

최 중  
연구보고서

S-adenosylmethionine(SAM)의 새로운  
생리·대사기능 규명 및 SAM 고함량 기능성  
작물개발에 관한 연구

(Physiological and metabolical characterization of  
S-adenosylmethionine(SAM) and Development of high content  
of SAM containing crop plants)

명지대학교 산학협력단

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “S-adenosylmethionine(SAM)의 새로운 생리·대사기능 규명 및 SAM  
고함량 기능성 작물개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 23 일

주관연구기관명 : 명지대산학협력단

총괄연구책임자 : 서 주 원

세부연구책임자 : 권 형 진

연 구 원 : 신 수 경

연 구 원 : 김 순 희 외 8인

협동연구기관명 : 고령지 농업연구소

협동연구책임자 : 서 효 원

# 요 약 문

## I. 제 목

S-adenosylmethionine(SAM)의 새로운 생리·대사기능 규명 및 SAM 고함량 기능성 작물개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

S-adenosyl-L-methionine (SAM)은 동물의 신경전달물질인 acetylcholine을 증가시켜 항 우울증을 개선시키는 효과를 가지고 있으며, 현재 건강식품제로 사용되고 있다. 알츠하이머병 환자에서 뇌세포 내의 SAM 함량이 정상인에 비해 급격히 줄어드는 점을 착안하여 SAM을 알츠하이머병 치료제로서 개발하고 있다. 또한 섭취한 비소 등의 독소물질을 간에서 SAM이 methylation하여 무독화하기 때문에 간 기능 개선제로 사용하고 있다. 이와 같이 SAM이 빈번히 발생하는 현대병의 치료제로 사용하고 있기 때문에 인위적으로 SAM을 과다 생산하는 기능성작물(과채류)이 개발되면 병 예방에 크게 기여할 것이다.

SAM은 기질로서 ATP와 필수 아미노산인 L-methionine을 이용하여 합성되어 동물, 식물, 미생물의 생체 내에서 methyl donor로서 작용한다. 그리고 식물에서는 생장에 깊이 관여하는 식물호르몬 에치렌과 폴리아민의 전구체이다. 에치렌은 대부분의 식물생장을 억제하고 노화를 촉진한다. 한편 폴리아민은 노화를 지연시키는 생리활성을 가지고 있다. 이처럼 에치렌과 폴리아민은 SAM을 전구체로 공유하고 methionine의 재생경로에 위치하고 있지만 식물의 생산성과 기능을 좌우하는 노화에 상반되는 생리작용을 나타내고 있다. 이러한 측면에 기초하여 SAM의 생리·대사조절을 이용한 노화조절 신품종 개발에 대한 가능성이 제기되어 지고 있다. 그러나 아직 식물 성장단계 및 기관에서의 SAM의 정교한 생리학적 대사체계에 대한 연구가 거의 없어 효과적으로 노화를 조절할 수 있는 작물 개발이 현재로서는 어려우므로 이를 극복할 수 있는 원천 기술개발이 필요하다.

본 연구진은 최근 미생물에서 SAM이 신호전달 단백질에 직접 결합하여 스트레스를 극복할 수 있는 이차대사산물의 분비를 촉진하는 SAM의 새로운 생리기능을 세계 최초로 발견하였다. 이러한 스트레스 내성 신호전달 단백질 군은

식물에서도 존재하기 때문에 유전체 연구가 활발한 모델식물을 이용하여 SAM과 신호전달 단백질간의 결합에 의하여 야기되는 새로운 스트레스 내성기능을 식물에서 발견하고자 한다. 이러한 연구는 생물 종을 뛰어넘는 SAM의 새로운 생리기능을 밝히게 되는 계기가 될 것이며 나아가 환경 스트레스 내성 식물을 개발하는 단초를 제공해 줄 것이다. 도시와 공업의 급속한 증대로 유효 경작지가 줄어들고 농업 환경이 위협받고 있는 현 시점에서 환경 내성작물 개발을 통한 농업 생산성 향상이 요구되고 있다.

본 과제에서는 (1) 동물에서 나타나는 SAM의 치매치료제 및 간 기능 개선제에 주목하여 SAM 고함량 기능성 작물을 개발하고자 한다. 또한 (2) SAM의 대사경로를 밝혀 생산성이 높은 작물개발을 위한 기초기반기술을 확보하고, (3) 모델 식물을 이용하여 SAM과 신호전달 관련 단백질간의 상호작용을 밝혀 SAM의 신호전달 기능을 규명하여 스트레스 내성 식물개발의 기반을 마련하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

SAM은 에치렌과 폴리아민의 전구체로서 식물 생장에 깊이 관여하고 있다. 그러므로 제 1 세부 과제에서는 주요작물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 생화학적 게놈연구 기술을 도입하여 SAM 대사관련 효소와 유전자의 기능 및 조절 기작을 효율적으로 규명하고, SAM의 대사 흐름과 식물생장을 유기적으로 분석하여 새로운 SAM의 생리·대사체계를 밝히고자 한다. 이를 위해서 먼저 애기장대에 존재하는 SAM synthase를 조사하고 유전자원을 확보하며, 외부환경 변화 및 스트레스에 의한 발현 변화를 살펴보고, 더 나아가 애기 장대에서 SAM synthase를 과대발현 한 뒤에 생화학적인 형질 규명을 통하여 SAM 대사 흐름을 연구 하고, SAM 고함량 기능성 작물 개발을 할 수 있는 기초 기반 기술을 마련하고자 한다.

제 2 세부 과제에서는 SAM과 결합 가능성이 있는 조절 단백질 유전자를 탐색하고, SAM과 조절 단백질간의 결합여부를 생화학적으로 밝히며 그에 따른 생리학적 기능을 조사한다. 이를 위해서 SAM binding motif를 활용하여 *Arabidopsis* 유래의 신호전달 단백질을 탐색, 선별하고 신호전달 단백질의 생화학적 기능을 분석하며, SAM과의 상호작용 가능성에 대해 연구하고자 한다. 또한 신호전달 단백질의 유전자 결손 식물을 확보하여 광 및 건조 등 외부환경에 대한 내성을 조사함으로써 생체 내 기능을 분석하고 SAM의 새로운 생리기능

을 밝히고자 한다.

제 1 협동 과제에서는 기능이 밝혀진 SAM synthase(SAM-s)와 SAM 대사 관련 유전자를 각각 토마토 과실과 감자의 괴경에 과대 발현하여 간 기능저하 및 치매에 치료효과가 높은 SAM과 생체활성물질인 폴리아민이 과 생산된 고 기능성 작물을 개발하고자 한다. 이를 위해 SAM 생합성 유전자를 클로닝 하고, 기능을 분석하며, 기능이 분석된 SAM 생합성 유전자를 감자와 토마토에 형질전환하여 재분화 식물체를 선발코자 한다. 또한 기내에서 선발된 형질전환 식물체들은 다양한 유전분석을 실시하여 포장재배 전 단계까지의 식물체를 증 식하고자 한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

애기장대에는 4개의 SAM 생합성 유전자가 존재하는데 본 연구에서는 SAM-s 유전자의 기능을 분석하기 위해서 4개의 SAM-s 유전자를 모두 확보 하였으며, 대장균에서 SAM-s 효소의 단백질을 발현 한 뒤에 순수 분리하여 *in vitro*에서 ATP와 methionine을 기질로 하여 SAM을 생합성함을 확인하였다. 또한 외부 환경 변화 및 스트레스 등에 의해 SAM-s의 발현이 어떻게 조절되 는지 알아보기 위하여 식물이 받는 외부의 스트레스의 한 방법으로 식물의 방 어기작으로 잘 알려진 elicitor인 salicylic acid와 jasmonic acid를 처리한 뒤에 애기 장대의 뿌리와 잎에서 mRNA를 분리하여 4종의 SAM-s의 발현량을 분석 한 결과, 특히 SAM-s 3의 발현량이 스트레스에 의해 급격히 증가하는 것을 새 롭게 발견하였다. 또한 애기장대에서 SAM-s의 과대 발현 형질전환 개체를 제 작하였으며, SAM-s의 과대 발현으로 인한 에틸렌의 생성이 증가로 예상되는 노화가 촉진 현상을 처음으로 발견하였다.

애기장대 내에서 SAM의 신호 전달 기능을 연구하고 스트레스 내성 식물 개 발의 기반을 마련하고자 SAM binding motif를 활용하여 애기장대 유래의 SAM과 결합하는 신호전달 단백질인 protein kinase AGC1-1을 선발하였다. Protein kinase AGC1-1이 자가 인산화 기능을 가지고 있음을 처음으로 밝히고, SAM에 의해서 인산화가 2배이상 증가함을 보여 주었다. 또한 AGC1-1유전자 를 GFP 발현 벡터에 클로닝하여 애기장대에 삽입함으로써 AGC1-1 kinase가 애기장대의 기관에서 cytoplasm에 존재하며, SAM을 인지하는 protein kinase임 을 새롭게 밝혔다. AGC1-1 kinase의 생리학적 기능을 밝히기 위하여 AGC1-1 유전자가 불활성화된 애기장대를 제작하였으며, AGC1-1 mutant에서 발아 효율

이 현격히 감소하며 애기장대의 초기발달에서 매우 중요한 역할을 담당하는 조절 단백질임을 제시하였다. AGC1-1 mutant에 가뭄 및 염을 처리하여 스트레스를 유발한 결과, 저항성이 크게 감소되며, 병원균을 처리하였을 경우에도 저항성이 매우 감소함을 증명하였다. 이러한 결과는 AGC1-1 kinase가 병원균 저항성 유도에 관여한다는 직접적인 증거를 제시하여 주며 또한 간접적으로는 SAM이 식물의 저항성 유도에 중요한 역할을 수행하고 있음을 제안한다.

야생근연종 감자 *Solanum brevidense*로부터 확보한 cDNA library로부터 SAM-s 유전자를 분리하여 기능을 확인하였다. 이를 감자 괴경에만 특이적으로 발현하는 promoter를 장착한 형질전환용 벡터를 구축하여 *Agrobacterium*에 형질전환하고, *Agrobacterium*-tissue co cultivation method를 사용하여 토마토와 감자에 형질전환하였다. 감자 품종 자심의 적정 재분화 조건을 찾아 형질전환 처리 후 재분화 식물체를 각각 선발하였다. 감자의 경우 기존 competitive duplex-PCR을 통하여 재분화 식물체로부터 형질전환여부를 1차 screening 하였으며, northern 분석을 통하여 expression level을 확인하여 최종적으로 5개체를 선발하였다. 선발된 감자는 현재 수중 재배 방법을 통하여 재배하고 있다.

SAM은 식물에서 폴리아민과 에틸렌 등 식물 호르몬의 전구체이므로 생체 내 SAM 함량이 증가하였을 경우 에틸렌을 포함한 다양한 생리 조절 물질의 생체 내 함량 또한 증가될 가능성이 매우 크다. 그러나 아직까지 SAM의 대사 관계에 대한 생리학적인 조절 기작 연구가 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구를 통하여 확보한 SAM-s 유전자가 과대 발현된 애기장대에서 실제 에틸렌과 같은 생리 조절 물질이 증가되었는지 실험적으로 증명하는 것은 굉장히 큰 의미가 있는 일이므로 연구를 계속 진행하여 그 연구 결과를 세계적인 SCI 등재 전문 학술지에 게재하려고 한다.

또한 고령지 농업 연구소에서 개발한 SAM-s 유전자가 형질 전환된 자심품 종은 생식이 가능하여, 형질 전환하여 과대 발현된 SAM을 가공과정에 손실이 거의 없는 상태에서 활용이 가능하다. 이러한 특성은 SAM이 가지는 여러 가지 약리적 특성으로 인해 활용 가치가 매우 높을 것으로 판단되므로 1차적으로 산업재산권 출원을 계획하고 있다.

또한, 개발된 형질전환 감자는 농촌진흥청 기본연구과제의 재료로 활용하여 농업적 특성과 실용화 가능성을 정밀 평가하여, GMO 안전성을 평가할 계획이다. 이를 위해 현재 진행 중인 수경 재배산 감자를 활용하여 2007년도 가을재배와 동계시설재배를 통하여 대량의 감자를 확보할 계획이다.

본 연구를 수행하면서 얻은 식물의 대사 기능을 이용한 기능성 작물개발에 대한 노하우 축적과 이 기술에 대한 지적 재산권(특허화)은 미래 농업 산업에서 새로운 시장개척 및 기존 시장의 대체효과를 창출할 것이다. 그리고 우수품종의 확보로 국가 경쟁력을 확보하여 농산물 시장 개방에 대응할 수 있는 국가적인 전략에 활용될 것이다.

본 연구의 세부과제 책임자인 양영열 교수가 과제 연구에 열중하던 중 천식 및 폐렴이 겹쳐서 2006년 말 갑자기 세상을 하직하고 말았습니다. 이로 인하여 세부연구책임자가 교체되었고 연구진행에도 어려운 점이 많았으나 나머지 연구원들이 일치단결하여 어려움을 극복해 연구를 마무리 하였습니다. 같은 연구자로서 삼가고인의 명복을 빕니다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

S-Adenosyl-L-methionine is an essential molecule that is involved in various cellular processes ranging from gene expression to membrane fluidity. Abnormalities in SAM metabolism has been well recognized in liver diseases and in various neurological disorders. SAM has been increasingly utilized for treatment of liver diseases as well as depression. Pharmaceutical industry considers SAM as a candidate medication for Alzheimer's disease since patients get lower concentration of SAM in the brain. If considering the beneficial role of SAM in these diseases, it is a task of great significance to develop edible plants containing higher concentration of SAM.

To investigate the cellular function and metabolism of SAM in plants and develop vegetables containing abundant SAM, we selected and used *Arabidopsis thaliana* as a model system. The genomic search showed *Arabidopsis thaliana* contains four genes encoding a SAM synthase(SAM-s). To characterize the SAM-s protein of *Arabidopsis thaliana*, all four candidate genes were expressed in *E. coli*, purified and assayed in vitro. All four gene products produced SAM from ATP and methionine. Thereafter, to elucidate the role of SAM in the adaptation of plants to stress condition, the expression patterns of SAM-s was investigated in *Arabidopsis thaliana* after treating jasmonic acid and salicylic acid. Transcription level of SAM-s 3 was enhanced by these treatments, but not the others.

The full length cDNA (*SbSAMs*) of SAM-s from *Solanum brevidense* (PI 218228) was cloned and characterized. The *SbSAMs* contained an open reading frame (ORF) encoding mature protein of 394 amino acids with calculated molecular mass of 47.3 kDa. It showed high amino acid sequence homology to tomato (97.8%) and petunia (93.9%). By *in vitro* translation assay, *SbSAMs* was shown to synthesize the SAM form L-methionine and ATP.

To investigate function of *SbSAMs*, it was introduced into *Arabidopsis*



*thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Several transgenic lines showed the symptom of yellowing and chlorophyll degradation by early aging. It can be explained by the accumulation of ethylene caused by overexpression of SAM-s. As a method to develop edible vegetables, SbSAMs was also introduced into a variety of potato, *Solanum tuberosum* L.cultivars Jashim. Regenerated potatoes were selected on the media containing kanamycin, and their genetic stability of the T-DNA was analyzed by the PCR, competitive duplex-PCR and northern blot analysis. On the basis of their molecular screening, some transgenic lines were selected. Each transgenic line of potatoes was propagated and grown up to 2nd generation in the greenhouse and on the hydroponic culture system.

To elucidate the regulatory mechanism of SAM, we searched candidate proteins for the SAM-binding kinase by using SAM-binding motif, GxGxGx. and found AGC1-1 which is in AGC kinase family. AGC1-1 is a putative serine/threonine kinase and has a potential transmembrane spanning region. AGC1-1 shares sequence similarity to rat PKA catalytic subunit, and it is able to phosphorylate histone H1, one of the common substrates of mammalian PKA. RT-PCR analysis indicated that *AGC1-1* gene is transcribed in the whole plant. And the GFP fused AGC1-1 showed that AGC1-1 was located in cytoplasm of cells.

The phenotype of a AGC1-1 deficient mutant under normal condition shows a slight defection on germination rate and root growth, but not significantly. However, under drought and salt stress, mutant plants showed a serious defect of drought tolerance. Furthermore, when *Arabidopsis thaliana* was incubated with pathogenic bacteria, *Pseudomonas syringe* DC3000, the lesion on leaves of mutants was severely progressed than wild type.

In this study we suggested new biological functions of SAM in plant by the overexpression of SAM and . The understanding of the mechanism of SAM on aging and stress tolerance will provide the fundamental information to make a new stress tolerance plant and an age-controlled plant.

Furthermore, vegetables or fruits having the high SAM contents will provide a possibility for new functional foods to prevent diseases. This study can be applied to many different plants such as corn, wheat and beans.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction .....	12
Chapter 2. Present condition of this technology .....	18
Chapter 3. Contents and results .....	22
Chapter 4. Achievement and contribution .....	80
Chapter 5. Application plan .....	83
Chapter 6. Information of overseas science and technology .....	86
Chapter 7. References .....	89

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	12
제 1 절 연구개발 필요성 .....	12
제 2 절 연구개발 범위 .....	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	18
제 1 절 SAM의 기능에 대한 임상적 연구 .....	18
제 2 절 기능성 물질 생산을 위한 형질전환 작물 개발 .....	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	22
제 1 절 식물의 미규명된 SAM의 생리 대사 체계 해명 .....	22
제 2 절 SAM의 신호전달 관련 단백질 간의 새로운 생리 기능 탐색 .....	38
제 3 절 SAM 고함량 기능성 작물 개발 .....	55
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	80
제 1 절 목표달성도 .....	80
제 2 절 관련분야에의 기여도 .....	81
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	83
제 1 절 본 과제를 통해 확보한 연구개발 산물 .....	83
제 2 절 연구개발 결과의 활용계획 .....	84
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	86
제 7 장 참고문헌 .....	89

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발 필요성

S-adenosylmethionine(SAM)은 SAM synthetase(SAM-s)에 의하여 ATP로부터 adenosine이 필수 아미노산인 methionine과 결합하여 생성된 생체물질로 동물, 식물, 미생물의 생체 내에서 methyl donor로 사용된다(Lu 2000). 지금까지 밝혀진 SAM의 생체 기능은 nucleic acid의 methylation, 단백질의 methylation에 의한 유전자 발현 조절, 생체막의 유동성에 중요한 역할을 하는 phosphatidylcholine의 형성, 생리 활성을 가진 생체 저분자 물질의 생합성 과정에서 methylation의 cofactor로서의 작용, amino group, ribosyl group, aminoalkyl group의 source로의 사용, 5'-deoxyadenosyl radicals 반응에의 사용 등이 있다(Fontecave et al. 2004). 최근에는 yeast와 *Bacillus*에서 세포 내에 SAM의 축적에 의해 형태분화가 저해됨이 보고 되고 있으며(Brooke et al. 2003, Hilti et al. 2000), 그에 따르는 기능들을 밝히는 연구들이 진행되고 있다. 그리고 식물에서 SAM은 생장에 깊이 관여하는 식물호르몬 에틸렌과 폴리아민의 전구체이다 (그림1). 에틸렌은 전구체인 SAM이 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) syntase에 의하여 ACC로 변환되어 생성되며, 폴리아민은 SAM이 SAM decarboxylase와 putrescine aminotransferase에 변환을 거쳐 생성된다. 에틸렌은 가스형 식물 호르몬으로 대부분의 식물생장을 억제하고 노화를 촉진한다. 한편 폴리아민은 노화를 지연시키는 생리활성 물질이다. 이처럼 에틸렌과 폴리아민은 SAM을 전구체로 공유하고 methionine의 재생경로에 위치하고 있지만 식물의 생산성과 기능을 좌우하는 노화에 상반되는 생리작용을 나타내고 있다. 이 점에 착안한 연구자들은 SAM의 생리·대사조절을 이용한 노화조절 신품종 개발에 대한 가능성을 제기하였다. 그러나 아직 식물 성장단계 및 기관에서의 SAM의 정교한 생리학적 대사체계(metabolic network)에 대한 연구가 거의 없어 효과적으로 노화를 조절할 수 있는 작물 개발이 현재로서는 어려워 이를 극복할 수 있는 원천 기술개발이 필요하다.

본 연구진은 최근 미생물에서 SAM이 신호전달 단백질에 직접 결합하여 스트레스를 극복할 수 있는 이차대사산물의 분비를 촉진한다는 SAM의 새로운

생리기능을 세계 최초로 발견하였다(Kim et al. 2003). 이러한 스트레스 내성 신호전달 단백질 군은 식물에서도 존재하기 때문에 유전체 연구가 활발한 모델식물을 이용하여 SAM과 신호전달 단백질간의 결합에 의하여 야기되는 새로운 스트레스 내성기능을 식물에서 발견하고자 한다. 이러한 연구는 생물 종을 뛰어넘는 SAM의 새로운 생리기능을 밝히게 되는 계기가 될 것이며 나아가 환경 스트레스 내성 식물을 개발하는 단초를 제공해 줄 것이다. 도시와 공업의 급속한 증대로 지금 전 세계적으로 유효 경작지가 점점 줄어들고 있어 척박한 환경에서도 작물이 자랄 수 있도록 작물을 변형시키는 연구도 진행 중이다. 이처럼 농업 환경이 위협받고 있는 현 시점에서 환경 내성작물 개발을 통한 농업 생산성 향상은 절실히 필요하다.

현재 SAM은 동물의 신경전달물질인 acetylcholine을 증가시켜 항 우울증을 증진시켜 현재 건강식품제로 사용되고 있다. 알츠하이머병 환자에서 뇌세포 내의 SAM 함량이 정상인에 비해 급격히 줄어드는 점을 착안하여 SAM을 알츠하이머병 치료제로서 개발하고 있다(Fava et al., 1990; Bressa et al., 1994). 현재 추세라면 2025년에 전 세계적으로 알츠하이머 치매환자수가 2200만 명에 이르며, 2020년 우리나라 노인인구는 전체 인구의 13%까지 증가할 추세이다. 치매 치료제의 잠재 시장은 국내에서 493백만 달러, 세계적으로 640억 달러에 이른다. 이러한 치료제를 부분적으로 대체할 수 있는 SAM 고함량 기능성 식품이 개발된다면 그 경제적 효과는 매우 크다. 2025년 세계인구는 현재의 1.5배인 90억 정도로 예상된다. 또한 생활수준 증가로 현 기준의 3배 이상의 식량을 필요로 할 것이다. 따라서 생산효율이 높고 자연환경에 강한 신품종의 개발 없이는 증가되는 식량의 요구를 충족시킬 방법이 막연하다. 수천억 달러의 시장규모가 예상되는 농업·의료산업에서 조만간 생명공학 기술이 핵심을 이룰 것으로 전망되고 있다. 이를 예상한 다국적기업들 (Monsanto, Dupont, Syngenta, AgrEvo 등)은 적극적인 사업 확장을 벌이고 있어 관련기술과 생산물에 대한 시장독점의 우려가 고조되고 있다. 유전공학기술을 응용한 종자 시장 규모는 2000년에 30억 달러에 머물렀으나 2010년에는 250억 달러 규모의 시장 형성을 예측하고 있다. 이는 작물의 상당 부분이 유전자변형 작물로 대체

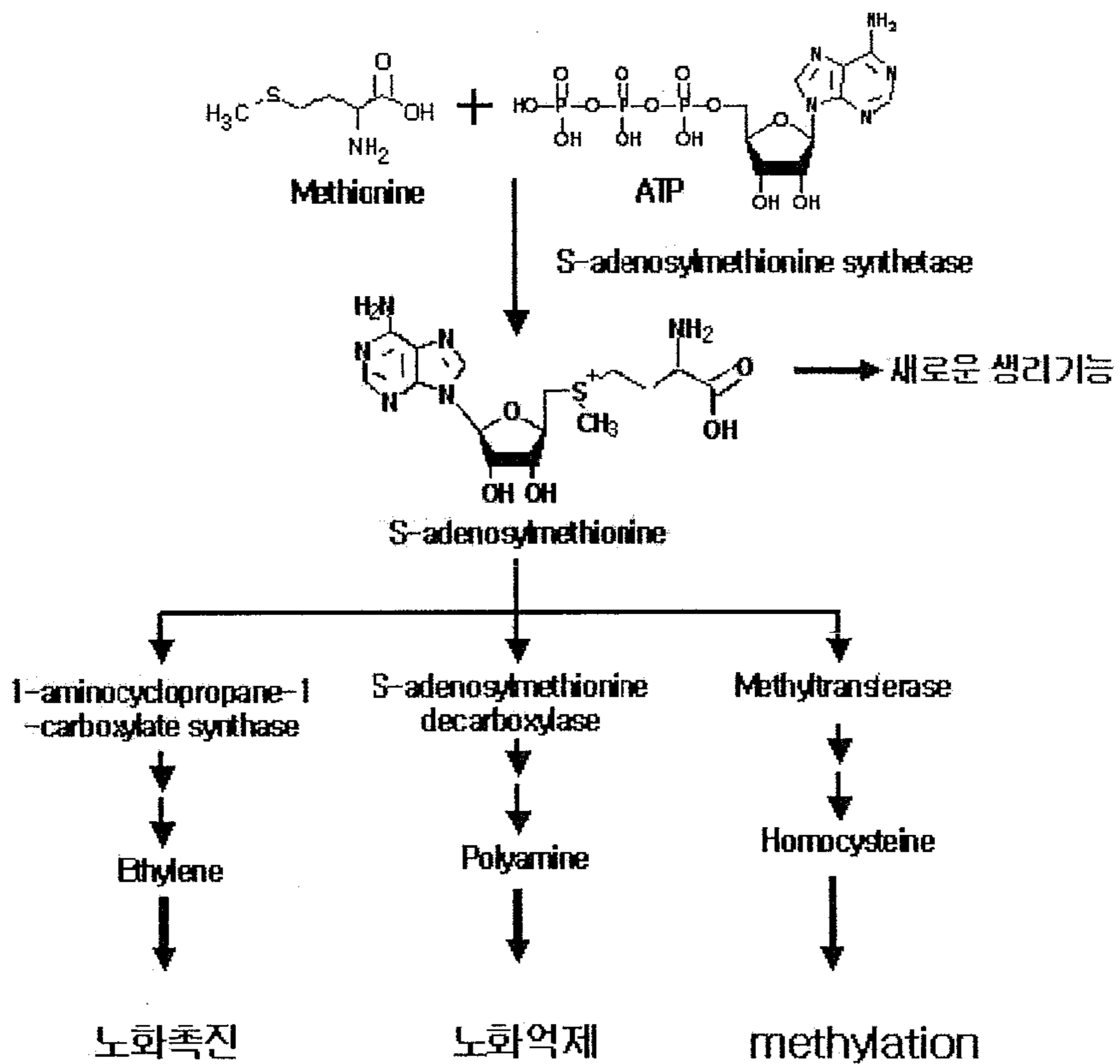


그림 1. 식물에서의 SAM의 생합성 및 대사경로

(에틸렌은 전구체인 SAM이 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) syntase에 의하여 ACC로 변환되어 생성되며, 폴리아민은 SAM이 SAM decarboxylase과 putrescine aminotransferase에 변환을 거쳐 생성된다)

될 것임을 시사하고 있다. 본 과제에서 시도하는 SAM 대사조절을 통한 노화 조절 및 환경 내성 작물이 개발되면 세계적으로 1조원, 국내에서는 수백억 원의 경제적 효과가 예상된다. 현재 뚜렷한 치매치료제가 개발되어 있지 않은 시점에서 SAM 함량이 높은 작물의 치매 예방효과가 입증되면 경제적 효과는 물론이고 금전으로 환산할 수 없는 삶의 질을 제공할 수 있을 것이다.

또한 SAM은 간에서의 독소물질의 무독화에도 작용하여 간 기능 개선 효과가 증명되고 있는 등 관련 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Fern Andez-Checa et al., 2002; Lieber et al., 2002; Ji et al., 2004). 한편, SAM은 국내에서는 식품 원료로써 법적지위를 인정받지 못하는 물질이지만 간기능 개선 질환용 치료약물로 경구용이나 주사제로 폭넓게 사용되어온 물질이다. 현재 미국과 EU 등에서는 식이보충용 식품원료로 널리 사용되고 있는데, 특히 알코올성 장애에 관한 연구논문(Stickle et al., 2003a; Stickle et al., 2003b)은 최근에도 년간 수백편씩 발표되고 있는 중으로 앞으로도 지속적인 관심을 받을 원료로 주목받고 있다. 이와 같이 SAM이 빈번히 발생하는 현대병의 치료제로 사용하고 있기 때문에 인위적으로 SAM을 과다 생산하는 기능성작물(과채류)이 개발되면 병 예방에 크게 기여할 것이다.

이와 같이 SAM은 전 생물체에 걸쳐 공통적인 생리기능과 생물 종에 따라 상이한 생리활성을 가지는 다기능적 물질이기 때문에 인위적인 대사조절로 생체내의 SAM의 양적 조절을 통해 선택적으로 작물의 생산성과 기능을 향상시킬 수 있는 활용가치가 높은 물질이다. 본 과제에서는 (1) 동물에서 나타나는 SAM의 치매치료제 및 간 기능 개선제에 주목하여 SAM 고함량 기능성 작물을 개발하고자 한다. 또한 (2) SAM의 새로운 대사기능을 밝혀 생산성이 높은 작물개발을 위한 기초기반기술을 확보하고(3) 모델 식물을 이용하여 SAM과 신호전달 관련 단백질간의 상호작용을 밝혀 새로운 기능을 규명하여 스트레스 내성 식물개발의 기반을 마련하고자 한다.

## 제 2절. 연구개발의 범위



## 1. 연구개발의 최종 목표

- SAM의 새로운 대사기능을 밝혀 생산성이 높은 작물개발을 위한 기초기반 기술을 확보한다.
- SAM의 신호전달 관련 단백질간의 상호작용을 밝혀 새로운 기능을 규명하여 스트레스 내성 식물개발의 기반을 마련한다.
- 동물에서 나타나는 SAM의 약효에 주목하여 SAM 고함량 기능성 작물을 개발한다.

## 2. 세부과제별 연구개발 내용 및 범위

SAM은 에치렌과 폴리아민의 전구체로서 식물 생장에 깊이 관여하고 있다. 그러므로 제 1 세부 과제에서는 주요작물인 애기장대에 생화학적 게놈연구 기술을 도입하여 SAM 대사관련 효소 유전자의 기능 및 조절 기작을 효율적으로 규명하고, SAM의 대사 흐름과 식물생장을 유기적으로 분석하여 새로운 SAM의 생리·대사체계를 밝히고자 한다. 이를 위해서 먼저 애기장대에 존재하는 SAM-s를 조사하고 유전자원을 확보하며, 외부환경 변화 및 스트레스에 의한 발현 변화를 살펴보고, 애기 장대에서 SAM-s를 과대발현 한 뒤에 생화학적인 형질 규명을 통하여 SAM 대사 흐름 연구 하고, SAM 고함량 기능성 작물 개발을 할 수 있는 기초 기반 기술을 마련하고자 한다.

제 2 세부 과제에서는 SAM과 결합 가능성이 있는 조절 단백질 유전자를 탐색하고, SAM과 조절 단백질간의 결합여부를 생화학적으로 밝히고 그에 따른 생리학적 기능을 조사한다. 이를 위해서 SAM binding motif를 활용하여 애기장대 유래의 신호전달 단백질을 탐색, 선별하고 신호전달 단백질의 생화학적 기능을 분석하며, SAM과의 상호작용 가능성에 대해 연구하고자 한다. 또한 신호전달 단백질의 유전자 결손 식물을 확보하여 광 및 건조 등 외부환경에 대한 스트레스 내성을 조사함으로써 생체 내 기능을 분석하고 SAM의 새로운 생리기능을 밝히고자 한다.

제 1 협동 과제에서는 기능이 밝혀진 SAM-s와 SAM 대사관련 유전자를 각각 토마토 과실과 감자의 껍질에 과다발현하여 간 기능저하 및 치매에 임상적 효과가 있는 SAM과 폴리아민을 많이 생성하는 고기능성 작물을 개발하고자 한다. 이를 위해 1년차 연구로 SAM 생합성 유전자를 클로닝 하고, 기능을 분석하며, 2년차 연구를 통하여 기능이 분석된 SAM 생합성 유전자를 감자와 토마토에 형질전환하여 재분화 식물체를 선발코자 한다. 3년차 연구에서는 기내에서 선발된 형질전환 식물체들은 다양한 유전분석을 실시하여 포장재배 전 단계까지의 식물체를 증식하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 SAM의 기능에 대한 임상적 연구

SAM은 섭식을 통해서만 매우 적게 체내로 들어오고, 간에서 methionine으로부터 생합성 된다. SAM의 생합성에는 엽산 (folic acid)과 비타민 B12가 필요하다. 이들 두 종류의 비타민이 결핍될 경우 혈액과 중추신경계에 SAM의 양이 부족하게 된다는 사실이 밝혀진 바 있으며 (Bottiglieri et al., 1994), 이러한 SAM의 부족은 간경변 (cirrhosis), 관상동맥질환 (coronary heart disease), 노인성치매 (Alzheimer's disease)와 우울증의 발생과 밀접하다는 사실이 밝혀진 바 있다 (Bottiglieri et al., 1990; Osman et al., 1993; Loehrer et al., 1996). 또한 SAM은 사람의 체내에서 40종류 이상의 필수 대사 과정에 관여하며, 특히 해독 작용, 항산화 작용, 뇌구성 물질의 조성에 관여한다는 연구결과가 보고된 바 있다 (Bottiglieri et al., 1994; Chiang et al., 1996). 또한 체내 dopamine의 수준을 높여 줌으로써 우울증 치료제에 효과적이라는 연구결과를 많이 확인할 수 있다 (Salmaggi et al., 1993).

### 제 2 절 기능성 물질 생산을 위한 형질전환 작물 개발

식물체에서의 안정한 형질전환이 보고 된 이래 (Fraley et al., 1983, Horsch et al., 1984) 15년이 지나서야 사람들은 경제적 가치가 있는 외래 단백질을 생산할 수 있는 형질전환 식물체의 필요성을 인식하였다 (Kusnadi et al., 1998). 단백질 생산을 위하여 형질전환 동물, 세균, 곰팡이 등을 사용할 수도 있지만 고등 식물체를 사용함으로써 안전하면서도 가장 높은 경제적 이익을 얻을 수 있기 때문에 이에 대한 많은 연구가 이루어졌다 (Daniell et al., 2001, Hood et al., 2002). 최근까지의 집중적인 연구 결과, 다양한 유용 물질들이 식물체에서 효율적으로 발현할 수 있다는 것을 알아낼 수 있었다. 이러한 예로서, 인간 혈청 단백질과 성장조절제, 항체, 백신, 산업효소, 생물 고분자 물질 및 분자생물학

시약 등을 들 수 있다 (Hood et al., 2002, Twyman et al., 2003).

미국, 일본, 유럽 등 기술선진국에서는 유용유전자 자원을 확보하고 그 기능을 이용하여 유전자 변형작물을 개발하는 연구에 대대적인 투자가 진행되고 있다. 현재 외국에서 상품화가 완료되어 판매되고 있는 유전자 변형작물로는 옥수수 15종, 토마토가 5종이다. 최근 스위스에서는 비타민 A가 강화된 황금 벼를 개발하여 현재 쌀의 주 소비국 중의 하나인 필리핀에서 재배하고 있다. 알파 토크페롤의 대사과정을 조절하여 항산화제인 비타민 E를 고생산하는 작물연구가 진행되고 있으며, 폴리아민 고함량 토마토 등의 고기능성 작물이 개발되었다. 또한 식물생장에 관여하는 식물호르몬인 지베렐린의 생합성 대사를 조절하여 바람이나 비에 쓰러지지 않아 생산성을 높이는 반 왜성 벼가 일본에서 개발되었다.

국내에서는 벼와 배추를 대상으로 유전체를 확보하여 고부가가치의 신 기능성 작물 개발을 위한 유용 유전자 기능연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 유전자를 이용하여 국내에서도 연구실 수준의 유전자변형 식물 개발 사례는 다수가 보고 되고 있다. 또한 농진청과 국내 여러 대학에서 식물의 환경 스트레스 신호전달 기작에 대한 연구를 진행하고 있다. 최근 들어 중금속에 대한 내성 식물 및 환경스트레스 식물개발에 괄목할 만한 성과를 거두고 있다. 그러나 가뭄, 저온 등 다양한 환경내성 식물체의 개발을 위하여 보다 많은 유용유전자 발굴이 필요하며, 다양한 방법을 통한 체계적인 연구가 필요하다. 국내에서도 미생물에서는 어느 정도 대사기능에 대한 연구가 진행되고 있으나 아직 주요작물에서는 대사기능연구에 기반 기술이 되는 생리학적 대사체계에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서 활용한 것과 동일한 종류의 유전자인 SAM-s 유전자를 효모에서 분리하여 토마토에 도입한 결과 polyamine이 증가되었다는 보고 (Mehta et al., 2002)에서 polyamine의 함량이 증가시켜 기능성을 높이려는 시도가 확인된바 있으나 식물에서 유래한 SAM의 과대 발현을 유도한 보고는 확인된 바 없다.

지금 전 세계적으로 작물을 경작할 수 있는 면적이 점점 줄어들고 있다. 이에 척박한 환경에서도 작물이 자랄 수 있도록 작물을 변형시키는 연구도 진행 중이다. 토양의 염분 농도는 작물의 광합성 양을 감소시키고 활성 산소의 양을 증가시켜 생리 기능을 제한한다. 따라서 염분 농도가 높은 곳에서도 작물의 정상

적인 성장을 위해서 항산화 효소의 발현을 증가시키는 등의 노력을 하고 있다. 또한 토양이 머금고 있는 금속에 대해서도 작물의 생존이 영향을 받게 되는데, 산성 토양에 의해 분비되는 알루미늄은 작물 뿌리에 흡수되어 세포의 물질대사에 장애를 일으켜 뿌리의 성장을 가로막게 된다. 이러한 알루미늄 중독으로 인해 작물 수확량이 최고 80%까지 감소되기도 한다. 이를 극복하기 위하여 유기산이 알루미늄과 결합하여 뿌리 속으로 들어오지 못하게 하는 방법으로 알루미늄에 견디는 식물에서 착안하여, 박테리아에서 구연산염 합성효소를 발현하도록 하는 유전자를 작물에 주입하여 높은 알루미늄 농도에서도 식물이 자랄 수 있도록 만들어내기도 한다. 수분함량 역시 작물의 생산량에 크게 영향을 미치는데 이것은 폴리아민(polyamine), 프롤린(proline), 글라이신 비타인(glycine bitaine)과 같은 대사물질의 생합성을 조절함으로써 가뭄에 영향을 받지 않는 작물을 만들 수 있다.

표 1은 유전자 변형기술을 도입하여 개발되고 있는 새로운 기능성 작물의 예를 보여 준다.

표 1. 유전자 변형기술을 도입하여 개발되고 있는 새로운 기능성 작물의 예

분 류	형 질	개 발 자	국 가
영양소 증가	녹말 함량 증가된 감자	몬산토	미국
	불포화 지방산 생산하는 애기장대	Bristol 대학	영국
	비타민C 함량 많은 우량 상추	(주)농우바이오	한국
	단백질 및 필수 아미노산 함량이 증가된 감자	Jawaharlal Nehru 대학	인도
백신	자궁경부암 예방 감자	로체스터, 코넬 연구팀	미국
	B형 간염 백신 당근	Giessen 대학	독일
	당뇨병 치료 벼	농업생물자원연구소와 일본제지	일본
	광견병백신 생산 담배	토마스제퍼슨 의과대학	미국, 영국
환경스트레스 저항	가뭄 저항성 부활초	Bonn 대학	독일
	환경 내성 수피 벼	명지대, 코넬	한국
	염분 저항성 콩, 쌀, 토마토	산둥보통대학	중국
기타 형질	저 니코틴 담배	농무부, 벡터 토마코	미국
	성장속도 개선 벼	명지대	한국
	지뢰탐지 유채	테네시	미국
	중금속 정화 식물	포항공대	한국
	저 카페인 커피	나라첨단과학기술대학원	일본

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절 식물의 미규명된 SAM의 생리·대사체계 해명

#### 1. 연구 수행 방법

##### 가. 애기 장대로부터 SAM-s gene 클로닝

애기장대에 존재하는 4개의 SAM-s gene을 클로닝하기 위하여 이미 알려져 있는 유전자 정보를 근거로 degeneration primer를 표1과 같이 제작하였으며, 애기장대의 mRNA를 분리한 뒤, cDNA library를 제작하고 이로부터 PCR을 이용하여 SAM 생합성 유전자를 탐색, 확보하였다. 이를 위하여 사용한 PCR primer는 표 2와 같다. mRNA 분리에는 Qiagen kit를 사용하였다. PCR을 통해 확보한 유전자를 pLitmus 벡터내로 삽입시키기 위하여, 제한효소 처리된 DNA를 ligation 시켰다. 2 uL의 순수 분리된 벡터 DNA와 4 uL의 SAM DNA를 혼합하여 ligase를 처리한 후, 16 °C에서 하룻밤 반응시켰다. 이렇게 ligation 반응이 수행된 반응물을 *E. coli* DH5a 내로 형질전환 시켰다. 형질전환은, 5 uL의 ligation 반응물을 *E. coli* DH5a competent cell과 혼합한 후, 얼음에서 30분 처리하였다. 그 후, 42°C에서 1분간 열처리한 후, 다시 얼음으로 옮겨 몇 분간 두었다. 형질전환 된 clone을 얻기 위하여 competent cell을 ampicillin이 첨가된 LB agar 배지에 도포하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 형질 전환된 colony를 얻었다. 얻어진 colony를 ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에서 배양하여 plasmid DNA를 분리하였고, 이것을 다시 제한효소로 처리하여 1.3 kb의 SAM-s 유전자에 해당되는 DNA 밴드가 분리되는지를 확인 한 후, 박테리아는 glycerol stock으로 만들어 -70°C에 보관하고, DNA는 sequencing을 실시하였다.

표 2. 애기장대의 SAM-s 유전자 분리를 위한 primer

유전자명	Degenerate primer의 염기서열
SAM-s 1	Forward: 5'-CGGAATTCATGGAGACTTTTCTATTTCAC-3' Reverse: 5'-CGGCGGCCGCTTAAGCTTGAGGTTTGTCCCAC-3'
SAM-s 2	Forward: 5'-CGGAATTCATGGAGACTTTCCTATTTCAC-3' Reverse: 5'-CGGCGGCCGCTTAAGCTTGAGGTTTGTCCCAC-3'
SAM-s 3	Forward: 5'-CGGAATTCATGGAATCTTTTTTTGTTTCACATCTGAA-3' Reverse: 5'-CGGAATTCTTGTTTCACATCTGAATCCGTCAACGAG-3'
SAM-s 4	Forward: 5'-CGGAATTCATGGAAACGTTTCCTATTTAC-3' Reverse: 5'-CGGCGGCCGCTTAGGCCTTTGGCTTGAGCGGCT-3'

#### 나. 대장균에서 애기장대 유래 SAM-s 효소 발현 및 분리

cDNA library로부터 cloning 한 유전자를 발현 vector에 construction하여 *E. coli* system에서 발현 시켰다. SAM 생합성 유전자는 발현벡터인 pET-28a에 construction하고, *E. coli* BL21에 형질 전환하였다. 형질전환 대장균의 단일 colony를 Kanamycin(100 µg/ml)이 첨가된 3 ml LB 액체배지에서 12 시간 배양한 후 induction하기 위하여 동일 조건의 50 ml의 LB 액체배지에 3 ml를 접종하여 37°C에서 OD<sub>600</sub>이 0.3-0.4가 될 때까지 배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 induction시켰다. Induction 후 25°C에서 6 시간 배양한 후 harvest 하여 cell을 얻었다. Cell을 sonication으로 완전히 깨 후 원심분리를 하여 상층액과 침전물을 분리하였고 SDS-PAGE로 protein의 발현을 확인하였다. Cell crude extract는 Novagen사의 His Bind kits을 이용하여 순수한 SAM 생합성효소를 분리하였다.

#### 다. 애기장대 유래 SAM-s 효소를 사용한 SAM 생합성 반응 및 분석

Tris/HCl 100 mM, KCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, ATP 5 mM, L-methionine 5 mM과 분리한 enzyme solution 10-50 µl를 첨가하고 pH는 7.8로 온도는 30°C에서 15 분, 30 분, 60 분, 120 분, 180 분 반응한 후 반응을 정지시켰다. 반응을 멈추기 위하여는 50 mM EDTA(100 µl/ml)를 첨가하였다. Control로는 2가지를 사용하였는데, 하나는 반응 solution에 ATP는 첨가하고,



methionine은 첨가하지 않고 사용하였고, 다른 하나는 ATP와 methionine은 첨가하고, 빈 벡터만 들어간 cell의 crude extract를 첨가하여 같은 조건, 같은 시간 하에서 반응하였다. 반응은 37°C에서 15 분, 30 분, 60 분, 120 분 반응하였다. 반응시간대 별로 반응을 마친 후 50 mM EDTA로 반응을 멈춘 후 얼음에 보관하였다. 모든 반응물은 같은 조건, 같은 시간에 take out하여 반응을 정지시켰으며, TLC와 HPLC로 반응 생성물을 확인하였다.

#### 라. 애기장대에서 mRNA 분리 및 RT-PCR

먼저 애기장대를 배양하기 위하여 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0)의 씨앗을 70% 에탄올로 씻은 후 triton X-100: detergent (Rox): 멸균수 (15:15:20) 혼합액으로 씻고 이후 멸균수로 10번 정도 깨끗이 씻어주었다. 4°C에서 약 2일간 암처리를 하여 씨앗이 잘 발아할 수 있도록 준비했다. 식물이 자랄 수 있는 식물 배양기의 온도는 24°C를 유지했고 습도는 40%로, 빛은 16시간, 암은 8시간으로 설정하였다. 무균작업을 하기 위하여 식물이 자랄 수 있는 식물 MS 배지를 100×20 mm 조직 배양 디쉬에 25ml정도 배지를 붓고 균한 다음 한 디쉬 당 10개정도의 씨앗을 디쉬 1/2선에서 수평으로 심었다. 식물 배양기에서 식물 뿌리가 수직으로 자랄 수 있도록 디쉬를 90도 수직으로 세워 식물을 15일 동안 키웠다. 15일 동안 자란 *Arabidopsis* 식물에 100μM 자스모닉산 (jasmonic acid)와 살리실산 (salicylic acid)을 각 디쉬에 5ml 처리하여 48시간이 지난 후 잎과 뿌리를 분리하여 샘플링한 뒤 바로 액체질소에 얼려서 -80도에 저장하였다. RT-PCR을 위한 RNA 추출은 QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit를 이용하였다. RNA의 정량을 위하여 PCR의 대조군은 housekeeping gene인 18S rRNA를 사용하였다. 애기장대의 4개의 SAMs 유전자의 염기서열과 발현량을 보기 위한 primers은 표 3과 같으며 표 2에도 밑줄로 표시하였다.

표 3. 애기장대의 SAM-s 유전자 발현 확인을 위한 RT-PCR용 primer

유전자명	RT-PCR용 primer의 염기서열
SAM-s 1	Forward: 5'-CCT AGA CGA GAA AAC CAT CTT-3' (21 mer) Reverse: 5'-CAC AAT CTT TAG TAT CTC CTT G-3' (22 mer)
SAM-s 2	Forward: 5'-CCT TGA CGA CAA AAC CAT CTT-3' (21 mer) Reverse: 5'-CAA CCC TGT TCC GTA AGT GT-3' (20 mer)
SAM-s 3	Forward: 5'-GCC AGT GAT CCC AGA GAA ATA-3' (21 mer) Reverse: 5'-CTT TCC TGT TCC ATA ACT GTC-3' (21 mer)
SAM-s 4	Forward: 5'-GCT AAG TAC CTT GAC GAT AAC-3' (21 mer) Reverse: 5'-GCC TGA AGT CAA ATG CTT CC-3' (20 mer)

#### 마. 애기장대에 SAM-s 유전자 형질전환

Seed culture한 Agrobacteria를 항생제가 들어간 1L YEP에 1ml 가량 넣어 28°C에서 하룻밤 배양 한 뒤에 원심분리하여 균체만을 회수 하였다. 형질전환용 B5 1L에 균체를 다시 현탁하여 40 uL/L의 Silwet L-77을 첨가하였다. 2L 비이커에 위 용액을 적당히 넣고 1-2분가량 식물을 침지 시켜준 뒤 비닐 백으로 덮어서 고정시켰다(3일후 비닐 벗김). 형질 전환된 개체로부터 씨를 얻어 항생제 선별 방법을 통해 F1 세대에 81개의 라인의 씨앗을 확보하였다.

#### 바. SAM-s 유전자 형질전환 애기장대 선별을 위한 PCR analysis

SAM-s 유전자가 과대 발현된 개체를 선별하기 위하여 형질전환에 사용한 pBI121백터 내의 특정 유전자인 35S promoter(그림 6)가 염색체내에 삽입되었는지 확인하였다. 이를 위해 PCR analysis을 수행하였으며 프라이머는 백터에 있는 CaMV 35S promoter의 시퀀스를 사용하였다. PCR 프라이머는 35S F: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3', 35S R: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGCGTCA과 같다. PCR 조건은 94°C/3min, 94°C/20sec, 54°C/40sec, 72°C/1min (30cycles) 로 products 사이즈는 195 bp이다.

## 2. 연구 결과

### 가. 모델식물인 애기장대에서 SAM-s 유전자 분석

염기 서열 분석 결과, 애기 장대에는 4개의 SAM-s 유전자가 존재함이 알려져 있다. 본 연구에서는 SAM 생합성 유전자의 기능을 확인하기 위하여 애기장대에서 4개의 SAM 생합성 유전자를 모두 확보하고자 하였다. mRNA 분리후 cDNA를 합성하여 4개의 SAM-s 유전자를 모두 클로닝하였으며, sequencing 후 얻어진 염기서열을 이용하여 gene bank에서 blast를 실시한 결과, 분리된 유전자가 애기 장대의 SAM 유전자임을 확인할 수 있었다 (표 4).

### 2. 애기장대의 SAM-s 효소의 생화학적 기능 분석

본 연구에서는 4개의 SAM-s 유전자를 클로닝하였으며, 이를 대장균에서 발현, 정제하였다. 이렇게 분리한 4개의 SAM-s 효소를 각각 SDS-PAGE를 실시한 결과, 모두 soluble protein이었다 (그림 2).

SAM의 전구체는 ATP와 methionine으로 SAM-s 에 의하여 합성된다. 애기장대에는 4개의 SAM-s 유전자가 존재하는데 단백질 서열이 약 90% 정도 동일하며, 다른 생물 종간에서도 일, 이차 대사에 사용되는 SAM-s간에는 매우 높은 유사성을 보인다. 그러나, 현재까지 왜 4개의 SAM-s의 isoform이 애기장대에 존재하는지에 대한 명확한 연구가 이루어지지 않은 상태이며, 그 이유에 대해서 여러 가지 가설이 제시되어 있는 상태로 각각의 SAM-s가 생체 내에서 다른 기능을 할 것으로 예측되고 있다. 이 중에서 SAM-s 3 gene은 lignin 생성에 관여한다는 보고가 있어, 본 연구팀에서는 특히 SAM-s 3 효소에 대한 기능을 분석하기 위해서 먼저 *in vitro*에서 SAM 생합성 기능에 대해서 실험해 보았다.

기질로 ATP와 methionine을 사용하여 분리, 정제한 SAM-s 효소를 넣어 반응 시킨 다음, 먼저 silica TLC plate에서 확인한 결과, 120 분 반응물에서 가장 진한 spot이 발견되었다. 대조군으로는 enzyme을 넣지 않고 반응시킨 것과, Sigma 회사에서 판매하는 standard 시약을 사용하였다. Standard 시약의 Rf 값이 0.66으로 나타났고, 분리 정제하여 사용한 SAM synthase와 기질이 첨가된 반응 생성물에서는 standard solution과 동일한 Rf 값인 0.66이 확인되었다(그림 3A). 그 이외의 spot도 있는데 그것들은 반응하고 남은 기질로 사료된다.

표 4. 애기장대의 SAM-s 유전자의 염기서열

<p><b>SAM-s 1 (At1g02500)</b></p> <p>GAATTCATGGAGACTTTTCTATTACATCTGAGTCTGTAAACGAGGGACACCCAGACAAGCTCTGTGACCAGATCTCTGATGCAGT  CCTCGATGCCTGCCCTTGAACAAGACCCTGACAGCAAAGTTGCTTGTGAGACATGCACCAAGACCAACATGGTCATGGTCTTTGGTG  AGATCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAAGATTGTCCGTGACACCTGTGCGCCATTGGATTTGTCTCTGATGATGTTGGT  CTTGATGCTGACAAATGCAAAGTCCTAGTCAACATTGAGCAACAGAGCCAGACATTGCTCAAGGAGTTCACGGTCACTTCACCAA  ATGTCCTGAAGAAATTTGGAGCCGGTGACCAAGGGCACATGTTTGGTTATGCCACTGATGAAACCCCTGAGTTAATGCCCCTGAGCC  ATGTTCTTGCCACCAAGCTCGGTGCTCGCCTAACAGAAGTCAGAAAGAATGGTACTTGCCTGGCTAAGACCTGACGGCAAAACC  CAAGTCACTGTTGAGTACTACAATGACAAGGGTGCCATGGTCCCAATCCGTGTCCACACAGTCTCATCTCCACCCAACACGATGA  AACTGTGACCAACGACGAAATTTGCCCGTGACCTTAAGGAGCATGTCAAGCCAGTCAATCCAGAGAAGTACCTAGACGAGAAAA  <u>CCATCTTCCACTTGAACCCTTCAGGCCGATTCGTATCGGTGGACCCCATGGAGACGCTGGTCTCACCGGGCGTAAGATCATCATC</u>  GACACTTACGGTGGATGGGGAGCTCACGGAGGCGGTGCATTCTCAGGTAAGACCCAACCAAGGTCGACAGAAGCGGAGCCTACAT  TGTGAGACAAGCAGCTAAGAGCGTTGTGGCTAACGGGATGGCTCGTAGGGCTCTTGTTCAGGTCTCATACGCCATTGGAGTCCCTG  AGCCATTGTCTGTCTTTGTGGACACTTATGAGACTGGATTGATTCAGACAAGGAGATACTAAAGATTGTGAAGGAGAGCTTCGAC  TTCAGACCAGGAATGATGACAATTAACCTTGACCTAAAGAGAGGAGGAAACGGAAGGTTCTTGAAAACGCGGCTTACGGACACTT  TGGAAGAGACGACCCTGACTTCACCTGGGAAGTCGTCAAGCCACTCAAGTGGGACAAACCTCAAGCTGCGGCCGCA</p>
<p><b>SAM-s 2 (At4g01850)</b></p> <p>GAATTCATGGAGACTTTTCTATTACATCTGAGTCTGTGAACGAAGGACACCCCTGACAAGCTTTGCGACCAGATCTCTGATGCAGT  CCTTGATGCCTGCCCTTGAACAAGACCCTGATAGCAAAGTTGCTTGTGAGACATGCACCAAGACCAACATGGTCATGGTCTTTGGTG  AGATCACCACCAAGGCTACGATTGACTACGAGAAGATTGTCCGTGACACTTGCCGTTCCATTGGATTCACTCTGACGATGTTGGT  CTTGATGCTGACAAATGCAAAGTCCTTGTAAACATTGAACAACAGAGCCAGACATTGCTCAAGGTGTTACGGTCACTTCACCAA  ACGTCCAGAAGACATTGGAGCTGGTGACCAAGGACACATGTTTGGTTATGCCACTGATGAAACCCCTGAGCTCATGCCTTTGAGTC  ATGTCCTTGCAACCAAGATTGGTGCTCGTCTCACTGAAGTCAGGAAGAATGGAACCTGCGCTTGGTTAAGACCAGATGGCAAGACC  CAAGTCACTGTTGAGTACTACAATGACAATGGCGCTATGGTTCCAGTCCGTGTCCACACCGTCTGATCTCAACCCAGCAGCATGA  AACCGTTACCAATGACGAGATTGCGCGTGACCTCAAGGAGCATGTGATCAAACCGATCATCCAGAGAAATACTTGACGACAAAA  <u>CCATCTTCCACCTCAACCCATCAGGCCGTTTGTGATCGGGGACACACCGGTGATGCTGGTTAATGAGCGTAAGATCATCATT</u>  GACACATACGGAGGATGGGGAGCTCATGGAGGTGGTGCTTTCTCAGGCAAAGACCCAACCAAGTTCGACAGAAGTGGAGCTTACAT  CGTGAGGCAAGCAGCAAAGAGTGTGGTGGCTAATGGCATGGCTCGCAGGGCTCTTGTCCAGGTCTCATACGCCATTGGAGTACCCG  AGCCATTGTCTGTCTTCGTTGACACTTACGGAAACAGGGTTGATTCCAGACAAGGAGATCCTGAAGATCGTGAAAGAGACATTTCGAT  TTCAGACCAGGAATGATGACAATCAACTTGGACTTGAAGAGAGGAGGAAATGGAAGGTTTCAGAAAACGGCAGCGTATGGACATTT  CGGAAGAGACGACCCTGACTTCACCTGGGAGGTCGTGAAGCCACTCAAGTGGGACAAACCTCAAGCTGCGGCCGCA</p>
<p><b>SAM-s 3 (At3g17390)</b></p> <p>GAATTCATGGAATCTTTTTGTTTACATCTGAATCCGTCAACGAGGGACATCCCAGACAAGCTTTGTGATCAGATCTCCGACGCTAT  CCTCGATGCTTGCCTTGAACAAGACCCTGAGAGCAAAGTTGCTTGTGAGACTTGTACCAAGACTAACATGGTCATGGTCTTTGGAG  AAATCACCACCAAGGCTAACGTTGATTACGAGCAGATTGTTTCGTAACATGCCGTGAGATTGGATTTCGTCTCTGCTGACGTTGGT  CTAGATGCTGACAATTGCAAGGTTCTGGTTAACATTGAGCAACAGAGTCCCTGACATTGCACAAGGTGTTTATGGTCATCTCACCAA  GAAGCCAGAGGAGGTTGGAGCTGGTGACCAAGGTACATGTTTGGGTATGCTACTGATGAGACTCCTGAGCTCATGCCTCTTACTC  ACGTTCTCGCTACTAAGCTTGGAGCTAAACTCACTGAAGTTCGCAAGAATGGAACCTGCCCCTTGGTTGAGGCCAGATGGTAAGACT  CAAGTCACTATTGAGTACATCAACGAAAGCGGAGCCATGGTTCCCTGTACGTGTCCACACTGTTCTCATCTCAACACAGCATGACGA  GACTGTGACTAACGATGAGATCGCAGCTGATCTTAAGGAGCATGTGATCAAGCCAGTATGCCAGAGAAATACCTTGATGAGAAAA  CCATCTTCCATCTCAACCCATCTGGTCTGTTTTGTTATCGGAGGTCCTCATGGAGATGCAGGGCTTACCGGCCGCAAGATCATCATC  GATACTTATGGTGGTTGGGGTGACACGAGGTTGGTGCTTTCTCTGAAAGGACCCAACCAAGGTTGACAGGAGTGGGGCTTACAT  CGTTAGGCAAGCAGCTAAGAGCATTGTAGCCAGTGGGCTAGCGAGGCGGTCATTGTGCAAGTCTCGTATGCCATTGGTGTCCCTG  AGCCATTGTCTGTGTTTCGTGGACAGTTATGGAACAGGAAAGATAACCAGACAAGGAGATTCTTGAGATTGTGAAGGAGAGTTTTGAT  TTCAGGCCAGGTATGATCTCCATTAACCTTGGATCTGAAGAGAGGAGGTAATGGTAGGTTCTTGAAGACTGCTGCCTATGGTCACTT  TGGAAGGACGATGCTGATTTACCTGGGAGGTAGTCAAGCCACTCAAGTCTAACAAGGTCCAAGCGGCCGCA</p>
<p><b>SAM-s 4 (At2g36880)</b></p> <p>GAATTCATGGAACGTTTCTATTACCTCTGAATCCGTCAATGAAGGACACCCAGACAAGCTTTGTGACCAGATTTCTGATGCGAT  CCTTGATGCTTGCCTTAGAGCAAGATCCTGAAAGCAAAGTGGCGTGTGAGACATGCACCAAGACCAACATGGTGATGGTGTTTGGTG  AGATCACTACCGCTGCGAAAGTTGACTATGAGAAGATTGTTAGATCCACTTGCAGGGAGATTGGTTTTATCTCTGCTGATGTTGGT  CTTGACGCTGACAAATGCAATGTTTGGTTAACATTGAGCAACAGAGCCCTGACATTGCTCAGGGTGTTCATGGTCATTTGACCAA  GAAGCCTGAAGATATTGGTGCTGGTGATCAGGGACATATGTTTGGGTATGCTACTGATGAGACTCCTGAGCTCATGCCGTTGACTC  ATGTCCTAGCCACCAAGCTTGGTGCTAAGCTTACTGAAGTGAAGGAAACAAGACTTGGCCATGGTTGAGGCCTGATGGTAAGACA  CAAGTCAAGTGGAGTACAAGAACGATGGTGGAGCTATGATTCCGATTAGAGTCCACACTGTTCTTATCTCAACTCAACATGACGA  AACTGTCACCAATGATGAGATTGCTGCTGACTTGAAGGAGCATGTGATCAAGCCTGTTATCCCTGCTAAGTACCTTGACGATAACA  CCATCTTTCACCTGAACCCATCTGGTCTGTTTTGTGTCATCGGAGGGCCTCATGGTGATGCTGGACTTACAGGGAGGAAGATCATCATT  GACACTTATGGTGGTTGGGGTGCTCATGGTGGAGGTGCCTTCTCAGGAAAGGACCCAACCAAGGTTGACAGAAGCGGTGCCATATAT  CGTGAGGCAGGCTGCAAAGAGCGTGGTAGCAGCAGGACCCGACGCGGTTGTATCGTGCAGGTATCATACGCCATTGGTGTCCCTG  AGCCGCTCTCAGTGTGTTGTTGACACCTACAAGACCGGGACCATCCAGACAAGGATATCCTTGTGTTGATCAAGGAAGCATTTGAC  <u>TTCAGGCCGGGAATGATGGCCATTAACCTTGACCTTAAGAGGGGAGGTAACCTCAGGTTCCAGAAAACCGCTGCGTATGGCCATTT</u>  CGGGCGTATGACCCTGACTTCACCTGGGAGGTTGTCAAGCCGCTCAAGCCAAAGGCCGCGGCCGCA</p>

그리고 동일 조건에서 효소를 제외한 반응 생성물에서는 Rf 값 0.66은 발견되지 않았고, vector만 들어간 strain에서 얻은 crude cell extract를 첨가한 반응 생성물에서도 standard와 동일한 Rf값의 spot은 얻지 못하였다. 이들 반응 생성물 중에서 가장 좋은 yield를 보인 120분 반응물을 이용하여 HPLC 분석으로 확인하였다.

HPLC 분석에서도 TLC와 같은 시료들과 standard를 사용하였다. HPLC의 standard sample의 Retention time(RT)은 8.2으로 확인되었다. SAM-s와 기질을 첨가하여 120 분 반응한 반응 생성물 역시 RT값 8.2에서 standard와 동일한 pick을 확인하였다. 그 외에 작은 pick들이 있는데 이것들은 반응에 참여하고 남은 기질들이라 사료된다. 기질 pick로 추측되는 pick들은 효소를 첨가하지 않고 반응한 반응 생성물 분석에서도 동일하게 나타남을 알 수 있다.

대조구로 사용한 vector만 도입된 strain의 cell crude extract를 첨가하여 반응시킨 반응 생성물에서는 standard와 동일한 pick이 아주 약하게 잡히는 것을 볼 수 있는데 이것은 original cell의 chromosome에 존재하는 SAM-s 유전자에 의해 발현되어 나온 SAM-s 효소의 영향이라 추정된다. 그러나 그 발현량이 현저히 적어 SAM의 생합성에 많은 기여를 하지 못하는 것으로 사료된다. 또 다른 negative control인 효소를 첨가하지 않은 반응 생성물에서는 전혀 standard solution과 같은 RT값을 갖는 pick은 나타나지 않았다 (그림 3B). 이 결과를 통하여 애기장대에서 분리한 SAM-s 3 유전자의 기능을 밝혔고, SAM-s의 활성을 확인하였다.

### 3. 애기장대에서 환경변화에 따른 SAM-s의 발현 조절

에틸렌 생합성의 전구체인 SAM은 세포내에 존재하는 메티오닌의 대부분으로부터 생합성 되어진다. 애기장대에는 각각의 염색체에 1개씩, 모두 4개의 SAM-s (At1g02500, At4g01850, At3g17390 그리고 At2g36880)가 있다. SAM은 에틸렌 등 생리조절 물질의 생합성 과정에서 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)와 함께 중요한 역할을 한다. 에틸렌의 생산은 식물의 발달 과정과 외부 환경의 스트레스에 대한 반응에 의해 잘 조절되어진다. 그러므로 본 연구에서는 먼저 애기장대에 존재하는 4개의 SAM-s 유전자의 발현 양을 살펴보고 외부환경 변화 및 스트레스 등에 의해 SAM-s 유전자의 발현이

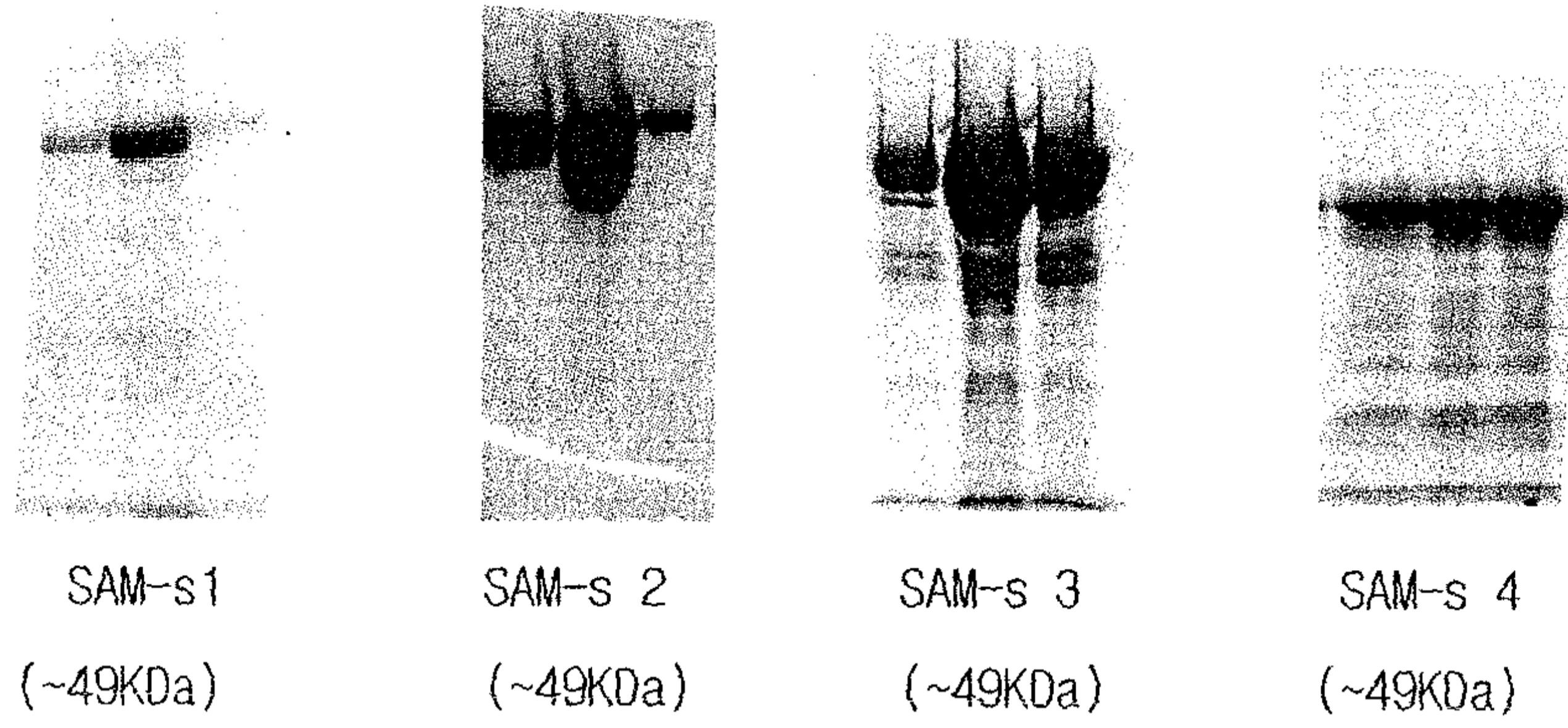


그림 2. 대장균에서 애기장대 유래 SAM-s 효소의 과대발현

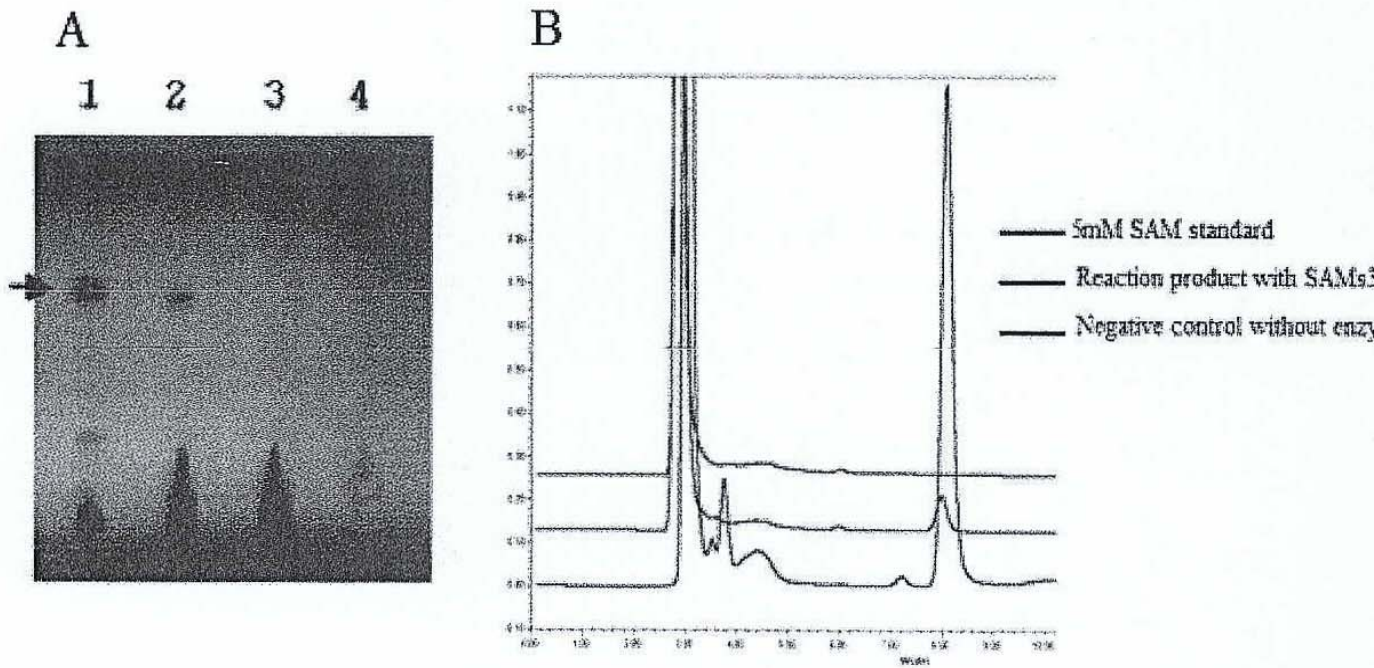


그림 3. 애기장대의 SAM-s 3 효소 반응 결과

(A: TLC 분석결과, 1: standard, 2: ATP와 methionine이 SAM-s 효소와 반응한 반응물, 3: 빈 벡터만 도입된 균주의 crude extract와 ATP, methionine 반응물, 4: wild-type 균주의 반응물. B : HPLC 분석 결과 )

어떻게 조절되는지 알아보기 위하여 식물이 받는 외부의 스트레스의 한 방법으로 식물의 방어기작으로 잘 알려진 elicitor인 salicylic acid와 jasmonic acid를 처리하였다.

RT-PCR 분석을 시행한 결과, 애기장대의 4개의 SAM-s 유전자, SAM-s 1 (At1g02500), SAM-s 2 (At4g01850), SAM-s 3 (At3g17390) 그리고 SAM-s 4 (At2g36880)의 각각의 발현량은 그림 4 및 그림 5와 같다. 일반적으로 잎(그림 5)과 뿌리(그림4) 모두에서 SAM-s 1, SAM-s 2 그리고 SAM-s 4는 항상 발현되는 것 같다. 이와 달리 SAM-s 3은 다른 것에 비해 일반적인 상태에서의 발현 양이 낮다. 그러나 뿌리에서의 RT-PCR 결과를 보듯이 jasmonic acid를 처리했을 때 대조군에 비해 발현 양이 많아지는 것을 볼 수 있다. SAM-s 3은 아래의 두 결과를 통하여 식물이 잘 자랄 수 있는 일반적인 조건하에서는 약하게 발현되다가 어떤 외부의 자극이 오게 되면 식물이 이를 감지해 SAM-s 3의 유전자의 발현 양을 높이는 것으로 생각된다. 에틸렌이 식물의 스트레스에 대한 방어기작중 하나이고 SAM이 이의 전구체인 것으로 볼 때, 이러한 결과는 매우 주목할 만하다.

#### 4. SAM-s 유전자를 과대발현한 애기장대의 생리학적 연구

애기장대에는 4개의 SAM-s 유전자가 존재하며, 그 기능이 다를 것이라고 예상된다. 또한 SAM은 식물체내의 생리 조절 물질의 전구체로 사용되기 때문에 SAM을 생합성하는 유전자를 과대 발현하였을 때 어떠한 생리적 변화를 보이는지 연구하는 일은 학문적으로도 매우 의미 있다고 할 수 있다. 그래서 본 연구진은 고려지 농업연구소의 서효원 박사팀이 *Solanum brevidense*에서 클로닝한 SAM-s 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation을 사용하여 애기장대에 형질전환하였다. 형질전환에 사용된 벡터는 그림 6과 같다.

형질 전환 결과 F2세대에서 얻은 81개 라인을 확보하였으며 그 중에서, SAM-s 유전자가 크로모솜 안에 삽입된 개체를 확인하고자 하였다. 확보한 81개 라인의 씨앗을 각각 10-20여개 발아하여 kanamycin이 첨가된 MS 배지에서 살아남은 개체만을 토양에 옮겨서 배양하였다. 성장한 개체의 잎을 채취하여 genomic DNA를 분리하였고, SAM-s 유전자가 삽입되었는지 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다.



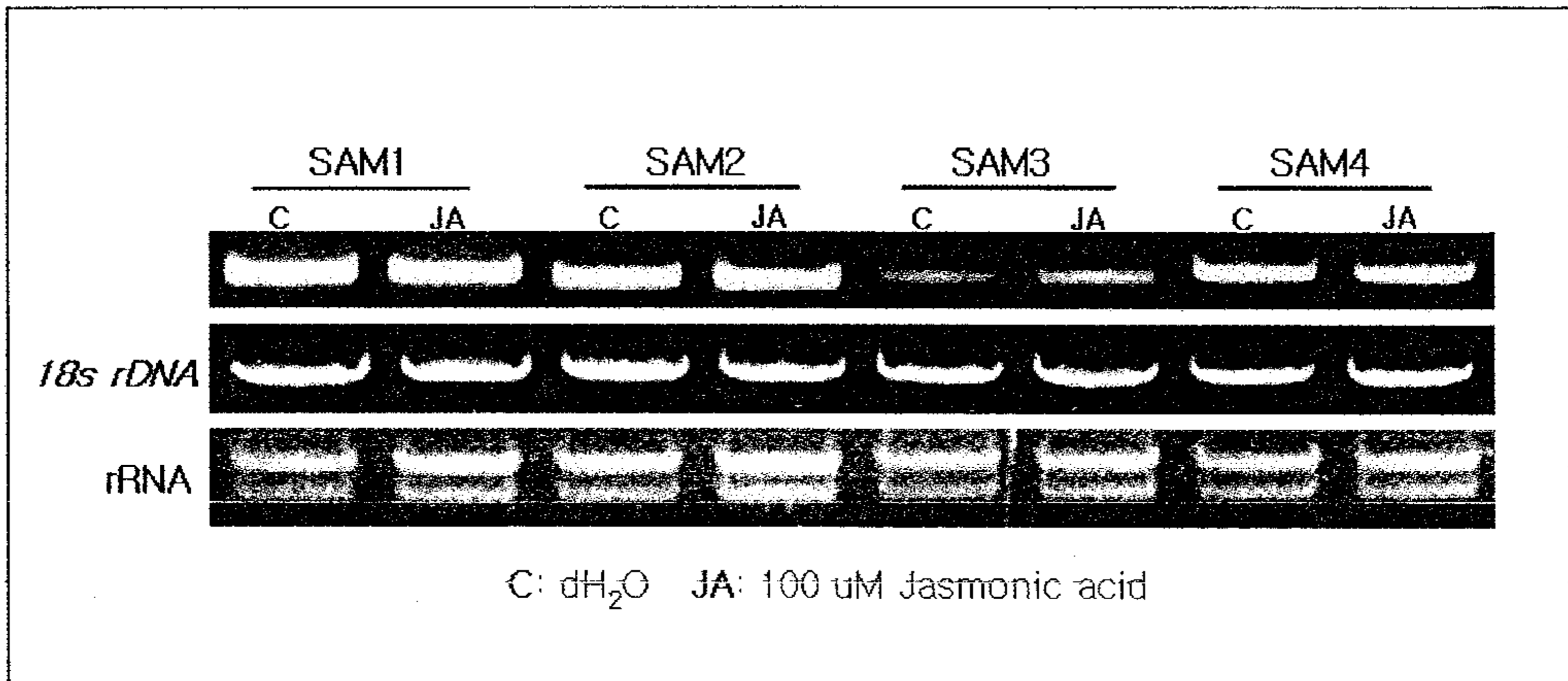


그림 4. 자스모닉산을 처리한 애기장대 뿌리에서의 SAM-s 유전자의 발현

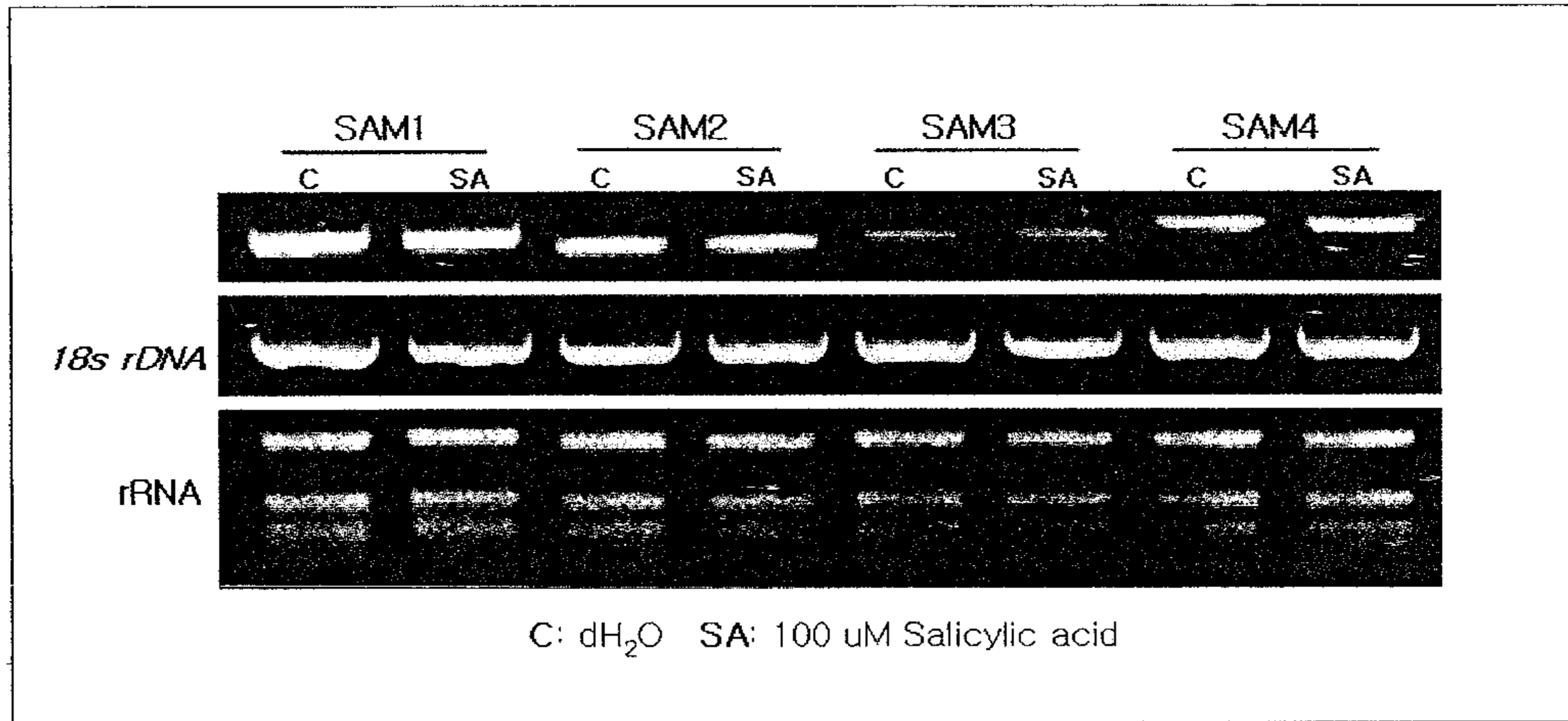


그림 5. 살리실산을 처리한 애기장대의 잎에서의 SAM-s 유전자의 발현

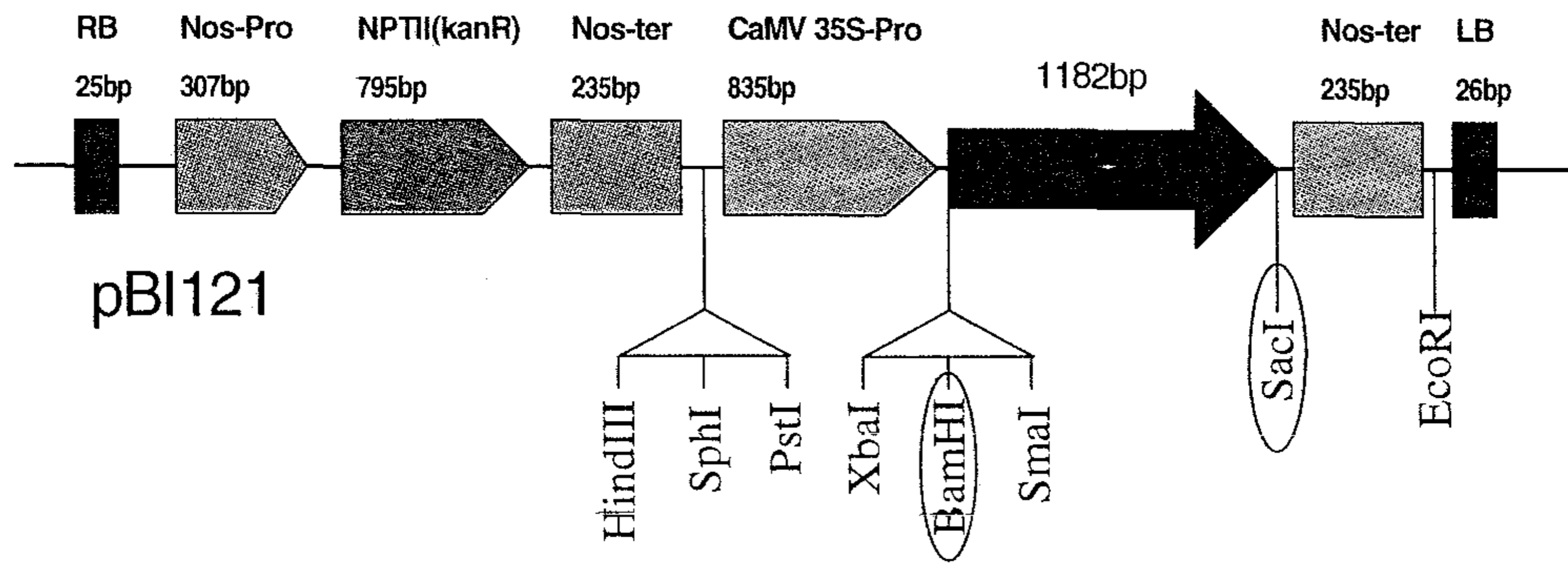


그림 6. *S. brevidense*에서 클로닝한 SAM-s 유전자 vector construction 지도

그 결과, 그림 7에서와 같이 wild type에서는 mutants에만 있는 35S promoter에 의한 PCR products인 195 bp의 밴드를 찾아 볼 수 없었다. 그러나 28개의 형질전환 개체 중에서 1번 레인의 식물 1-4 라인만 제외하고는 모두 SAM-s가 형질전환이 됐음을 확인할 수 있다. 이후에 southern blotting을 통하여 몇 카피가 들어갔는지 확인하고자 한다.

이렇게 선별된 SAM-s 유전자를 과대 발현한 애기장대를 키워 가면서 성장 모습을 관찰하였다. 그 결과, 그림 8과 같이 wild type에 비해서 SAM-s를 과대 발현한 애기장대 잎의 낙엽화가 빨리 진행되는 것을 발견할 수 있었다. 이는 아마도 SAM-s 유전자의 과대 발현으로 생체 내 SAM 함량이 증가하여 폴리아민과 같은 생리조절 물질의 생성 또한 촉진되어진 결과라고 예상된다. 그러므로 앞으로 연구를 진행하여 애기 장대의 성장 단계에서 SAM 및 폴리아민과 같은 SAM관련 대사물질의 함량을 정량적으로 측정하고 분자수준에서도 발현량이 증가하였는지 확인하고자 한다. 이러한 연구가 완료된다면 애기장대에서 SAM 대사 조절에 대한 새로운 가설을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

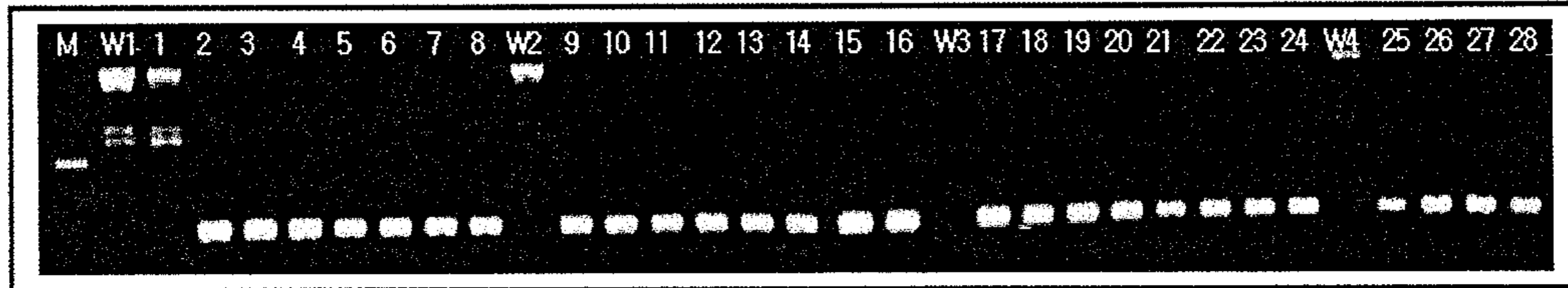


그림 7. SAM-s 유전자를 과대발현한 애기장대 스크린을 위한 PCR  
(M: 100bp ladder, W1: wilde type 1, 1: 1-4, 2: 5-2, 3: 5-3, 4: 6-3, 5: 8-3, 6: 9-4, 7: 9-5, 8: 14-8, 9: 16-8, 10: 19-2, 11: 22-1, 12: 22-2, 13: 23-1, 14: 24-3, 15: 24-4, 16: 25-1, 17: 36-4, 18: 39-3, 19: 54-9, 20: 58-6, 21: 59-1, 22: 59-2, 23: 59-3, 24: 59-5, 25: 64-2, 26: 64-4, 27: 76-6, 28: 76-8)

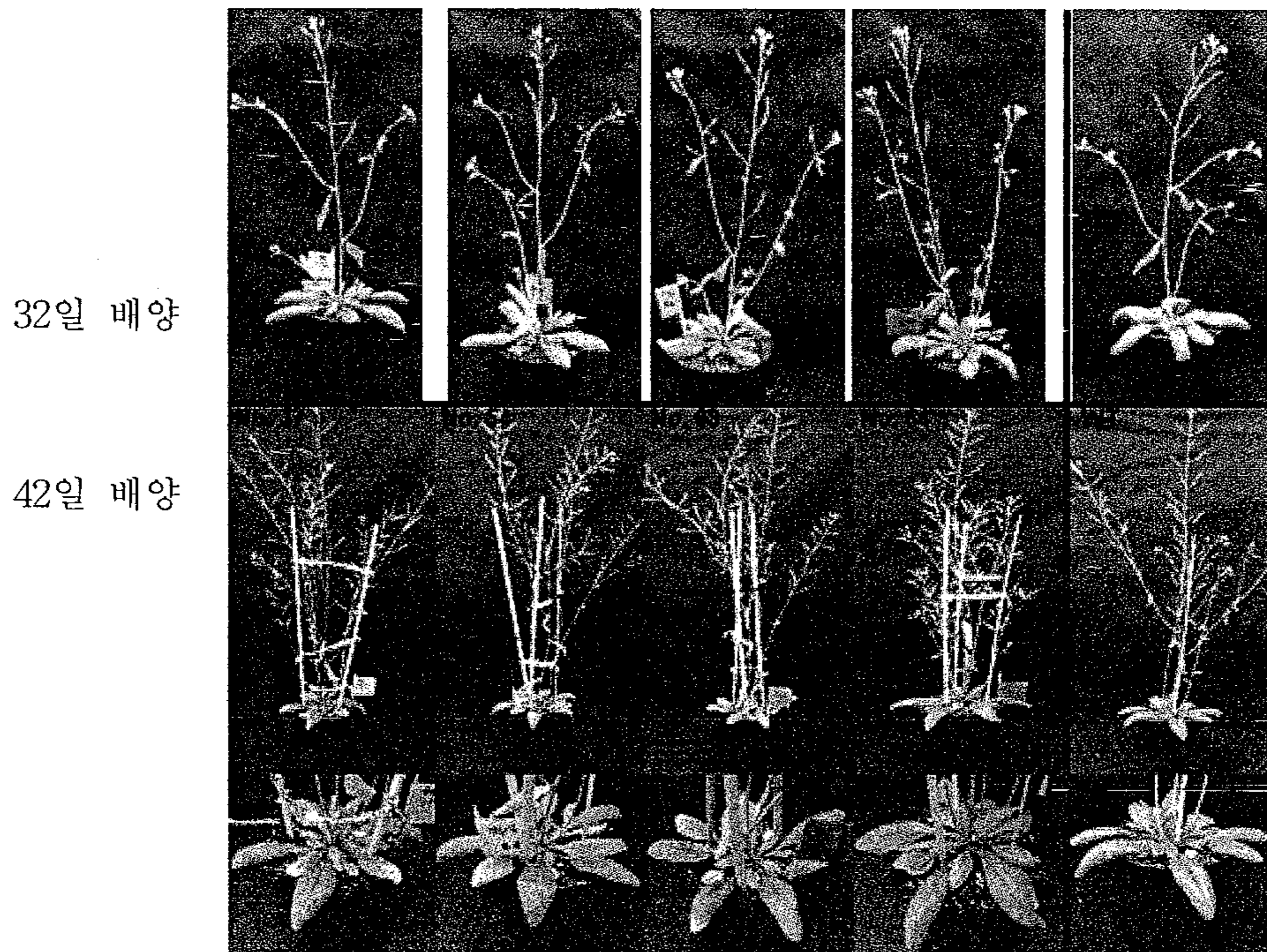


그림 8. SAM-s 유전자를 과대발현한 애기장대의 성장 모습

## 제 2 절 SAM의 신호전달 관련 단백질간의 새로운 생리 기능 탐색

### 1. SAM과 결합하는 조절 단백질의 확보

SAM은 ATP 다음으로 다양한 생체 대사에 관여하는 중요 생체물질이다. 그럼에도 불구하고 SAM에 의한 대사조절 기능에 대한 연구는 전무한 상태이다. 근래 본 연구진이 토양 미생물에서 SAM의 신호전달 기능을 최초로 밝힌 바 있다. 이와 같은 맥락에서 식물에서의 SAM의 신호전달 기능 연구를 시작하게 되었으며 구체적으로는 스트레스 내성 식물개발의 기반을 마련하고자 SAM과 결합하는 신호전달 단백질을 탐색하고자 하였다. SAM과 결합 가능한 신호전달 단백질 선별하기 위하여 SAM binding motif (GxGxGx)를 활용하여 Arabidopsis 유래의 protein kinase를 탐색하였다. 그 결과 SAM 바인딩 사이트 (GxGxGx)를 가지는 protein Kinase 유전자 AGC1-1 (GenBank Accession No. BAB08656), AGC2-1 (GenBank Accession No. NP-189162)을 선별하게 되었다(그림 9). AGC kinase family은 cAMP-dependent protein kinase A (PKA), cGMP-dependent protein kinase G (PKG)와 phospholipids-dependent protein kinase C(PKC)에서 그 이름이 유래하였다. AGC kinase family은 동물에서 신호전달 단백질로 잘 알려져 있으나 식물에서는 비교적 연구된 바 없는 조절단백질이다.

### 2. SAM과 결합하는 조절 단백질의 생화학적 기능 분석

AGC1-1과 AGC2-1의 조절 기능이 SAM binding에 의하여 조절되는 가능성을 검증하기 위하여 이들을 cDNA를 대장균에서 발현하여 단백질들을 순수 분리하였으며 자가 인산화 실험을 하였다. 먼저 SAM binding motif를 가지고 있는 serine/threonine kinase인 AGC1-1(ATPK-64)을 6X histidine tagged 단백질로서 대장균에서 발현하고 Ni-NTA column을 사용하여 단백질을 순수 분리하였다. 또한 2-5 $\mu$ g의 AGC1-1 protein을 Tris-HCl (pH 7.2)-5 mM MnCl<sub>2</sub> 0.1mM ATP-10Ci of [<sup>32</sup>P] ATP-1 mM dithiothreitol의 buffer에 넣고, 30°C에서 5분 동안 반응 시킨 다음, 반응물을 SDS-PAGE를 실시하였다.

```

AGC1-1      MAAIKEESDYDSSRSRLTAPDSRRSWISDIGSSSSVSARSFGGDTPASSCRYKPHKANQA
AGC2-1      -----MLEGDE-----KQS
              : **                **:

AGC1-1      EWEAIRRLRAGAGRVGLEHFRLVRRIGSGDLGNVYLCRLREPWSSSSMTTITAGGCLYAMK
AGC2-1      --RALD-----FNRLEVLSLIGRGAKEVFLVRDD-----AKLLALKVILKEAIE
              .*:                : * * * * : : : : * :
              : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

AGC1-1      VVDKDALAFRKKLRRAEVERDILRTLDPFLPTLYADFEASHYACLVMEFCPPGGDLHVAR
AGC2-1      KKKKGRESEDEYKRVSEFQGVLSRFDHPLFPSLHGVLATDKVIGYAIIDYCPGONLSLR
              . * . : . : : * . . * . . : * : * * * : * : * . : : : . : : * * * : * : *

AGC1-1      QRQPGRRFTVSSTRFYVAETVLALEYLHMMGVVYRDLKPENLVLRGDGHIMLSDFDLSLK
AGC2-1      KMQSESMFSDEIIRFYAAELVLALDYLNQGIYRDLKPDNVMIQENGLMLIDFDLSTN
              : * . * : . * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

AGC1-1      CDVVPKLLRPARSAAAGGKPPPLPPSSCVPPTIOPVLSCIFRGVHKCHHAKCAGGGAAA
AGC2-1      -----LAPR-----TPQSPSLSKPSPTMKRKRFR-----FTSFCNSG-----
              * *                . * * . * * . * . . : * *                . : . * . *

AGC1-1      GNNGDGDGNDEEAETETAEPVVVVEPVAARSKSFVGTHEYLAPEYISGGHGSVAVDWWT
AGC2-1      -----ISPQESISVHSSSTLAVSDSSGEKSNFSVGT EYVAPEYISGDGHDFAVDWWS
              . : * : : . . . : * . . : * : * * * * . * : * * * * * * * * * * * :

AGC1-1      LGVFMYEMLYGRTFFKGESNEKTLINIIKQPVTFPRLAGAAAAGEWEEMKTAQDLMLQLL
AGC2-1      LGVLYEMLYGATPFRGSRNRKETFYRILSKPPNLT-----G-----ETTSLRDLIRLL
              * * . : * * * * * * * * * : * . : * * . . . * . : : * * : * *

AGC1-1      AKNPKKRLGSTMGSAEVKRHPFFKGVNVALVRSVR-PPEVPAPPAPAPK-----
AGC2-1      EKDPSRRIN----VEEIKGHDFFRGVDEKVLVSRPPYIPAPDDGGDKGTDVNTKMDVE
              * : * . : * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AGC1-1      ---KVMTMSKKERQEP-----YNYRPNHFDFYF
AGC2-1      NIVQEIFAARQEREKQSGDNNKNANMKIKDNTSGEWWKGLNNDLESNNFLVF
              : : : : * * * : : : : : * * * * * : : . . : * * * *

```

그림 9. 애기장대로부터 분리한 serine-threonine protein kinases 의 아미노산 상동성 비교; AGC1-1 (GenBank Accession No. BAB08656), AGC2-1 (GenBank Accession No. NP-189162) 로 붉은 색 박스는 SAM binding motif 이며, 푸른 색 박스는 kinase 활성 부위임



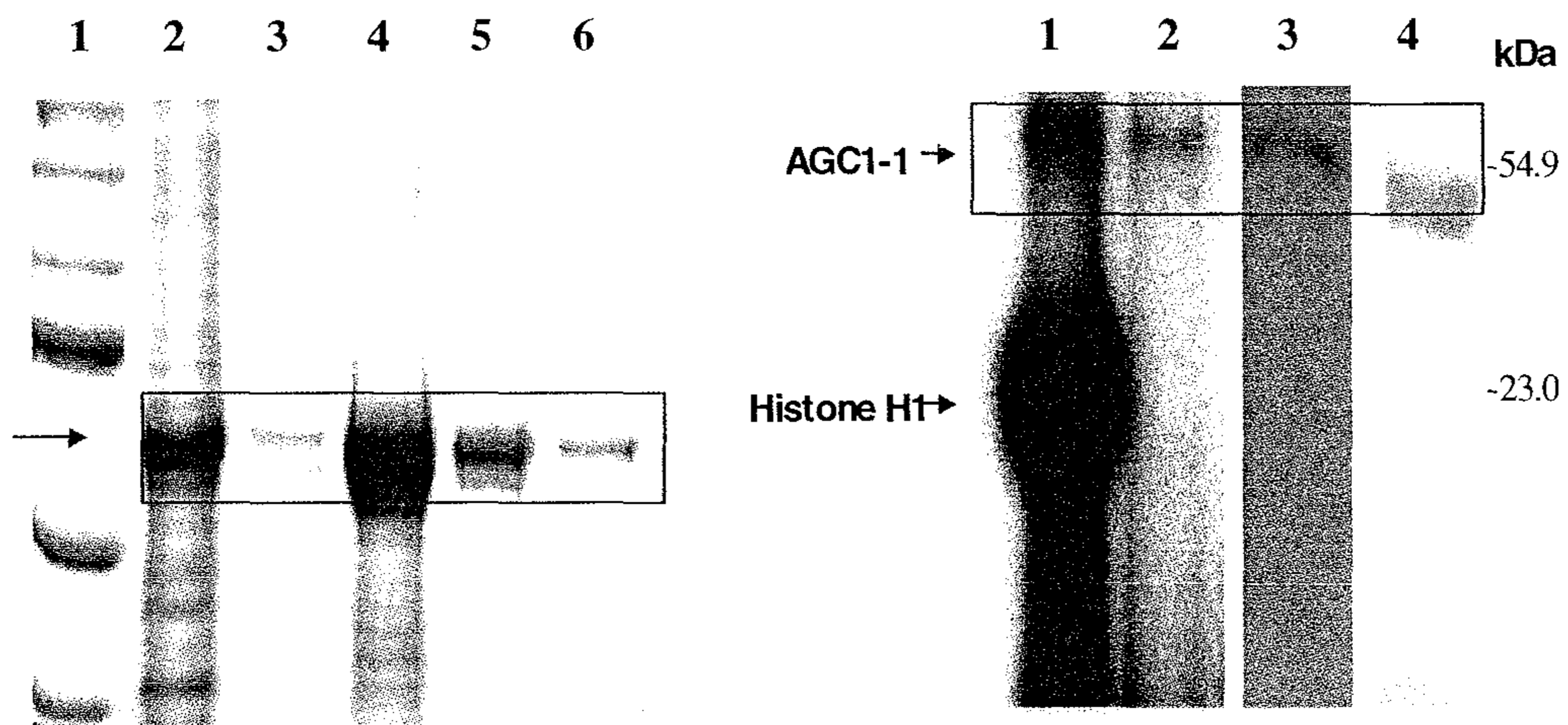


그림 10. AGC1-1 의 발현 분리 및 자가 인산화 기능분석

반응물의 AGC1-1의 자가 인산화 반응은 gel을 phospho-image analyzer를 통해 확인하였다 (그림 10). 그림 10의 좌측 그림에서 lane 2는 1 mM IPTG induction 후의 단백질 조추출액이며 lane 3-6은 250 mM imidazole으로 정제한 단백질이다. 우측 그림에서 lane 1-4은 각각 protein kinase의 일반적인 기질인 histone H1을 사용한 인산화, AGC1-1 만의 자가인산화, coomassie blue staining, western blotting 실험 결과이다. 그림 10에서 볼 수 있듯이 AGC1-1은 자가 인산화됨을 확인할 수 있었다. AGC2-1도 같은 방법으로 발현, 정제하여 자가 인산화 실험을 수행하였으나 자가인산화됨을 확인할 수 없었다.

AGC1-1 단백질이 외부환경을 직접 인식하여 세포내의 신호를 전달하는 단백질로 예상되므로 신호 전달물질인 SAM이 AGC1-1의 자가 인산화 반응에 미치는 영향을 관찰하였다. 자가인산화를 조사한 결과 AGC1-1 만이 자가인산화 능력을 나타내었다 (그림 10). 다양한 SAM 농도에 따른 AGC1-1의 인산화에 영향을 살펴본 결과, 50 nM의 SAM에서도 약 2배 이상 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 11). 이러한 결과로부터 식물 생체 내에서 SAM이 신호전달 물질로서 작용하여 대사 조절 기능을 수행할 것이라는 새로운 가능성을 확인할 수 있었다.

### 3. AGC1-1 Kinase의 생체내 기능 분석

이상의 연구에서 SAM이 effector로서 작용하는 신호전달 serine/threonine protein kinase AGC1-1의 자가인산화 기능을 확인하였다. 이 후 AGC1-1의 발현을 transcription 수준에서 검증하였다. 이는 AGC1-1이 생체 내에서 용이하게 발현되는 단백질을 확인하여 AGC1-1의 대사조절 기능이 생장에 매우 중요한 역할을 수행하고 있음을 제시하기 위함이다.

애기 장대의 잎 조직, 뿌리 조직, 그리고 줄기 조직으로부터 total RNA를 분리하였다. SAM과 반응하는 단백질인 AGC1-1에서 cDNA의 upstream 350-bp를 증폭하는 PCR primer를 합성하였다. 이 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 18S rRNA를 정량 분석을 위한 대조구로 사용하였다. 그림 12의 RT-PCR 결과에서 보여 지는 것처럼, 줄기 부위에서 다소 낮은 발현 양상을 보이지만 애기 장대의 잎과 줄기 및 뿌리 등 모든 기관에서 AGC1-1이 발현하는 것을 알 수 있었다.

특정 단백질의 조직 특이적 발현 양상을 관찰하는 것은 그 단백질의 기능을 동정하는데 아주 유용하다. AGC1-1 단백질을 bioinformatics 기법으로 분석한 결과 transmembrane domain을 보유하고 있는 것으로 판명되었다 (그림 13). 본 연구팀에서는 AGC1-1의 subcellular 분포를 확인하기 위하여 GFP 유전자를 애기 장대의 원형질체에 형질전환 시켜 그 발현 위치를 알아보았다.

1개월 된 애기 장대로부터 잎 조직을 채취한 후 cellulose 및 hemicellulose와 같은 효소를 사용하여 원형질체를 분리하였고, constitutive 프로모터인 35S 프로모터와 NOS terminator를 가지고 있는 GFP 유전자 상단 또는 하단에 *AGC1-1*을 삽입시켰다. 두 가지 construct가 애기 장대의 원형질체 형질전환을 위하여 구축되었는데, 먼저 *AGC1-1*의 C-terminus에 GFP가 위치하도록 구축한 construct와 *AGC1-1*의 N-terminus에 GFP가 위치하도록 한 construct가 사용되었다.

그림 14에서 보여지는 것과 같이 *AGC1-1*의 C-terminus에 위치한 GFP는 애기 장대의 cytoplasm에서 발현하는 것을 알 수 있었다. *AGC1-1*의 N-terminus에 위치한 GFP 역시 동일한 발현 양상을 보여주었다.

이상의 기반 연구 결과로서 *AGC1-1* 이 SAM 을 인지하는 protein kinase 이며, 모든 기관에서 발현되고 cytoplasm에 위치하는 단백질을 확인하였다. 이후 본 연구진은 *AGC1-1*이 식물의 stress 내성에 관여하는 지를 검증하기 위하여 유전자 불활성화 작업을 진행하였다. ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)의 Salk T-DNA library 에서 구입한 SAIL\_242\_C05 에서 homozygous line 을 준비하였다. Homozygous 를 선정하기 위한 PCR 전략을 다음 그림 15와 같으며 이를 통하여 homozygous line 을 선발한 결과는 그림 16과 같다.

우선 *AGC1-1* mutant 와 wild type의 발아 효율을 조사하였다 (그림 17). 그림 17에서 볼 수 있듯이 *AGC1-1* mutant는 발아 효율이 wild type에 비하여 현격하게 감소되었다. 발아하는 속도가 늦고 또한 최종적으로 발아되는 효율도 wild type의 75% 정도였다. 이는 *AGC1-1*이 애기장대의 발아 조절에 중요한 역할을 담당하는 유전자임을 시사하는 결과이다. 이후 발아되어 seedling들의 뿌리 길이를 측정한 결과 역시 *AGC1-1* mutant에서 뿌리 길이가 현격하게 짧음을 확인할 수 있었다 (그림 18).

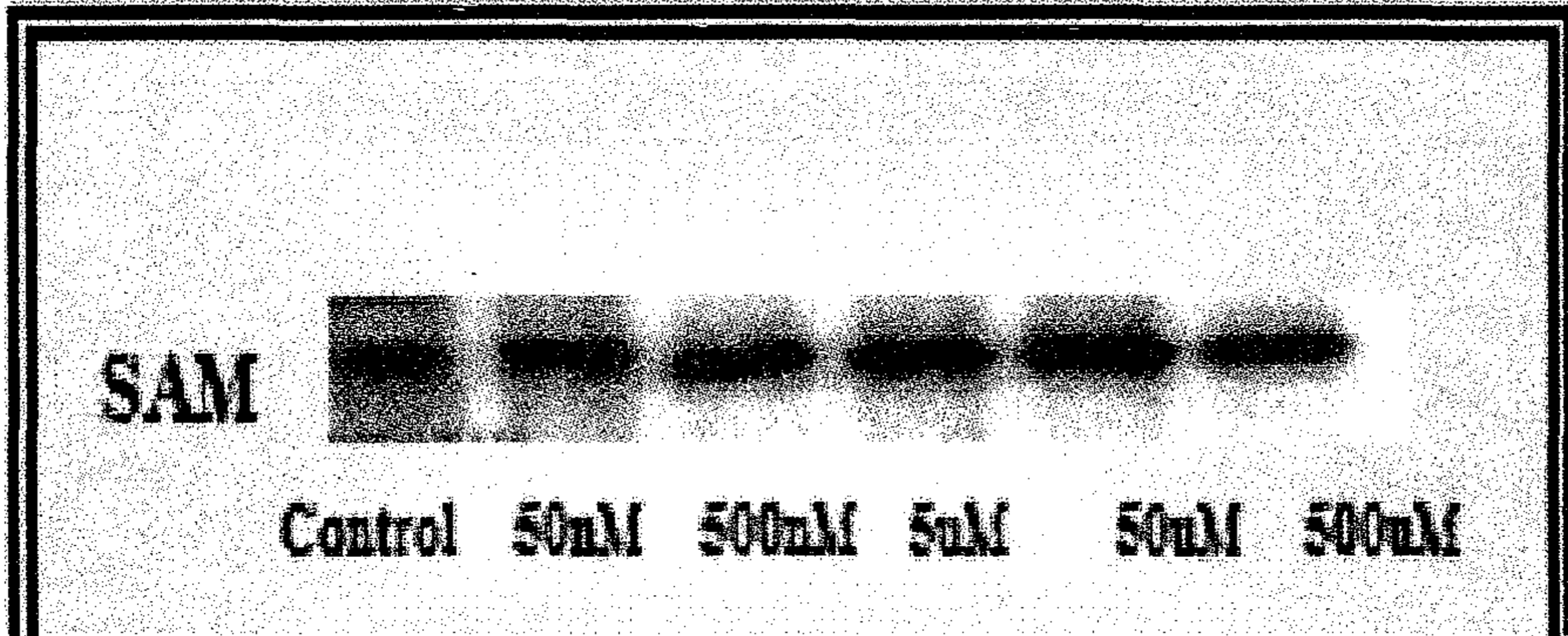
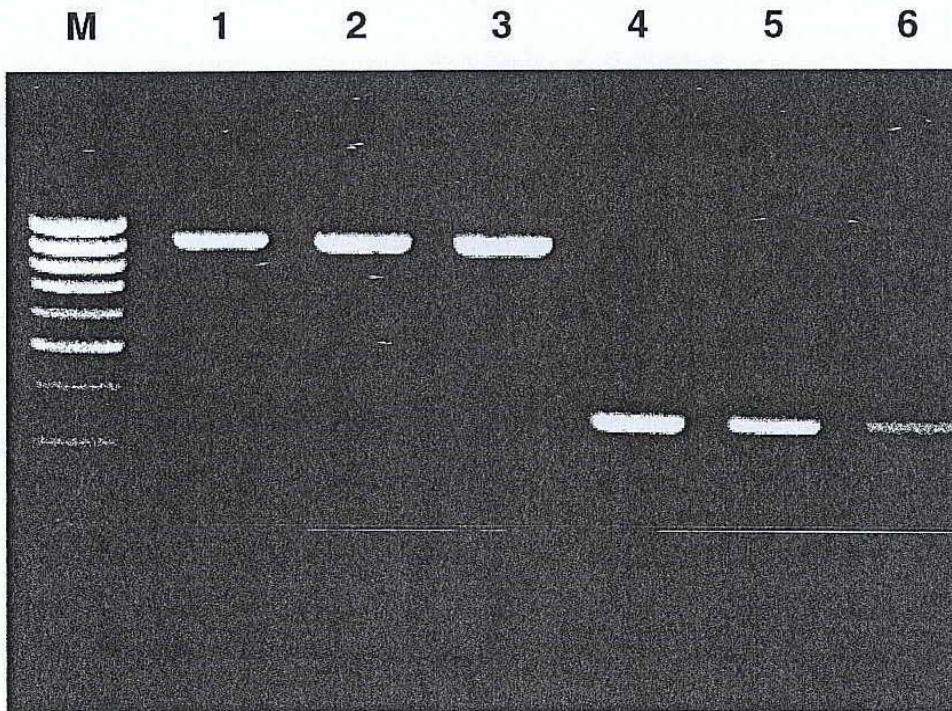


그림 11. SAM에 의한 AGC1-1 kinase의 인산화 증가



18 S rRNA gene was used as a quantitative control

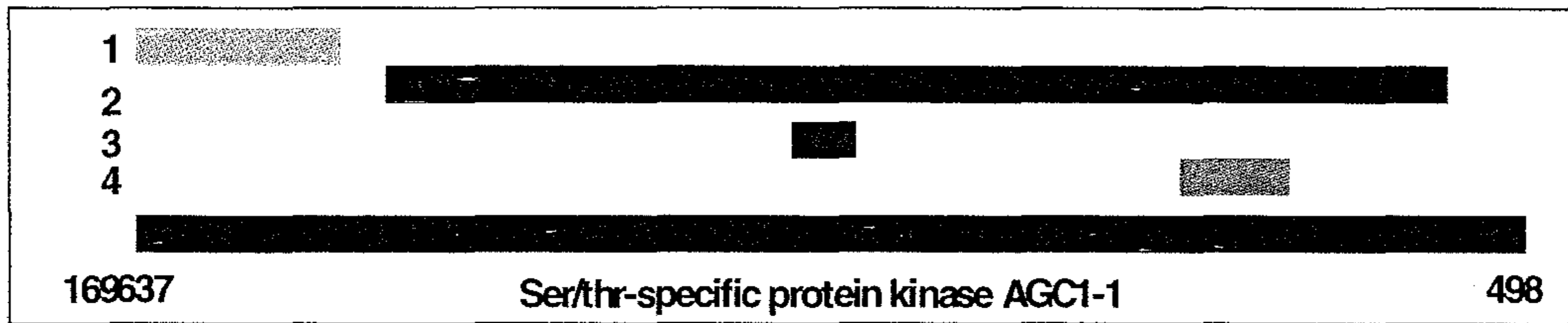
M : 100 bp Marker

Lane 1: 18 S rRNA in leaf    Lane 4: AGC1-1 in leaf

Lane 2: 18 S rRNA in root    Lane 5: AGC1-1 in root

Lane 3: 18 S rRNA in stem    Lane 6: AGC1-1 in stem

그림 12. *AGC1-1* 유전자의 기관 별 발현 양상을 조사한 RT-PCR 결과







-  (1) 10-79 Serine-rich region
-  (2) 109-446 Protein kinase catalytic domain profile
-  (3) 230-242 Serine/Threonine protein kinases active-site signature
-  (4) 362-381 Potential transmembrane spanning region

그림 13. AGC1-1 단백질의 domain 분석

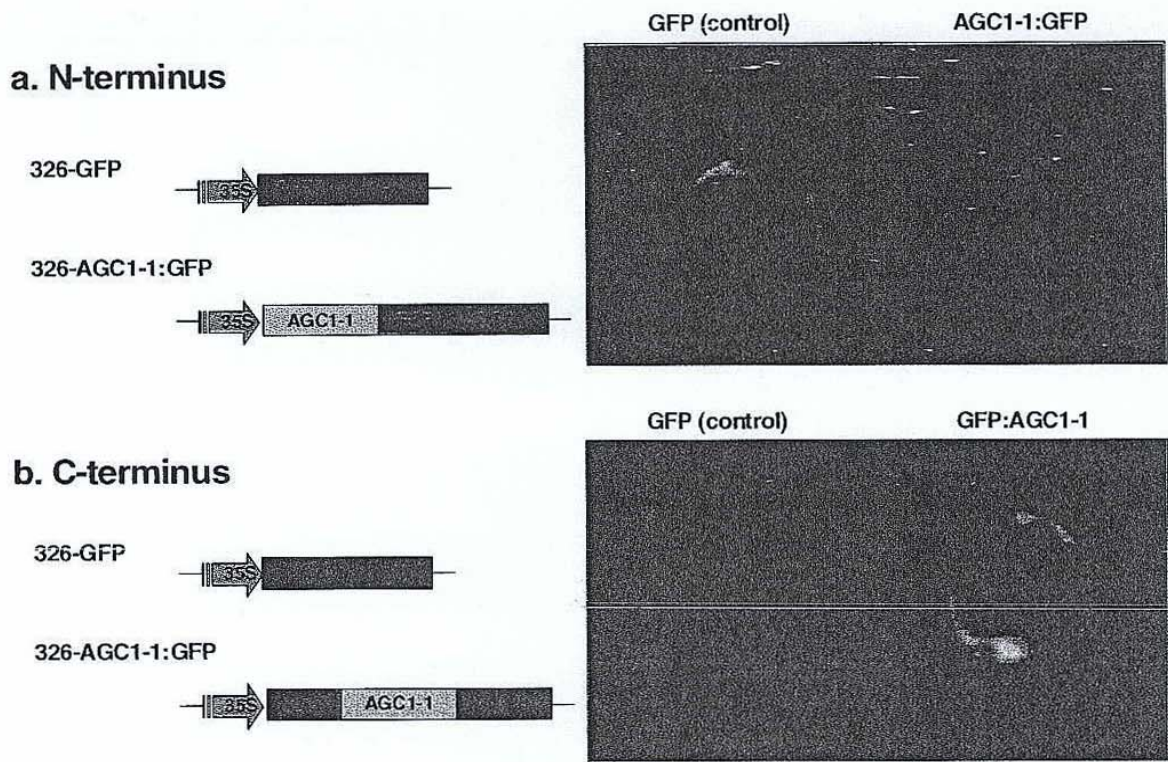


그림 14. 형질전환된 protoplast에서의 AGC1-1:GFP 발현 부위. GFP가 애기 장대의 cytoplasm에서 발현하는 것을 관찰할 수 있다.

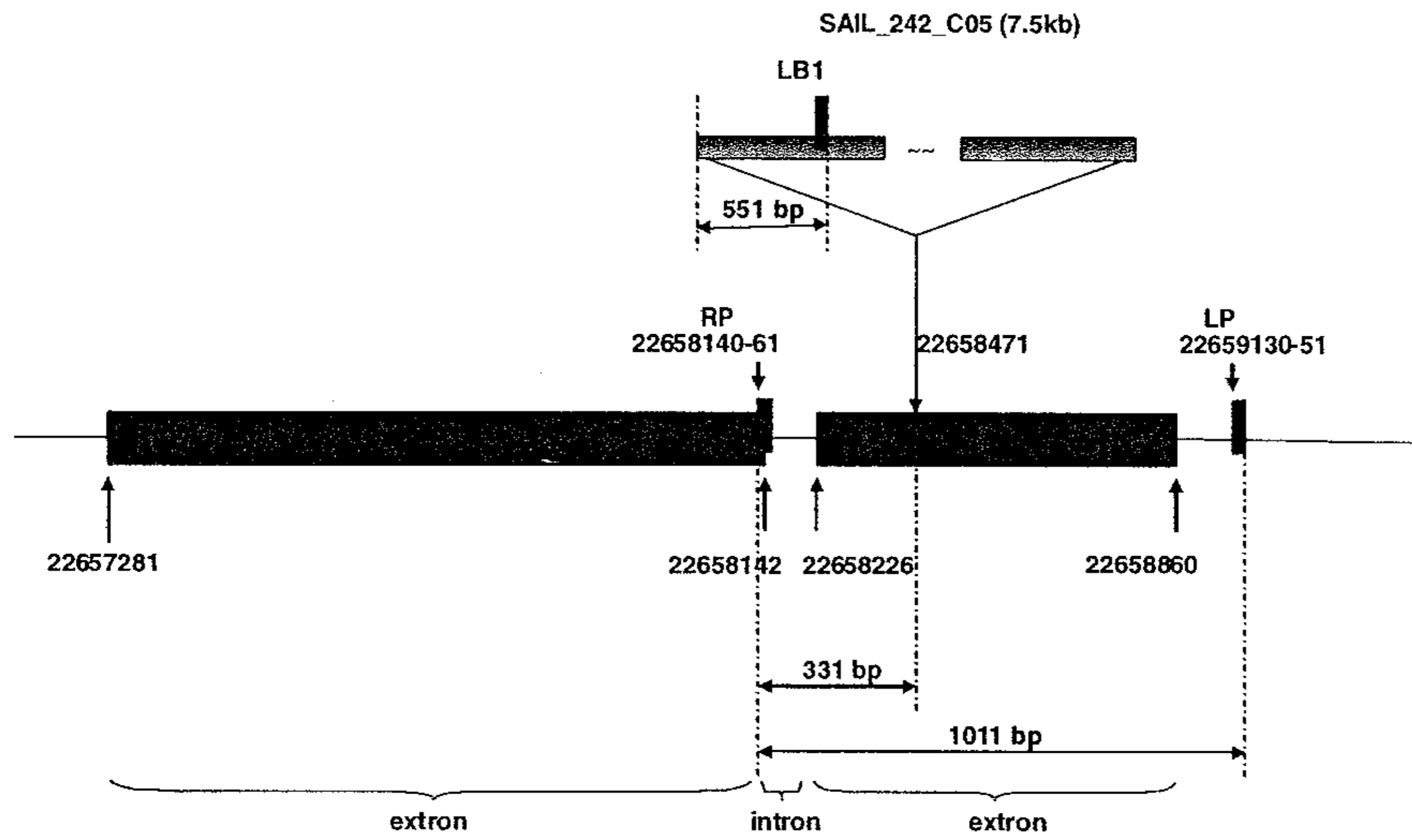
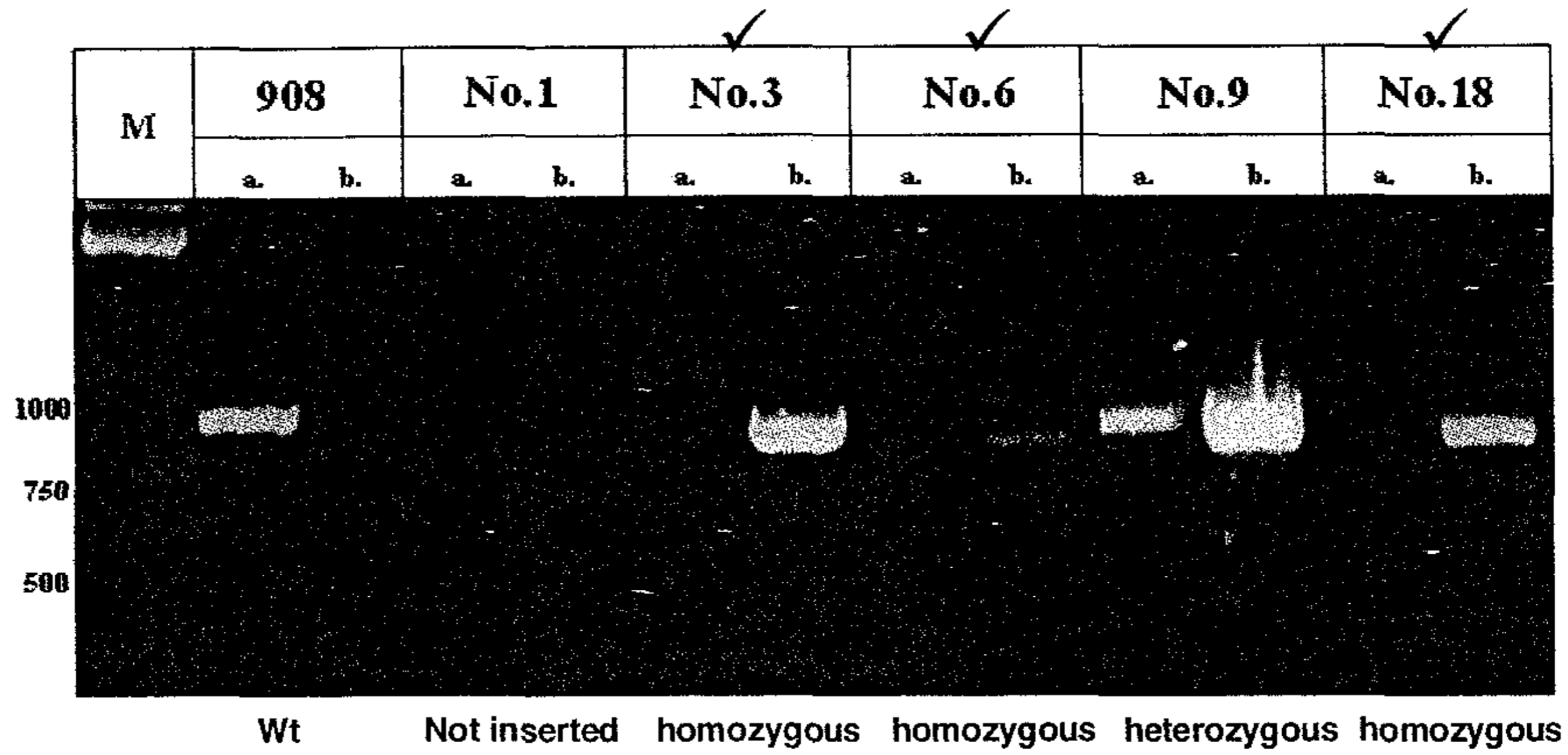


그림15. AGC1-1 유전자에 T-DNA insertion homozygous line 을 선발하기 위한 PCR 전략:

정상적인 AGC1-1 유전자 경우 RP/LP primer pair 를 통하여 1011-bp DNA 가 증폭되어야 하며, T-DNA insertion 을 통하여 불활성화된 AGC1-1 유전자 경우 RP/LB1 primer pair를 통하여 882-bp (331 plus 551) DNA 단편이 증폭 되어야 한다.





Screening of over 30 t-DNA insertion seedlings identified several homozygous, For example, No.3, No.6 and No.18, No.3 was used for further phenotype study

그림 16. SAIL\_242\_C05 에서 얻어진 개체들의 total DNA로서 PCR을 수행한 결과: 각 시료에서 lane a 는 RP/LP primer를 활용한 WT *AGC1-1* 의 검출 결과이며, lane b는 RP/LB1 primer 를 활용한 *AGC1-1*:T-DNA 의 검출 결과이다. No. 3 을 선정하여 이 후 형질 연구에 이용하였다.

이상의 결과를 통하여 AGC1-1 단백질이 애기장대의 초기 발달에서 중요한 역할을 담당한 조절 단백질을 짐작할 수 있었다. 이 후 본 연구의 핵심 목표였던 stress 저항성 정도를 조사하였다. 가장 일반적이고 작물에서 중요한 drought (가뭄) stress 에 대하여 조사한 결과 *AGC1-1* mutant 에서 그 저항성이 현격하게 감소되었음을 확인할 수 있었다 (그림 19). 가뭄 처리와 연관성이 있는 것으로 알려진 salt stress 에 대하여서도 *AGC1-1* mutant 는 저항성이 크게 감소됨을 확인하였다 (그림 20).

병원균 저항성에 대한 AGC1-1 단백질의 관련성을 파악하기 위하여 병원균인 *Pseudomonas syringe* DC3000 을 처리하고 wild type과 *AGC1-1* mutant의 생장을 조사하였다. 다음 그림 21에 보여 지듯이 AGC1-1의 경우 *Pseudomonas syringe* DC3000 처리에 의하여 저항성이 크게 감소되어 쉽게 고사하는 것을 관찰할 수 있었다.

SAM에 의하여 자기인산화 기능이 촉진되는 serine/threonine protein kinase AGC1-1의 유전자인 *AGC1-1*을 불활성화하였을 시에 병원균에 대한 저항성이 크게 감소하는 것은 AGC1-1 단백질이 병원균 저항성 유도에 관여한다는 직접적인 증거를 제시하여 주며 또한 간접적으로는 SAM이 식물의 저항성 유도에 중요한 역할을 수행하고 있음을 짐작할 수 있게 하는 결과이다. 이는 본 연구과제 수행에서 규명하고자 한 식물대사 조절에 있어서의 SAM의 새로운 기능을 제시하여 준 결과라 평가할 수 있다.

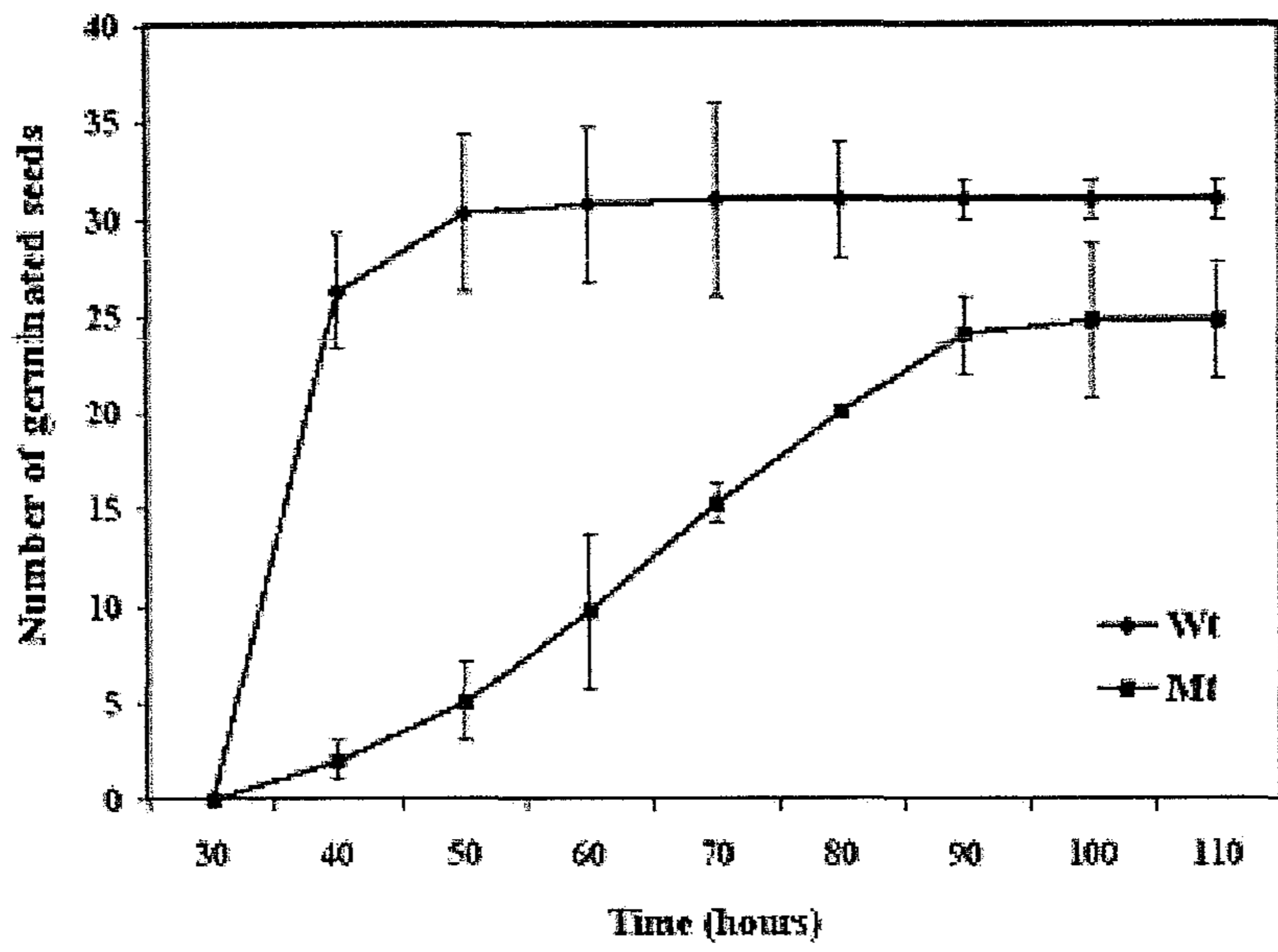


그림 17. *AGC1-1* mutant 와 WT 의 발아율 비교 결과

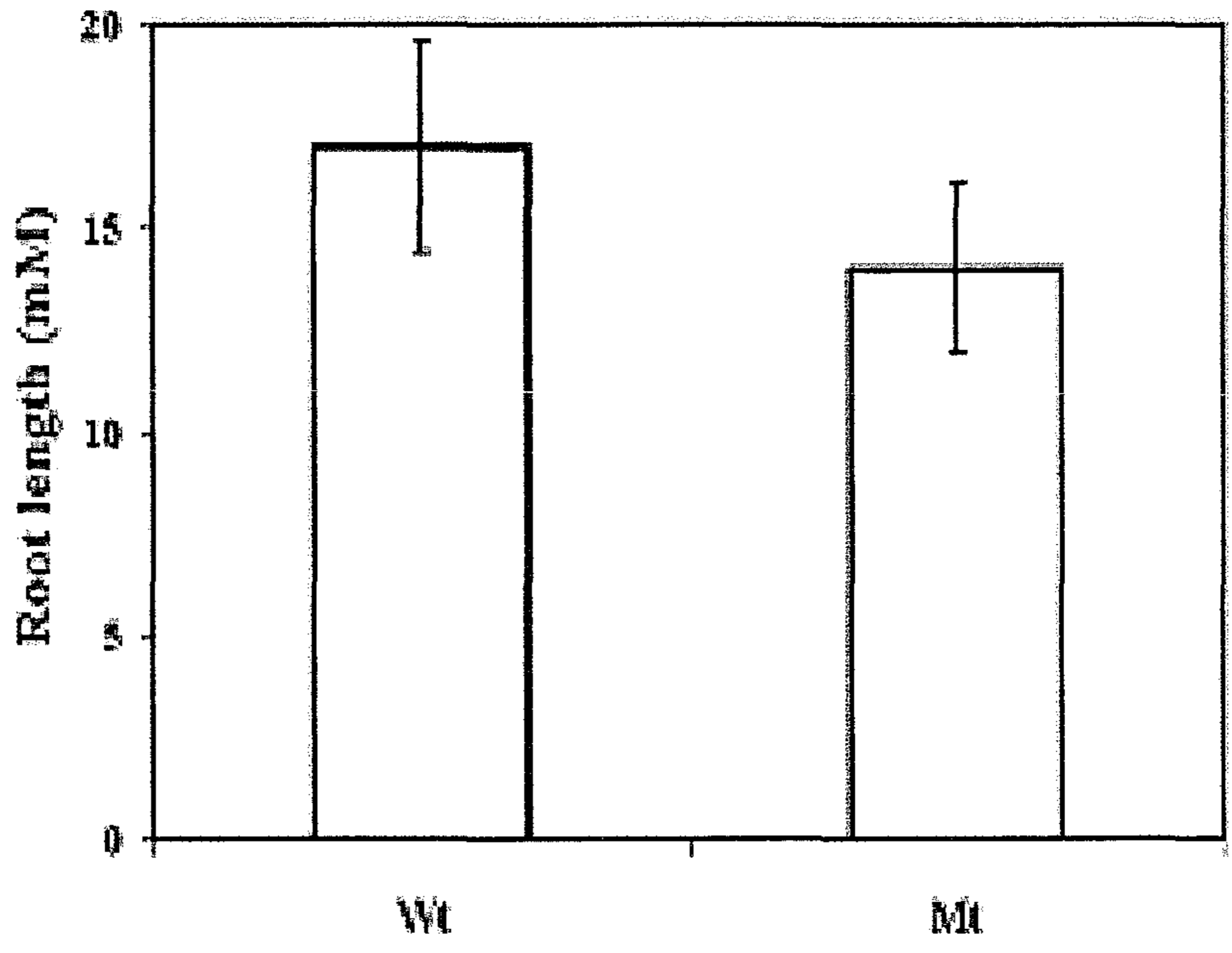


그림 18. 5일된 seedling의 뿌리 길이를 측정한 결과

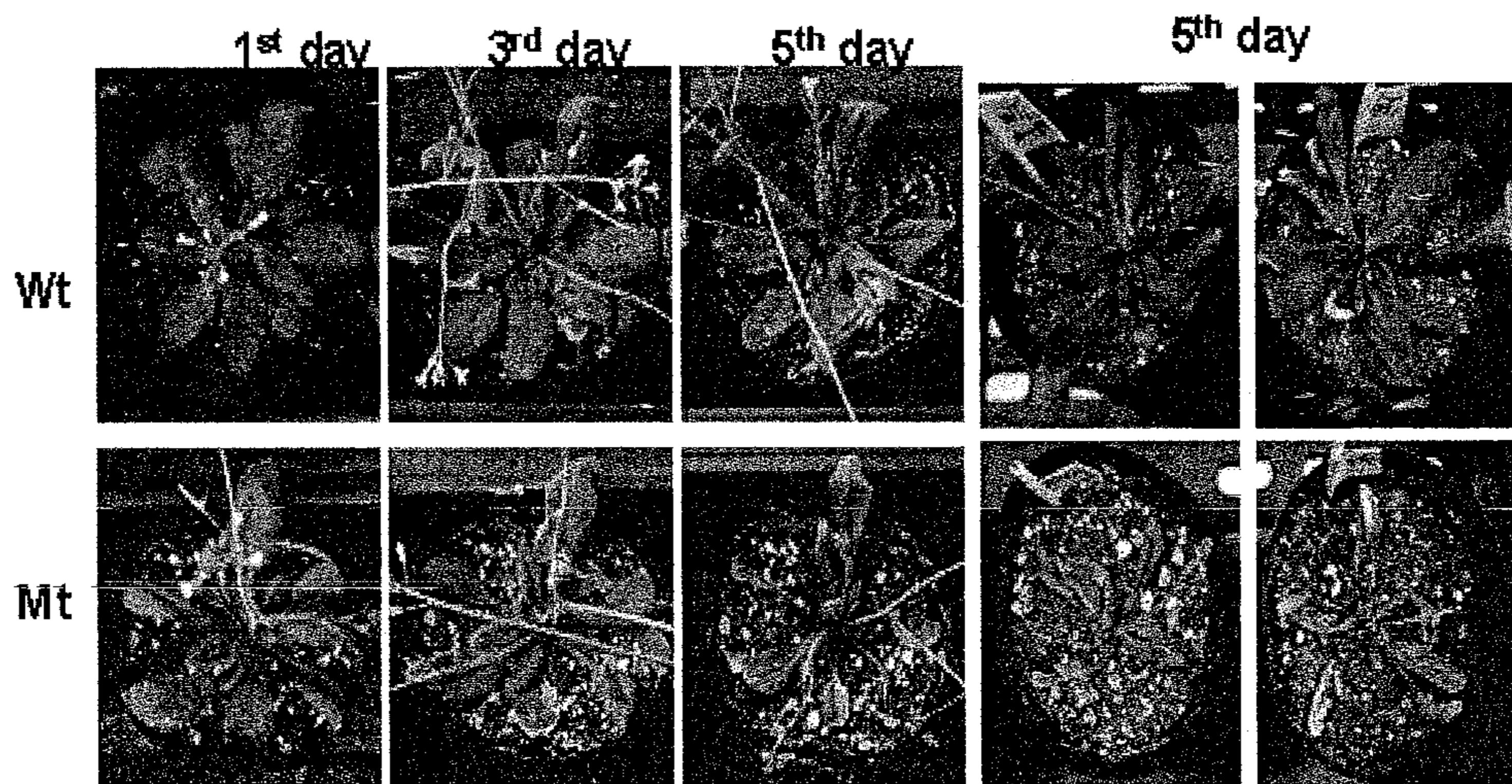


그림 19. 가뭄 처리 (drought stress) 에 대한 성장 저해 양상

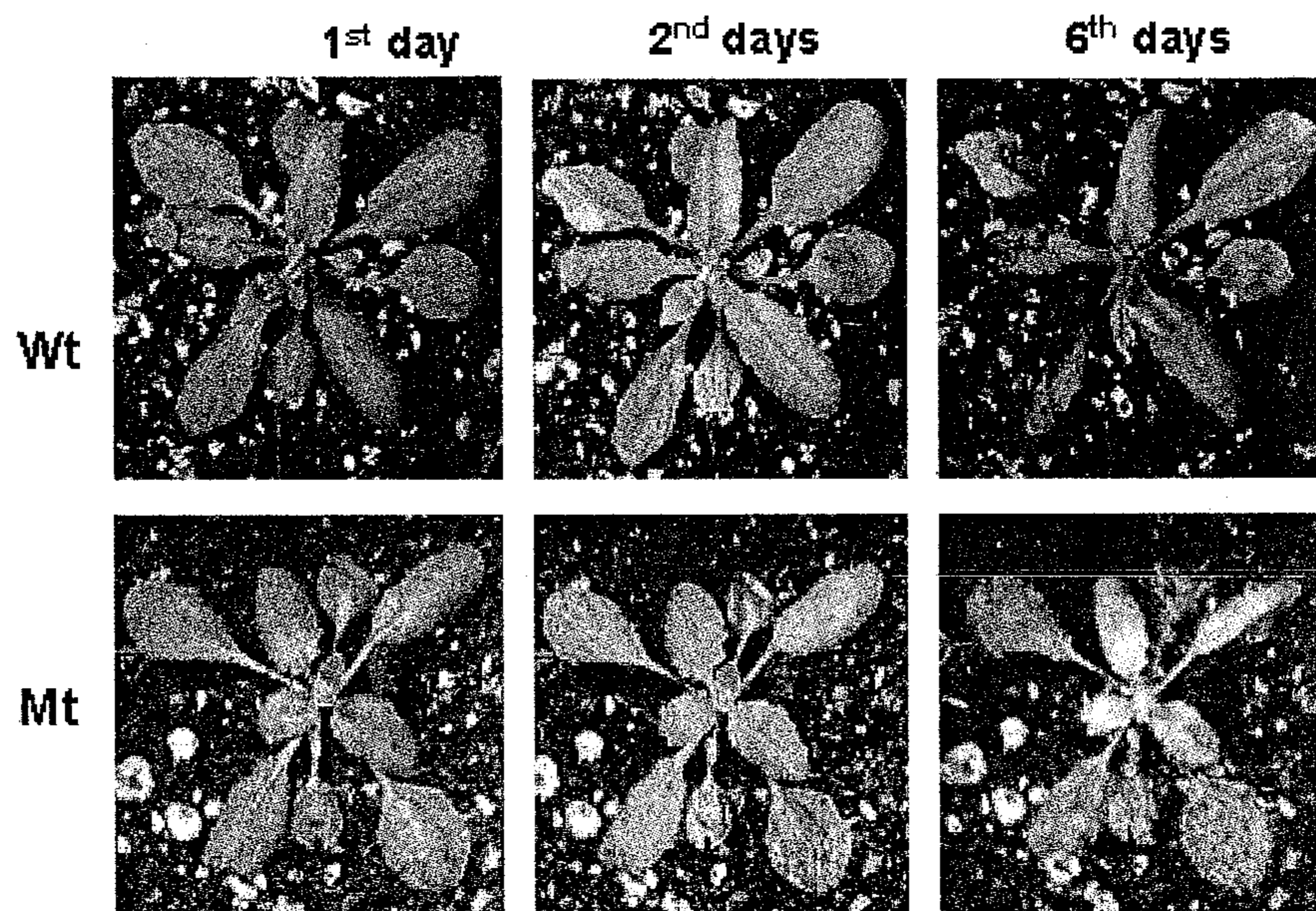


그림 20. 염 처리 (salt stress) 에 대한 성장 저해 양상

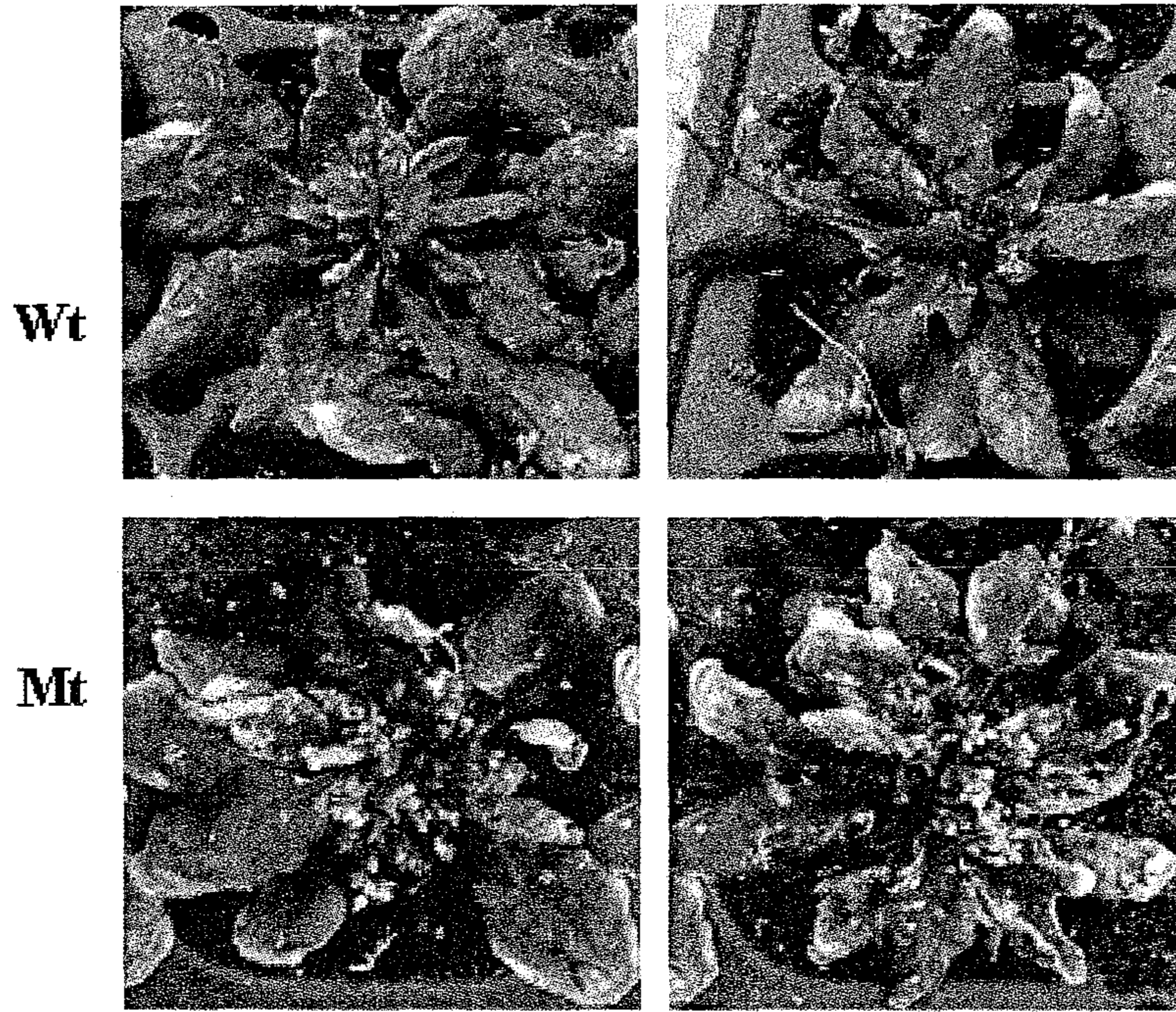


그림 21. 병원균 처리 (salt stress) 에 대한 성장 저해 양상

## 제 3 절 SAM 고함량 기능성 작물 개발

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 실험재료

SAM 유전자의 개발을 위해 야생 근연종 감자인 *S. brevidens* (PI 218228, VS19, Potato Introduction Station, Sturgeon Bay, WI, USA) cDNA를 실험 재료로 이용하였다. 기내 식물체는 호르몬이 첨가되지 않은 무균의 MS 배지에 계대배양된 것을 이용하였으며, 16/8의 광주기 조건으로 기내에서 생육시킨 *S. brevidens*의 상위엽을 재료로 이용하였다.

SAM의 경우 비교적 열에 불안정한 특성을 가지므로 개발된 SAM 고함유 감자를 보다 효율적으로 활용하기 위해서는 생식이 가능한 작물이 유리하다. 따라서 본 연구에서는 최근 우리나라에서 개발된 감자 품종 중 생식이 가능한 감자 품종인 '자심'을 이용하였다.

#### 나. *S. brevidens* 유래 SAM-s 유전자(SbSAMs) 클로닝 및 특성평가

*Solanum brevidens* cDNA library로부터 대량으로 random sequencing된 ESTs중 NCBI/Blast 검색엔진을 활용하여 기존 등록되거나 보고된 다른 식물체들의 SAM 생합성 유전자와 유사도가 높은 클론을 찾아 완전 염기분석을 실시하여 SAM 생합성유전자로 추정되는 염기서열을 얻었다.

Sub-cloning된 cDNA의 염기서열 분석은 Sanger 등 (1977)의 방법을 응용하여 제작된 AccuPower™ DNA Sequencing Kit (Bioneer, Korea)으로 실시하였으며, PCR 반응이 끝난 반응액을 6% (w/v) polyacrylamide gel에 전개하여 silver staining을 실시하여 염기서열을 판독하였다. Silver staining은 Silverstar™ Staining System (Bioneer, Korea)을 이용하여 실시하였다. 판독된 염기서열은 web-site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> 검색엔진을 이용하여 GenBank, EMBL 와 DDBJ의 데이터베이스 검색을 통해 기존 보고된 유전자들과의 유사성 비교를 하였다. 기내에서 발현된 SbSAMs 유전자의 SAM 생합성 능력을 검정하기 위해 기내발현용 운반체 제작 pET28a(+)에 sub cloning하였다. 기내 발현된 SbSAMs 유전자 산물에 의한 SAM 생합성 능력은 전구물질 L-Methionine과



ATP이 기질로 포함된 반응액으로 처리하여 얻은 산물을 분석하여 확인하였다.

#### 다. 식물형질전환용 벡터구축 및 *Agrobacterium* 형질전환

SbSAMs 유전자를 식물체 발현벡터인 pBI121 (Clontech, 6018-1)에 sub-cloning하기 위해 운반체 MCS의 제한효소인식부위인 *Xba*I과 *Sac* I 인식 염기서열이 추가된 Forward primer 5'-GCAGTCTAGAATGGAAACTTTCCTATT-3'와 reverse primer 5'-GTTCCCTTTTTCTA GAGAATGGA-3'를 각각 이용하여 증폭된 PCR 산물을 이용하였다. 운반체 pBI121과 증폭된 PCR 산물을 각각 제한효소 *Xba*I과 *Sac* I으로 처리하여 정제한 다음 sense 방향으로 삽이 되도록 ligation을 수행하여 *E. coil* DH5a에 형질전환하였다. *Agrobacterium*의 형질전환은 *Agrobacterium* LBA4404 균주에 Holster 등 (1978)과 An 등 (1988)의 방법을 다소 변형한 freeze-thaw 방법을 이용하여 형질전환 하였다. YEB 배지에서 30±1℃로 밤새 배양한 *Agrobacterium* LBA4404 배양액 0.5 mL을 새로운 배지 20 mL에 첨가하여 5~6시간, 30±1℃로 배양한 후 원심분리 하였다. 회수된 세포에 YEB 배지 4 mL을 첨가하여 현탁한 후 다시 원심분리 하였다. 회수된 세포에 800 µL의 YEB 배지를 첨가하여 현탁한 후 소형원심분리용 튜브에 200 µL씩 분주하였다. 세포를 분주한 튜브를 1~2분간 얼음 위에 놓아 냉각시킨 후 -70℃ 초저온냉동고 에서 급속냉동하여 5분간 방치한 후, 37℃에서 3분간 녹여서 competent cell을 준비했다. 준비된 competent cell 200 µL에 YEB 배지 90 µL와 형질전환하고자 하는 DNA 5 µg을 섞은 후 -70℃에서 5분간 얼리고 37±1℃에서 25분간 녹인 다음 30℃에서 1시간 배양하였다. 배양된 혼합액에 5 mL의 523배지를 넣고 30℃에서 1시간 현탁배양한 후 원심분리하여 모아진 세포에 523배지 200 µL를 넣어 현탁한 후 100 µL씩 항생제를 포함한 523고체배지에 도말한 후 30±1℃에 48시간 배양하여 형질전환된 콜로니를 선발하였다.

#### 라. 배지와 배양방법

감자의 품종별 재분화 조건 규명을 위하여 표 5의 7가지 배지를 사용하였다. 이들 배지의 기본은 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)이며, M1부터 M5배지는 캘러스 형성과정 없이 직접 신초를 유기시키기 위해 이용한 것으로 단계

를 구분하지 않고 동일배지에서 연속하여 계대배양하였다. M6와 M7배지는 indirect 재분화에 이용한 것으로 감자조직을 14일간 캘러스 유기 배지에서 배양하여 캘러스를 유기시킨 다음 재분화된 신태를 유기하기 위해 이용하였다. 형질전환 과정에는 표 5의 조성으로 조제된 배지들을 사용하였다. 또한 감자식물체의 기내유지 및 신태의 급속 증식을 위해 표 5의 배지들을 사용하였다. 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404은  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 진탕 배양하였으며, 감자 식물체는  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 일장 조건으로 배양하였다.

표 5. 감자 재분화 시 필요한 배지의 hormone 조성

Medium	Callus culture (mg/L)					Shoot-inducing culture (mg/L)	
	BA	GA <sub>3</sub>	Zeatin	IAA	NAA	BA	GA <sub>3</sub>
M1 <sup>1</sup>	2.25	5					
M2 <sup>2</sup>	2.25	10					
M3 <sup>3</sup>	1	5	3				
M4 <sup>4</sup>			2	0.5			
M5 <sup>5</sup>		0.1	2		0.01		
M6 <sup>6</sup>	2.25				0.2		5
M7 <sup>7</sup>	2.25			0.17		2.25	5

<sup>1</sup>Visser et al. 1989, <sup>2</sup>Ooms et al. 1987, <sup>3</sup>Dobigny et al. 1995, <sup>4</sup>Sheerman and Bevan 1988, <sup>5</sup>Joung et al. 1996, <sup>6</sup>Carputo et al. 1995, <sup>7</sup>Ooms et al. 1987.

#### 마. 감자의 재분화 및 형질전환

감자의 형질전환은 Visser 등 (1989)의 방법과 Joung 등 (1996)의 방법을 응용하여 수행하였다. 감자 조직의 재분화 조건 확립 및 형질전환 과정에 이용한 배지는 표 5 와 표 6의 조성으로 조제된 것을 사용하였다. 감자 잎은 기내에서 증식시킨 어린 감자 식물체를 펄라이트에서 순화시킨 후 온실 내 수경 재배상에서 50일간 생육시킨 다음 채취하여 사용하였다. 채취한 잎은 Tween-20으로 계면활성화된 유효염소농도 0.5% (v/v)의 sodium hypochlorite (NaOCl) 용액으로 15분간 흔들면서 소독한 후 멸균수로 5~6회 세척하였다. 이때 모든 작업은 무균상에서 실시하며 이후 멸균한 여과지를 사용하여 소독된 잎의 수분을 제거

하고 1 cm<sup>2</sup>의 크기로 절단하여 전배양 배지 (PPM)에 24시간 동안 배양하였다. 멸균된 감자 조직을 형질전환용 운반체 pBI121 (Clontech, USA)로 형질전환된 *Agrobacterium*으로 10분간 감염시켰다. 이때 감자의 형질전환효율을 높이기 위해 페놀 화합물 acetosyringone을 각각 0, 25, 50, 75과 100µM씩 첨가하여 효율적인 감염을 유도하였다. *Agrobacterium* 감염을 시킨 감자조직 절편들은 공동배양 배지 (PCM)에서 48시간 동안 배양한 후 선발배지 (PSM)에 옮겼다. 재분화된 싹초들은 kanamycin이 첨가된 선발배지에 배양하여 생존하는 것들을 선발하였다. 선발된 싹초들은 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> 호르몬이 첨가된 액체증식배지 (MUM)에 옮겨서 120 rpm 진탕 배양기에서 증식시켰다.

액체증식배지에서 증식된 감자 싹초들은 호르몬이 없는 MS 고체배지에서 발근 시켰으며, 뿌리가 발생한 후 멸균된 펄라이트에서 묘를 순화시킨 다음 멸균된 버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1로 혼합시킨 포트에 심어 온실에서 순화시켰다.

표 6. 감자 조직의 재분화 조건 확립 및 형질전환 과정에 이용한 배지 조성

Medium <sup>1</sup>	Composition of medium (mg/L)									Agar (g/L)
	BA	GA <sub>3</sub>	Zeatin	NAA	2,4-D	CaCl <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Kanamycin	Carbenicillin	
PPM	10			10						
PCM					2	147	80			8
PSM		0.1	2	0.01				50	500	8
SUM								50	500	8
MUM		0.1								

<sup>1</sup>Except MUM, all the media contains the 1×MS salt with 1×vitamin mixture and 30 g/L sucrose. The MUM contains 2×MS salt with 1×vitamin mixture and 30g/L sucrose. PPM, potato pre-culture media; PCM, potato co-culture media; PSM, potato selection media; SUM, subculture media; MUM, multiplication media.

## 바. 선발된 형질전환 감자의 분석

### 1) DNA의 분리 및 PCR 분석

감자 잎으로부터 total DNA 분리는 Teresa 등 (1995)이 이용한 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 약 0.1 g의 어린 감자 잎 조직을 1.5 mL micro centrifuge tube에 넣고 -80°C 초저온냉동고에서 동결시킨 다음 일회용 tissue grinder로 조직을 파쇄하였다. 이후 0.7 mL의 감자 DNA 추출용 완충용액 [DNA extraction buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris base, 5 mM EDTA (pH 7.5) : nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB : 5% (w/v) sarkosyl = 2.5 : 2.5 : 1)]을 가하여 잘 섞은 다음 65°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 이후 0.7 mL의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)을 채워 vortex한 다음 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액의 투명한 부분을 회수하여 2/3배의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 RNase를 처리하고 정량한 다음 농도를 200 ng/ $\mu$ L로 맞춘 후 PCR 반응의 주형으로 이용하였다. 감자 식물체에서 총 DNA를 분리하여 운반체 T-DNA 구조를 이루는 각종 유전자의 특이적인 primer들을 제작하여 이용하였으며 (표 7), 감자 고유의 internal control DNA의 증폭을 위해 고안된 primer인 rAGU4A를 활용하여 multiplex PCR을 수행하였다.

PCR 증폭을 위한 조건은 94°C로 5분간 전변성을 시킨 후 94°C로 20초 (denaturation), 54°C로 40초 (annealing), 72°C로 1분 (extension)의 조건으로 40회 증폭시켰다. 최종 증폭 후 72°C로 7분간 반응하여 증폭을 종료하고 1.5% (w/v) 아가로스 겔 상에서 5.0 V/cm로 40분간 전기영동하여 EtBr염색 후 UV trans-illuminator로 관찰하고 촬영하였다.

표 7. 형질전환 감자 스크리닝을 위한 PCR primer

Name	Sequence of the primer (5'→3')	Tm (°C)	Target gene
rAGU4A	GACTCGATAACAGGCTCCA	49.5	tetraploid potato
35S-S	GCTCCTACAAATGCCATCA	50.5	CaMV35S promoter
35S-AS	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	52.9	
NOS-S	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	56.6	NOS terminator
NOS-AS	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	52.9	

## 2) Northern blot 분석

형질전환 감자식물체로부터의 총 RNA 추출은 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 실시하였다. 파종 후 본엽이 3-4장 출현된 어린 감자의 잎을 채취하여 액체질소를 이용하여 마쇄한 다음 제공된 protocol에 따라 RNA를 분리하였다. Blotting은 vacuum blotter (Hoefer, Trans Vac TE 80)를 이용하여 수행하였다. *SbSAM* transcripts에 특이적인 프로브의 합성은 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Germany, Cat. No. 1175 125)을 사용하여 digoxigenin-UTP로 cRNA를 표지하였다. 혼성화 반응은 혼성화 오븐 (Hybaid, USA)을 이용하여 수행하였다. 65°C의 DIG Easy Hyb (Roche, Germany, Cat. No. 1603 558)를 membrane에 20 mL/100cm<sup>2</sup> 되도록 첨가하여 전혼성화반응을 실시하였으며, 최종 검출과정은 DIG Wash and Block Buffer Set (Boehringer Mannheim, Germany, Cat. No. 1585 762)의 사용자 지침서에 준하여 실시하였다.

## 3) 형질전환 씨감자의 증식

*SbSAM* 유전자가 도입된 형질전환 감자의 증식은 고령지농업연구소의 양액씨감자 생산시스템을 이용하였으며, 1차 상토에서 생산된 소과경에서 발아된 어린싹을 수경재배 상에 옮긴 후 배양액을 mist 분무하여 양분을 공급하며, 감자형성을 유도하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 야생근연종 감자 *Solanum brevidense*로부터 SAM-s 유전자 분리 및 분석

야생근연종 감자 *S. brevidense*의 cDNA library로부터 SAM-s 유전자 염기서열을 포함하는 EST (그림 23)로부터 이 유전자의 ORF sequence를 확인하였으며, 최종 분석된 염기서열을 NCBI GenBank AY635050와 국내 유전자 등록처 (GeneIn KS109049)에 등록하였다 (그림 24). 판독된 염기서열은 web-site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> 검색엔진을 이용하여 GenBank, EMBL 와 DDBJ의 데이터베이스 검색을 통해 기존 보고된 유전자들과의 유사성 비교를 하였다. 비교된 유전자간 아미노산 서열의 비교는 기존 등록된 토마토 (Z24741) 페튜니아 (AF170798), 애기장대 (M55077), 배추(AF379014) 및 담배(AF127243)의 유전자 아미노산 서열을 비교하였다. 최초 cDNA library부터 부분적으로 염기서열이 분석된 EST중 SAM 생합성 유전자로 판단되는 clone의 염기서열을 완전 해독한 결과 총 1532bp의 서열 내에 1182bp의 SAM 생합성 효소 유전자의 ORF가 포함된 것을 확인 하였다. 이들이 해독될 경우 발현될 총 394개의 아미노산 서열을 기존 다른 종의 식물로부터 분석되어 등록된 유전자들의 아미노산들과 유사도를 비교해 본 결과 동일 과 식물간에는 약 93% 이상, 다른 과의 식물과는 약 88%이상의 상동성을 나타내어 SAM-s 유전자임을 판단할 수 있었다 (그림 25 & 그림 26).

### 나. 클로닝된 *SbSAMs* 유전자의 기능분석을 위한 *in vitro* translation assay

클로닝된 *SbSAMs* 유전자의 ORF의 발현산물이 실제 기질들이 포함된 기내 반응액에서 최종산물인 SAM을 합성할 수 있는지를 확인하기 위해 *in vitro* translation을 수행하였다. *in vitro* translation용 운반체인 pET28a(+)의 cloning site에 *SbSAMs* 유전자가 삽입된 운반체를 구축하기 위해 primer F: 5'-GAATTCATGGAAACTTTCCTATTCACCTCCG-3'와 primer R: 5'-CTCGAGTGGGGGTTTTCCCACTTGAGGGGCT-3'를 이용한 PCR로 *SbSAMs* 유전자의 ORF

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

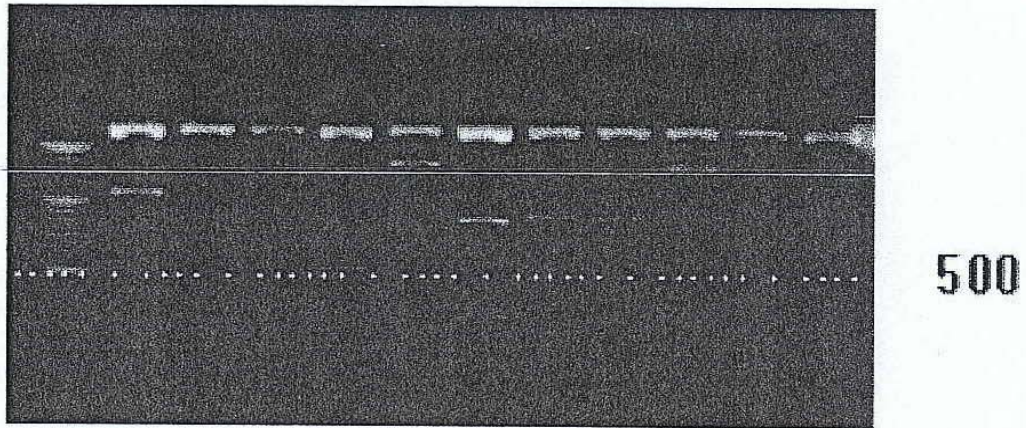


그림 23. 클로닝된 *SbSAMS* 유전자의 전기영동 사진

Size fractionation of cDNA library that subcloned into pBluescript SK(+/-) vector by *in vivo* single clone excision. *SbSAMS* clone was lane 11 and used RE were *EcoRI* and *XhoI*.

□1: AY635050. Reports Solanum brevidens...[gi:48928009]

L

Features Sequence

LOCUS AY635050 1523 bp mRNA linear PLN 23-JUN-2004  
 DEFINITION Solanum brevidens S-adenosyl methionine synthase mRNA, complete cds.  
 ACCESSION AY635050  
 VERSION AY635050.1 GI:48928009  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Solanum palustre  
 ORGANISM Solanum palustre  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanoideae; Solaneae; Solanum.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1523)  
 AUTHORS Seo,H.W., Yi,J.Y., Moon,J.Y., Park,Y.E. and Cho,J.H.  
 TITLE SAM and polyamine levels in transgenic tomato fruits and potato tuber with SAM synthase gene  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1523)  
 AUTHORS Seo,H.W., Yi,J.Y., Moon,J.Y., Park,Y.E. and Cho,J.H.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (25-MAY-2004) National Institute of Highland Agriculture, Hoengke 3Ri Doam Pyongchang, Gangwon 232 - 955, South Korea

FEATURES  
 source Location/Qualifiers  
 1..1523  
 /organism="Solanum palustre"  
 /mol\_type="mRNA"  
 /db\_xref="taxon:4115"  
 /tissue\_type="leaf"  
 CDS  
 109..1290  
 /note="SAMs"  
 /codon\_start=1  
 /product="S-adenosyl methionine synthase"  
 /protein\_id="AA147716.1"  
 /db\_xref="GI:48928010"  
 /translation="METFLFTSESVNEGHPDKLCDQISDAVLDALEQDPESKVACET  
 CTKTNLVMVFGIITTKAIVDYKIVRDTCRNIGFVSDVGLDADNCKVLVYIEQQSPD  
 IAQGVHGHLLTKRPEEIGAGDQGHMFGYATDETPELMPLSHVLATKLGARL TEVRKNGT  
 CRWLRKPDGKTQVTVYECNDNGAMIPIRVHTVLISTQHDQETVNDIARDLKEHAIKPV  
 IPEKYLDEKTIIFHLNPSGRFVIGGPHGDAGLTGRKIIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDPT  
 KVDRSGAYIVRQAASIVASGLARRCIVQVSYAIGVPEPLSVFVDTYGTGKIPDREIL  
 KIVKENFDFRPGMMSINLDLKRGGNGRFLKTAAYGHFGRDDAFTUEVVKPLKWNENPQ  
 D"

ORIGIN  
 1 acgaggcaaa gaggtttttt ctctcaaggg gtataaagat tgctcctttc cgacatttct  
 61 aaacctcttt ttctattagt tegctgttgg gttccctttt tcttgagaat ggaactttc  
 121 ctattcacct ccgagtcgtg gaacgagggg caccagaca agctctgtga tcagatctct  
 181 gatgcagttc ttgatgcttg ccttgagcaa gatcctgaga gcaaaagttc atgtgaaact  
 241 tgcaccaaga ccaacttggt catggtcttt ggtgagatca caaccaaggc tattgtagac  
 301 tatgagaaaa tcgtgctgga cacatgccgt aacattggat ttgtttctga tgatgttggg  
 361 cttgatgccc acaactgcaa gytccctggt tacattgagc agcaaaagtc tgatattgct  
 421 caaggtgtcc acggccatct gaccaaacgc cctgaggaga ttggtgctgg tgaccagggg  
 481 cacatgtttg gctatgccac cgatgagacc cctgaattaa tgcctctcag tcacgtgctt  
 541 gcaactaac ttggtgcccg ccttacagaa gttcgcaaga atggcacctg ccgctggttg  
 601 aagcctgatg gcaaaactca agttactggt gegtactgca atgacaatgg tgccatgatt  
 661 ccaattaggg tccacactgt tctcatctcc actcaacacg atgagactgt tacaatgat  
 721 gagattgccc gcyaccttaa ggagcatgct atcaagccag tcatcccaga gaagtacctt  
 781 gacgagaaga caatcttcca ccttaaccca tctggccgat ttgttattgg tggacctcat  
 841 ggtgatgctg gtctcactgg tctgaaatc atcattgaca cttatggtgg ttgggtgccc  
 901 catggtggtg gtgcattctc tggcaaggac ccaaccaagg ttgacaggag tgggtgcatac  
 961 attgtaaggg aggctgcaaa gagtattgta gctagtggac tcgctcgcag atgcatcgtg  
 1021 caggtttctt atgccatcgg tgtgcctgag ccattgtctg tattcgttga cacctatggc  
 1081 actggaaga tccccgacag gaaaattttg aagatcgtta aggagaactt cgacttcaga  
 1141 cctggaatga tgtccattaa cttggatttg aagaggggtg gcaatgggag attcttgaaa  
 1201 actgctgcct atggtcattt tggacgtgac gacgctgatt tcacatggga agttgtcaeg  
 1261 cccctcaagt gggaaaacc ccaagactaa taagtgtctg aaagtgcttg cctatgtttt  
 1321 tttctctttt gttgtctgct tgtggcttta gaatcccctg tgtttgcttg tctatgtatt  
 1381 ttctcttttg accctttttt tgctattgtc ctgtttccat tgtgtggaa cttggatatt  
 1441 ttaggccttg gaatattaag gaaaaaaaaa tattattata tacataaaaa ttagtgcatt  
 1501 tgtggaaaaa aaaaaaaaaa aaa

//

그림 24. *S. brevidens* 로부터 분리한 SAM-s 유전자의 염기서열  
 (GenBank AY635050, GeneIn KS109049).



ARABI. AMI	1	METFLFTSES	VNEGHPDKLC	DOISDAVLDA	CLEQDPESKV	ACETCTKINM	50
BRASICA. AMI	1	METFLFTSES	VNEGHPDKLC	DQVSDAILDA	CLEQDPESKV	ACETCTKINM	50
PETUNIA. AMI	1	METFLFTSES	VNEGHPDKLC	DOISDAVLDA	CLEQDPESKV	ACETCTKINL	50
POTATO. AMI	1	METFLFTSES	VNEGHPDKLC	DOISDAVLDA	CLEQDPESKV	ACETCTKINL	50
TOBACO. AMI	1	METFLFTSES	VNEGHPDKLC	DQVSDAILDA	CLEQDPESKV	ACETCTKINM	50
TOMATO. AMI	1	METFLFTSES	VNEGHPDKLC	DOISDAVLDA	CLEQDPESKV	ACETCTKINL	50
		60	70	80	90	100	
ARABI. AMI	51	VNVFGEITTK	ATVDYEKIVR	DTCRATGFVS	DDVGLDADKC	KVLVNIQQS	100
BRASICA. AMI	51	VNVFGEITTS	AKVDYEKIVR	STCREIGFIS	ADVGLDADKC	MVLVNIQQS	100
PETUNIA. AMI	51	VNVFGEITTK	ANVDYEKIVR	DTCRNIGFIS	DDVGLDADNC	KVLVYIEQQS	100
POTATO. AMI	51	VNVFGEITTK	ATVDYEKIVR	DTCRNIGFVS	DDVGLDADNC	KVLVYIEQQS	100
TOBACO. AMI	51	VNVFGEITTK	ATVDYEKIVR	DTCRIGFIS	ADVGLDADNC	KVLVNIQQS	100
TOMATO. AMI	51	VNVFGEITTK	ATVDYEKIVR	DTCRNIGFVS	DDVGLDADNC	KVLVYIEQQS	100
		110	120	130	140	150	
ARABI. AMI	101	PDIAQGVHGH	LTKRPEEIGA	GDQGHMFGYA	TDETPELMPL	SHVLATKLG	150
BRASICA. AMI	101	PDIAQGVHGH	LTKRPEEIGA	GDQGHMFGYA	TDETPELMPL	THVLATKLG	150
PETUNIA. AMI	101	PDIAQGVHGH	LTKRPEEIGA	GDQGHMFGYA	TDETPELMPL	SHVLATKLG	150
POTATO. AMI	101	PDIAQGVHGH	LTKRPEEIGA	GDQGHMFGYA	TDETPELMPL	SHVLATKLG	150
TOBACO. AMI	101	PDIAQGVHGH	LTKRPEEIGA	GDQGHMFGYA	TDETPELMPL	THVLATKLG	150
TOMATO. AMI	101	PDIAQGVHGH	LTKRPEEIGA	GDQGHMFGYA	TDETPELMPL	SHVLATKLG	150
		160	170	180	190	200	
ARABI. AMI	151	RLTEVRKNGT	CPWLRPDGKT	QVTVEYKNDK	GAMVPIRVHT	VLISTQHDET	200
BRASICA. AMI	151	RLTEVRKNGT	CPWLRPDGKT	QVTVEYKNEG	GAMVPIRVHT	VLISTQHDET	200
PETUNIA. AMI	151	RLTEVRKNGT	CPWLRPDGKT	QVTVEYKNDK	GAMVPIRVHT	VLISTQHDET	200
POTATO. AMI	151	RLTEVRKNGT	CPWLRPDGKT	QVTVEYKNDK	GAMVPIRVHT	VLISTQHDET	200
TOBACO. AMI	151	RLTEVRKNGT	CPWLRPDGKT	QVTVEYKNDK	GAMVPIRVHT	VLISTQHDET	200
TOMATO. AMI	151	RLTEVRKNGT	CPWLRPDGKT	QVTVEYKNDK	GAMVPIRVHT	VLISTQHDET	200
		210	220	230	240	250	
ARABI. AMI	201	VINDEIARDL	KEHVIKPVIP	EKYLDKTIIF	HLNPSGRFVI	GGPHGDAGLT	250
BRASICA. AMI	201	VINDEIARDL	KEHVIKPVIP	AKYLDENTIF	HLNPSGRFVI	GGPHGDAGLT	250
PETUNIA. AMI	201	VINDEIARDL	KEHVIKPVIP	EKYLDKTIIF	HLNPSGRFVI	GGPHGDAGLT	250
POTATO. AMI	201	VINDEIARDL	KEHVIKPVIP	EKYLDKTIIF	HLNPSGRFVI	GGPHGDAGLT	250
TOBACO. AMI	201	VINDEIARDL	KEHVIKPVIP	SOYLDENTIF	HLNPSGRFVI	GGPHGDAGLT	250
TOMATO. AMI	201	VINDEIARDL	KEHVIKPVIP	EKYLDKTIIF	HLNPSGRFVI	GGPHGDAGLT	250
		260	270	280	290	300	
ARABI. AMI	251	GRKIIIDTYG	GWGAHGGCAF	SGKDPKVDK	SGAYIVRQAA	KSVVANGMAR	300
BRASICA. AMI	251	GRKIIIDTYG	GWGAHGGCAF	SGKDPKVDK	SGAYIVRQAA	KSVVATGLAR	300
PETUNIA. AMI	251	GRKIIIDTYG	GWGAHGGCAF	SGKDPKVDK	SGAYIVRQAA	KSVVANGLAR	300
POTATO. AMI	251	GRKIIIDTYG	GWGAHGGCAF	SGKDPKVDK	SGAYIVRQAA	KSVVANGLAR	300
TOBACO. AMI	251	GRKIIIDTYG	GWGAHGGCAF	SGKDPKVDK	SGAYIVRQAA	KSVVASGLAR	300
TOMATO. AMI	251	GRKIIIDTYG	GWGAHGGCAF	SGKDPKVDK	SGAYIVRQAA	KSVVASGLAR	300
		310	320	330	340	350	
ARABI. AMI	301	RCIVQVSYAI	GVPEPLSVFV	DTYGTGKIPD	REILKIVKEN	EDFRPGMMSI	350
BRASICA. AMI	301	RCIVQVSYAI	GVPEPLSVFV	DTYGTGKIPD	REILKIVKEN	EDFRPGMMSI	350
PETUNIA. AMI	301	RCIVQVSYAI	GVPEPLSVFV	DTYGTGKIPD	REILKIVKEN	EDFRPGMMSI	350
POTATO. AMI	301	RCIVQVSYAI	GVPEPLSVFV	DTYGTGKIPD	REILKIVKEN	EDFRPGMMSI	350
TOBACO. AMI	301	RCIVQVSYAI	GVPEPLSVFV	DTYGTGKIPD	REILKIVKEN	EDFRPGMMSI	350
TOMATO. AMI	301	RCIVQVSYAI	GVPEPLSVFV	DTYGTGKIPD	REILKIVKEN	EDFRPGMMSI	350
		360	370	380	390	400	
ARABI. AMI	351	NLDLKRGGNG	RFLKTAAYGH	FGRDDPFTW	EYVKPLKWK	POA*.....	400
BRASICA. AMI	351	NLDLKRGGNG	RFLKTAAYGH	FGRDDPFTW	EYVKPLK---	PKA*.....	400
PETUNIA. AMI	351	NLDLKRGGNG	RFLKTAAYGH	FGRDDPFTW	EYVKPLKCEK	AQD*.....	400
POTATO. AMI	351	NLDLKRGGNG	RFLKTAAYGH	FGRDDPFTW	EYVKPLKWN	POD*.....	400
TOBACO. AMI	351	NLDLKRGGNG	RFLKTAAYGH	FGRDDPFTW	EYVKPLK---	PKA*.....	400
TOMATO. AMI	351	NLDLKRGGNG	RFLKTAAYGH	FGRDDPFTW	EYVKPLKWEK	POD*.....	400

그림 25. *S. brevidense* 유래 SAM-s 효소의 아미노산 서열 비교  
(Potato;AY635050, Tomato;Z24741, Petunia;AF170798,  
Arabidopsis;M55077, Brasica;AF379014, Tobacco;AF127243).

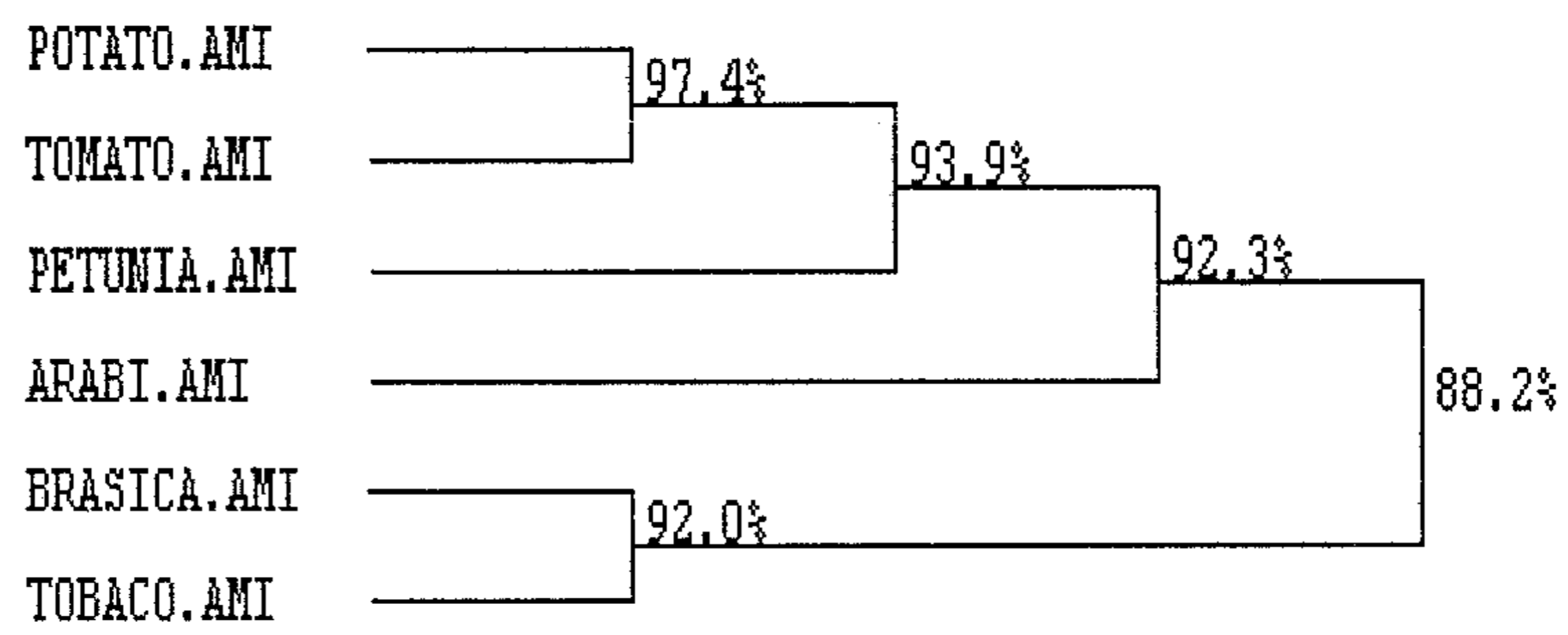


그림 26. *S. brevidense* 유래 SAM-s 효소의 상동성 분석  
(Potato;AY635050, Tomato;Z24741, Petunia;AF170798,  
Arabidopsis;M55077, Brasica;AF379014, Tobacco;AF127243).

를 증폭하고, 운반체와 PCR 산물을 각각 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 처리하여 ligation 하였다. 이 후 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하여 증폭된 plasmid를 분리한 다음 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 처리하여 insert size를 확인한 결과 목표 유전자가 성공적으로 삽입되었음이 확인되었다 (그림 27).

In vitro translation을 수행하기 위해 구축된 운반체를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환 시켜 발현된 단백질을 Sepex G10 Gel (Pharmacia)을 이용하여 회수하여 10% SDS-PAGE통하여 발현된 단백질의 크기를 확인하였으며, Coomassie brilliant blue용액에 염색하여 47.3 kDa의 단백질 밴드가 확인되어 SbSAMs 효소 단백질이 정상적으로 발현되었음을 알 수 있었다 (그림 28).

Sepedex Gel에서 회수된 효소단백질 15 ul(60 ug)을 biological buffer인 HEPES-K<sup>+</sup> 50 mM에 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 5 mM ATP 와 10mM L-methionine등 기질이 포함된 반응액을 37°C에서 2시간동안 반응시켜 목포산물인 SAM이 정상적으로 합성하는지를 확인하여 보았다. 0.2um pore size의 filter로 부분 정제한 다음 HPLC (High Performance Liquid Chromatography, waters)로 분리하여 O.D. 259nm에서 0.5mM SAM으로 확인한 peak와 일치된 분획을 확인하였다 (그림 29). 반응산물의 양은 비교적 적게 나타났으나, 발현 단백질을 처리하지 않았던 대조 처리에서는 확인되지 않은 SAM peak가 확인되어 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

#### 다. 식물 형질전환용 운반체 제작

식물체 형질전환용 운반체 pBI121의 MCS 부위에 위치한 *XbaI* site와 reporter 유전자인 GUS( $\beta$ -glucuronidase) 부위를 제거할 수 있는 *SacI*로 처리하여 PCR로 동일 adaptor가 부착된 SbSAM 생합성 유전자를 각각 동일한 제한 효소로 처리하여 ligation시켜 운반체 pBISAM-1을 구축하였다 (그림 30-A). 구축된 운반체 pBISAM-1을 *E. coli* DH5a에 형질전환하여 증폭한 후 회수하여 *Xba I/Sac I* 으로 2중 절단한 후 insert size를 확인한 결과 목표 유전자가 성공적으로 도입되었음이 확인되었다 (그림 30-B).

식물체 형질전환용 운반체 pBI121의 구조유전자중 조직화학적 reporter 유전자인 (GUS) 유전자를 운반체 제작 과정에서 제거한 이유는 감자의 형질전환 과정에서 유해성 여부가 아직까지 확인되지 않은 외래유전자의 수를 감소시키

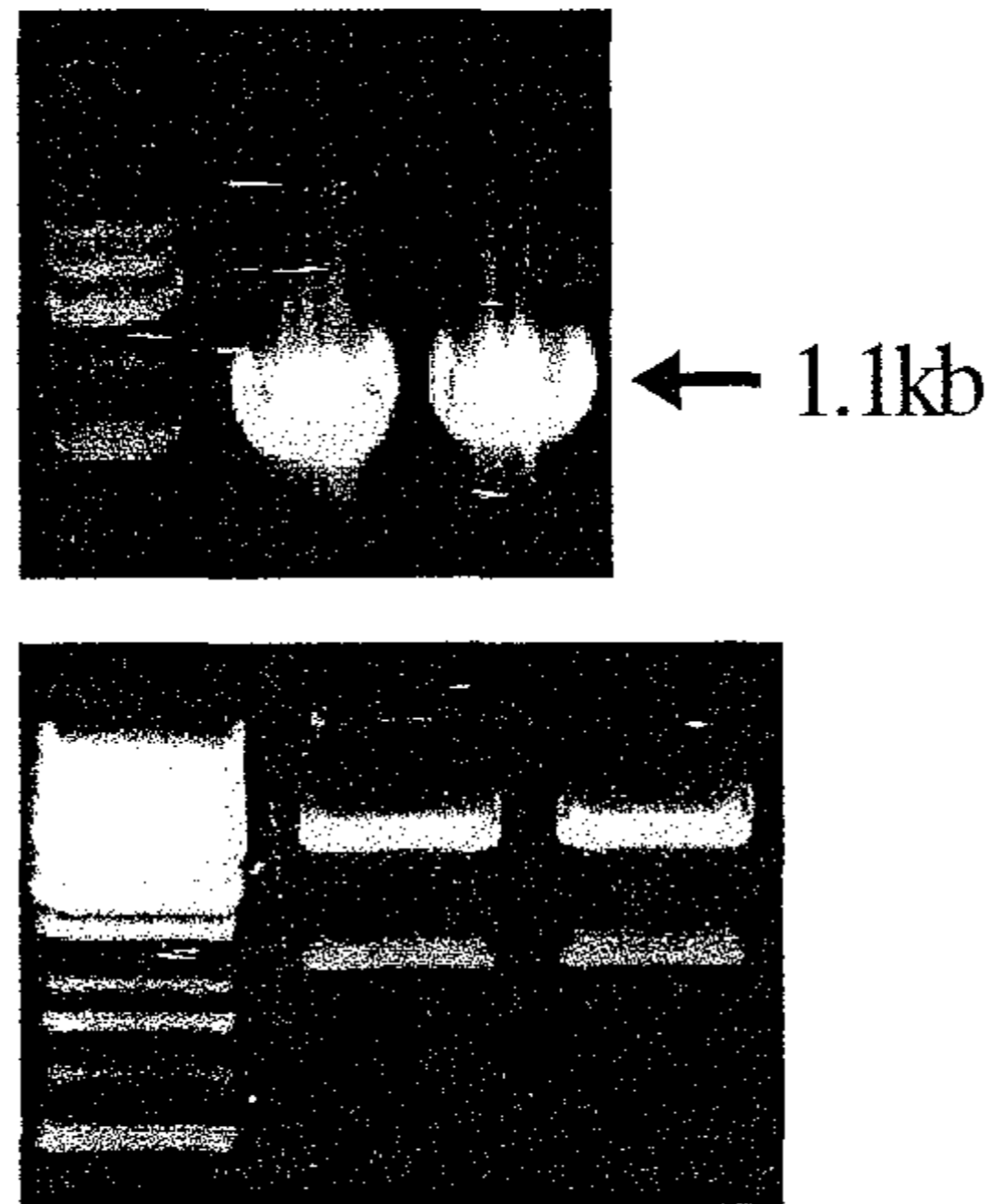


그림 27. Vector에 클로닝 된 *S. brevidense* 유래 SAM-s 유전자의 전기영동 사진

primer F(+EcoRI):5'-GAATTCATGGAACTTTCCTATTACCTCCG-3'

prime rR(+XhoI):5'-CTCGAGTGG GGGTTTTCCCACTTGAGGGGCT-3'.

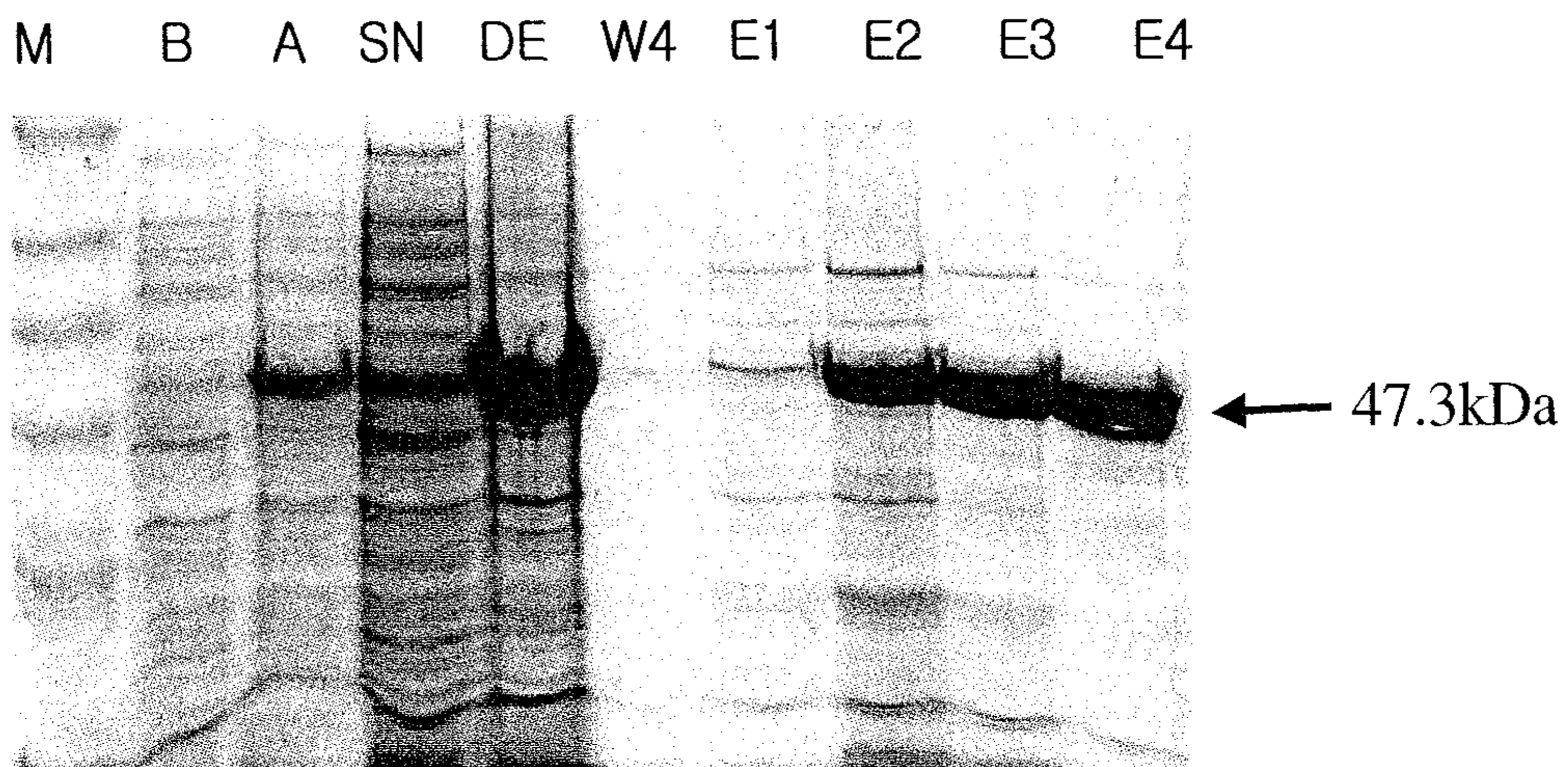
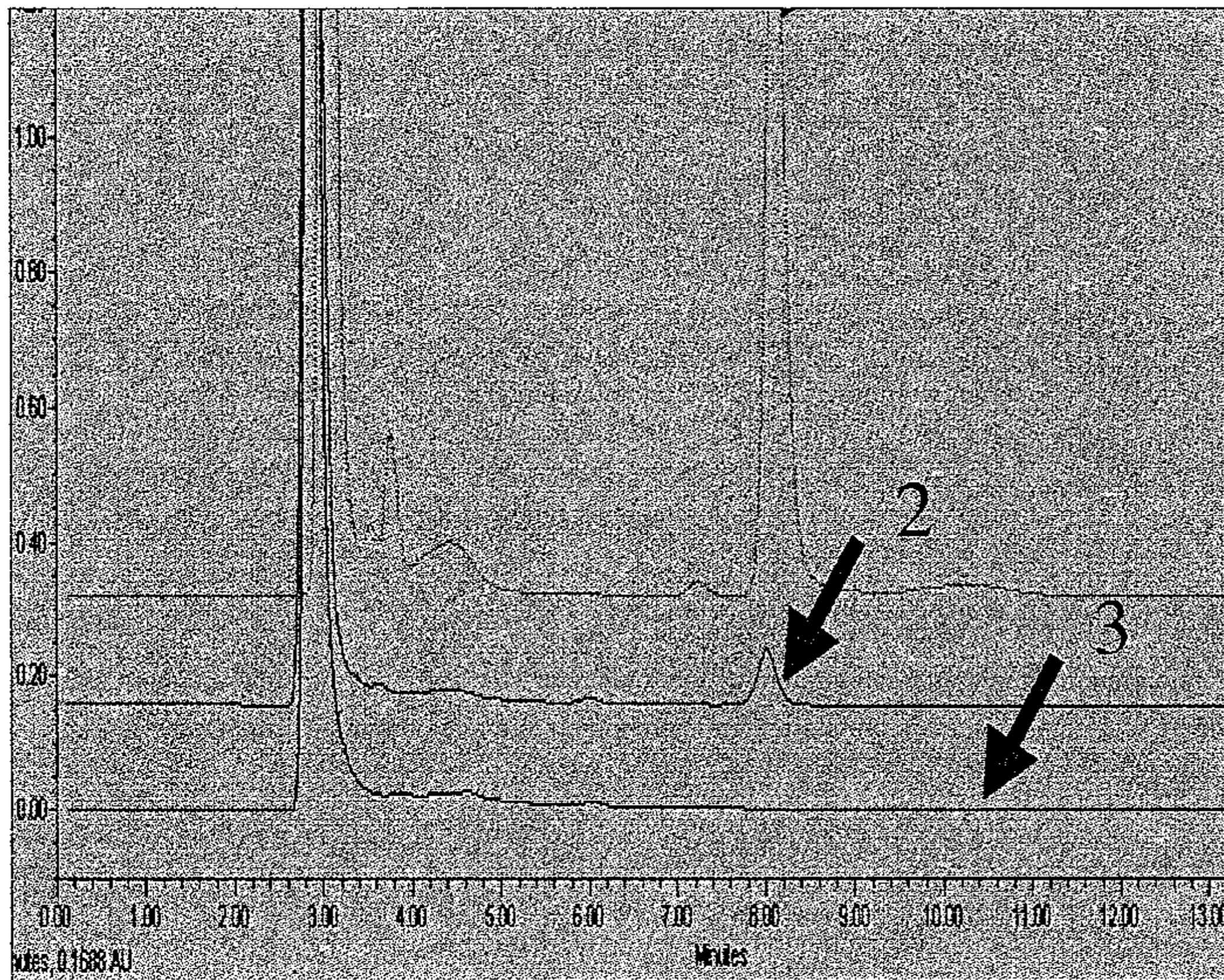


그림 28. *S. brevidense* 유래 SAM-s 효소의 분리 정제 후 SDS-PAGE

M: Molecular Weight size marker, B: before induction;

A: after induction with 1mM IPTG; SN: supernatant;

De: debris; W4: wash 4; E: 500mM imidazole elution.



**Assay Buffer**  
 HEPES-K+: 50mM  
 KCL: 50 mM  
 MgCl<sub>2</sub> : 10 mM  
 DTT: 5 mM  
 ATP: 5 mM  
 L-Methionine: 10 mM  
 Protein: 15ul(60ug)  
 Incubation : at 37  
 or 2 hours then  
 filter in 0.2um filter

그림 29. 대장균에서 발현시킨 *Solanum brevidense* 유래 SAM-s의 기능 분석  
 1; 5mM SAM standard, 2; Reaction product with SBSAMs, 3; Negative control without enzyme.

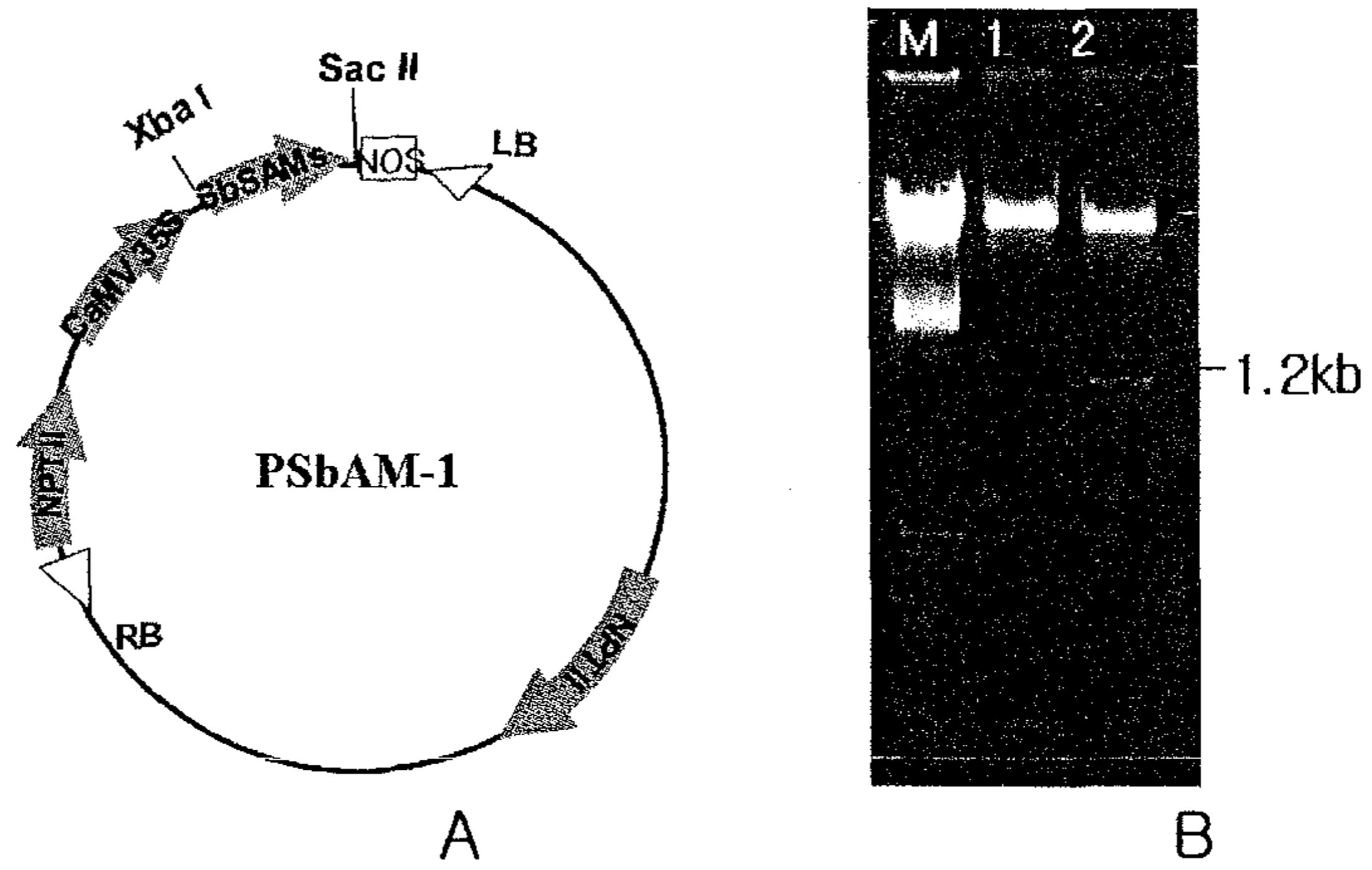


그림 30. *S. brevidense* 유래 SAM-s 유전자가 클로닝된 plasmid의 구조  
 A, Restriction map of the plasmid vector pSbSAM-1. The GUS reporter gene was replaced by a sense oriented SbSAMs gene. B, Confirmation of the vector construction by enzyme digestion. Plasmid DNA was mini-prepared, enzyme digested, and electrophoresised on 1 % (w/v) agarose gel. lane 1, *Xba* I/*Sac* I digested; lane 2, marker *N/Hind* III.

고, 감자의 영양체 번식특성으로 인해 형질전환체의 유전적 분리 (segregation)에 대한 연구가 필요하지 않기 때문이었다. 또한 형질전환된 감자를 이용한 포장 시험에서 GUS trans gene이 감자의 수량과 식물체 활력을 감소시킨다는 기존의 연구결과들이 보고된 바 있다 (Belknap *et al.*, 1994; Dale and MacPortlan, 1992; Davies, 1996). 실제로 Monsanto 회사에서 개발되어 품종화된 형질전환 콩인 Roundup Ready의 경우 GUS 유전자가 없는 계통들이 확인되었다 (Diane and Padgett, 1992). 아울러 발현된 이 후에 세포 내에 지속적으로 축적되는 GUS 유전자의 발현이 다른 효소의 작용이나 대사과정을 방해할 가능성이 높으므로 특별히 유전자의 발현연구를 할 경우를 제외하고는 transgene에서 제거되는 것이 바람직할 것으로 판단되었기 때문이다.

#### 라. 감자의 형질전환

감자는 형질전환 연구의 초기세대부터 연구재료로 많이 이용되어왔고 (An *et al.*, 1988; De Block, 1988), 비교적 형질전환이 잘 이루어지는 것으로 알려져다. 그러나 감자의 기내 재분화와 형질전환을 위해서는 감자의 품종과 조직에 따라서 다른 호르몬의 조성과 배양 조건이 많은 차이를 보인다 (D'Amato, 1975; De Block, 1988; Dobigny *et al.*, 1996). 감자의 경우 잎 조직 (De Block, 1988)이나 괴경 조직 (Sheerman and Bevan, 1988; Stiekema *et al.*, 1988) 등을 재료로 이용하여 형질전환에 이용하고 있으나 사용되는 조직에 따라 재현성과 형질전환율 등이 다를 뿐만 아니라 품종에 따라서도 많은 차이를 보이고 있음을 보고한 바 있다. 우리나라에서도 최근까지 감자를 이용한 형질전환 연구들이 많이 보고되고 있으나 (Choi *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1996; Youm *et al.*, 2002) 극히 일부 품종에 제한되고 있고 품종별로 다르게 나타날 수 있는 감자의 재분화 조건이나 형질전환 조건을 규명한 보고는 확인되지 않고 있다. 최근까지 국내외에서 형질전환 연구재료 (Youm *et al.*, 2002)로 많이 이용되고 있는 'Desiree'와 같은 일부 품종의 경우 재분화나 형질전환 효율이 다른 감자 품종에 비해 탁월한 것으로 알려져 있지만 (Choi *et al.*, 1996), 현재 우리나라에서는 재배되고 있지 않는 품종으로 형질전환 이 후 실용화 등에 문제가 있다. 형질전환체의 유전적 고정을 위한 별도의 육종 과정을 거치지 않아도 되는 감자의 경우 개발된 이 후 실용화를 위해서는 우리나라에서 재배가 가능한 품종을 재료로 이용하는



것이 필요하다.

형질전환을 위한 대상 품종인 자심의 잎으로부터 재분화 효율이 가장 좋은 배지 조성을 위해 현재까지 감자 형질전환 관련 논문에서 보고된 여러 가지 종류의 배지를 활용하여 형질전환이 가장 높은 배지조성을 확인하였다. 그 결과 정 등 (1996)에 의해 보고되어진 M5 배지조성에서 재분화 식물체의 형성효율이 가장 높은 것으로 확인되어 이 후 자심품종의 형질전환 실험에 활용하였다 (표 8).

표 8. 다양한 배지에서 재분화 식물체의 형성 효율

Rates of shoot formation (%)						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
0	0	0	3.3±0.9	21.8±3.1	0	0

<sup>1</sup>Used leaf discs were excised from young and full-expanded potato leaves grown for seven to eight weeks in green house.

자심 품종의 감자는 줄기와 피경의 표피와 육색이 자주색이며, 기내식물체의 경우도 이러한 특성을 유지한다. 그러나 형질전환 과정 중 재분화 식물체에서 줄기표면의 색이 자주색을 띠지 않는 개체도 확인되었는데 이러한 현상에 대한 원인은 확인 할 수 없었다. 다만, 일반적으로 자심품종의 자주색발현은 일교차가 큰 조건에서 잘 이루어진다는 점을 감안해 볼 때, 스트레스와 관련된 식물호르몬인 에틸렌 전구물질로의 작용, 혹은 그 반대의 작용을 하는 polyamine류의 전구물질로서의 작용에 의한 것으로 추측해 볼 수 있다.

#### 마. 형질전환된 감자의 기내 선발과 검정

선발용 항생제 kanamycin과 cabenicillin이 포함된 배지에서 재분화된 shoot를 발근을 유도하기 위해 식물생장 조절제가 포함되지 않은 1X MS배지로 옮겨 완전한 식물체를 유도하였다 (그림 31-3). 완전한 식물체를 유도한 다음 각각의 재분화된 개체별로 단엽을 채취하고 DNA를 추출하였다. 형질전환된 T-DNA 중 삽입된 목표유전자 양쪽말단에 위치한 CaMV 35S promoter 부위와

NOS terminator 부위를 증폭할 수 있는 primer들을 활용한 PCR을 수행하여 형질전환 여부를 판단하였다. 1차 선별된 putative 형질전환체들은 T2세대에서도 대부분 형질전환이 되었음을 확인할 수 있었다 (그림 32). 본 연구에 활용된 PCR 방법은 GMO 판별을 위해 EU 에서 추천한 protocol (Promega Note, 1998)에 의한 primer들을 사용하였으며, PCR 조건도 동일한 과정으로 수행하였다. PCR을 통한 형질전환체의 판별과정에서 internal control DNA의 증폭 과정은 결과의 신뢰성 확보에 필수적인 과정이다 (Meyer 1999). 이는 운반체 특이 유전자만을 증폭하여 검정하는 방법은 작물에 대한 특이성과 정확한 PCR 수행여부를 판단할 수 없어 결과에 대한 신뢰도가 낮아지게 되기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 1차 screening된 재분화 식물체들의 형질전환 여부를 보다 정확히 판단하기 위해 감자 특이적인 DNA를 증폭할 수 있도록 고안된 internal control용 PCR primer (서 등, 2002)를 사용하여 판별의 정확도를 높였다 (그림 33).

#### 바. 형질전환 감자의 도입유전자 발현수준 비교

*SbSAMs*로 형질전환된 ‘자심’ 품종의 감자 계통에서 발현되는 transcript의 수준을 확인하기 위해 PCR 및 duplex-competitive PCR로 검정한 개체들로부터 추출된 total RNA를 이용한 northern blot 분석을 수행하였다 (그림 34). DIG probe를 이용한 최종 검출 결과 비형질전환체에서도 소량의 transcript가 확인되었는데, 이는 감자 고유의 SAM-s 유전자 transcript의 검출 결과로 판단된다. 형질전환체로 선별된 개체중에서도 대조구와 비슷하거나 발현량이 적은 경우 (그림 34의 lane 2, 4, 5와 8)는 chromosome상의 non-translative 부위에 도입된 결과로 판단되며 이 결과를 근거로 증식계통 중에서 제거하였다.

#### 사. *SbSAMs* 유전자가 도입된 형질전환 감자의 SAM 증가 분석

1차 PCR로 검정되어 선별된 형질 전환체들은 상토로 옮겨 순화시킨 다음 지상부를 생장시켜 약 90일 후 소피경을 얻었을 수 있었다 (그림 35). 일부 생산된 소피경을 활용하여 도입유전자에 의한 SAM함량을 분석하였다. SAM의 분석방법으로는 피경감자를 2 g/wet weight를 액체질소로 얼린 후 액체질소 속에서 막자사발로 분쇄하였다. 분쇄된 powder에 5 mM NaEGTA를 포함한

18%(w/v) trichloroacetic acid 10 ml를 넣고 4°C에서 2시간 동안 shaking 하고, 12000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 취한 상등액에 5 ml diethyl ether를 처리하여 3000 rpm에서 15분간 원심분리를 통해 층분리를 하였다. 하층액을 얻어서 pH 7.0으로 맞추는 다음 바로 액체질소에 얼려 freezing dry를 이틀동안 수행하였다. freezing dry된 샘플 피경 감자는 2.5 ml HPLC buffer A로 녹인 다음 필터하여 10 ul를 HPLC에 injection 하였다.

HPLC 조건은 다음과 같았다.

1. Column: ODS HPLC column (YMC. Inc. 120Å, 5 um particle size 4.6×250 mm)
2. 용매조건: Flow rate : 1.0 ml/min  
buffer A: 10 % methanol in 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 mM 1-octanesulfonic acid, pH 3.2  
buffer B: methanol
3. 254 nm에서 확인
4. 용매흐름은 gradient
  - ① 85 % buffer A 와 15 % buffer B (10분)
  - ② 50 % buffer B (5분)
  - ③ 100 % buffer B (3분)
  - ④ 15 % buffer B (4분)

분석결과는 대조군의 감자에서는 분석 범위 안에 들어올 수 없는 미미한 양을 보였지만 SAMs overexpression된 자심은 3.2 mg/g으로 분석되었다. (그림 36)

#### 아. 연구개발 결과의 활용계획

SAM은 전 생물체에 걸쳐 공통적인 생리기능과 생물 종에 따라 상이한 생리활성을 가지는 다기능적 물질이기 때문에 인위적인 대사조절로 생체내의 SAM의 양적 조절을 통해 선택적으로 작물의 생산성과 기능을 향상시킬 수 있는 활용 가치가 높은 물질이다. 본 연구를 통해서 모델 식물인 애기 장대에서 SAM의 새로운 기능을 밝힐 수 있었으며, SAM-s 유전자가 과대 발현된 개체를 확보할 수 있었다. SAM은 식물에서 폴리아민과 에틸렌 등 식물 호르몬의 전구체이므로 생체 내 SAM 함량이 증가하였을 경우 에틸렌을 포함한 다양한 생리 조절 물질의 생체 내 함량 또한 증가될 가능성이 매우 크다. 그러나 아직까지 SAM의 대사 관계에 대한 생리학적인 조절 기작 연구가 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구를 통하여 확보한 SAM-s 유전자가 과대 발현된 애기

장대에서 실제 에티렌과 같은 생리 조절 물질이 증가되었는지 실험적으로 증명하는 것은 굉장히 큰 의미가 있는 일이므로 연구를 계속 진행할 예정이다. 특히 에티렌의 경우는 공기 중에 휘발되는 특징이 있으므로 특수 용기 등을 제작하여야 하는 어려움이 있다. 이는 고령지 농업연구소의 서효원 박사 연구팀과 협력하여 진행할 예정이다. 이렇게 진행된 연구 결과는 세계적인 SCI등재 전문 학술지에 게재할 수 있을 것으로 예상되어 진다.

또한 고령지 농업 연구소에서 개발한 형질 전환된 자심품종은 생식이 가능하며, 형질 전환하여 과대 발현된 SAM을 가공과정에 손실이 거의 없는 상태에서 활용이 가능하다. 이러한 특성은 SAM이 가지는 여러 가지 약리적 특성으로 인해 활용 가치가 매우 높을 것으로 판단되므로 1차적으로 산업재산권 출원을 하였다.

또한, 개발된 형질전환 감자는 농촌진흥청 기본연구과제의 재료로 활용하여 농업적 특성과 실용화 가능성을 정밀 평가하며 GMO 안전성을 평가할 계획이다. 이를 위해 현재 진행 중인 수경 재배 감자를 활용하여 2007년도 가을재배와 동계시설재배를 통하여 대량의 감자를 확보할 계획이다.

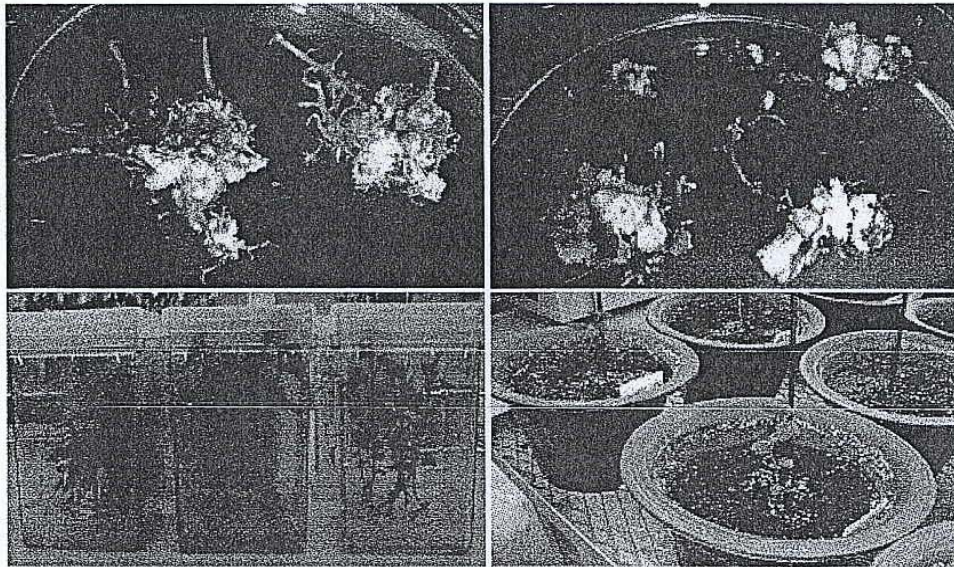


그림 31. 감자 자심의 형질 전환 후 재분화 모습

1 and 2, Callus induction on the kanamycin contained PSM media under the fluorescent light (3000-3500 Lux) in the growth chamber; 3, *In vitro* multiplication and root induction of the regenerated shoots on the hormone-free MS medium; 4, T2 putative transformants on soil.

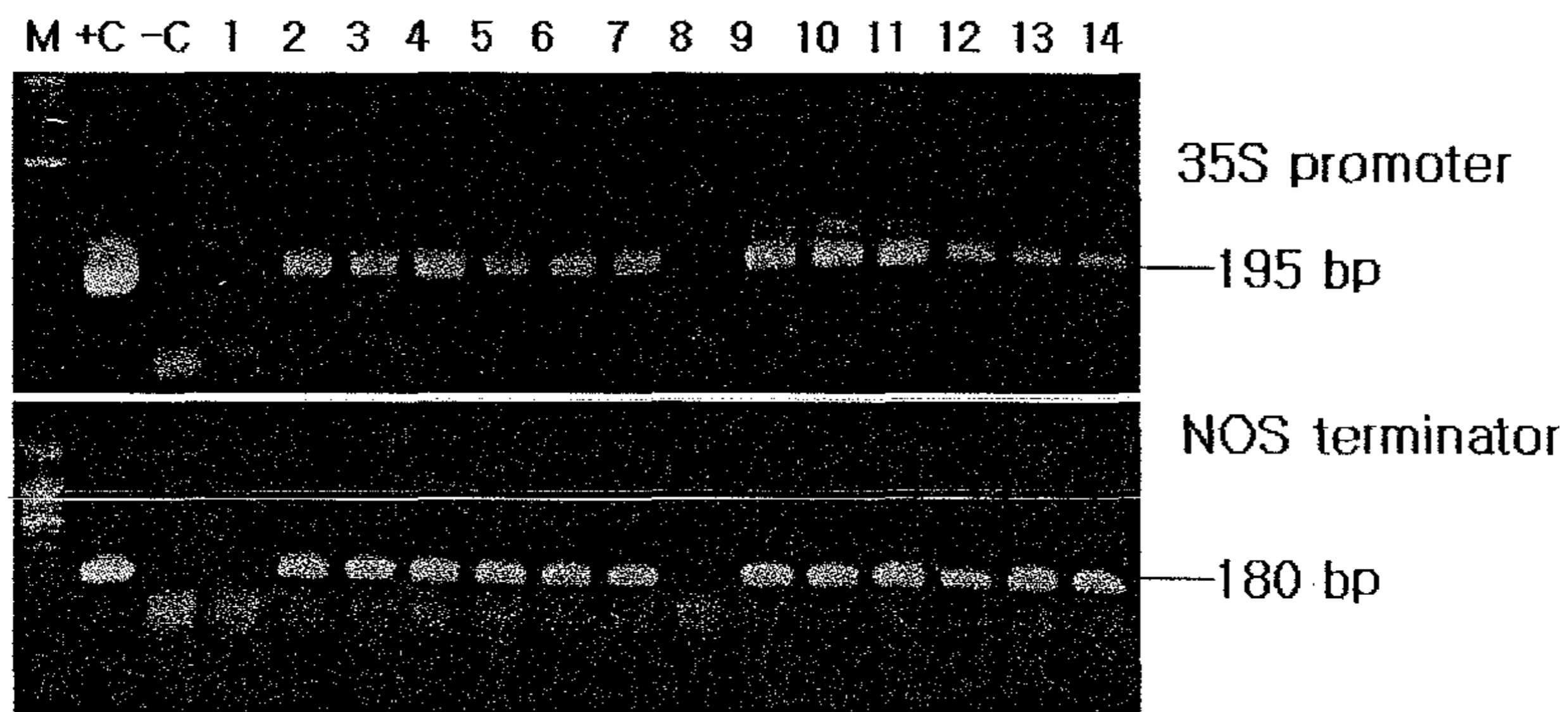


그림 32. 재분화된 감자로부터 형질전환된 T-DNA의 PCR 증폭 결과

M, size marker, Used primer; 35S-S: GCTCCTACAAATGCCATCA; 35S-AS, GATAGTGGGATTGTGCGTCA; NOS-S, GAATCCTGTTGCCGG TCTTG; NOS-AS, TTATCCTAGTTTGCGCGCTA.

PCR condition : pre-denaturation, 94°C/ 5min; denature, 94°C/ 20sec; annealing, 50°C/20sec; expansion, 72°C/1min (40 cycles) and full extension; 72°C, 5min.

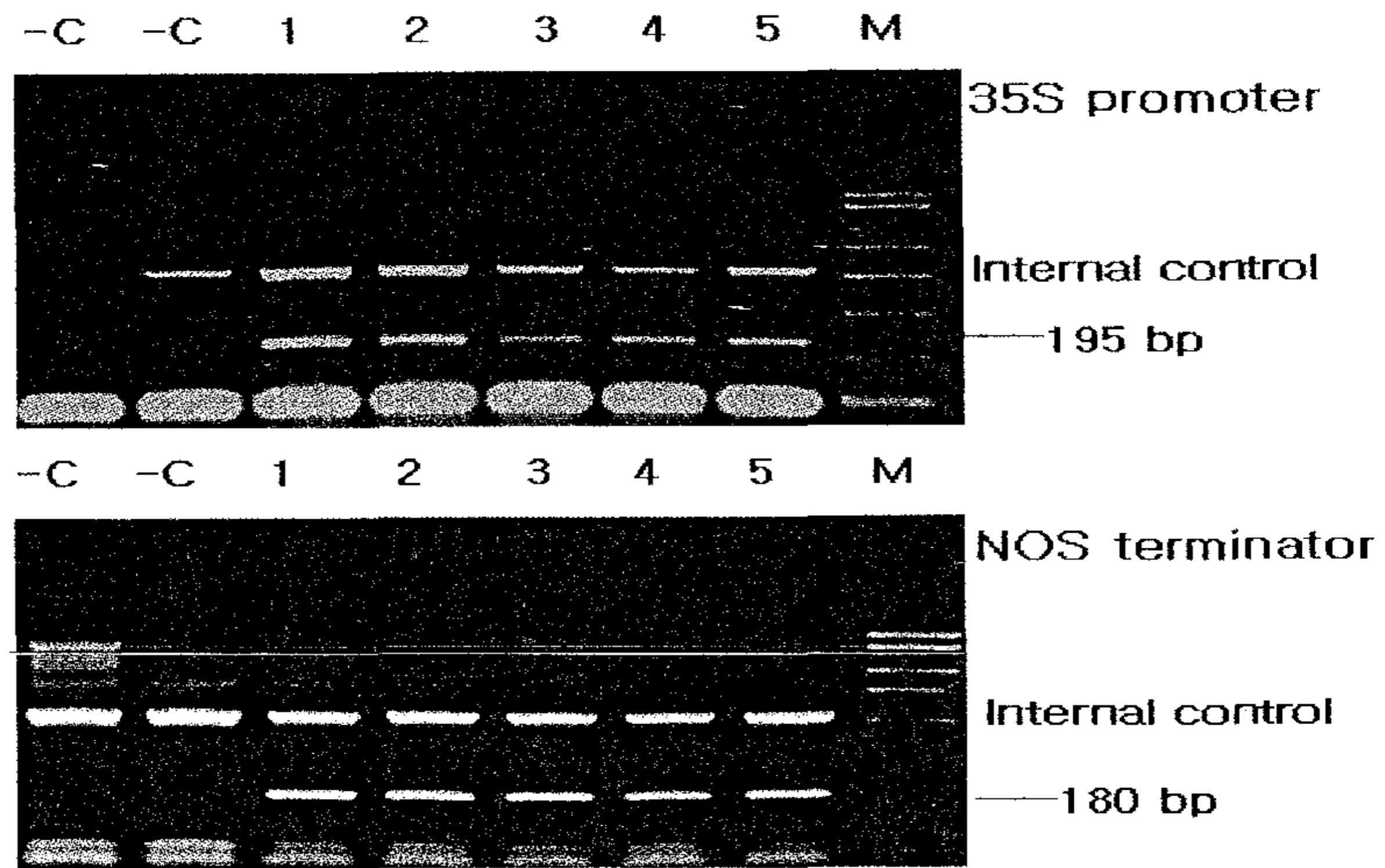


그림 33. 형질전환 감자 자심의 competitive duplex-PCR amplification

M, PCR marker, Used primer; Potato internal control : rAGU4A;  
 5'-GACTCGATAACA GGCTCCA-3' 35S-S:5'-GCTCCTACAAATGCCA  
 TCA-3'; 35S-AS, 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'; NOS-S, 5'-GAATC  
 CTGTTGCCGGTCTTG-3'; NOS-AS, 5'-TTATCCTAGTTTGCGCGCTA-3'.  
 PCR conditions were same as figure 32.

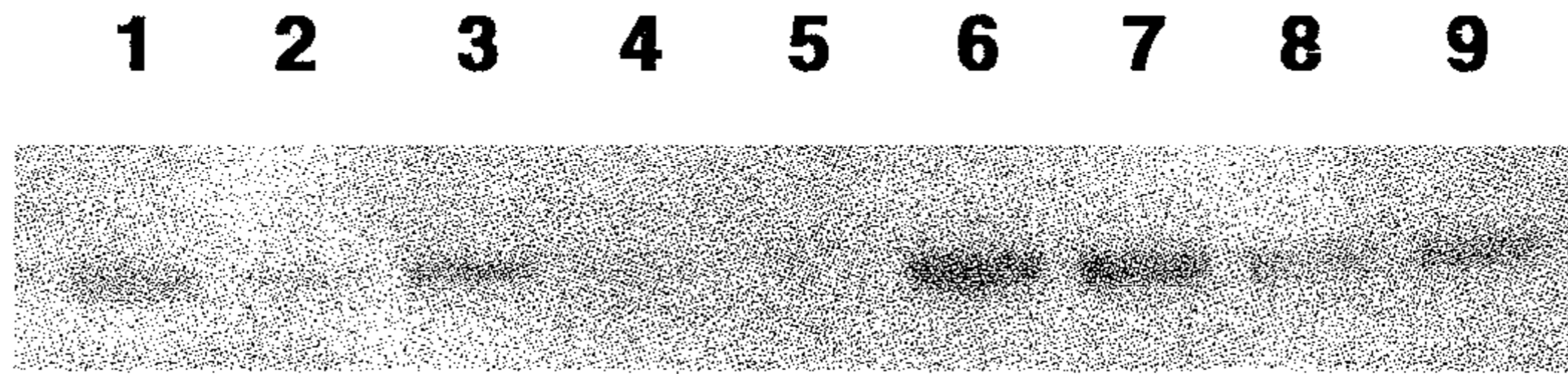


그림 34. 형질전환 감자 자심의 Northern blot analysis

*SbSAMS* transcripts were detected with DIG-labeled *SbSAMS* gene cRNA probe. lane 1-2, Non-transgenic cv. Jashim; 3-9 transgenic cv. Jashim with *SbSAMS* gene from *S. brevidens*. 1, non-transgenic potato cv. Jashim; 2-9, putative transgenic potato cv. Jashim.



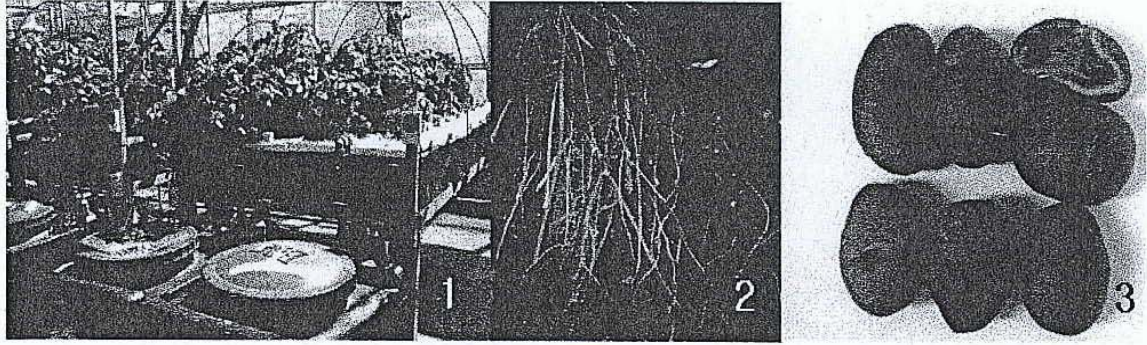


그림 35. 수중 재배 방법을 사용한 형질전환 감자 자심의 씨감자 형성 과정  
1. growing status of transgenic potato on hydroponic culture system; 2, early tuberization stage of transgenic potato in hydroponic culture bed; 3, harvested transgenic cv. Jashim.

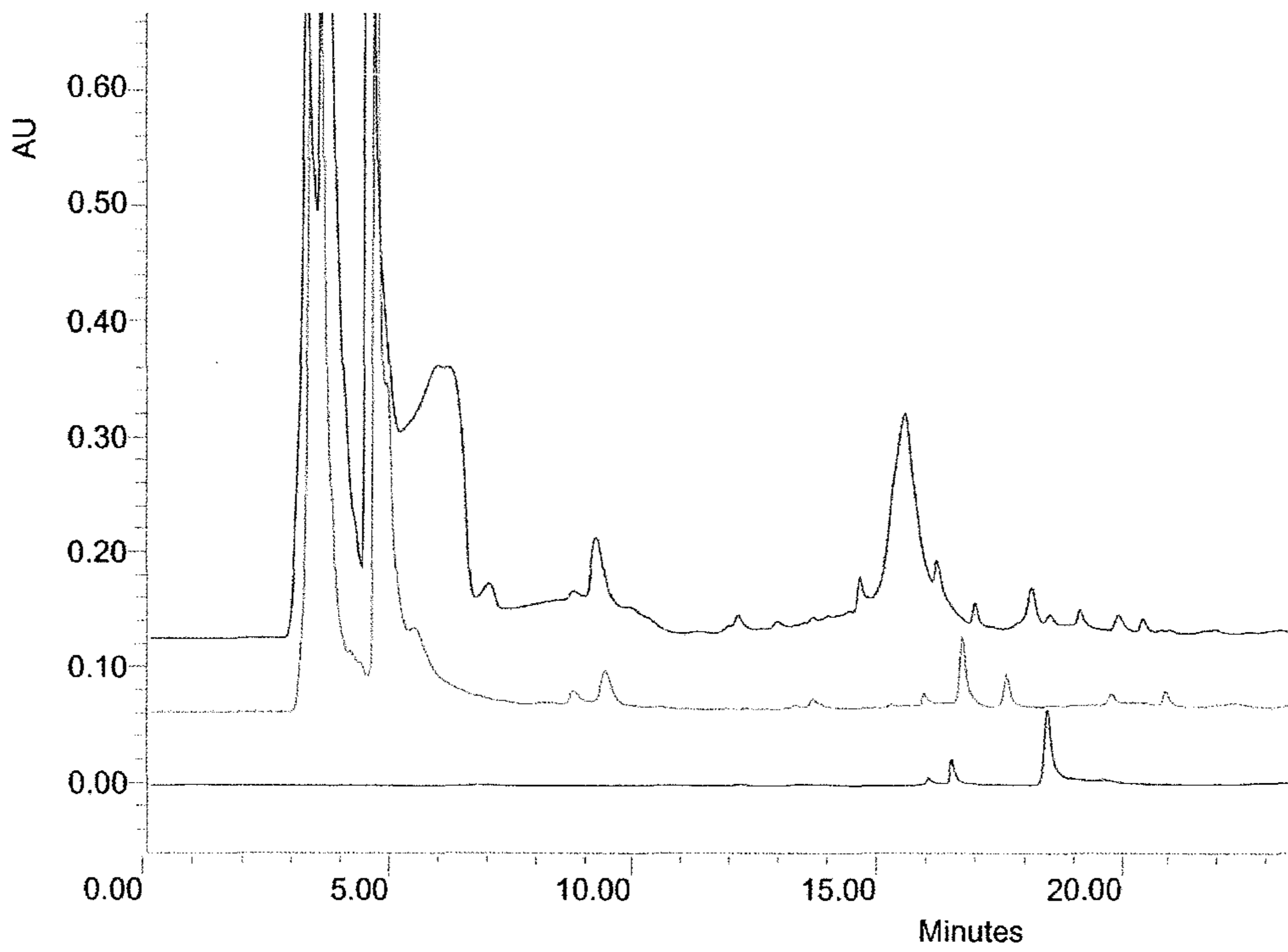


그림 36. 배양에 의해 얻어진 감자의 SAM함량 분석. 1. SbSAMs의 과발현 감자. 2. 대조감자. 3. Standard

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

목 표	달성도(%)	내 용
SAM의 생리·대사관련 효소 유전자 확보 및 형질전환용 벡터 구축	100%	모델식물인 애기장대에서 SAM synthase(SAM-s) 유전자 4종을 모두 클로닝하였으며 Gene bank로부터 SAM과 결합 가능한 스트레스 내성 신호전달 관련 단백질 AGC1-1 kinase를 선별하였다. 또한 <i>Solanum brevidense</i> 로부터 확보한 cDNA library로부터 SAM-s 유전자를 분리하여 기능을 확인하고, SAM-s 유전자와 조직특이성 promoter를 포함한 형질전환용 발현벡터 구축하였다.
모델 식물인 애기장대에서 SAM의 새로운 생리·대사기능의 분석	100%	식물의 방이기작으로 잘 알려진 elicitor인 salicylic acid와 jasmonic acid를 처리한 뒤에 애기장대의 뿌리와 잎에서 mRNA를 분리하여 4종의 SAM-s의 발현량을 분석한 결과, 특히 SAM-s 3의 발현량이 스트레스에 의해 급격히 증가하는 것을 새롭게 발견하였다. SAM-s가 형질전환된 애기장대에서 에틸렌의 생성이 증가로 예상되는 현상을 처음으로 발견하였다.
모델 식물의 신호전달 단백질과 SAM의 상호작용 규명 및 대사기작 규명	100%	Protein kinase AGC1-1이 자가 인산화 기능을 가지고 있음을 처음으로 밝히고, SAM에 의해서 인산화가 2배 이상 증가함을 보여 주었다. 또한 AGC1-1 유전자를 GFP 발현 벡터에 클로닝하여 애기장대에 삽입함으로써 AGC1-1 kinase가 애기장대의 기관에서 cytoplasm에 존재하며, SAM을 인지하는 protein kinase임을 새롭게 밝혔다.
SAM 형질 전환 식물 개발 및 조절 단백질 결손 균주 확보	100%	모델식물인 애기장대에서 SAM-s 유전자가 형질전환되어진 개체를 확보하였으며 또한 AGC1-1 유전자가 불활성화된 애기장대를 제작하였다.
SAM의 새로운 기능을 규명하여 스트레스 내성 식물 개발의 기반 구축	100%	AGC-1 mutant에서 발아 효율이 현격히 감소하며 애기장대의 초기발달에서 매우 중요한 역할을 담당하는 조절 단백질임을 제시하였다. AGC1-1 mutant에 가뭄 및 염을 처리하여 스트레스를 유발한 결과, 저항성이 크게 감소되며, 병원균을 처리하였을 경우에도 저항성이 매우 감소함을 증명하였다.
SAM 고함량 기능성 식용 작물 개발	100 %	Agrobacterium-tissue co cultivation method로 감자에 제작한 벡터를 형질전환하였다. 감자 품종 자심의 적정 재분화 조건을 찾아 형질전환 처리 후 재분화 식물체를 각각 선별하였다. Competitive duplex-PCR을 통하여 재분화 식물체로부터 형질전환 여부를 확인하였으며, northern 분석을 통하여 SAM-s의 transcription이 증가함을 확인하였다.

## 제 2절 관련분야에의 기여도

### 1. 노령화 사회에 따른 사회적 비용감소에 대한 기여

현재 우리나라의 경우 노인인구가 급증하는 추세에 있으며, 65세 이상의 노령인구가 전체 인구의 7.5%이상을 차지하고 있다. 이에 따른 퇴행성 질환 문제 등이 급부상하고 있으며, 노인성 치매인구의 경우 약 33만 명으로 추산되고 있다(65세 이상 10%, 85세 이상 50%). 현재 임상적으로 처방되고 있는 노인성 치매 치료제 (Galantamin 등)의 대부분은 신경전달물질 아세틸콜린의 분해효소 억제제 등으로 본연구의 목표산물인 SAM은 아세틸콜린 활성 촉진물질로 노인성치매 예방과 항우울증 등에 임상적 효과가 입증되어 처방되고 있다. 따라서 개발된 SAM 고함유 기능성 감자의 활용으로 노령인구의 치매예방 효과가 가능할 경우 이에따른 사회적 비용의 절감효과는 연간 수천억원에 이를 것으로 판단된다. 현재 추세라면 2025년에 전 세계적으로 알츠하이머 치매환자수가 2200만명에 이를 추세이다. 치매치료제의 잠재 시장은 국내에서 493백만 달러 세계적으로 640억 달러에 이른다. 이러한 치료제를 부분적으로 대처할 수 있는 SAM 고함량 기능성 식품이 개발된다면 그 경제적 효과는 매우 클 것으로 기대된다.

### 2. 로얄티 문제 및 환경유해 가능성이 없는 기술효과

자체 개발한 감자유래 유전자의 경우 자체 개발된 고유 유전자로 활용하여 협동연구팀에서 육성한 감자품종인 자심을 활용하였으므로 기술사용료의 제가 없으며, 감자에 과다발현 시켰을 경우 인체 유해성이 없을 것으로 판단된다. 아울러 현재까지 국내에서 개발된 여러 가지 특성의 형질전환 작물(예, 제초제 저항성, 해충저항성 작물)들과는 달리 유전자 특허에 대한 로얄티 문제가 발생하지 않을 것으로 판단된다. 형질전환에 이용한 운반체 pBI121의 경우 특허기간이 만료되어 사용에 문제가 없으며, 운반체에 포함되어 있던 histochemical reporter 유전자인 GUS를 운반체 구축과정에서 제거하였으므로 환경 위해성 평가과정을 비교적 단순화할 수 있다는 장점이 있다. 뿐만 아니라 주요 수요인구의 대부분이 노인층으로 GMO 반대론자들의 우려와는 달리 세대 반복에 따른 유전자의 인체 부작용에 대한 우려를 줄일 수 있을 것이라 판단된다.

### 3. 생식 가능한 감자를 활용한 유용물질의 기능 극대화효과

괴경 내부에 자주색의 anthocyanin성분을 축적하는 특성을 가진 자심은 항산화물질의 함량이 다른 품종에 비해 높은 것으로 평가되고 있다. 아울러 2차 대사산물의 전구물질 생산 효율이 비교적 높은 품종이므로 이러한 기능성과 더불어 새로운 기능성을 추가할 경우 품종의 활용도를 극대화 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절. 본 과제를 통해 확보한 연구개발 산물

본 연구 과제를 통하여 첫째, 야생종 감자 *S. brevidens*의 SAM-s 유전자 (*SbSAMs*)를 클로닝하여 특성을 평가하였다. 기능과 특성이 밝혀진 유전자 *SbSAMs*을 생식이 가능한 우리나라 장려품종 감자인 자심에 형질전환하여 재분화 식물체를 확보하였다. 형질전환 감자의 성분 분석 및 무병씨감자 생산을 위해 수정재배를 수행하였으며, 괴경내 SAM의 과대 생산량을 측정하기 위한 괴경을 확보하였다.

둘째, SAM-s 유전자가 과대 발현된 애기장대를 확보하였다. SAM은 식물에서 폴리아민과 에틸렌등 식물 호르몬의 전구체이므로 생체 내 SAM 함량이 증가하였을 경우 에틸렌을 포함한 다양한 생리 조절 물질의 생체 내 함량 또한 증가될 가능성이 매우 크다. 그러나 아직까지 SAM의 대사 관계에 대한 생리학적 조절 기작 연구가 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구를 통하여 확보한 SAM-s 유전자가 과대 발현된 애기장대는 SAM의 새로운 기능을 밝힐 수 있는 중요한 모델 식물로서 사용될 것이다.

셋째, AGC1-1 유전자가 불활성화된 애기장대를 제작하였고, protein kinase AGC1-1이 자가 인산화 기능을 가지고 있으며, SAM을 인지하는 protein kinase임을 새롭게 밝혔다.

이외에도 본 연구팀은 본 과제를 수행하면서 연구비를 지원받아 국외 SCI 등재 유명 학술지에 2편의 논문을 등재하였다. 2006년 *Journal of applied Microbiology* vol.99에 Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua (J.S. Han, J.H. Cheng, T.M. Yoon, J. Song, A. Rajkarnikar, W.G. Kim, I.D. Yoo, Y.Y. Yang and J.W. Suh) 를 발표하였으며, 2007년 *Gene* vol. 395에 Glucoamylase gene, *vldI*, is linked to validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*, and *vldADEF* confers validamycin production in *Streptomyces lividans*, revealing the role of *VldE* in glucose attachment (Deepak Singh, Hyung-Jin Kwon, Arishma Rajkarnikar, Joo-Won Suh Soon-Ok Kim)을 게재하였다.

또한 2005년 International symposium and Annual Meeting of the KSABC에서 애기장대의 신호전달 단백질에 대한 연구결과를 AGC-1 kinase Study on the Physiological Role of AGC1-1 in *Arabidopsis thaliana*, (Ming Li, Young-Yell Yang, Hyung-Jin Kwon, Joo-Won Suh)란 제목으로 발표하였으며, Proceedings of the Symposium on Plant Biotechnology에서 고령지 농업연구소 서효원 박사팀이 Molecular characterization of S-adenosyl methionine synthase (SbSAMs) gene of *Solanum brevidens*에 대한 연구 결과를 발표하였다.

본 연구를 수행하면서 박사 1명, 석사 2명의 인력지원 성과를 얻을 수 있었다.

## 제 2 절. 연구개발 결과의 활용계획

SAM은 전 생물체에 걸쳐 공통적인 생리기능과 생물 종에 따라 상이한 생리활성을 가지는 다기능적 물질이기 때문에 인위적인 대사조절로 생체내의 SAM의 양적 조절을 통해 선택적으로 작물의 생산성과 기능을 향상시킬 수 있는 활용 가치가 높은 물질이다. 본 연구를 통해서 모델 식물인 애기 장대에서 SAM의 새로운 기능을 밝힐 수 있었으며, SAM-s 유전자가 과대 발현된 개체를 확보할 수 있었다. SAM은 식물에서 폴리아민과 에티렌등 식물 호르몬의 전구체이므로 생체 내 SAM 함량이 증가하였을 경우 에티렌을 포함한 다양한 생리조절 물질의 생체 내 함량 또한 증가될 가능성이 매우 크다. 그러나 아직까지 SAM의 대사 관계에 대한 생리학적인 조절 기작 연구가 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구를 통하여 확보한 SAM-s 유전자가 과대 발현된 애기장대에서 실제 에티렌과 같은 생리 조절 물질이 증가되었는지 실험적으로 증명하는 것은 굉장히 큰 의미가 있는 일이므로 연구를 계속 진행할 예정이다. 특히 에티렌의 경우는 공기 중에 휘발되는 특징이 있으므로 특수 용기 등을 제작하여야 하는 어려움이 있다. 이는 고령지 농업연구소의 서효원 박사 연구팀과 협력하여 진행할 예정이다. 이렇게 진행된 연구 결과는 세계적인 SCI등재 전문 학술지에 게재할 수 있을 것으로 예상되어 진다.

또한 고령지 농업 연구소에서 개발한 형질 전환된 자심품종은 생식이 가능하며, 형질 전환하여 과대 발현된 SAM을 가공과정에 손실이 거의 없는 상태에서

활용이 가능하다. 이러한 특성은 SAM이 가지는 여러 가지 약리적 특성으로 인해 활용 가치가 매우 높을 것으로 판단되므로 1차적으로 산업재산권 출원을 하였다.

또한, 개발된 형질전환 감자는 농촌진흥청 기본연구과제의 재료로 활용하여 농업적 특성과 실용화 가능성을 정밀 평가하며 GMO 안전성을 평가할 계획이다. 이를 위해 현재 진행 중인 수경 재배 감자를 활용하여 2007년도 가을재배와 동계시설재배를 통하여 대량의 감자를 확보할 계획이다. .



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2006년 Plant. Cell. Rep. 저널에 Wi등은 S-adenosylmethionine decarboxylase gene(SAMDC)을 과대 발현시킨 담배가 abiotic stress에 대해서 넓은 저항성을 나타낸다고 보고 하였다. SAMDC는 SAM으로부터 polyamine을 합성하는 효소이다. 이는 식물체 내에서 polyamine의 과다 축적이 환경 스트레스에서 매우 중요하다는 것을 의미한다. 여기서 우리가 주목해야 할 것은 SAM이 polyamine의 전구체로 작용하며, SAMDC의 과대발현은 생체내의 SAM 합량 및 대사과정에 영향을 미칠 수 있을 것이라는 사실이다. 또한 SAM 생합성 과정의 상위 단계를 조절함으로써 polyamine의 생합성을 증가시킬 수 있을 것이라는 연구는 아직까지 미흡한 현실이다. 그러므로 애기장대에서 SAM-s gene을 과대 발현시켰을 때 노화현상이 빠르게 진행된 본 연구 결과는 매우 흥미로우며, 학문적으로도 큰 의미를 가진다고 할 수 있다.

2002년 The Plant Journal에 Shen 등은 Arabidopsis에서 SAM-s 3 gene에 single point mutation이 일어나서 ATP binding domain에 한 개의 아미노산이 바뀌는 mutation이 일어나면 SAM-s 3 gene의 발현과 전체 SAM-s 효소가 변하지 않음에도 불구하고 SAM 함량이 줄어들면서 Lignin 함량이 wild type에 비해서 22%가 감소한다고 발표하였다. 그러나 wild type과 비교하여 발아과정이 조금 느려지는 것을 제외하고 성장과정에서 눈에 띄는 차이는 보여주지 않았다. 이러한 결과는 SAM-s 3 gene이 다른 SAM-s gene 과 비교하여 one carbon metabolism에서 다른 기능을 가질 것이라는 것을 제시해 준다. Arabidopsis SAM-s 3 protein은 SAM-s 1, SAM-s 2, SAM-s 4 protein과 약 90%의 상동성을 가진다. 이러한 사실은 왜 생체 내에 SAM-s의 isoform이 존재하는지에 대한 의문을 불러일으킨다. Shen 등은 첫째, SAM-s 3는 다른 SAM-s gene에 비하여 상대적으로 다른 조직에서 발현될 수 있을 가능성을 제시하였다. 그러나 Shen 등은 앞에서 RNA 분석 결과 이러한 가능성에 대한 증거를 발견하지 못하여 tissue specificity는 없다고 제안하였다. 이는 본 연구진의 실험 결과와 일부 일치하는 것으로서, 본 연구진이 네 개의 SAM-s gene의 transcription을 구별할 수 있는 specific primer를 제작하여 RT-PCR을 수행한

결과, 뿌리와 잎 모두에서 SAM-s 3 gene의 발현량이 다른 SAM-s gene에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다. 둘째, Shen 등은 *Pisum sativum*의 예를 들어 SAM-s 3 gene은 식물의 성장과 발달 과정에서 시기별로 다르게 발현될 수 있다는 가능성을 제시하였으나 이 또한 증명하지 못하였다. 이는 본 연구진의 실험 결과 애기 장대에서 내병성에 관여하는 salicylic acid와 jasmonic acid를 처리한 뒤에 SAM-s 3 gene의 발현량이 증가함을 보여줌으로써 처음으로 증명되었으며, SAM-s 3 gene의 새로운 기능에 대한 가능성이 제시되었다. 셋째로는 *Catharanthus roseus*의 예를 들어, SAM-s 3 protein이 나머지 SAM-s와는 다른 생화학적인 특성을 가질 것이라는 가능성을 제안하였다. 그리고 그들이 수행한 실험 결과를 예를 들어 마지막으로 특히 lignin 생합성과정에서 수반되는 methyltransferase와 밀접한 관련이 있을 것이라고 주장하였다. SAM-s 2 gene을 constitutive promoter하에서 발현되도록 하여 complementation 실험을 수행하였을 때 SAM-3 gene의 mutation을 회복시키지 못하였다는 결과는 참으로 흥미롭다.

Arabidopsis의 연구 결과와 비슷하게, 토마토에서 salt stress가 xylem 발달을 촉진시키고 SAM-s의 발현을 증가시킨다는 연구가 2004년 *Planta* 저널에 보고되었다. 토마토에서는 SAM-s 1 gene 과 SAM-s 3 gene이 NaCl, mannitol, abscisic acid (ABA) 처리에 의해서 그 발현량이 증가하였고 다른 식물에서도 스트레스와 관련하여 SAM-s gene의 발현이 증가한다는 보고가 있었다. 이러한 사실은 스트레스 환경 하에서 식물 내에서 SAM의 생합성에 대한 요구가 증가한다는 것을 암시해 준다. SAM-s단백질의 발현 조절은 아미노산 polyamines, phenylpropanoid compounds, 그리고 ethylene등의 생합성에 영향을 줄 수 있다. 또한 vascular plants에서 lignin 생합성 하는데 SAM이 중요한 전구물질로 작용할 것이라고 제안되어 왔다. Lignin은 대부분 cell wall등에서 발견되며 2002년 Shen등의 연구 결과도 이를 증명한다고 할 수 있다. 이렇게 식물체 내에서 SAM은 생장에 있어 매우 중요한 생체 물질로 연구되어 왔으나 아직까지 그 기능에 대해서 다 밝혀지지 않았다. 그러므로 식물 내에서 SAM의 생체 기능에 대한 본 연구가 학문적으로 매우 중요하다고 할 수 있으며, 본 연구 결과 식물의 스트레스에 대한 저항성을 유지하는데 있어 SAM이 중요한 역할을 할 것이라는 사실을 처음으로 확인할 수 있었다.

## 제 7 장      참고문헌

- An G. Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary Vectors. In : Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS, Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publisher, Boston, PMAN-A3: 1-19.
- Belknap, WR, Corsini D, Pavsek JJ, Synder GW, Rockhold DR, Vayda M.E (1994) Field performance of transgenic Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. *Amer. potato J.* 71: 285-296.
- Bottiglieri T, Godfrey P, Flynn T, Carney MW, Toone BK, Reynolds EH (1990) Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53: 1096-8.
- Bottiglieri T, Hyland K, Reynolds EH (1994) The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs.* 48: 137 - 152.
- Bradshaw JE, Mackey GR (1994) Potato Genetics. CAB International. Wallingford.
- Bragod-Aas M (1977) Regeneration of plants from callus of potato tubers. *Acta Hort* :133-137.
- Bressa GM (1994) S-adenosyl-l-methionine (SAME) as antidepressant: Meta-analysis of clinical studies. *Acta Neurol Scand* 154(suppl): 7 - 14.
- Brooke, A., M. McDaniel, F. J. Grundy, I. Artsimovitch, and T. M. Henkin(2003), Transcription termination control of the S box system: Direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 3083-3088.
- Hilti, N., R. Graub, M. Jorg, P. Arnold, A. M. Schweingruber, and M. E. Schweingruber(2000), Gene *sam1* encoding adenosylmethionine synthetase: effects if its expression in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 16:1-10.
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10:

471-480.

- Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Yang DC, Joung H (1996) An effective method for the selection of transgenic potato using mouse adenosine deaminase gene. *Korean J Plant tissue culture* 23:97-101.
- D'Amato F (1975) The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge Univ Press. pp 333-348.
- Dale, PJ, MacPortlan, HC (1992) Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor. Appl. Genet.* 84: 585-591.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants *Trends Plant Sci* 6:219-226.
- Davies, HV (1996) Recent developments in our knowledge of potato transgenic biology. *Potato Res.* 39: 411-427.
- De Block M (1988) Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 76:767-774.
- Diane, BL, Padgett SR (1992) Petition for determination of non-regulated status: soybeans with a Roundup Ready™ gene. USDA-ARS-FCR Report.
- Dobigny A, Ambroise A, Haicour R, David C, Rossignol L, Sihachakr D (1995) Transformation of potato using mannopine and cucumopine strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40:225-230.
- Fava M, Rosenbaum JF, MacLaughlin R, Falk WE, Pollack MH, Cohen LS, Jones L, Pill L (1990) Neuroendocrine effects of S-adenosyl-L-methionine, a novel putative antidepressant. *J Psychiatr Res* 24: 177-184.
- Fernández-Checa JC, Colell A, García-Ruiz C (2002) S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol.* 27:179-183.
- Fontecave, M., M. Atta, and E. Mulliez(2004), S-adenosylmethionine: nothing

- goes to waste. *Trends. Biochem. Sci.*, 29: 243-249
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffman NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4803-4807.
- Ghislain M, Querci M, Bonierbale M, Golmirzaie R, Nels R (1997) *Biotechnology and the potato*. CIP, Peru. Lima.
- Holster MD, de Waele A, Depicker E, Messens M, Montagu V, Schell J (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163: 81-187.
- Hood EE, Woodard SL, Horn ME (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants myths and realities. *Curr Opin Biotechnol* 13: 630-635.
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SC, Sanders PR, Lloyd A, Hoffman N (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223: 496-498.
- Ji C, Deng Q, Kaplowitz N (2004) Role of TNF- $\alpha$  in ethanol-induced hyperhomo- cysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology*. 40: 442-451.
- Joung YH, Jeon JH, Choi KH, Kim HS, Joung H (1996) Transformation of potato leafroll virus coat protein gene into potato. *Kor J Plant tiss cult* 23:77-81.
- Kim, D. J., J. H. Huh, Y. Y. Yang, C. M. Kang, I. H. Lee, C. G. Hyun, S. K. Hong, and J. W. Suh(2003), Accumulation of S-Adenosyl-L- methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *J. Bacteriol.*, 185: 592-60
- Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nikolov ZL (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog* 14: 149-155.
- Lamblin F, Saladin G, Dehorter B, Cronier D, Grenier E, Lacoux J, Bruyant P, Laine E, Chabbert B, Girault F, Monties B, Morvan C, David H, David A. (2001) Overexpression of a heterologous sam gene encoding

- S-adenosylmethionine synthetase in flax (*Linum usitatissimum*) cells: Consequences on methylation of lignin precursors and pectins. *Physiol Plant*. 112:223-232.
- Lieber CS (2002) S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am J Clin Nutr* 76: 1183-1187.
- Loehrer FM, Angst CP, Haefeli WE, Jordan PP, Ritz R, Fowler B (1996) Low whole-blood S-adenosylmethionine and correlation between 5-methyltetrahydro-folate and homocysteine in coronary artery disease *Thromb Vasc Biol* 16: 727-33.
- Lu, S. C.(2000), S-adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 391-39.
- Mehta RA, Cassol T, Li N, Ali N, Handa AK, Matoo AK (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotech* 20: 613-618.
- Meyer R (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10: 391-399.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Osman E, Owen JS, Burroughs AK (1993) S-adenosyl-L-methionine-a new therapeutic agent in liver disease?. *Aliment Pharmacol Ther* 7: 21-8.
- Promega (1998) Screening for genetically modified organisms in food using promega's Wizard Resin. *Pomega Note* 73: 23-25.
- Ross H (1958) Virus resistance of the potato. *European Potato J.* 1:1-19.
- Salmaggi P, Bressa GM, Nicchia G, Coniglio M, La Greca P, Le Grazie C (1993) Double-blind, placebo-controlled study of S-adenosyl-L-methionine in depressed postmenopausal women. *Psychother Psychosom* 59:34-40.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *PNAS* 74: 5463-5467.
- Sheerman S, Bevan MW (1988) A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell*

- Rep 7: 13-16.
- Shen B, Li C, Tarczynski MC. (2002) High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant J.* 29: 371-380.
- Stickel F, Hoehn B, Schuppan D, Seitz HK (2003) Review article: Nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 18: 357-373
- Stickel F, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D (2003) Alcoholic liver disease-established treatment and new therapeutic approaches. *J. Gastroenterol.* 41: 333-42.
- Stiekema WJ, Heidekamp F, Louwarse JD, Verhoeven HA, Dijkhuis P (1988) Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Rep* 7: 47-50.
- Teresa MF, Julapark C, Tanksley SD (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* 13:2 07-209.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology *Trends Biotechnol* 21: 570-578.
- Visser RGF, Jacobsen E, Hesseling-Meinders A, Schans MJ, Witholt B, Feenstra WJ (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Mol Biol* 12: 329-337.
- Yuom JW, Jeon JH, Jung JY, Lee BC, Kang WJ, Kim MS, Kim CJ, Joung H, Kim HS (2002) Introduction of VP6 gene into potato plant by *Agrobacterium*-mediated transformation and analysis of VP6 expression in transgenic potatoes. *Korean J Plant Biotechnology* 29: 93-98.
- Wi SJ, Kim WT, Park KY. (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.* 25: 1111-1121.

서효원, 이정윤, 김승열, 조현묵 (2002). 감자특이 internal control DNA 증폭용 primer와 이를 이용한 유전자변형감자의 경쟁적 이중 PCR 검정. 식물생명공학 회지 29(4): 235-240.