-terminal truncated *DgHsp101*을 probe로 Northern blot analysis를 수행한 결과, 40°C에서 시간별로 처리하였을 경우 처리 10분부터 발현량이 증가하기 시작하여 처리 후 1시간째에 가장 강하게 발현하였으며 그 이후 점차 감소하는 것으로 나타났다. 반면 저온 stress (4°C)에 의한 발현량의 변화는 관찰할 수 없었으며, 지금까지 보고되지 않은 salt stress (NaCl)와 Abscisic acid (ABA) 처리에 의해 발현량이 다소 증가하는 것으로 나타났다.

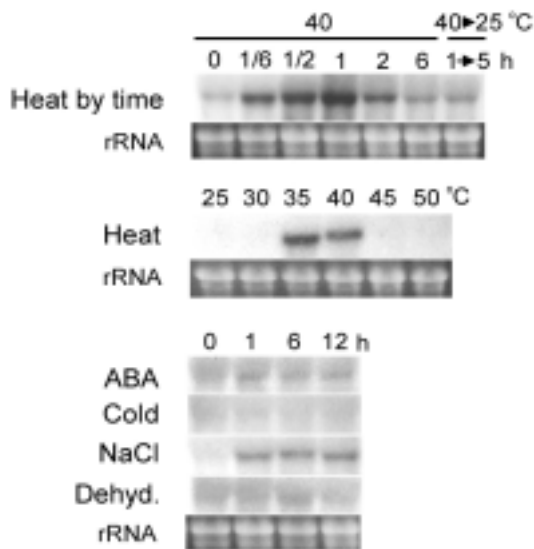


Fig. 17. Northern blot analysis of *DgHsp101*

나) *DgHsp90*

*DgHsp90*은 다른 heat shock gene들과는 달리 25°C의 상온에서도 다소의 발현이 관찰되었다. 35°C 열처리에 의해서 대조구에 비하여 발현량이 많이 증가하였지만 40°C부터는 점차 감소하였다. 온도처리 시간에 따른 *DgHsp90*의 발현량의 변화는 거의 일어나지 않았다. 이는 다른 Hsp들이 heat stress에 의해 유도되는 것과는 달리 Hsp90은 정상조건에서도 발현하여 Hsp90 signal transduction network을 구성하고 있기 때문인 것으로 추측된다. 세포가 어떤 stress 상황에 노출되면 세포내 ROS (Reactive Oxygen Species)가 증가하게 되며, 이는 세포를 apoptosis나 necrosis로 유도한다. 심각한 고온 stress도 이와 유사한 경로를 거칠 것이라 생각되며, 이와 같은 stress가 주어졌을 경우, 과연 Hsp family들 중에 어떤 protein이 작용하는 것일까? 세포내 ROS의 양을 빠른 시간 내에 증가시키는 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 처리하였을 경우, 여러 Hsp family들 중 Hsp90과 Hsp70의 발현량만 증가하는 것이 관찰되었다. 이들 단백질들과 cell death와의 관계는 더 연구되어야 할 것이다.

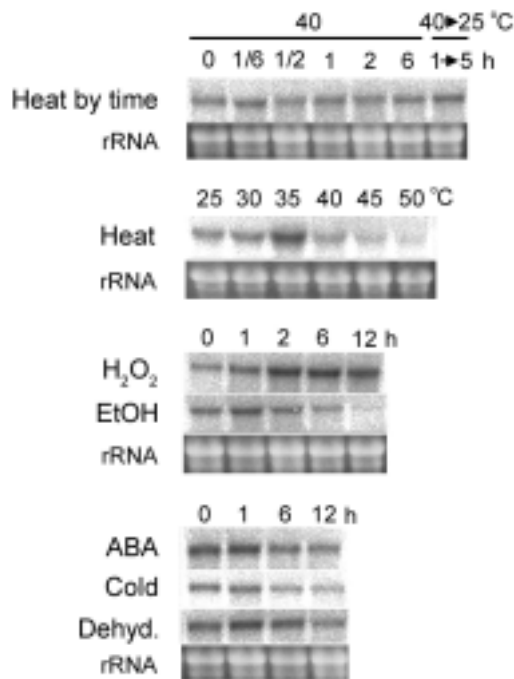


Fig. 18. Northern blot analysis of *DgHsp90*

다) *DgHsp70*

*DgHsp70*은 *DgHsp90*과 같이 25°C의 상온에서도 약하게 발현되었다. 정상적인 조건 하에서도 고온 스트레스 상황만큼은 아니지만 약간의 chaperone activity에 의한 protein folding이 진행된다. 그러나 고온 스트레스를 받을 경우, 생체내의 정상적인 protein folding 기능은 소실되고 chaperone에 의한 folding 기능이 현저하게 증가하게 된다. 따라서 *Hsp90*과 *Hsp70*의 경우, 정상조건에서도 다소 발현되어 기능을 유지하는 것으로 보인다. 고온 처리시 35°C까지 지속적으로 발현량이 증가하였으며, 40°C에서는 열처리 후 2시간까지 발현량이 증가하다가 이후 감소하였다. *DgHsp70*은 특이하게 ethanol의 처리에 의해 강하게 발현이 급증하였으며, hydrogen peroxide에 의해서도 다소 발현되는 것으로 나타났다. 반면, 다른 stress에 의해서는 큰 차이를 관찰할 수 없었다.

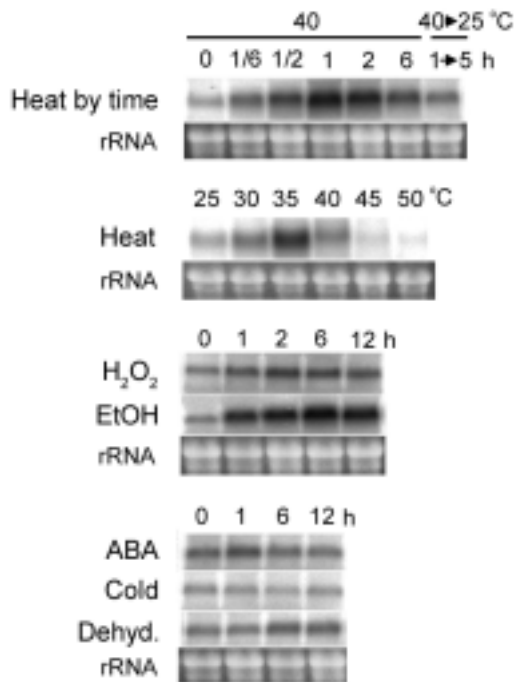


Fig. 19. Northern blot analysis of *DgHsp70*

라) *DgSti*

고온처리 (35°C와 40°C)에 의하여 *DgSti*가 강하게 발현되었다. 40°C에서는 열처리 후 1시간째에 급격하게 발현되어 2시간째에 가장 강하게 발현되었으나 그 이후 급격히 감소하였다. 이 결과로 *DgSti*는 stress 초기에는 관여하지 않는 것처럼 보이며, 스트레스 상황이 계속 지속될 경우에 기능을 하는 것으로 추측된다. *Sti*는 stress inducible protein의 약어임에도 불구하고 *DgSti*의 경우, 고온 이외의 스트레스에 의해서는 발현되지 않거나 salt stress와 drought stress에 의하여 발현량이 오히려 감소되었다. 이는 지금까지 밝혀진 *Sti*와 *DgSti*는 그 기능이 다를 수 있음을 암시한다.

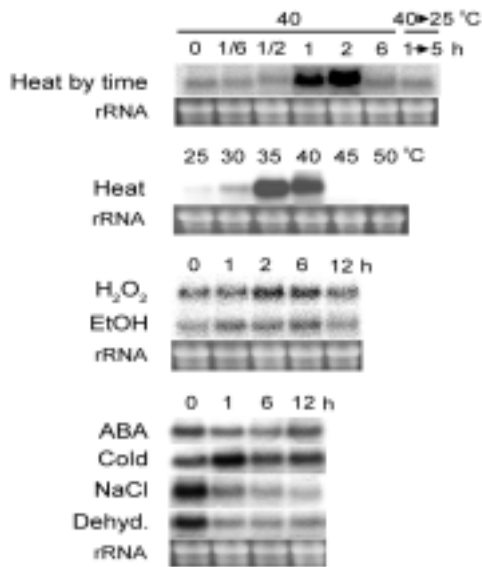


Fig. 20. Northern blot analysis of *DgSti*

마) *DgHop*

*DgHop*은 본 연구진이 screening 한 많은 Heat shock gene들에 비해 고온 스트레스에 의한 발현량이 낮았다. 그러나 40°C의 고온처리 시간이 경과함에 따라 발현량이 서서히 증가하여 다른 내하고 관련 유전자들과는 달리 처리 6시간째에도 발현이 지속되었다. *DgSti*와 마찬가지로 고온 이외의 스트레스에 의해서는 발현의 차이를 관찰할 수 없었다.



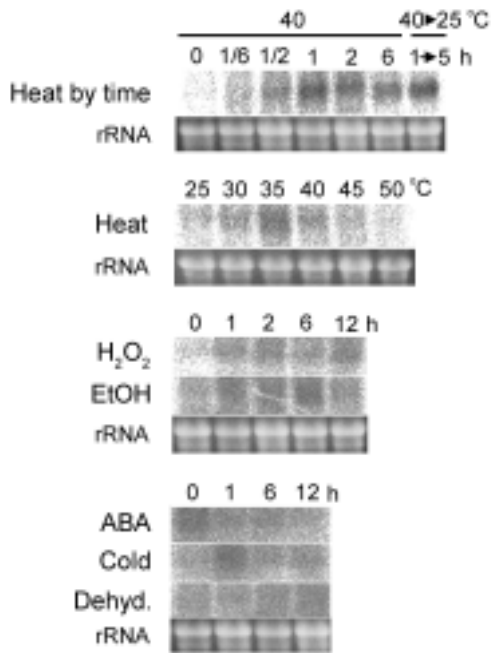


Fig. 21. Northern blot analysis of *DgHop*

바) *DgAha*

*DgAha*은 35°C와 40°C의 고온 처리에 의해 강하게 발현되었으며, 40°C의 고온 처리 후 1시간째 가장 강하게 발현되었으며 6시간 이후에도 어느정도 발현이 지속되고 있었다. ABA에 의해 발현이 조절되는 것으로 나타났으며 다른 stress에 의해서는 명확한 변화양상을 관찰할 수 없었다.

사) *Dgp23*

*Dgp23*은 35°C의 고온처리에 의해 발현량이 증가하였으며, 다른 high molecular weight Hsp들에 비해 열처리 후 10분 이내에 빠르게 발현이 증가하였다. 또한 ABA와 salt 처리에 의해 약하게 발현량이 증가하였으나, cold stress에 의해서는 오히려 감소하였다.

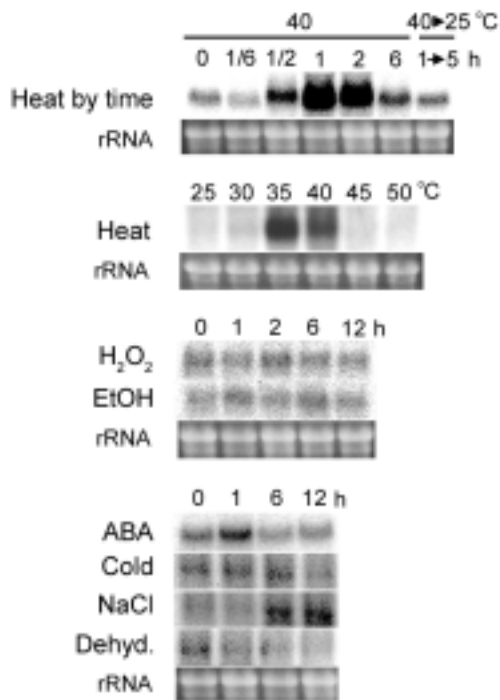


Fig. 22. Northern blot analysis of *DgAha*

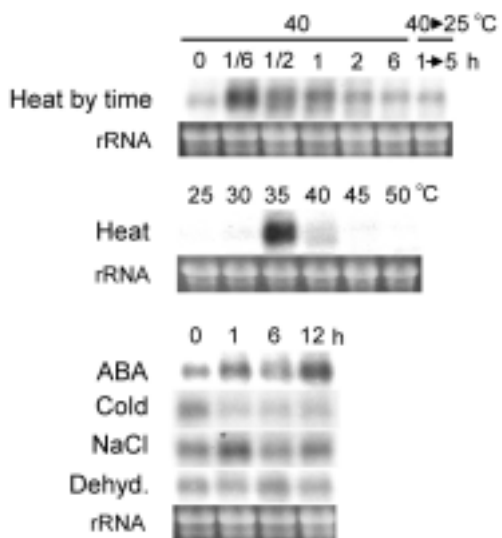


Fig. 23. Northern blot analysis of *Dgp23*

아) *DgHsp17.8*

다른 거대분자 Hsp들에 비해 Dgp23과 같이 상대적으로 작은 sHsp인 *DgHsp17.8*도 고온 처리 후 빠르게 induction되었으며, 35°C의 고온 처리에 의해 가장 많이 발현되었다. Kuo등 (2000)은, sHsp의 경우 ethanol에 의해 발현이 유도되며, 식물의 thermotolerance 및 ethanol tolerance에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. *DgHsp17.8*도 ethanol에 의해 강하게 발현된 반면 다른 stress에 의한 발현량의 차이는 관찰할 수 없었다.

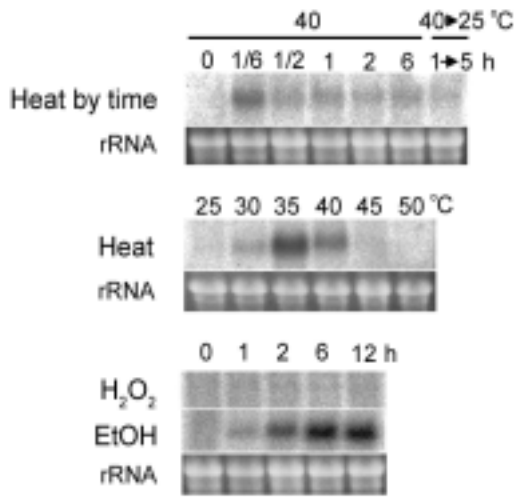


Fig. 24. Northern blot analysis of *DgHsp17.8*

자) 기타 heat-inducible gene

Carbonic anhydrase의 homolog는 40°C의 고온처리 후 10분 이내에 강하게 induction되어 고온처리 후 6시간까지 발현이 지속되었다. ABA, salt stress 및 drought stress 처리에 의해서는 발현이 증가되었으나 cold stress에 의해서는 오히려 감소하였다 (Fig. 25).

Small heat shock protein의 하나인 *DgHsp17.9*는 고온처리에 따른 시간별 발현량의 변화를 볼 수는 없었다. 그러나 40°C에서 1시간동안 고온처리를 했다가 25°C로 되돌렸을 때는 발현양이 증가하였다. 이 유전자는 ABA 처리에 의해서는 발현이 감소되었으며 다른 스트레스에 의해서는 차이가 없는 것으로 나타났다. (Fig. 26).

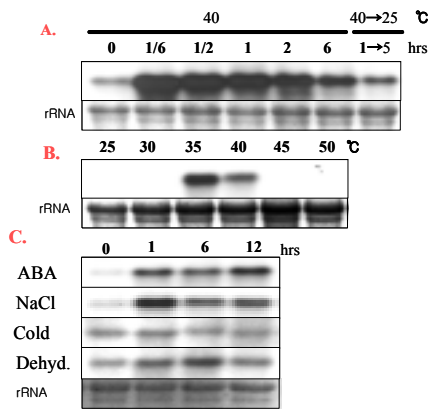


Fig. 25. Northern blot analysis of *D. glomerata carbonic anhydrase*

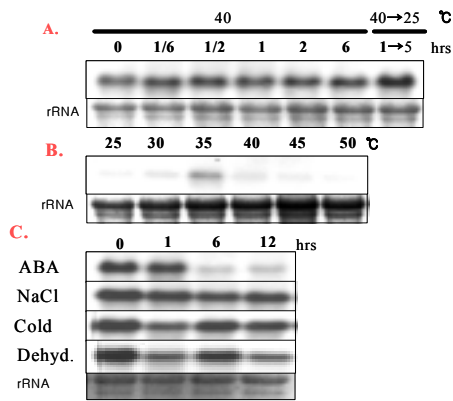


Fig. 26. Northern blot analysis of *DgHSP17.9*

### 3) 내하고 관련 단백질들의 특성연구

#### 가) 내하고 관련 단백질들의 샤페론 활성

Heat shock protein들은 구조적으로 불안정한 상태에 있는 단백질과 결합하는 성질이 있으며, 번역직후의 단백질의 folding, 막내수송에 적합한 구조로의 변환, 변성단백질의 분자응집의 저해, 혹은 변성 응집한 단백질 분자를 정상적인 상태로 되돌리는

등 molecular chaperone으로서 중요한 생리기능을 맡고 있다. 본 연구진은 지금까지 screening한 10개의 유전자 중에 *DgHsp90*, *DgHsp70*, *DgSti1*, *DgHop*, *DgAha1*, *Dgp23*, *DgHsp17.8*을 적절한 제한효소로 절단한 후, 연구방법에서 기술한 GST fusion protein expression vector인 pGEX 종류 중 frame이 맞는 vector에 cloning하였다. 각각의 내하고 관련 유전자를 *E. coli* 내에서 발현시켜, protein을 생산하였으며, GST fusion protein만을 순수 분리하기 위하여 Sepharose4B와 binding시켜 reduced glutathione으로 fusion protein 상태로 분리하거나, Factor Xa로 fusion 부위를 절단하여 native protein만을 분리하였다. 내하고 관련 단백질의 샤페론 활성은 이상과 같이 분리된 내하고 관련 단백질들을 이용하여 heat stress에 의해 변성되는 substrate를 보호하는 chaperone 기능 여부에 중점을 두어 연구를 진행하였다.

Chaperone activity는 먼저 denaturation되기 쉬운 단백질 (malate dehydrogenase, citrate synthase, luciferase)들을 고온 혹은 여러 가지 chemical을 사용하여 denaturation 시키면서 spectrophotometer 상에서 control 값을 얻은 후에 control과 측정하고자 하는 protein의 molar ratio를 바꿔가며 첨가하여 spectrophotometer로 값을 측정한다. Chaperone activity가 있을 경우, 측정값이 control 값보다 줄어들게 되는데, 이는 단백질이 변성될 경우, hydrophobic residue가 노출되면서, UV 하에서의 light scattering 값이 변하기 때문이다. 본 연구에서는 substrate로 MDH (malate dehydrogenase)를 이용하였다.

#### (1) *DgHsp90*

*DgHsp90*은 분자량이 93 kDa이며, pI 값이 4.89인 산성에 가까운 단백질이다. 현재까지 animal Hsp90은 단독으로 chaperone 기능을 가지지만, cell 내에서 Hsp70 및 다른 cochaperone들과 multi chaperone complex를 이루는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 본 연구진은 많은 양의 발현을 유도하지는 못했지만, *DgHsp90*의 단백질 발현에 성공하였으며, 이를 이용하여 chaperone activity를 측정하였다. 그 결과, 지금까지 여러 보고에서 밝혀진 어떤 Hsp들보다 강력한 chaperone activity를 가지고 있는 것으로 나타났다. 열변성의 기질로 첨가하였던 MDH와 같은 molar ratio로 혼합하여 열처리를 하였을 때, *DgHsp90*은 거의 100%에 가까운 chaperone 기능을 수행하였다. 또한 Hsp90의 양을 MDH에 비해 1/10로 낮추어도 열 변성되는 기질을 50% 가량 줄일 수 있는 것으로 나타났다.

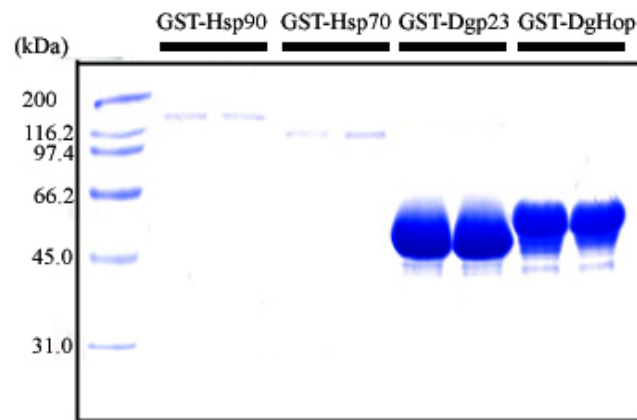


Fig. 27. SDS-PAGE of purified GST-Hsp90, GST-70, GST-p23 and GST-Hop

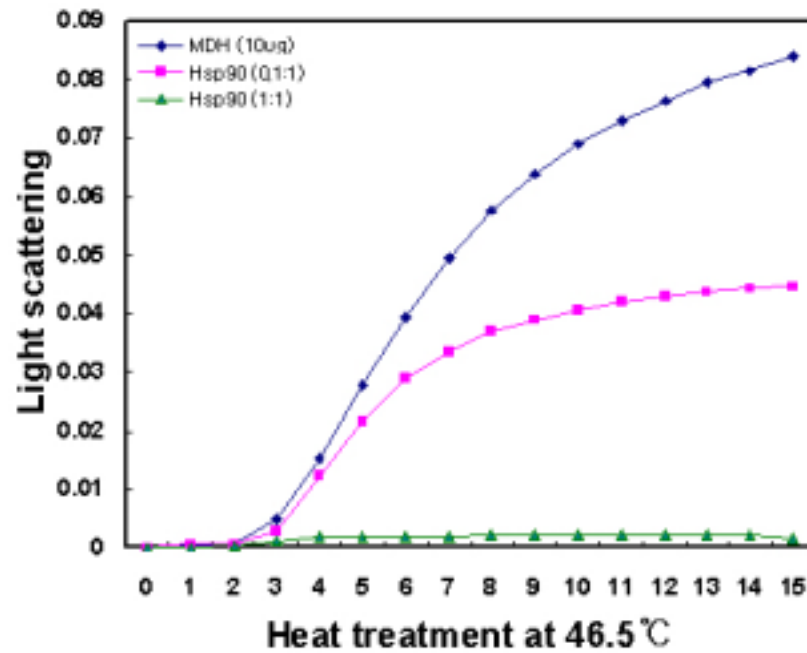


Fig. 28. Chaperone activity of GST-DgHsp90 on heat denaturated substrate

(2) DgHsp70

663개의 아미노산으로 구성되어 있는 DgHsp70은 분자량이 71.8 kDa이며, pI 값은 6.01이었다. Hsp70 역시 animal에서 많이 연구가 되어졌는데, 자체적인 chaperone 기능을 가지지만, stress 환경에서 하에서는 unfold된 단백질들과 binding 하여 Hsp90으로 인도하는 역할도 수행한다. DgHsp70을 MDH와 같은 molar ratio로 혼합하였을 경우, DgHsp90만큼의 activity는 없었지만 DgHsp90의 80% 정도의 MDH 변성을 막아주는 것으로 나타났다. DgHsp90과 DgHsp70은 다른 Hsp들에 비해 소량으로도 강력한 chaperone 기능을 수행하였다.

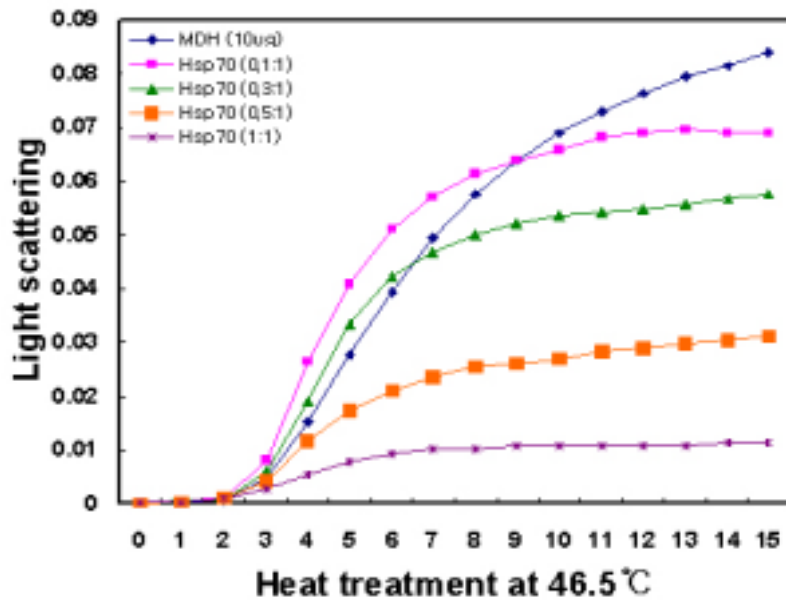


Fig. 29. Chaperone activity of GST-DgHsp70 on heat denaturated substrate

### (3) DgSti

DgSti의 크기는 64.5 kDa이고 pI 값은 6.11이다. 최근의 보고에 의하면 Sti는 Hop의 yeast homolog로 분자량이 대략 60 kDa 정도이며, Hsp90 chaperone multicomplex의 한 component라고 알려져 있다. Hsp90 complex를 이루는 다른 protein component와 마찬가지로 chaperone 기능의 여부를 조사하였다. 그러나 DgSti는 chaperone 기능을 하기엔 너무 많은 단백질이 소요되며, stress 조건하에서 시간이 길어지면 다시 aggregation 되는 단백질을 보호하지 못하였다.

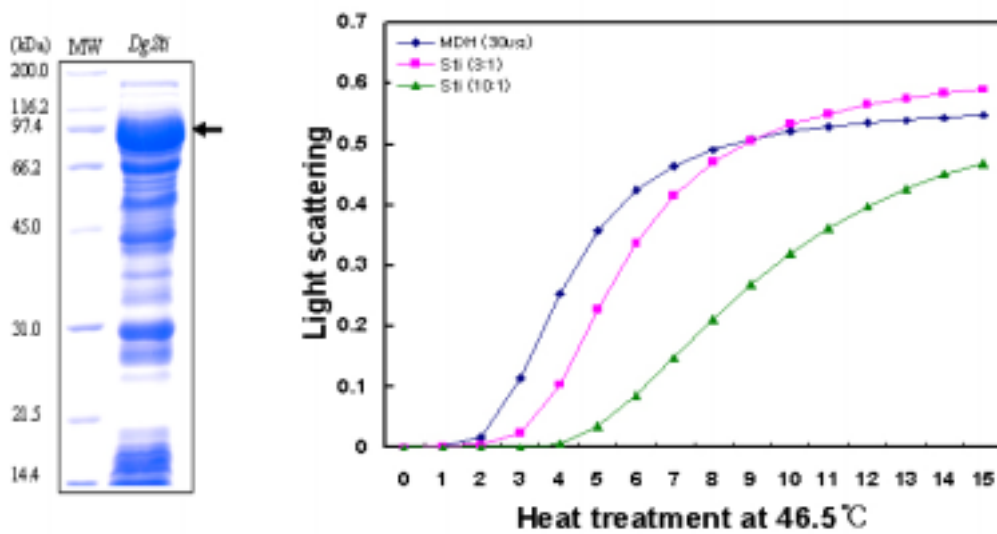


Fig. 30. SDS-PAGE and chaperone activity of GST-DgSti on heat denatured substrate



(4) DgHop

224개의 아미노산으로 구성된 DgHop은 분자량이 24,900이며, pI 값은 5.22이다. 현재까지 밝혀진 Hsp90 chaperone multicomplex에 관여하는 Hop에 비해 크기는 작지만 앞에서 언급하였듯이 TPR domain을 가지고 있기 때문에 Hsp90과 binding할 것으로 추측된다. Chaperone activity 측정 결과, DgHop은 Sti 만큼 약하지는 않았지만 다른 Hsp들에 비해서는 활성이 낮은 것으로 나타났다. DgHop을 MDH와 1:1의 molar ratio로 혼합하여 열처리 하였을 경우, 약 40%의 MDH의 변성을 막아주는 효과를 나타내었다. Hop의 양을 높여도 activity에는 영향을 주지 않았다.

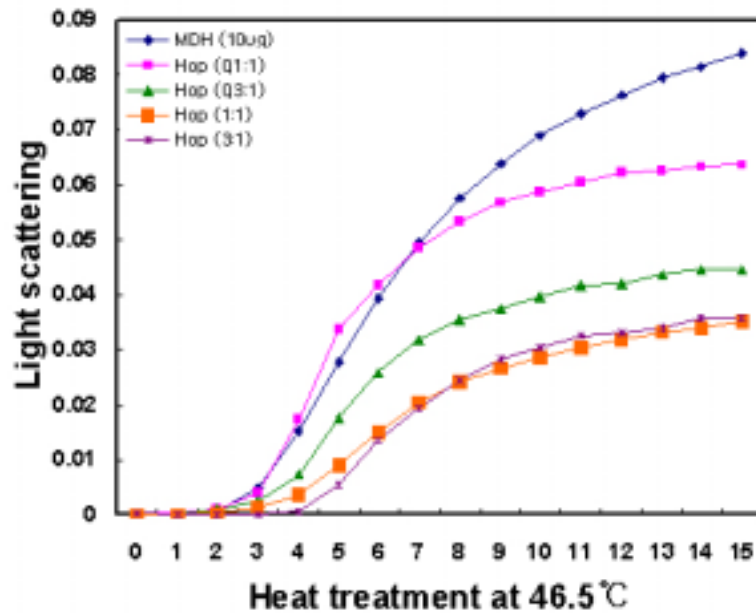


Fig. 31. Chaperone activity of DgHop on heat denaturated substrate

(5) DgAha

Hsp90 ATPase의 activator인 DgAha는 크기가 23.5 kDa, pI 값은 5.1이었으며, DgHsp90과 유사한 정도의 chaperone activity를 나타내었다. DgAha와 MDH의 molar ratio가 0.5:1의 수준인데도 약 90% 이상의 chaperone activity를 보여주었다. Aha는 Hsp90의 client protein들이 binding 하는 middle 영역에 binding한다고 알려져 있다. 따라서 Aha는 Hsp90에 결합하여 ATPase의 활력을 증가시켜주는 동시에 Hsp90에 binding 되어있는 substrate들을 Hsp90과 같이 repair시킬 수도 있을 것으로 생각한다.

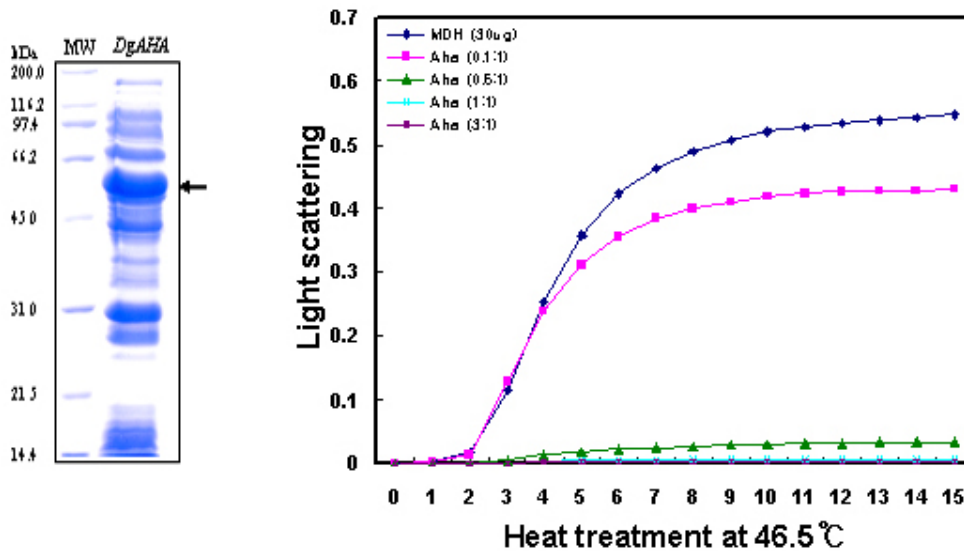


Fig. 32. SDS-PAGE and chaperone activity of GST-DgAha on heat denatured substrate

(6) Dgp23

Hsp90의 cochaperone으로 알려진 p23의 orchardgrass homolog인 Dgp23은 20.2 kDa이며, pI 값은 4.28인 산성 단백질이다. 최근까지 보고된 Hsp과 관련된 많은 chaperone activity를 살펴보았지만, 본 연구진이 발견시킨 Dgp23 만큼 강력한 chaperone activity를 나타내는 단백질은 없었다. 비록 animal에서 Hsp90 chaperone multicomplex에 관여하는 cochaperone으로 알려져 있지만, substrate와의 1:1 molar

ratio만으로 100%에 가까운 활성을 나타내었다. 또한 Dgp23의 양을 1/10로 낮추어도 DgHop과 DgSti가 가지고 있는 chaperone activity 보다 월등한 활성을 나타내었다.

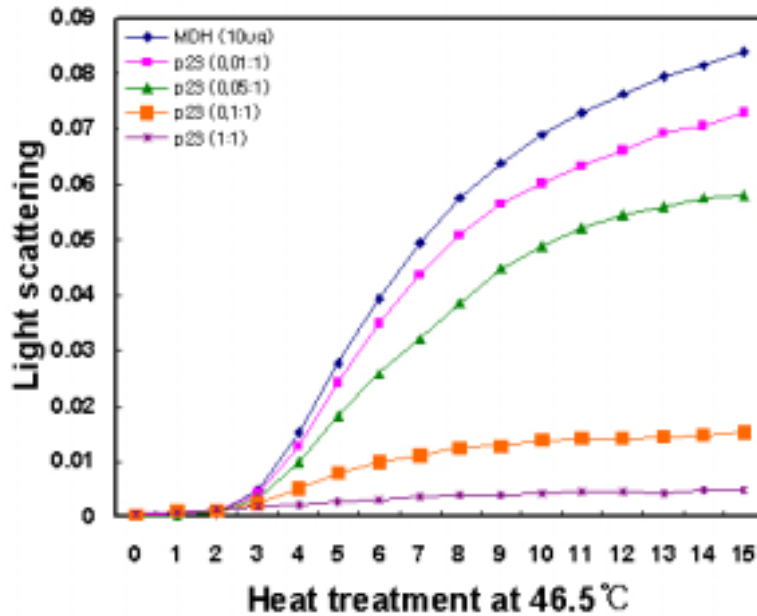


Fig. 33. Chaperone activity of GST-DgHop on heat denaturated substrate

(7) sHsp

다양한 Hsp family들 중에, Hsp90 만큼 연구가 많이 진행되고 있는 family가 small Hsp이다. 이는 sHsp들이 작은 분자량에 비해 homo 혹은 heterocomplex를 이루며 oligomerization 되기 때문이다. 앞에서 언급하였듯이, homolog 간의 차이는 있지만, 최고 800 kDa까지도 oligomerization 되는 것으로 알려져 있다. 본 연구진이 분리한 DgHsp17.8은 분자량이 19,600이며, pI 값은 4.99이다. 또한 sHsp들의 특징적인 domain인  $\alpha$ -crystallin domain이 존재하며, 이 domain은 chaperone activity에 중요하다. DgHsp17.8은 MDH와 3:1의 molar ratio로 혼합하였을 시, 약 80%의 chaperone activity를 나타내었으며, yeast에 발현시켰을 때, 고온에 대한 내성을 갖는 것으로 나타났다. 따라서 sHsp는 *in vitro*에서 protein의 aggregation을 막을 뿐만 아니라, *in vivo*에서도 내열성 획득에 중요한 유전자이다.

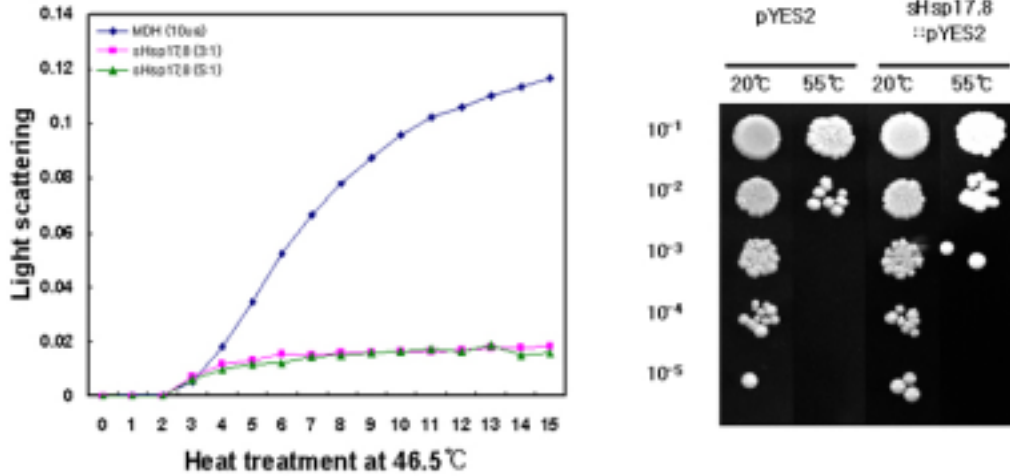


Fig. 34. Chaperone activity of GST-DgHsp17.8 on heat denatured substrate and yeast spot assay for thermotolerance

#### 4) 내하고 관련 유전자들의 형질전환 vector 개발 및 Arabidopsis의 형질전환

본 연구는 식물에 내열성 유전자를 도입함으로써, 고온 스트레스 환경조건 하에서도 식물이 건강하게 살아남을 수 있게 하며, 궁극적으로 여름 하고기에 식물생육 저해로 인한 생산성의 저하를 막고자 함이다. 본 연구진이 확보한 내하고 관련 유전자들은 우리나라에서 널리 재배되고 있는 중요한 화본과 목초의 하나인 orchardgrass에 도입하고자 하였다.

유전자 수준에서 고온 내성을 보이는 10개의 유전자 중 전체 염기서열을 완전히 해석한 7개의 유전자를 식물체 도입을 위한 binary vector에 cloning 하였다. 본 실험에 사용된 binary vector는 강력한 promoter인 CaMV 35S promoter를 가진 pCAMBIA1300 vector 종류들 중 각각의 유전자와 사용가능한 restriction enzyme site가 일치하는 vector를 선택하여 35S promoter의 down stream에 각각의 유전자를 도입하였다. 각각의 유전자의 형질전환을 위하여 사용한 pCAMBIA vector 및 ORF의 PCR 증폭을 위한 primer sequence는 Table 4에 나타내었다.

**Table 4. Binary vectors and primer sequences for plant transformation**

Gene	Binary vector	Primer sequence
DgHsp90	pCAMBIA1300PT	For. : 5'-GCGGATCCATGCGCAGGTGGGCGCTCTCCTCCGCG-3' Rev. : 5'-GCTCTAGACTACAGCTCGTCCTTGTCGTACTGCTC-3'
DgHsp70	pCAMBIA1300PT	For. :5'-GCGGATCCATGGCGAAGAAGGGAGGGGA-3' Rev. :5'-GCTCTAGATTAATCGACCTCCTCGATCT-3'
DgSti	pCAMBIA1300PT	For. : 5'-GAATTCATGGCCGACGAGGCGAAGGCG-3' Rev. : 5'-CTCGAGTTATCTCGTTTGGACTATTCCAGCGTTTATGAGC-3'
DgAha	pCAMBIA1300PT	For. : 5'-GAATTCGTCGATCCAGTGATGGAGGAGA-3' Rev. : 5'-CTCGAGCTACCTATCTTTCAGCTCCTGCTCA-3'
DgHop	pCAMBIA1300PT	For. : 5'-GCGGATCCATGATCAAATGTTTGCTT-3' Rev. : 5'-GCTCTAGATCATTCCGACTGTGTACC-3'
Dgp23	pCAMBIA1301	For. : 5'-CGCCATGGATGAGTCGCCACCCGAGC-3' Rev. : 5'-CGAGATCTTCATGGCTTTGCTTCATCCGTGG-3'
DgHsp17.8	pCAMBIA1300PT	For. : 5'-GCGGATCCATGGAGGGCAGGGTGTTTC-3' Rev. : 5'-GCGTCGACTCACTCACTAATCATCGA-3'

이상의 binary vector에 재조합된 유전자들을 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 transformation하여 colony-PCR로 각각의 재조합 DNA들이 *Agrobacterium*내로 도입되었는지를 확인하였다. 최근에 orchardgrass library로부터 screening되었으며, 현재 연구가 진행중인 *DgHsp90*, *DgHsp70*, *DgHop* 재조합 construct를 제외한 *DgSti*, *DgAha*, *Dgp23*, *DgHsp17.8* construct의 plasmid 및 재조합 DNA가 도입된 *Agrobacterium* 균주를 본 연구기관과 협동과제로 연구 중인 축산 연구소에 분양하였다. 축산연구소에서는 이들 재조합 내열성 유전자들을 orchardgrass 종자로부터 유기시킨 callus에 도입하여 식물체를 재분화시켰다..

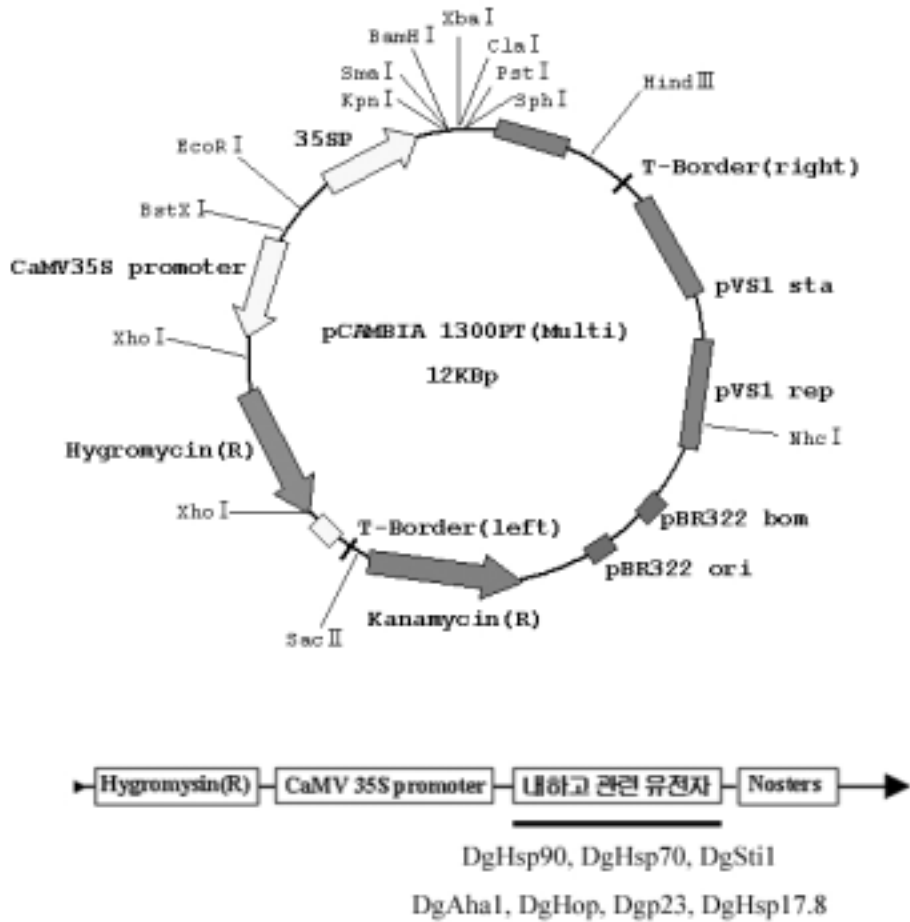
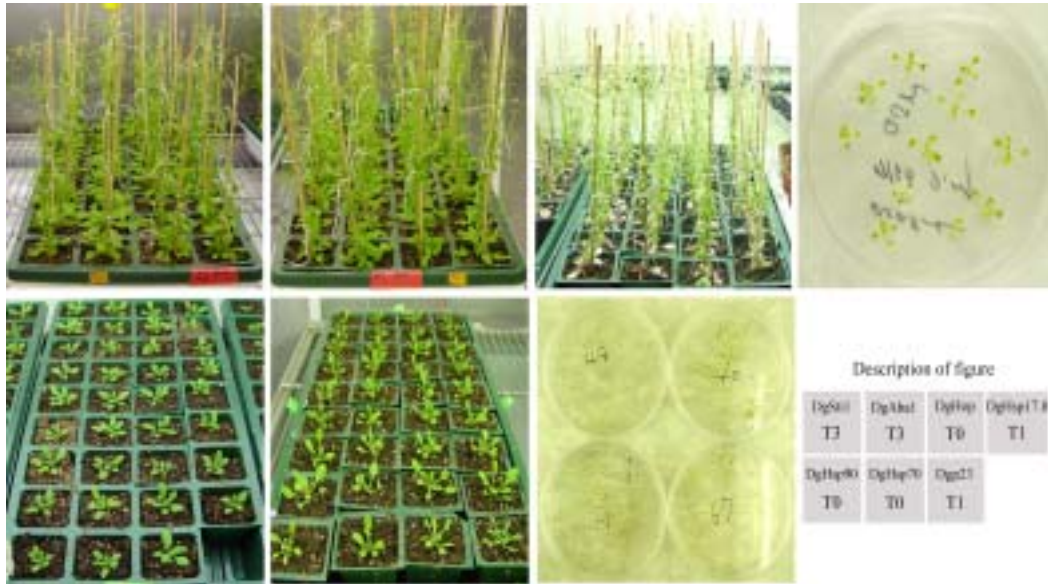


Fig. 35. Construction of overexpression vector for plant transformation

본 연구진은 재조합 DNA가 도입되어 있는 *Agrobacteria*를 flower-dip 방식으로 *Arabidopsis*에 형질전환시켰다. 본 연구과제 2년차에 확보된 *DgSti*, *DgAha*, *Dgp23*, *DgHsp17.8*의 경우, 형질전환시킨 *Arabidopsis*로부터 종자를 받아 hygromycin이 포함된 MS media에서 형질전환체 선발작업을 거쳤다. 이들 중, *DgSti*와 *DgAha*의 경우, T3 line까지 generation이 진행되어 최종적으로 종자를 받고 있으며, *Dgp23* 형질전환체의 경우, hygromycin 선택 배지 내에서 백화현상을 보이며 고사하는 식물이 많았으나, 아직 남아있는 T1 line의 종자로 계속적인 선발작업을 진행하고 있다. *DgHsp17.8*

은 T1 line의 종자까지 얻었으며, 이 식물체 역시 hygromycin 배지에서 선발작업 중에 있다 (Fig. 36).



**Fig. 36. Over-expression Arabidopsis transformed heat shock inducible genes**

T3 line까지 진행된 *DgSti*와 *DgAha*의 경우, 재조합 DNA가 generation을 거듭하면서도 안정적으로 Arabidopsis의 genome상에 삽입되어 있는지를 살펴보기 위하여, 각각의 형질전환체의 잎을 채취하여 genomic DNA를 분리하였다. Control로는 Arabidopsis wild type으로부터 분리한 genomic DNA를 사용하였다. 형질전환체 genomic DNA를 template로 하여 1737 bp의 *DgSti* ORF를 amplify할 수 있는 양쪽 primer로 genomic PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 37와 같이 형질전환체의 염색체에 *DgSti*가 안정적으로 삽입되어 있음을 확인하였다. 위와 같은 방법으로 643 bp에 해당하는 *DgAha*를 amplify 할 수 있는 primer를 사용하여 genomic PCR을 수행하였다. Control에는 PCR product가 관찰되지 않은 반면 형질전환체의 genome상에는 *DgAha*가 안정적으로 삽입되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 38).

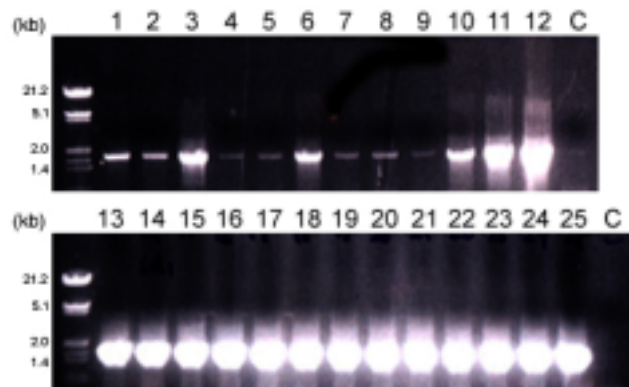


Fig. 37. Confirmation of *DgSti* transgenic plants by genomic PCR using genomic DNAs from wild-type (C) and transgenic Arabidopsis plants (indicated number)

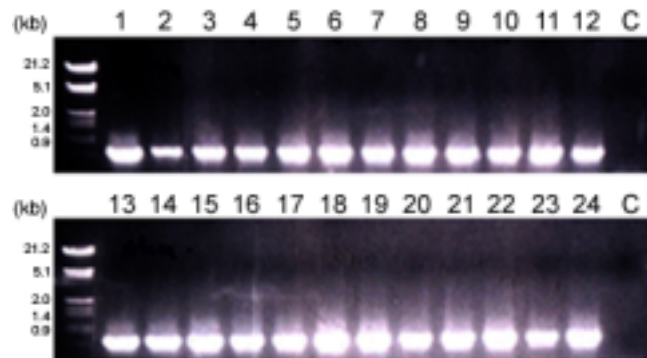


Fig. 38. Confirmation of *DgAha* transgenic plants by genomic PCR using genomic DNAs from wild-type (C) and transgenic Arabidopsis plants (indicated number)



## 2. 제 1 협동과제: 오차드그라스의 형질전환체계 확립 및 형질전환 식물체의 고온내성 검정

### 가. 식물체 재분화 및 형질전환기술 개발

#### 1) 캘러스 유도 및 식물체 재분화의 관찰

오차드그라스의 품종별 캘러스 형성과 재분화율을 조사하기 위하여 MS 배지를 기본으로 한 캘러스 유도배지에서 치상 후 7일 이후부터 유백색의 점액성 캘러스가 형성되기 시작하였다. 새로운 배지에 옮겨 4주간 배양했을 때는 좀 더 치밀하고 견고한 유백색의 캘러스가 형성되었고, 2주간 배양했을 때는 4주령의 캘러스에 비해 어두운 황백색의 캘러스가 형성되었다.



Fig. 39. 오차드그라스 캘러스 유도 및 증식

유도된 캘러스를 식물체 재분화 배지 (MS배지에 NAA 1 mg/ℓ 및 kinetin 5 mg/ℓ 첨가한 배지)에 치상하여 식물체의 재분화를 유도한 결과, 배양 4~5일 후부터 캘러스 주위에 녹색의 spot이 관찰되었으며, 이 때부터 식물체의 재분화가 시작되어 치상 후 4주 정도 지나서 완전히 재분화되었다. 이 때 재분화되지 않은 대부분의 캘러스는 암갈색으로 변하여 더 이상의 재분화는 관찰되지 않았으나, 이들 캘러스에서도 스포털 모양의 뿌리와 비슷한 조직의 발생이 관찰되었다. Fig. 39은 오차드그라스의 캘러스 유도 및 증식 사진으로서, 좌측부터 캘러스 유도, 확대한 것, 캘러스 증식, 배양실 전경을 사진으로 보여 주고 있다.

30품종에 대한 캘러스 형성율을 조사한 결과, “93M” 품종이 callus 크기가 가장 크고 캘러스 형성율이 가장 좋았으며, 다음으로 “Sparta” , “Justus” , “Condor” , “Potomac” 순 이었다 (Table 5, Table 6).

## 2) 4주령 켈러스로부터 식물체 재분화

1차 시험에서 국내에 도입된 오차드그라스 27 품종과 국내 합성 품종인 Hapsung 2의 종자로부터의 켈러스 형성율, 형성된 켈러스의 크기, 켈러스로부터의 재분화율 및 재분화 효율을 4주령의 켈러스에 대하여 얻은 결과는 아래 Table 5와 같았다. 4주령의 켈러스에 대한 종자로부터 켈러스의 형성율을 조사한 결과, 치상 종자의 50% 이상이 켈러스를 형성한 형성율 상위 품종들은 93M > Sparta > Pizza > Condor > Lidaglo > Glorus > Hapsung 2 > Frode의 순으로서, 대조품종으로 제시한 Hapsung 2보다 켈러스 형성율이 높은 품종들이 많았다. 이들 중 93M과 Sparta의 두 품종은 치상 종자의 90% 이상이 켈러스화 됨을 확인하였다. 4주령 켈러스 크기를 직경(cm)으로 표시하였을 때, 최저 0.43cm, 최고 4.2cm로서 약 10배의 차이가 있었으나, 대부분은 2.5~4cm의 범위 내에 있었다. 크기 순으로 보면 Justus > Condor > Potomac > Lidaglo > 93M이었으며 대조품종인 Hapsung 2의 직경이 0.43cm로서 가장 낮은 값을 보였다. 켈러스의 형성을 무게(mg)로 표시한 Kim 등 (1988)의 보고와 비교해 보면, 본 연구에서 사용한 대조품종인 Hapsung 2와 비슷한 값을 보인 합성 19호, 합성 20호, 합성 21호 및 Potomac의 켈러스 크기보다 Justus 및 Condor에서 훨씬 더 큰 켈러스들이 형성되었음을 알 수 있었다. 4주령 켈러스로부터의 재분화는 0~36%의 꽤 넓은 범위를 나타내었는데, 재분화율이 높은 것으로부터 순서는 Plano > Akimidori > Justus > Lidacta > Currie > Hall mark의 순이었고, Filippa와 Juno의 경우에는 형성된 켈러스로부터 재분화가 전혀 일어나지 않았다. 대조품종인 Hapsung 2는 8.4%로서 거의 중간정도의 재분화율을 보였다.

한편, 종자로부터 켈러스의 형성과, 신초 및 뿌리의 형성과정을 거쳐 완전한 식물체로 재분화 되는 단계로서 재분화 효율을 다음 괄호 안의 식[켈러스 형성율(%) × 재분화율(%) / 100]으로 계산하였을 때, 그 범위는 0~17.4%로서 재분화율의 범위보다 그 폭이 훨씬 좁았다. Justus는 재분화 효율이 17.4%로서 비교품종들 중에서 가장 높았으며, 다음으로 Lidacta의 12.4%, Condor의 11.4%, Potomac의 8.9% 순이었으며, 대조품종인 Hapsung 2의 5.5%보다 최고 3배 이상의 높은 효율을 보였다 (Table 5, Fig. 40).

각 parameter 간의 관계를 상관계수로 표시하면 켈러스 형성율과 켈러스 크기 사이에는  $r=0.5765$ 였고, 켈러스 형성율과 재분화 효율 사이에는  $r=0.6365$ 였으며, 켈러스 크기와 재분화 효율 사이에는  $r=0.6246$ 이었는데, 이 값들은 모두 1%의 높은 유의성이

있었다. 이 사실은 캘러스 형성율이 높으면 캘러스의 크기가 크고 재분화 효율도 높다는 것을 알 수 있다.

**Table 5. Comparison result of callus formation ratio, callus diameter, regeneration ration and regeneration efficiency in 28 orchardgrass varieties for 4-week treatment**

Variety	4-week callus				
	Number of seeds tested	Callus formation(%)	Callus diameter(cm)	Regeneration (%)	Regeneration efficiency(%)
Able	210	12.0	1.8 ± 0.72	12.0	1.4
Amba	200	37.5	2.8 ± 0.56	5.3	1.9
Ambassador	190	40.0	2.75± 0.72	2.5	1.0
Benchmark	200	51.0	2.85± 0.49	8.8	4.4
Condor	200	82.0	4.15± 1.00	14.0	11.4
Curie	200	17.0	3.15± 0.72	17.0	2.8
Filippa	190	3.6	1.64± 0.31	0.0	0.0
Frode	200	59.0	1.65± 0.53	3.4	2.0
Glorus	200	66.5	3.4 ± 0.44	10.5	6.9
Hall mark	200	7.0	1.85± 0.45	14.3	1.0
Hay-King	200	58.0	3.55± 0.54	8.6	4.9
Jesper	200	12.5	2.2 ± 0.66	12.0	1.5
Juno	200	6.0	1.5 ± 0.42	0.0	0.0
Justus	200	84.0	4.2 ± 0.66	20.8	17.4
Kay	210	33.8	3.25± 0.78	12.7	4.3
Lidacta	210	67.1	3.65± 0.35	18.6	12.4
Lidaglo	200	79.5	3.75± 0.64	1.9	1.5
Pizza	200	83.0	3.45± 0.54	5.4	4.4
Plano	200	5.5	2.88± 0.76	36.0	1.9
Potomac	200	58.0	3.9 ± 0.62	15.5	8.9
Rancho	190	17.9	2.4 ± 0.62	8.8	1.5
Sampson	200	63.0	3.2 ± 0.70	4.8	3.0
Sparta	200	91.5	3.15± 0.91	6.0	5.4
Tna	200	19.0	2.2 ± 0.45	2.6	0.4
Kitamidori	200	38.0	2.5 ± 0.56	3.9	1.4
Akimidori	200	26.5	2.9 ± 0.62	26.4	6.9
93M	200	96.0	3.7 ± 0.87	7.3	7.0
Hapsung 2	200	65.5	0.43± 0.39	8.4	5.5

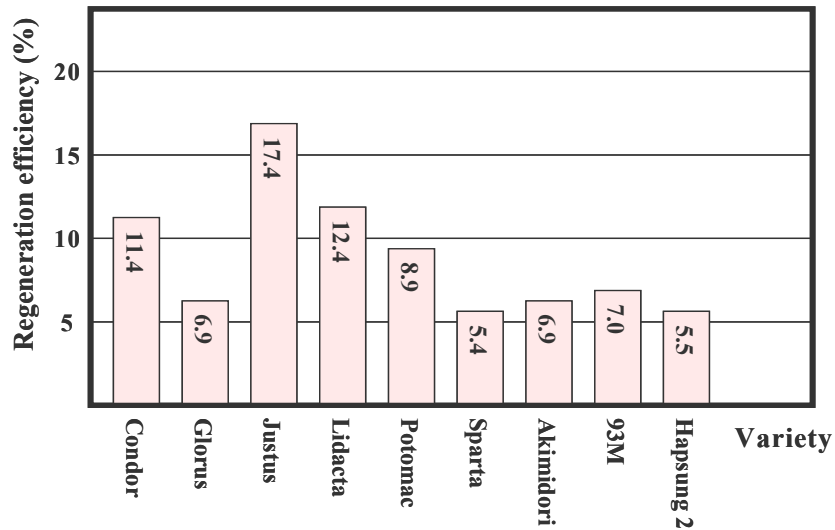


Fig. 40. Comparison result of regeneration efficiency in 9 orchardgrass varieties for 4-week treatment

The varieties of Hapsung 2 is developed in Korea.

또한 2차 시험에서 국내에서 육성한 오차드그라스 3품종과 외국으로부터 도입된 품종인 Potomac의 종자로부터 켈러스 형성율, 형성된 켈러스의 크기, 켈러스로부터의 재분화율 및 재분화 효율을 4주령의 켈러스에 대하여 얻은 결과는 Table 6과 같았다.

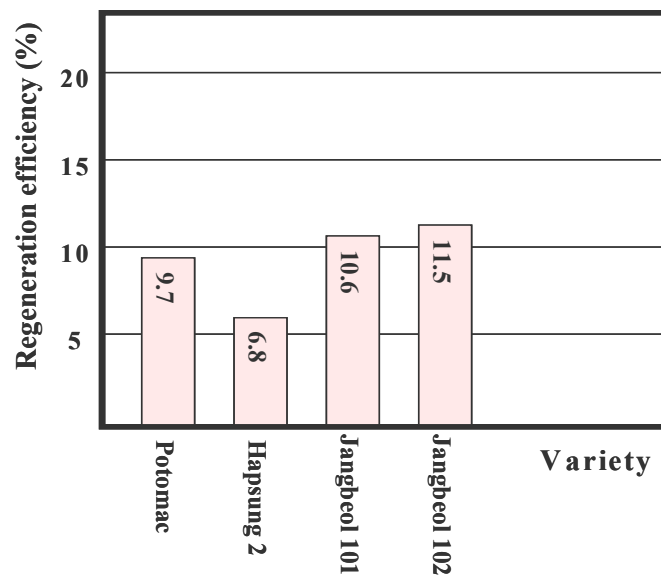
4주령의 켈러스에 대한 종자로부터 켈러스의 형성율은 Jangbeol 102 > Hapsung 2 > Potomac > Jangbeol 101 순으로서, Jangbeol 102와 Hapsung 2는 대비품종 Potomac보다 켈러스 형성율이 높았다. 4주령의 켈러스의 크기를 직경 (cm)으로 표시하였을 때, 최저 3.47 cm, 최고 3.93 cm로서 품종간에 큰 차이는 없었으며, 크기순서로 보면 Potomac > Jangbeol 101 > Jangbeol 102 > Hapsung 2 순으로서, 국내육성 품종이 대비품종 Potomac에 비해 모두 작은 것으로 관찰되었다.

4주령의 켈러스로부터 식물체 재분화는 10.3~17.7 %의 넓은 범위의 차이를 보였는데, 재분화율의 순서는 Jangbeol 101 > Jangbeol 102 > Potomac > Hapsung 2의 순으로서, Jangbeol 101과 Jangbeol 102가 대비품종 Potomac에 비해 재분화율이 높게 나타났다. 4주령 켈러스로부터 식물체 재분화 효율을 계산한 결과, 그 범위는 6.8~11.5 %로서 재분화율의 범위와 비교해서 그 폭이 비슷하였다. Jangbeol 102의 재분화율이 11.5 %, Jangbeol 101의 재분화율이 10.6 %로서 대비품종 Potomac (9.7 %)보다

높았으며, Hapsung 2는 가장 낮은 6.8 %였다 (Fig. 41). Hapsung 2의 재분화효율은 시험 1에서 5.5% 였는데, 시험 2에서는 6.8% 였다.

**Table 6. Comparisons of callus formation ratio, callus diameter, regeneration ratio and regeneration efficiency in 4 orchardgrass varieties for 4-week treatment**

Variety	Number of tested seeds	Callus formation(%)	Callus diameter(cm)	Regeneration (%)	Regeneration efficiency(%)
Potomac	200	60.0	3.93±0.62	16.1	9.7
Hapsung 2	200	66.2	3.47±0.41	10.3	6.8
Jangbeol 101	200	59.8	3.72±0.36	17.7	10.6
Jangbeol 102	200	67.0	3.65±0.35	17.2	11.5



**Fig. 41. Comparison result of regeneration efficiency in 9 orchardgrass varieties for 4-week treatment**

Three varieties of Hapsung 2, Jangbeol 101 and Jangbeol 102 are developed in Korea.

### 3) 6주령 켈러스로부터 식물체 재분화

1차 시험에서와 동일한 품종들에 대하여 종자로부터 6주간 켈러스를 유도한 후, 켈러스의 형성율, 형성된 켈러스의 크기, 켈러스로부터의 재분화율 및 종자로부터의 재분화 효율을 조사하여 다음 Table 7과 같은 결과를 얻었다. 종자로부터의 켈러스 형성율은 Condor > Sparta > 93M > Justus > Potomac > Lidaglo > Frode의 순으로서 4주령의 순위와 다소 다른 결과를 보였다. 그러나 99% 이상의 켈러스 형성율을 보인 Condor, Sparta, 93M은 4주령의 켈러스와의 비교에서 순위 변동은 있었으나 높은 형성율은 여전히 유지되었다. 대조품종인 Hapsung 2의 켈러스 형성율은 55%로서 전체 비교품종들 중에서 중간정도의 순위를 보였다. 형성된 켈러스의 크기는 1.2~5.7cm로서 가장 큰 것과 가장 작은 것 사이에 약 5배의 크기 차이를 보였다. 6주 배양후 켈러스의 크기는 Sparta > 99M > Justus > Condor > Pizza의 순이었고 이 순서는 4주령 켈러스의 크기 순서와 다소 차이를 보였다. 대조품종인 Hapsung 2는 3.8cm로서 비교품종들 사이에서 다소 큰 편이었다.

켈러스의 재분화율은 0%에서 100%까지 큰 편차를 보였는데, Plano가 100%의 재분화율을 보여 치상한 종자가 모두가 켈러스 형성이 되었고 Juno는 전혀 켈러스화 되지 않았다. 4주령에서도 Plano는 재분화율 36%로서 최고의 값을 보였다. 전체 27개 품종중 Condor, Glorus, Hall mark, Lidacta의 다섯 품종을 제외한 모든 품종들은 4주령의 켈러스에 비해 6주령의 켈러스로부터의 재분화가 더 잘 되었고 이들 중, Plano, Able, Currie, Tna 등은 월등하게 재분화율이 높아졌다.

종자로부터 켈러스를 거쳐 재분화되는 재분화 효율의 범위는 0~28%로서 4주령의 범위보다 더 커졌으며 전체적으로 4주령의 재분화 효율보다 6주령의 재분화 효율이 더 높아졌다. 특히 Potomac의 경우 4주령에 비하여 6주령의 것이 3배 이상 재분화 효율이 높아졌다. 공시 품종인 Hapsung 2는 4주령에서 5.5%이던 것이 6주령에서는 5.9%로서 0.4%의 증가에 그쳤다. 재분화 효율의 상위 5 품종은 Potomac 28%, Justus 25.9%, Pizza 22.4%, Sparta 12.5% 및 Frode 12.5%의 순이었는데 이들 중 Pizza, Sparta 및 Frode는 4주령에서는 낮은 값을 보였으나 6주령에서는 월등하게 그 값이 높아졌는데, 이 사실로 미루어 볼 때 이들 품종의 재분화 실험에서는 6주령의 켈러스로부터 재분화를 유도하는 것이 훨씬 유리할 것으로 판단되었다. 이와는 반대로 Condor, Glorus, Lidacta, 아끼미도리 등은 4주령의 켈러스로부터의 재분화율이 6주령의 재분화율보다 낮아졌으므로 이들 품종을 재분화 할 때는 4주령의 켈러스를 사용하는 것이 더 좋을 것으로 판단되었다.

**Table 7. Comparison result of callus formation ratio, callus diameter, regeneration ration and regeneration efficiency in 28 orchardgrass varieties for 6-week treatment**

Variety	6-week callus				
	Number of seeds tested	Callus formation(%)	Callus diameter(cm)	Regeneration (%)	Regeneration efficiency(%)
Able	200	6.0	3.3 ± 0.95	42.0	2.5
Amba	200	26.5	3.4 ± 0.87	20.8	5.5
Ambassador	200	55.0	3.6 ± 0.92	10.0	5.5
Benchmark	200	70.0	4.7 ± 1.20	34.3	24.0
Condor	200	94.5	4.9 ± 0.87	5.3	5.0
Curie	200	15.0	3.9 ± 0.78	46.7	7.0
Filippa	200	4.0	3.1 ± 0.93	25.0	1.0
Frode	200	66.5	4.1 ± 0.70	18.8	12.5
Glorus	200	55.0	3.8 ± 0.83	10.0	5.5
Hall mark	200	4.5	4.2 ± 1.06	11.0	0.4
Hay-King	200	65.0	4.6 ± 0.95	16.9	10.9
Jesper	200	2.0	1.8 ± 0.86	25.0	0.5
Juno	200	3.0	1.2 ± 0.26	0.0	0.0
Justus	200	90.5	5.5 ± 1.02	28.7	25.9
Kay	210	53.8	4.7 ± 1.15	13.3	7.15
Lidacta	210	64.8	4.8 ± 0.97	10.3	6.6
Lidaglo	200	68.5	4.1 ± 0.81	14.6	10.0
Pizza	200	82.0	4.8 ± 0.97	27.4	22.4
Plano	200	0.5	2.75± 1.49	100.0	0.5
Potomac	200	71.5	4.3 ± 0.82	39.2	28.0
Rancho	190	11.1	2.58± 0.87	9.5	1.0
Sampson	200	63.0	4.1 ± 0.83	15.1	9.5
Sparta	200	91.5	5.7 ± 1.11	13.7	12.5
Tna	200	12.0	3.3 ± 1.88	45.8	5.4
Kitamidori	200	55.0	4.5 ± 0.88	13.6	7.4
Akimidori	200	59.5	4.0 ± 0.73	7.6	4.5
93M	200	91.0	5.6 ± 1.20	8.2	7.4
Hapsung 2	200	55.0	3.8 ± 0.79	10.9	5.9

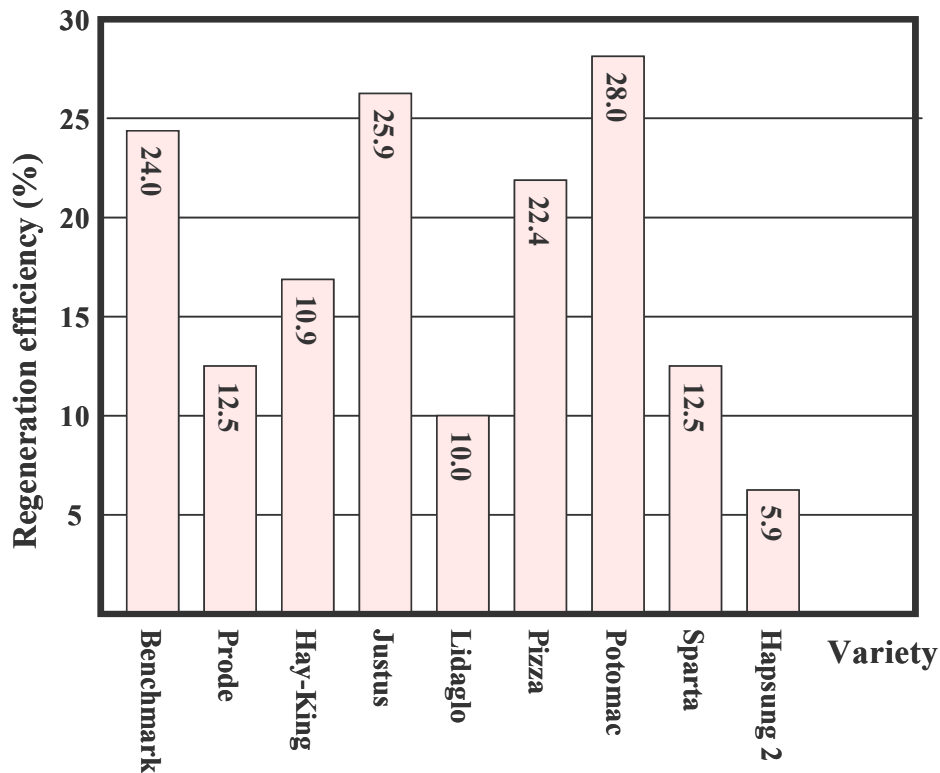


Fig. 42. Comparison result of regeneration efficiency in 9 orchardgrass varieties for 6-week treatment

The varieties of Hapsung 2 is developed in Korea.

각 parameter들간의 상관 관계를 보면 켈러스 형성율과 켈러스 크기 사이에는  $r=0.8369$ 였고, 켈러스 형성율과 재분화 효율 사이에는  $r=0.6683$ 이었으며, 켈러스 크기와 재분화 효율사이에는  $r=0.5937$ 이었는데, 이들 모든 처리기간에도 1%의 높은 유의성이 있었다. 이 사실은 4주령의 켈러스에서와 마찬가지로 6주령의 켈러스를 사용할 때에도 켈러스 형성율이 높으면 켈러스의 크기가 크고 재분화 효율도 높다는 것을 의미한다. 그러나 통계적인 의미에서는 모든 parameter 사이에 높은 유의성이 인정된다고 할지라도 개별 품종의 능력을 고려하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

2차 시험에서와 동일한 품종들에 대하여 종자로부터 6주간 켈러스를 유도한 후,



캘러스의 형성율, 형성된 캘러스의 크기, 캘러스로부터의 재분화율 및 종자로부터의 재분화 효율을 조사하여 다음 Table 8과 같은 결과를 얻었다.

종자로부터의 캘러스 형성률은 Potomac > Jangbeol 102 > Hapsung 2 > Jangbeol 101의 순으로서, 4주령의 캘러스 형성률 순위와 다소 다른 결과를 보였다. 형성된 캘러스의 크기는 3.76~4.32 cm로서 가장 큰 것과 가장 작은 것 사이에 큰 차이는 없었다. 6주 배양 후 캘러스의 크기는 Jangbeol 101 >Potomac >Jangbeol 102 >Hapsung 2의 순으로서 (Fig. 43), 이 순서 역시 4주령 캘러스 크기 순서와 다소 차이를 보였다.

6주령 캘러스의 식물체 재분화율은 11.2~37.4 %로서 큰 편차를 보였다. 4개의 품종 모두 4주령의 캘러스에 비해 6주령의 캘러스로부터의 재분화율이 더 높게 나타났으며, 이들 중 대비품종인 Potomac은 월등하게 재분화율이 높아졌다. 이상의 결과에서 본 실험에 공시한 품종들에 대한 식물체 재분화 실험에서는 6주령의 캘러스를 이용하는 것이 재분화 효율을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 본 시험에서도 캘러스 크기와 재분화 효율 사이에 상관계수가  $r=0.634$ 로 나타났다. 그러나 특정 품종에서는 통계적인 유의성과는 반대의 결과도 충분히 예상되기 때문에, 이들 통계적 수치는 참고 자료로는 가능하지만 절대적 지침은 될 수는 없다.

Fig. 44은 캘러스 증식 및 식물체 재분화 사진으로서, 좌측부터 캘러스 증식, shoot 유도, root 유도, 기내에서 배양하는 전경을 사진으로 보여 주고 있다.

**Table 8. Comparisons of callus formation ratio, callus diameter, regeneration ratio and regeneration efficiency in 4 orchardgrass varieties for 6-week treatment**

Variety	Number of tested seeds	Callus formation(%)	Callus diameter(cm)	Regeneration (%)	Regeneration efficiency(%)
Potomac	200	68.4	4.29±0.39	37.4	25.6
Hapsung 2	200	64.7	3.76±0.62	11.2	7.2
Jangbeol 101	200	59.5	4.32±0.54	23.5	14.0
Jangbeol 102	200	65.9	3.97±0.46	18.5	12.3

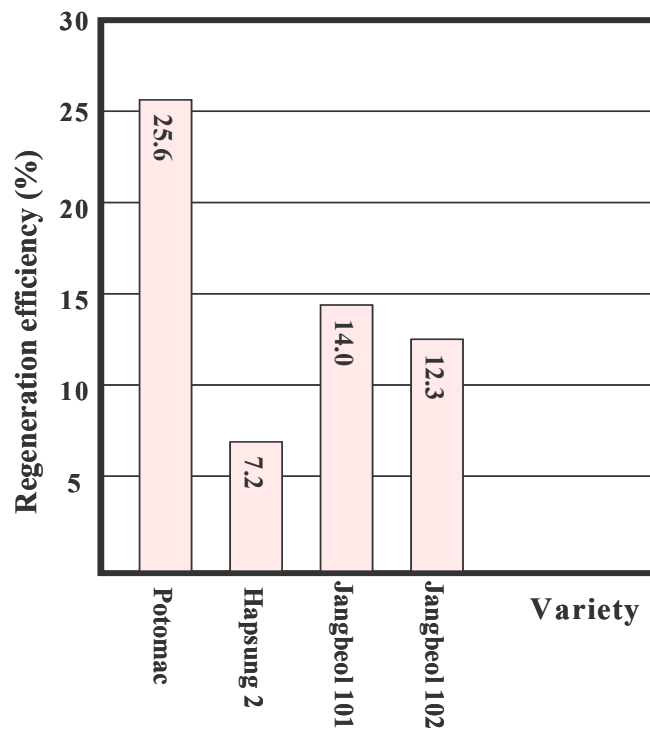


Fig. 43. Comparison result of regeneration efficiency in 9 orchardgrass varieties for 6-week treatment  
 Three varieties of Hapsung 2, Jangbeol 101 and Jangbeol 102 are developed in Korea.

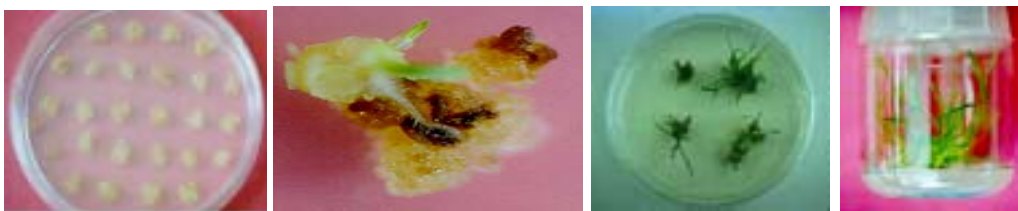


Fig. 44. Callus multiplication and plant regeneration of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)

#### 4) 오차드그라스의 형질전환 효율

오차드그라스의 형질전환 효율을 조사하기 위하여, 종자 유래의 캘러스와 pIG121-Hm 벡터로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101을 공배양하여, 50 mg/ℓ의 hygromycin이 첨가된 배지에서 형질전환 캘러스를 선발하였고, 선발한 캘러스를 N6배지에 1 mg/ℓ의 NAA, 5 mg/ℓ의 kinetin, 250 mg/ℓ의 carbenicillin 및 50 mg/ℓ의 hygromycin을 첨가한 재분화 배지에 옮겨 식물체 재분화를 유도한 다음, 전체적인 형질전환 효율을 조사하였다. 형질전환 효율은 품종에 따라 매우 다르게 나타났는데, 'Potomac' 품종은 12%의 형질전환 효율을 나타낸 반면, 'Amba' 품종은 5.5%에 그쳤다. 오차드그라스의 형질전환에서 co-cultivation 과정에 acetosyringone의 첨가는 효율을 높이는데 크게 기여하였다. 형질전환체의 분석은 PCR 및 Southern blot 분석으로 확인하였다.

오차드그라스의 형질전환 효율을 연구한 데이터는 뒤에 소개할 본 시험의 결과와 중복되는 경향이 있으므로 그 결과만을 요약하였다. 결론적으로 식물체 재분화 효율에서도 'Potomac' 품종이 25.6%로서 가장 높았으며, 형질전환 효율에서도 12%로서 가장 높았기 때문에, 본시험에서는 'Potomac' 품종을 이용하여 고온내성 오차드그라스 형질전환체를 생산하는 연구를 진행하기로 하였다.

#### 나. 형질전환 오차드그라스의 생산 및 확인

##### 1) 유전자 및 발현 vector의 특성

제1세부과제로부터 분양받은 유전자는 모두 4종으로서, *Dgp23*, *DgAha*, *DgSti*, *DgHsp17.8*이며, 이들 유전자는 모두 pCAMBIA1300PT 벡터 (12Kb)에 재조합하였다. 유전자의 특성은 다음과 같다.

##### 가) *Dgp23* 유전자

Full length는 911bp이며, 540bp의 ORF 및 180 AA를 갖는다. *Dgp23* 유전자는 *Brassica napus* 및 *Arabidopsis*의 p23 유전자와 각각 57% 및 47%의 homologs를 갖는다.

##### 나) *DgAha* 유전자

Full length는 958bp이며, 642bp의 ORF 및 213 AA를 갖는다. *DgAha* 유전자는

*Bam*H I 및 *Kpn* I enzyme으로 절단할 수 있다.

다) *DgSti* 유전자

Full length는 1937bp이며, 1737bp의 ORF 및 578 AA를 갖는다. *DgSti* 유전자는 *Bam*H I 및 *Kpn* I enzyme으로 절단할 수 있다.

라) *DgHsp17.8* 유전자

Full length는 883bp이며, 555bp의 ORF 및 184 AA를 갖는다. *DgHsp17.8* 유전자는 *TaHsp17.8* 유전자와 79%의 homologs를 갖는 Cytosolic class II heat shock protein 유전자이다.

마) 발현벡터 : pCAMBIA1300PT

발현벡터 pCAMBIA1300PT는 MCS에 *Kpn* I, *Sma* I, *Bam*H I, *Xba* I, *Cla* I, *Pst* I 및 *Sph* I enzyme site를 가지며, kanamycin 내성 유전자 및 hygromycin 내성 유전자 둘 다를 가지고 있어 어느 항생제로도 형질전환체의 선발이 가능하다. 또한 CaMV35S promoter를 가지고 있어 삽입된 유전자가 항상적으로 발현되며, 벡터의 크기는 12Kb이다 (Fig.45).

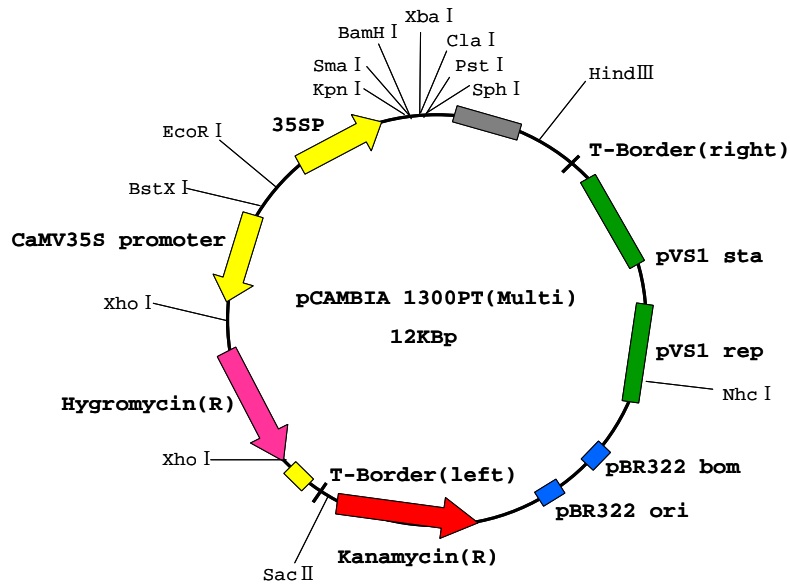


Fig. 45. Plasmid map of pCAMBIA1300PT

## 2) 형질전환된 *Agrobacterium*의 선발

4종의 유전자 (*Dgp23*, *DgAha*, *DgSti*, *DgHsp17.8*)로 재조합된 각각의 pCAMBIA1300PT 벡터를 Horsch 등 (1984)의 freezing-thawing 방법에 따라 *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) GV3101에 형질전환하여 50 mg/ℓ의 kanamycin을 첨가한 YEP 배지에서 살아남는 *Agrobacterium*을 선발하였다. 선발된 *Agrobacterium*은 5 ml의 YEP broth에 접종하여 28℃에서 하루 배양한 다음, plasmid DNA를 분리, agarose gel 전기영동으로 확인 후 오차드그라스의 형질전환에 이용하였다.

## 3) *Agrobacterium* 감염 및 형질전환 callus 선발

형질전환을 위한 식물재료로는 오차드그라스의 조직배양 및 형질전환 효율이 가장 높게 나타난 Potomac의 배반조직 유래의 캘러스를 이용하였다. 식물 형질전환 효율은 식물재료, vector, *Agrobacterium* strain, selective agent 및 배지조성 등의 요인이 영향을 미치는데, 이중 단자엽 식물의 형질전환 효율에는 식물재료가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 대표적인 단자엽 식물인 벼의 경우 배반 조직 유래의 캘러스가 형질전환 효율이 가장 높은 것으로 보고되었으며 (Hiei 등, 1994), 배반조직으로부터 합성되는 화합물이 *Agrobacterium*의 *vir* 유전자의 발현과 T-strand generation을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Vijayachandra 등, 1995).

Potomac의 배반조직으로부터 유도한 캘러스를 *Agrobacterium* 현탁액에 감염시킨 다음, hygromycin이 첨가된 N6 선발배지에서 3주간 배양하고 동일배지로 계대하여 2주간 다시 배양하였다. 선발과정을 통하여 hygromycin에 의해 갈변되어 고사하지 않고 저항성을 나타내는 캘러스를 형질전환된 callus로 추정하여 선발하였다 (Fig. 46).



Fig. 46. Selection of transgenic callus on hygromycin (50 mg/ℓ) containing medium

#### 4) 형질전환 오차드그라스 생산

항생제 첨가 배지에서 선발된 캘러스는 재분화 배지로 옮겨 신초의 분화를 유도하였다. 유도된 신초를 half-strength의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도한 다음 (Fig. 47), 원예용 상토 (5호, 부농)가 담긴 화분으로 옮기고 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 성장실에서 일주일 이상 간 순화시킨 후, 흙을 넣은 화분으로 옮겨 온실에서 생육시켰다 (Fig. 48).

재분화된 식물체는 환경 스트레스 내성 관련 유전자의 형질전환 시에 빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이 (Lagrimini, 1991; Lagrimini 등, 1997)는 나타나지 않았다. 그런데 형질전환 callus의 선발과정에서 배지에 kanamycin을 사용한 경우에 백화현상 (Albino)이 많이 발생하였다. 이러한 현상은 항생제를 kanamycin에서 hygromycin으로 변경하여 사용함으로써 극복할 수 있었다.

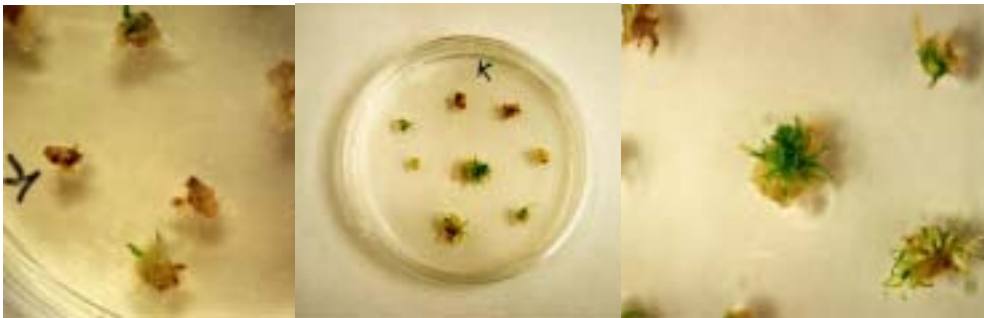


Fig. 47. Plant regeneration from transgenic callus on regeneration medium containing hygromycin (50 mg/l )



Fig. 48. Transgenic plant의 온실순화

#### 5) PCR 및 Southern blot 분석

Hygromycin이 첨가된 배지에서 재분화된 식물체로부터 genomic DNA를 분리한 후 PCR 법으로 형질전환 여부를 확인하였다. 오차드그라스의 endogeneous한 유전자와의 구별을 위하여 35S promoter와 각각 (*Dgp23*, *DgAha*, *DgSti*, *DgHsp17.8*)의 유전자에 특이적인 sense 및 antisense primer를 합성하여 PCR 증폭을 실시한 다음, 각각의 probe DNA를 이용하여 Southern blot 분석을 실시하였다.

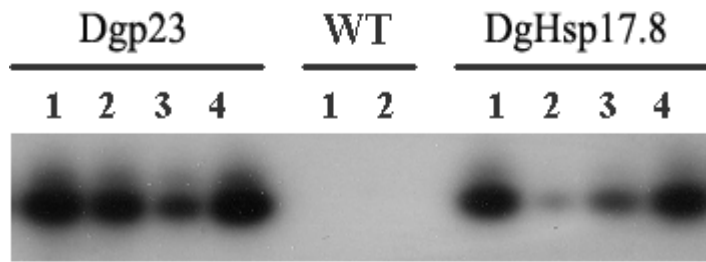
본 연구에서 4종의 유전자를 이용하여 오차드그라스의 형질전환을 시도하였으나, 본 협동과제는 제1세부과제에서 유전자를 분양받아 1년간의 기간동안 형질전환체를 생산해야 하는 시간적 한계가 있기 때문에, 우선적으로 *Dgp23* 및 또는 *DgHsp17.8* 유전자에 대해 중점적으로 형질전환을 시도하였다. 따라서 나머지 두 유전자에 대해서는 현재 일부 재분화된 식물체가 생산되고 있으나, 아직은 분석 및 검정 단계이 이르지 못한 관계로 본 보고서에는 *DgAha1* 및 *DgSti1* 유전자의 형질전환 관련 데이터는 생략하기로 하였다.

*Dgp23* (911bp) 또는 *DgHsp17.8* (883 bp) 유전자로 형질전환된 경우, 예상되는 증폭산물의 크기는 약 0.9 kb이다. PCR 증폭산물을 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, 형질전환하지 않은 wild-type에서는 증폭산물이 관찰되지 않았으나, *Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자로 형질전환된 식물체의 genomic DNA에서는 예상크기와 동일한 약 0.9kb의 증폭산물의 DNA band가 관찰되었다. 이들을 다시 Southern blot 분석을 실시한 결과, Fig. 49에서 보는 바와 같이 모든 형질전환 식물체에서 예상크기의 hybridization band가 확인되었고, 형질전환되지 않은 wild type에서는 특이적인 hybridization band가 관찰되지 않았으므로, 오차드그라스 식물체에 *Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자가 정상적으로 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다.

또한 *Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자로 형질전환된 식물체의 잎으로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR 및 Southern blot 분석을 실시한 결과, 모든 형질전환 식물체에서 예상크기의 hybridization band가 확인되었고 (Fig. 50), 형질전환 되지 않은 wild type에서는 특이적인 hybridization band가 관찰되지 않았으므로, 오차드그라스 식물체에 *Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자가 정상적으로 형질전환 되어 발현됨을 확인할 수 있었다. 한편 형질전환 식물체의 Southern blot 분석에서 hybridization band의 intensity가 개체별로 차이를 나타내었는데, 이는 도입된 유전자의 copy number의 차이, 삽입된 위치 및 integration되는 과정에서 chromosome rearrangement 현상 등이

관여한 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합하면, 내하고성 목초의 개발을 위하여 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환에 관한 실험을 수행하여, 목적의 유전자가 정상적으로 도입되어 발현되는 형질전환 오차드그라스 식물체 (T<sub>0</sub>)를 구축하였으며, 현재 자가수정과 형질전환체의 선발을 통한 homozygous line을 구축 중에 있다.



**Fig. 49. Confirmation of transgenic plants by PCR and Southern blot analysis using genomic DNAs from wild-type (WT) and transgenic plants with *Dgp23* or *DgHsp17.8* gene**

The numbers (1~4) of *Dgp23* and *DgHsp17.8* are indicated independent transgenic lines.



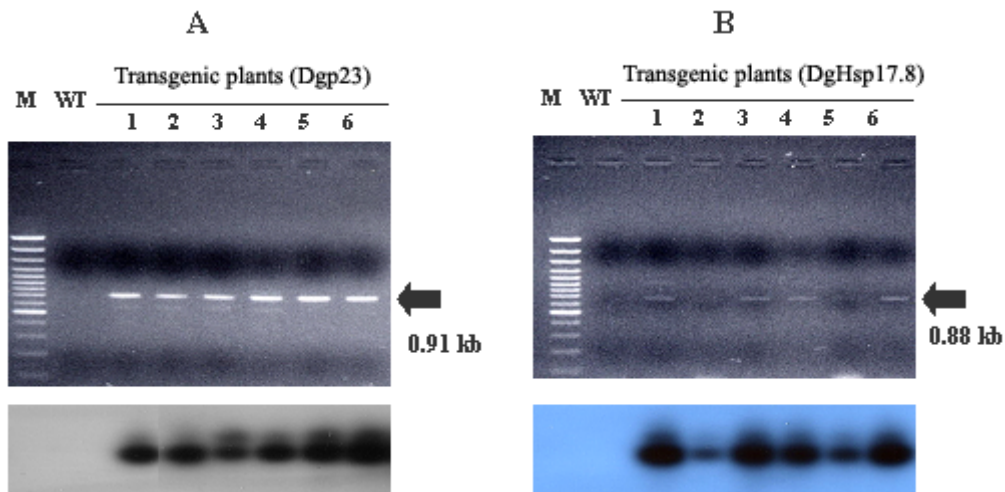


Fig. 50. Confirmation of transgenic plants by RT-PCR and Southern blot analysis using genomic DNAs from wild-type (WT) and transgenic plants

A, Transgenic plants with *Dgp23* gene; B, Transgenic plants with *DgHsp17.8*. The numbers (1~6) indicate independent transgenic lines.

다. 형질전환 오차드그라스의 고온내성 검증

1) 45, 50 및 55°C에서 처리시간별 생육상태

과종 후 4주령 된 오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.)를 45, 50 및 55°C에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 결과, 온도 및 시간에 따른 외관상의 식물체 손상은 거의 없었다. Kim 등 (1997)이 담배 (*Nicotiana tabacum* L.)에서 치사온도를 조사했을 때는 50°C에서 15분 이상 처리하면 치사온도에 도달하는 것으로 보고되어 있는데, 오차드그라스의 경우에는 55°C에서 60분간 처리하였을 때에도, 외관상으로 영향을 거의 받지 않은 것으로 나타났다 (Table 9). 45, 50 및 55°C의 온도조건에서 60분까지 처리한 1차 실험에서 치사온도를 결정할 수 없었으므로, 온도를 더 높여 2차 실험을 실시하였다.

2) 60, 65 및 70°C에서 처리시간별 생육상태

오차드그라스를 60, 65 및 70°C에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 결과, 60°C에서

30분 이상 처리했을 때에는 잎 끝이 마르고 약간 시들었으나 식물체의 손상은 약한 편이었으며, 65℃에서 처리한 결과에서도 60℃에서 처리했을 때보다는 좀 더 시들었지만 역시 심한 정도는 아니었다. 70℃에서 30분간 처리했을 때에 오차드그라스는 잎의 중간 정도까지 말랐으며, 60분간 처리했을 때에는 지상부의 잎이 2/3 이상 마른 상태였다 (Table 9). 하지만 60, 65 및 70℃의 온도조건에서 60분까지 처리한 2차 실험에서도 치사온도는 결정할 수 없었다. 그래서 온도를 10℃ 더 높여 3차 실험을 실시하였다.

**Table 9. Effects of high temperature on heat damage of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) plants at several temperature**

Treatment Observation (1~9)*	Temperature of heat treatment for 60 min (°C)						
	45	50	55	60	65	70	80
1 day later	1	1	1	2	2	4	8
2 days later	1	1	1	2	2	5	9
3 days later	1	1	1	2	2	5	9
4 days later	1	1	2	2	2	6	9
5 days later	1	1	2	2	3	6	9
6 days later	1	1	2	2	3	6	9
7 days later	1	1	2	2	3	6	9

\* Damage index: 1, normal; 9, death

**Table 10. Determination of heat-killing temperature of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)**

Observation (1~9)*	Treatment											
	Heat treated time at 80°C (min)											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
1 day later	2	2	2	3	4	5	5	5	6	6	7	8
2 days later	2	2	2	4	5	5	6	6	6	6	8	9
3 days later	2	2	2	4	5	5	6	6	6	6	8	9
4 days later	2	2	2	4	6	6	7	7	7	7	9	9
5 days later	2	2	2	5	6	6	7	7	7	7	9	9
6 days later	2	2	2	5	6	6	7	7	7	7	9	9
7 days later	2	2	2	5	6	6	7	7	7	7	9	9

\* 1: normal, 9: death

### 3) 80°C에서 처리시간별 생육상태

열처리 온도를 10°C 더 높여 오차드그라스를 80°C에서 5분부터 60분까지 5분 간격으로 처리한 결과, 처리 후 1일 이내에 50분 이상 처리에서 거의 죽어가는 현상이 나타났다. 처리 후 2일에는 60분 처리에서 모두 죽었으며, 처리 후 4일에는 55분 처리에서 모두 죽었으나, 50분 이하의 처리에서는 7일까지 죽은 개체를 발견할 수 없었다. 처리 후 7일부터는 완전히 죽지 않은 식물체의 경우 새로운 shoot가 재생됨을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 오차드그라스의 치사온도는 80°C에서 55분 처리하는 것으로 결정되었다 (Table 10). 앞으로 내하고성 및 재해저항성 유전자를 도입한 형질전환 오차드그라스가 개발될 경우, 1차적으로 실험실 조건에서 고온내성 정도를 조사할 수가 있으며, 이 때 치사온도 (80°C에서 55분)보다 조금 약하게 처리하여 (80°C에서 45분 또는 50분) 서로 비교할 수 있을 것으로 판단된다.

Fig. 51에서 A는 생장실에서 4주 동안 재배한 상태의 오차드그라스이며, B는 오차드그라스를 80°C에서 5분 간격으로 60분까지 처리 7일 후 생육상태이고, C는 80°C에서 50분 처리 후 7일 된 오차드그라스와 처리하지 않은 오차드그라스를 촬영한 사진이다.

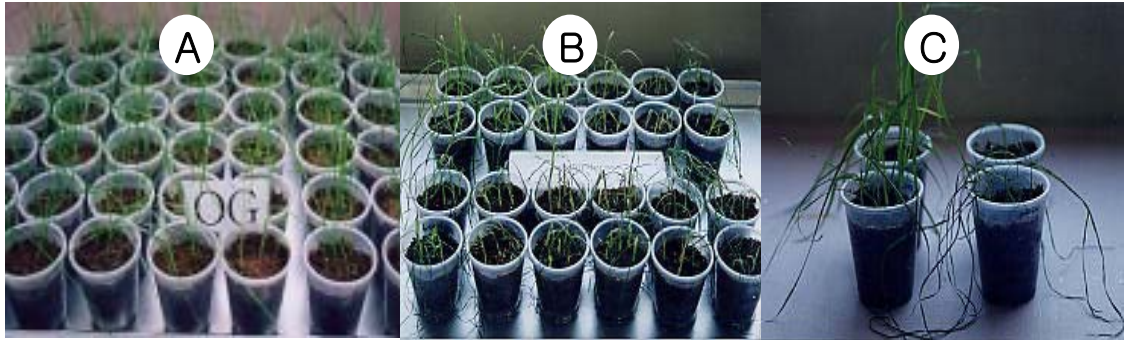


Fig. 51. Determination of killing temperature of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.).

#### 4) 형질전환 오차드그라스의 고온내성 검증

*Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자의 도입이 식물체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 식물체 수준에서 알아보기 위하여, 온실에서 성장시킨 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 heat-killing temperature를 조사하였다. 그 결과 60℃에서 50분 이상의 열처리가 형질전환 되지 않은 대조구 식물체의 heat-killing temperature임을 확인할 수 있었다 (Table 10). Fig. 52A에서 나타난 바와 같이, 고온에 의한 피해정도의 차이가 육안으로 관찰되었는데, heat treatment 3일 후 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 leaf disc는 고온에 의한 피해로 인해 점차 갈변되어 되사하는 현상이 관찰되었다 (Fig. 52B). 따라서 오차드그라스의 heat-killing temperature를 60℃에서 50분 처리하는 것으로 결정하고, *Dgp23* 또는 *DgHsp17.8* 유전자로 형질전환된 식물체와 대조구 식물체의 leaf disc를 각각 취하여, 동일한 조건으로 60℃에서 50분간 heat treatment를 실시하였다. 그 결과, *Dgp23* 유전자를 도입한 형질전환체는 대조구 식물체와 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았으나, Fig. 52C에서 보는 바와 같이, *DgHsp17.8* 유전자로 형질전환된 오차드그라스는 대조구 식물체에 비해 leaf disc가 60~80% 이상 열에 의한 피해로부터 내성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 *DgHsp17.8* 유전자의 도입이 heat stress로부터 식물체를 보호함으로써 고온에 대한 내성을 부여한 것으로 판단된다. *Dgp23* 유전자로 형질전환된 식물체는 앞으로 좀 더 연구해 볼 필요가 있을 것으로 판단된다.

고온내성 검정은 식물체 생육상태가 동일해야 하고 동일한 열처리가 이루어져야 하는데, 본 연구에서는 형질전환체의 종자가 아직 생산되지 않은 관계로 식물체 자체를 이용하지 않고, 부득이 잎 조직을 이용해서 고온검정을 실시하였다.

식물체를 고온에 의한 손상으로부터 보호하는데 필요한 최소한의 sHsp의 양은 아직 보고된 바는 없지만, 고등식물에서 sHsp는 고온 환경에서 전체 단백질의 1%까지 축적되는 것으로 알려져 있고, 이는 세포의 열손상을 방지하는 과정에서 sHsp가 중요한 역할을 할 뿐 아니라 많은 양의 sHsp가 요구된다는 것을 알 수 있다 (Lin 등, 1984; Kimpel 등, 1990; Vierling, 1991). 고온내성 획득에 있어 sHsp의 기능에 관한 직접적인 증거로서, 최근 sHsp 유전자를 이용해 형질전환 식물체를 생산했을 때 고온내성이 증가되었다는 보고들이 있다 (Park 등, 1996; Kim 등 1997; Banzet 등, 1998).

따라서 본 연구에서 단자엽 식물인 오차드그라스의 종자 유래의 캘러스를 이용하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법으로 *DgHsp17.8* 유전자를 도입한 형질전환 오차드그라스 계통은 고온내성 목초의 개발을 위한 중요한 재료로 활용될 것으로 판단된다. Fig. 53는 *Dgp23* 및 *DgHsp17.8* 유전자로 형질전환된 오차드그라스 계통들로서, GMO 격리포장에서 관리하며 분석 및 종자생산을 위해 재배하는 전경이다. 이 계통들 중 고온내성이 강한 우수계통들을 지속적으로 선발한 다음, 형질전환체와 형질전환체간 또는 형질전환체와 비형질전환체간 교배조합을 작성하여, 고온내성 오차드그라스 신품종을 육성하는 재료로 활용코자 한다.

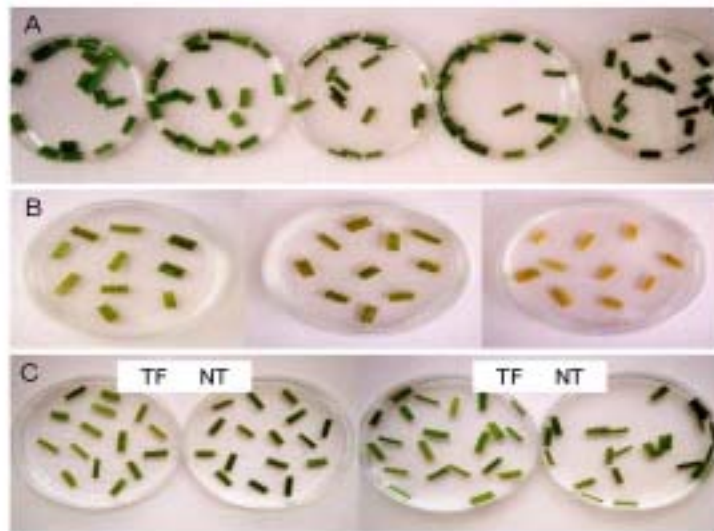


Fig. 52. Treatment of heat killing temperatures on the leaf discs of transgenic with *DgHsp17.8* gene or non-transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)

A. Leaf discs of non-transgenic orchardgrass exposed to 60°C for 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively.

B. Leaf discs of non-transgenic orchardgrass exposed to 60°C for 30 min were observed for 3 days at 25°C.

C. Leaf discs of transgenic orchardgrass with *DgHSP17.8* gene and non-transgenic orchardgrass exposed to 60°C for 30 min.

NT, Non-transgenic orchardgrass; TF, Transgenic orchardgrass



Fig. 53. The lines of transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) plants with *Dgp23* or *DgHsp17.8* gene

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	연구개발 목표	달성도	관련분야의 기여도	
1 차 년 도	제 1 세 부 과 제	1. 고온 특이적 발현 유전자의 분리  2. 오차드그라스 cDNA library의 구축	○ 오차드그라스의 mRNA 분리  ○ Differential display에 의한 고온 특이적 발현 유전자의 분리  ○ 분리한 cDNA의 Northern blot analysis에 의한 검정  ○ 고온 스트레스에 의해 유도되는 cDNA library의 제작	고온내성 유전자의 대량분리로 고온내성 작물개발의 기초기술이 될 것으로 기대됨.
	제 1 세 부 과 제	1. 고온 특이적 발현 유전자의 특성연구	○ 오차드그라스 cDNA library로부터 full length clone의 screening  ○ 선발된 유전자의 구조 결정  ○ 선발된 유전자의 특성 연구	고온내성 관련 유전자의 특성연구로 내하교의 분자생물학적 기작연구에 기여함
2 차 년 도	제 1 세 부 과 제	1. 오차드그라스의 형질전환체계 확립	○ 오차드그라스의 조직배양 및 재분화 효율 증진  ○ 오차드그라스의 형질전환 효율 향상 기술 개발	오차드그라스의 형질전환체계 확립함으로써 우수한 형질을 갖는 오차드그라스의 개발이 가능함.
	제 1 세 부 과 제			

구 분		연구개발 목표	달성도	관련분야의 기여도
3 차 년 도	제 1 세 부 과 제	1. 형질전환용 vector의 구축 및 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 내하고 관련 유전자들의 형질전환용 vector 구축</li> <li>○ 선발된 내하고 관련 유전자들의 애기장대로의 형질전환</li> </ul>	고온내성 기작을 연구할 수 있는 재료를 확보
	제 1 협 동 과 제	1. 내하고성 오차드그라스의 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 오차드그라스의 개발</li> <li>○ 형질전환 오차드그라스의 고온내성 검증</li> </ul>	내하고성 오차드그라스의 개발로 목초의 생산성 증대가 기대됨.



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 기대효과

우리나라와 같이 겨울이 춥고 여름이 무더운 환경 하에서는 추위에 강하거나 더위에 강한 식물 즉, 양극단의 식물들이 계절별로 우점하게 마련이다. 그러므로 우리나라에 도입된 북방형 목초들은 하고현상으로 인하여 생산 지역이 한정될 뿐만 아니라 여름철에는 엄청난 수량 감소가 따른다. 이들 더위에 약한 목초들을 우리나라에서 재배하기 위해서는 더위에 강한 품종을 육종해야한다. 앞에서 지적한 것처럼 육종에는 많은 시간이 걸리므로, 내하고 관련 유전자와 내열성 유전자를 도입하여 고온에 내성을 가지는 목초를 개발할 필요가 있다.

식물의 고온 적응 기작을 기초 생화학적, 생리적 측면의 연구를 통하여 이해하고, 내하고 관련 유전자의 대량 확보로 가용 유전자의 pool size를 증대시키면 하고현상을 피해갈 수 있는 목초의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

또한, 유용 유전자가 확보되고 개발되어 유용성이 입증되면 자체로도 경제성이 있는 무형 또는 유형의 상품이 될 수 있을 뿐만 아니라 작물에 적용되면 매우 가치 있는 종자를 수출하는 나라가 될 수 있다.

본 연구에서 분리된 유전자군은 가치만 입증되면 다른 작물에 적용도 가능하게 되므로 동남아는 물론 유럽의 여러 나라에도 필요한 유전자가 될 수 있다.

#### 1. 기술적 측면

- 가) 식물에서 유용한 유전자의 확보는 외국에 의존하지 않고 독자적으로 새로운 신품종을 개발하기 위하여 가장 선행되는 기술이다.
- 나) 내열성유전자는 여러 작물에 사용할 수 있는 가능성 때문에 선호도가 높은 유전자원이 될 것이다.
- 다) 내하고성 관련 기초생리 연구를 통하여 식물의 고온내성 기작을 연구하므로써 고온내성 작물 개발의 기초 기술이 된다.
- 라) 본 연구에서 오차드그라스의 형질전환체계를 확립하여 다른 유전자 즉 제초제내성, 내병성 등의 유용유전자의 도입이 가능하게 되므로 우수한 형질을 가지는 오차드그라스의 개발이 가능하다.

마) 유전자 탐색 기술은 여러 작물에 필요하므로 본 연구를 통하여 기술의 축적이 가능하게 된다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

가) 내열성 유전자의 도입에 의한 내하고성 목초의 개발은 조사료의 생산을 증대하여 우리나라 축산물 가격을 낮출 수 있으며 수입 축산물과의 경쟁을 가능하게 할 것이다.

나) 사료 곡물의 수입 감소로 무역 적자를 줄일 수 있다.

다) 내하고 관련 유전자의 확보와 이 유전자들을 도입한 작물의 개발을 통해 종자 시장에서 부가가치가 높은 상품을 만들 수 있게 될 것이다.

라) 우리나라의 독자적인 유전자 확보로 우수 생물의 자원화에 힘쓰는 나라들과 함께 경쟁할 수 있을 것이다.

## 2절 활용방안

1. 본 연구 결과 확보되는 내열성 유전자가 가을배추에 도입되면 맛있는 가을배추가 봄, 여름에도 생산되게 활용한다.
2. 확보된 내열성 유전자들은 식물의 분자 육종 및 여러 부문에서 쓰일 유전자원으로 활용될 수 있다.
3. 고온 내성을 갖는 형질 전환 농작물과 원예작물을 만들 수 있도록 유전자를 제공한다.
4. 확보된 유전자들은 유용성에 따라 특허를 획득하게 되고 외국에서의 산업화를 위하여 경제적인 혜택을 받고 제공할 수 있다.

## 3절 추가 연구의 필요성

본 연구를 통하여 확보된 Hsp90 샤페론 기구의 구성요소들인 Hsp90, Hsp70, Hop 그리고 p23의 yeast two hybrid library로부터 client protein들의 선발, client protein들의 생화학적 · 분자생물학적 특성 연구, iRNA를 이용한 knock out 식물체와 과발현 형질전환 식물체의 제작, KO과 과발현 식물체에 대한 특성 연구는 식물의 고온 적응 기작을 이해하는데 크게 기여 할 수 있을 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

곡류 위주의 식생활을 하는 아시아에 비해 유럽과 미국 같은 서구사회에서는 육류 위주의 식생활을 오랫동안 영유하고 있다. 세계적으로 중요한 경작물의 경우, 범세계적인 consortium을 형성하여 genome project, 유용유전자의 확보 등의 연구에 매진하고 있으며, 우리나라도 몇 개의 project에 포함되어 활발한 연구를 하고 있다. 그러나 그 이외의 작물들에 대한 연구는 산발적이며 매우 미흡한데 그 한 예가 서구와 아시아의 식생활 차이에서 언급할 수 있는 목초 관련 연구이다. 현재까지의 분자생물학적 연구가 모델식물인 Arabidopsis에 중점을 두어 괄목할 만한 성과를 이루었다면, 앞으로는 유용한 작물에 대한 연구, 혹은 유용 작물로부터 경제성 있는 유전자원의 확보에 총력을 기울일 때이다. 서구의 경우, 이미 목초를 기반으로 한 식물생리학적 연구에서부터 최근의 빠른 분자생물학적 기법의 도입으로 인한 관련 연구결과가 쉽게 발표되고 있는 실정이다. 그러나 우리나라를 포함한 아시아의 경우, 목초를 기반으로 분자생물학적 연구를 하는 연구진은 손에 꼽을 정도이다. 이에 본 연구진은 축산연구소 조사료자원과와 협동으로 세계적으로 널리 재배되는 목초인 오차드그라스로부터 내열성 유전자의 확보에 몰두하여, 다수의 유전자를 확보하였으며 형질전환 식물체를 개발하였다. 최근 GMO에 대한 우려가 많지만, 목초의 경우 사람이 직접 섭취하지 않고, 가축이라는 중간 거름 장치가 있어 보다 안전한 식생활에 도움이 되리라 생각한다.

본 연구진이 확보한 내열성 관련 유전자들의 경우, 동물에서는 연구가 많이 진행되어 있다. 특히 heat shock protein들은 생물종간에 광범위하게 존재하는 단백질로서 그 중요성이 인식되어 많은 연구자들이 노력을 기울이고 있다. 그러나 그에 비해 식물의 heat shock protein들은 아직 sequence만 밝혀져 있는 경우가 대부분이며, 그 기능 또한 명확하지 않다. Heat shock protein들의 공통적인 기능인 다른 단백질을 보호하는 chaperone 기능은 병원성 단백질 혹은 어떤 자극에 의한 정상적인 단백질들의 손상을 막아주는 것이기에 이미 의학계에서 많은 관심을 쏟고 있다. 따라서 식물 유래 heat shock protein들의 확보 및 향후 약품으로의 발전가능성은 넓을 것으로 생각한다.

식물로부터 분리한 Hsp90 chaperone multicomplex를 이루는 component들을 본

연구진과 같이 집중 연구하는 곳은 드물다. 미국 Arizona 대학의 Vierling 교수팀은 현재 세계적으로 인정받는 Heat shock protein 연구자이다. 그러나 최근에 들어 small Hsp 관련 연구에 중점을 두는 듯 하며, 아직 상대적으로 거대분자인 Hsp90 complex에 관한 연구는 미비한 것 같다. 본 연구 결과 확보한 이들 heat shock protein의 생화학적 연구와 식물체로의 도입은 중요 경작물의 내열성 획득에 큰 도움이 되리라 생각한다.

## 제 7 장 참고문헌

- Bae, E.K., I.A. Lee, K.Y. Kim, B.H. Lee, D.Y. Son, H.S. Lee, M.S. Chung and J.K. Jo. 2002. Comparison of callus formation ratios from seed explants, callus sizes and regeneration efficiency among several orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties. J. Korean Grassl. Sci. 22(2):93-100.
- Bharti, K., Schmidt, E., Lyck, R., Heerklotz, D., Bublak, D., Scharf, K. D. 2000. Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon Peruvianum*. The Plant Journal. 22(4): 355-366.
- Birnboim H.C., Doly J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Burke, J. J., O'Mahony, P. J., Oliver, M. J. 2000. Isolation of Arabidopsis Mutants Lacking Components of Acquired Thermotolerance. Plant Physiology. 123: 575-587.
- Campbell, J. L., Klueva, N. Y., Zheng, H., Nieto-Sotelo, J., Ho, T. -H. D. and Nguyen, H. T. 2001. Cloning of new members of heat shock protein *HSP101* gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA. Biochimica et Biophysica Acta. 1517: 270-277.
- Carranco, R., Almohuera, C., Jordano, J., 1999. An Imperfect Heat Shock Element and Different Upstream Sequences Are Required for the Seed-Specific Expression of a Small Heat Small Heat Shock Protein Gene. Plant Physiology. 121: 723-730.
- Chen, Q., Lauzon, L. M., DeRocher, A. E., Vierling, E. 1990. Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat shock protein. J. Cell. Biol. 110: 1873-1883.
- Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bandich, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3672-3676.
- Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to another culther of cereal crops. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Pecking. pp. 43-50.
- Conger, B.V. and G.E. Hanning. 1991. Regeneration of embryogenic orchardgrass germplasm with a high capacity for somatic embryogenesis from in vitro cultures. Crop Sci. 31:855-893.
- Conger, B.V., G.E. Hanning, D.J. Gray and J.K. McDaniel. 1983. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. Science. 221: 850-851.
- Czarnecka, E., Edelman, L., Schöffl, F., Key, J. L. 1984. Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. Plant Mol. Biol. 3: 45-58.
- Czernilofsky, A.P., R. Hain, L. Herrera-Estrella, E. Goyvaerts, B.J. Baker and J. Schell. 1986. Fate of selectable marker DNA integrated into genome of *Nicotiana tabacum*. DNA 5:101-113.
- Declene M., 1985. The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopath. Z. 113:81-89.
- DeRocher A.E., Helm K.W., Lauzon L.M., Vierling E., 1991. Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. Plant Physiol 96:1038-1047.
- Gasser C.S., Fraley R.T., 1989. Genetically engineering plant for crop improvement. Science 244:1293-1299.
- Gray, D.J., B.V. Conger. 1985. Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and quality on cell suspensions of *Dactylis glomerata* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 4:123-133.
- Gray, D.J., B.V. Conger and G.E. Hanning. 1984. Somatic embryogenesis in suspension and suspension-derived callus cultures of *Dactylis glomerata* L. Protoplasma 122:196-202.
- Gurley, W. B. 2000. HSP101:A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in

- Plants. *The Plant Cell*. 12: 457-460.
- Hanning, G. E. and B. V. Conger. 1986. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata* L. *J. Plant Physiol.* 123:23-29.
- Harrell, J. M., Kurek, I., Breiman, A., Radanyi, C., Renoir, J-M., Pratt, W. B. and Galigniana, M. D. 2002. All of the protein interactions that link steroid receptor · immunophilin heterocomplexes to cytoplasmic dynein are common to plant and animal cells. *Biochemistry*. 41:5581-5587.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.* 6(2):271-282.
- Hong, S. W., Vierling, E., 2000. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *PNAS*. 97: 4392-4397.
- Hong, S. W., Vierling, E., 2001. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* 27: 25-35.
- Horn M.E., B.V. Conger and C.T. Harms. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), *Plant Cell Report* 7:371-374.
- Horsch R.B., Fly J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rodgers S.G., Fraley R.T., 1984. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 223:496.
- Kadyrzhanova, D. K., Vlachonassios, K. E., Ververidis, P., Dilley, D. R. 1998. Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA<sup>1</sup> in tomato fruit by of mRNA differential display<sup>2</sup>. *Plant Molecular Biology*. 36: 885-895.
- Keeler, S. J., Boettger, C. M., Haynes, J. G., Kuches, K. A., Johnson, M. M. 2000. Acquired Thermotolerance and Expression of the HSP100/ClpB Genes of Lima Bean. *Plant Physiology*. 123: 1121-1132.
- K.Y. Kim, B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, E.S. Chung, W.H. Kim and J.G. Kim. 2001. Transformation of Birdsfoot trefoil by *BcHSP17.6* Gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Korean Grassl. Sci.* 21(3): 145-150.
- K.Y. Kim, B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, S. Seo, S.H. Yoon, G.J. Park and J. Jo. 2001. Transformation of Alfalfa by *BcHSP17.6* Gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Korean Grassl. Sci.* 21(3): 151-156.
- K.Y. Kim, G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.S. Jang and J. Jo. 2001. Root initiation in cut Italian ryegrass stems by treatment of IBA. *J. Korean Grassl. Sci.* 21(1): 31-34.
- K.Y. Kim, G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, Y.C. Lim, Y.S. Jang and W.H. Kim. 2001. Root initiation in cut Birdsfoot trefoil stems by treatment of IBA. *J. Korean Grassl. Sci.* 21(1): 35-38.
- K.Y. Kim, K.M. Kang, B.R. Sung, M.J. Kim, Y.W. Rim, W.H. Kim, G.J. Park and B.H. Lee. 2004. Determination of Heat Killing Temperature of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Korean Grassl. Sci.* 24(1): 21-24.
- K.Y. Kim, K.M. Kang, E.K. Bae, I.A. Lee, Y.W. Rim, G.J. Choi, G.J. Park, D. Son and J. Jo. 2003. Callus formation ratio and regeneration efficiency of orchardgrass varieties developed in Korea. *J. Korean Grassl. Sci.* 23(1): 59-64.
- K.Y. Kim, K.M. Kang, G.J. Choi, Y.S. Jang, Y.C. Lim, M.J. Kim, J.G. Kim, W.H. Kim and G.J. Park. 2002. Production of New Regenerated Plants by Anther Culture of the Hybrids of Italian ryegrass × Tall fescue. *J. Korean Grassl. Sci.* 22(4): 273-278.
- K.Y. Kim, K.M. Kang, G.J. Choi, Y.W. Rim, Y.S. Jang, B.R. Sung, D. Son, B.H. Lee and J. Jo. 2002. Production of new regenerated plant by anther culture of Italian ryegrass. *J. Korean Grassl. Sci.* 22(3): 209-212.
- K.Y. Kim, K.M. Kang, G.J. Park, E.K. Bae, I.A. Lee, B.H. Lee, S.S. Kwak and J. Jo. 2003. Examination of root induction ratio for regeneration of alfalfa by medium component. *J.*

- Korean Grassl. Sci. 23(2): 95-100.
- K.Y. Kim, K.M. Kang, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.C. Lim, S. Seo, D. Son and J. Jo. 2004. Determination of Heat Killing Temperature of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 24(1): 25-28.
- K.Y. Kim, Y.S. Jang, B.H. Lee and J. Jo. 1998. Expression and accumulation of LMW HSPs under various heat shock conditions. J. Korean Grassl. Sci. 18(4): 303-310.
- K.Y. Kim, Y.S. Jang, G.J. Choi, Y.W. Rim, G.J. Park, B.H. Lee, D. Son and J. Jo. 2002. Molecular cloning of a cDNA encoding 17.6-kilodalton heat shock protein from *Brassica campestris* and its expression in *E. coli*. Korean J. Genetics 24(4): 383-388.
- K.Y. Kim, Y.W. Rim, K.J. Choi and B.R. Sung. 1999. Callus induction from seeds of birdsfoot trefoil and plant regeneration on BOi2Y medium. J. Korean Grassl. Sci. 19(4): 303-308.
- K.Y. Kim, Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, S. Seo, B.H. Lee and J. Jo. 1999. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. J. Korean Grassl. Sci. 19(1): 23-30.
- Kim K.Y., Y.W. Rim, G.J. Choi, J.S. Shin, J.G. Kim and J.K. Jo. 1998, Rapid Regeneration of Plants on N6 Medium from Orchardgrass Calli, Korean J. Grassl. Sci. 18(3):267-272.
- Kim, K.Y., M.S. Chung and J. Jo. 1997. Acquisition of thermotolerance in the transgenic plants with BcHSP17.6 cDNA. J. Korean Grassl. Sci. 17(4): 379-386.
- Kim, K. Y., Rim, Y. W., Choi, K. J., Shin, J. S., Kim, J. G. and Jo, J. 1998. Rapid regeneration of plants on N6 medium from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) calli. J. Korean Grassl. Sci. 18(3): 267-272.
- Krol, A., D.L.A. van Mur, M. Beld, J.N.M. Mol and A.R. Stuitje. 1990. Flavonoid genes in *Petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell 2:291-299.
- Kuo, H. -F., Tsai, Y. -F., Young, L. -S. and Lin, C. -Y. 2000. Ethanol treatment triggers a heat shock-like response but no thermotolerance in soybean (*Glycine max* cv. Kaohsiung No.,8) seedlings. Plant, Cell & Environ. 23:1099-1108.
- Lee, G. J., Vierling, E. 2000. A Small Heat Shock Protein Cooperates with Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein<sup>1</sup>. Plant Physiology. 122: 189-197.
- Lee, H., Bae, E., Kim, K. Y., Won, S., Chung, M. and Jo, J. 2001. Transformation of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with Glutathione Reductase Gene. J. Korean Grassl. Sci. 21(1): 21-26.
- Lee, H., B.H. Lee, S. Won, S. Lee and J. Jo. 2000. Effect of copper on the plant regeneration from seed derived callus of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), J. Korean Grassl. Sci. 20(4):259-264.
- Lee, H., E.K. Bae, K.Y. Kim, S. Won, M. Chung and J. Jo. 2001. Transformation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with glutathione reductase gene. J. Korean Grassl. Sci. 21(1):21-26.
- Lee, H., Kwon, Y. S., Lee, B. H., Won, S. H., Kim, K. Y. and Jo, J. 2000. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 20(1): 7-12.
- Lee H.S., B.H. Lee and J.K. Jo. 2000. Development of transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 20(2):103-108.
- Lee H.S., Y.S. Kwon, B.H. Lee, S.H. Lee and J.K. Jo. 1998b. Plant regeneration from seed-derived callus in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 18(4):285-290.
- Lee, H.S., Y.S. Kwon, B.H. Lee, S.H. Won, K.Y. Kim and J.K. Jo. 2000. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 20(1):7-12.

- Lee, Y. J., Nagao, R. T., Key, J. L. 1994. A Soybean 101-kD Heat-Shock Protein Complements a Yeast *HSP104* Deletion Mutant in Acquiring Thermotolerance. *The Plant Cell*. 6: 1889-1897.
- Lindquist, S, Craig, E.A.,1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677.
- Lindquist, S., Kim, G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5301-5306
- Malik, M. K., Slovin, J. P., Hwang, C. H., Zimmerman, J. L. 1999. Modified expression of a rice small heat shock protein gene, *Hsp17.7*, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal*. 20(1): 89-99
- Mansfield M.A., Key J.L., 1987. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. *Plant Physiol* 84:1007-1017.
- McGookin R. 1984. RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. In: Walker JM (ed), *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2, Humana Press, New Jersey, pp. 113-116.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:71-78.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
- Nieto-Sotelo, J., Kannan, K. B., Martinez, L. M. and Segal, C. 1999. Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/HSP100 protein homologue. *Gene*. 230: 187-195.
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J. K., Singh, S., Millson, S. H., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P. W. 2002. Activation of the ATPase Activity of Hsp90 by the Stress-Regulated Cochaperone Aha1. *Molecular Cell*. 10:1307-1318.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437-496.
- Potrykus I., Soul M.W., Petruska J., Pazkowski J., Shillito R.D., 1985. Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188.
- Polla, B. S., Kantengwa, S., François, D., Salvioli, S., Franceschi, C., Marsac, C., Cossarizza, A. 1996. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6458-6463.
- Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E., Lindquist. 2000. Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 12: 479-492.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J., Buchner, J. 2003. Stil Is a Non-competitive Inhibitor of the Hsp90 ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(12):10328-10333.
- Rim, Y.W., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.C. Lim, M.J. Kim, G.J. Park, K.Y. Kim, J.W. Chung and N.G. Park. 2003. Growth characteristics and productivity of new orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) variety "Jangbeol 101". *J. Korean Grassl. Sci.* 23(3): 207-210.
- Rim, Y.W., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.C. Lim, M.J. Kim, G.J. Park, K.Y. Kim, J.W. Chung and N.G. Park. 2003. Growth characteristics and productivity of new orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) variety "Jangbeol 102". *J. Korean Grassl. Sci.* 23(3): 211-218.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, E. F., Coulson, A. R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA.* 74: 5463-5467.
- Schirmer, E. C., Lindquist, S., Vierling, E. 1994. An Arabidopsis Heat Shock Protein Complements a Thermotolerance Defect in Yeast. *The Plant Cell*. 6: 1899-1909.
- Schöffl, F., Key, J. L., Prändl, R., Reindl, A. 1998. Regulation of the Heat-Shock Response. *Plant Physiol*. 117: 1135-1141.
- Shoji, T., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K. 2000. Two types of heat shock factors in



- cultured tobacco cells. *Plant Cell Reports*. 19: 414-420.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci.* 35:301-309.
- Songstad, D. D. and B. V. Conger. 1986. Direct embryogenesis from cultured anthers and pistils of *Dactylis glomerata*. *Am. J. Bot.* 73:989-992.
- Soto, A., Allona, I., Collada, C., Guevara, M., Casdo, R., Rodriguez-Cerezo, E., Aragoncillo, C., Gomez, L. 1999. Heterologous Expression of a Plant Small Heat-Shock Protein Enhances *Escherichia Coli* Viability under Heat and Cold Stress. *Plant Physiology*. 120: 521-528.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M., Buchner, J. 2003. Analysis of the Interaction of Small Heat Shock Proteins with Unfolding Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(20):18015-18021.
- Sullivan, W. P., Owen, B.A.L., Toft, D. O. 2002. The Influence of ATP and p23 on the Conformation of hsp90. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(48):45942-45948.
- Vierling E., 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:579-620.
- Vijayachandra, K., K. Palanichelvam and K. Veluthambi. 1995. Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens vir* genes and T-strand generation. *Plant Mol. Biol.* 29:125-133.
- Waters E.R., Lee G.J., Vierling E., 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Biol* 47:325-338.
- Wohnik, G. M., Young, J. C., Schmidt, U., Holsboer, F., Ulrich, H. F. and Rein, T. 2004. Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90. *FEBS Letter*. 560:35-38.
- Young, J. C., Hartl, F. U. 2000. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *The EMBO Journal*. 19(21):5930-5940.
- Zhang, Z., Quick, M. K., Kanelakis, K. C., Gijzen, M., Krishna, P. 2003. Characterization of a Plant Homolog of Hop, a Cochaperone of Hsp90. *Plant Physiology*. 131:525-535
- 농림부, 1998. 농림부 조사료 생산확대 추진대책.
- 농림부, 2001. 국내 조사료 수급과 조사료 생산단지 조성방향.
- 농촌진흥청. 2002년도 동계작물 신품종개발공동연구 보고서. p. 201-212.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.