

최 종  
연구보고서

세로토닌유도체의 종자축적을 통한  
항산화활성 기능성 벼 개발

Enriched production of antioxidant serotonin  
derivatives in transgenic rice seed

연구기관

전남대학교

농림자료실



0013434

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “세로토닌유도체의 종자축적을 통한 항산화활성 기능성 벼 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 05월 24일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 백 경 환

연 구 원 : 강기윤, 강세이,  
김찬수, 김혜숙,  
이경진, 이용혁,  
이천희, 양기웅,  
정선요

협동연구기관명 : 작물과학원

협동연구책임자 : 김 기 중

# 요 약 문

## I. 제 목

세로토닌유도체의 종자축적을 통한 항산화활성 기능성 벼 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

세로토닌유도체(serotonin derivatives)는 식물이 생합성하는 2차대사산물로서, 페놀화합물과 아민화합물의 중합체이다. 초코렛, 녹차, 올리브기름, 적포도주에서 많이 발견 되는 polyphenol의 일종으로서, 대표적인 세로토닌유도체 화합물로서는 쿠마로일세로토닌(coumaroylserotonin; CS), 페루로일세로토닌(feruloylserotonin; FS) 등이 있다. 이들 CS 및 FS는 홍화씨에서 항산화활성 물질로서 최초 분리되었으며, 천연항산화제인 tocopherol과 합성항산화제인 BHT보다 높은 항산화활성을 발휘하는 것으로 보고 되어있다. 또한 상기 세로토닌유도체가 항산화활성 외에 항염증 억제활성도 갖는 것으로 보고되었으며, 대한민국 특허등록번호 제10-0354791호에는 상기 페루로일세로토닌 및 쿠마로일세로토닌의 신규한 용도인 뼈 형성 촉진 활성이 보고되어 있다. 본 연구는 세로토닌 생합성 유전자를 벼에 도입함으로써 항산화활성 및 뼈형성촉진 기능을 가진 세로토닌유도체 관련 화합물을 함유하는 기능성 벼 종자를 개발함이 연구의 최종 목표입니다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 영양약리물질(Nutraceuticals)로 알려진 세로토닌유도체를 생합성하는 벼를 육성하는 과제로서, 본 연구진이 세계 최초로 고추에서 클로닝한 serotonin *N*-hydroxycinnamoyl transferase (SHT) 유전자를 벼에 도입하여 효과적으로 Nutraceuticals 화합물을 벼에 축적 시킬 수 있는 방법이 무엇인지를 규명하고자 한다. SHT 유전자는 세로토닌유도체 화

합물인 쿠마로일세로토닌(coumaroylserotonin), 페루로일세로토닌 (feruloylserotonin), 카페오일세로토닌(caffeoylserotonin), 및 시나포일세로토닌(sinapoylserotonin)를 생합성하는 단백질을 암호화하고 있는 유전자로서, 28Kda의 분자량을 소유하고 있다. 본 연구목표를 달성하기 위해 다음 세 가지의 주안점을 두고 연구를 수행하고자 한다. 첫째는 세로토닌유도체 합성을 촉매하는 SHT 유전자를 벼 종자 특이 조절유전자인 Glutelin promoter 이용하여, 형질전환벼를 육성하고, 이 형질전환벼가 세로토닌유도체 합성을 종자에 과다축적 시킬 수 있는지를 조사한다. 특히 Glutelin promoter를 이용한 형질전환벼가 기존육성한 Ubiquitin promoter를 이용한 형질전환벼보다 더 많은 양의 세로토닌유도체의 합성을 촉매하는지 비교 검토하고자 한다. 또한 Glutelin promoter : SHT 발현 형질전환벼의 경우에서도, 뿌리에 cinnamic acid, tyramine, ferulic acid를 처리하였을 때 이들 세로토닌유도체 화합물이 증대되는 지를 조사하고자 한다. 이들 세로토닌유도체 화합물이 homozygous lines의 세대진전에 따라 안정적으로 생합성되는지를 아울러 조사한다. 본 연구를 통하여, 식물체내에서 SHT의 이중발현을 통하여, 식물에서 생성되는 세로토닌유도체의 생합성 방법 및 종자에 다량축적 시키는 주요 기술이 무엇인지를 밝힐 수 있을 것으로 생각되며, polyphenol 류의 세로토닌유도체를 종자에 다량 축적시킨 벼종자는 기능성 식품으로서 크게 활용될 수 있을 것이며, 둘째는 본 연구팀에서 기 확보된 Ubiquitin promoter:SHT 발현 T<sub>3</sub> homozygous 형질전환벼를 이용하여, 포장상태에서, 다양한 기질을 처리하여 세로토닌유도체의 합성 및 종자축적을 최대로 유도하는 물질이 무엇인지 동정하고자 한다. 셋째는 feruloyltyramine 및 4-coumaroyltyramine 을 생합성하는 유전자를 벼에 도입하여 세로토닌유도체와 동일한 약리활성을 지닌 티라민유도체가 어떻게 합성되는지 보고자하며, 벼에 티라민유도체 화합물이 얼마나 축적되는 지 보고자 한다. 넷째는 세로토닌을 함유하는 기능성 벼를 육성하고자 세로토닌 생합성의 rate limiting 으로 작용하는 TDC 유전자를 벼에 도입하여 세로토닌 고 함유 벼를 개발하고자 한다. 다섯째는 상기의 육성한 형질전환벼의 생산성 및 미질특성, 식미관련특성을 조사하고자한다. Ubiquitin promoter:SHT 및 Glutelin promoter:SHT 발현 형질전환벼로부터, 수확된 세로토닌유도체 함유 종자의 형태적 특성뿐만 아니라, 이들 형질전환종자의 생산성과, 미질특이성을 조사하고, 윤기치 및 식미관련특성 등을 조사한다. 저장기간에 따른 이들의 특이성도 연구하고자 한다. 이는 항산화활성이 높은 세로토닌유도체가 종자에 함유되어 있기에, 호흡에 의한 산화 및 저장중 산화스트레스에 대해 저항성을 보일 수 있으므로, 저장기간에 따른 미질특성이 일반 wild-type 보다 향상될 가능성이 있을 것으로 추정되기 때문이다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. Maize ubiquitin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 특성 및 세로토닌유도체 함량 분석

고추의 SHT를 옥수수의 ubiquitin promoter 조절 하에 벼의 genome에 도입시켰다. 세로토닌유도체의 함량 분석 및 생화학적 연구를 위해 사용한 SHT 발현 형질전환 벼는 T<sub>4</sub> 세대를 이용하였다. 형질전환 벼의 SHT 효소활성은 25-60 pkat/mg protein이나 형질전환하지 않은 대조구벼와 vector만 발현하는 transgenic control은 모두 1 pkat/mg보다 적은 효소활성이 측정되었다. 이는 형질전환 벼에서 세대가 진전되어도 SHT transgene 이 안정적으로 전달되고, 기능적으로 발현된다는 것을 의미한다. 껍질 벗긴 벼 종자에서 p-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin의 정량하기위해 T<sub>4</sub> transgenic의 종피를 벗기고 HPLC 기기를 이용하여 serotonin유도체의 함량을 측정하였다. 대조구 wild type과 transgenic control에서는 종자 g당 30 ng의 아주 적은 량의 serotonin유도체가 검출되었다. 반대로 transgenic 종자에서는 wild type보다 5-18배 더 높은 함량을 보여 주었다. 형질전환 벼에서 정량한 종자의 총 serotonin유도체(쿠마로일세로토닌(CS)+페루로일세로토닌(FS))의 함량은 종자 g당 165-562 ng 사이에 분포하였다(CS 213 ng, FS 349 ng). 종자에 serotonin 유도체의 축적에 있어서 생육기간중 SHT 효소의 기질로 작용하는 기질 처리의 효과는 대조구인 wild type에서는 tyramine을 뿌리에 처리한 것이 처리하지 않은 것 보다 serotonin유도체가 3배 이상 증가하였다. Wild type에서와 마찬가지로 transgenic 종자에서 또한 1 mM의 tyramine chemical을 처리한 것이 serotonin유도체의 함량이 더 높았다. 평균적으로 transgenic 벼에서는 chemical을 처리한 것이 처리하지 않은 것 보다 약 2배 정도 증가하였다. 몇몇의 chemical 처리 실험에서 볼 때 tyramine이 최고의 inducer로 작용하지만 transgenic 종자에서는 trans-cinnamic acid와 p-coumaric acid와 같은 다른 chemical들도 serotonin유도체의 합성에 있어서 tyramine과 유사한 효과를 지님을 보여주었다. 또한 trans-cinnamic acid의 처리에 의한 일 serotonin 유도체 함량의 time course 별 결과에 의하면 *Trans-cinnamic acid*가 함유된 배지에서 쿠마로일세로토닌(CS)과 페루로일세로토닌(FS) 생합성이 어떻게 되는지 조사하였다. 파종 후 시기별로 벼 잎을 수확하여 serotonin유도체의 량을 측정하였다. 총 34일의 배양 기간 동안 transgenic 잎들은 11째

각각 110  $\mu\text{g/g}$ 과 140 $\mu\text{g/g}$ 으로 CS와 FS가 가장 높았다. 잎의 노화가 시작되는 11일 이후 점차적으로 serotonin유도체의 수준이 감소하였다. 34일째 잎들은 완전히 노화되었고 CS와 FS의량은 각각 3  $\mu\text{g/g}$ , 5  $\mu\text{g/g}$  아래로 감소하였다. *Trans*-cinnamic acid가 없을 경우에는 transgenic 벼의 잎에서조차 serotonin유도체가 검출되지 않았다. 벼 추출물을 이용하여 항산화효과 여부를 조사하였다. Transgenic과 wild type으로부터 radical scavenging activity를 측정하기 위하여 잎의 추출물을 이용하였다. Wild type의 잎 추출물은 5-20% 정도의 낮은 DPPH radical scavenging activity를 보였다. 반대로 transgenic 벼의 잎 추출물은 10-93%의 높은 quench DPPH radical activity를 보인다. DPPH radical scavenging activity는 serotonin유도체의 절대량과 깊은 관련이 있다. 11일째의 잎 추출물은 quench DPPH radical에서 가장 많은 activity를 보이고 그 뒤를 7일과 15일째에 높은 활성을 보였다. 결론적으로 본 연구 결과는 식물체에서 영양약리물질(phytochemical or nutraceuticals)을 생산하는데 있어 SHT 유전자가 중요한 역할을 수행함을 보여 주지만, wild-type 혹은 형질 전환 벼 내에서 세로토닌유도체의 조절기작 및 rate limiting 효소에 대한 더 많은 연구가 수행되어져야 할 것으로 사료된다.

## 2. Rice glutelin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석

SHT 유전자를 rice glutelin promoter 조절하에 두고, binary vector를 구축하여, Agrobacterium 매개 벼 형질전환을 시도하여 independent line 20여종을 육성하였다. 이중 총 12 line의 식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot을 수행한 결과 11개의 식물체에 SHT 유전자가 삽입되었음을 알 수 있었다. Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 미숙배유로부터 total RNA를 추출하여, northern blot 분석을 수행하였다. SHT mRNA의 발현을 배유에서 보고자 수번 northern blot를 수행하였으나, 검출되지 않았다. 따라서 T<sub>2</sub> 성숙배유에서 total RNA를 추출하여, reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다. Wild type에서 추출한 RNA에서는 PCR 생성물이 검출되지 않았으나, 형질전환 line 4 및 line 5에서 추출한 RNA에서는 SHT 유전자의 PCR 산물이 검출됨을 알 수 있었다. 형질전환체에서 SHT 단백질의 발현을 보고자 대조구와 형질전환체로부터 추출하여 배유에서 SHT 단백질이 발현되는지를 Western blot 분석으로 검사하였다. 수번의 반복 실험을 실행하였으나 SHT 단백질은 거의 검출할 수 없었다. 이

러한 결과는 종자배유내의 SHT mRNA 발현량이 매우 적은 것과 상관관계가 있는 것으로 보여진다. 형질전환체의 미숙배유로부터 SHT 효소활성을 검정하였다. 검정 결과 4번 line에서만 Wild type보다 2배 이상의 조금 높은 SHT 효소활성을 보였으나 그 외의 전 lines에서는 Wild type보다 낮거나 비슷한 수준의 활성을 보였다. Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 종자내의 세로토닌유도체 (p-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin) 함량을 정량하였다. SHT gene이 형질전환되어 있는 T<sub>2</sub> transgenic의 종피를 벗기고 HPLC 기기를 이용하여 serotonin유도체의 함량을 측정하였다. 형질전환하지 않은 대조구 wild type에서는 종자 g 당 30 ng의 아주 적은 량의 serotonin유도체가 검출되었다. 반대로 transgenic 종자에서는 wild type보다 10-25% 정도의 더 높은 함량을 보여 주었다. 함량이 낮은 이유를 규명하고자 serotonin 유도체 생합성 관련 효소활성을 부위별로 측정하였다. TDC 효소활성은 벼의 전 부위에서 매우 낮게 검출되며, 특히 잎, 줄기, 종자외피(hull) 및 종자에서는 TDC 효소활성이 아주 미미하였다. 그러나 뿌리 부분에서는 TDC 활성이 기타부위에 비해 18배 이상 높아, TDC 활성은 주로 뿌리에 있는 것으로 나타났다. Serotonin 생합성의 마지막 효소인 tryptamine hydroxylase(TH)의 효소활성을 처음으로 측정하여 본 결과 벼의 전부위에 다량 발현되는 것으로 보이며, TDC 효소활성과 마찬가지로 뿌리에 집중적으로 발현되고 있음을 확인하였다. Serotonin 량이 가장 많이 존재하고 있는 곳이 뿌리로서 g 생체중 당 3.5 µg 정도로 측정되었으며, 그 다음으로는 뿌리와 비슷한 량으로 존재하는 곳이 g 생체중으로 3.0 µg 이 되는 hull 부분이었다. Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환 벼에 기질인 serotonin을 처리하였을 때 세로토닌유도체 함량의 변화가 있는지 조사하였다. 5 mM serotonin을 출수기 후 10일째 되던 날부터 이틀간격으로 3번 종자에 처리하였다. 그 후 종자를 수확하여 종자내의 세로토닌유도체 함량을 측정한 결과 세로토닌 처리에 따른 세로토닌유도체 함량의 증대효과는 관찰되지 않았다. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환 벼에서 세로토닌유도체의 함량을 부위별로 정량하여 보았다. 유묘의 경우, tyramine 혹은 serotonin 기질을 처리하지 않을 경우, 세로토닌유도체 함량이 대조구 및 형질전환 벼 모두 검출되지 않았다. 그러나 대조구와 형질전환 벼를 특별한 기질처리 없이 포장에서 키운 후, 출수 30일 경의 shoot를 채취하여 세로토닌유도체 함량을 조사한 결과 대조구에서 1.2 µg(g 생체중) 정도의 세로토닌유도체가 검출되었고, 형질전환 벼에서는 12 µg (g 생체중) 이 정량되었다.

### 3. Rice prolamine promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석

Glutelin A3 promoter:SHT 발현 형질전환 벼에서 Northern blot 에 검출되지 않은 만큼 transgene SHT가 미약하게 발현되어, 좀 더 강력한 배유 특이 promoter을 사용하였다. SHT 유전자를 rice prolamin promoter 조절하에 둔 binary vector pGA1611을 제작하고 *Agrobacterium* LAA4404에 형질전환하여, 벼의 게놈에 유전자를 형질전환하였다. 총 19개의 independent lines를 육성하였고, T1 종자를 수확하여 종자내 세로토닌유도체 함량을 조사하였다. 유전자 삽입을 확인하기 위해서 Southern blot를 수행하였다. prolamin:SHT 유전자는 총 19 line 중 17 line의 식물체에 삽입되었고 그 중 5 lines 만이 1 copy의 유전자가, 나머지는 2~4 copy의 유전자가 삽입되었음을 확인하였다. 또한 대조구 및 형질전환 동진벼 종자에서 추출해 낸 protein 50 $\mu$ g을 SDS-PAGE에서 분리하여 SHT 항체와 면역반응 시켜 본 결과 Western blot에서와 마찬가지로 SHT 단백질 크기인 28Kda에서는 아무런 밴드도 검출되지 않았다. Prolamin promoter를 이용하여 SHT유전자를 도입한 형질전환 벼 종자에서 SHT유전자의 전사 유무를 확인하기 위하여 Northern blot을 수행하였다. Northern blot 수행 결과 모든 형질전환 lines 에서 mRNA가 감지되었고 반면 형질전환 시키지 않은 동진 벼 종자에서는 SHT mRNA가 감지되지 않았다. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 종자의 serotonin 유도체 함량분석을 하였다. 포장에서 완전히 성숙되어 수확한 후 건조시킨 동진벼 종자와 형질전환 벼 종자의 종피를 제거하고 MeOH를 이용하여 serotonin유도체를 추출한 후 HPLC를 이용하였다. 형질전환 벼의 종자내의 Serotonin유도체의 함량은 wild type과 크게 차이를 보이지 않았다. 1, 2, 8, 10번 line만이 wild type과 비슷하거나 약 1.2~1.5배 정도 높은 수치의 serotonin 함량을 보였다. 또한 출수 후 20일째 되는 날로부터 3일 간격, 두 차례, 5mM의 serotonin을 뿌리에 처리하였던 형질전환 벼 중의 한 line은 불임으로 종자를 얻지 못하였고 나머지 line을 상기 동일한 방법으로 serotonin유도체 함량을 측정하였다. 측정 결과 serotonin을 처리한 wild type의 종자에서는 처리하지 않은 wild type종자보다 약간 높은 serotonin 유도체의 함량을 보였지만 이는 오차 범위 내에 있는 수준이었다. serotonin을 처리해 준 형질전환 벼 중 16번 line은 wild type보다 더 낮은, 18번 line은 wild type보다 약 1.7배정도 높은 함량을 보였지만 이 또한 serotonin을 처리해 준 효과라기보다는 형질전환 벼 자체의 SHT유전자 발현으로 인한 결과라고 생각된다.



#### 4. Maize Ubiquitin promoter 조절에 의한 THT 형질전환 벼의 육성 및 티라민유도체 함량 분석

세로토닌유도체와 유사한 티라민유도체(tyramine derivatives) 역시 영양약리물질로서 세로토닌유도체와 비슷한 약리적 역할을 발휘한다. feruloyltyramine 및 4-coumaroyltyramine 같은 티라민유도체 생합성이 벼에서 어떻게 일어나는지 연구하기 위해 tyramine derivatives 합성이 terminal 효소인 tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase (THT) 유전자를 벼에 형질전환하였다. THT 유전자는 28-kDa의 soluble 단백질로서 다양한 페놀기질과 tyramine 을 기질로 이용하여 다양한 tyramine 유도체를 생합성한다. 고추에서 클로닝한 THT 유전자를 binary vector pGA1611에 클로닝하고, Agrobacterium LBA4404에 형질전환하고, 본 Agrobacterium을 이용하여 벼에 형질전환하였다. 총 8개의 independent transformants을 획득하였고, Southern blot 분석 결과 모든 lines에서 1-2개의 THT 유전자가 삽입되어 있음을 확인 하였다. Northern blot 분석을 수행한 결과 벼의 게놈에 도입된 THT 유전자가 왕성하게 transcription이 일어남을 확인하였다. THT mRNA가 많이 검출되었던 형질전환체에서 높은 THT 효소활성이 있음을 볼 때, 외부에서 도입된 THT 유전자가 functional 하게 작동됨을 볼 수 있었다. 반면 대조구인 형질전환하지 않은 동진 벼에서는 THT mRNA 발현이 거의 검출되지 않았다. T<sub>1</sub> 형질전환체의 유묘에서 feruloyltyramine(FT) 및 4-coumaroyltyramine(CT) 함량은 매우 낮게 검출되었으나 대조구와는 현격한 차이를 보여 주었다. 그러나 성숙된 노화된 잎에서 FT+CT 함량은 어린잎에서 보다 상대적으로 모두 높아진 경향을 보여 주었고, 대조구에 비해 많게는 32배 높은 FT+CT 함량을 보여 주었다. 유묘를 이용하여 tyramine이 첨가된 배지에서 자란 형질전환 유묘에서는 tyramine 의 처리 농도와 비례하여 많은 FT+CT 함량이 합성되었으며, 대조구에서는 tyramine를 처리하여도 FT+CT 함량이 거의 검출되지 않았다. 본 연구로 통해 FT+CT 함량은 성숙기 혹은 노화된 잎에서 생합성되는 전형적인 2차대사산물의 생합성 특성을 지니고 있으며, 유묘에서 생성되지 않는 주요 이유는 합성 기질 중 아민 기질인 tyramine의 절대량과 직접적인 관련이 있는 현상을 발견하였으며, 이는 serotonin 유도체 생합성에 serotonin 이 bottleneck 기질로 작용하는 것과 동일한 현상을 발견하였다. 추후 티라민유도체의 대량생합성은 serotonin 유도체의 생합성 기술을 그대로 적용하면 될 것으로 사료되는 결과를 얻을 수 있었다.

## 5. Serotonin 생합성의 rate limiting 효소인 tryptophan decarboxylase(TDC) 유전자 도입 형질전환 벼의 육성 및 serotonin 고함량 벼 육성

세로토닌유도체 합성의 rate limiting 기질로 작용하는 serotonin 생합성의 key 효소인 tryptophan decarboxylase(TDC) 유전자를 벼에 형질전환하여 이들 형질전환 벼의 분자적 발현 및 serotonin 생합성 특성을 비교하였다. TDC를 발현하는 형질전환체 19종을 hygromycin 항생제하에서 기내 선발하고, 그 중 9종을 포장으로 옮겨 T<sub>0</sub> 개체를 유지하고 T<sub>1</sub> seeds를 수확하였다. Northern blot 분석을 TDC mRNA 가 형질전환 벼에서 과다발현됨을 확인하였다. TDC 의 과다발현에 의한 형질전환 벼에서 효소산물인 tryptamine 의 함량이 증대되는지 알고자 T<sub>1</sub> 종자에서 발아시킨 2주된 유묘의 잎에서 tryptamine 의 함량을 측정하였다. Tryptamine의 함량은 대조구인 형질전환하지 않은 벼에서 0.3 ug g<sup>-1</sup> fresh weight 정도 검출되었으며, 형질전환 벼에서는 4-5 ug g<sup>-1</sup> fresh weight 가 검출되어 형질전환 벼내에서 tryptamine 함량이 대조군에 비해 10배 이상 축적됨을 알 수 있었다. 축적된 tryptamine 이 벼 내에서 항상 발현되는 것으로 알려진 tryptamine 5-hydroxylase 작용에 의해 serotonin 으로 전환되는지 알고자 2주된 유묘로부터 serotonin 함량을 측정하였다. 대조군의 경우 세로토닌의 함량은 0.2 ug g<sup>-1</sup> fresh weight 정도였으나, 형질전환체는 모두 5 ug g<sup>-1</sup> fresh weight 정도의 세로토닌이 축적됨을 알 수 있었고, 이는 대조군의 serotonin 함량보다 무려 25배 높은 수치를 보여 주고 있다. 이렇게 형질전환 앞에 축적되는 serotonin 이 T<sub>1</sub> 종자에서도 함량이 높은지 알고자 종자의 현미 및 백미에서도 serotonin 함량이 높은지 분석하였다. 대조군에서는 현미 및 백미에 0.2 및 0.1 ug g<sup>-1</sup> dry weight 정도 각각 검출되었으나, 형질전환 벼의 현미에서는 1.2 에서 1.8 ug dry weight 정도로 검출되어 대조구 현미보다 6 - 9배 높은 함량을 보여 주었다. 형질전환 벼의 백미에서는 0.5 - 0.8 ug dry weight 로서 대조군보다 5 - 8배 정도 높은 세로토닌이 축적됨을 알 수 있었다.

## 6. SHT 발현 형질전환 벼의 생산성 및 미질특성 연구

Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 작물학적 특성 조사한 결과 출수가 낙형질전환 낙동벼에서 3일 정도 늦었다. 간장은 낙동벼가 75cm인 반면 낙동벼 SHT 413은 70cm 이었고, 낙동벼 SHT 414는 55cm 이었다. 수장은 낙동벼가 20cm이었고, 낙동벼

SHT 413은 낙동벼와 비슷한 19cm인 반면 낙동벼 SHT 414는 15cm로 낙동벼와는 완전히 다른 초형을 나타내었다. 수수는 대조구와 형질전환체간에 비슷한 경향을 보였다. 수당입수는 형질전환 벼가 떨어지고 등숙률도 낮아 비교적 모든 면에서 생육이 불량한 특성을 보였다. 동진벼의 출수기는 대조구와 형질전환 벼가 비슷하였고, 간장은 동진벼가 82cm인 반면 동진벼 SHT 41은 63cm로 동진벼에 비하여 19cm가 짧았고, 동진벼 SHT 42는 60cm로 동진벼에 비하여 22cm가 짧았다. 이삭의 길이는 동진벼, 동진벼 SHT 41, 동진벼 SHT 42가 각각 21, 19, 14cm로 동진벼 SHT 41은 동진벼에 비하여 2cm가 짧은 반면 동진벼 SHT42는 무려 7cm가 짧았다. 수수는 동진벼와 동진벼 SHT 41은 9개인 반면 동진벼 SHT 42는 10개 이었다. 수당입수는 동진벼가 107립 이었으나 동진벼 SHT 41은 79립인 반면 동진벼 SHT 42는 94립이었다. 등숙율은 동진벼가 98.0%인 반면 동진벼 SHT 41은 82.9% 이었고 동진벼 SHT 42는 78.7%로 동진벼에 비하여 19.3%가 낮았다. 낙동벼의 생산성은 정현비율로 측정한 결과 낙동벼의 경우 81.2%로 왕겨가 18.8% 이었으나 낙동벼 SHT 413은 79.2% 이었고, 낙동벼 SHT 414는 79.8%로 두 계통 모두 낙동벼의 정현비율보다 1.4~2.0%정도가 낮았는데, 낙동벼 SHT 413과 낙동벼 SHT 414의 정현비율은 우리나라에서 재배되는 일반계통중의 정현비율보다 약 2% 정도가 낮은 경향을 보였다. 현미의 외관특성중 정립율은 낙동벼가 17.6%이었고 낙동벼 SHT 413이 49.6% 이었으며 낙동벼 SHT 414가 27.3%로 낙동벼에 비하여 모두 높은 정립율을 나타내었다. 그러나 동진벼의 경우 정립율이 51.8%로 낙동벼에 비하여 높은 정립율을 나타내었으나 동진벼 SHT 41은 17.2%로 가장 낮았으나 동진벼 SHT42는 60.9%로 가장 높았다. 백미의 외관품위 중 정상립은 동진벼 SHT 41이 77.4% 로 가장높았고, 동진벼가 69.5% 로 그다음으로 높았으며 동진벼 SHT 42는 56.2%로 높았던 반면 낙동벼는 61.3% 이었고, 낙동벼 THT 413은 가장 낮은 13.0% 이었으며 낙동벼 THT 414는 28.1% 이었다. 분상질립은 동진벼 THT 41이 가장낮은 3.0% 이었던 반면 동진벼는 14.1% 이었고, 동진벼 THT 42는 30.1% 이었으며 낙동벼는 28.9%이었고 낙동벼 THT 413은 74.3% 로 가장 높았고, 낙동벼 THT 414는 61.5%이었다. 찌라기 비율은 낙동벼 THT 414가 가장낮은 7.6% 이었으며 동진벼 THT 41이 가장 많은 14.2% 이었다. 윤기치를 측정을 한 결과 동진벼 및 동진벼 형질전환체 중에서는 동진벼 SHT 41이 가장높은 66.4 이었고 동진 SHT 42가 64.6 이었으며 동진벼는 58.7 이었고, 낙동벼 및 낙동벼 형질 전환체 에서는 낙동 SHT 414가 가장높은 70.2 이었고, 낙동벼가 그다음으로 높은 60.4 이었으며 낙동벼 SHT 413이 가장 낮은 54.7 이었다. 밥의 경도와 관련이 높은 것으로 보고되고 있는 단백질 함량은 동진벼가 가장 낮은 5.9%

이었고, 낙동벼가 그다음으로 낮은 6.3% 이었으며 동진벼 SHT 41, 동진벼 SHT 42와 낙동벼 SHT 413이 6.3% 이었다.

## 7. Serotonin 고 함류 형질전환 벼의 생산성 및 미질특성 연구

동진벼와 동진벼 TDC 형질전환체의 작물학적 특성 중 출수기는 동진벼는 2월 20일이었고 동진벼 형질전환체 모두 2월 24일 이었으며, 간장은 동진벼가 60cm인 반면 동진벼 T2-9는 55cm, T2-10은 56, T2-14는 60, T2-18은 50cm로 동진벼에 비하여 1~5cm가 짧았다. 수장(이삭 길이)은 동진벼가 12.9cm 이었으나 동진벼 형질전환체인 T2-9는 12.4, T2-10은 12.7, T2-18은 11.2cm로 동진벼에 비하여 0.2~1.7cm가 짧았으나 T2-14는 15.2cm로 동진벼보다 2.3cm길었다. 이삭수는 동진벼가 포기당 3.6개였고 T2-9는 4.1개, T2-14는 3.7개로 동진벼보다 많았으나 T2-10, T2-18은 동진벼보다 적었다. 수당입수는 동진벼가 35립, 형질전환체는 28~33개로 동진벼보다 적었고 등숙율도 현저히 낮았다. 그 외 미질 및 외관 식미특성은 SHT 형질전환 벼와 유사한 경향을 보였다.

# SUMMARY

## I. Title

Enriched production of antioxidant serotonin derivatives in transgenic rice seed

## II. Objects and Significance

Serotonin derivatives are polyphenol compounds and include *p*-coumaroylserotonin (CS) and feruloylserotonin (FS) that have often been isolated from the seeds of *Carthamus tinctorius*, *Echinochloa utilis*, *Amorphophallus konjac*, *Leuzea carthamoides*, and *Centaurea nigra*. Recently, serotonin derivatives have also been found in the twigs of the diseased bamboo as antifungal compounds as well as in the roots of rice. CS and FS have first identified as antioxidant compounds from safflower (*Carthamus tinctorius*) oil cake, and also exhibit various activities, e.g., cathartic effect, inhibitory activity on proinflammatory cytokine production, anti-tumor promoting activity and the effect of lowering the plasma cholesterol. Particularly, it was reported that both CS and FS exhibit stronger antioxidant activities than butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). Serotonin derivatives are synthesized from two substrates: hydroxycinnamoyl-CoA thioesters and serotonin, which is in turn synthesized by the transfer of hydroxycinnamic acids from hydroxycinnamoyl-CoA esters to serotonin. This reaction is catalyzed by hydroxycinnamoyl-CoA:serotonin *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase (SHT). SHT was first cloned from pepper (*Capsicum annuum*) as a tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase (THT), and further rediscovered to be SHT activity through the study of transgenic rice plants and kinetic analysis of recombinant pepper SHT. In our prior data, the transgenic rice plants harboring the pepper SHT produced serotonin derivatives in leaves only upon

treatments of several substrates into the roots, suggesting that serotonin derivatives biosynthesized in the roots are transported to the shoot tissues by the treatment of several chemical compounds such as tyramine and trans-cinnamic acid. In this study, we investigate whether the ectopic expression of SHT under the control of endosperm specific promoter can enhance the level of serotonin derivatives in rice roots compared to that of the constitutive maize ubiquitin promoter. Therefore, we developed several lines of transgenic rice cultivars expressing the glutelin A3 promoter:SHT, Prolamin promoter:SHT, Ubiquitin promoter:TDC, and Ubiquitin promoter:THT. From the data examined, we may get valuable information to do enhance the level of serotonin derivatives in plants via metabolic engineering that the transport of serotonin derivatives from the roots to the shoots would be knit to the transport of serotonin derivatives into seeds.

### III. Research Contents and Scopes

In our previous study, we had generated transgenic rice plants expressing SHT under the control of constitutive maize ubiquitin promoter which produced a relatively high level of serotonin derivatives in rice leaves, but this requires an addition of substrate chemicals such as cinnamic acid, and serotonin. In our continuation of this study, we firstly want to examine seed contents of serotonin derivatives in wild-type and transgenic rice plants overexpressing the SHT, the optimum concentration of chemical treatments for enhancing serotonin derivatives, and the antioxidant activity of transgenic rice plants. Secondly, the goal of this research is to express SHT under the control of endosperm specific promoter to see whether this transgenic rice can produce more serotonin derivatives than that of the ubiquitin promoter. To do this goal, we will employ two rice endosperm specific promoters such as glutelin A3 and prolamin. Thirdly, in order to know the mechanism by which serotonin derivatives are synthesized during the developmental stage, we will develop THT overexpressing transgenic lines. From the THT transgenic rice, we may have some information on

which what are limiting factors to produce tyramine- or serotonin- derivatives in rice plants. Finally, we want to observe agronomic traits of field-grown transgenic relative to wild-type rice plants and quality of transgenic rice seeds in view of whiteness, brightness, content of proteins. Followings are experimental scopes in details.

- Seed contents of transgenic rice expressing SHT under the control of constitutive maize ubiquitin promoter
- Construction of SHT and THT gene cassettes using various rice endosperm specific promoter such as glutelin and prolamin.
- Development of transgenic rice plants expressing SHT under the control of glutelin promoter.
- Development of transgenic rice plants expressing SHT under the control of prolamin promoter.
- Development of transgenic rice plants expressing THT under the control of ubiquitin promoter.
- Development of transgenic rice plants expressing TDC under the control of ubiquitin promoter.
- Molecular analysis of transgene integration and expression
- Analysis of tyramine derivatives and serotonin derivatives in transgenic rice plants
- Tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase enzyme activity measurement
- Serotonin *N*-hydroxycinnamoyl transferase enzyme activity measurement
- Agronomic traits on transgenic rice plants
- Seed contents of serotonin derivatives, tyramine derivatives, serotonin in various transgenic rice
- Analysis of expression level of transgene by RT-PCR, Northern blot, and Western blot
- Quality measurement of transgenic rice seed

## IV. Results and Suggestion on Utilization of Results

Serotonin derivatives such as 4-coumaroylserotonin and feruloylserotonin, a family of plant polyphenol compounds, have been implicated in an array of biological activities including antioxidative activity, but neither their production nor identification has been reported in crop plants. Here, we report the detection and enhanced synthesis of serotonin derivatives in rice seeds. We identified that wild-type rice seeds synthesized a basal levels of serotonin derivatives with around 30 ng g<sup>-1</sup>seed weight. However, transgenic rice expressing the pepper hydroxycinnamoyl-CoA:serotonin *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase (SHT) produced on average 274 ng g<sup>-1</sup> seed weight which was 9 fold higher than wild-type. In addition, production of serotonin derivatives increased upon chemical treatments such as trans-cinnamic acid and tyramine in both wild-type and transgenic rice by two to three fold. The DPPH radical scavenging activities of transgenic rice were higher than that of wild-type and showed concentration dependent of serotonin derivatives. These results demonstrate that overexpression of SHT provides the feasibility of engineering increased nutraceutical serotonin derivative levels in plants using this gene. The second goal of this research is to express SHT in rice under the control of endosperm specific promoter. This is to accumulate much more amount of serotonin derivatives in rice seed than transgenic rice using an ubiquitin promoter. We produced transgenic rice using endosperm specific promoters, glutelin A<sub>3</sub> and prolamin promoters. We investigated the transgene expression using a series of molecular tools including Southern, Northern, Western blot, etc. All transgenic rice plants under the control of glutelin or prolamin showed their stable insertion on rice genome through Southern blot analysis. However, their expression levels vary among transgenic cultivars. The glutelin A<sub>3</sub> promoter showed a very weak expressing of SHT: SHT mRNA expression was not observed in both transgenic and wild; a faint band of RT-PCR products were just detected in transgenic rice using total RNA isolated from seeds. The control rice seed did not show any detectable level of SHT RT-PCR products. This indicated that transgene SHT under the control of glutelin



promoter was expressed fairly low level. To overcome the low level of SHT expression, we again employed the rice prolamin promoter. Transgenic rice plants expressing SHT under the control of rice prolamin promoter showed much more mRNA expression compared with the glutelin promoter lines. The prolamin lines expressed SHT transgene abundantly in rice seeds which were shown in Northern blot analysis. Western blot failed to detect SHT protein in seeds. The accumulation of serotonin derivatives in rice seeds in these prolamin transgenic lines was not greatly enhanced relative to the wild type. This may be ascribed to the limitation of amine substrate such as serotonin especially. The third goal is to express THT in rice to engineer tyramine derivatives. Tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase (THT) is a 28-kDa soluble protein that catalyzes the condensation of hydroxycinnamates and tyramine via the thioesters. The representative products synthesized by THT include feruloyltyramine (FT) and 4-coumaroyltyramine (CT). The THT gene of *Capsicum annum* was introduced into the rice genome using *Agrobacterium*-mediated transformation. Eight independent transgenic rice plants were selected and characterized. The transgenic lines had a single- or two-copy insertion of the THT transgene. Abundant THT mRNA with high THT enzyme activity was detected in transgenic leaves, but not in wild-type leaves. In young leaves, the level of CT+FT was very low, but differed significantly between transgenics and the wild type. However, in old and senesced leaves, a high level of CT+FT was detected in both transgenics and the wild type, at 32 times higher in the best transgenic line than in the wild type. Tyramine applied exogenously to roots was directly coupled with the increased synthesis of CT+FT in young leaves in a dose-dependent manner. Our data suggest that CT and FT synthesis is developmentally regulated and closely associated with the presence of tyramine substrate in rice plants. The transgenic line showed no significant variation in days to heading, panicle length, or panicle number, but the transgenic plants were slightly shorter than the untransformed wild-type controls, and both the number of spikelets per panicle and the 1,000-grain weight of the brown rice were slightly higher in the transgenic line than in the untransformed control. Interestingly, the spikelet fertility was 12% lower in the transgenic line than in the

wild-type control, and this difference resulted in a 20% lower yield in the transgenic line than in the control. In addition to the agronomic traits, the quality of the brown rice of the two groups was measured. The transgenic line produced 95% head rice, and the control produced 92%. The lower percentage of head rice in the untransformed control was ascribed to the higher percentage of immature rice relative to that in the transgenic line. The other values measured, such as number of damaged kernels, cracked rice, and dead rice, were not significantly different between the two groups.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Overview of project</b> .....	25
Section 1. Aim and necessity of study .....	25
Section 2. Contents of study .....	33
<b>Chapter 2. Status of study in korea and other countries</b> .....	37
Section 1. Our previous results .....	37
Section 2. Progresses in korea and other countries .....	38
<b>Chapter 3. Research contents and Results</b> .....	41
Section 1. Enhanced neutraceutical serotonin derivatives of rice seed by hydroxycinnamoyl-CoA:serotonin <i>N</i> -(hydroxycinnamoyl)transferase .....	41
1. Preface .....	41
2. Materials and methods .....	42
3. Results and discussion .....	43
Section 2. Development of transgenic rice expressing SHT under the control of rice glutelin promoter and their analysis of serotonin derivatives .....	52
1. Preface .....	52
2. Materials and methods .....	53
3. Results and discussion .....	60
Section 3. Development of transgenic rice expressing SHT under the control of rice prolamine promoter and their analysis of serotonin derivatives .....	81
1. Preface .....	81
2. Materials and methods .....	81
3. Results and discussion .....	83
Section 4. Generation of transgenic rice plants expressing THT and their analysis of tyramine derivatives .....	91

1. Preface .....	91
2. Materials and methods .....	92
3. Results and discussion .....	94
Section 5. Generation of transgenic rice plants expressing TDC, a rate limiting step enzyme for serotonin synthesis for higher level of serotonin .....	104
1. Preface .....	104
2. Materials and methods .....	104
3. Results and discussion .....	107
Section 6. Characteristic study of transgenic rice on their quality and productivity .....	115
1. Preface .....	115
2. Materials and methods .....	115
3. Results and discussion .....	116
Section 7. Characteristic study of transgenic rice with a high level of serotonin on their quality and productivity .....	149
1. Preface .....	149
2. Materials and methods .....	149
3. Results and discussion .....	150
<b>Chapter 4. Implementation and contribution to its related field .....</b>	<b>161</b>
<b>Chapter 5. Application of results .....</b>	<b>164</b>
<b>Chapter 6. Recent progresses on related field .....</b>	<b>167</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>169</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	25
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	25
제 2 절 연구개발 범위 .....	33
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	37
제 1 절 본 연구진의 선행연구결과 .....	37
제 2 절 국내·외 타 연구기관의 연구내용 및 결과 .....	38
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	41
제 1 절 Maize ubiquitin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 특성 및 세로토닌유도체 함량 분석 .....	41
1. 서 설 .....	41
2. 연구 수행 방법 .....	42
가. Ubiquitin:SHT 형질전환 벼의 배양, 기질처리, 생산물 분석 .....	42
나. SHT activity 측량 .....	42
다. DPPH 방법을 이용한 Radical scavenging activity .....	43
3. 연구 수행 결과 .....	43
가. T <sub>4</sub> 형질전환 벼에서의 SHT enzyme activity .....	43
나. 껍질 벗긴 벼 종자에서 p-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin의 정량 .....	45
다. 종자에 serotonin유도체의 축적에 있어서 기질 처리의 효과 .....	45
라. Trans-cinnamic acid의 처리에 의한 잎 serotonin 유도체 함량의 time course .....	47
마. DPPH 방법을 통한 transgenic 벼의 antioxidant activity 측정 .....	50
제 2 절 Rice glutelin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석 .....	52
1. 서 설 .....	52
2. 연구 수행 방법 .....	53

가. Rice glutelin promoter을 이용한 SHT 유전자 발현 벡터 construction	53
나. Rice Glutelin:SHT 발현 형질전환 벼 육성을 위한 Callus 유도	53
다. 벼 형질전환 및 재 분화	55
라. Genomic DNA 분리 및 Southern 분석	56
마. Total RNA 분리 및 reverse transcriptase PCR, Northern blot 분석	56
바. Western blot 분석	57
사. SHT 효소 활성 측정	57
아. 종자 내 serotonin 유도체 함량 분석	58
자. T <sub>1</sub> 형질전환체 종자의 유전력 검증	59
3. 연구 수행 결과	60
가. Glutelin 프로모터를 이용한 SHT 유전자 발현 벼의 형질전환	60
나. Glutelin:SHT T <sub>1</sub> 형질전환벼체의 분자적 검증 :	
형질전환체로부터 genomic Southern blot 분석	61
다. Glutelin:SHT T <sub>1</sub> 형질전환벼체의 분자적 검증	65
라. Glutelin:SHT T <sub>1</sub> 형질전환벼체의 Western blot 분석	65
마. Glutelin:SHT T <sub>1</sub> 형질전환벼체의 SHT 효소활성 검증	68
바. Glutelin:SHT T <sub>1</sub> 형질전환종자의 functional loci 검증	68
사. Glutelin:SHT 발현 T <sub>2</sub> 종자내의 세로토닌유도체 (p-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin) 함량의 정량	68
아. 세로토닌유도체 합성의 rate limiting 효소 규명 및 serotonin 함량측정	71
자. Glutelin:SHT 발현 T <sub>2</sub> 형질전환종자의 기질처리에 따른 세로토닌유도체 함량측정	73
차. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환체의 배유 및 쌀겨(bran) 포함 부위별 세로토닌유도체 함량분석	75
카. Ubiquitin:SHT T <sub>3</sub> 형질전환벼의 기질처리시기별 종자내 세로토닌유도체 함량	75
타. Ubiquitin:SHT T <sub>4</sub> 형질전환종자의 저장기간별 종자내 세로토닌유도체 함량	78
파. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환낙동 및 동진 계통들의 southern 분석	78
제 3 절 Rice prolamine promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석	81
1. 서 설	81

2. 연구 수행 방법 .....	81
가. Rice prolamin promoter:SHT 발현 형질전환 벼 육성 .....	81
나. Total RNA 분리 및 reverse transcriptase PCR, Northern 분석 .....	82
다. Southern blot 및 Northern blot 발현 분석 .....	82
라. Western blot 분석 .....	83
3. 연구 수행 결과 .....	83
가. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 육성 .....	83
나. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼의 Southern blot 분석 .....	84
다. Prolamin:SHT 발현 형질전환종자의 Western blot 분석 및 SHT 효소활성 측정 .....	84
라. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 종자의 Northern blot 분석 .....	86
마. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 종자의 serotonin 유도체 함량분석 .....	89
제 4 절 Maize Ubiquitin promoter 조절에 의한 THT 형질전환 벼의 육성 및 티라민유도체 함량 분석 .....	91
1. 서 설 .....	91
2. 연구 수행 방법 .....	92
가. Binary vector 제작 및 벼 형질전환 .....	92
나. Total RNA 추출, genomic DNA 추출 및 분석 .....	93
다. 벼 조직에서 feruloyltyramine 및 4-coumaroyltyramine 함량 측정 .....	93
라. THT 효소활성 측정 .....	93
마. 벼에서 Tyramine 함량 분석 .....	94
3. 연구 수행 결과 .....	94
가. 형질전환 벼 육성 및 Southern blot 분석 .....	94
나. 형질전환 벼에서 THT 유전자의 발현 정도: Northern blot 및 효소활성 측정 .....	97
다. T <sub>0</sub> 형질전환 벼의 잎 및 T <sub>1</sub> 종자에서 tyramine 유도체 함량측정 .....	97
라. T <sub>1</sub> 형질전환 벼의 유묘에서 뿌리와 잎에서 THT 효소활성 .....	98
마. Tyramine 첨가 배지에서 유묘의 CT+FT 합성 능력 검정 .....	98
바. 형질전환 벼에서 tyramine 공급에 따른 tyramine 함량과 CT+FT함량 변화 측정 .....	102

제 5 절 Serotonin 생합성의 rate limiting 효소인 tryptophan decarboxylase(TDC)	
유전자 도입 형질전환 벼의 육성 및 serotonin 고함량 벼 육성 .....	104
1. 서 설 .....	104
2. 연구 수행 방법 .....	104
가. Ubiquitin promoter:TDC binary vector 제작 및 벼 형질전환 .....	104
나. Total RNA 추출 및 Northern blot 분석 .....	105
다. AK31 유전자의 대장균 이종발현 및 정제 .....	105
라. TDC 효소활성 측정 .....	106
마. 벼에서 serotonin 및 tyramine 함량 분석 .....	106
3. 연구 수행 결과 .....	107
가. 대장균 발현, affinity 정제 및 효소활성 검정 .....	107
나. 형질전환 벼 육성 및 Southern blot 분석 .....	109
다. 형질전환 벼에서 tyramine 및 tryptamine 함량 측정 .....	109
라. 종자 및 잎에서 세로토닌 함량 분석 .....	110
마. 형질전환 벼에서 세로토닌유도체 함량 측정 .....	110
제 6 절 형질전환 벼의 생산성 및 미질특성 연구 .....	115
1. 서 설 .....	115
2. 연구 수행 방법 .....	115
가. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>3</sub> 형질전환체의 생산성 측정 .....	115
나. 낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 미질 분석 .....	115
다. 낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석 .....	115
3. 연구 수행 결과 .....	116
가. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 작물학적 특성 조사 .....	116
나. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 생산성 .....	117
다. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 현미의 외관특성 .....	117
라. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 백미의 외관특성 .....	125
마. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 윤기치 및 식미관련 특성 .....	125
바. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 작물학적 특성 조사 .....	130
사. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 생산성 .....	131



아. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 현미의 외관특성 .....	131
자. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 백미의 외관품위 .....	135
차. Ubiquitin:SHT 발현 T <sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 윤기치 및 식미관련 특성 .....	135
카. 낙동벼, 동진벼 및 형질전환체의 저장기간과 저장온도별 이화학특성 .....	143
타. 낙동벼, 동진벼 및 형질전환체의 저장기간과 저장온도별 알칼리 붕괴도 .....	143
제 7 절 Serotonin 고 함류 형질전환 벼의 생산성 및 미질특성 연구 .....	149
1. 서 설 .....	149
2. 연구 수행 방법 .....	149
가. Ubiquitin:TDC 발현 T <sub>2</sub> 형질전환체의 생산성 측정 .....	149
나. 형질전환체의 미질 분석 .....	149
다. 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석 .....	150
3. 연구 수행 결과 .....	150
가. Ubiquitin:TDC 발현 T <sub>2</sub> 형질전환 벼의 작물학적 특성 조사 .....	150
나. Ubiquitin:TDC 발현 T <sub>2</sub> 형질전환 동진벼의 생산성 .....	151
다. 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석 .....	151
라. Ubiquitin:TDC 발현 T <sub>2</sub> 형질전환체와 동진벼 백미의 외관품위 .....	151
마. Ubiquitin:TDC 발현 T <sub>2</sub> 형질전환체의 윤기치 및 식미관련 특성 .....	157
제 4 장 <b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	161
제 5 장 <b>연구개발결과의 활용계획</b> .....	164
제 1 절 연구 성과 .....	164
제 2 절 타 연구에의 응용 .....	165
제 6 장 <b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	167
제 7 장 <b>참고문헌</b> .....	169

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

**세로토닌유도체(serotonin derivatives)란 ?** 세로토닌유도체(serotonin derivatives)는 식물이 생합성하는 2차대사산물로서, 페놀화합물과 아민화합물의 중합체이다. 초코렛, 녹차, 올리브기름, 적포도주에서 많이 발견 되는 polyphenol의 일종으로서, 대표적인 세로토닌유도체 화합물로서는 쿠마로일세로토닌(coumaroylserotonin), 페루로일세로토닌(feruloylserotonin), 카페오일세로토닌(caffeoylserotonin), 및 시나포일세로토닌(sinapoylserotonin) 등이 있다 (그림 1-1).

**세로토닌유도체의 약리적 효능 ?** 지금까지 식물체에서 추출, 동정된 세로토닌유도체는 coumaroylserotonin(CS)과 feruloylserotonin(FS)이며, 이들 CS 및 FS는 대표적으로 홍화씨(*Carthamus tinctorius* L.)에서 황산화활성 물질로서 최초 분리되었으며(Zhang et al., 1996), 천연항산화제인 tocopherol과 합성항산화제인 BHT보다 높은 항산화활성을 발휘하는 것으로 보고 되어있다(백남인 외 1999). 또한 상기 세로토닌유도체가 항산화활성 외에 항염증 억제활성도 갖는 것으로 보고되었으며(Kawashima et al., 1998), 대한민국 특허등록번호 제10-0354791호에는 상기 페루로일세로토닌 및 쿠마로일세로토닌의 신규한 용도인 뼈 형성 촉진 활성이 보고되어있다.

**식물체내에서 세로토닌유도체 및 티라민유도체의 기능 ?** 식물체에서 세로토닌유도체의 기능은 현재까지 알려진바 없다. 그러나 세로토닌유도체와 비슷한 화합물인 티라민유도체(예; feruloyltyramine, coumaroyltyramine)의 경우, 상기 티라민유도체 화합물은 주로 식물 세포벽으로 도입되어 세포벽의 구성성분인 리그닌 및 세포막 단백질과의 과산화중합반응(oxidative polymerization)을 통해 식물의 세포벽 강화에 관여하고(Schmidt et al., 1998), 식물에 병원균의 균사생장을 억제하는 항균물질로서의 기능이 보고되어 있다(Grandmaison et al., 1993). 따라서 이들 세로토닌유도체 화합물은 식물에서 생합성 되는 항균물질(phytoalexin)로서 역할을 할 것으로 추정된다(그림 1-2).

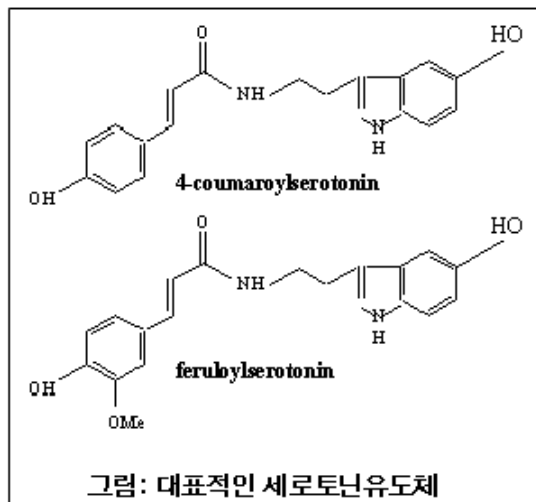


Fig. 1. Representatives of serotonin derivatives

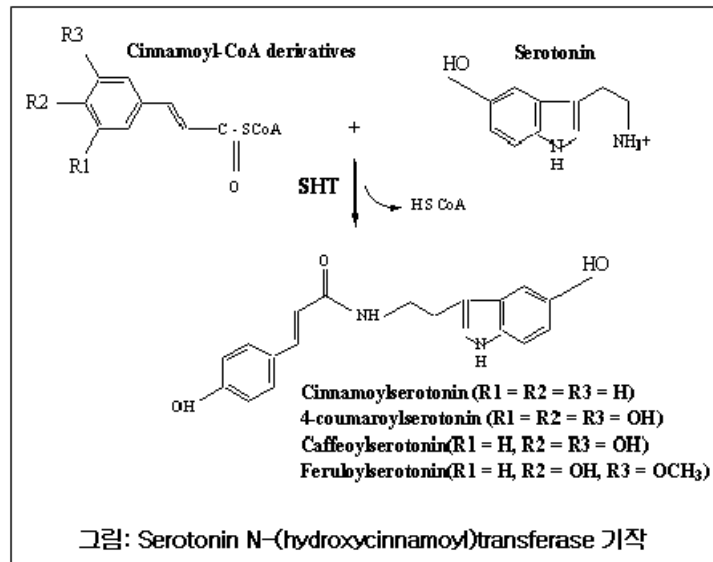


Fig. 2. Enzymatic synthesis of serotonin derivatives by the action of SHT

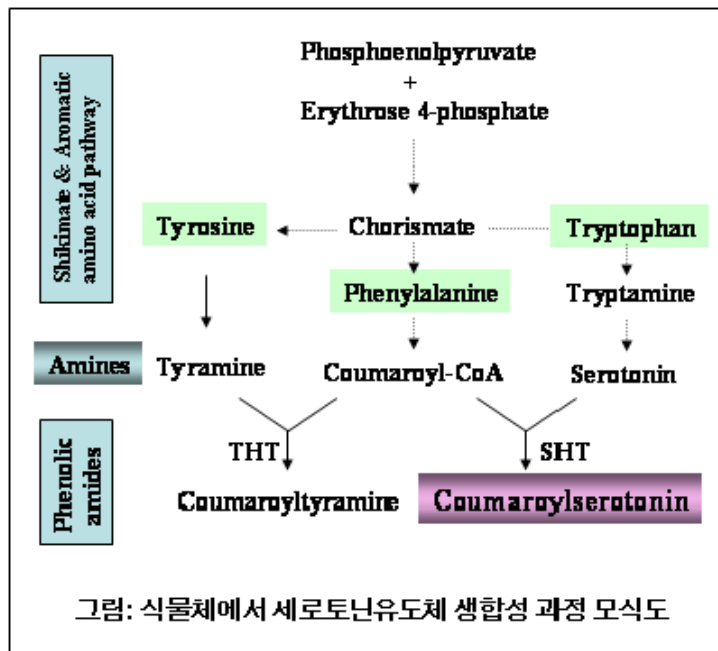
**세로토닌유도체의 생합성 기작 ?** 상기와 같은 세로토닌유도체의 약리적 유용성 및 생리적 기능에도 불구하고 현재까지 세로토닌유도체를 생합성하는 기작연구 및 세로토닌유도체가 생합성된 기능성 식물에 대해서 보고 된 바가 전혀 없을 뿐만 아니라, 세로토닌유도체의 합성을 촉매하는 효소에 대한 연구조차도 전혀 없는 실정이다. 본 연구진은 고추에서 feruloyltyramine의 합성을 촉매하는 tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase (THT) 유전자를 클로닝한 후(Back et al., 2001), 이들 유전자를 벼에 형질전환하여 본 결과, 형질전환 벼의 잎에서 feruloylserotonin의 생합성이 이루어짐을 관찰하였다. 또한 이 feruloylserotonin의 합성이 고추 THT 유전자에 의해 매개됨을 *in vivo* 및 *in vitro* 연구(효소 kinetics 연구)로 통해 처음으로 확인하였다. 고추에서 클로닝한 유전자가 feruloylserotonin의 합성을 촉매하는 serotonin *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase (SHT) 유전자임을 증명하였다.

**연구개발의 목표 및 필요성 ?** 본 연구는 항산화활성 및 뼈형성촉진 기능을 가진 세로토닌유도체 화합물이 종자에 다량 축적된 종자를 개발함이 연구의 최종 목표입니다. 본 연구 목표를 위하여, 세로토닌유도체 화합물의 생합성을 촉매하는 SHT 유전자를 종자특이 promoter(Glutelin or prolamin)에 부착하여 벼 종자에 세로토닌유도체를 다량 생성할 수 있는지 조사하고자 합니다. 이들 종자 특이 promoter:SHT 형질전환체와 Ubiquitin:SHT 발현 형질전환체의 종자에서의 세로토닌유도체의 함량을 비교 분석하여 세로토닌유도체의 종자축적을 위한 과학적인 지식을 습득하고자 한다. Ubiquitin:SHT 형질전환체의 경엽에서 무처리 시 세로토닌유도체를 전혀 발견하지 못 하였으나, 형질전환체를 아민 및 시나믹산 유도체가 있는 배지에서 자란 벼의 경엽에서는 다량의 세로토닌유도체가 합성됨을 관찰하였다. 이는 세로토닌유도체의 합성 기질로 사용되는 이들 물질이 세로토닌유도체의 합성에 elicitor 역할을 하는 것으로 추정되며, 이들 처리에 의한 종자내의 세로토닌유도체의 함량을 더욱 증대될 수 있음을 시사한다. 따라서 기 확보된 형질전환체를 이용하여, 재배중 이들 물질을 처리함으로써 종자내의 세로토닌유도체 함량이 얼마나 유도 증대되는지 연구를 수행하고자 한다(제1세부과제). 또한 세로토닌유도체가 함유된 형질전환종자의 미질특이성 및 생육특성 등을 동시에 조사함으로써 신기능성종자의 상업적 응용성을 규명하고자 한다(제1협동과제). 현재까지 항산화활성을 가진 화합물을 함유하는 기능성종자로서는 tocopherol 함량이 증대된 옥수수종자 및 vitamin C 함량이 증대된 *Arabidopsis*가 보고되었으나(Cahoon et al., 2003; Aglius et al., 2002), 이들의 원천기술은 국외연구자에 귀속된 상태이다. 본 연구의 SHT 유전자의 기능 및 응용에 대한 연구로 통한 특허는 국내 기술로 귀속 될 것이다.

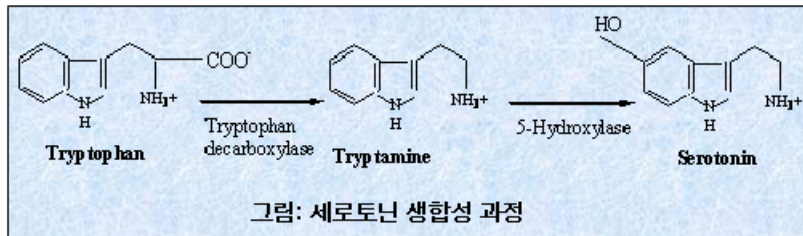
## 1. 기술적 측면

Feruloylserotonin 및 coumaroylserotonin 같은 세로토닌유도체 화합물은 페놀화합물과 방향족 아민화합물(aromatic amines)의 중합체로서, 식물체에서 phenylpropanoid pathway 와 aromatic amines 생합성 경로로 통해 생합성 된다. 세로토닌유도체를 합성하는 SHT 효소는(seotonin *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase) 세로토닌유도체 합성의 최종단계 효소로서 유전자의 도입에 의한 생성물의 rate-limiting 단계를 조절하는 효소로 인정된다. 지금까지의 Vitamin C 및 E 의 합성이 증대된 형질전환 작물 육성에 사용된 유전자의 경우, 이들 합성의 초기 및 중간 단계에 관련된 유전자를 사용함으로써, 유전자가 도입된 후, 최종산물이 생성되기 위해서는 host 세포의 다양한 효소기능이 후원되어야 하는 결점을 가지고 있으나, SHT 같은 최종단계효소(final step enzyme)의 경우, host 세포에서 기질만 공급되면 생성물의 양은 SHT의 발현량과 상관성을 가지고 있다는 점에서, metabolic engineering 측면에서 매우 유리하다. 현재까지 페놀-아민 중합체 연구는 THT 효소 (tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase) 에 집중하여 연구되어 왔으며, 최초로 감자에서 Dr. Strack 그룹이 THT 유전자를 클로닝한 이래(Schmidt et al., 1999), 담배(Farmer et al., 1999), 고추(Back et al., 2001), 토마토(Von Roepenack-Lahaye et al., 2003)에서 각각 클로닝 되었다. 이들 THT 연구의 중심은 tyramine 유도체 생성에 관한 THT 효소의 특성 및 생합성 기작에 대한 연구로 국한되어 있었다. 그러나 동물에서 감정을 조절하는 neurotransmitter 로 알려진 세로토닌(serotonin)을 기질로 사용될 가능성에 대한 연구 결과는 전혀 시사된바 없다. 이는 THT 연구가 세로토닌이 없거나 미량으로 존재하는 담배 및 감자를 중심으로 연구되어 왔으므로, 이들 감자 및 담배에서 세로토닌유도체를 정량적으로 발견하지 못 함이 주 원인이었으리라 사료된다.

본 연구자 역시, 고추에서 클로닝한 THT 유전자를 벼에 형질전환하여, 티라민유도체 화합물의 생성을 기대하였으나, 티라민유도체는 생성되지 아니하고, 기질처리시 세로토닌 유도체가 벼의 잎에서 생합성되는 것을 확인한 후, 본 연구진이 고추에서 클로닝한 THT 유전자가 SHT 유전자임을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 연구의 결과를 획득한 주원인은 벼에서는 THT의 아민 기질로 사용되는 tyramine 보단 serotonin이 주로 생합성되는 식물 종의 특이성에 의해 나타난 결과로 사료된다. 따라서 세로토닌이 다량으로 합성되는 작물의 경우(예; 벼, 옥수수, 생강, 무우 등), 티라민유도체 보단, 세로토닌유도체가 주도적으로 합성될 가능성이 매우 높을 수 있음을 시사하나, 현재까지 본 연구진 이외에서 고추 및 벼



**Fig. 3.** Schematic diagram for synthesis of serotonin derivatives and tyramine derivatives by the action of SHT and THT, respectively.



**Fig. 4.** Serotonin synthesis from tryptophan via two successive enzymatic steps including tryptophan decarboxylase(TDC) and tryptamine 5-hydroxylase.



를 포함하는 작물에서 이들 세로토닌유도체 화합물의 동정을 보고한 연구는 없는 실정이다.

결론적으로 본 연구는 ① 기술적으로 기능이 규명된 SHT 유전자를 벼의 곡립에 발현시켜(Glutelin promoter:SHT; prolamin promoter:SHT), 세로토닌유도체의 축적을 유도하고자 하며, ② 기 육성된 Ubiquitin:SHT 발현 형질전환벼에, 다양한 기질을 처리하여 재배함으로써, 세로토닌유도체의 종자축적을 유도하는 연구와, ③ Serotonin derivatives와 비슷한 tyramine derivatives를 생합성하는 THT 유전자를 벼에 도입하여 생합성 기작에 대한 공통적인 특징을 규명하고, ④ 벼 종자내 세로토닌유도체가 다량 함유된 형질전환벼의 미질 특성, 식미 및 생산성에 대한 연구를 수행하고자 한다. 본 연구로 통한 항산화활성을 가진 신기능종자는 쌀을 주식으로 모든 사람에게 건강증진을 도모 할 뿐 아니라, 벼에서 자연적으로 생성되는 세로토닌유도체의 생성기작을 규명할 수 있을 뿐더러, 벼 외의 품종에 본 기술을 사용 시 본 연구의 활용성은 극대화 될 것으로 사료된다.

## 2. 경제·산업적 측면

항산화제는 활성산소에 의해 야기되는 지질막과산화작용을 방어하는 물질로서, 대표적인 화합물로서 Vitamin E(tocopherol) 및 C를 예로 들 수 있다. 세로토닌유도체는 polyphenol 계통의 화합물로서 홍화씨에서 항산화활성을 가진 물질로 처음 추출·동정된 화합물이다(Zhang et al., 1997). 백남인 등(1999)에 의하면 홍화씨에서 분리한 feruloylserotonin은 현재 널리 사용되고 있는 천연항산화제인 tocopherol 과 합성항산화제인 BHT 및 BHA와 활성을 비교해 볼 때, IC50 값이 6.6 ug/ml 로서 어떤 상용 항산화제보다 높은 항산화효과를 발휘하는 것으로 보고 하였다.

항염증효과를 실험한 결과, LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokines의 생성을 효과적으로 저해함을 보고하였으며(Takii et al., 2003), 이외에도, 심장혈관수축 기능을 보호하는 역할도 보고된바 있다(Kawashima et al., 1998; Hotta et al., 2002). 세계적으로 vitamin C 시장은 7-8만 톤으로 추산되며, 국내는 1300억 원대의 시장을 형성하고 있는 것으로 추산된다. 본 연구에 의해 육성된 세로토닌유도체 함유 벼의 경우, 항산화활성 외 다양한 약리적 효과가 기대될 뿐더러, 약리적 효과가 많이 보고 된 polyphenol 계통의 2차 대사물질의 molecular farming 기술에 선도적 역할을 제공함과 동시에, 국제적 경쟁력을 갖춘 기능성종자를 생산하는 중요한 원천기술로 이용되어 질 수 있을 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

국·내외적으로, 형질전환작물의 인식이 현재까지 부정적인 이미지를 못 벗어나고 있지만, 이에 대한 인식은 추후 변화될 것으로 예견되고 있다. 본 연구진이 개발한 유용화합물의 종자축적 기술은 국내 농업생명공학의 원천기술을 홍보하는 역할을 담당하게 될 것이며, 건강식품에 대한 높은 관심을 보이는 사회추세에 비추어 보아, 형질전환작물에 대한 국민의 인식전환에 기여하게 될 것이다.

## 제 2 절 연구개발 범위

본 연구의 범위는 네 개의 영역으로 대별해 볼 수 있다. 첫째는 세로토닌유도체 합성을 촉매하는 SHT 유전자를 Glutelin promoter 및 Prolamin promoter 이용하여, 형질전환벼를 육성하고, 이 형질전환벼가 세로토닌유도체 합성을 종자에 과다축적 시킬 수 있는지를 조사한다. 특히 Glutelin 및 prolamin promoters를 이용한 형질전환벼가 기존육성한 Ubiquitin promoter를 이용한 형질전환벼보다 더 많은 량의 세로토닌유도체의 합성을 촉매하는지 비교 검토하고자 한다. 또한 Glutelin promoter : SHT 및 Prolamin promoter : SHT 발현 형질전환벼의 경우에서도, 뿌리에 cinnamic acid, tyramine, ferulic acid를 처리하였을 때 이들 세로토닌유도체 화합물이 증대되는 지를 조사하고자 한다. 이들 세로토닌유도체 화합물이 homozygous lines의 세대진전에 따라 안정적으로 생합성되는지를 아울러 조사한다. 본 연구를 통하여, 식물체내에서 SHT의 이종발현을 통하여, 식물에서 생성되는 세로토닌유도체의 생합성 방법 및 종자에 다량축적 시키는 주요 기술이 무엇인지를 밝힐 수 있을 것으로 생각되며, polyphenol 류의 세로토닌유도체를 종자에 다량 축적시킨 벼종자는 기능성 식품으로서 크게 활용될 수 있을 것이며, 둘째는 본 연구팀에서 기 확보된 Ubiquitin promoter:SHT 발현 T<sub>2</sub> homozygous 형질전환벼를 이용하여, 포장상태에서, 다양한 기질을 처리하여 세로토닌유도체의 합성 및 종자축적을 최대 유도시키는 물질이 무엇인지 동정하고자 한다. 또한 이들 물질의 처리는 벼의 생육에 영향을 미칠 것으로 예상하는바, 처리시기별, 처리농도별로 구별하여, 벼의 생육에 감소효과를 유발하지 않는 범위에서, 종자내의 세로토닌유도체 화합물의 축적을 최대 할 수 있는 조건을 찾고자 한다. 본 연구로 통하여, 이미 육성된 형질전환벼를 실제로 농가에서 효과적으로 사용할 수 있는

지에 대한 자료를 얻고자 함이며, 셋째는 Serotonin derivatives 와 비슷한 tyramine derivatives를 생합성하는 THT 유전자를 벼에 도입하여 생합성 기작에 대한 공통적인 특징을 규명하고, serotonin 유도체와 tyramine 유도체 들 간의 생합성에 관련된 주요 기질의 반응 기작 및 rate limiting 단계에 대한 공통적인 정보를 획득하여 추후 이 분야의 metabolic engineering에 효율적인 방법을 획득하고자 한다. 넷째는 상기의 육성한 형질전환벼의 생산성 및 미질특성, 식미관련특성을 조사하고자한다. Ubiquitin promoter:SHT 및 Glutelin promoter:SHT 발현 형질전환벼로부터, 수확된 세로토닌유도체 함유 종자의 형태적 특성뿐만 아니라, 이들 형질전환종자의 생산성과, 미질특이성을 조사하고, 윤기치 및 식미관련특성 등을 조사하며, 저장기간에 따른 이들의 특이성도 연구하고자 한다. 이는 향산화활성이 높은 세로토닌유도체가 종자에 함유되어 있기에, 호흡에 의한 산화 및 저장 중 산화스트레스에 대해 저항성을 보일 수 있으므로, 저장기간에 따른 미질특성이 일반 wild-type 보다 향상될 가능성이 있을 것으로 추정되기 때문이다.

구체적인 연구개발 범위를 요약하면 다음과 같다.

1. Maize ubiquitin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환벼의 특성 및 세로토닌유도체 함량 분석
  - T<sub>4</sub> 형질전환벼에서 SHT 효소활성 분석
  - 종자에서 feruloylserotonin 및 4-coumaroylserotonin 함량 정량
  - 종자의 세로토닌유도체 축적을 위한 기질 처리효과
  - trans-cinnamic acid 처리에 의한 잎 세로토닌유도체 함량의 time course
  - DPPH 방법을 통한 transgenic 벼의 항산화활성 측정
  - T<sub>4</sub> 형질전환체의 조직별 세로토닌유도체 함량 분석
  - 기질처리별 종자내 세로토닌유도체 함량 분석
  - 수확후 저장기간별 종자내 세로토닌유도체 함량 분석
  
2. Rice glutelin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석
  - Rice glutelin promoter:SHT binary vector 제작
  - Glutelin promoter:SHT 발현 형질전환벼 육성

- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Southern blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Northern blot 및 RT-PCR 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Western blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, SHT 효소활성 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체 벼 종자의 functional loci 검정
- T<sub>1</sub> 형질전환체 벼 종자의 세로토닌유도체 함량 분석
- 벼에서 세로토닌유도체 합성의 rate limiting 효소규명 및 세로토닌 함량 측정
- T<sub>2</sub> 형질전환체 육성 및 벼 종자의 세로토닌유도체 함량 분석

### 3. Rice prolamine promoter 조절에 의한 SHT 형질전환벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석

- Rice prolamin promoter:SHT binary vector 제작
- Prolamin promoter:SHT 발현 형질전환벼 육성
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Southern blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Northern blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Western blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, SHT 효소활성 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체 벼 종자의 functional loci 검정
- T<sub>1</sub> 형질전환체 벼 종자의 세로토닌유도체 함량 분석
- 벼에서 세로토닌유도체 합성의 rate limiting 효소규명 및 세로토닌 함량 측정
- T<sub>2</sub> 형질전환체 육성 및 벼 종자의 세로토닌유도체 함량 분석

### 4. Maize Ubiquitin promoter 조절에 의한 THT 형질전환벼의 육성 및 티라민유도체 함량 분석

- Rice ubiquitin promoter:THT binary vector 제작
- Ubiquitin promoter:THT 발현 형질전환벼 육성
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Southern blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, Northern blot 분석
- T<sub>1</sub> 형질전환체의 분자적 검정, 부위별 THT 효소활성 분석
- 기질처리에 따른 티라민 유도체 함량 분석

- 티라민 처리에 대한 식물의 phenotype 관찰
  - 벼에서 티라민유도체 합성의 rate limiting 효소규명 및 세로토닌 함량 측정
5. Serotonin 생합성의 rate limiting 효소인 tryptophan decarboxylase(TDC) 유전자 도입  
형질전환 벼의 육성 및 serotonin 고함량 벼 육성
- 대장균 발현, affinity 정제 및 효소활성 검정
  - 형질전환벼 육성 및 Southern blot 분석
  - 형질전환벼에서 tyramine 및 tryptamine 함량 측정
  - 종자 및 잎에서 세로토닌 함량 분석
  - 형질전환벼에서 세로토닌유도체 함량 측정
6. 형질전환벼의 생산성 및 미질특성 연구
- Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동)의 작물학적 특성 조사
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(동진)의 작물학적 특성 조사
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동 및 동진)의 생산성 특성 조사
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동 및 동진)의 현미의 외관특성 조사
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동 및 동진)의 백미의 외관품질
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동 및 동진)의 윤기치 및 식미관련 특성 조사
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동 및 동진)의 이화학적 특성 조사
  - Ubiquitin:SHT 형질전환체(낙동 및 동진)의 알카리 붕괴도 특성 조사
7. Serotonin 고 함류 형질전환 벼의 생산성 및 미질특성 연구
- Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환 벼의 작물학적 특성 조사
  - Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환 동진벼의 생산성
  - 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석
  - Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체와 동진벼 백미의 외관품질
  - Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 윤기치 및 식미관련 특성

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 본 연구진의 선행연구결과

#### 1. 고추로부터 Serotonin N-(hydroxycinnamoyl)transferase (SHT) 유전자 클로닝 및 특성규명

본 연구진은 세계최초로 SHT 유전자를 클로닝 하였으며, SHT 효소의 기질 특이성 및 효소 kinetics에 대한 특성을 규명하였다. SHT 유전자는 고추에서 feruloyltyramine류의 합성을 촉매하는 tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase (THT) 유전자로서 클로닝 되었다(Back et al., 2001). 그 후 고추 THT 유전자를 벼에 형질전환하여, feruloyltyramine의 축적을 기대하였으나, feruloylserotonin 류의 축적이 *de novo*하게 생합성됨을 관찰한 후, 고추 THT 효소의 특성을 재조사하였다. 정제된 재조합고추 THT 효소가, tyramine( $K_m$  1165  $\mu$ M) 보다는 serotonin( $K_m$  73  $\mu$ M)에 16배 이상 높은 기질특이성을 보임을 관찰하였다 (표 I). 또한 acyl acceptor로서, tyramine 및 serotonin 외에 tryptamine, phenylethylamine 및 dopamine 등의 다양한 amines류를 기질로 사용함을 확인하였다. Acyl donor로서 feruloyl-CoA가 가장 높은 친화력을 보였으며( $K_m$  3.5  $\mu$ M), 그 다음으로 caffeoyl-CoA, *p*-coumaroyl-CoA 및 cinnamoyl-CoA 등의 순이었다. 결론적으로, 감자, 담배, 토마토, 양귀비 등에서 THT 효소가 정제되고 특성이 규명되었으나, SHT 활성은 없거나, 보고되지 않았으며, 본 연구진이 최초로 SHT 활성을 가진 유전자를 규명하였다.

#### 2. SHT 발현 형질전환벼의 세로토닌유도체 합성 특성

본 연구진은 SHT 유전자를 모든 조직에 항상 발현되는 옥수수 Ubiquitin promoter에 부착하여, 형질전환벼를 육성하여 세로토닌유도체의 생성능력을 조사하였다. 형질전환벼를 선발하여, SHT 유전자의 삽입과 발현을 DNA/RNA/Western blot로 확인하였으며, SHT 활성을 조사한 결과, SHT가 기능적으로 항상 발현됨을 확인하였다. SHT transgene이 항상발현되는 형질전환벼의 잎에서 세로토닌유도체 화합물을 조사한 결과 예상과 다르게

이들 화합물이 전혀 측정되지 않았다. 따라서 이들 경엽에 기질을 처리한 결과, tyramine 혹은 serotonin을 처리한 경엽에서 tyramine 및 serotonin 유도체가 검출되는 것을 확인하였다. 이는, 형질전환벼에서 SHT가 항상발현되어도 amines 기질이 limiting factor로 작용하여 세로토닌유도체가 생합성되지 못함을 알 수 있었다. 경엽처리 실험 결과와 다르게, 이들 형질전환벼를 표 II에서와 같이 다양한 기질이 포함된 MS 배지상에서 키워, 15일된 잎을 채취하여 조사한 결과, tyramine, cinnamic acid, coumaric acid 가 50 uM 함유된 곳에서 자란 벼에서 다량의 세로토닌유도체가 생합성됨을 확인하였다. 그러나 serotonin 같은 amine 기질처리시 경엽처리와 다르게 세로토닌유도체가 전혀 합성되지 않았다. Non-specific elicitor인 chitin 및 CuSO<sub>4</sub> 역시 세로토닌유도체 합성을 유도하지 않았다. 이와같이 뿌리에 cinnamic acid나 tyramine을 처리시 세로토닌유도체의 합성이 증대되는 이유는 아직 알 수 없으나, 이들이 뿌리로 흡수되어, 세로토닌유도체의 생합성을 upregulation하거나, 아니면, 합성된 세로토닌유도체의 이동(transport)을 촉진시키는 역할을 할 것으로 추정된다.

## 제 2 절 국내·외 타 연구기관의 연구내용 및 결과

### 1. 국내 연구동향

국내에서 세로토닌유도체 생합성 연구기작에 대한 연구를 수행하는 곳은 본 연구진 외에는 없으며, 홍화로부터 항산화물질 추출 및 동정에 대한 연구를 수행한 곳은 한 곳이 있는 상태이다(백남인 외 1999).

이원정, 박남운, 최상원, 이덕록(한국) : 홍화씨에서 추출한 feruloylserotonin, coumaroylserotonin 이 뼈 형성 촉진작용이 우수하여, 골절이나 골다공증의 예방 및 치료제로서 사용할 수 있음을 골아세포주인 ROS 17/2.8의 증식에 미치는 효과를 관찰함으로써 이들의 기능을 보고하였다.

### 2. 국외 연구동향

국외에서 SHT 유전자 및 효소 관련 연구보고는 없는 상태이며, 단지 THT 관련연구와 세로토닌유도체의 약리적 특성을 연구하는 연구자가 있는 상태이다.

Dr. Strack 그룹(독일) : 최초로 감자에서 THT유전자를 클로닝하였으며, 대장균에서 발현 정제한 recombinant THT가 multiple amines 및 cinnamic acid 유도체를 기질로 이용하는 연구를 최초로 보고 하였다(Schimidt et al., 1999).

Dr. Negrel 그룹(프랑스) : 담배에서 최초로 tyramine 유도체가 바이러스 침입시 유도된다고 보고한 그룹이며, tyramine 유도체 합성기작에 대한 가장 많은 연구를 수행한 연구그룹이다. 그 후 감자에서 THT유전자를 클로닝하여 Eur. J. Biochem. (Farmer et al., 1999) 저널에 발표하였다.

Dr. Von Roepenack 그룹(영국) : 토마토에서 THT유전자 3개를 클로닝하였으며, 병원균과 토마토 숙주간의 gene for gene interaction 시, 방어물질 생합성에 대한 연구를 수행하는 그룹이다. 상기의 gene for gene 반응에 coumaroyloctopamine 및 coumaroylnoradrenaline 물질의 생합성과 연계성이 있음을 연구하였으며, 이들 물질을 생합성하는 유전자가 THT 유전자임을 보고하였다. 이들이 토마토에서 클로닝한 THT 모두 tyramine에 가장 높은 친화성을 보였고( $K_m$  4-60  $\mu$ M), noradrenaline에 대한 기질친화성이 있음을 처음으로 보고하였다.

그 외 THT 관련 효소의 특성 및 유전자 연구를 수행하는 곳으로 일본의 Dr. Ishihara 그룹(Kyoto Univ.), 미국의 Dr. Ryan 그룹(Washington State Univ.), 및 캐나다의 Dr. Facchini 그룹(Univ. of Calgary) 등이 있다.

세로토닌유도체 화합물의 생합성 및 약리적 역할을 수행하는 연구 그룹은 다음과 같다.

Dr. Tsuda 그룹(일본) : Kyoto 대학 Dr. Tsuda 그룹에서 병원균에 감염된 대나무가지에서 coumaroylserotonin 및 feruloylserotonin이 생합성됨을 보고하였으며, 이중 coumaroylserotonin은 곰팡이 균(*A. take*)에 항균효과가 있는 것으로 보고하였다(Tanaka et al., 2003).

Dr. Sakakibara 그룹(일본) : Nagoya 대학의 Dr. Sakakibara 박사 연구팀은 Aichi 의대의 Dr. Hotta 그룹과 공동으로 세로토닌유도체 화합물의 혈관수축에 의한 심근빈혈에 대한 방어작용을 보임을 기니피그 Langendorff 심장을 이용한 실험에서 밝혔다. 이러한 방어작용은 이들 유도체가 NO 함량을 늘리고,  $Ca^{2+}$  함량의 감소와 연관이 있음을 제시하였다(Hotta et al., 2002).



Dr. Onozaki 그룹(일본) : Coumaroylserotonin이 proinflammatory cytokines 생성을 mRNA level에서 낮추어 줌으로서, anti-inflammatory drug(항염증억제효과)로서 사용할 수 있음을 보고하였다(Takii et al., 2003).

항산화효과 연구 그룹(일본, 한국) : 일본의 Tanaka 그룹(Niwa et al., 2002), Sakakibara 그룹(Zhang et al., 1996), 및 한국의 백남인 그룹(1999) 등에서 세로토닌유도체가 강한 항산화활성이 있음을 보고하였다. 세로토닌유도체의 항산화효과가 합성항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene) 보다 높음을 보고하였다.

### 3. 앞으로의 전망

현재까지 세로토닌유도체에 대한 효소적, 분자적 및 2차대사산물로서 합성에 대한 연구는 현재까지 없는 실정이며, 이는 이를 합성하는 SHT 효소의 연구부재가 주원인이다. 본 연구진에 의하여, SHT 유전자가 밝혀지고, 이들의 농업적응용성이 제시되면서, 이 SHT 유전자의 생명공학적 응용 가능성이 확대되어질 전망이다. 이들 세로토닌유도체 화합물의 약리적 기능, 항산화활성 및 항균물질로서의 특성을 고려할 때, 이들 물질을 이용한 건강식품, 및 병저항성작물 육성 등과 같은 다양한 측면에서 응용 가능할 것으로 보인다. 특히 항산화활성을 가진 세로토닌유도체 화합물은 식물성 유지의 저장기간(shelf life)을 증대할 수 있을 뿐 아니라, 가뭄 혹은 열에 기인하는 식물의 산화스트레스에 저항하는 능력을 증대시킬 수도 있을 것으로 예상된다. 특히 형질전환벼의 뿌리에 cinnamic acid를 처리시 엄청난 량의 세로토닌유도체가 잎에 증대됨을 볼 때, 이들 잎은 특정 병균에 대한 저항성을 발휘 할 것으로 예상된다.

따라서 Ubiquitin : SHT 형질전환벼를 이용하여, 상기의 명시된 다양한 가능성을 진단하는 model system으로서 사용이 가능하며, 기초적으로 세로토닌유도체 화합물의 생성, 이동, 및 종자로의 저장에 대한 기본연구를 수행하는데 큰 도움을 주게 될 것이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 Maize ubiquitin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 특성 및 세로토닌유도체 함량 분석

#### 1. 서 설

식물은 다양한 종류의 화합물을 생합성 한다. 이중 많은 화합물들이 인간의 건강을 증진하는 영양약리물질로 기여하는 것으로 알려져 있다. 최근 들어 이러한 영양가치가 높고 건강을 증진하는 물질들을 건강보조식품으로 사용되고 있으며 대표적인 물질로서는 비타민, 미네랄 및 다양한 식물추출물 등이 포함된다(Grusak, 2002). 세로토닌유도체는 폴리페놀 화합물군에 속하며, 대표적으로 feruloylserotonin, 4-coumaroylserotonin 등이 있다. 주로 홍화씨(Sakamura et al., 1980), *Echinochloa utilis*(Watanabe et al., 1999), *Amorphophallus konjac*(Niwa et al., 2000), *Leuzea carthamoides*(Pavlik et al., 2002), *Centaurea nigra*(Kumarasamy et al., 2003) 등의 종자에 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다. 최근 들어 세로토닌유도체가 병원균으로 감염된 대나무 가지에서도 발견되고(Tanaka et al., 2004), 벼의 뿌리에서도 있는 것으로 보고되고 있다(Jang et al., 2004). Feruloylserotonin 및 4-coumaroylserotonin 등의 세로토닌유도체 화합물은 홍화씨 껍묵에서 최초로 항산화 물질로서 동정되었고(Zhang et al., 1996), cathartic 효과(Hotta et al., 2003), 염증반응억제 효과(Kawashima et al., 1998), 항암효과(Nagatsu et al., 2000), 혈장콜레스테롤저하효과(Cho et al., 2004) 등 다양한 약리효과가 있는 것으로 보고되었다. 세로토닌유도체는 두 가지 종류의 기질을 이용한 중합물이다. 두 기질은 hydroxycinnamoyl-CoA thioesters과 serotonin이다. Hydroxycinnamoyl-CoA thioesters에서 hydroxycinnamic acids가 serotonin에 전달되어 중합되며, 이 반응을 촉매하는 것이 serotonin N-hydroxycinnamoyl transferase (SHT) 효소이다(Jang et al., 2004). SHT 효소는 고추에서 THT 효소로 처음 보고 되었으나(Back et al., 2001), 이 THT 유전자를 벼에 발현시켰을때 세로토닌유도체가 축적되는 것으로 확인되고, recombinant THT enzyme을 이용하여 kinetic 분석을 한 결과 tyramine 보다 serotonin에 더 큰 기질친화성이 있음을 발견하여 SHT 유전자로 명명되었다. 본 연

구는 SHT 유전자가 발현하는 형질전환벼를 이용하여, 종자내 세로토닌유도체 함량을 조사하고, 유묘에서 최대한의 세로토닌유도체를 생합성하는 조건이 무엇인지, 그리고 형질전환벼의 항산화활성이 어느정도인지 조사하여 세로토닌유도체의 종자축적에 대한 지식을 얻고자 수행하였다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. Ubiquitin:SHT 형질전환 벼의 배양, 기질처리, 생산물 분석

고추의 hydroxycinnamoyl-CoA: serotonin N-(hydroxycinnamoyl) transferase(SHT)를 발현하는 T<sub>4</sub> homozygous 형질전환 벼는 Jang 등의 T<sub>2</sub> 형질전환 벼로부터 왔다(2004). SHT 유전자를 도입한 T<sub>2</sub> 형질전환 벼 종자들은 T<sub>4</sub> 종자들을 획득하기 위해 자가 수분시켰다. T<sub>4</sub>나 wild type 종자들을 30초 동안 70% EtOH 속에서 다음 20분 동안 2%의 NaOCl속에서 살균한다. 종자들을 멸균된 3차 증류수로 몇 번 헹궈주고 50 $\mu$ M의 trans-cinnamic acid가 있거나 없는 1/2 Murashige & Scoog(MS)배지에 치상한다. 그런 다음 25 $^{\circ}$ C에서 계속적인 빛 아래서 배양한다. 벼 잎을 액체 질소 속에서 갈고 그 추출물을 3ml의 methanol과 혼합한다. Sep-Pak cartridge를 통과한 sample들을 HPLC로 분석하였다. 종자의 serotonin유도체의 함량은 1mM의 다양한 기질(2000ml)을 첨가하거나 첨가하지 않은 논에서 자란 개화 후 40일 된 T<sub>4</sub> 종자를 이용하여 분석하였다.

### 나. SHT activity 측량

벼 잎은 4 $^{\circ}$ C에 10mM sodium phosphate buffer(pH7.5)와 14.4mM mercaptoethanol을 첨가하여 막자사발로 갈아준다. 그 후 12000rpm으로 10분 동안 원심분리 시키고 그 상등액을 효소활성측정의 sample(crude enzyme solution)로써 사용하였다. 10 $\mu$ l crude enzyme solution은 1mM의 feruloyl-CoA 10 $\mu$ l, 10mM serotonin 10 $\mu$ l, 100mM Tris-HCl buffer(pH8.5) 70 $\mu$ l을 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 10분동안 incubation시키고 20 $\mu$ l의 acetic acid를 첨가하여 반응을 정지시킨다. 그 혼합물에 500 $\mu$ l의 methanol로 채우고 10 $\mu$ l를 HPLC로 분석한다. 단백질 농도는 Bio Rad protein assay dye를 이용한 Bradford 방법으로 측정하였다.

## 다. DPPH 방법을 이용한 Radical scavenging activity (항산화활성 측정)

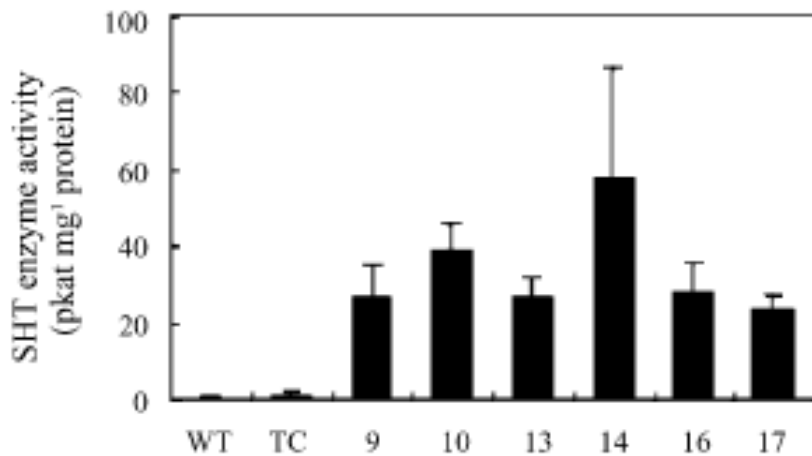
모든 잎 추출물들 속에서 다양한 화학적 화합물들의 복잡한 상호작용 효과와 관계있는 문제들을 피할 목적으로 잎 추출물들을 Sep-Pak cartridge에 통과시켜 HPLC 분석 방법을 이용했다. 50 $\mu$ l의 잎 추출물에 MeOH를 첨가하여 100 $\mu$ l로 맞추고 900 $\mu$ l의 0.15mM methanolic solution인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 첨가하여 E-tube에 담아 강하게 섞어준다. tube를 27°C에 20분 동안 놓아둔다. 대조구는 어떤 추출물도 넣지 않은 채 준비해 둔다. 517nm에서 sample들의 흡광도를 측정한다. Radical scavenging activity는 inhibition %로 나타나고 다음과 같이 계산하였다 : radical scavenging activity (%) = (control OD-sample OD/control OD) $\times$ 100. 잎 추출물부터의 알려져 있는 CS, FS의 농도는 radical scavenging activity를 위한 참고 자료로서 분석하였다.

## 3. 연구 수행 결과

### 가. T<sub>4</sub> 형질전환 벼에서의 SHT enzyme activity

고추의 SHT를 옥수수의 ubiquitin promoter와 함께 벼의 genome에 도입시켰다(Jang et al., 2004). 세로토닌유도체의 함량 분석 및 생화학적 연구를 위해 사용한 SHT 발현 형질전환벼는 T<sub>4</sub> 세대를 이용하였다. 이는 T<sub>1</sub>과 T<sub>2</sub>의 세대는 비록 silence하지 않지만 T<sub>3</sub> 세대에서 발생 가능한 gene silence를 피하기 위하여 T<sub>4</sub> 세대 homozygous 라인을 선별하여 사용하였다(Lyer et al., 2000). T<sub>4</sub> 세대에서 SHT gene 발현을 조사하기 위해서 소독된 멸균벼 종자를 1/2 MS 배지에서 15일 동안 배양한 transgenic line과 wild type 잎으로부터 SHT 효소활성을 측정하였다(그림 1-1).

형질전환벼의 SHT 효소활성은 25-60 pkat/mg protein이나 형질전환하지 않은 대조구벼와 vector만 발현하는 transgenic control은 모두 1 pkat/mg보다 적은 효소활성이 측정되었다(그림 1). 가장 높은 SHT activity는 14 line에서 60 pkat/mg으로 측정되었고, 다음으로 효소활성이 높은 형질전환 line은 10번 이었고, 기타 lines들도 대조구에 비해 높은 효소활성이 검출되어 형질전환벼에서 고추유래의 SHT 유전자가 다량 발현됨을 확인할 수 있었다. T<sub>4</sub>세대 line 14의 SHT enzyme activity는 T<sub>2</sub> 세대의 SHT 효소활성 측정치인 78 pkat/mg과 거의 동등함을 알 수 있었다(Jang et al., 2004). 결론적으로 보면, T<sub>4</sub> transgenic



**Fig. 1-1.** SHT enzyme activities of independent transgenic rice plants. Sterilized seeds were sown and grown in half-strength MS medium for 15days at 25°C under alternating 12 h light/dark, and the leaves of the rice were used in this assay. SHT activity is expressed as mean±S.D. (pkat mg<sup>-1</sup> protein) on duplicate experiments. WT: nontransformed rice; TC: transformed rice expressing a vector only; 9-17: independent transgenic rice lines.

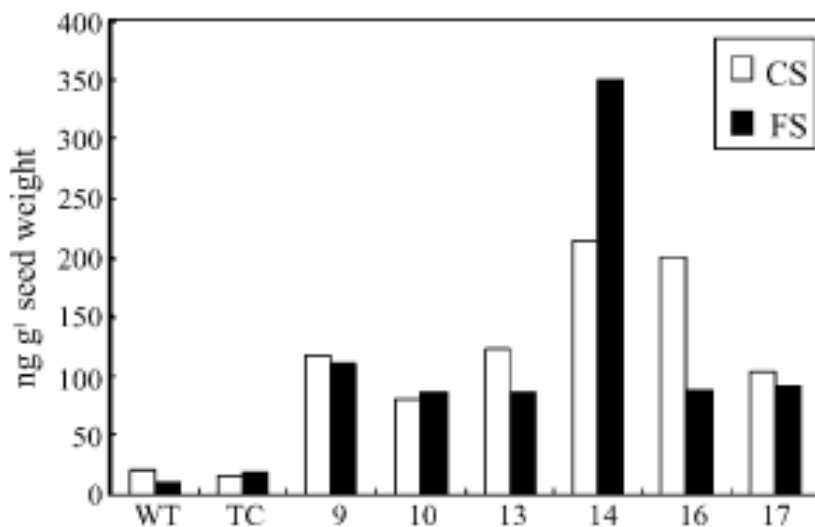
lines의 전반적이 SHT 효소활성은 T<sub>1</sub>세대에서 측정된 것과 거의 유사함을 보여 주었다. 이것은 형질전환벼에서 세대가 진전되어도 SHT transgene 이 안정적으로 전달되고, 기능적으로 발현된다는 것을 의미한다.

#### 나. 껍질 벗긴 벼 종자에서 p-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin의 정량

SHT gene이 형질전환되어있는 T<sub>4</sub> transgenic의 종피를 벗기고 HPLC 기기를 이용하여 serotonin유도체의 함량을 측정하였다(그림 1-2). 대조구 wild type과 transgenic control에 서는 종자 g당 30 ng의 아주 적은 량의 serotonin유도체가 검출되었다. 반대로 transgenic 종자에서는 wild type보다 5-18배 더 높은 함량을 보여 주었다. 형질전환벼에서 정량한 종자의 총 serotonin유도체(쿠마로일세로토닌(CS)+페루로일세로토닌(FS))의 함량은 종자 g당 165-562 ng 사이에 분포하였다(CS 213 ng, FS 349 ng). 형질전환벼 14 line과 wild type을 제외하고는 대부분의 transgenic line에서 p-coumaroylserotonin이 feruloylserotonin보다 약간 더 높게 측정되긴 하지만 일반적으로 14와 16 line들을 제외하고는 CS나 FS의 함량 분포차이의 특이성은 발견되지 않았다. 이러한 현상은 feruloyl-CoA와 p-coumaroyl-CoA에 대한 SHT enzyme의 V<sub>max</sub>와 K<sub>m</sub>이 상이하지 않은 transgene SHT 효소의 고유한 성질과 높은 관련이 있는 것으로 사료된다. 형질전환벼 종자의 평균적인 serotonin유도체의 함량은 274 ng/g 정도 이다. 형질전환 SHT 벼의 종자에서 maize ubiquitin에 대한 serotonin유도체 과다생산의 조절 기작은 명백하지 않지만 ubiquitin promoter에 의한 SHT transgene의 벼 뿌리에서 과다발현되어, 뿌리에서 과다 합성된 serotonin유도체가 영양생장에서 생식생장으로 전환되는 기점에서 특정한 생리적 생화학적 신호에 의해 생육후 반기에 종자로 운반되는 것으로 추정 된다(Jang et al., 2004).

#### 다. 종자에 serotonin유도체의 축적에 있어서 기질 처리의 효과

선행연구 결과에 의하면, 세로토닌유도체의 함량은 amine 화합물이나 phenolic 화합물을 뿌리에 처리하면, 처리한 벼의 잎조직에서 세로토닌유도체 함량이 잎에 축적되는 현상을 나타내었으므로, 본 연구에서는 형질전환벼의 생육시기동안에 다양한 전구물질을 벼의 뿌리에 처리하여 보았으며, 이들의 처리에 의한 종자내의 세로토닌 유도체 함량의 차이를 측정하였다. 논에서 자라고 있는 벼의 뿌리에 화학 물질을 처리했을 때 종자의 serotonin유



**Fig. 1-2.** Levels of 4-coumaroylserotonin and feruloylserotonin in dehulled rice seeds from wild-type and transgenic rice lines. T4 homozygous seeds grown in the paddy field were employed for HPLC analysis. Data from duplicates of the same sample were identical. WT: nontransformed rice; TC: transformed rice expressing a vector only; 9-17: independent transgenic rice lines.

도체의 합성이 증가하는지를 실험하기 위해 개화 후 40일에 몇몇의 화학 물질을 토양에 처리하였다(2000 ml/plant). 1mM 농도의 chemicals을 처리한지 30일 후 종자를 수확한 결과 serotonin유도체의 함량이 증폭된 현상을 볼 수 있었다(표 1-1).

대조구인 wild type에서는 tyramine을 뿌리에 처리한 것이 처리하지 않은 것 보다 serotonin유도체가 3배 이상 증가하였다. Wild type에서와 마찬가지로 transgenic 종자에서 또한 1 mM의 chemical을 처리한 것이 serotonin유도체의 함량이 더 높았다. 평균적으로 transgenic 벼에서는 chemical을 처리한 것이 처리하지 않은 것 보다 약 2배 정도 증가하였다. 몇몇의 chemical 처리 실험에서 볼 때 tyramine이 최고의 inducer로 작용하지만 transgenic 종자에서는 trans-cinnamic acid와 p-coumaric acid와 같은 다른 chemical들도 serotonin유도체의 합성에 있어서 tyramine과 유사한 효과를 지님을 보여주었다. Chemical 처리에 의한 종자에서 serotonin유도체의 생산 증진은 벼 잎에서의 화합물의 처리에 의해 세로토닌유도체 합성이 증가되는 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 그러므로 종자에서의 serotonin유도체의 축적 증진은 serotonin유도체가 뿌리에서 있을 경우하여 종자로 운반되는 것임을 시사한다고 할 수 있다. 또한 개화 40일 후 1 mM의 chemical처리는 처리하지 않는 대조구에 비해 잎의 노화가 촉진되는 현상을 나타내었다. 잎의 노화를 야기하지 않고 종자내의 세로토닌유도체 함량을 최대화 할 수 있는 최적의 chemical 농도를 알아내는 실험이 추후로 요청된다.

#### 라. Trans-cinnamic acid의 처리에 의한 잎 serotonin 유도체 함량의 time course

Trans-cinnamic acid가 함유된 배지에서 쿠마로일세로토닌(CS)과 페루로일세로토닌(FS) 생합성이 어떻게 되는지 조사하기 위하여, 멸균된 벼 종자를 50  $\mu$ M의 trans-cinnamic acid가 함유된 1/2 MS(Murashige & Skoog)배지에 치상하여 성장시켰다. 파종 후 시기별로 벼 잎을 수확하여 serotonin유도체의 량을 측정하였다. 총 34일의 배양 기간동안 transgenic 잎들은 11째 각각 110  $\mu$ g/g과 140 $\mu$ g/g으로 CS와 FS가 가장 높았다. 잎의 노화가 시작되는 11일 이후 점차적으로 serotonin유도체의 수준이 감소하였다. 34일째 잎들은 완전히 노화되었고 CS와 FS의 량은 각각 3  $\mu$ g/g, 5  $\mu$ g/g 아래로 감소하였다(그림 1-3).

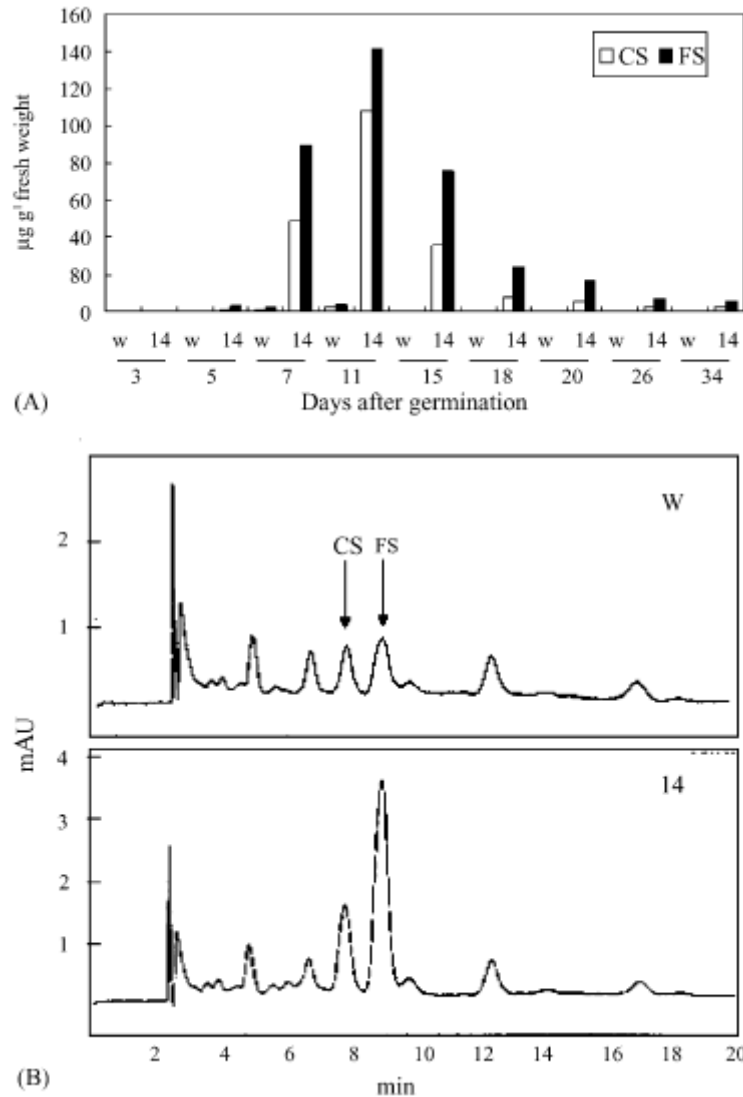
trans-cinnamic acid가 없을 경우에는 transgenic 벼의 잎에서조차 serotonin유도체가 검출되지 않았다. 형질전환벼에 비교하여 11일째 되는 날의 wild type 잎에서의 serotonin유



**Table 1-1.** Seed contents of serotonin derivatives upon various substrate treatment. One milliliter substrates(2000 ml) were applied once into the soil of wild and transgenic rice (line 14) at 40 days after anthesis, harvested after one month and then quantified the products by HPLC. Rice seeds were dehusked and subjected to extraction for analyses. Each experiment was carried out at least twice and expressed as mean  $\pm$  S.D.

Table 1  
Seed contents of serotonin derivatives upon various substrate treatments

Substrates	Coumaroylserotonin (ng g <sup>-1</sup> seed)	Feruloylserotonin (ng g <sup>-1</sup> seed)	Total (ng g <sup>-1</sup> seed)
Wild-type	19 $\pm$ 10	10 $\pm$ 11	29 $\pm$ 10
Tyramine <sup>a</sup>	36 $\pm$ 12	55 $\pm$ 19	91 $\pm$ 15
Transgenic	213 $\pm$ 63	349 $\pm$ 57	562 $\pm$ 60
Cinnamic acid <sup>b</sup>	403 $\pm$ 78	406 $\pm$ 81	809 $\pm$ 79
<i>p</i> -Coumaric acid	325 $\pm$ 49	599 $\pm$ 54	924 $\pm$ 52
Tyramine	314 $\pm$ 51	684 $\pm$ 94	998 $\pm$ 73

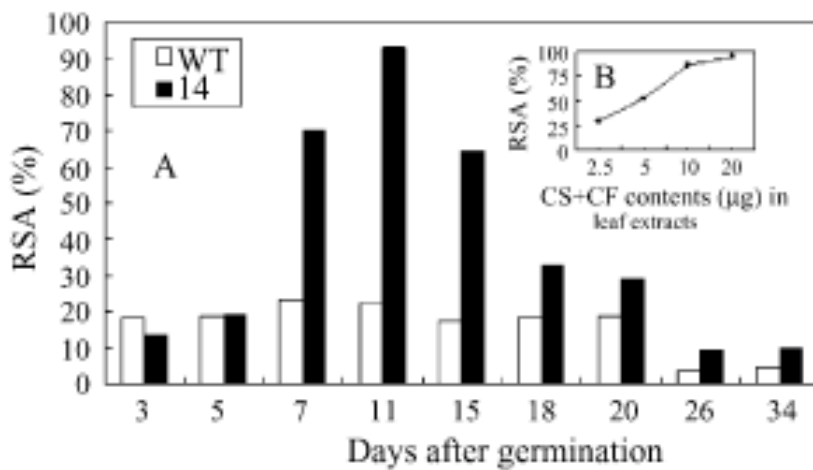


**Fig. 1-3.** Time course of leaf serotonin derivatives contents during the experiment challenged with trans-cinnamic acid(A) and a representative HPLC chromatogram of leaf extracts on day 5 (B). Rice seeds were sown and grown in half-strength Murashige and Skoog medium in the presence of trans-cinnamic acid(50  $\mu$ M). The leaves of the rice were harvested and the levels of serotonin derivatives were determined at each time point. Relative trends in duplicate experiments were identical. W: wild-type; 14: transgenic line 14; CS:4-coumaroylserotonin; FS: feruloylserotonin.

도체의 총량은 CS, FS 각각 1.5  $\mu\text{g/g}$ , 2.5  $\mu\text{g/g}$ 이 측정되었다. 형질전환벼와 wild type의 세로토닌유도체 합성 정도는 모두 11일째 되는 날 최고의 축적률을 나타내고 그 후에는 줄어드는 공통적인 현상을 나타내었다. *Trans*-cinnamic acid로 인해 유도된 종자에서 serotonin유도체의 량(998ng/g seed weight)과 잎에서의 량(360 $\mu\text{g/g}$  leaf weight)을 비교해 보았을 때 serotonin유도체의 약 0.3%라는 매우 적은 량이 잎에서 종자로 전환되는 현상을 나타내었다. 그러나 세로토닌유도체 합성이 뿌리에서 합성되어 특정 생육시기에 세포 내의 신호를 받아 줄기로 이동되고, 최종적으로 종자로 이동되는 경로를 통해 합성되는지, 아니면, 종자를 포함하는 모든 부위에서 발현되는 ubiquitin promoter의 작용으로 종자에서도 세로토닌유도체가 합성되는지는 현재로서는 알 수 없다. 그러므로 SHT gene를 glutelin promoter와 같은 종자 특이적 promoter와의 융합하여 벼에 발현시켰을 때, 종자에서 serotonin유도체의 합성을 증폭되는지를 조사하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

#### 마. DPPH 방법을 통한 transgenic 벼의 antioxidant activity 측정

CS와 FS는 강한 항산화활성(antioxidant activity)을 보인다고 보고되어왔다(Baek et al., 1999; Niwa et al., 2002). 따라서 SHT 유전자를 발현하는 형질전환벼에서 이들의 항산화활성을 세로토닌유도체 함량이 높고 축적되는 잎 부위를 이용하여 측정하였다. 항산화활성을 측정하기 위하여, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 시약을 이용하여, radical scavenging activity를 확인하였다. Baek et al.(1999)의 보고에 의하면, FS의  $\text{RC}_{50}$ 은 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT: $\text{RC}_{50} = 12.2 \mu\text{g}$ )과 butylated hydroxyanisole(BHA: $\text{RC}_{50} = 7.4 \mu\text{g}$ )와 비교해 볼 때, 6.6  $\mu\text{g}$ 으로 높은 항산화율을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 형질전환 종자에서는 serotonin유도체의 함량이 낮기 때문에 종자 추출물을 이용할 수 없었다. 따라서 transgenic과 wild type으로부터 radical scavenging activity를 측정하기 위하여 잎의 추출물을 이용하였다. 잎 추출물은 그림4에서 CS와 FS 분석에 이용했던 sample을 이용하였다. Wild type의 잎 추출물은 5-20% 정도의 낮은 DPPH radical scavenging activity를 보인다(그림1-4). 반대로 transgenic 벼의 잎 추출물은 10-93%의 높은 quench DPPH radical activity를 보인다. DPPH radical scavenging activity는 serotonin유도체의 절대량과 깊은 관련이 있다. 11일째의 잎 추출물은 quench DPPH radical에서 가장 많은 activity를 보이고 그 뒤를 7일과 15일째에 높은 활성을 보였다. 따라서 50% DPPH radical scavenging activity를 발현하기 위해서는 serotonin유도체(CS+FS)가 약 5  $\mu\text{g}$ 이



**Fig. 1-4.** DPPH radical scavenging activity in transgenic leaf extracts (A). Relationship between RSA activity and serotonin derivative concentration (B). The Sep-Pak filtered leaf extracts analyzed for serotonin derivative content (shown in Fig. 4) were analyzed for RSA, in order to minimize interference from other chemicals found in crude leaf extracts. WT, wild-type 14, transgenic RSA, radical scavenging activity. Data from duplicates of the same sample were identical.

필요하며, 이를 위해서는 SHT 발현 형질전환변종 종자 5g 정도가 요구되어 진다.

결론적으로 이러한 결과는 식물체에서 영양약리물질(phytochemical or nutraceuticals)을 생산하는데 있어 SHT 유전자가 중요한 역할을 수행함을 보여 주지만, wild-type 혹은 형질전환변종 내에서 세로토닌유도체의 조절기작 및 rate limiting 효소에 대한 더 많은 연구가 수행되어져야 할 것으로 사료된다. 또한 비록 식물에서의 CS와 FS의 정확한 기능이 잘 밝혀지지는 않았지만 SHT 과다발현에 의한 항산화 물질인 serotonin유도체의 양적 증가는 생물과 무생물 스트레스에 대한 식물 조직의 저항성을 증진시킬 것이다(Tanaka et al., 2003; Demmig-Adams & Adams, 2002). 이러한 저항성은 작물의 생산성과 종자 저장 수명을 증가시키는 데도 중요한 역할을 할 것이다.

## 제 2 절 Rice glutelin promoter 조절에 의한 SHT 형질전환변종의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석

### 1. 서 설

일반적으로 벼 종자 저장 단백질은 그들의 용해성에 따라 insoluble glutelins, alcohol-soluble prolamins, salt-soluble globulins, water-soluble albumins 이렇게 네 가지로 분류된다. 또한 벼 배유 세포에는 type I protein body(PBI)와 type II protein body(PBII) 두 종류의 단백질 저장 액포가 존재하는데 prolamins는 PBI에 축적되는 반면 glutelin과 globulin은 PBII에 축적된다. Glutelin은 벼의 종자 저장 단백질의 70%를, prolamins는 총 종자 저장 단백질의 20~25%를 구성하고 있다. Gus 유전자에 각각의 종자 저장 단백질의 promoters를 장착한 후에 이 유전자를 벼에 도입시키고 각각의 종자 저장 단백질 promoters에 의해서 발현된 gus activity를 벼 종자에서 측정하여 본 결과 prolamins과 globulin promoters에 의해 발현된 gus activity가 가장 높은 반면 allergenic 단백질인 albumin의 promoter의 활성이 가장 낮은 것으로 보고하였다. Glutelin promoter는 GluA-3와 GluB-1, 두 종류로 존재하는데 이 둘 모두 중간 정도의 activity를 보인다고 보고 하였다(Wu et al. 1998).

이러한 벼 종자 단백질은 배유 특이적으로 발현되기 때문에 외부 유전자를 종자에 특이

적으로 발현 시키고 싶을 때 이들 유전자의 promoter를 주로 이용한다. 따라서 본 연구는 SHT 유전자를 벼 glutelin A3 promoter 조절 하에 두어 형질전환 시켰을 때, 이들 형질전환벼에서 세로토닌유도체 함량이 어떻게 되는지 알고자하여 본 연구를 수행하였다. Glutelin A3 promoter:SHT 발현 형질전환벼가 ubiquitin promoter:SHT 발현 형질전환벼에 비해 세로토닌유도체 함량이 높은지 혹은 낮은지 알기위해서 본 실험을 수행하였다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. Rice glutelin promoter을 이용한 SHT 유전자 발현 벡터 construction

벼의 배유 발현 특이 프로모터는 Glutelin A3 유전자(X54313) 염기서열을 이용하였다. 전방 primer으로서 F1117(5'-AGTGGATCCAGAAGAAAGATAATAACC-3')을, 후방 primer으로서는 F1118(5'-GATAAGCTTAATGCTTTTGTGAGAAATG-3')을 제작하여, 우영민교수(포항공대)로부터 분양받은 Glutelin A3 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 클로닝하였다. 클로닝된 유전자는 보고된 유전자 서열과 일치 하였으며, 유전자 서열은 결과란에 도시하였다. 클로닝된 GluA3 유전자는 전방 primer에 *Bam*HI 제한효소 site가, 후방 primer에는 *Hind*III 제한효소 site가 삽입되어 있어, GluA3 유전자를 *Bam*HI과 *Hind*III insert로 분리하여 바이너리 벡터 제작에 이용하였다(그림 2-1).

### 나. Rice Glutelin:SHT 발현 형질전환벼 육성을 위한 Callus 유도

GlutelinA<sub>3</sub>:SHT유전자 형질전환을 위한 벼의 배반유래 callus는 낙동벼로부터 유도하였다. 먼저 우량한 종자만을 선별하여 깨지지 않도록 유의하여 종피를 벗겨낸 후, 70% EtOH로 약 30초 동안 표면을 살균한 후 멸균된 3차 증류수로 잘 씻어주고 약 50분 동안 2% NaOCl로 살균하였다. 이후, 멸균된 3차 증류수로 약 30분 동안 2~3회 헹구어 NaOCl을 완전히 씻어냈다. 멸균시킨 여과지에 종자를 옮겨서 물기를 뺀 후 잘 말려주고 2N6 기본배지 (callus 유도배지-50ml N6 macro elements, 1ml micro elements, 1ml N6 vitamins, 5ml Fe<sub>2</sub>EDTA, 300mg/L casein enzymatic hydrolysate, 500mg/L proline, 500mg/L glutamin, 30g/L sucrose, 2mg/L 2,4-D, 4.0g/L phytagel, pH5.8)에서 6주 이상 암 배양한 callus중에서 지름이 1~2mm인 밀집된 callus만을 선별하여 2N6 기본배지에 3~4일 동안 암 상태에서 배양시켜 callus를 활성화 시켰다.

```

agaagaaaga taaataaccg aaactatttg gagagcattc aggttacatg gttagtccat 060
ggtgctagat attgctatat aatactcaat gcaatgctca atagatataa gtttcaaagc 120
tgtataagaa ttttaggtta gtgtgcaatg taagtgtagc ttcttatagc ttagtgcttt 180
actatcttca caagcacatg ctatagtatt gttccaagat gaaagaataa ttcaccccttg 240
ctaccaactt gcatgatatt atatttgga ataccctatc tcttggtta taatgaaatg 300
tgctgctggg ttataactga ccattggtatt tgagagacct ttgtatagct gaaaccaacg 360
tatatgcgag catggaacaa gagaacaaaa tgcaaggatt tttttatact ggttcatgcc 420
cctggatggg ttaatatcgt gatcatcaaa aaagatatgc ataaaattaa agtaataaat 480
ttgctcataa gaaaccaaaa ccaaagcac atatgtccta acaaaactgc attttgttg 540
tcatgtagca atacaagaga taatatatga cgtggttatg acttattcac tttttgtgac 600
tccaaaatgt agtaggtcta actgattggt taaagtgatg tgcttactgt agaagtttca 660
tcccaaaagc aatcactaaa gcaacacaca acgtatagtc caccttgac gtaattcttt 720
gtggaagata acaagaaggc tcaactgaaa ataaaagcaa agaaaaggat atcaaacaga 780
ccattgtgta tccattgat acttgatgt ctatttatct atccacctt tgtgtacctt 840
actctatct agtgagtcac ttcatatgtg gacattaaca aactctatct taacatctag 900
tcgatcacta ctttacttca ctataaaagg accaacatat atcaccattt ctcacaaaa 960
cattgagttc agtcccacaa aaacatggca

```

그림 바로부터 Glutelin A3 유전자 promoter 서열

Fig. 2-1. Nucleotide sequence of rice glutelin-A3 promoter sequence. Sequence underlined were used as primer set for subcloning into binary vector.

#### 다. 벼 형질전환 및 재 분화

pGA1611:glutelinA<sub>3</sub>:SHT와 pGA1611:prolamin:SHT 재조합 vector로 *Agrobacterium tumefaciens*를 형질전환하고 상기 형질전환 된 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 벼를 형질 전환하였다. 20 $\mu$ g/mL의 hygromycin과 3 $\mu$ g/mL의 tetracycline이 함유된 10ml YEP 배지(10g/L Bacto-tryptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L NaCl)에서 형질전환 된 *Agrobacterium*을 약 17시간동안 28 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 균주의 농도가 600nm에서 OD2.0 정도가 되면 3500rpm으로 7분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리 시켜 상등액은 버리고 침전물은 acetosyringone이 함유된 5ml의 AA-AS배지(AA배지; AA macroelements, N6 micro elements & vitamins, 5mg/L Fe<sub>2</sub>EDTA, 1mg/L 2,4-D, 20g/L sucrose, pH5.5 - 100 $\mu$ M acetosyringone)에 녹였다. 멸균된 petri -dish에 *Agrobacterium*이 녹아있는 5ml의 AA-AS배지를 준비하고, 3~4일 암 상태에서 배양시켜 활성화된 callus를 이 배지에서 30분간 공조 배양하였다. 공조 배양이 끝나면 callus에 남아 있는 과다한 *Agrobacterium*을 줄이기 위해 멸균된 여과지 위에 callus를 옮겨서 물기를 뺀 후 1ml의 AA-AS배지가 함유된 여과지가 깔려있는 2N6-AS배지(2N6 기본배지 - 19.62mg/L aceto- syringone)로 옮겨서 28 $^{\circ}$ C, 암 상태에서 2~3일간 배양하였다. 2~3일간 배양이 끝나면 250mg/L cefotaxime이 함유된 멸균수가 담겨있는 삼각 플라스크에 callus를 옮겨서 2회 정도 약200rpm으로 shaking하면서 callus 표면에 붙어있는 *Agro -bacterium*을 제거해 주었다. 이 후 멸균된 여과지 위로 callus를 옮겨 물기를 제거하고 건조시킨 후 선발 배지인 2N6-CH배지(2N6 기본배지 pH5.2 - 40mg/L hygromycin, 250mg/L cefotaxime)로 callus에 상처를 주지 않으면서 옮겼다. 암 상태에서 배양하면서 2주에 한번씩 2회 정도 새로운 배지로 옮기면서 선발하였다. 이 시기에 형질전환이 이루어진 callus들은 분열하면서 살아나며 그렇지 않은 것들은 갈변하고 죽게 된다. 선발과정에서 살아남은 callus를 떼어내어 잎 성장 재분화 배지인 2N6-BN배지(4.4g/L MS salts & vitamins(Murachige & skoog), 2g/L casamino acid, 30g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 2mg/L BAP, 1mg/L NAA, 40mg/L hygromycin, 250mg/L cefotaxime, 4g/L phytigel, pH5.8)으로 옮겨 빛에서 배양시켰다. 약 2주에 한번씩 새 배지로 옮겨주며 약 한달 후에는 엽록소가 생성되며 잎이 자란다. 잎이 생성되면 그 개체만을 성장점이 잘려나가지 않도록 유의하며 떼어내어 뿌리 성장 재 분화 배지인 2N6-Rooting배지(4.4g/L MS salts & vitamins (Murachige & skoog), 2g/L casamino acid, 30g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 4g/L phytigel, pH5.8)에서 배양하여 뿌리를 유도시



켰다. 약 1주 후 뿌리가 왕성하게 유도된 개체들을 뿌리에 묻어있는 배지를 잘 제거한 후 수도용 상토를 담은 포트에 이식하여 포장에 이양할 때까지 성장시켰다.

#### 라. Genomic DNA 분리 및 Southern 분석

형질 전환 벼의 T<sub>1</sub>세대(glutelinA<sub>3</sub>:SHT)와 T<sub>0</sub>세대(prolamin:SHT)의 잎 0.1g을 액체질소에 담아 곱게 마쇄하여 gDNA 추출 완충액(1M Tris-HCl pH8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, 0.16% β-mercaptoethanol) 500μl에 담아 잘 섞어준 후 20% SDS를 33.3μl 첨가하여 2시간동안 37°C에 방치하였다. 5M potassium acetate를 166μl 첨가하여 잘 혼합한 뒤 30분간 4°C에 방치하였다. 4°C에서 13,500rpm으로 15분간 원심 분리하여 상등액을 새로운 E-tube에 옮기고 700μl isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 뒤 -80°C에 15분간 방치한다. 4°C에서 13,500rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액은 버리고 500μl 70% EtOH을 첨가하여 동일한 속도로 3분간 원심분리 하여 상등액을 버리고 EtOH을 잘 건조시킨 후 침전물을 1×TE 완충액이나 멸균된 3차 증류수에 녹였다. 정량하여 10μg의 gDNA를 *Hind* III 제한효소(invitrogen)로 절단한 뒤 0.8% 아가로스 겔에 분리한 후 모세관 현상을 이용하여 nylon membrane (Hybond -XL, Amersham Pharmacia Biotech)에 전이한 다음 UV-crosslinker로 고정하여 Prime It<sup>®</sup> II Kit(Stratagene)를 이용, 고추 SHT insert를 dCTP-P<sup>32</sup>로 표지한 후 hybridization 용액에서 반응시켜 0.1×SSC 용액으로 수세하고 Phosphoimage analyzer로 분석하였다.

#### 마. Total RNA 분리 및 reverse transcriptase PCR, Northern blot 분석

포장에서 완전히 성숙되어 수확한 후 건조시킨 glutelinA<sub>3</sub>:SHT 형질전환 벼 T<sub>2</sub>종자를 껍질을 벗긴 후 하루 동안 물을 흡수하게 하여 액체질소에 담아서 곱게 빻은 후 TRI<sup>®</sup> reagent 1ml당 시료 0.1g을 혼합하여 상온에서 약 5분간 방치한 후 4°C에서 13,500rpm으로 10분간 원심분리 시켜 상등액만을 0.2ml의 chloroform과 혼합하여 상온에서 10분간 방치한 후 다시 원심분리 하였다. 이 후 용액 부분만을 새로운 튜브에 옮겨 0.5ml의 isopropanol과 잘 섞은 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 원심분리 하여 침전물을 DEPC water에 녹여 total RNA를 분리 하였다. 분리한 2μg의 total RNA를 Random primer, 10mM dNTP, DEPC water 와 혼합하여 80°C에 3분, ice에 10분간 둔 후 10×RT buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M DTT, RNase

inhibitor를 첨가하여 25°C에 2분간 두고 역전사 효소(Invitrogen)를 첨가한 후 25°C에 10분, 42°C에 1시간동안 반응시켜 상보적 DNA(complementaryDNA)를 합성하였다. 이 cDNA를 각각 SHT gene은 전방 G0703(5'-TATCAAGCTTCCATGGCTTCTGCTCCTCAA-3'), 후방 G1217 (5'-TCAAAGCTTACAGCTTCCTGCACCATT-3') primers를 이용하여, control로써 rice 18S gene은 전방 F0704(5'-GCAGGGACGGGAA ACATG-3'), 후방 F0703(5'-ATGGCCGTTCTTAGTTCA-3') primers를 이용하여 PCR을 수행하였다(94°C 2분, 94°C 30초, 50°C 30초, 72°C 1분, 70°C 10분 30cycle PCR).

출수 후 10~15일 된 prolamin:SHT 형질전환 벼 T<sub>1</sub>종자를 액체질소에 담아 곱게 마쇄하고 glutelinA<sub>3</sub>:SHT T<sub>2</sub>형질전환 벼 종자와 동일한 방법으로 total RNA를 분리한 후 20 µg을 취하여 EtOH로 침전 시킨 다음 6.5% formaldehyde와 50% formamide가 함유된 10×Mops 완충액과 혼합하여 변성시켰다. 변성된 시료를 1.9% formaldehyde가 포함된 1×Mops 완충액이 담긴 전기영동 kit에서 0.8% formaldehyde agarose gel을 통해 total RNA를 분리하였다. 25mM sodium phosphate로 두 번 gel을 세척한 후 모세관 현상을 이용하여 nylon membrane (Hybond -XL, Amersham Pharmacia Biotech)에 전이한 다음 UV -cross linker로 고정하여 Prime It<sup>®</sup> II Kit(Stratagene)를 이용, 고추 SHT insert를 dCTP-P<sup>32</sup>로 표지한 후 hybridization 용액에서 반응시켜 0.1×SSC 용액으로 수세하고 Phosphoimage analyzer로 분석하였다.

#### 바. Western blot 분석

출수 후 10~15일된 형질전환 벼 종자를 액체질소에 담아 곱게 마쇄하여 0.2g을 균질화 완충용액(60mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 4% 2-mercapto ethanol, 15% glycerol) 0.8ml에 균질화하고 12,000rpm으로 원심분리 한 다음 상등액을 Western 분석의 단백질 시료로 사용하였다. 30µg 단백질 시료는 11% SDS-PAGE에서 분리시킨 후 PVDF membrane (Osmoics Inc.)에 전이시켜 SHT polyclonal 항체와 면역반응 시키고 2차 항체 반응과 밴드의 감지는 Western Blot Kit (Boehringer Mannheim)를 사용하여 수행하였다.

#### 사. SHT 효소 활성 측정

출수 후 10~15일된 형질전환 벼 종자를 액체질소에 담아 곱게 마쇄하여 0.25g을 균질

화 완충용액(100mM sodium phosphate buffer pH7.5, 14.4 mM mercaptoethanol) 1ml에 넣어 4°C에서 균질화하고 동일한 온도에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 다음 상등액을 효소활성 측정의 sample로 사용하였다. 상등액의 10 $\mu$ l를 1mM의 Feruloyl-coA 10 $\mu$ l, 10mM의 serotonin 10 $\mu$ l, 100mM Tris-HCl buffer(pH8.5) 70 $\mu$ l에 첨가하여 30°C에서 10분 동안 반응 시키고 혼합물에 Methanol을 첨가하여 500 $\mu$ l로 맞춘 후 10 $\mu$ l를 HPLC (Waters2695)로 분석하였다. 10 $\mu$ l sample 주입 후 HPLC조건은 33% methanol을 Nova-Pak<sup>®</sup> C18 4 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm cartridge column에 통과시켜 Waters 2487 UV detector를 이용하여  $\lambda$ 320에서 feruloylserotonin을 검출한 후 검출량을 계산하였다.

계산법 :  $\text{sample area} \times \text{standard량(ng)} / \text{standard area} \times \text{희석배수} \times 1000$  (단위환산 : ng $\rightarrow$ pg) /  $\text{reaction time(sec.)} / \text{serotonin유도체 Mw} / \text{protein content (mg/10}\mu\text{l)}$

#### 아. 종자 내 serotonin 유도체 함량 분석

포장에서 완전히 성숙되어 수확한 후 건조시킨 형질전환 벼 종자를 껍질을 벗긴 후 0.25g을 곱게 마쇄하고 1.5ml MeOH을 첨가하여 균질화한 다음 1.5ml의 MeOH를 더 첨가하여 10,000g로 원심분리한 후 상등액을 보관해 놓고 침전물에 3ml의 MeOH를 더 첨가하여 다시 10,000g로 원심분리한 후 상등액을 이전 상등액과 합하여 두었다. 총 6ml의 상등액에 1.5ml의 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 이 sample을 80% MeOH로 pre-equilibration시킨 C18 cartridge(Waters)에 통과시킨 후 이를 증발 시킨 다음 2ml의 H<sub>2</sub>O에 녹였다. 이 sample을 H<sub>2</sub>O로 pre-equilibration시킨 C18 cartridge(Waters)에 통과시키고 20% MeOH를 통과시켜 cartridge를 씻어준 후 최종 50% MeOH를 통과시켜 이 sample을 받아 증발시키고 200 $\mu$ l의 MeOH에 녹였다. MeOH에 녹아있는 sample에 6ml의 CHCl<sub>3</sub>을 첨가하여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=30:1로 pre-equilibration시킨 Silica cartridge(Waters)에 통과시키고 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=20:1로 cartridge를 다시 통과시킨 후에 이 sample들을 합하여 증발시켜 100 $\mu$ l MeOH에 녹인 후 10 $\mu$ l를 HPLC(Waters2695)로 분석하였다. 10 $\mu$ l sample 주입 후 HPLC조건은 33% Methanol을 Nova-Pak<sup>®</sup> C18 4 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm cartridge column에 통과시켜 Waters2487 UV detector를 이용하여  $\lambda$ 320에서 feruloylserotonin 및 4-coumaroylserotonin을 검출한 후 검출량을 계산하였다.

계산법 :  $\text{sample area} \times \text{standard량(ng)} / \text{standard area} \times \text{희석배수} / \text{균질화한 sample}$   
 $\text{량(g)} \times \text{소실률}$

### 자. T<sub>1</sub> 형질전환체 종자의 유전력 검정

외래 유전자가 도입된 자가수분 된 벼에서 T<sub>1</sub>세대에서의 유전자 전이 유무와 후대 발아 분리비를 알아보기 위해 Hygromycin 선발배지에서 유전자의 삽입여부와 삽입 Loci를 검정하였다. T<sub>1</sub> 종자의 종피를 제거한 후 캘루스를 유도할 때 사용하였던 방법과 동일하게 70% 에탄올과 2% NaOCl로 표면 살균하였다. 이 후 50 mg/l hygromycin이 함유된 half-strength MS배지에 표면 살균된 종자를 치상하여 약 10일동안 암배양하여 종자의 발아유무를 검정하여 저항성인 종자와 감수성인 종자의 분리비를 살펴보았다.

## 3. 연구 수행 결과

### 가. Glutelin 프로모터를 이용한 SHT 유전자 발현 벼의 형질전환

벼 형질전환을 위한 binary vector 벡터의 제조는 다음과 같이 하였다. 벼의 형질전환에 사용하기 위한 벼 glutelin promoter와 고추 SHT 유전자를 포함하는 벡터를 제조하였다. pBluescript에 함유된 벼 glutelin promoter(포항공대 우영민 교수 제공)의 유전자 서열을 아래 그림 2-5에 도시하였다. 벼 Glutelin promoter 유전자를 *Bam*HI 과 *Hind*III 제한 효소 부위를 함유하는 전방(F1117; 5'-AGTGGATCCAGAAGAAAGATAATAACC-3') 및 후방(F1118; 5'-GATAAGCTTAATGCTTTTGTGAGAAAT-3') primers를 제작하여, 유전자 증폭시킨 후, pBluescript cloning 벡터에 삽입하여, 유전자의 서열과 primers 부위에 염기서열상 문제가 있는지 조사한 후, DE81 paper를 이용하여 *Bam*HI과 *Hind*III 제한 효소부위를 함유하는 960 bp 정도의 glutelin promoter insert를 정제하였다.

또한 SHT 유전자를 제한 효소 *Hind*III 및 *Kpn*I를 함유한 전방(B1109; 5'-ATCAAGCTTATGGCTTCTGCTCCTCAA-3') 및 후방(B1110; 5'-GTGGAGCTCCTAACAGCTTCCTGCACC-3') primers를 이용하여 DNA를 증폭하고, 증폭된 SHT DNA를 pBluescript의 *Sma*I 부위에 subcloning하여 유전자서열의 변화가 없음을 확인 후, DE81 paper를 이용하여 *Hind*III 및 *Kpn*I insert를 정제하였다.

Binary vector에 클로닝하기 위해 pGA1611 vector(포항공대 안진홍 교수로부터분양)를 사용하였으며, maize ubiquitin promoter를 제거하기 위해 *Bam*HI과 *Kpn*I으로 절단하였다. *Bam*HI 과 *Kpn*I으로 절단한 pGA1611 vector에 앞에서 정제한 Glutelin promoter와 SHT 유전자를 동시에 결합(ligation)함으로써 pGA1611:Glu:SHT 유전자 구조물을 작제하였다(그림 2-1).

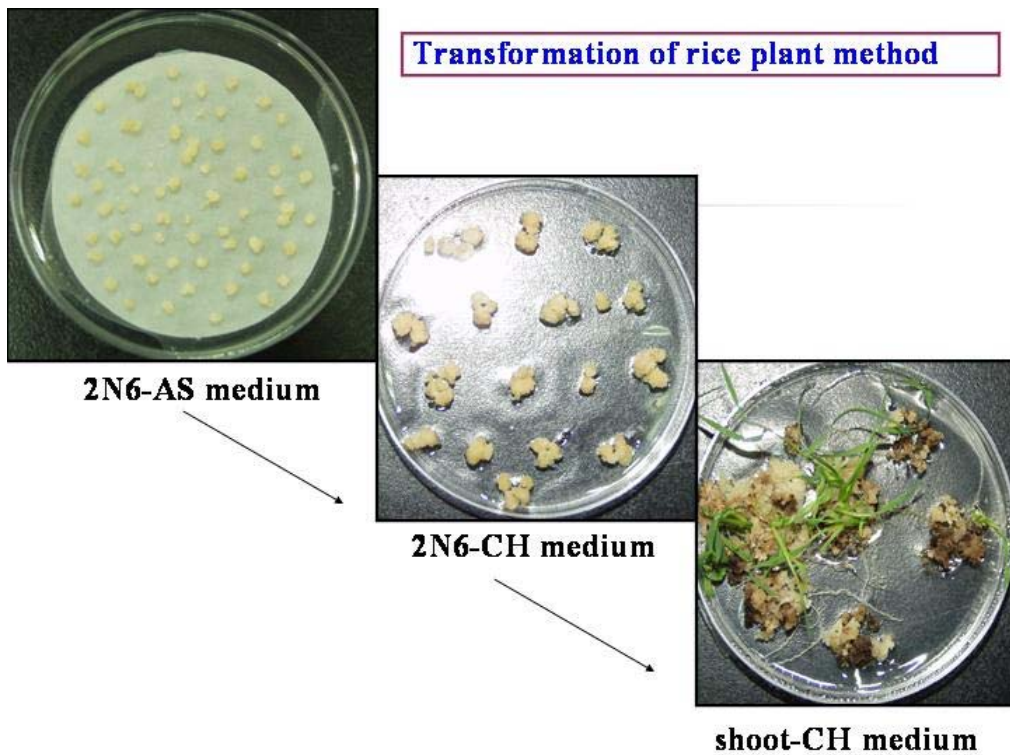
벼 형질전환 및 재분화는 다음과 같다. pGA1611:Glu:SHT 재조합 벡터로 아그로박테리움 속 미생물을 형질전환하고 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 벼를 형질전환하였다. 형질전환을 위해 사용한 벼의 캘러스(callus)는 N6 배지(Rashid et al., 1996; Hiei et al., 1997)에서 과중된 벼의 배반(품종: 동진)으로부터 유도하였다. 3 내지 4 주령의 밀집된 벼의 캘러스를 상기 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404 현탁액 중에 3분 동안 침적시키고, 이후, 멸균 여과지를 현탁액에 접촉시켜 현탁액을 흡수 및 건조시킴으로써 과량의 균체를 현탁액에서 제거하였다. 이후, 현탁액 중의 캘러스를 공조배양 배지로 옮기고, 25°C의 암실에서 2일 내지 3일 동안 공조 배양시켰다. 공조 배양된 캘러스를 세포탁심(Cefotaxime) 250mg/L가 함유된 멸균수로 세척하여 잔존 세균을 제거하고, 세균이 제거된 캘러스를 세포탁심(Cefotaxime) 250mg/L 및 하이그로마이신 50mg/L을 포함하는 N6 배지로 옮겨 배양하였다. 3주 내지 4주 동안의 배양 과정 중에 선별된 캘러스들을 잎 및 뿌리 성장용 재분화 배지로 옮겨 배양시켰다(그림 2-2). 십수 여종의 independent 형질전환 lines을 획득하였으며, 5월 말 정식 이양시에 T<sub>0</sub> 개체를 이양하여 종자를 획득하였다.

#### 나. Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환벼체의 분자적 검정 : 형질전환체로부터 genomic Southern blot 분석

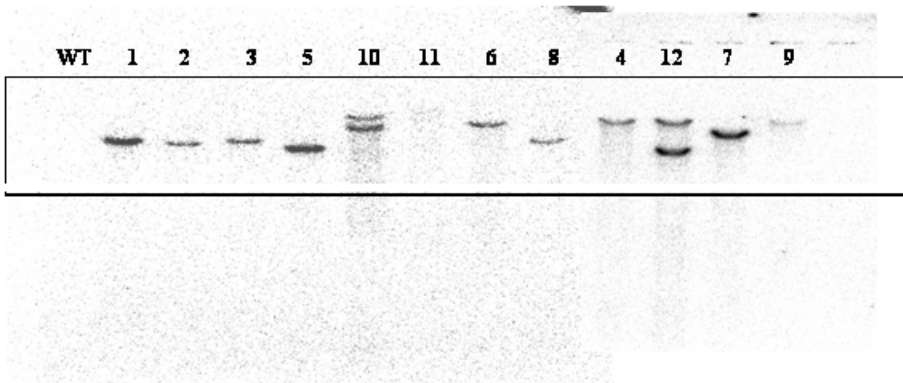
기내에서 hygromycin 저항성 벼 유묘를 온실에서 순화하여, 포장에 심은 independent line 20여종의 식물체 중 총 12 line의 식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot을 수행한 결과 11개의 식물체에 SHT 유전자가 삽입되었음을 알 수 있었다(그림 2-3). Line 11번은 유전자 삽입이 동정되지 않았으므로 더 이상 실험에 사용하지 않았다. 삽입이 확인된 11종의 독립 lines 중에서 line 10번과 line 12번에서 2 copy의 유전자가 삽입되어 있음을 확인 하였고, 그 외 9종의 independent lines들에서는 모두 1 copy의 유전자가 삽입되었음이 확인되었다. 추후 Southern blot에서 1 copy로 확인된 9 lines만을 포장에서 재배하여 실험들을 수행하였다.



**Fig. 2-1.** Schematic diagram of binary vector pGA1611 harboring SHT gene under the control of rice glutelin A3 promoter



**Fig. 2-2.** Generation of transgenic rice from scutellum derived calli. Upper photo shows coculture stage, middle denotes selection from CH medium supplemented with 50 mg/l hygromycin. Lower represents shoot regeneration from hygromycin resistant calli.



**Fig. 2-3.** Genomic Southern blot analysis. T<sub>0</sub> transgenic rice leaves were used for extracting genomic DNA as described in materials and method. WT; Untransformed rice, 1-12; Transformed rice plants.

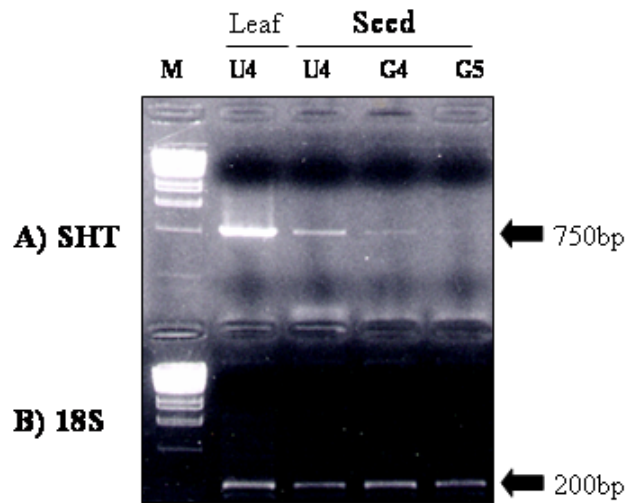


#### 다. Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환벼체의 분자적 검정 : 형질전환체로부터 Northern blot 분석, RT-PCR 분석

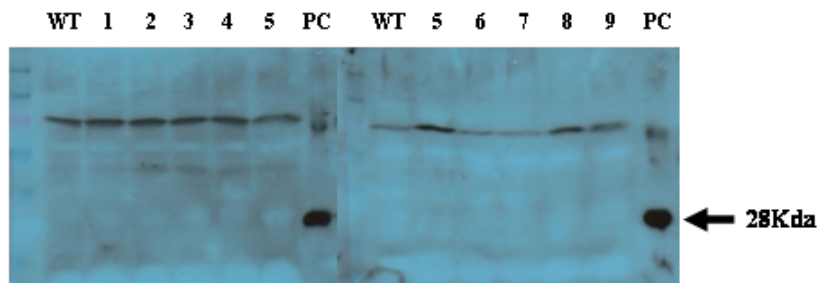
Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 미숙배유(immature endosperm)로부터 total RNA를 추출하여, northern blot 분석을 수행하였다. SHT mRNA의 발현을 배유에서 보고자 수번 northern blot를 수행하였으나, 검출되지 않았다. 따라서 T<sub>2</sub> 성숙배유에서 total RNA를 추출하여, reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다(그림 2-4). Wild type에서 추출한 RNA에서는 PCR 생성물이 검출되지 않았으나, 형질전환 line 4 및 line 5에서 추출한 RNA에서는 SHT 유전자의 PCR 산물이 검출됨을 알 수 있었다. Positive control로서, ubiquitin:SHT 발현 형질전환체의 잎과 배유에서 추출한 RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다. 잎에서는 가장 많은 PCR 산물이 정량되었고, 배유에서는 1/10수준의 PCR 산물이 정량되었다. 잎과 배유의 PCR 산물의 절대량차이는 total RNA에 발현되는 SHT mRNA의 발현과 상관관계가 있는 것으로 보여진다. 이에 비해 glutelin:SHT발현 형질전환체의 배유에서 검출된 RT-PCR 생성물(line 5)은 ubiquitin:SHT의 배유에서 검정된 RT-PCR 생성물에 비해 1/10의 수준으로 RT-PCR 생성물이 생성되는 것으로 보아, glutelin:SHT 형질전환체의 배유에서 미미한 정도의 SHT mRNA가 발현되고 있음을 시사한다. Line 4의 경우는 line 5에 비해 더욱 적은 양으로 발현됨을 알 수 있다. 비록 적은 양으로 발현되지만, SHT mRNA가 배유에서 생합성됨을 시사한다.

#### 라. Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환벼체의 Western blot 분석

T<sub>2</sub> 형질전환체의 수정 후 17일째 되는 배유로부터 단백질을 대조구와 형질전환체로부터 추출하여 배유에서 SHT 단백질이 발현되는지를 Western blot 분석으로 검사하였다(그림 2-5). 9개의 형질전환벼로(T<sub>2</sub>)의 종자으로부터 단백질을 추출하고, SHT 항체를 이용하여 Western blot 결과 SHT 단백질 크기인 28 Kda 부위에서 아무런 밴드도 검출되지 않았다. 수번의 반복 실험을 실행하였으나 동일한 결과를 얻었고 또 다른 그림에서는 28 Kda 크기에 밴드가 아주 미약하게나마 보이기는 하나 너무 미약하여 SHT 단백질인지 확신할 수 없었다. 이러한 결과는 종자배유내의 SHT mRNA 발현량이 매우 적은 것과 상관관계가 있는 것으로 보여진다.



**Fig. 2-4.** RT-PCR analysis from glutelin:SHT expressing T2 transgenic rice endosperm. Total RNAs isolated from T2 plants were used as templates for RT-PCR. WT; Untransformed rice, U4; Transgenic rice expressing ubiquitin:SHT gene construct, G4-G5; Transgenic rice plants expressing glutelin:SHT gene construct.



**Fig. 2-5.** Immunoblot analysis of transgenic rice plants ( $T_2$ ) expressing glutelin:SHT. Proteins were extracted from seeds of transgenic and wild type and incubated with SHT antibodies. WT: Nontransformed rice, 1-9; Transgenic rice, PC; purified recombinant SHT protein (40 ng).

#### 마. Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환벼체의 SHT 효소활성 검정

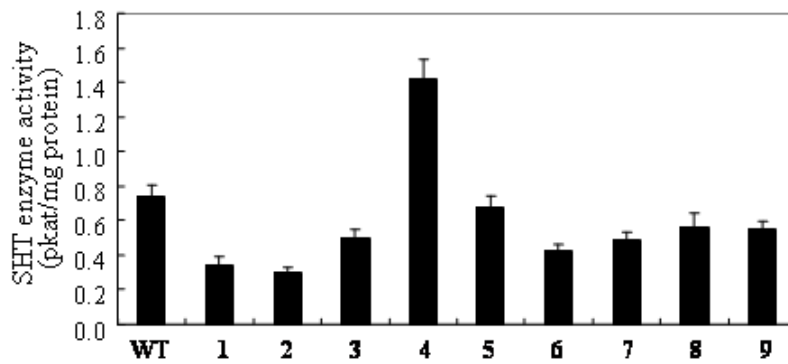
Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 미숙배유(수정 21일째)에서 단백질을 추출하여, SHT 효소 활성을 측정하였다. 검정 결과 4번 line에서만 Wild type보다 2배 이상의 조금 높은 SHT 효소활성을 보였으나 그 외의 전 lines에서는 Wild type보다 낮거나 비슷한 수준의 활성을 보였다(그림 2-6). 이는 SHT 유전자가 mRNA level이 매우 낮고, SHT mRNA에서 translation된 SHT 단백질량이 매우 적어, 효소활성 측정의 수준까지 검출되지 않음으로 사료된다. 다행이도 line 4에서는 2배 이상 높은 효소활성이 나타났으며, 이는 RT-PCR 결과와 비슷한 맥락에서 설명되어 질수 있는 것으로 사료된다.

#### 바. Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환종자의 functional loci 검정

Glu:SHT T<sub>1</sub> 종자의 기능적 copy 수를 검정하기 위하여 30여개의 T<sub>1</sub> 종자를 이용하여 hygromycin 저항성 발아 검정을 실시하였다. 50mg/L의 Hygromycin이 함유되어 있는 물에 담귀 발아 유무를 확인한 결과 line 4 와 12를 제외한 모든 line에서 hygromycin 저항성:감수성 비율이 3:1 로 나타나 기능적으로 single dominant gene 삽입에 의해 유전됨을 확인하였다. Line 4 와 12는 서로 다른 게놈위치에 삽입되었음을 보여 주며 2 loci 이상에 삽입되어 유전됨을 확인할 수 있다. 특히 line 4의 경우 southern blot 분석에서는 1 copy 만 나타났으나, hygromycin test에서는 두 개 이상의 loci 에 삽입되었음을 나타냄으로 southern blot에서 나타나지 않은 다른 band가 있음을 제시한다. Line 12의 경우는 southern blot 결과와 일치한다. Line 10 의 경우 southern blot 분석에서는 2 copy로 보여 주었으나, hygromycin 검정에서 1개의 유전자로 분리되어 저항성을 보이기에 두개의 유전자가 가까이 삽입되어 있음을 알 수 있다(표 2-1).

#### 사. Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 종자내의 세로토닌유도체 (p-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin) 함량의 정량

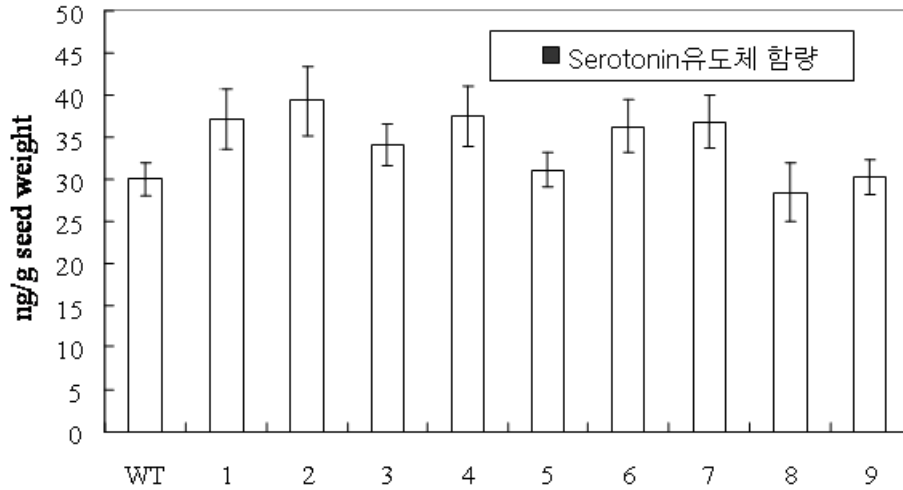
SHT gene이 형질전환되어있는 T<sub>2</sub> transgenic의 종피를 벗기고 HPLC 기기를 이용하여 serotonin유도체의 함량을 측정하였다(그림 2-7). 형질전환하지 않은 대조구 wild type에서는 종자 g당 30 ng의 아주 적은 량의 serotonin유도체가 검출되었다. 반대로 transgenic



**Fig. 2-6.** SHT enzyme activity of transgenic and wild type rice. Proteins were extracted from seeds of both transgenic and wild type rice and assayed with feruloyl-CoA as a substrate. WT: Nontransformed rice, 1-9; Transgenic rice.

☒ 2-1. Ratio of hygromycin resistance verse susceptible seeds grown 50 mg/l antibiotic hygromycin.

lines	Resistant	Susceptible	copy number
1	22	8	1
2	20	10	1
3	21	9	1
4	30	0	>2
5	26	4	1
6	20	10	1
7	24	6	1
8	20	10	1
9	23	7	1
10	20	10	1
11	19	11	1
12	29	1	>2



**Fig. 2-7.** Quantification of serotonin derivatives from wild type and T2 transgenic rice seeds. Seeds were extracted with methanol as describes in Materials and methods and subjected to HPLC analysis. The content of serotonin derivatives denotes the sum of 4-coumaroylserotonin and feruloylserotonin. WT: Nontransformed rice, 1-9; Transgenic rice.

종자에서는 wild type보다 10-25% 정도의 더 높은 함량을 보여 주었다. 형질전환변에서 정량한 종자의 총 serotonin유도체(쿠마로일세로토닌(CS)+페루로일세로토닌(FS))의 함량은 종자 g당 28-40 ng 사이에 분포하였다. 형질전환변 1, 2, 4, 6, 7 lines에서 가장 많은 량이 검출되었지만 ubiquitin promoter:SHT 발현 T<sub>4</sub> 종자의 평균 세로토닌유도체 함량 274 ng/g에 비해 적은량으로 축적됨을 확인하였다. Glutelin:SHT 발현 형질전환변이 ubiquitin:SHT 형질전환변에 비해 낮은 함량의 세로토닌유도체 함량을 보이는 것은 배유내에서 SHT 단백질 및 mRNA 발현이 ubiquitin:SHT line 보다 미미하여서 인지, 아니면 종자내에 아민기질의 결핍에 따른 생합성 결핍인지는 지금으로서는 알 수 없는 실정이다. 따라서 glutelin promoter 보다 발현이 높은 것으로 알려진 prolamin promoter:SHT 발현 형질전환변을 현재 형질전환하고 있으며, prolamin:SHT 형질전환변에서 종자내의 SHT 유전자가 glutelin:SHT 보다 많이 발현되는지를 확인 한 후, 배유내의 SHT 발현 강도에 따른 세로토닌유도체 함량의 변화가 상관관계가 조사함으로 추후 세로토닌유도체 고함량 생산 변을 획득하는 결정적인 자료를 제시하게 될 것으로 사료된다.

#### 아. 세로토닌유도체 합성의 rate limiting 효소 규명 및 serotonin 함량측정

세로토닌유도체 생합성의 rate limiting 되는 기질은 serotonin 이다. 세로토닌은 아미노산 tryptophan이 tryptophan decarboxylase(TDC)에 의해 tryptamine이 되고, tryptamine은 tryptamine 5-hydroxylase(TH)에 의해 serotonin이 생합성된다. 따라서 serotonin 생합성 경로에서 bottleneck이 되는 효소가 무엇인지를 찾기 위해 TDC 및 TH 효소활성을 벼의 부위별로 측정하였다. TDC 효소활성은 벼의 전 부위에서 매우 낮게 검출되며, 특히 잎, 줄기, 종자외피(hull) 및 종자에서는 TDC 효소활성이 아주 미미하였다. 그러나 뿌리 부분에서는 TDC 활성이 기타부위에 비해 18배 이상 높아, TDC 활성은 주로 뿌리에 있는 것으로 나타났다(표 2-2). Ueno et al. (2003) 등의 보고에 의하면 벼에서 TDC 효소활성이 잎과 줄기에 거의 검출되지 않고, sl mutant line에서 병원균과 빛을 처리하였을 때만 효소활성이 검출된다는 보고와 일치한다. 그러나 TDC 활성이 뿌리에 constitutive 하게 발현된다는 보고는 본 연구진이 처음으로 제시하였다. TDC 발현이 뿌리에 존재하는 이유와 생리적인 역할은 추후 연구되어야 될 것으로 보인다. Serotonin 생합성의 마지막 효소인 tryptamine hydroxylase(TH)의 효소활성을 처음으로 측정하여 본 결과 벼의 전부위에 미약하게 발현되는 것으로 보이며, TDC 효소활성과 마찬가지로 뿌리에 집중적으로 발현되



**Table 2-2.** Serotonin contents and corresponding enzyme's activities in various rice tissues.

표 1 부위별 세로토닌 함량 및 관련효소 활성 측정

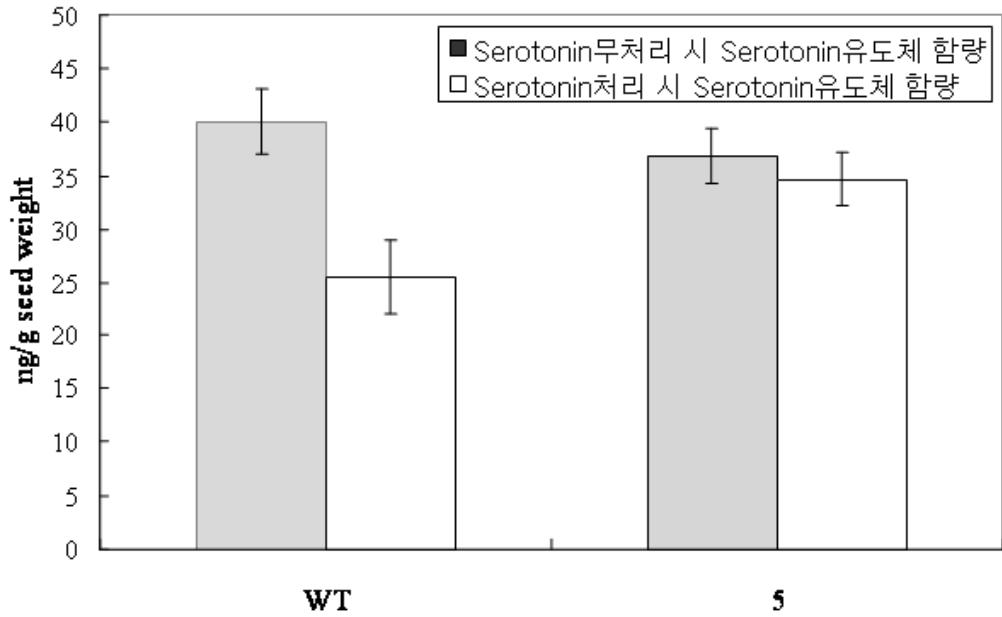
	Serotonin	Tryptophan decarboxylase	Tryptamine hydroxylase
	ng g <sup>-1</sup> f.w.	pkat mg <sup>-1</sup> protein	
Leaf	235 ± 35	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Stem	314 ± 15	0.06 ± 0.02	0.21 ± 0.08
Root	3535 ± 350	0.54 ± 0.03	3.41 ± 0.23
Hull	3036 ± 280	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Seed	153 ± 14	0.02 ± 0.01	0.17 ± 0.03

고 있음을 확인하였다. 이는 serotonin 생합성의 중심이 뿌리에 존재하고 있음을 시사하며 TDC와 TH의 효소활성이 서로 긴밀히 연관되어 있음을 시사하며, 이에 대한 생리적인 역할은 추후 식물에서 serotonin 생합성 경로에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 보여진다. 마지막으로 TDC 및 TH 효소활성이 뿌리에 있는 것이 serotonin 생합성량과 상관이 있는지를 조사하기 위하여 벼 내에서 serotonin 양을 정량하였다. 가장 많이 존재하고 있는 곳이 뿌리로서 g 생체중당 3.5  $\mu\text{g}$  정도로 측정되었으며, 그 다음으로는 뿌리와 비슷한 양으로 존재하는 곳이 g 생체중으로 3.0  $\mu\text{g}$  이 되는 hull 부분이었다. 그 외 잎, 줄기, 종자에는 각 각 235, 314, 153  $\mu\text{g}$  정도의 serotonin 함량이 존재함을 HPLC로 확인하였다. 재미있는 점은 TDC 및 TH 효소활성이 매우 적은 hull 부위에 serotonin 이 뿌리와 비슷한 수준으로 존재하는 점이다. 아마도 hull에 존재하는 serotonin은 생육후반기에 뿌리에서 생합성된 serotonin이 hull 부위로 이동하는 것으로 추정되며, 이는 대조구에서 세로토닌유도체가 생육 상반기에서의 잎에서는 관찰되지 않지만 생육후반기의 잎에서는 관찰되는 맥락과 일치한다. 세로토닌유도체를 생합성하는 SHT, TDC 및 TH 효소가 모두 뿌리에 존재 함에도 불구하고 생육후반기의 잎에 검출되는 것은 뿌리에서 합성된 세로토닌유도체가 잎으로 이동한다는 사실을 뒷받침한다. 생육 후반기의 세로토닌유도체 및 세로토닌의 정확한 이동기작은 아직은 알 수 없지만, 많은 종류의 2차대사물질이 뿌리에서 합성되어 잎 및 종자로 이동하는 것으로 알려져 있으며 대표적인 화합물로서 담배의 nicotine을 예로 들 수 있다(Wink & Roberts, 1998).

#### 자. Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환종자의 기질처리에 따른 세로토닌유도체 함량측정

Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환체에 기질인 serotonin을 처리하였을 때 세로토닌유도체 함량의 변화가 있는지 조사하였다(그림 2-8).

형질전환하지 않은 대조구와 Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환체에 5mM serotonin을 출수기 후 10일째 되던 날부터 이틀간격으로 3번 종자에 처리하였다. 그 후 종자를 수확하여 종자 내의 세로토닌유도체 함량을 측정한 결과 세로토닌 처리에 따른 세로토닌유도체 함량의 증대효과는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 glutelin promoter에 의한 SHT 발현이 저조하여 세로토닌을 종자에 처리하여도 기질을 이용할 SHT 효소가 너무 적게 발현되어서 일어난 현상인지 혹은 또 다른 생화학적인 저해요인이 있어서 인지는 추후 prolamin:SHT 형질전환체의 분석을 기다려 보아야 할 것으로 생각된다.



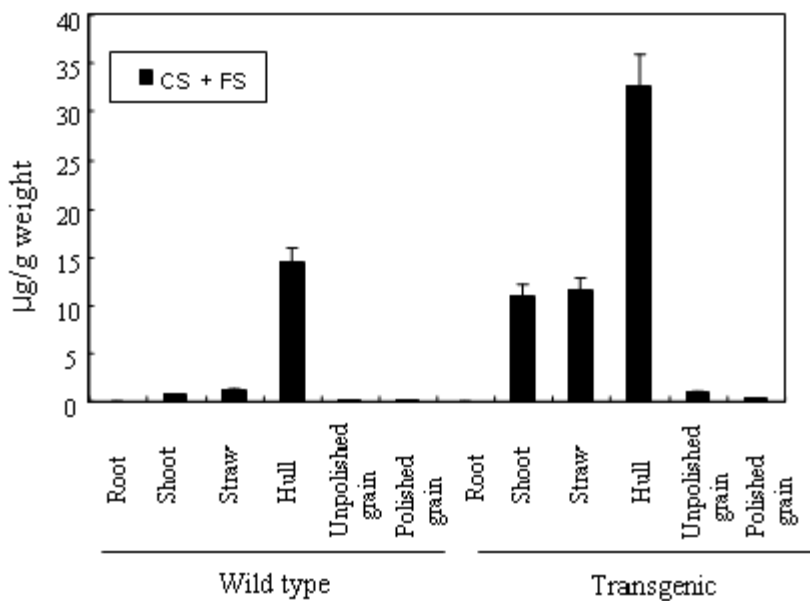
**Fig. 2-8.** Seed serotonin derivatives contents. Serotonin was treated with 1 mM concentration after anthesis. After 1 month, seed were harvested and quantified the levels of serotonin derivatives by using HPLC. WT; Nontransgenic rice seed, 5; transgenic rice; serotonin derivatives, 4-coumaroylserotonin plus feruloylserotonin.

#### 차. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환체의 배유 및 쌀겨(bran) 포함 부위별 세로토닌 유도체 함량분석

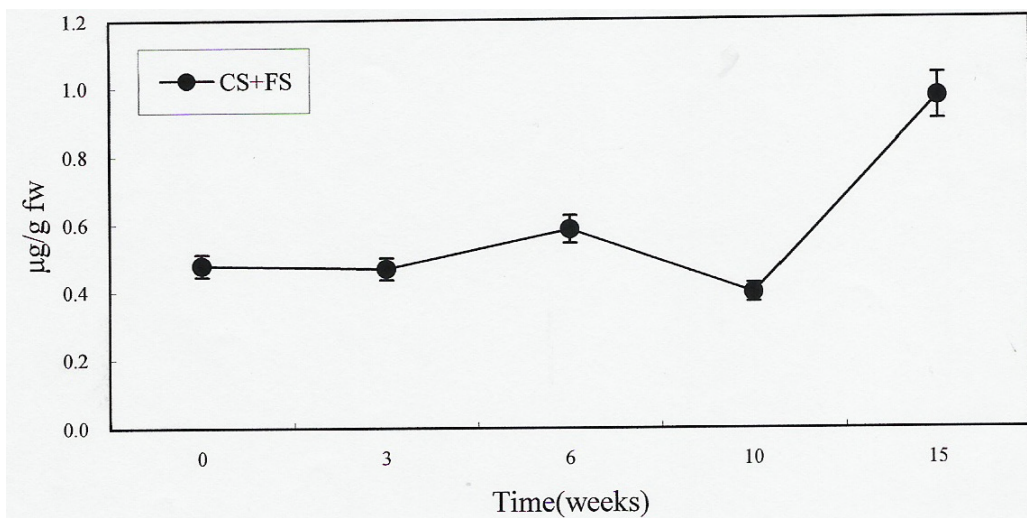
Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환체에서 세로토닌유도체의 함량을 부위별로 정량하여 보았다. 유묘의 경우, tyramine 혹은 serotonin 기질을 처리하지 않을 경우, 세로토닌유도체 함량이 대조구 및 형질전환체 모두 검출되지 않았다(그림 2-9). 그러나 대조구와 형질전환체를 특별한 기질처리 없이 포장에서 키운 후, 출수 30일 경의 shoot를 채취하여 세로토닌 유도체 함량을 조사한 결과 대조구에서 1.2 µg(g 생체중) 정도의 세로토닌유도체가 검출되었고, 형질전환체에서는 12 µg (g 생체중)이 정량되었다. 재미있는 것은 대조구의 경우, 종피(hull)에서 상당히 많은 양의 세로토닌유도체 함량이 정량되었으며, 무려 15 µg(g 건물중) 정도였다. 대조구의 hull에서 높은 함량은 형질전환체에서도 33 µg(g 건물중) 정도의 최고 높은 함량으로 축적되는 것을 알 수 있었다(그림 7). 그 외 벚짚에서도 대조구에서는 2 µg(g 건물중)이 형질전환체에서는 10 µg(g 건물중)이 측정되었고, 현미에서는 형질전환체에서 0.7 µg(g 건물중)정도가 측정되었고, 백미에서는 현미의 10% 정도만이 있는 것으로 나타났다. 대조구의 현미에서는 형질전환체의 백미에서 정량되는 수준의 세로토닌유도체 함량이 측정되었다. 부위별 세로토닌유도체 함량을 측정한 본 결과로부터 두 가지 사실을 발견할 수 있다. 첫째는 유묘 및 출수전에는 대조구 및 형질전환체에서 세로토닌유도체 함량이 앞에서 거의 검출되지 않았지만, 출수 이후 앞에서 다량의 세로토닌유도체가 대조구 및 형질전환체에서 검출되어진다는 사실이다. 이는 세로토닌유도체가 앞에서 de novo 합성되든지 아니면 뿌리에서 합성된 세로토닌유도체가 출수 후 어떤 signal에 의해 뿌리에서 앞으로 이동하는 것으로 볼 수 있다. 그러나 출수 후 30-40일경의 앞에서 TDC 활성을 측정한 결과 효소활성이 거의 검출되지 않음을 볼 때 아마도 뿌리에서 세로토닌유도체 생합성된 세로토닌유도체가 출수 후 도관을 통해 이동하는 것으로 사료된다. 둘째는 세로토닌유도체 함량이 hull에서 상당히 많이 검출된다는 사실이다. 비록 hull에서는 TDC 및 TH 효소활성이 basal level로 존재함에도 불구하고 hull에서 세로토닌유도체 함량이 높게 나타나는 이유도 아마 세로토닌 합성처럼 뿌리에서 합성된 세로토닌유도체가 출수 후 hull로 이동하는 것이 아닌가 생각된다.

#### 카. Ubiquitin:SHT T<sub>3</sub> 형질전환체의 기질처리시기별 종자내 세로토닌유도체 함량

기질처리 시기에 따른 종자내 세로토닌유도체 함량의 변화를 측정하기 위해 200 µM cinnamic acid (0.1% MeOH)를 2L 씩 뿌리에 처리하였다(그림 2-10).



**Fig. 2-9.** Quantification of serotonin derivatives in rice tissues expressing ubiquitin:SHT at T<sub>4</sub> generation. CS; 4-coumaroylserotonin, FS; feruloylserotonin.



**Fig. 2-10.** Content of seed serotonin derivatives in transgenic rice of ubiquitin:SHT ( $T_3$ ) challenged with cinnamic acid after transplanting. CS; 4-coumaroylserotonin, FS; feruloylserotonin.

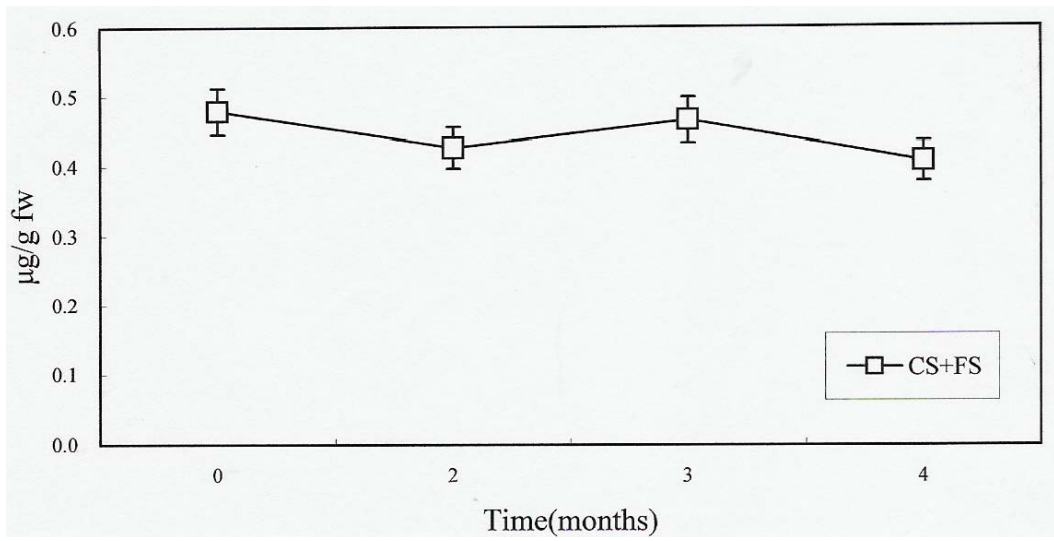
형질전환벼(T14 line)는 30 cm 지름의 무저포트(bottomless pot)에 심었으며, 처리시기는 모내기직후부터 출수 후기까지였다. 모내기 시기인 5월29일부터 출수 전 7월31일까지 cinnamic acid를 처리한 경우, 세로토닌유도체 함량의 변화는 관찰되지 않고 일정하게  $0.5 \mu\text{g}/\text{g}^{-1}$  seed 나타났고, 출수 후 처리시에는  $1.0 \mu\text{g}/\text{g}^{-1}$  seed 정도로 출수전 처리보다 2배 이상 높음을 보였다. 이와같은 현상은 출수 전에는 종자의 저장기관이 형성되지 못한 관계로 기질처리에 의한 세로토닌유도체 함량이 종자로 이동되지 못하고, 출수 후 처리는 뿌리에서 합성된 세로토닌유도체가 종자로 이동되어서 나타나는 현상에 의한 것으로 볼 수 있다. 따라서 ubiquitin:SHT 형질전환벼에서 세로토닌유도체 합성을 높이기 위하여서는 출수 후 기질처리가 효과적인 것으로 나타났다(그림 2-10).

#### 타. Ubiquitin:SHT T<sub>4</sub> 형질전환종자의 저장기간별 종자내 세로토닌유도체 함량

Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환벼를 수확하여 종자의 저장 기간별 세로토닌유도체 함량을 조사해 보았다. 저장기간별 종자내의 세로토닌유도체 함량의 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 종자에 축적된 세로토닌유도체가 다른 물질로 분해되거나 저장중 산화에 의한 분해현상이 일어나지 않음을 보여 주는 것으로 세로토닌유도체가 종자내에서 안정적인 화합물 형태로 있음을 시사한다(그림 2-11).

#### 파. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환낙동 및 동진 계통들의 southern 분석

4개 (낙동벼 2개 라인, 동진벼 2개 라인) T<sub>4</sub> 형질전환 계통벼를 포장에서 재배하여 그들의 생육상태를 측정(협동과제에서 사용된 재료)하기에 앞서의 세대진전에 따른 transgene SHT 유전자가 안정적으로 삽입되어 후대에 전달되고 있는지 조사하기 위하여, southern-blot 분석을 수행하였다(그림 2-12). 아래그림은 제한 효소 *Hind*III로 절단된 낙동벼, 및 동진벼 형질전환 개체의 genomic DNA의 southern-blot 분석 결과이다. 사용된 낙동 2 라인과 동진 2개 라인에서 SHT 벼의 게놈에 안정적으로 삽입되어 있음을 확인 할 수 있었다. SHT 유전자의 낙동벼에 삽입된 copy 수는 초기 T<sub>2</sub> 세대에서 확인된 수와 동일하였다. 추가로 동진벼에 SHT 유전자가 형질전환된 2 라인에서는 모두 2개의 SHT 유전자가 벼의 게놈에 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.



**Fig. 2-11.** Serotonin derivatives of T4 ubiquitin:SHT transgenic rice seeds. CS; 4-coumaroylserotonin, FS; feruloylserotonin.



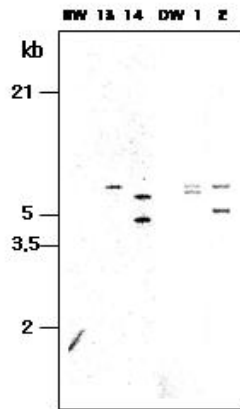


그림7. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 세대에서 낙동 및 동진 형질 전환체의 Southern blot 분석

**Fig. 2-12.** Southern blot analysis at T<sub>4</sub> generation of transgenic rice cv. Dongjin and cv. Nakdong. gDNAs were digested with *Hind*III and separated on agarose gel and blotted to nylon membrane which then hybridized with <sup>32</sup>P labeled SHT probe.

## 제 3 절 Rice prolamine promoter 조절에 의한 SHT 형질전환 벼의 육성 및 세로토닌유도체 함량 분석

### 1. 서 설

SHT 유전자를 벼의 종자에 발현시키기 위하여 사용한 종자특이 promoter인 glutelin A3 promoter는 형질전환벼의 종자에서 SHTmRNA 발현량이 매우 미약하여 RT-PCR 수준에서 발현량을 측정할 정도였다. Northern blot 분석에서 검출되지 않을 정도로 미약하게 발현하였다. 또한 glutelin promoter:SHT 형질전환종자에서 적은 함량으로 동정된 serotonin derivatives의 원인이 SHT 유전자가 충분히 발현되지 않아서 그러한지 조사하기 위하여, glutelin-A3 promoter 보다 발현이 좋은 것으로 알려진(우영민 박사, 포항공대) rice prolamin promoter을 이용하여 SHT 유전자를 벼에 형질전환하기로 하였다. 본 연구로 통해 벼의 종자에 SHT 과다발현이 serotonin 유도체 함량을 증대시킬 수 있는지 알 수 있게 될 것이고, 본 결과로 통해 serotonin derivatives의 벼 곡류축적을 위한 중요한 자료를 획득 할 수 있을 것이다.

### 2. 연구 수행 방법

#### 가. Rice prolamin promoter:SHT 발현 형질전환벼 육성

① 형질전환용 binary vector 작성(pGA1611:Glutelin:SHT binary vector construction) - PCR을 이용 rice glutelin 과 SHT 유전자의 promoter 부위와 ORF부분을 제한효소부위를 첨가한 primer를 사용 증폭하여 적정 제한효소로 자른 후 binary vector에 ligation하여 최종적으로 *Agrobacterim tumefaciens* 4404 에 형질전환 한다.

② *Agrobacterium* 매개방법에 의한 벼 형질전환 : 동진벼의 scutellum에서 유래한 calli 를 사용한다.

③ *Agrobacterium* 매개방법에 의한 벼 형질전환은 본 연구실에 set up 된 방법(Ha et al., 2004 ; Lee et al., 2000 )에 따라 형질전환 한다.

#### 나. Total RNA 분리 및 reverse transcriptase PCR, Northern 분석

출수 후 10~15일 된 prolamin:SHT 형질전환 벼 T<sub>1</sub>종자를 액체질소에 담아 곱게 마쇄하고 glutelinA<sub>3</sub>:SHT T<sub>2</sub>형질전환 벼 종자와 동일한 방법으로 total RNA를 분리한 후 20  $\mu$ g을 취하여 EtOH로 침전 시킨 다음 6.5% formaldehyde와 50% formamide가 함유된 10×Mops 완충액과 혼합하여 변성시켰다. 변성된 시료를 1.9% formaldehyde가 포함된 1×Mops 완충액이 담긴 전기영동 kit에서 0.8% formaldehyde agarose gel을 통해 total RNA를 분리하였다. 25mM sodium phosphate로 두 번 gel을 세척한 후 모세관 현상을 이용하여 nylon membrane (Hybond -XL, Amersham Pharmacia Biotech)에 전이한 다음 UV -cross linker로 고정하여 Prime It<sup>®</sup> II Kit(Stratagene)를 이용, 고추 SHT insert를 dCTP-P<sup>32</sup>로 표지한 후 hybridization 용액에서 반응시켜 0.1×SSC 용액으로 수세하고 Phosphoimage analyzer로 분석하였다.

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

실험에 사용 될 잎(T<sub>0</sub> 후 T<sub>1</sub>)을 액체질소에 담아서 곱게 빻은 후 TRI reagent(Sigma, USA) 1 mL당 시료 0.1 g을 혼합하여 상온에서 약 5분간 방치한 후 13,500rpm으로 10분간 원심분리 시켜 상등액만을 0.2 mL의 chloroform과 혼합하여 상온에서 10분간 방치한 후 다시 원심분리 하였다. 이 후 용액부분만을 새로운 튜브에 옮겨 0.5 mL의 isopropanol과 잘 섞은 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 원심분리를 하여 침전물을 diethyl pyrocarbonate-treated water(DEPC-treated water)에 녹여 전체 RNA를 준비하였다. 이 중 10  $\mu$ g의 전체 RNA를 취하여 에탄올로 침전 시킨 후 6.5% formaldehyde와 50% formamide가 함유된 10x Mops 완충액과 혼합하여 80°C에서 3분간 변성시켰다. 변성된 시료를 1.9% formaldehyde가 포함된 1x Mops 완충액이 담긴 전기영동 kit에서 0.8% formaldehyde agarose gel을 통하여 전체 RNA를 분리시켰다. 25 mM sodium phosphate로 두 번에 걸쳐 젤을 세척한 후 모세관 현상을 이용한 방법으로 전체 RNA를 nylon membrane에 전이시켜 UV-crosslinker로 고정시켰다. 이 nylon membrane에 프라이머 AF 5'-d(GCCATGGATCACATGCCAAGA)-3'와 그 역 프라이머인 5'-d(GGGTACCCTACGGTGCATGAGAAGT)-3' (carboxy-terminal sequence)를 이용하여 PCR로 얻어진 합성 DNA probe로 융합반응 시켰다. 그 후 <sup>32</sup>P-dCTP로 표지한 다음, hybridization buffer에서 반응시켜 phosphoimaging analyzer로

분석하였다. 각각의 전체 RNA는 블롯팅 이전에 에티디움 브로마이드로 같은 양을 분석하였다.

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

### 라. Western blot 분석

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

## 3. 연구 수행 결과

### 가. Prolamin:SHT 발현 형질전환체 육성

Prolamin:SHT로 형질전환된 *Arobacterium* LBA4404 을 각각 낙동벼와 동진벼로부터 유기된 callus와 공조배양하여 선발배지로 옮겼다. 선발배지인 2N6-CH배지에 옮긴 callus들이 암 상태에서 3-4주가 지나자 형질전환된 callus들은 활력을 가지며 살아가는 것을 볼 수 있었고 형질전환 되지 않은 callus들은 갈변하여가다 결국 검게 변하여 죽는 것을 볼 수 있었다. 살아남아 분얼하는 callus를 재 분화배지인 MS-BN에 옮겨서 빛에서 배양한

결과 엽록소가 형성되며 점차 잎이 생성되어가는 것을 확인할 수 있었다. 이 때 하나의 callus에서 나온 여러 개의 개체들은 같은 계통으로 취급하였으며, 하나의 균에서는 하나만을 독립된 계통으로 인정하였다. 잎이 생성되면 그 개체만을 생장점이 잘려나가지 않도록 유의하며 떼어내어 뿌리 성장 재 분화 배지인 2N6-Rooting배지에 옮겨주어 약1주일 후 뿌리가 유도됨을 확인 할 수 있었다. 이를 통하여 prolamin:SHT는 19종의 독립 line을 획득 할 수 있었다. 독립 line 모두를 포장에 이양하여 prolamin:SHT는 T<sub>0</sub> 세대 잎과 이로부터 얻은 T<sub>1</sub>종자로 이후의 실험들을 수행하였고 T<sub>0</sub> 세대로부터 얻은 T<sub>1</sub>종자를 40mg/L의 hygromycin이 함유된 1/2MS 배지에서 키워 선별 획득한 잎으로 Southern blot을 수행하여 prolamin:SHT유전자 도입 수를 확인하였다. 그 중 prolamin:SHT유전자가 1 copy만 도입된 line의 T<sub>1</sub>종자를 다음해에 파종하여 line당 20주씩 포장에 이양하고 이로부터 획득한 T<sub>2</sub>종자로 이후의 실험들을 수행하였다.

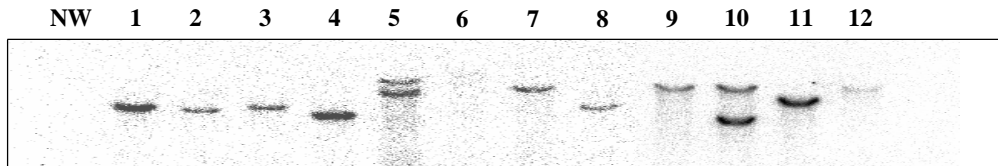
#### 나. Prolamin:SHT 발현 형질전환변의 Southern blot 분석

*Agrobacterium* 매개에 의해 형질전환 한 식물체들에 SHT유전자가 안정적으로 삽입되어 있는지 확인하기 위하여 Southern blot을 수행하였다. Prolamin :SHT는 포장에 이양한 19 line의 T<sub>0</sub> 잎을 사용하였고, glutelinA<sub>3</sub>:SHT는 상기한 바와 같이 T<sub>0</sub> 세대로부터 얻은 T<sub>1</sub>종자를 40mg/L의 hygromycin이 함유된 1/2MS 배지에서 키워 선별 획득한 잎으로 Southern blot을 수행하였다. GlutelinA<sub>3</sub>:SHT는 당초 이양하였던 30 line 중 12 line의 개체에서만 T<sub>1</sub>종자를 획득할 수 있었고 이 12 line을 가지고 실험을 수행하였다. 그 결과 11개의 식물체에 glutelinA<sub>3</sub>:SHT 유전자가 삽입되었음을 알 수 있었고 이중 2 line에서 2 copy의 유전자가, 나머지는 모두 1 copy의 유전자가 삽입되었음이 확인되었다. prolamin:SHT유전자는 총 19 line 중 17 line의 식물체에 삽입되었고 그 중 5 line만이 1 copy의 유전자가, 나머지는 2~4 copy의 유전자가 삽입되었음을 확인하였다(그림 4). glutelinA<sub>3</sub>:SHT는 1 copy만 도입된 9개 line의 T<sub>2</sub>종자를, prolamin:SHT는 유전자가 삽입된 것 중 불임이 아닌 전 line의 T<sub>1</sub>종자를 이후의 실험 시료로 사용하였다(그림 3-1).

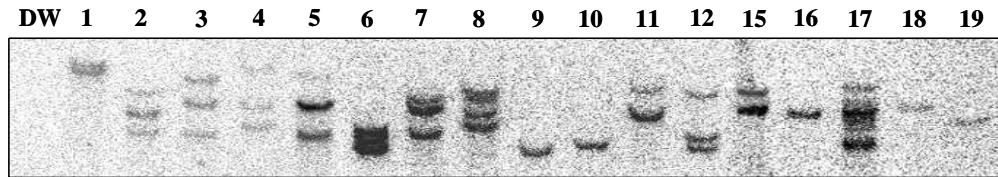
#### 다. Prolamin:SHT 발현 형질전환종자의 Western blot 분석 및 SHT 효소활성 측정

변 배유 특이 promoter인 prolamin promoter를 이용하여 SHT 유전자를 도입한 형질전

(가)



(나)



**Fig. 3-1.** Southern blot analysis using transgenic rice expressing SHT genes under the control of rice glutelin-A3 (가) and prolamins (나) promoters. 가 indicated the transgenic rice cv. Nakdong expressing glutelin:SHT. 나 demonstrated the transgenic rice cv. Dongjin expressing prolamins:SHT. gDNA from leaves were digested with HindIII restriction endonuclease enzyme, separated on 1% agarose gel and transferred onto nylon membrane which then were probed with <sup>32</sup>P-SHT cDNA. NW; cv. Nakdong, DW, cv. Dongjin.

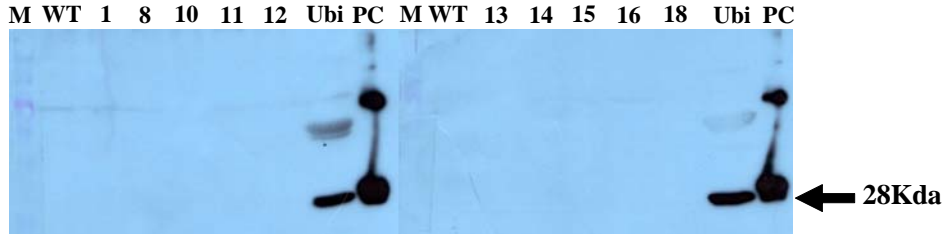
환 벼의 종자에서 SHT 유전자가 기능적으로 발현이 되고 발현이 된다면 이 SHT효소가 얼마만큼 활성을 띄는지를 알아보기 위하여 SHT 효소 활성 측정 및 Western blot을 수행하였다.

포장에서 생육하고 출수 후 10~15일 된 prolamin:SHT형질전환 벼 종자와, 동일한 시기의 동진벼 종자에서 추출해 낸 protein 50 $\mu$ g을 SDS-PAGE에서 분리하여 SHT 항체와 면역반응 시켜 본 결과 glutelinA<sub>3</sub>:SHT 형질전환 벼의 Western blot에서와 마찬가지로 SHT 단백질 크기인 28Kda에서는 아무런 밴드도 검출되지 않았다(그림 3-2). 실험 방법상의 오류를 막기 위해 대조구로 이미 SHT발현이 확인된 ubiquitin:SHT 형질전환 벼 잎을 종자에서와 동일한 방법으로 protein을 추출하여 종자로부터 추출한 protein과 함께 실험을 수행하였다. Western blot을 수행하였던 동일한 시기의 prolamin:SHT형질전환 벼 종자와, 동진벼 종자에서 sodium phosphate buffer를 이용하여 효소 활성을 잃지 않도록 단백질을 추출하고 이 추출한 단백질을 효소 활성 측정의 sample로 사용하였다. 동진벼 종자는 낙동벼 종자와 유사하게 0.7pkat/mg protein 정도의 SHT 효소활성을 보였고 prolamin:SHT 형질전환 벼는 wild type과 유사한 효소 활성을 보였던 glutelinA<sub>3</sub>:SHT 형질전환 벼와는 달리 wild type과 크게 차이는 나지 않지만 전반적으로 동진벼 보다 높은 SHT 효소활성을 보였고 1번과 4번 line은 wild type보다 4배 높은 활성을 보였다. 하지만 prolamin:SHT 형질전환 벼 종자에서 SHT가 확실히 발현하는지 확신할 수는 없었다. 본 실험에 사용된 시료는 10~15일 된 낙동벼와 형질전환 벼 종자로부터 추출해 낸 단백질을 feruloyl-CoA, serotonin과 반응시켜 얻어진 feruloyserotonin량을 검출하여 효소 활성을 계산하였다

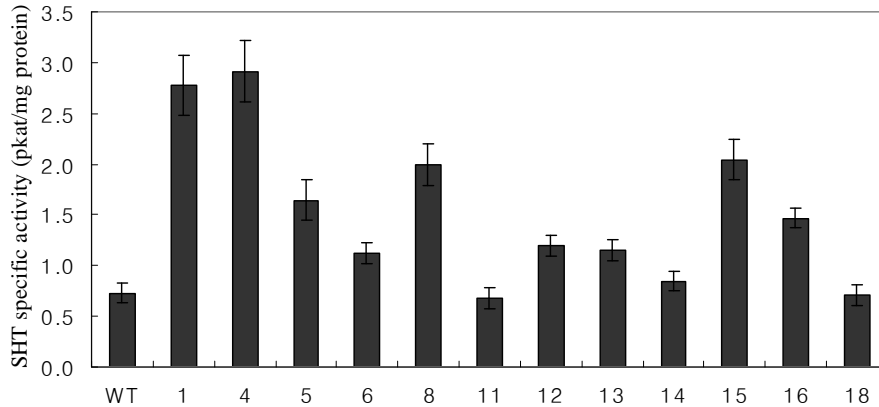
#### 라. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 종자의 Northern blot 분석

Prolamin promoter를 이용하여 SHT유전자를 도입한 형질전환 벼 종자에서 SHT유전자의 전사 유무를 확인하기 위하여 Northern blot을 수행하였다. 출수 후 10~15일 된 동진벼 및 형질전환 벼 종자로부터 total RNA를 추출하고 formaldehyde agarose gel을 통해 20 $\mu$ g의 total RNA를 분리한 후 모세관 현상을 이용하여 nylon membrane에 전이한 다음 방사선 동위원소로 표지된 SHT를 probe 삼아 hybridization시켰다. Northern blot 수행 결과 전 line에서 mRNA가 감지되었고 반면 형질전환 시키지 않은 동진 벼 종자에서는 SHT mRNA가 감지되지 않았다(그림 3-3). Lines 1과 16번에서 가장 많은 SHT mRNA가 동정되었으며, 다른 모든 lines 에서도 상당히 많은 양의 SHT mRNA 가 발현됨을 볼

(가)

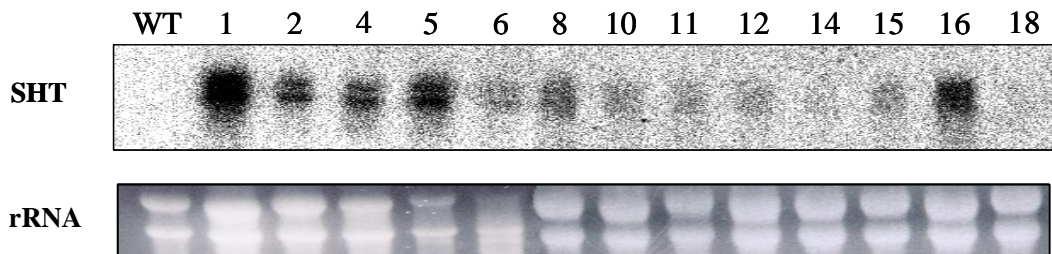


(나)



**Fig. 3-2.** Molecular analysis of transgenic rice expressing prolamin:SHT with Western blot (가) and SHT enzyme activity (나). Seeds were employed for these analysis. M ; protein molecular size marker, WT ; wild-type rice seed, 1~18 ; transgenic lines, Ubi ; ubiquitin:SHT transgenic rice leaves, PC ; purified recombinant SHT(50ng).





**Fig. 3-3.** Northern blot analysis of transgenic rice expressing prolamin:SHT construct. Dehusked seeds were used for total RNA isolation. WT; control rice, 1-18; transgenic lines, lower figure showed total RNA separated on 1% formaldehyde agarose gel which was stained with ethidium bromide.

수 있다. 이는 glutelin promoter 보다 prolamine promoter 가 더욱 효과적으로 SHT 유전자의 발현을 유도함을 알 수 있었다.

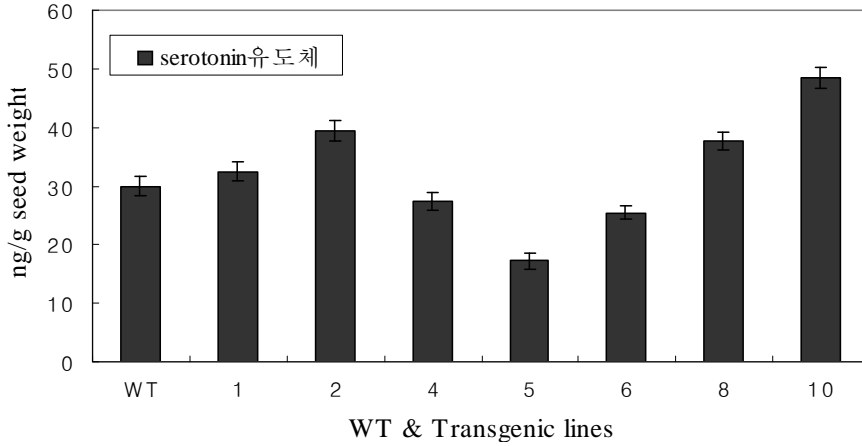
#### 마. Prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 종자의 serotonin 유도체 함량분석

SHT효소의 촉매로 인한 prolamin:SHT 발현 형질전환 벼 종자에서의 serotonin 유도체 함량을 측정하여 보았다. 포장에서 완전히 성숙되어 수확한 후 건조시킨 동진벼 종자와 형질전환 벼 종자의 종피를 제거하고 MeOH를 이용하여 serotonin유도체를 추출한 후 HPLC를 이용하여 4-coumaroylserotonin과 feruloylserotonin을 검출하여 그 검출량을 계산해 주었다.

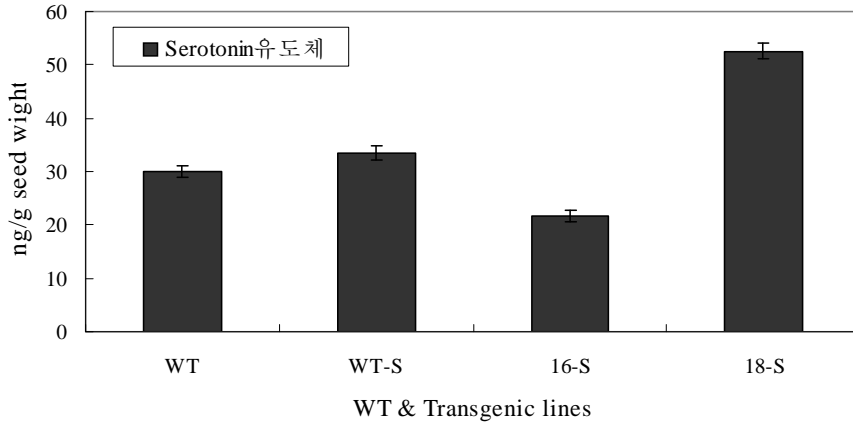
Prolamin:SHT 형질전환 벼 또한 glutelinA<sub>3</sub>:SHT형질전환 벼와 마찬가지로 serotonin 유도체의 함량은 wild type과 크게 차이를 보이지 않았다. 1, 2, 8, 10번 line만이 wild type과 비슷하거나 약 1.2~1.5배 정도 높은 수치의 serotonin 함량을 보였다(그림 3-4). GlutelinA<sub>3</sub>:SHT형질전환 벼 분석 시에도 언급하였던 것처럼 이미 벼의 종자 내에 SHT가 기질로 이용하는 serotonin이 소량으로 존재함을 알고 있기 때문에 wild type 동진벼 1주와 SHT 유전자가 도입되었음을 확인 한 prolamin:SHT형질전환 벼 3 line에 출수 후 20일째 되는 날로부터 3일 간격, 두 차례, 5mM의 serotonin을 뿌리에 처리해 주었다. serotonin을 처리하였던 형질 전환 벼 중의 한 line은 불임으로 종자를 얻지 못하였고 나머지 line을 상기 동일한 방법으로 serotonin유도체 함량을 측정하였다.

측정 결과 serotonin을 처리한 wild type의 종자에서는 처리하지 않은 wild type종자보다 약간 높은 serotonin 유도체의 함량을 보였지만 이는 오차 범위 내에 있는 수준이었다. serotonin을 처리해 준 형질전환 벼 중 16번 line은 wild type보다 더 낮은, 18번 line은 wild type보다 약 1.7배정도 높은 함량을 보였지만 이 또한 serotonin을 처리해 준 효과라기보다는 형질전환 벼 자체의 SHT유전자 발현으로 인한 결과라고 생각된다. 이는 기질 처리 시 생육에 저해를 주지 않으며 serotonin 유도체 생산에 영향을 줄만큼의 적정량 serotonin의 농도를 파악하지 못한 것과 serotonin 뿐만 아니라 종자 내의 SHT에 의한 생합성 기작의 또 다른 기질인 CoA류의 부재가 원인일 것으로 생각된다.

(가)



(나)



**Fig. 3-4.** Contents of serotonin derivatives in rice seeds. 가 indicated serotonin derivatives quantified in T1 transgenic seeds. 나 meant the serotonin derivative found upon serotonin treatment with 5 mM 20 days after heading.

## 제 4 절 Maize Ubiquitin promoter 조절에 의한 THT 형질전환 벼의 육성 및 티라민유도체 함량 분석

### 1. 서 설

Feruloyltyramine(FT) 및 4-coumaroyltyramine(CT) 등의 화합물은 phenylpropanoid amides 계통의 화합물 군에 속하며 이 화합물 군에는 feruloylserotonin, feruloyloctopamine, 4-coumaroylnoradrenalin, caffeoyltyramine 등이 있다(Facchini et al., 2002, Roepenack-Lahaye et al., 2003). 이러한 phenylpropanoid amides 화합물들은 식물 병원균들의 침입에 대항하는 방어물질 및 식물 식물간의 상호작용에 관계하는 alleopathy 화합물로서 기능을 발휘하고 있는 물질이다(Roepenack-Lahaye et al., 2003, Hahabrock et al., 1989, Cutillo et al., 2003, Tanaka et al., 2003). 이들 화합물의 식물 병원균에 대한 방어기작은 이들 물질이 세포벽에서 합성되어 세포벽으로 이동하고 세포벽의 구성물질과 peroxidative 중합반응을 일으켜 세포벽을 강화함으로써 상처 및 병원균의 침입에 저항성을 부여하는 것으로 보고되어 있다(Negrel et al., 1987, Negrel et al., 1993, Guillet et al., 2005, Hagel et al., 2005). 이렇게 세포벽이 강화된 식물은 fungal hyphae의 성장을 억제하거나, 병원균에 의한 세포벽의 가수분해를 줄여줌으로서 병원균의 침입에 대한 세포벽의 탄성을 높여 준다(Grandmaion et al., 1993). 따라서 feruloyltyramine 및 4-coumaroyltyramine 같은 tyramine 유도체들은 식물에 가해지는 다양한 스트레스 즉 물리적 상처, 병원균 침입, 유인제 처리에 대한 식물의 반응으로 합성이 유도되어 지고 있고 많은 식물체에서 발견된다(Negrel et al., 1984, Miyagawa et al., 1998, Pearce et al., 1998, Ishihara et al., 2000, Matsuda et al., 2005). Tyramine *N*-hydroxycinnamoyl transferase(THT) 효소는 tyramine 유도체 합성을 촉매하는 효소로서 현재 다양한 식물체에서 4개의 유전자가 클로닝되어 효소특성이 규명되어 있는 상태이다(Roepenack-Lahaye et al., 2003, Farmer et al., 1999, Schmidt et al., 1999, Kang et al., 2006). 특히 벼에는 THT homolog가 존재하지 않고(DNA Bank, Japan, GenBank), 227개의 아미노산으로 구성된 AK073240 유전자가 THT와 아미노산 동질성이 32%를 보이는 유전자가 있거나, *E. coli* 에 발현하여 affinity chromatography로 정제한 recombinant 단백질의 효소활성을 검정한 결과 THT 효소활성이 없는 것으로 나타났다(미발표 자료). THT 유전자를 발현하는 최초의 형질전환 작물은

담배이고, 이 형질전환 담배에서 heterologous THT 발현을 Northern blot 및 THT 효소 활성 측정으로 확인하였으나, tyramine 유도체 합성은 형질전환하지 않은 대조구 담배와 비슷한 경향을 보고하였다(Hagel et al., 2005). 이는 아민 기질인 tyramine 이 제한요인으로 작용하고 있는 것으로 생각된다. 더 나아가 THT 와 tyramine 생합성 유전자인 tyrosine decarboxylase(TYDC) 와 동시에 발현시킨 형질전환담배에서조차 tyramine 유도체의 합성이 관찰되지 않고, 단지 tyramine 의 과다생산이 관찰되었을 뿐이다. 이는 기질 제한 이외의 다른 대사조절 기작이 있는 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구는 고추에서 클로닝된 THT 유전자를 벼에 도입하여, THT 유전자의 ectopic 발현이 tyramine 유도체의 생합성에 직접적으로 관여하여 tyramine 유도체의 생성이 벼에서 이루어지는지 아니면 형질전환 담배에서와 같이 THT 가 발현되어도 tyramine 유도체의 생합성과 독립적으로 일어나는지를 조사하고자 본 실험을 수행하였다. 결과적으로 THT 발현 형질전환벼는 19주 지난 T0 앞에서 형질전환하지 않은 대조구 보다 훨씬 많은 tyramine 유도체를 생성하였으며, 유식물인 경우 그 차이가 매우 낮게 나타났고, 특히 유식물에 tyramine을 공급하였을 때 많은량의 tyramine 유도체가 생합성 되는 것으로보아, tyramine 의 공급과 tyramine 유도체의 생합성은 긴밀히 연계되어 있음을 볼 수 있어, 추후 이러한 tyramine 유도체의 생합성에는 기질의 생성을 고려해야 함을 알 수 있다.

## 2. 연구 수행 방법

### 가. Binary vector 제작 및 벼 형질전환

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환법으로 형질전환벼를 육성하였다. THT full length cDNA(AY819700; Kang et al., 2006)를 template로 사용하고, 전방 primer로서 5'-ATCAAGCTTATGGCTTCAGCTATATCT-3'(HindIII site 밑줄, 전이개시는 굵은 글씨), 후방 primer 5'-TTGGGTACCGAGCTCTAACAGTTTCCTCCTTC-3'(KpnI SITE 밑줄)을 사용하여 PCR 반응을 수행하였고, 획득된 PCR 산물을 *HindIII* 및 *KpnI* 제한효소로 자르고, 상기 제한효소로 절개된 pGA1611 binary vector에 ligation 시켰다. 도입된 THT 유전자는 옥수수 ubiquitin promoter 조절하에 두고, nopaline terminator 에 의해 전사를 종결하는 기작으로 전사가 이루어지도록 하였다. pGA1611:THT binary vector는 T-DNA에 형질전환 선발마커로서 hygromycin이 있다. 제작된 binary vector를 *Agrobacterium*

LBA4404에 형질전환하고(그림 4-1), 이 starin을 이용하여 동진벼의 배반에서 유래된 calli와 공조배양을 통해 앞에서 제시한 형질전환법에 의해 형질전환벼를 육성하였다.

#### 나. Total RNA 추출, genomic DNA 추출 및 분석

Total RNA는 TRI REAGENT(Sigma)를 이용하였다. 10ug의 total RNA를 formaldehyde 함유 1% agarose gel에 분리하고, 20 mM MOPS(3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid)을 전기영동 buffer로서 사용하였다. 분리된 RNA를 nylon membrane으로 옮기고, PCR에 의해 생성된 THT cDNA를 probe로 이용하였다. 동등량을 loading 하였는지 알고자 ethidium bromide로 염색하여 확인한 후, blotting을 하였다. Genomic DNA는 DNAzol ES(Molecular Research Center)을 이용하여 추출하였고, 5 ug의 genomic DNA를 *Hind*III로 절단하여 0.8% agarose gel에 분획하였다. 분획된 gel를 nylon membrane으로 옮기고 hybridization을 공지의 방법에 따라 수행하였다(Jang et al., 2004)

#### 다. 벼 조직에서 feruloyltyramine 및 4-coumaroyltyramine 함량 측정

Tyramine 유도체의 정량은 Ishihara 등의 방법에 의해서 측정하였다(Ishihara et al., 2000). 간략하게 정리하면, 250 mg 정도의 벼 잎을 액체질소에서 갈고, 3 ml 메탄올에서 ncnf한다. 시료를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액을 Sep-pak C18Waters)에 통과시키고 다시 Sep-pak Silica(Waters) cartridge에 통과시킨다. 클로로포름:메탄올(30:1)로 용출된 분획을 수거하여 evaporator로 증발시키고, 최종적으로 0.5 ml 메탄올에 녹여 문헌에 나와 있는 방법으로 HPLC에 정량한다(Jang et al., 2004, Kang et al., 2006).

#### 라. THT 효소활성 측정

벼 잎을 100 mM sodium phosphate(pH 7.5)와 14.4 mM mercaptoethanol 용액이 있는 곳에서 4°C 상태에서 곱게 간다. 추출액을 12,000 rpm에서 10분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 효소활성 측정을 위한 시료로 사용한다. 간단하게 효소활성 측정을 요약해 보면 다음과 같다. 10 ul 시료를 1 mM feruloyl-CoA, 10 mM tyramine, 100 mM Tris-HCL(pH 8.5) 함유된 반응시약에 두고 30°C에서 효소반응을 시작한다. 10분 후 20 ul 정도의 acetic

acid을 첨가하여 반응을 종료하고 500 ul가 되도록 MeOH을 넣어준다. 여기에서 10 ul를 채취하여 HPLC에 주입하여 분석한다. 단백질 정량은 protein assay dye(Bio-Rad)을 사용한다.

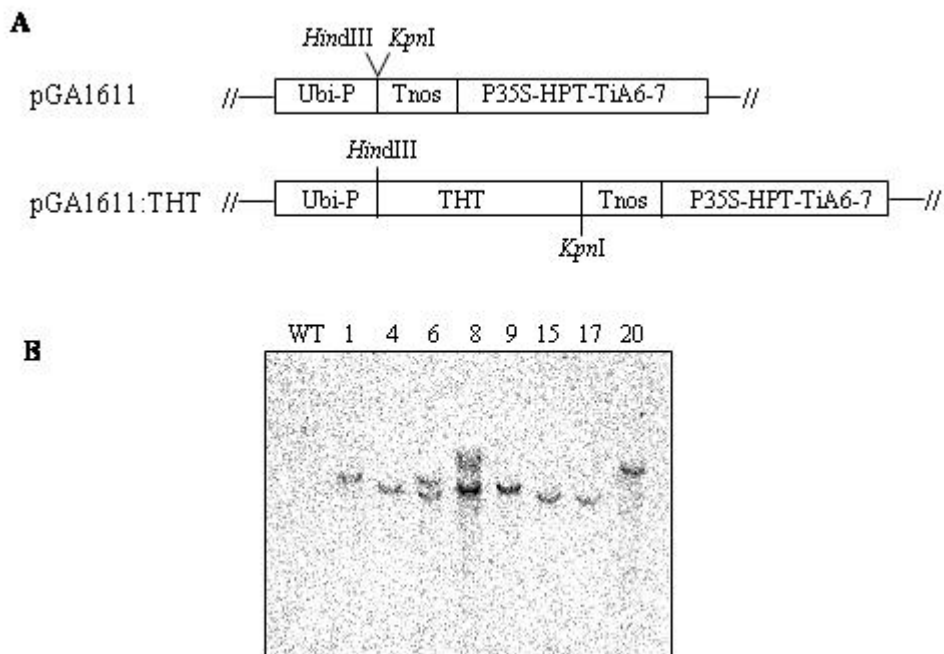
#### 마. 벼에서 Tyramine 함량 분석

형질전환벼와 대조구의 종자에서 종피를 제거하고, 살균하고, Murashige-Skoog 배지에 치상한다. 배지에는 다양한 농도의 tyramine을 넣어준다. 25°C 생장실에서 12h 밤/12h 낮 상태의 명암으로 7일간 생육시킨다. 그 후 0.3 g 정도의 조직을 이용하여 액체 질소에서 분말을 낸 후, 6 ml MeOH 로 추출한다. 추출물을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, Millex-LG(Millipore) 필터를 통과 시키고, 용출액을 80% MeOH 농도가 되도록 조정 한 후, Sep-pak Light C18 cartridge를 통과한다. 통과된 추출액을 증발시키고 최종적으로 0.5 ml MeOH에 녹여, 10 ul 정도의 시료를 HPLC 에 주입한다. 사용한 column은 C18이며(4 um particle size, 4.6 mm × 150 mm, Waters), 5% MeOH와 0.3% trifluoroacetic acid 의 전개용매로 분당 0.8 ml 유속으로 280 nm에서 tyramine을 저장한다.

### 3. 연구 수행 결과

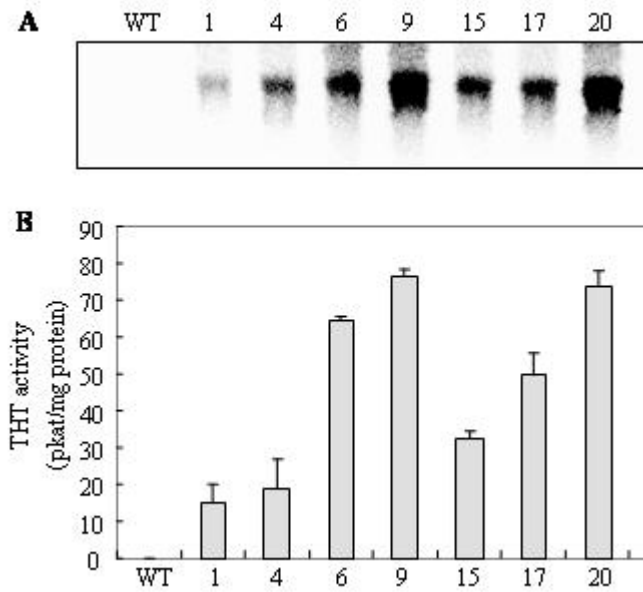
#### 가. 형질전환벼 육성 및 Southern blot 분석

고추 유래의 THT유전자를 발현하는 형질전환벼는 동진벼의 배반에서 유래된 calli 와 pGA1611:THTbinary 유전자를 가진 Agrobacterium과 공조배양을 통해 육성하였다. THT 유전자는 항상 발현되는 옥수수 ubiquitin 조절하에 발현되도록 하였다. 20종의 독립적인 형질전환체를 hygromycin 항생제하에서 기내 선발하고, 그 중 8종을 포장으로 옮겨 T<sub>0</sub> 개체를 유지하고 T<sub>1</sub> seeds를 수확하였다. Transgene THT 유전자가 벼의 게놈에 삽입되었는지를 조사하기 위하여 8주된 형질전환벼의 잎으로부터 DNA를 추출하여 *Hind*III로 절단하고, <sup>32</sup>P로 라벨된 THT cDNA로 hybridization 하였다. *Hind*III로 절단할 경우, THT cDNA를 절단하지 않기 때문에 한개의 genomic blot band는 THT유전자가 벼 haploid 게놈에 안정적으로 1회 삽입되었음을 의미한다. 6개의 형질전환체 lines 1, 4, 9, 15, 17, 20에서 1개의 band가 검출되어 벼의 게놈에 1 copy로 삽입되었음을 볼 수 있고, 반면에 두개의



**Fig. 4-1.** Schematic diagram of T-DNA of the pGA1611 binary vectors used for plant transformation (A). Ubi-P, maize ubiquitin promoter; Tnos, nopaline synthase terminator; P35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; HPT, hygromycin phosphotransferase; TiA6-7, TiA6-7 terminator THT, tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase. Southern blot analysis (B). *HindIII*-digested rice genomic DNA was probed with THT cDNA.





**Fig. 4-2.** (A) Northern blot of tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase (THT). Total RNA (10  $\mu$ g) was isolated from 8-week-old leaves of transgenic or wild-type rice and blotted onto a nylon membrane (see Materials and methods). (B) THT enzyme activity measured in extracts of 8-week-old leaves of wild-type and transgenic rice (T<sub>1</sub>). THT activity is expressed as pkat mg<sup>-1</sup> protein.

형질전환체 lines 6 및 8은 두 개의 자리에 삽입되었음을 보여 준다(그림 4-1). 8개의 독립적인 형질전환체는 Southern blot 상에서 모두 서로 다른 size를 보여 주는 것으로 보아, 모구 서로 다른 벼의 게놈 부위에 삽입되어 있는 독립적인 line 임을 알 수 있었고, 이렇게 삽입된 모든 형질전환체는 정상적인 phenotype 으로 성장하였다. 이들로부터 T<sub>1</sub> 종자를 수확하였고, T<sub>1</sub> 종자의 개수는 개체마다 달랐는데, 이는 기내 배양시 발생한 유전적 변이 혹은 transgene의 삽입에 의한 유전적 영향 일 수 있을 것이다.

#### 나. 형질전환벼에서 THT 유전자의 발현 정도: Northern blot 및 효소활성 측정

T<sub>0</sub> 형질전환벼에서 THT 유전자의 전사정도를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 수행하였다. 형질전환벼의 잎 및 대조구의 잎에서 추출한 total RNA로부터 THT mRNA의 발현을 분석한 결과, 모든 형질전환벼에서 THT 유전자의 전사가 일어남을 볼 수 있었고, 대조구인 형질전환하지 않은 벼에서는 THT mRNA의 발현이 검정되지 않았다(그림 4-2A). 발현량은 개체마다 달랐으며, line 9 및 20은 최고의 발현량을 보였으며, lines 4, 6, 15, 17은 중간적인 수준을 보였다. 그리고 line 1은 매우 적은 양의 THT mRNA가 발현되었다. Northern blot 시 채취한 잎과 비슷한 시기에 같은 잎으로부터 단백질을 ncnf하여 THT 효소활성을 측정하였다. THT활성은 feruloyltyramine 합성 정도를 기내에서 검정하였다. THT 효소활성 정도는 THT mRNA 수준과 비슷한 상관관계를 보여 주었다.(그림 4-2B). 예를 들어 가장 적은 효소활성을 보인 line 1은 가정적은 mRNA 발현량을 보여 주었고, lines 9 및 20은 최고의 THT 효소활성과 동시에 가장 높은 THT mRNA 수준을 보여주었다. 그러나 THT 효소활성은 대조구인 형질전환하지 않은 잎에서는 매우 미약하게 검출되었는데 이로부터 벼에서도 THT 효소활성이 있는 것을 알 수 있고 이 결과는 Jang 등(2004)의 결과와 일치함을 알 수 있다(Jang et al., 2004).

#### 다. T<sub>0</sub> 형질전환벼의 잎 및 T<sub>1</sub> 종자에서 tyramine 유도체 함량측정

T<sub>0</sub> 형질전환벼가 19주 정도지난 수확기 무렵에 종자와 잎을 채취하여 tyramine 유도체 함량을 조사하였다. 대조구의 종자에서는 그램 중당 20 ng 정도의 CT+FT 함량이 조사되었으나, 형질전환벼의 종자에서는 32에서 62 ng 정도의 CT+FT 함량이 검출되어 약 1.5배에서 3배 정도의 높은 함량을 보여 주었다. 이에 비해 잎에 경우에는 대조구에서는 그램 중당 0.46 ug 정도가 검출되나, 형질전환벼에서는 2.8, 14.7, 7.2 ug 정도가 lines 1, 6, 17에

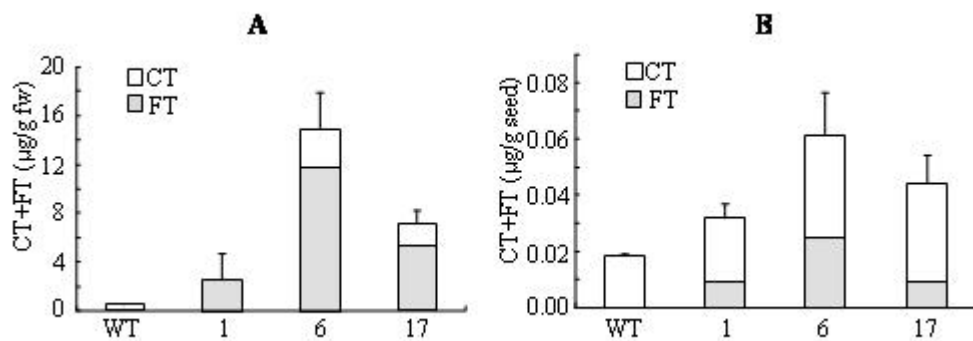
서 검출되었다. 형질전환변이에서 CT+FT 함량은 6배, 32배, 16배 정도 높은 경향을 보여 주었다(그림 4-3).

#### 라. T<sub>1</sub> 형질전환변이의 유묘에서 뿌리와 잎에서 THT 효소활성

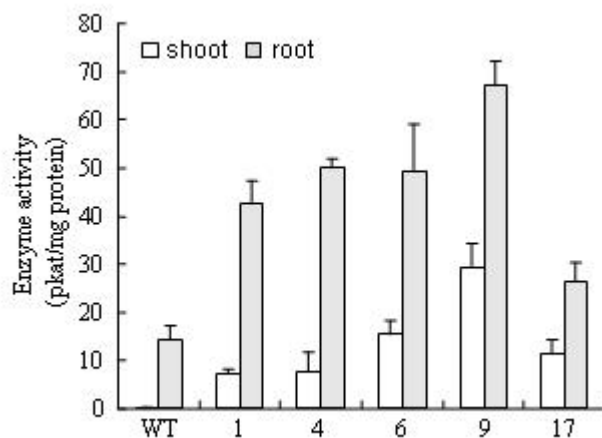
T<sub>1</sub> 종자를 수확한 후, THT 효소활성을 T<sub>1</sub> 유묘에서 측정하여 보았다. Line 20의 경우, 최고의 mRNA 및 효소활성을 보였으나, 종자를 맺지 못하였다. MS 배지에서 자란 10일 묘의 경우, 잎에서 THT활성을 발견 할 수 없었으나, 형질전환변이의 유묘에서는 상대적으로 높은 THT 효소활성을 보여 주었다. 잎과는 다르게 THT 활성이 대조구의 뿌리에서 14 pkat mg<sup>-1</sup> protein 정도의 효소활성이 검출되었고, 이에 비해 형질전환변이의 경우 대조구보다 3.4배 높은 평균 47 pkat pkat mg<sup>-1</sup> protein 정도의 THT 효소활성을 나타내었다(그림 4-4).

#### 마. Tyramine 첨가 배지에서 유묘의 CT+FT 합성 능력 검정

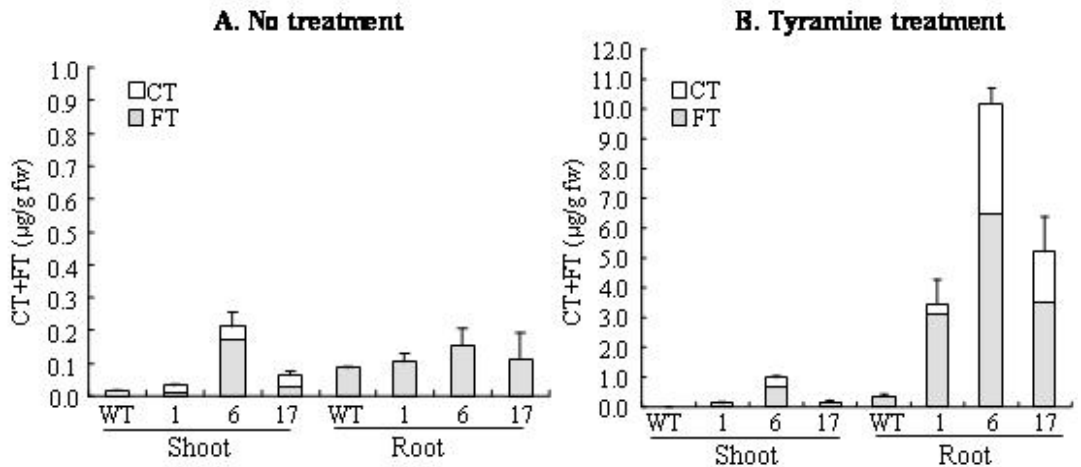
THT 유전자를 발현하는 형질전환변이의 CT+FT 합성 능력을 보기위해 50 uM tyramine 이 함유된 배지에 10일간 무균 상태로 키운 다음, 잎과 뿌리에서 CT+FT 함량의 합성 정도를 관찰하였다. Tyramine이 함유되지 않은 배지에서 자란 대조구의 유묘의 잎과 뿌리에서는 0.02 및 0.1 ug 정도의 CT+FT가 검출되었다. 반면에 형질전환변이의 잎에서는 2배에서 많게는 10배 까지 높은 CT+FT 함량이 검출되었으나, 뿌리에서는 대조구와 비슷한 경향을 보여 차이를 보여 주지 않았다(그림 4-5). 상기의 결과로 보건데, 형질전환변이에서 THT가 기능적으로 작동하고 있음을 알 수 있었다. 유묘에서 CT+FT 함량은 대조구에 비해 형질전환변이에서 높게 나타났으나, 절대적인 CT+FT 량은 그램 중량 모두 0.2 ug 이하로 나타났다. 하지만 50 uM tyramine이 함유된 배지에서 자란 유묘의 경우, 잎에서 1 ug, 뿌리에서 10 ug 정도의 절대적인 량이 상승함을 볼 수 있었다. 50 uM tyramine이 함유된 곳에서 자란 형질전환 잎은 tyramien이 없는 곳에서 자란 잎보다 5배 이상의 CT+FT 함량을 보여 주었다. 형질전환변이의 뿌리의 경우는 tyramine이 없는 곳에서 자란 뿌리에 비해 27배에서 55배 높은 CT+FT 함량을 보여 주었다. Line 6는 10 ug, 그리고 line 17 및 line 1은 각각 5.2, 3.3 ug 정도였다. 증대된 CT+FT 함량은 대조구인 뿌리에서 tyramine이 있는 것과 아닌 것과 5배정도의 차이를 보여 주었다. Tyramine의 처리에 따른 높은 CT+FT 합성율은 유묘에서 tyramine 합성이 매우 적음을 보여 주고, 본 결과는 유묘에서의 낮은



**Fig. 4-3.** Feruloyltyramine (FT) and 4-coumaroyltyramine (CT) content in leaves (A) and seeds (B) (mean SE, n = 3). Seeds and leaves were harvested from 19-week-old rice plants and subjected to HPLC. WT, wild type; 117, transgenic lines; fw, fresh weight.



**Fig. 4-4.** Tissue-specific tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase (THT) enzyme activity in wild-type and transgenic rice plants. THT enzyme activity was measured in extracts from 10-day-old leaves and roots of wild-type and transgenic rice ( $T_1$ ) grown in Murashige and Skoog medium. THT activity is expressed as  $\text{pkat mg}^{-1}$  protein. WT, wild type; 117, transgenic lines.

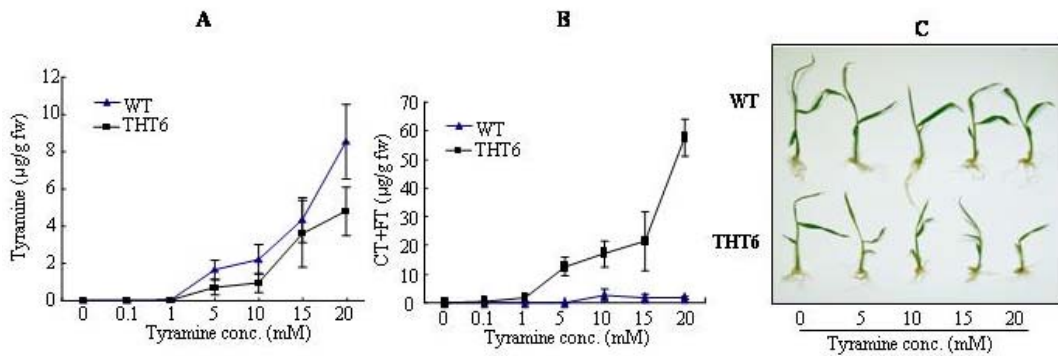


**Fig. 4-5.** Feruloyltyramine (FT) and 4-coumaroyltyramine (CT) content in seedlings grown (A) without and (B) with exogenous tyramine (mean SE,  $n = 3$ ). Rice seeds (T1) were grown for 10 days in half-strength Murashige and Skoog medium with and without tyramine-HCl (50 M) the seedlings were then divided into shoots and roots, and subjected to HPLC. WT, wild type; 117, transgenic lines; fw, fresh weight.

CT+FT 함량과 성숙한 잎에서의 높은 CT+FT 함량과 비교해 볼때, 기질인 tyramine이 벼의 생육초기에 합성되지 못하고 생육 후반기에 공급됨을 시사한다. 따라서 tyramine의 합성 및 CT+FT같은 tyramine 유도체의 합성은 벼의 발달시기에 따라 조절되고 있음을 볼 수 있다. 그리고 대조구 및 형질전환 뿌리에서 CT 함량이 검출되지 않는데 이는 THT 효소의 coumaroyl-CoA에 대한 친화도가 낮는데 기인하는 것이 아니라, 벼에서 coumaroyl-CoA의 합성이 낮은 탓에 기인하는 것으로 사료된다.

#### 바. 형질전환 벼에서 tyramine 공급에 따른 tyramine 함량과 CT+FT함량 변화 측정

CT+FT생성에 대한 tyramine의 효과를 효과적으로 검증하기 위해서 형질전환벼 및 대조구의 종자를 tyramine이 함유된 배지에 치상하였다. 최고 20 mM의 tyramine이 함유되어 있는 곳에서 성장시켜 본 결과 20 mM의 농도에서 약간의 생육이 저해되는 현상을 가져왔고, 10 mM까지는 형태적으로 차이를 크게 보이지 않았다. 그러나 50 mM tyramine 농도에서는 벼가 거의 자라지 않았다(그림 4-6C). 다양한 농도 하에서 자란 형질전환벼와 대조구의 벼에서 tyramine 함량을 잎에서 측정된 결과, 모든 식물체에서 tyramine 처리 농도와 비례하여 높은 tyramine 함량이 잎에서 측정되었다. 이는 뿌리로부터 tyramine이 흡수되어 안정적으로 잎으로 이동하는 것을 볼 수 있었고, 20 mM tyramine에서 자란 형질전환벼와 대조구는 5 ug 과 8.5 ug 정도의 tyramine이 검출되었다. Tyramine의 상대적인 양은 항상 대조구에서 훨씬 많은 양이 측정되었다. Tyramine 농도가 5, 10, 20 mM 처리되었을 때, 대조구에서 tyramine 함량은 형질전환벼보다 거의 2배 이상 높은 결과가 관찰되었다(그림 4-6A). 이러한 결과는 형질전환벼에서 tyramine 이 CT+FT로 전환되어 일어난 현상으로 여겨지며, 이를 조사하기 위해 CT+FT 함량을 조사하였다. 형질전환벼의 잎에서는 잎내의 tyramine 농도가 높은 수록 이에 비례하여 CT+FT 함량이 증대됨을 볼 수 있었다. 예를 들면, tyramine이 없는 고세서 자란 유묘의 잎에는 0.2 ug 정도의 CT+FT 함량이 측정되었으나, tyramine이 있는 곳에서 자란 형질전환벼의 잎은 12, 17, 22, 55 ug 정도의 매우 높은 CT+FT 함량이 5, 10, 15, 20 mM tyramine 배지에서 측정되었다. 이는 무려 250배 높은 함량을 보여 준다. 대조구의 경우도 내부 tyramine 농도가 1.8 ug 이상일 경우, CT+FT 함량이 2 ug 정도까지 검출됨을 알 수 있었다. 결과적으로 대조구에 비해 형질전환벼에 훨씬 많은 양의 tyramine 유도체가 생합성 됨을 볼 수 있었고, 이는 THT 유전자의 ectopic 발현에 기인 함을 직접적으로 대변해 줌을 볼 수 있다.



**Fig. 4-6.** (A) Tyramine content and (B) feruloyltyramine (FT) and 4-coumaroyltyramine (CT) content in leaves of rice seedlings grown in various concentrations of tyramine (mean SE, n = 3). (C) Phenotype of rice seedlings grown in various concentrations of tyramine HCl. Rice seeds (T1) were grown as described in Fig. 5. WT, wild type; THT6, T1 transgenic lines; fw, fresh weight.



## 제 5 절 Serotonin 생합성의 rate limiting 효소인 tryptophan decarboxylase(TDC) 유전자 도입 형질전환벼의 육성 및 serotonin 고함량 벼 육성

### 1. 서 설

SHT 유전자를 벼에 형질전환하면 ubiquitin promoter의 경우, 종자에 일정량의 세로토닌유도체가 축적된다. 이에 비해 종자특이 promoter인 prolamin을 사용할 경우, 종자내 SHT 유전자의 발현이 되나 세로토닌유도체의 축적은 거의 이루어지고 있지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 THT 발현 형질전환벼의 결과와 비슷한 사례를 보여준다. THT 발현 형질전환벼에서 tyramine 유도체의 합성은 자연적으로는 벼 생육후반기에 tyramine 유도체 합성을 일어남을 볼 수 있고, 유묘에서는 합성이 일어나지 않음을 알 수 있었고, 이러한 현상이 바로 아민 기질인 tyramine의 결핍에 의한 것임을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구는 SHT 효소의 아민 기질로 작용하는 serotonin에 대한 연구가 선행 되어야 함을 알 수 있었다. Serotonin은 동물에서 신경전달물질이며, 기분을 좌우하는 물질이고 최근 간 재생에도 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다(Odjakova et al., 1997; Lesurtel et al., 2006). Serotonin 생합성은 두개의 효소작용으로 인해 이루어지는데 첫 번째 효소인 tryptophan decarboxylase(TDC)가 serotonin 생합성의 rate limiting 효소로 작용하는 것으로 알려져 있다. TDC 효소는 방향족 아미노산인 tryptophan을 tryptamine으로 촉매시키는 효소이다. 벼에서 TDC 유사 염기서열을 조사하여 이 유전자를 벼에 형질전환하여 serotonin 생합성에 대한 기초자료 및 응용화 기술을 얻기 위해 본 연구를 수행하였다.

### 2. 연구 수행 방법

#### 가. Ubiquitin promoter:TDC binary vector 제작 및 벼 형질전환

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환법으로 형질전환벼를 육성하였다. Putative TDC full length cDNA(AK069031)를 template로 사용하고, 전방 primer로서 5'-ATCAAGCTT ATGGGCAGCTTGGACACC-3'(HindIII site 밑줄, 전이개시는 굵은 글씨), 후방 primer

5'-TTGGGTACCTTAGTTCATCATCTCGGTGGT-3'(KpnI site 밑줄)을 사용하여 PCR 반응을 수행하였고, 획득된 PCR 산물을 *Hind*III 및 *Kpn*I 제한효소로 자르고, 상기 제한효소로 절개된 pGA1611 binary vector에 ligation시켰다. 도입된 AK069031(AK31) 유전자는 옥수수 ubiquitin promoter 조절하에 두고, nopaline terminator 에 의해 전사를 종결하는 기작으로 전사가 이루어지도록 하였다. pGA1611:AK31 binary vector는 T-DNA에 형질전환 선발마커로서 hygromycin이 있다. 제작된 binary vector를 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환하고(그림 4-1), 이 starin을 이용하여 동진벼의 배반에서 유래된 calli 와 공조배양을 통해 앞에서 제시한 형질전환법에 의해 형질전환벼를 육성하였다.

#### 나. Total RNA 추출 및 Northern blot 분석

Total RNA는 TRI REAGENT(Sigma)를 이용하였다. 10ug의 total RNA를 formaldehyde 함유 1% agarose gel에 분리하고, 20 mM MOPS(3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid)을 전기영동 buffer로서 사용하였다. 분리된 RNA를 nylon membrane으로 옮기고, PCR에 의해 생성된 THT cDNA를 probe로 이용하였다. 동등량을 loading 하였는지 알고자 ethidium bromide로 염색하여 확인한 후, blotting을 하였다.

#### 다. AK31 유전자의 대장균 이종발현 및 정제

AK31 유전자의 아미노 말단부위(전이개시점)에 *Nco*I 부위를 추가한 primer을 제작하고, stop codon부위에 stop을 삭제하고 제한효소 *Hind*III 부위를 추가한 primer를 이용, polymerase chain reaction을 수행하여 PCR 생성물을 1% agarose gel 상에 분리 후 크기를 확인 후 생성물을 DE81 paper에 결합시킨 후 1.5 M NaCl이 들어있는 elution buffer에 해리 시켜 ethanol 침전법으로 PCR 생성물을 정제 후, 제한효소 *Nco*I 및 *Hind*III을 이용하여 말단을 자른 후 *Nco*I 및 *Hind*III로 절개된 pET28b에 ligation 시킨다.

이후 ligation된 DNA를 대장균 host인 *E. coli* BL21(DE3)으로 transformation한 후 kanamycin 저항성 YEP medium에 깔아준 후 생성된 colonies를 plasmid mini preparation에 의해 AK31-insert band가 있는 확인한다. AK31 유전자들이 정확한 DNA integrity를 제한효소 및 PCR 방법으로 확인 후 이들을 overnight 배양한 seed culture의 100  $\mu$ L 취하여 2 mL의 new medium에 넣어주어 bacteria titer이 OD600=1.0이 될 때까지 배양 후

최종농도가 1 mM 되도록 IPTG를 처리하여 AK31 유전자의 전사, 전이를 유도하여 유전자 산물인 AK31 단백질이 대장균에서 만들어지는지는 AK31 효소활성 측정 방법으로 확인한다.

AK31 유전자를 stop codon이 없이 pET28b 벡터의 카복실 말단에 6개의 histidine과 연결하도록 고안되어 affinity chromatography 방법으로 정제한다. 발현방법 및 정제방법은 Novagene protocol에 따르며 100 mL Terrific Broth에 overnight culture한 2 mL seed culture를 넣어 37°C에 3-4시간 배양 후 0.3 mM IPTG을 첨가하여 다시 28°C에서 5시간 배양하여 원심분리하여 *E. coli* pellet를 1x binding buffer(Novagen)에 용해하여 초음파 파쇄기로 대장균 세포벽을 파쇄한다. 파쇄된 대장균 lysate를 4°C 원심분리기에서 13,000rpm에 20여분간 원심분리하여 soluble extract를 Nickel column에 부어 정제하며 상세한 방법은 Novagen protocol 방법을 따른다.

#### 라. TDC 효소활성 측정

TDC 효소활성 측정은 L-[methylene-<sup>14</sup>C]tryptophan 이 [<sup>14</sup>C]tryptamine으로 전환되는 양을 측정하는 것으로 De Luca 등의 방법에 준하여 실시하였다(De Luca et al., 1988). 간략하게 설명하면, 벼 조직 0.2 g을 액체 질소에서 갈고, 시료 가루를 1 ml extraction buffer(0.1 M HEPES buffer(pH 7.5), 25 mM mercaptoethanol, 1 mM DTT)에서 추출하고 이 추출물을 13,000 rpm에 20분 원심분리하여 상등액을 효소활성 측정을 위해 사용한다. 상등액 300 ul 정도를 3 mM tryptophan, 0.4 uci <sup>14</sup>C-tryptophan, 8 uM pyridoxal phosphate, 50 mM HEPES(pH 7.5) 반응액에 넣고 30°C에 30분 반응시킨 후, 2 M NaOH로 반응을 중단 시키고, 600 ul ethyl acetate 로 추출하고 13,000 rpm에 2분간 원심분리한 다음 ethyl acetate 200 ul를 scintillation counter에 넣고 cpm 값을 읽어 정량한다.

#### 마. 벼에서 serotonin 및 tyramine 함량 분석

형질전환벼와 대조구의 종자에서 종피를 제거하고, 살균하고, Murashige-Skoog 배지에 치상한다. 배지에는 다양한 농도의 tyramine을 넣어준다. 25°C 생장실에서 12h 밤/12h 낮 상태의 명암으로 7일간 생육시킨다. 그 후 0.3 g 정도의 조직을 이용하여 액체 질소에서 분말을 낸 후, 6 ml MeOH 로 추출한다. 추출물을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한

후, Millex-LG(Millipore) 필터를 통과 시키고, 용출액을 80% MeOH 농도가 되도록 조정  
한 후, Sep-pak Light C18 cartridge를 통과한다. 통과된 추출액을 증발시키고 최종적으로  
0.5 ml MeOH에 녹여, 10 ul 정도의 시료를 HPLC에 주입한다. 사용한 column은 C18 이  
며(4 um particle size, 4.6 mm × 150 mm, Waters), 5% MeOH와 0.3% trifluoroacetic  
acid의 전개용매로 분당 0.8 ml 유속으로 280 nm에서 tyramine을 저장한다.

### 3. 연구 수행 결과

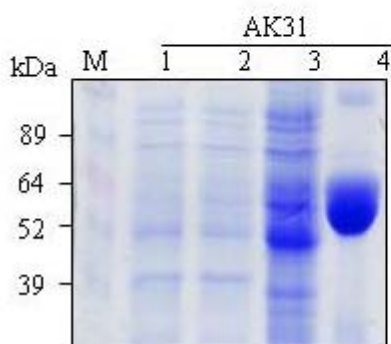
#### 가. 대장균 발현, affinity 정제 및 효소활성 검정

벼의 AK31 유전자가 TDC 효소 활성을 갖는 단백질을 coding 하는지를 검증하기 위하  
여 먼저 대장균 내에서 히스티딘으로 테깅된 (histidine-tagged) 제조합체 형태의 합성  
AK31 단백질을 합성하였다. 그 후 이 제조합체를 affinity chromatography 방법으로 정제  
하여 그 특성이 조사되었다. 전장 AK31 cDNA (full length cDNA)를 전사 종결 codon을  
제외하고 대장균 발현 벡터인 pET28(b)에 삽입하여 Protox 발현 construct로 준비하였다.  
이 제조합체 중 원하는 염기서열이 정확히 전사 번역되어 완전한 단백질로 발현되게 하기  
위하여 6개 histidine tag는 벡터의 카복실 말단에 연결하였다. 그림 5-1은 대장균 내에서  
의 제조합 AK31의 발현과 정제를 보여주고 있다. IPTG로 유도하기 전후의 total 그리고  
soluble 단백질을 볼 수 있는데, 제조합 Protox는 IPTG에 의해 그 발현이 높은 수준으로  
유도 되었다. 일반적으로 대장균의 총 soluble 단백질의 15-30% 정도가 recombinant  
Protox로 나타났다. 단과정(one step)의 친화 정제(affinity purification)는 Ni-NTA  
column을 사용해 수행하였으며 그에 의해 얻어진 His-tagged 단백질은 약 0.5-0.7 mg/0.1  
L culture였다. 이것은 대장균의 전체 soluble 단백질 중 AK31 단백질이 약 2.7-3.8 %로  
얻어지는 짐을 보여준다. 그리고 정제된 His-tagged AK31 단백질을 이용하여 효소활성을  
측정한 결과, 높은 TDC 효소활성(pkat mg<sup>-1</sup> protein)을 지니고 있으며, 반면에 tyrosine  
decarboxylase(TYDC) 효소활성은 없는 것으로 확인하였다.

(A)

GenBank accession no.	Amino acid length	GC %	Purification in <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i> enzyme activity	
				TYDC	TDC
AK069031	514	68	Yes	0	3372

(B)



**Fig. 5-1.** Functional expression of the AK31 gene in *E. coli*. Expression of the AK31 gene in *E. coli* and affinity purification of His-tagged Protox protein. *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the pET28b-Protox plasmid construct were cultured with or without isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG) before preparation of total and soluble protein extracts. Extracts were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels, which were stained for protein using Coomassie Brilliant Blue: M, molecular weight standards lane 1, total protein in 15- $\mu$ l aliquots of bacterial cells without IPTG; lane 2, total protein after IPTG treatment; lane 3, 20  $\mu$ g of the 15,000 g supernatant fraction; lane 4, AK31 protein (20  $\mu$ g) purified by Ni-NTA affinity chromatography.

## 나. 형질전환벼 육성 및 Southern blot 분석

벼 유래의 AK31 유전자를 발현하는 형질전환벼는 동진벼의 배반에서 유래된 calli와 pGA1611: AK31 binary 유전자를 가진 *Agrobacterium*과 공조배양을 통해 육성하였다(그림 5-2A). AK31 유전자는 항상 발현되는 옥수수 ubiquitin 조절하에 발현되도록 하였다. 19종의 독립적인 형질전환체를 hygromycin 항생제하에서 기내 선발하고, 그 중 9종을 포장으로 옮겨 T<sub>0</sub> 개체를 유지하고 T<sub>1</sub> seeds를 수확하였다. T<sub>0</sub> 형질전환벼에서 AK31 유전자의 전사정도를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 수행하였다. 형질전환벼의 잎 및 대조구의 잎에서 추출한 total RNA로부터 AK31 mRNA의 발현을 분석한 결과, 모든 형질전환벼에서 AK31 유전자의 전사가 일어남을 볼 수 있었고, 대조구인 형질전환하지 않은 벼에서는 AK31 mRNA의 발현이 검정되지 않았다(그림 5-2B). 발현량은 개체마다 달랐으며, line 5, 15 및 19은 최고의 발현량을 보였으며, lines 2, 9, 14, 17, 18 등은 중간적인 수준을 보였다. AK31 유전자가 벼 cDNA 임에도 불구하고 대조구인 형질전환하지 않은 벼의 잎에서는 AK31 mRNA가 전혀 검출되지 않음을 볼때 벼 잎에서 AK31 효소활성이 거의 검출되지 않음을 알 수 있고 이와 같은 결과는 Arase 등의 결과와 일치함을 확인 할 수 있었다(Arase et al., 2003). Arase 등은 TDC 활성은 특정 mutant 벼에 병원균을 접종하고 광 상태에서 미약하게 유도된다는 보고를 하였다.

## 다. 형질전환벼에서 tyramine 및 tryptamine 함량 측정

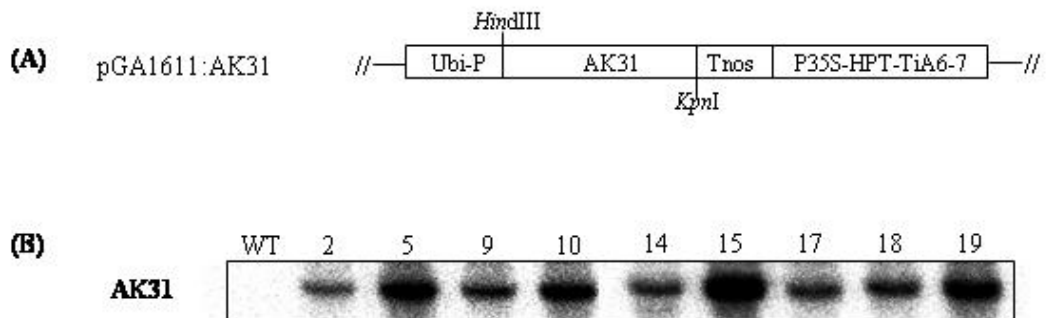
TDC의 과다발현에 의한 형질전환벼에서 효소산물인 tryptamine의 함량이 증대되는지 알고자 T<sub>1</sub> 종자에서 발아시킨 2주된 유묘의 잎에서 tryptamine의 함량을 측정하였다. Tryptamine의 함량은 대조구인 형질전환하지 않은 벼에서 0.3 ug g<sup>-1</sup> fresh weight 정도 검출되었으며, 형질전환 벼에서는 4-5 ug g<sup>-1</sup> fresh weight가 검출되어 형질전환벼내에서 tryptamine 함량이 대조군에 비해 10배 이상 축적됨을 알 수 있었다(그림 5-3). 이에 비해서 tyramine의 함량은 대조구에서 3 ug 정도 검출되었고, 형질전환벼에서도 대조군과 비슷한 수준의 tyramine 함량이 검출되었다. 상기의 결과는 AK31이 TYDC 활성을 갖고 있지 않고, TDC 활성을 갖고 있다는 in vitro 결과와 동일함을 in plant에서 직접 확인 할 수 있었다.

## 라. 종자 및 잎에서 세로토닌 함량 분석

AK31 유전자를 발현하는 형질전환체는 효소산물인 tryptamine의 함량이 대조군 보다 10배나 높았다. 축적된 tryptamine이 벼내에서 항상 발현되는 것으로 알려진 tryptamine 5-hydroxylase 작용에 의해 serotonin으로 전환되는지 알고자 2주된 유묘로부터 serotonin 함량을 측정하였다. 대조군의 경우 세로토닌의 함량은  $0.2 \text{ ug g}^{-1}$  fresh weight 정도였으나, 형질전환체는 모두  $5 \text{ ug g}^{-1}$  fresh weight 정도의 세로토닌이 축적됨을 알 수 있었고, 이는 대조군의 serotonin 함량보다 무려 25배 높은 수치를 보여 주고 있다(그림 5-4). 이렇게 형질전환잎에 축적되는 serotonin 이 T<sub>1</sub> 종자에서도 함량이 높은지 알고자 종자의 현미 및 백미에서도 serotonin 함량이 높은지 분석하였다. 대조군에서는 현미 및 백미에  $0.2$  및  $0.1 \text{ ug g}^{-1}$  dry weight 정도 각각 검출되었으나, 형질전환벼의 현미에서는  $1.2$  에서  $1.8 \text{ ug dry weight}$  정도로 검출되어 대조구 현미보다 6 - 9배 높은 함량을 보여 주었다. 형질전환벼의 백미에서는  $0.5 - 0.8 \text{ ug dry weight}$  로서 대조군보다 5 - 8배 정도 높은 세로토닌이 축적됨을 알 수 있었다.

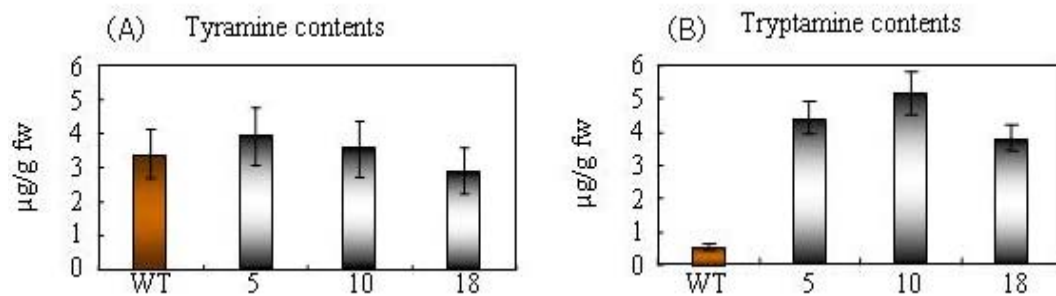
## 마. 형질전환벼에서 세로토닌유도체 함량 측정

잎에서 축적되는 세로토닌이 벼에 있는 SHT 효소에 의해 serotonin 유도체로 변화하는지 보기위해 형질전환벼 잎에서 feruloylserotonin 함량을 측정하여 보았다. 측정한 결과 모든 형질전환체 lines에서 모두 feruloylserotonin의 함량이 대조군과 차이가 없음을 볼 때(그림 5-5), 유묘에서 증가된 세로토닌 함량이 세로토닌유도체 생합성과 직접적으로 연결되어 있지 않음을 볼 수 있었다. 이는 벼의 잎에서 SHT 효소활성이 매우 미약하거나 없기 때문인 것으로 사료된다.

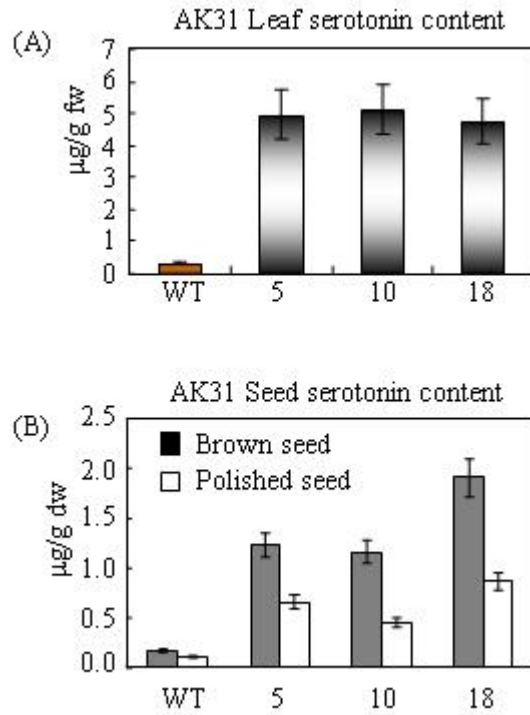


**Fig. 5-2.** Schematic diagram of T-DNA of the pGA1611 binary vectors used for plant transformation (A). Ubi-P, maize ubiquitin promoter; Tnos, nopaline synthase terminator; P35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; HPT, hygromycin phosphotransferase; TiA6-7, TiA6-7 terminator AK31, tryptophan decarboxylase. Northern blot of AK31(B). Total RNA (10  $\mu$ g) was isolated from 8-week-old leaves of transgenic or wild-type rice and blotted onto a nylon membrane (see Materials and methods).

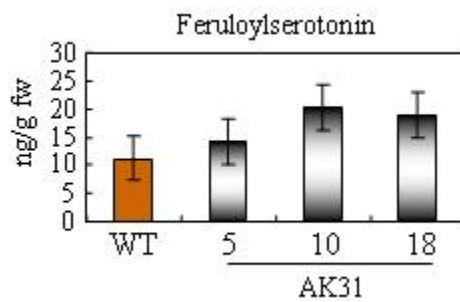




**Fig. 5-3.** Contents of tyramine and tryptamine. 2 week old leaves grown in a half strength Murashige and Skoog medium were subjected to HPLC analysis.



**Fig. 5-4.** Serotonin contents in leaves and seeds. WT; Wild type, 5-10; transformed rice.



**Fig. 5-5.** Quantification of feruloylserotonin in wild type (WT) and transgenic rice leaves (5-18). Two weeks old leaves were employed for extraction which then subjected to HPLC.

## 제 6 절 형질전환벼의 생산성 및 미질특성 연구

### 1. 서 설

SHT, TDC 유전자를 발현하는 형질전환벼의 형태적 특성뿐만 아니라, 이들 형질전환종자의 생산성과, 미질특이성을 조사하고, 윤기치 및 식미관련특성 등을 조사하며, 저장기간에 따른 이들의 특이성도 연구하고자 한다. 본 연구는 기내에서 생산된 벼의 생산성뿐만 아니라, 생산된 종자의 내부적 특성을 동시에 연구하고자 수행하였다.

### 2. 연구 수행 방법

#### 가. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환체의 생산성 측정

Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성을 측정하기 위하여 작물과학원 유전육종과 시험포장에서 재배를 하였다. 시험재료는 2004년 4월 25일 파종하였고, 한달후인 5월 25일에 재배포장에 2열, 1열당 25주씩 주당 1본씩 손으로 이앙을 하였다. 시비관리 및 재배관리는 작물과학원의 표준재배관리법에 준하여 재배를 하였다.

#### 나. 낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 미질 분석

낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 미질을 분석하기 위하여 수확한 시험를 수분함량 15% 로 건조 후 냉장고에 보관하면서 성분분석을 실시하였다. 단백질 분석은 단백질 자동분석기(Kjeltec, 서독)를 이용하여 분석 하였고, 백도는 백도계(Kett, 일본)을 사용하였으며 윤기치는 토요미도미터(Toyo 90A, 일본)를 이용 하였다.

#### 다. 낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석

낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석은 국립농산물품질관리원의 조사규격에 준하여 분석 하였다.

### 3. 연구 수행 결과

#### 가. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 작물학적 특성 조사

Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성을 측정하기 위하여 작물과학원 유전육종과 시험포장에서 재배를 하였다. 시험재료는 2004년 4월 25일 파종하였고, 한달후인 5월 25일에 재배포장에 1주 1본씩 손으로 이앙을 하였다. 시비관리 및 재배관리는 작물과학원의 표준재배관리법에 준하여 재배를 하였다.

시험재료의 작물학적 특성 중 출수기는 낙동벼가 8월 14일 이었고 낙동벼 THT413이 8월 16일로 2일 늦은 반면 낙동벼 THT414는 낙동벼보다 3일 늦은 8월 17일 이었다. 간장은 낙동벼가 75cm인 반면 낙동벼 THT413은 70cm이었고, 낙동벼 THT414는 55cm이었다. 수장은 낙동벼가 20cm이었고, 낙동벼 THT413은 낙동벼와 비슷한 19cm인 반면 낙동벼 THT414는 15cm로 낙동벼와는 완전히 다른 초형을 나타내었다. 그러나 수수는 낙동벼가 9개 인 반면 낙동벼 THT413은 10개 이었고 낙동벼 THT414도 9개로 낙동벼와 비슷한 경향을 보였다. 그렇지만 수당입수는 낙동벼가 108립 이었으나 낙동벼 THT413은 73립이었고, 낙동벼 THT414는 43립에 불과하였다. 등숙율도 낙동벼가 94.9%로 일반품종과 비슷한 경향이었으나 낙동벼 THT413은 90.3%이었고, 낙동벼 THT414는 낙동벼의 절반 수준인 54.9% 정도에 지나지 않았다. 시험재료의 작물학적 특성 중 출수기는 동진벼가 8월 16일 이었고 동진벼 THT41은 8월 17일로 1일 늦은 반면 동진벼 THT42는 동진벼보다 2일 빠른 8월 14일 이었다. 간장은 동진벼가 82cm인 반면 동진벼 THT41은 63cm로 동진벼에 비하여 19cm가 짧았고, 동진벼 THT42는 60cm로 동진벼에 비하여 22cm가 짧았다. 이삭의 길이는 동진벼, 동진벼 THT41, 동진벼 THT42가 각각 21, 19, 14cm로 동진벼 THT41은 동진벼에 비하여 2cm가 짧은 반면 동진벼 THT42는 무려 7cm가 짧았다. 수수는 동진벼와 동진벼 THT41은 9개 인 반면 동진벼 THT42는 10개 이었다. 수당입수는 동진벼가 107립 이었으나 동진벼 THT41은 79립인 반면 동진벼 THT42는 94립이었다. 등숙율은 동진벼가 98.0%인 반면 동진벼 THT41은 82.9%이었고 동진벼 THT42는 78.7%로 동진벼에 비하여 19.3%가 낮았다.

## 나. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 생산성

낙동벼의 생산성을 측정하기 위하여 농촌진흥청 작물과학원 벼 시험포장에서 재배 후 생산된 시험재료를 품위판정기(쌍용기계산업, 한국)로 정현비율을 측정한 결과 낙동벼의 경우 81.2%로 왕겨가 18.8% 이었으나 낙동벼 THT413은 79.2% 이었고, 낙동벼 THT414는 79.8%로 두 계통 모두 낙동벼의 정현비율 보다 1.4~2.0%정도가 낮았는데, 낙동벼 THT413과 낙동벼 THT414의 정현비율은 우리나라에서 재배되는 일반계품종의 정현비율 보다 약 2% 정도가 낮은 경향을 보였다. 동진벼의 정현비율을 측정하기 위하여 농촌진흥청 작물과학원 벼 시험포장에서 재배 후 생산된 시험재료를 품위판정기(쌍용기계산업, 한국)로 측정한 결과 동진벼의 경우 82.8%로 왕겨가 17.2% 이었으나 동진벼 THT41은 79.72% 이었고, 동진벼 THT42는 79.3%로 두 계통 모두 동진벼의 정현비율 보다 3.1~3.5%정도가 낮았는데, 동진벼 THT41과 동진벼 THT42의 정현비율은 낙동벼 형질전환체와 비슷한 수준이었다. 낙동벼의 친립중은 21.6g 으로 일반적인 재배품종과 비슷하였으나 낙동벼 THT413은 23.8g으로 낙동벼에 비하여 친립중이 무거웠고, 낙동벼 THT414는 17.8g으로 낙동벼에 비해 친립중이 가벼웠다. 동진벼의 경우 친립중이 24.8g으로 일반계 품종에 비하여 무거웠으나 동진벼 THT41은 23.2g으로 동진벼에 비하여 가벼웠고, 동진벼 THT42는 18.5g으로 낙동벼 형질전환체에 비하여 가벼웠다. 주당 수량성에서는 낙동벼의 경우 23.8g이었고 낙동벼 THT 413의 경우 15.2g이었던 반면 낙동벼 THT 414는 9.7g 으로 낙동벼의 40.7%이 지나지 않았다. 그러나 동진벼의 주당수량은 동진벼가 29.9g이었고 동진벼 THT 41은 17.7이었던 반면 동진벼 THT 42는 18.0g으로 동진벼의 60.2% 이었다.

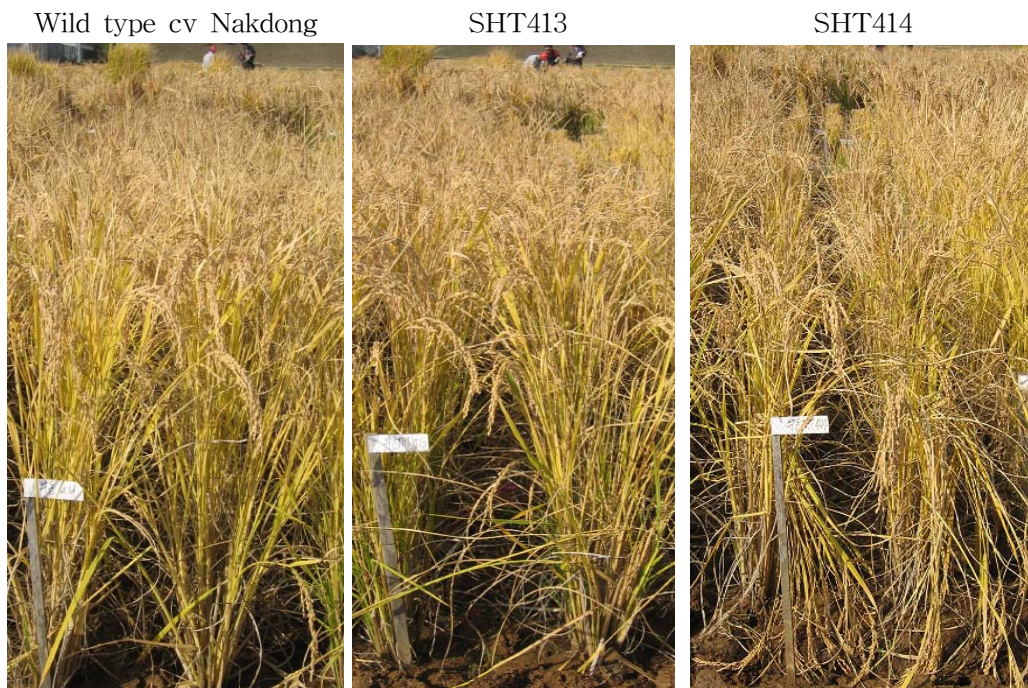
생산성의 중요 인자인 정조 수량은 낙동벼의 경우 300평당 529kg 이었고 낙동벼 THT 413은 337kg 으로 낙동벼의 63.7% 이었으나 낙동벼 THT414는 216kg으로 수량 면에서는 낙동벼의 40.8% 에 지나지 않았다. 동진벼 및 동진벼 형질전환체의 수량성은 동진벼가 664kg 이었고, 동진벼 THT 41 및 동진벼 THT 42는 각각 393, 400kg 으로 동진벼 수량성의 59.2~60.2% 이었다.

## 다. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 현미의 외관특성

낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 미질을 분석하기 위하여 수확한 시험재료를 수분 함량 15% 로 건조 후 냉장고에 보관하면서 성분분석을 실시하였다.

**Table 6-1.** Agronomic characteristics of transgenic rice cultivar, cv Nakdong.

Cultivar	Heading date (m. d)	height (cm)	panicle length (cm)	panicle no	grain/panicle	ripening rate (%)
Nakdong	8. 14	75	20	9	106	94.9
Nakdong SHT413	8. 16	70	19	10	73	90.3
Nakdong SHT414	8. 17	55	15	9	43	54.9



**Fig. 6-1.** Phenotype of wild type Nakdong and transgenic rice (cv. Nakdong).

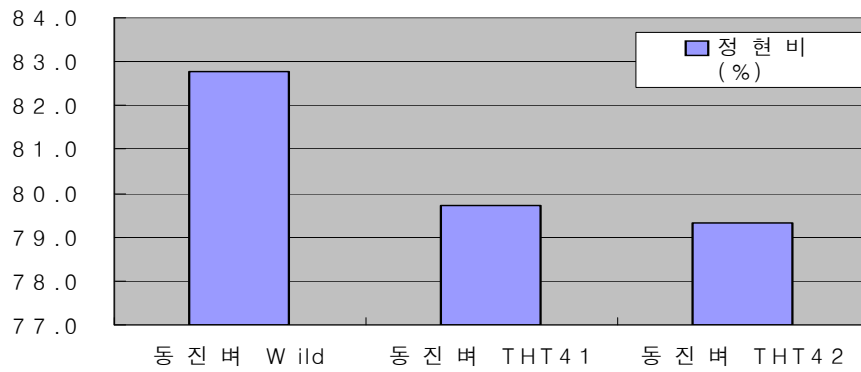
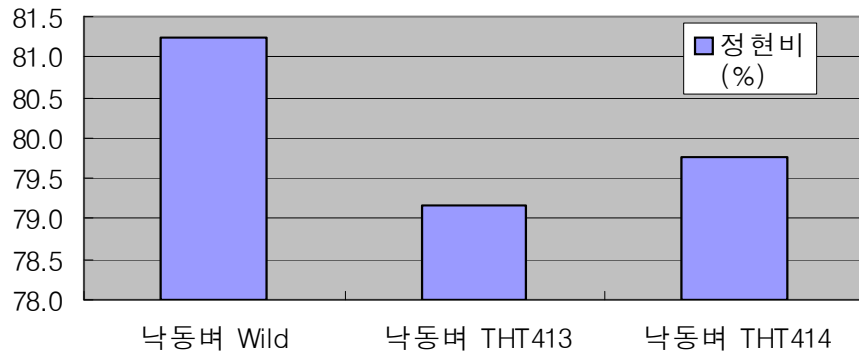




**Fig. 6-2.** Phenotype of wild type Dongjin and transgenic rice (cv. Dongjin).

**Table 6-2.** Agronomic characteristics of transgenic rice cv. Dongjin.

Cultivar	Heading date (m. d)	Height (cm)	Panicle length (cm)	Panicle no	Grain no/panicle	Ripening rate (%)
Dongjin	8. 16	82	21	9	107	98.0
Dongjin SHT41	8. 17	63	19	9	79	82.9
Dongjin SHT42	8. 14	60	14	10	94	78.7



**Fig. 6-3.** Polishing rate of transgenic Nakdong and Dongjin.

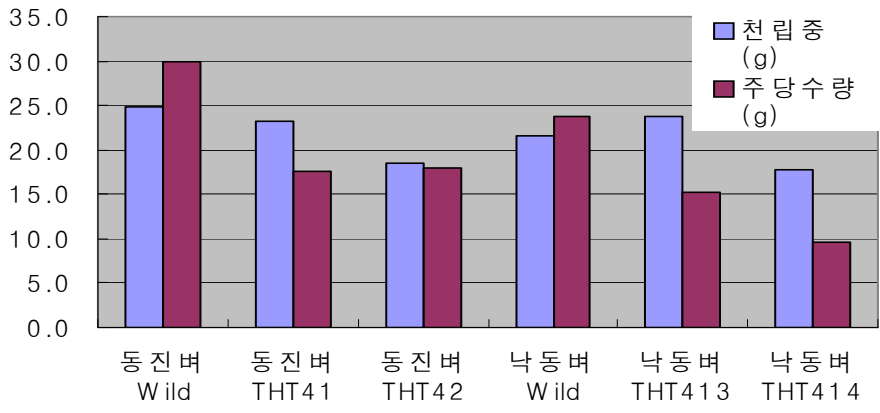
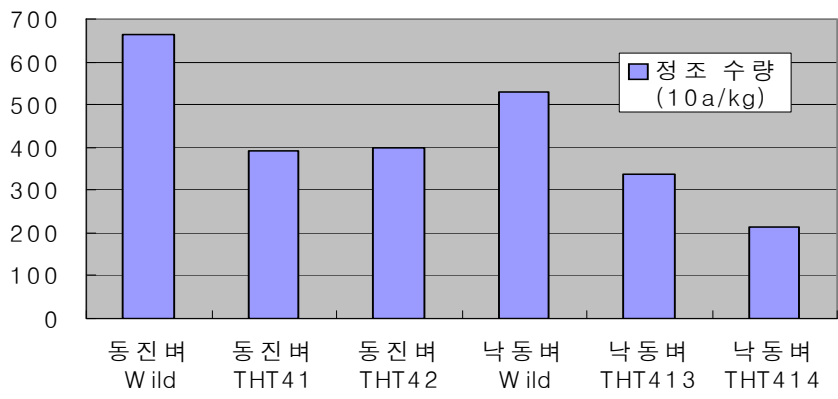


Fig. 6-4. A thousand grain weight and yield per one plant.



**Fig. 6-5.** Yield between wild type and transgenic rice (THT denotes SHT).

현미의 외관특성중 정립율은 낙동벼가 17.6%이었고 낙동벼 THT413이 49.6% 이었으며 낙동벼 THT 414가 27.3%로 낙동벼에 비하여 모두 높은 정립율을 나타내었다. 그러나 동진벼의 경우 정립율이 51.8%로 낙동벼에 비하여 높은 정립율을 나타내었으나 동진벼 THT 41은 17.2%로 가장 낮았으나 동진벼 THT42는 60.9%로 가장 높았다. 현미 중 금간 쌀인 현미 동할립율은 낙동벼, 낙동벼 THT 413, 낙동벼 THT 414가 각각 22.9, 32.0, 8.6% 이었던 반면 동진벼, 동진벼 THT 41, 동진벼 THT 42는 각각 32.1, 14.1, 18.8%이었다. 미숙립은 동진벼 THT 41이 가장높은 58.9% 이었고 그다음으로는 낙동벼가 37.5% 이었으며 낙동벼 THT 413이 가장낮은 9.4% 이었다. 피해립은 동진벼 가 가장낮은 5.9% 이었던 반면 낙동벼는 21.8%로 가장 높았다. 사미는 대부분의 시험재료가 0.1%로 낮은 경향이었다.

#### 라. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 백미의 외관특성

백미의 외관품질 중 정상립은 동진벼 THT 41이 77.4% 로 가장높았고, 동진벼가 69.5% 로 그다음으로 높았으며 동진벼 THT 42는 56.2%로 높았던 반면 낙동벼는 61.3% 이었고, 낙동벼 THT 413은 가장낮은 13.0% 이었으며 낙동벼 THT 414는 28.1% 이었다. 분상질립은 동진벼 THT 41이 가장낮은 3.0% 이었던 반면 동진벼는 14.1% 이었고, 동진벼 THT 42는 30.1% 이었으며 낙동벼는 28.9%이었고 낙동벼 THT 413은 74.3% 로 가장 높았고, 낙동벼 THT 414는 61.5%이었다. 찌라기 비율은 낙동벼 THT 414가 가장낮은 7.6% 이었으며 동진벼 THT 41이 가장 많은 14.2% 이었다.

#### 마. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 윤기치 및 식미관련 특성

낙동벼, 동진벼 및 형질전환체의 식용 가능성을 보기 위하여 취반미의 윤기치를 측정 하였다. 윤기치 측정을 위하여 시료 33g을 칭량한 후 취반용기에 넣고 10분간 가열 한 다음 윤기치 측정기(Toyo 90A, 토요미도메터, 일본)에 넣고 측정을 한 결과 동진벼 및 동진벼 형질전환체 중에서는 동진벼 THT 41이 가장높은 66.4 이었고 동진 THT 42가 64.6 이었으며 동진벼는 58.7 이었고, 낙동벼 및 낙동벼 형질 전환체 에서는 낙동 THT 414가 가장 높은 70.2 이었고, 낙동벼가 그다음으로 높은 60.4 이었으며 낙동벼 THT 413이 가장 낮은 54.7 이었다. 낙동벼 THT 414가 시험재료 중 가장높은 윤기값을 나타낸 것은 피해립의 함량이 가장 높았기 때문으로 판단이 되었다.

**Table 6-3.** Phenotypic characteristics of brown rice between wild type and transgenics.

	brown rice (%)				
	Round	Cracked	Immature	Damaged	Dead grain
Nakdong	17.6	32.1	10.1	5.9	0.1
Nakdong SHT413	49.6	14.1	58.9	9.7	0.1
Nakdong SHT414	27.3	18.8	13.7	6.4	0.2
Dongjin	51.8	32.1	10.1	5.9	0.1
Dongjin SHT41	17.2	14.1	58.9	9.7	0.1
Dongjin SHT42	60.9	18.8	13.7	6.4	0.2

**Table 6-4.** Phenotypic characteristics of polished rice between wild type and transgenics.

	Polished rice		
	Normal	Shattered	Cracked
Nakdong	61.3	28.9	9.0
Nakdong SHT413	13.0	74.3	10.5
Nakdong SHT414	28.1	61.5	7.6
Dongjin	69.5	14.1	10.8
Dongjin SHT41	77.4	3.0	14.2
Dongjin SHT42	56.2	30.1	10.1





**Fig. 6-6.** Phenotypes of wild type and transgenic rice.

**Table 6-5.** Characteristics of glossiness and taste-related index.

	Protein (%)	Whiteness	Glossiness
Nakdong	6.3	57.8	60.4
Nakdong SHT413	6.5	69.1	54.7
Nakdong SHT414	7.5	50.9	70.2
Dongjin	5.9	53.2	58.7
Dongjin SHT41	6.5	52.4	66.4
Dongjin SHT42	6.5	53.9	64.6

식미관련 인자 중 밥의 경도와 관련이 높은 것으로 보고되고 있는 단백질 함량은 동진벼가 가장 낮은 5.9% 이었고, 낙동벼가 그다음으로 낮은 6.3% 이었으며 동진벼 THT 41, 동진벼 THT 42와 낙동벼 THT 413이 6.3% 이었다. 낙동벼 THT 414는 가장 높은 7.5%의 단백질 함량을 나타내었다. 시험재료를 백미로 가공 후 측정된 백미의 백도는 우리나라에서 재배되는 일반쌀의 경우 38정도인데 시험재료의 경우 대부분이 50 이상으로 높은 백도값을 나타내었다. 그중 낙동벼 THT 414가 가장 낮은 50.9 인 반면 낙동벼 THT 413은 백도값이 가장 높은 69.1 이었고, 동진벼와 동진벼 형질전환체는 52.4~53.9의 백도값을 나타내었다.

#### 바. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 작물학적 특성 조사

Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환체의 생산성을 측정하기 위하여 작물과학원 남양시험지 시험포장에서 재배를 하였다. 시험재료는 2005년 4월 26일 파종하였고, 30일간 육묘하여 5월 26일에 재배포장에 1주 1본씩 손으로 이앙을 하였다. 시비관리 및 재배관리는 작물과학원의 표준재배관리법에 준하여 재배 하였는데, 질소질 비료는 300평당 18kg을 시비하였다.

낙동벼와 낙동벼 THT 413의 작물학적 특성 중 출수기는 낙동벼와 낙동벼 THT 413 모두 8월 15일 이었다. 간장은 낙동벼가 88cm인 반면 낙동벼THT413은 85cm 이었다. 수장은 낙동벼가 19.1cm이었고, 낙동벼 THT 413은 낙동벼보다 조금 작은 18.8cm 이었다. 그러나 수수는 낙동벼가 16.7개인 반면 낙동벼 THT 413은 낙동벼 보다 1.4개가 적은 15.3개 이었다. 그렇지만 수당입수는 낙동벼가 70립 이었으나 낙동벼 THT 413은 74립으로 낙동벼 보다 4립이 많았다. 등숙비율은 낙동벼가 94.5%로 입반품종과 비슷한 경향이었으나 낙동벼 THT 413은 82.1% 로 낙동벼에 비하여 12.4%가 적었다. 동진벼와 동진벼 THT 41의 작물학적 특성 중 출수기는 동진벼와 동진벼 THT 모두 8월 17일 이었고 간장은 동진벼가 69cm인 반면 동진벼 THT 41은 81cm로 동진벼에 비하여 12cm가 길었다. 수장(이삭 길이)은 동진벼가 17.6cm 이었으나 동진벼 THT 41은 20.6cm로 동진벼에 비하여 3cm가 길었다. 수수는 동진벼와 동진벼 THT 41은 각각 13.7, 16.2개로 동진벼 THT 41이 동진벼에 비하여 2.5개가 많았다. 수당입수는 동진벼가 88립, 동진벼 THT 41은 87립으로 큰 차이가 없었으나 등숙율은 동진벼와 동진벼 THT 41이 큰 차이가 있었다. 즉 동진벼가 96.2%인 반면 동진벼 THT41은 72.79% 로 동진벼에 비해 23.5%가 낮았다.

#### 사. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 생산성

낙동벼와 동진벼 및 이들 형질 전환체의 생산성을 분석하기 위하여 농촌진흥청 작물과 학원 남양시험지 시험포장에서 재배 후 수확한 시험재료를 품위판정기(쌍용기계산업, 한국)로 정현비율을 측정된 결과 낙동벼의 경우 83.3%로 왕겨가 16.7% 이었으나 낙동벼 THT 413은 81.8% 이었고, 낙동벼의 정현비율은 우리나라에서 재배되는 일반계품종의 정현비율보다 약 1.3% 정도가 높은 반면 낙동벼 THT 413은 비슷한 수준 이었다. 동진벼의 정현비율은 80.8%로 왕겨가 19.2% 이었으나 동진벼 THT 41은 81.3% 로 동진벼 보다 0.5%가 높았으나 우리나라 일반품종의 정현비율 82.0% 보다는 모두 낮았다.

쌀의 생산성과 관련이 높은 현백율은 낙동벼가 90.1%, 낙동벼 THT 413이 87.4%로 낙동벼 형질전환체가 낙동벼에 비해 2.7%가 낮았고, 동진벼는 90.7%로 동진벼 형질전환체의 현백율 89.6%보다 1.1%가 높았다. 낙동벼와 동진벼 및 이들 형질전환체의 도정율은 각각 75.1%(낙동벼), 71.5%(낙동벼 THT 413), 73.3%(동진벼), 72.9%(동진벼 THT 41) 이었다. 이들 시험재료의 도정율은 우리나라에서 많이 재배되고 있는 일반품종 벼의 도정율과 비슷하거나 약간 낮은 경향 이었다.

천립중은 낙동벼, 낙동벼 THT 413, 동진벼, 동진벼 THT 41이 각각 20.9g, 22.7g, 23.2g, 21.7g이었다. 낙동벼의 형질전환체는 낙동벼에 비하여 1.8g이 무거웠으나 동진벼의 형질전환체는 동진벼에 비하여 1.5g이 가벼웠다. 300평당 수량성중 정조는 낙동벼가 714kg이었고 낙동벼 THT 413은 552kg이었으며 동진벼는 696kg, 동진벼 THT 41은 578kg 이었다. 현미의 수량성은 낙동벼가 595kg이었고 낙동벼 THT 413은 451kg이었으며 동진벼는 563kg, 동진벼 THT 41은 470kg 이었으며, 백미의 수량성은 낙동벼가 535.8kg이었고 낙동벼 THT 413은 394.6kg이었으며 동진벼는 510.2kg, 동진벼 THT 41은 420.8kg 이었다.

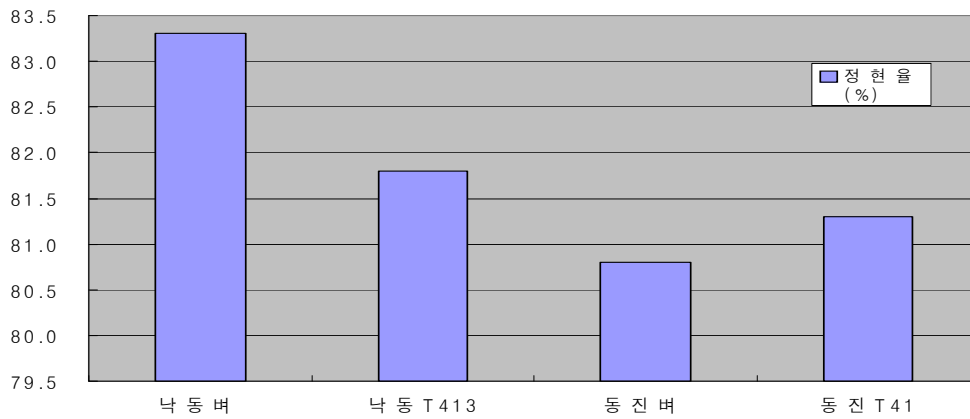
#### 아. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 현미의 외관특성

낙동벼, 동진벼 및 그 형질전환체의 미질을 분석하기 위하여 수확한 시험재료를 수분함량 15% 로 건조 후 냉장고에 보관하면서 성분분석을 실시하였다.

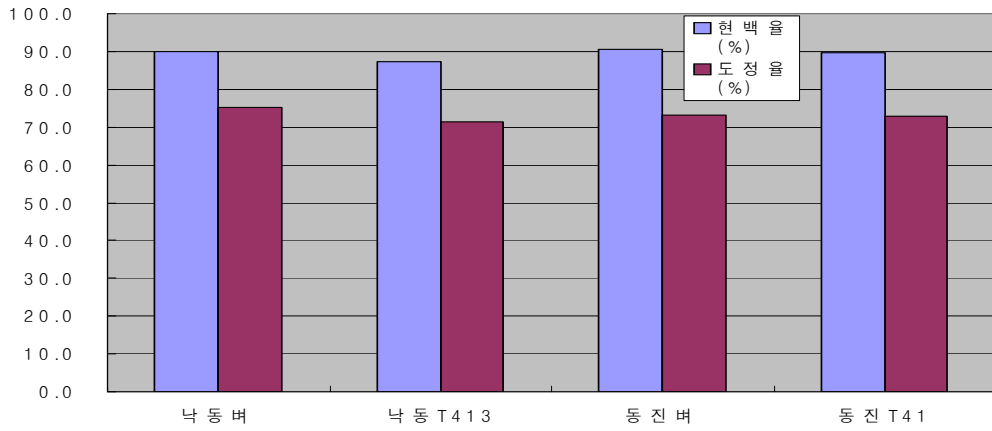
현미의 심백 및 복백의 발현정도는 농업과학기술 연구조사분석기준에 의거하여 0부터 9까지 9단계로 구분하여 조사하였다. 즉 심백 혹은 복백이 전혀 없는 정도를 0으로 하고, 쌀알 면적의 5%이하를 1, 6~10%를 3, 11~20%를 5, 21~40%를 7, 41% 이상을 9로 하였다. 낙동벼는 심백과 복백이 전혀없는 0이었던 반면 낙동벼 THT 413은 심백이 3, 복백이 5정

**Table 6-6.** Agronomic characteristics of transgenic rice plants, Nakdong and Dongjin.

Cultivars	Heading data (m. d)	Height (cm)	Panicle length (cm)	Panicle no	Grain no/panicle	Ripening rate (%)
Nakdong	8. 15	88	19.1	16.7	70	94.5
Nakdong SHT 413	8. 15	85	18.8	15.3	74	82.1
Dongjin	8. 17	69	17.6	13.7	88	96.2
Dongjin SHT41	8. 17	81	20.6	16.2	87	72.8



**Fig. 6-7.** Polishing rate of transgenic rice seeds.



**Fig. 6-8.** Milling ratio and polished rice per brown rice

도이었으나 동진벼와 동진벼 THT 41은 심백과 복백 모두 0 이었다. 낙동벼 현미의 정립율이 92.11%로 낙동벼THT 413의 정립율 95.79%에 비하여 3.68%가 낮았으나, 동진벼의 경우는 동진벼 THT 41의 현미 정립율 92.95%에 비해 0.44%가 낮은 92.51% 이었다. 미숙립은 낙동벼가 가장 많은 4.62%이었고, 낙동벼 THT 413이 0.23% 이었으며 동진벼는 미숙립이 없었으나, 동진벼 THT 41은 0.05% 이었다. 피해립은 낙동벼가 3.09% 이었고 낙동벼 THT 413이 3.57% 이었던 반면 동진벼는 7.09%이었고, 동진벼 THT 41은 6.77% 이었다. 싸라기율은 낙동벼 THT 413이 가장 많은 0.41% 이었고, 그다음이 동진벼로서 0.29% 이었으며 그다음으로는 동진벼 THT 41이 0.16% 이었고, 낙동벼는 0.07% 로 가장 낮았다. 사미는 낙동벼, 동진벼 및, 동진벼 THT 41이 각각 0.11%, 0.10%, 0.07%이었으나 낙동벼 THT 413은 사미가 전혀 없었다.

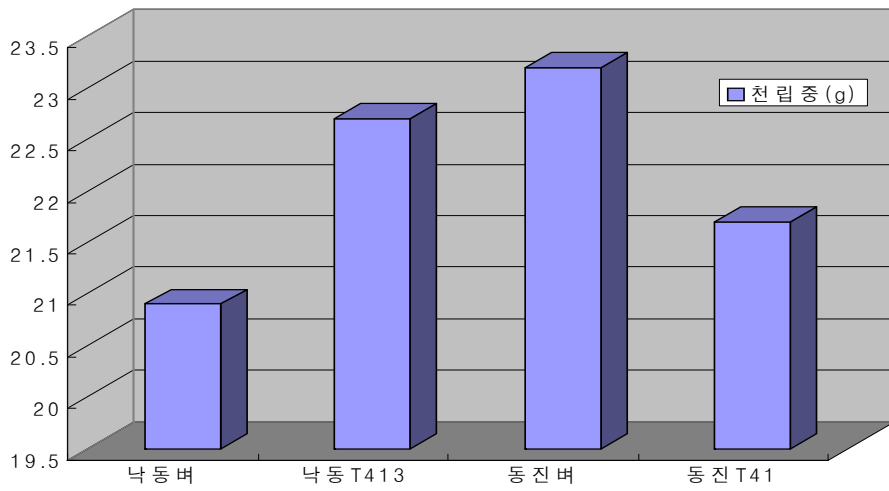
#### 자. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼 백미의 외관품질

낙동벼, 동진벼와 그들 형질전환체의 백미 외관 특성을 조사한 결과 백미의 완전미율은 낙동벼가 90.2%이었고, 동진벼 백미의 완전미율은 낙동벼 보다 1.7%가 높은 91.9% 이었고 동진벼 형질전환체인 동진벼 THT 41은 낙동벼 보다 1.8%가 높았다. 그러나 낙동벼 THT 413은 가장 낮은 25.6% 이었다. 백미의 외관품질 상품성과 관련이 높은 분상질립율은 동진벼와 동진벼 형질전환체가 각각 0.5, 0.6% 이었던 반면 낙동벼는 2.1%로 동진벼보다 높았고, 낙동벼 형질전환체는 53.9%로 시험재료 중 가장 분상질립율이 높았다. 백미의 싸라기율은 낙동벼가 2.4%, 낙동벼 THT 413이 4.1%로 낙동벼에 비해 약 2배정도가 많았다. 동진벼의 경우 싸라기율이 1.7% 이었으나 동진벼 THT 41은 2.0%로 동진벼에 비해 큰 차이가 없었다.

#### 차. Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환 낙동벼와 동진벼의 윤기치 및 식미관련 특성

낙동벼, 동진벼 및 형질전환체의 식용 가능성을 보기 위하여 시험재료를 윤기측정기에서 윤기치를 측정 하였다. 윤기치 측정은 33g을 칭량한 후 취반용기에 넣고 10분간 가열 한 다음 윤기치 측정기(Toyo 90A, 토요미도메터, 일본)에 넣고 측정을 하였는데, 동진벼 및 동진벼 THT 41이 각각 76.3, 79.2로 동진벼 THT41이 동진벼에 비하여 2.9가 높았고 낙동벼 및 낙동벼 형질 전환체에서는 낙동벼가 71.2로 낙동벼 THT 413의 63.4에 비하여 7.8이 높았다. 쌀을 취반하고 난 후 밥의 경도와 관련이 높은 것으로 보고되고 있는 단백질 함량은 낙동벼 THT 413이 6.1%로 낙동벼의 6.2%보다 낮았고, 동진벼가 6.3% 이었던 반면





**Fig. 6-9.** A thousand grain weight of transgenic rice plants.

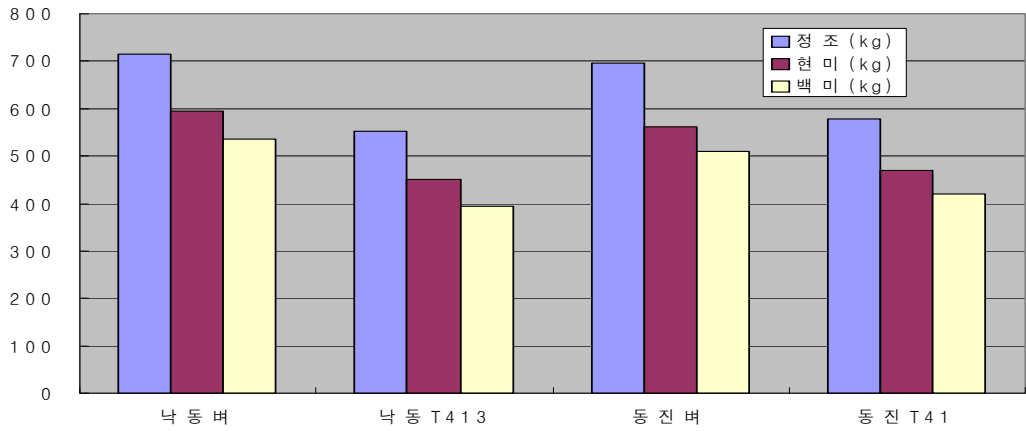


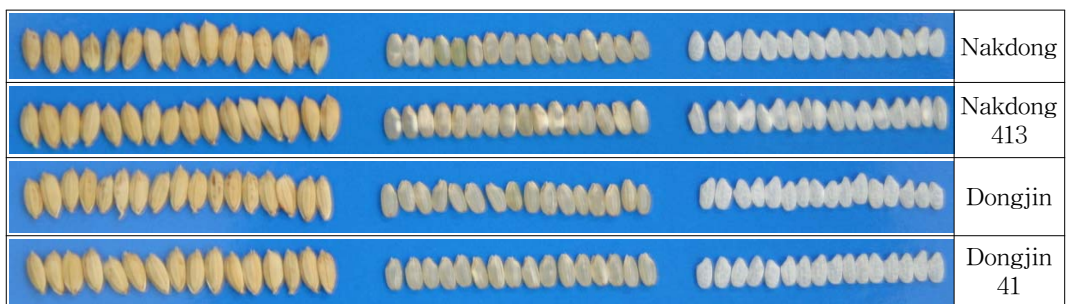
Fig. 6-10. Yield per 10a by gross, brown rice, polished rice.

**Table 6-7.** The degree of white center rice and chalky grain in the transgenic rice.

	Nakdong	Nakdong SHT 413	Dongjin	Dongjin SHT41
White center rice	0	3	0	0
Chalky grain	0	5	0	0

**Table 6-8.** Quality of transgenic brown rice.

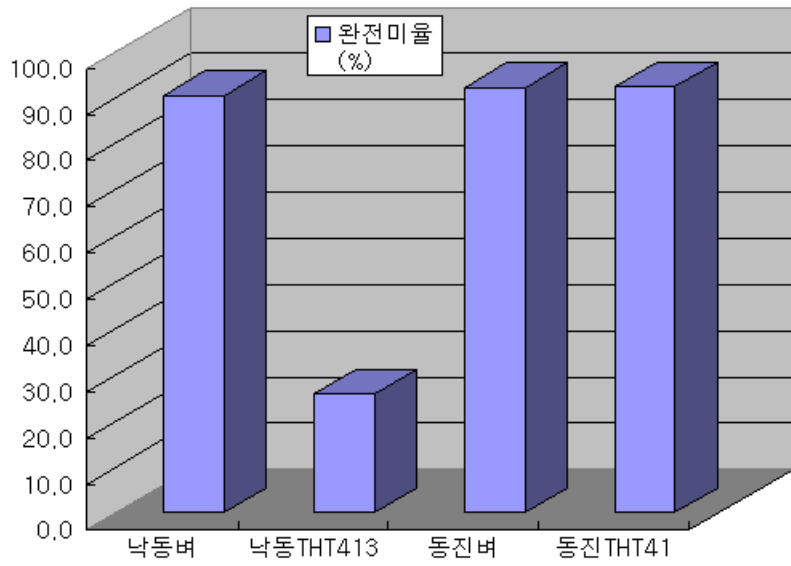
	Quality of brown rice (%)				
	Crystalline grain	Unripened grain	Damaged grain	Broken rice	Dead rice
Nakdong	92.11	4.62	3.09	0.07	0.11
Nakdong SHT413	95.79	0.23	3.57	0.41	0.00
Dongjin	92.51	0.00	7.09	0.29	0.10
Dongjin SHT41	92.95	0.05	6.77	0.16	0.07



**Fig. 6-11.** Appearance of brown rice and polished rice in the transgenic rice.

**Table 6-9.** Quality of polished rice in the transgenic rice.

	Quality of polished rice(%)			
	Perfect kernel	Mealy kernel	Broken rice	Dead rice
Nakdong	90.2	2.1	2.4	5.3
Nakdong SHT 413	25.6	53.9	4.1	16.4
Dongjin	91.9	0.5	1.7	5.9
Dongjin SHT 41	92.0	0.6	2.0	5.4



**Fig. 6-12.** Ratio of perfect rice in transgenic rice.

THT 41이 6.6%로 시험재료 중에서는 가장 높았다. 시험재료를 백미로 가공 후 측정된 백도는 우리나라에서 재배되는 일반 쌀의 경우 38정도로 보고되고 있는데, 낙동벼가 37.1로 가장 낮았고, 낙동벼 THT 41이 41.2로 낙동벼에 비하여 4.1이 높았다. 그러나 동진벼와 동진벼 THT 41의 경우는 백도가 비슷한 수준으로서 각각 37.5와 37.3 이었다.

#### 카. 낙동벼, 동진벼 및 형질전환체의 저장기간과 저장온도별 이화학특성

낙동벼, 동진벼 및 이들 형질전환체 시료를 저온창고(15℃)와 상온창고에 저장하면서 10일 간격으로 수분, 단백질, 아밀로스, 백도, 윤기치, 지방산도등을 분석하였다. 대부분의 시료와 저장조건에 관계없이 저장기간이 지날수록 단백질, 수분, 아밀로스, 윤기치는 낮아지는 경향이었으나 백도와 지방산도는 증가하는 경향인데 이는 저장 중 수분이 감소하였기 때문으로 생각 된다. 지방산도는 저장성을 판가름하는 주요한 지표중의 한가지 인데, 품종에 관계없이 저장기간이 길수록 증가하였는데 특히 상온저장이 저온저장에 비하여 많이 증가 하였다. 입고시의 지방산도가 1.7 mgKOH/100g 이었던 것이 15℃의 저온창고에서 60일간 저장 후에는 3.4 mgKOH/100g가 된 반면 상온창고에서 60일간 저장 후에는 3.5 mgKOH/100g 으로 지속적인 증가현상을 보였다. 윤기치는 입고시에 비하여 저장 30일까지 증가하다가 그 이후에 다시 낮아지는 경향 이었는데 이러한 경향은 저장온도와 시험재료에 상관없이 비슷하였다. 동진벼의 경우 저온저장과 상온저장 모두 저장기간 40일까지는 윤기치가 증가하다가 그 이후 감소하였다. 그러나 동진벼 THT41의 경우에는 저온 저장 시에는 40일 이후 윤기치가 감소하였으나 상온 저장 시에는 낙동벼와 같이 저장 30일에 최고치를 나타내다가 그 이후 감소하였다. 입고시 지방산도는 동진벼가 1.1 mgKOH/100g 이었고 동진벼 THT 41이 1.3이었던가 저장기간이 경과함에 따라 증가하여 동진벼 저온저장의 경우 60일 이후에는 2.1 mgKOH/100g로 증가 하였으나 상온 저장시에는 60일 후에 2.2로 증가하였다. 동진벼 THT 41은 지방산도가 입고시 1.3 mgKOH/100g이던 것이 저온 저장시 60일 후에는 2.0 mgKOH/100g, 상온저장시에는 2.1 mgKOH/100g으로 증가하였다.

#### 타. 낙동벼, 동진벼 및 형질전환체의 저장기간과 저장온도별 알칼리 붕괴도

낙동벼와 동진벼 및 이들 형질전환체의 알칼리 붕괴도 분석을 위하여 저장기간별, 저장온도별로 60일 저장 후 1.4% KOH 용액에 쌀알 6립을 넣고, 30℃ 항온기에서 24시간 정치 후 퍼짐정도와 투명도를 조사하였다. 퍼짐정도와 투명도는 낙동벼, 동진벼 및 이들 형질전환체 모두 7 정도의 붕괴도를 보였고, 저장기간이나 저장온도에 따른 변화는 볼 수 없었다.



**Table 6-10.** Characteristics of glossiness and taste-related index.

	Protein (%)	Whiteness	Glossiness
Nakdong	6.2	37.1	71.2
Nakdong SHT413	6.1	41.2	63.4
Dongjin	6.3	37.5	76.3
Dongjin SHT41	6.6	37.3	79.2

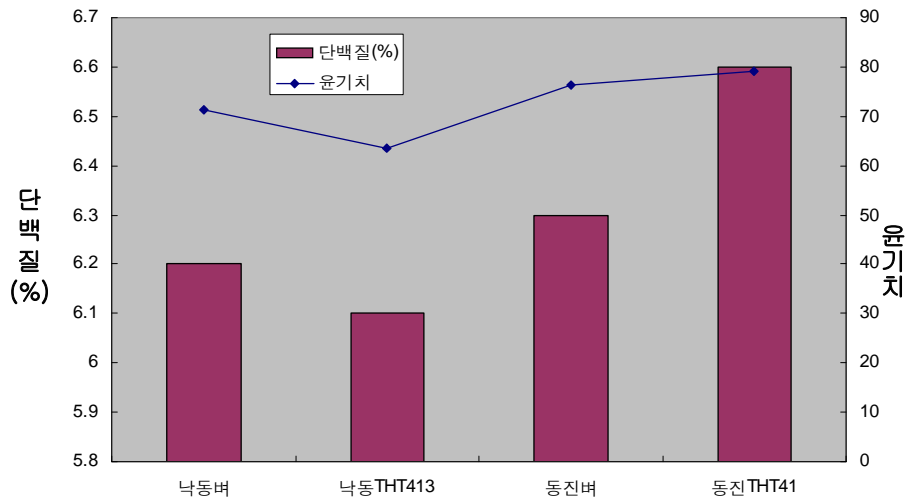


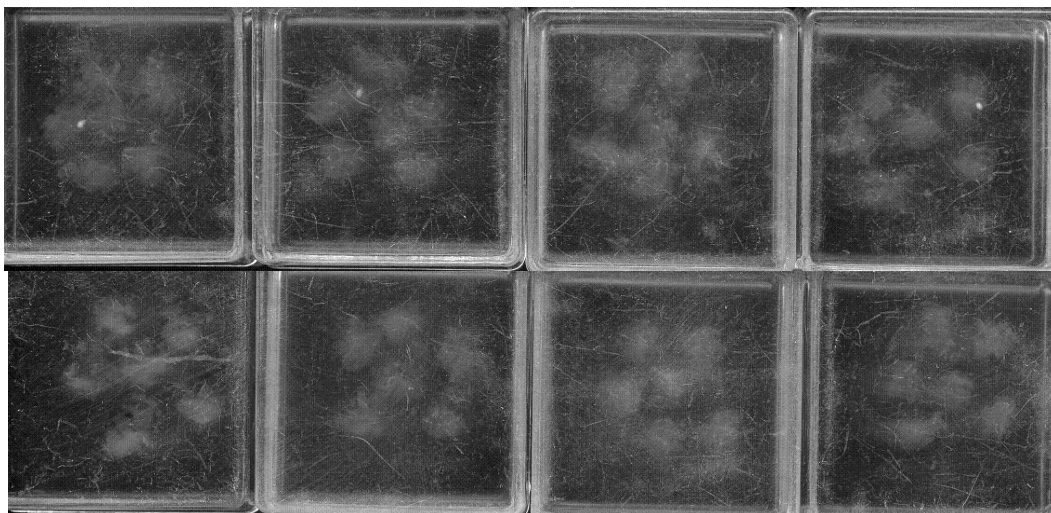
Fig. 6-13. Glossiness and protein contents in transgenic rice seeds.

**Table 6-11.** Biochemical features of transgenic polished seeds (cv Nakdong) by storage period and temperature.

Cultivar	Temp	Days after treatments	Protein (%)	Moisture (%)	Amylose (%)	Whiteness	Glossiness	Fat acidity (mgKOH/100g)
Nakdong	15°C	0	6.2	14.2	18.3	37.1	71.2	1.7
		10	6.2	14.1	18.3	37.1	71.2	1.8
		20	6.2	14.0	18.2	37.4	78.8	2.4
		30	6.1	14.0	17.3	37.5	79.1	2.5
		40	6.0	14.0	17.3	37.5	69.0	3.1
		50	6.0	13.9	17.2	37.7	70.1	3.3
		60	6.0	13.9	17.1	37.8	71.7	3.4
	Room Temp.	0	6.2	14.2	18.3	37.1	71.2	1.7
		10	6.2	14.1	18.2	37.1	71.2	2.5
		20	6.3	14.0	18.2	37.2	77.2	2.6
		30	6.1	13.9	17.2	37.2	80.6	2.5
		40	6.1	13.8	17.2	37.4	79.4	3.2
		50	6.1	13.8	17.2	37.4	70.7	3.5
		60	6.1	13.8	17.0	37.6	69.0	3.5
Nakdong SHT413	15°C	0	6.1	14.4	19.9	41.2	62.3	3.8
		10	6.1	14.4	19.7	41.2	62.3	3.9
		20	6.1	14.4	19.5	41.8	62.2	5.1
		30	6.1	14.3	19.0	41.5	62.1	5.4
		40	6.0	14.3	19.0	41.6	62.0	6.5
		50	6.1	14.3	19.0	41.7	61.8	6.6
		60	5.9	14.2	19.0	41.8	61.3	6.6
	Room Temp.	0	6.1	14.4	19.9	41.2	62.3	3.8
		10	6.1	14.3	19.9	41.2	63.1	3.8
		20	6.1	14.3	19.3	41.3	63.4	5.0
		30	6.0	14.3	19.0	41.2	63.5	5.2
		40	6.0	14.2	19.1	41.7	62.2	6.0
		50	6.0	14.1	19.0	41.5	62.2	6.9
		60	5.9	14.1	19.3	41.4	61.6	7.2

**Table 6-12.** Biochemical features of transgenic polished seeds (cv Dongjin) by storage period and temperature.

Cultivar	Temp	Days after treatments	Protein (%)	Moisture (%)	Amylose (%)	Whiteness	Glossiness	Fat acidity (mgKOH/100g)
Dongjin	15°C	0	6.3	14.1	18.5	37.5	76.3	1.1
		10	6.3	14.1	18.5	37.5	76.7	1.3
		20	6.3	14.1	18.7	37.5	77.5	1.6
		30	6.3	14.0	17.9	37.6	77.8	1.8
		40	6.2	14.0	17.9	37.5	80.1	1.9
		50	6.2	13.9	17.8	37.6	79.0	1.9
		60	6.2	13.9	17.6	37.7	78.6	2.1
	Room Temp.	0	6.3	14.1	18.5	37.5	76.3	1.1
		10	6.4	14.1	18.7	37.5	76.3	1.1
		20	6.4	14.1	18.7	37.5	78.4	1.5
		30	6.3	13.9	17.8	37.6	78.7	1.5
		40	6.3	13.8	17.7	37.7	77.9	2.0
		50	6.3	13.8	17.7	37.7	77.2	2.0
		60	6.2	13.8	17.6	38.2	77.4	2.2
Dongjin SHT 41	15°C	0	6.6	14.0	18.3	37.3	77.3	1.3
		10	6.6	14.0	18.3	37.3	77.3	1.3
		20	6.5	14.0	18.3	37.3	74.3	1.6
		30	6.4	14.0	17.7	37.7	75.5	1.5
		40	6.4	13.9	17.4	37.8	79.0	2.0
		50	6.4	13.8	17.6	37.8	78.0	2.0
		60	6.4	13.9	17.5	38.0	77.3	2.0
	Room Temp.	0	6.6	14.0	18.7	37.3	77.3	1.3
		10	6.6	14.1	18.7	37.3	78.1	1.3
		20	6.4	14.0	18.5	37.2	78.3	1.3
		30	6.4	13.9	17.7	37.2	78.7	1.5
		40	6.4	13.8	17.6	37.1	74.2	2.1
		50	6.4	13.7	17.6	37.1	77.9	2.1
		60	6.4	13.7	17.5	37.1	77.3	2.2



**Fig. 6-14.** Degree of alkali lysis of transgenic rice seeds by storage temperature and period. Upper lane: from left to right; Nakdong, Nakdong SHT413, Dongjin, Dongjin SHT41. Lower lane: 60 days after from left to right; Nakdong, Nakdong SHT413, Dongjin, Dongjin SHT41.

## 제 7 절 Serotonin 고 함유 형질전환 벼의 생산성 및 미질특성 연구

### 1. 서 설

TDC 유전자를 발현하는 형질전환벼는 현미 및 백미에 그램중 당 1 ug 정도의 높은 serotonin을 함유한다. 이들 고 세로토닌 축적 벼의 형태적 특성뿐만 아니라, 이들 형질전환종자의 생산성과, 미질특이성을 조사하고, 윤기치 및 식미관련특성 등을 조사하며, 저장 기간에 따른 이들의 특이성도 연구하고자 한다. 본 연구는 기내에서 생산된 벼의 생산성뿐만 아니라, 생산된 종자의 내부적 특성을 동시에 연구하고자 수행하였다.

### 2. 연구 수행 방법

#### 가. Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성 측정

Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 생산성을 측정하기 위하여 작물과학원 벼 윤종은실에서 재배를 하였다. 시험재료는 2006년 12월 5일 파종하였고, 12월 23일에 재식거리 15×7cm, 주당 1본씩 손으로 이앙을 하였다. 시비량은 온실에서 재배하는 관계로 일반 표준재배와 달리 질소-인산-칼리비료를 5-3-4kg/10a 시비하였고, 일반관리는 작물과학원의 표준재배관리법에 준하여 재배를 하였다.

#### 나. 형질전환체의 미질 분석

낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 미질을 분석하기 위하여 수확한 시험를 수분함량 15% 로 건조 후 냉장고에 보관하면서 성분분석을 실시하였다. 단백질 분석은 단백질 자동분석기(Kjeltec, 서독)를 이용하여 분석 하였고, 백도는 백도계(Kett, 일본)을 사용하였으며 윤기치는 토요미도메터(Toyo 90A, 일본)를 이용하였다. 쌀의 아미로스함량 측정은 아밀로스가 그의 나선구조속에 요드분자를 결합시켜 안정된 청자색 혼합물을 형성시키는 특성을 이용하여 아밀로스 요드 혼합물의 청색을 가장 많이 흡수하는 비색계의 적색과장에서의

흡광도에 의해 검정한다. 알칼리붕괴도는 백미 6립을 1.4% KOH 용액 20ml에 침지하여 30°C 항온기에서 24시간 정치 후 퍼짐도(spreading)와 투명도(clearing)를 1~7등급으로 조사한다.

#### 다. 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석

낙동벼, 동진벼 및 그의 형질전환체의 현미 및 백미의 외관분석은 국립농산물품질관리원의 조사규격에 준하여 분석 하였다. T<sub>4</sub> 형질전환벼의 제현율, 현백율, 도정율 등 도정특성과 완전미율, 찌라기율, 심·복백율 등 쌀의 외관품위 및 단백질 함량을 분석한다.

### 3. 연구 수행 결과

#### 가. Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환 벼의 작물학적 특성 조사

Ubiquitin : SHT 발현 T<sub>1</sub> 형질전환체의 생산성을 조사하기 위하여 작물과학원 온실에서 재배를 하였다. 시험재료는 2006년 12월 5일 파종하였고, 12월 23일에 재식거리 15×7cm, 주당 1본씩 손으로 이앙을 하였다. 시비량은 온실에서 재배하는 관계로 일반 표준재배와 달리 질소-인산-칼리비료를 5-3-4kg/10a 시비하였고, 일반관리는 작물과학원의 표준재배 관리법에 준하여 재배를 하였다.

동진벼와 동진벼 형질전환체의 작물학적 특성 중 출수기는 동진벼는 2월 20일이었고 동진벼 형질전환체 모두 2월 24일 이었으며, 간장은 동진벼가 60cm인 반면 동진벼 T2-9는 55cm, T2-10은 56, T2-14는 60, T2-18은 50cm로 동진벼에 비하여 1~5cm가 짧았다. 수장(이삭 길이)은 동진벼가 12.9cm 이었으나 동진벼 형질전환체인 T2-9는 12.4, T2-10은 12.7, T2-18은 11.2cm로 동진벼에 비하여 0.2~1.7cm가 짧았으나 T2-14는 15.2cm로 동진벼보다 2.3cm길었다. 이삭수는 동진벼가 포기당 3.6개였고 T2-9는 4.1개, T2-14는 3.7개로 동진벼보다 많았으나 T2-10, T2-18은 동진벼보다 적었다. 수당입수는 동진벼가 35립, 형질전환체는 28~33개로 동진벼보다 적었고 등숙율도 현저히 낮았다(표 7-1). 이는 온실조건에서 재배되어 정상적인 벼의 특성이 나타나지 않은 상태였으므로 작물학적인 고유 특성을 평가하기는 어려운 것으로 판단된다.

**Table 7-1.** Agronomic characteristics of transgenic rice cultivar, cv Dongjin

Cultivar	Heading date (m. d)	Height (cm)	Panicle length (cm)	panicle no.	Grain no./panicle	Ripening rate (%)
Dongjin	2. 20	60	12.9	3.6	35	64
Dongjin T2-9	2. 24	55	12.4	4.1	30	5
Dongjin T2-10	2. 24	56	12.7	3.3	33	6
Dongjin T2-14	2. 24	59	15.2	3.7	28	4
Dongjin T2-18	2. 24	50	11.2	3.0	28	4



## 나. Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환 동진벼의 생산성

동진벼와 이들 형질 전환체의 생산성을 분석하기 위하여 농촌진흥청 작물과학원 온실에서 재배 후 수확한 시험재료를 품위판정기(쌍용기계산업, 한국)로 정현비율을 측정하고 결과 동진벼의 경우 83.7%로 왕겨가 16.3% 이었으나 T2-9는 78.6%로 왕겨의 비율이 21.4%로 가장 높았고, T2-10은 79.9, T2-14는 79.8%, T2-18은 79%로 형질전환체 모두가 동진벼보다 낮은 것으로 조사되었다(그림 7-1).

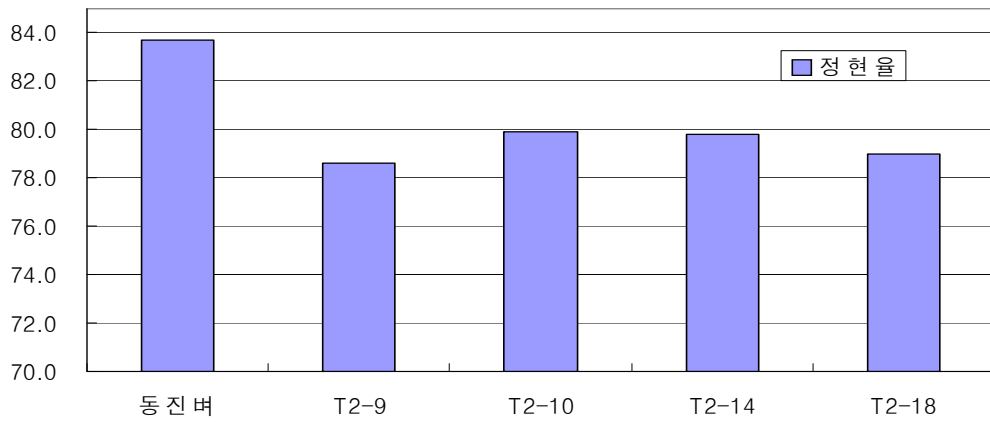
## 다. Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체와 동진벼 현미의 외관특성

동진벼와 그 형질전환체의 미질을 분석하기 위하여 수확한 시험재료를 수분함량 15%로 건조 후 냉장고에 보관하면서 성분분석을 실시하였다. 현미의 심백 및 복백의 발현 정도는 농업과학기술 연구조사분석기준에 의거하여 0부터 9까지 9단계로 구분하여 조사하였다. 즉 심백 혹은 복백이 전혀 없는 정도를 0으로 하고, 쌀알 면적의 5%이하를 1, 6~10%를 3, 11~20%를 5, 21~40%를 7, 41% 이상을 9로 하였다. 동진벼는 심백과 복백이 전혀 없는 0이었고 형질전환체 중 T2-9와 T2-18은 모두 다 동진벼와 같은 반면에 T2-10과 T2-14는 심백과 복백 모두다 1정도 였다(표 7-2).

동진벼의 현미 정립율이 96.8%이었고 T2-10이 97.1%로 가장 높았고 T2-9가 90.8%로 가장 낮았다(표 7-3). 이는 피해립의 비율이 6.4%로 다른 계통에 비하여 월등히 낮은 것으로 조사 되었다. 미숙립은 계통에 따라 1.5%~2.8%의 분포를 보이고 있었고 싸라기와 사미는 계통간에 많은 차이를 보이지는 않았다.

## 라. Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체와 동진벼 백미의 외관품질

동진벼와 이들 형질전환체의 백미 외관 특성을 조사한 결과 백미의 완전미율은 동진벼가 93.3%이었고, T2-18은 94.7%로 동진벼에 비하여 1.4% 높았으며 T2-9은 92.8%, T2-10은 90.7, T2-14는 88.2%로 동진벼에 비하여 각각 0.5, 2.6, 5.1% 낮았다. 백미의 외관품질 상품성과 관련이 높은 분상질립율은 동진벼가 3.4%인 반면에 형질전환체는 1.6~5.2%로 다양하게 나타났다(표 7-4). 특히 T2-14는 싸라기 비율과 사미의 비율이 다른 계통에 비하여 월등히 높은 것으로 조사되었다.



**Figure 7-1.** Polishing rate of transgenic Dongjin and its corresponding wild-type.

**Table 7-2.** The degree of white center rice and chalky grain in the transgenic rice

	Dongjin	T2-9	T2-10	T2-14	T2-18
White center rice	0	0	1	1	0
Chalky grain	0	0	1	1	0

**Table 7-3.** Phenotypic characteristics of brown rice between wild type and transgenics.

	Brown rice (%)				
	Round	Immature	Damaged	Cracked	Dead
Dongjin	96.8	2.0	1.2	0	0
T2-9	90.8	2.7	6.4	0.2	0.1
T2-10	97.1	1.5	1.3	0.1	0.0
T2-14	96.3	2.7	0.9	0.0	0.0
T2-18	95.7	2.8	1.1	0.1	0.3

**Table 7-4.** Phenotypic characteristics of polished rice between wild type and transgenics.

	Polished rice (%)			
	Perfect kernel	Mealy kernel	Broken rice	Dead rice
Dongjin	93.3	3.4	2.1	1.2
T2-9	92.8	4.1	2.0	1.1
T2-10	90.7	5.2	3.1	0.9
T2-14	88.2	2.0	4.7	5.0
T2-18	94.7	1.6	2.5	1.2

#### 마. Ubiquitin:TDC 발현 T<sub>2</sub> 형질전환체의 윤기치 및 식미관련 특성

동진벼 및 형질전환체의 식용 가능성을 보기 위하여 시험재료를 윤기측정기에서 윤기치를 측정 하였다. 윤기치 측정은 33g을 칭량한 후 취반용기에 넣고 10분간 가열 한 다음 윤기치 측정기(Toyo 90A, 토요미도메터, 일본)에 넣고 측정을 하였는데, 동진벼는 74.2로 가장 높았고, T2-10이 73.7, T2-14가 73.3, 그리고 T2-9와 T2-18이 72.3으로 조사되었다. 쌀을 취반하고 난 후 밥의 경도와 관련이 높은 것으로 보고되고 있는 단백질 함량은 T2-9가 9.0%로 가장 높았고 다른 형질전환체인 T2-10, T2-14, T2-18은 각각 7.9, 8.0, 8.2%로 동진벼 8.6%보다 낮은 것으로 조사 되었다 (그림 7-3; 그림 7-2).

시험재료를 백미로 가공 후 측정한 백도는 우리나라에서 재배되는 일반 쌀의 경우 38정도로 보고되고 있는데, T2-9가 34.4로 가장 낮았고 T2-10이 36.7로 둘째로 가장 낮았다. 일반 적인 쌀보다 백도가 낮은 이유는 시료량이 적어 시험용 정미기로 정상적인 도정이 되지 않았기 때문이라 생각된다(표 7-5; 그림 7-3).

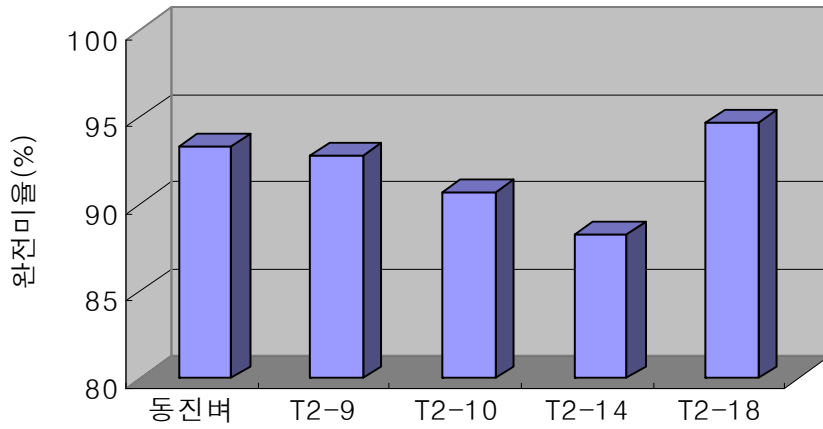


Figure 7-2. The degree of perfect kernel in the transgenic rice.

**Table 7-5.** Characteristics of glossiness and taste-related index.

	Protein(%)	Whiteness	Glossiness
Dongjin	8.6	35.0	74.2
T2-9	9.0	34.4	72.3
T2-10	7.9	36.7	73.7
T2-14	8.0	34.5	73.3
T2-18	8.2	35.0	72.3



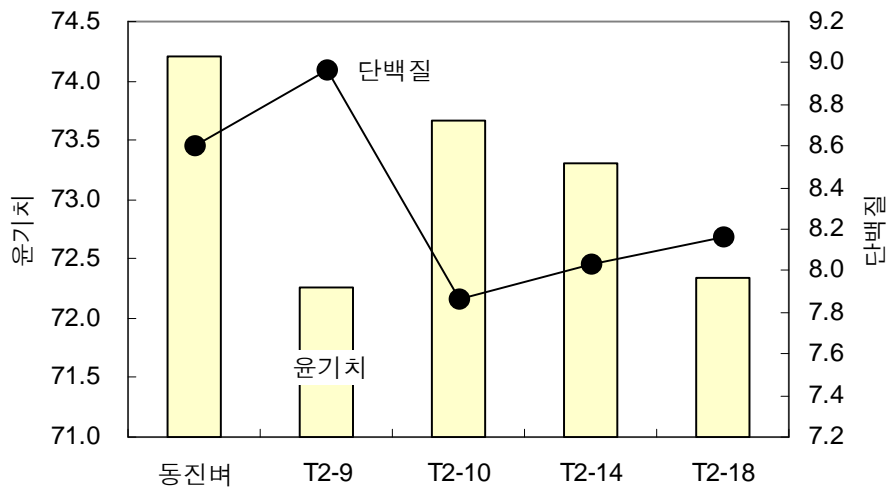


Figure 7-3. Comparison of protein and glossiness rate in transgenic rice.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

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

구 분	연구개발 목표의 달성도	
	평가의 착안점 및 척도 (%)	구체적인 결과 및 관련분야 기술발전 기여도
1차 년도 (2004)	<p><b>&lt;1세부과제&gt;</b></p> <p>○Glutelin: SHT 형질전환벼 육성(T<sub>0</sub>) (40)</p> <p>○Ubiquitin: SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환벼의 기질처리시 세로토닌유도체 화합물의 종자내 축적 유도효과 검정 (40)</p> <p><b>&lt;협동과제&gt;</b></p> <p>○상기 T<sub>3</sub> 형질전환벼의 미질 검정 (20)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Glutelin: SHT 발현 형질전환벼(T<sub>0</sub>)를 binary vector에 구축하여 현재 형질전환벼 20여 종이 기내에서 자라고 있으며, 5월 정시 이앙기때 포장 육묘.</li> <li>▶ Ubiquitin: SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환벼의 종자내 세로토닌유도체 정량 하였음.</li> <li>▶ 세로토닌유도체의 항산화활성 측정 함.</li> <li>▶ 기질처리에 의한 유도효과 측정 함.</li> <li>▶ Ubiquitin: SHT 발현 T<sub>3</sub> 형질전환낙동 및 동진벼의 포장재배 및 생산성을 측정하였음</li> <li>▶ T<sub>4</sub> 형질전환벼의 수확 및 미질특성 분석</li> <li>▶ 윤기치 및 식미관련특성 조사하였음</li> </ul>

구분	연구개발 목표의 달성도	
	평가의 착안점 및 척도 (%)	구체적인 결과 및 관련분야 기술발전 기여도
2차년도 (2005)	<p>&lt;1세부과제&gt;</p> <p>○Glutelin:SHT T<sub>1</sub> 형질전환벼체의 분자적 검정(25)</p> <p>○Glutelin:SHT 발현 T<sub>1</sub> 종자내의 세로토닌유도체 함량정량(17%)</p> <p>○세로토닌유도체 합성의 rate limiting 효소 규명 (12)</p> <p>○배유 및 쌀겨(bran) 포함 부위별 세로토닌유도체 함량분석(12)</p> <p>&lt;협동과제&gt;</p> <p>○Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 벼의 생산특성 및 수량구성 요소측정(12)</p> <p>○T<sub>4</sub> 벼의 미질 과 식미 검정 (10)</p> <p>○T<sub>4</sub> 벼의 저장기간별 미질 과 식미검정(12)</p>	<p>▶ 형질전환체의 분자적 검정</p> <p>- <u>Southern blot 분석</u> Glutelin:SHT 발현 형질전환벼(T<sub>1</sub>) 11여 종으로부터 gDNA를 추출하여 Southern blot 수행한 결과 벼의 게놈에 1-2 copy로 삽입되었음을 확인 함.</p> <p>- <u>Northern blot 분석, RT-PCR 분석</u> 미성숙배유(T<sub>2</sub>)로부터 RNA를 추출하여 mRNA blot 을 실행하였으나, band가 나타나지 않아, RT-PCR을 수행 하였으며, RT-PCR band가 동정되어, SHT mRNA 가 극미량으로 존재함을 확인 함.</p> <p>- <u>Western blot 분석</u> 10여종의 T<sub>2</sub> 벼의 성숙배유로부터 단백질을 추출하여 immunoblot 분석을 하였으나, 발현율이 매우적어 검출 이 되지 않았음.</p> <p>- <u>SHT 효소활성 검정</u> 9종의 형질전환미숙배유(T<sub>2</sub>)로부터 추출한 단백질을 이용 SHT 효소활성을 측정하였다. 4번 라인에서 대조 구보다 2배 이상의 활성이 검출되었고, 나머지 lines들은 대조구와 비슷하였다.</p> <p>▶ Glutelin:SHT 발현 T<sub>2</sub> 형질전환벼의 종자내 세로토닌 유 도체 정량 하였음.</p> <p>▶ 세로토닌합성의 첫 효소인 tryptophan decarboxylase (TDC)와 tryptamine hydroxylase 효소활성을 부위별로 측정하였으며, TDC 효소가 세로토닌 합성의 속도에 제한요인으로 작용함을 확인 함.</p> <p>▶ Hull 부위에 가장 많은 세로토닌유도체 함량이 측정 되었고, 수확기의 잎 및 벧짚 순으로 함량이 많았다.</p> <p>▶ Ubiquitin:SHT 발현 T<sub>4</sub> 형질전환낙동 및 동진벼의 포장재배 및 생산성을 측정하였음</p> <p>▶ T<sub>4</sub> 형질전환벼의 수확 및 미질특성 분석</p> <p>▶ 윤기치 및 식미관련특성 조사하였음</p>

구 분	연구개발 목표의 달성도	
	평가의 착안점 및 척도 (%)	구체적인 결과 및 관련분야 기술발전 기여도
3차 년도 (2006)	<p>&lt;1세부과제&gt;</p> <p>○Prolamin promoter:SHT 발현 T<sub>0</sub>, 형질전환벼 육성 (19)</p> <p>○ 분자적 검정 및 T<sub>1</sub> 종자 수확 및 세로토닌유도체 정량(14)</p> <p>○ TDC 발현 형질전환벼육성 및 분자적 생화학적 분석 (34)</p> <p>&lt;협동과제&gt;</p> <p>○Prolamin promoter:SHT 발현 T<sub>2</sub> 벼의 생육특성 검 정 (16)</p> <p>○형질전환벼의 미질 특성 검정 (17)</p> <p>○Ubiquitin:TDC 발현 형질 전환벼의 미질 및 생육특 성 조사</p>	<p>▶ Prolamin promoter:SHT 발현 T<sub>0</sub>, 형질전환 벼 분자적 검정 - Southern blot 분석 - Western blot 분석 - Northern blot 분석</p> <p>▶ Prolamin promoter:SHT 발현 T<sub>1</sub> 종자 수확 및 세로토닌 정량 - 종자에서 세로토닌 함량 정량</p> <p>▶ TDC 발현 형질전환 벼의 생화학적 분석 - Southern blot 분석 - Western blot 분석 - Northern blot 분석 - T<sub>2</sub> homo lines 선발</p> <p>▶ Prolamin promoter:SHT T<sub>2</sub> 형질전환 벼의 포장 재배 및 생산성을 측정하였음</p> <p>▶ T<sub>1</sub> 형질전환 벼의 수확 및 미질특성 분석</p> <p>▶ 윤기치 및 식미관련특성 조사하였음</p> <p>▶ T<sub>1</sub> TDC 발현 형질전환 벼 생육 특성 조사</p> <p>▶ Ubiquitin:TDC T<sub>2</sub> 형질전환 벼의 포장재배, 생산 성 및 미질특성을 측정하였음.</p>

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 연구 성과

본 연구의 1-3년차 연구로 통해 SHT 유전자를 벼에 도입함으로써 세로토닌유도체를 벼에 축적 시킬 수 있는 자료를 제공하였다. 본 연구에 의한 SHT 유전자는 벼를 포함한 작물에 형질전환하여 영양약리물질(Nutraceuticals)로 알려진 가 serotonin 유도체를 다양한 작물에 생합성 하도록 함으로써 기능성 작물을 육성할 수 있는 유전자원으로 사용할 수 있는 상업적 이용 가능성을 위해 특허를 국내 및 미국에 출원하여 등록하였다.

#### 가. 대한민국 특허등록 1건:

1. 식물에서 세로토닌 유도체를 생합성하는 방법 (등록일 2006. 05. 18) : 백경환, 장선미 : 대한민국 특허등록 10-0583207

#### 나. 미국 특허등록 1건

1. Method for biosynthesizing the serotonin derivatives in plants (등록일 2006. 08. 01) Kyoungwhan Back and Sun-Mi Jang. 미국 특허등록번호 (7,084,322)

다. 국제 SCI 논문게제 2건: SHT 및 THT 유전자를 이용한 형질전환벼의 세로토닌유도체 생합성 및 tyramine 유도체 생합성 연구결과로서 Plant Science에 2편 게제 하였다.

1. Kang K, Jang SM, Kang S, Back K (2005) Production of nutraceutical serotonin derivatives in rice seed enhanced by transgenic hydroxycinnamoyl-CoA:serotonin N-(hydroxycinnamoyl)transferase. Plant Science 168(3):783-788.
2. Lee D, Kang K, Lee SG, Back K (2007) Enhanced synthesis of feruloyltyramine and

4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase. *Plant Science*. 172(1): 57-63.

#### 라. 국제 SCI 논문투고 중 1건

1. Kang S, Kang K, Back K: Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep.* submitted.

## 제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구 결과에서 얻어진 세로토닌유도체 생합성을 위한 metabolic engineering 기술은 다음과 같이 요약된다. 첫째로 SHT 유전자의 단독발현이 종자특이 promoter를 사용하는 것보다 좋은 이유는 rate limiting 기질로 작용하는 serotonin이 주로 벼의 뿌리에서 생합성되고, 생육 후반기에 생합성이 유도되는 특징이 있기에 벼 종자 특이 promoter를 사용하여 종자에 SHT 단백질을 과다발현 시켜도 기질인 serotonin이 결핍되어 종자에 축적되는 serotonin 유도체의 함량은 제한된다는 사실을 알 수 있었다. 둘째로, 세로토닌유도체와 유사한 티라민유도체 합성을 위해 THT 유전자를 벼에 과다발현 시킨 결과, 티라민유도체가 생육후반기의 잎에서만 생합성되는 특징을 발견하였고, 유묘에서는 티라민유도체가 전혀 합성되지 않았다. 그러나 기질인 tyramine이 함유된 배지에서 자라는 유묘는 다량의 tyramine 유도체 화합물을 생합성하는 것으로 보아 기질인 tyramine이 rate limiting 기질로 작용하는 것임을 발견하였다. 셋째로 serotonin 생합성의 key 효소인 TDC 유전자를 벼에 도입하여 serotonin이 고함유하는 형질전환 벼를 육성하였다. 육성된 형질전환 벼는 그램 현미당 많게는 2 ug 정도, 백미당 0.8 ug 정도 생합성하는 벼가 육성되었다. 세로토닌은 혈장에서 간재생에 관여하는 주요한 물질로 알려져 있는 생리활성물질이다. 넷째로 세로토닌유도체 및 tyramine 유도체를 식물에 과다생성하기 위해서는 최소한 SHT 및 TDC 유전자혹 THT 및 TYDC 유전자가 동등하게 발현시킴으로서 획득 될 수 있음을 본 연구 과제로 통해 확인 할 수 있었다.

#### 가. TDC 및 SHT 유전자 공동발현을 통한 Serotonin 유도체 합성 감자 및 당근 육성 연구 사업 참여(2007-2011)

본 연구결과에서 도출된 idea를 이용하여, 작물에 세로토닌유도체를 고함량으로 증대시키기 위해서는 serotonin을 생합성하는 key 유전자인 TDC와 세로토닌과 phenolic acid를 중합시키는 SHT 유전자가 동시에 발현되어야 한다. 이를 시험하기위해서 TDC+SHT 유전자를 A2 cleavage system(하선화 박사 제공)을 이용하여 감자 및 당근에 도입하는 연구를 2007년부터 수행하기로 하였다(BioGreen 사업). 본 연구 사업으로 통해 serotonin 유도체의 metabolic engineering을 위한 실용적인 대안을 획득 할 것으로 사료된다.

#### 나. TDC 및 SHT 유전자 공동발현을 통한 형질전환 벼 개발

T-DNA 상에 두 개의 유전자를 Ubiquitin promoter 및 rice prolamine promoter 조절하에 발현되도록 binary vector를 제작하여 현재 형질전환 벼가 기내에서 자라고 있는 상태이다. Ubiquitin promoter:SHT:nos terminator + Ubiquitin promoter:TDC:nos terminator 상태로 발현되도록 binary vector를 제작하였다. Homologous ubiquitin promoter에 의한 silencing 효과만 일어나지 않는다면 두개의 유전자 발현에 의한 세로토닌유도체 고함유 형질전환 벼가 육성될 수 있을 것으로 보인다. 본 연구를 현재 진행하고 있는 상태이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 가. 2005년: TYDC와 THT 유전자 과다발현 형질전환담배에서 상처에 의한 tyramine 유도체 생합성 증대

Calgary 대학의 Facchini group은 tyramine 유도체 생합성 관련 유전자인 THT와 이 THT 효소의 기질을 제공하는 TYDC(tryptosine decarboxylase)를 과다발현하는 각각의 형질전환 담배를 교배하여 THT와 TYDC 유전자를 과다발현하는 형질전환담배를 육성하였다(Hagel et al., 2005). THT와 TYDC를 독립적으로 발현하는 담배와 공동으로 발현하는 담배에서 tyramine 유도체 생합성 능력과 soluble 및 세포벽결합 tyramine 유도체의 분포를 비교하였다. TYDC 과다발현은 tyramine 생합성을 증대시키고 대신에 phenylalanine 함량을 감소시켰다. 반면에 THT 과다발현은 tyramine 함량을 떨어뜨렸다. Tyramine 유도체 함량은 건강한 식물체에서는 매우 낮았으며, 상처를 처리하였을 때 상처 주위에 생합성이 유도되는 것을 확인 하였다. Tyramine 유도체 생합성 증대는 THT와 TYDC 발현이 최고 높은 식물체에서 일어나는 것으로 보아 tyramine 유도체 생합성 증대에 THT와 TYDC 효소가 중요한 역할을 함을 보고하였다.

### 나. 2006년: Serotonin 의 새로운 기능: 간 재생 규명

독일의 Dr. Clavien 교수 연구실에서(Lesurtel et al., 2006) 신경전달물질로서 알려진 serotonin이 간 재생을 매개 한다는 사실을 Science 지에 게재 하였다. 특성상 강은 조직의 상당량이 없어도 재생하는 특성을 가지고 있다. 쥐의 간을 모델로 사용하여, 손상된 혈소판활성(impaired platelet)은 간 재생을 할 수 없다는 사실을 확인하였다. 혈소판은 혈액 내에서 serotonin을 운반하는 운반자이다. 이 손상된 혈소판에서 serotonin agonist가 간 재생을 재개한다는 사실을 확인하였다. Serotonin을 처리하면 간에 있는 serotonin 수용체가 활성화 되고, 반대로 수용체 저해제의 경우 간 재생을 억제하는 현상은 serotonin이 간 재생에 밀접한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 또한 간 재생은 serotonin 합성의 rate limiting 효소인 tryptophan decarboxylase 유전자가 결핍된 쥐에서 일어나지 않는 사실을



불 때 상기의 결과를 재확인 시켜 주었다. 또한 간 재생이 되지 않는 쥐에서 혈소판에 serotonin을 첨가하면, 간 재생이 일어남을 보고하였다. 결과적으로 혈소판에 있는 serotonin이 간 재생의 개시에 중요한 역할을 함을 볼 수 있다.

#### 다. 2005년: TYDC와 THT 유전자 과다발현 형질전환담배에서 상처에 의한 tyramine 유도체 생합성 증대

Montreal 대학의 Dr. De Luca 그룹은 tyramine 유도체의 생합성이 wounding 처리에 의해 형질전환체와 대조구인 담배와 어떤 차이가 있는지 조사하였다(Guillet et al., 2005). 형질전환체는 TDC와 TYDC 유전자를 각 각 발현하는 lines과 둘 다를 발현하는 담배와 비교하였다. TDC 발현하는 형질전환하는 담배에는 TDC 효소의 반응산물인 tryptamine 이 다량 생합성 되었으나, tryptamine 유도체는 생성되지 않았다. 이와는 다르게 TYDC 유전자를 발현하는 담배는 tyramine과 tyramine 유도체를 생성하였다. Wounding 처리에 의해 메탄올에 용해되는 세포벽에서 다량의 tyramine 유도체가 합성되었다. 그리고 상처에 의해 tyramine 생합성 유도에 관여하는 효소들도 함께 유도됨을 확인하였다. 결론적으로 tyramine 유도체 생합성에서 TYDC 효소가 최소한 상처 처리시 rate limiting 효소로 작용하는 것을 암시하는 결과를 Plant Physiology에 발표하였다. 그러나 상처를 처리하여도 tyramien 유도체의 함량은 형질전환체에서조차 최고로 1 ug 이하의 적은 양이 생합성되는 경향을 보였다. 이는 THT 효소의 도입이 되어야 만 함량 증대를 유도 할 수 있음을 시사한다.

## 제 7 장 참고문헌

- Back K, Jang SM, Lee BC, Schmidt A, Strack D, Kim KM** (2001) Cloning and characterization of a hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase induced in response to UV-C and wounding from *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol* 42, 475-481.
- Baek NI, Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK** (1999) *N*-feruloylserotonin, antioxidative component from the seed of *Carthamus tinctorius* L. *J. Korean Soc. Agric Chem Biotechnol* 42, 366-368.
- Cho SH, Lee HR, Kim TH, Choi SW, Lee WJ, Choi Y** (2004) Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid ovariectomized rats fed high-cholesterol diets. *J Nutr Sci Vitaminol* 50, 32-37.
- Cutillo F, Abrosca BD, DellaGreca M, Marino CD, Golino A, Previtiera L, Zarrelli A** (2003) Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seed germination and plant growth, *Phytochemistry* 64, 1381-1387.
- De Luca V, Alvarze-Fernandez F, Campbell D, Kurz WGW** (1988) Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 86, 447-450.
- Demmig-Adams B, Adams WW** (2002) Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298, 2149-2153.
- Facchini PJ, Hagel J, Zulak KG** (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry, *Can. J. Bot.* 80, 577-589.
- Facchini PJ, Huber-Allanach KL, Tari LW** (2000) Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* 54, 121-138
- Farmer MJ, Czernic P, Michael A, Negrel J** (1999) Identification of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase from

tobacco. *Eur. J. Biochem.* 263, 686–694.

- Fitzpatrick PF** (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68, 355–381
- Grandmaison J, Olah GM, van Calsteren MR, Furlan V** (1993) Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots, *Mycorrhiza* 3, 155–164.
- Grobe W** (1982) Function of serotonin in seeds of walnuts. *Phytochemistry* 21, 819–822.
- Grusak MA** (2002) Phytochemicals in plants: genomics-assisted plant improvement for nutritional and health benefits, *Curr Opin Biotechnol* 13, 508–511.
- Guillet G, De Luca V** (2005) Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine in tryptophan and tyrosine decarboxylase transgenic tobacco lines, *Plant Physiol.* 137, 692–699.
- Hagel JM, Facchini PJ** (2005) Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves, *Planta* 221, 904–914.
- Hahlbrock K, Scheel D** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 40, 347–369.
- Hotta Y, Nagatsu A, Liu W, Muto T, Narumiya C, Lu X, Yajima M, Ishikawa N, Miyazeki K, Kawai N, Mizukami H, Sakakibara J** (2002) Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction, *Mol Cell Biochem* 238, 151–162.
- Ishihara A, Kawata N, Matsukawa T, Iwamura H** (2000) Induction of *N*-hydroxycinnamoyltyramine synthesis and tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase (THT) activity by wounding in maize leaves, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1025–1031.
- Jang SM, Ishihara A, Back K** (2004) Production of coumaroylserotonin and feruloylserotonin in transgenic rice expressing pepper hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:serotonin *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase. *Plant Physiol* 135, 346–356.

- Kawashima S, Hayashi M, Takii T, Kimura H, Zhang HL, Nagatsu A, Sakakibara J, Murata K, Oomoto Y, Onozaki K** (1998) Serotonin derivatives, N-(p-coumaroyl) serotonin, inhibits the production of TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , and IL-6 endotoxin-stimulated human blood monocytes. *J Interferon Cytokine Res* 18, 423-428.
- Kumarasamy Y, Middleton M, Reid RG, Nahar L, Sarker SD** (2003) Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of *Centaurea nigra*. *Fitoterapia* 74, 609-612.
- Lee HJ, Lee SB, Chung JS, Han SU, Han O, Guh JO, Jeon JS, An G, Back K** (2000) Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen, *Plant Cell Physiol.* 41, 743749.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA** (2006) Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 312, 104-107.
- Iyer LM, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC** (2000) Transgene silencing in monocots. *Plant Mol Biol* 43, 323-346.
- Matsuda F, Morino K, Ano R, Kuzawa M, Wakasa K, Miyagawa H** (2005) Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue, *Plant Cell Physiol.* 46, 454-466.
- Miyagawa H, Ishihara A, Lim CH, Ueno T, Furuichi N** (1998) Induction of N-p-coumaroyloctopamine in potato tuber disks by -1,3-glucooligosaccharide. *J. Pesticide Sci.* 23, 49-53.
- Nagatsu A, Zhang HL, Mizukami H, Okuyama H, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H** (2000) Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) oil cakes. *Nat Prod Lett* 14, 153-158.
- Negrel J, Javelle F, Paynot M** (1993) Wound-induced tyramine hydroxycinnamoyl-transferase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs. *J. Plant Physiol.* 142, 518-524.

- Negrel J, Javelle F, Paynot M** (1993) Biochemical basis of resistance of tobacco callus tissue cultures to hydroxyphenylethylamines, *Plant Physiol.* 103, 329–334.
- Razem FA, Bernards MA** (2003) Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase, *J. Exp. Bot.* 54, 935–941.
- Negrel J, Lherminier J** (1987) Peroxidase-mediated integration of tyramine into xylem cell walls of tobacco leaves, *Planta* 172, 494–501.
- Negrel J, Martin C** (1984) The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 23, 2797–2801.
- Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM** (2001) Induction of hydroxycinnamoyltyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hp gene-dependent and hp gene-independent mechanisms, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 785–792.
- Niwa T, Etoh H, Shimizu A, Shimizu Y** (2000) Cis-N-(p-coumaroyl)serotonin from konnyaku, *Amorphophallus konjac* K. Koch, *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 2269–2271.
- Niwa T, Murakami K, Ohtake T, Etoh H, Shimizu A, Shimizu Y, Kato Y, Tanaka H** (2002) Peroxynitrite scavenging activities of aromatic compounds isolated from Konnyaku, *Amorphophallus konjac* K. Koch. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1386–1388.
- Odjakova M, Hadjiivanova C** (1997) Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulg J Plant Physiol* 23, 94–102.
- Park JB, Schoene N** (2002) Synthesis and characterization of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1104–1110.
- Pavlik M, Laudová V, Gruner K, Voker K, Harmatha J** (2002) High-performance liquid chromatographic analysis and separation of N-feruloylserotonin isomers, *J. Chromatogr.* 770, 291–295.
- Pearce G, Marchand PA, Griswold J, Lewis NG, Ryan CA** (1998) Accumulation of feruloyltyramine and p-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to

wounding, *Phytochemistry* 47, 659–664.

- Qu LQ, Takaiwa F** (2004) Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 2, 113–125.
- Roepenack-Lahaye EV, Newman MA, Schornack S, Hammond-Kosack KE, Lahaye T, Jones JDG, Daniels MJ, Dow JM** (2003) p-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogen, *J. Biol. Chem.* 278, 43373–43383.
- Roh JS, Han JY, Kim JH, Hwang JK** (2004) Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol Pharm Bull* 27, 1976–1978.
- Sakamura S, Terayama Y, Kawakatsu S, Ichihara A, Saito H** (1980) Conjugated serotonins and phenolic constituents in safflower seed (*Carthamus tinctorius* L.), *Agric Biol Chem* 44, 2951–2954.
- Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D, Rosahl S** (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase, *J. Biol. Chem.* 274, 4273–4280.
- Schroder P, Abele C, Gohr P, Stuhlfauth-Roisch U, Grosse W** (1999) Latest on the enzymology of serotonin biosynthesis in walnut seeds. *Adv Exp Med Biol* 467, 637–644.
- Tanaka E, Tanaka C, Mori N, Kuwahara Y, Tsuda M** (2003) Phenylpropanoid amides of serotonin accumulate in witches' broom diseased bamboo. *Phytochemistry* 64, 965–969.
- Ueno M, Shibata H, Kihara J, Hnda Y, Arase S** (2003) Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. *Plant J* 36, 215–228.
- Watanabe M** (1999) Antioxidative phenolic compounds from Japanese barnyard millet (*Echinochloa utilis*) grains, *J. Agric. Food Chem* 47, 4500–4505.
- Wu CY, Adachi T, Hatano T, Washida H, Suzuki A, Takaiwa F** (1998) Promoters of rice seed storage protein genes direct endosperm-specific gene expression in

transgenic rice. *Plant Cell Physiol* 39, 885-889.

**Yao K, De Luca V, Brisson N** (1995) Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 7, 1787-1799.

**Yu M, Facchini PJ** (1999) Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy, *Planta* 209, 33-44.

**Zhang HL, Nagatsu A, Sakakibara J** (1996) Novel antioxidants from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Oil Cake. *Chem Pharm Bull* 44, 874-876.