

발간등록번호

11-1543000-000753-01

**Gene targeting 기술을 활용한 고 함량 tryptophan 생산  
고품질 벼 개발**

(Development of High Quality Rice Variety Producing  
High Content Tryptophan by Gene Targeting Technology)

충북대학교

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Gene targeting 기술을 활용한 고 함량 tryptophan 생산 고품질 벼 개발”  
과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 11 월 9 일

주관연구기관명 : 충북대학교

주관연구책임자 : 조 용 구

세부연구책임자 : 조 용 구

연 구 원 : 이 혜 정

연 구 원 : Franz Nogoy

연 구 원 : 유 달 아, 김 미 선

연 구 원 : Marjohn Nino

연 구 원 : 지 무 근, 장 대 원

연 구 원 : 변 상 옥

협동연구기관명 : (주)클론

협동연구책임자 : 정 유 진

연 구 원 : 강 권 규, 이 인 혜

연 구 원 : 한 경 희, 이 계 동

연 구 원 : 정 여 진

# 요 약 문

## I. 제 목

Gene targeting 기술을 활용한 고 함량 tryptophan 생산 고품질 벼 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

Gene targeting 기술을 활용한 고 함량 tryptophan 생산 고품질 벼 개발

- 5MT 저항성 계통과 ZFN 기술 이용 GBSS1 유전자 개량을 통한 고품질 벼의 실용화
- Anthranilate synthase 유전자의 gene targeting 및 분자유종에 의한 고품질 벼 개발

### 2. 연구개발의 필요성

- 가. 우리 쌀의 경쟁력을 높이기 위해 벼 품질강화를 위한 기초연구 및 우수 품종 개발 필요성 증대
- 나. Tryptophan은 필수 아미노산 중 하나로 곡류에는 매우 낮은 수치로 존재하기 때문에 고품량 트립토판 생산 벼의 개발이 필요
- 다. ZFN과 Gene targeting 기술은 기본적으로 특정 염기서열에 특이적으로 결합하여 결합된 부위를 절단시켜 DSB(double-stranded break)를 유도시킨 후 상동재조합 (homologous recombination)을 도출시키는 기술
- 라. Tryptophan 대사경로상의 특정 유전자만을 한정하여 knock-out 시켜 돌연변이체를 작성할 수 있는 zinc finger nuclease (ZFN) 방법과 같은 gene targeting 방법을 사용하면 효과적으로 knock-out mutant를 작성할 수 있고 이를 이용하여 wild type과 형태적, 생리적 및 생화학적으로 비교분석함으로써 보다 효율적으로 유전자의 발현과 기능을 분석하여 대사경로 네트워크를 밝힐 수 있을 것으로 생각
- 마. 유전자의 과발현과 발현억제 기술을 이용하여 효율적인 목표형질의 개량 및 고품질 벼 품종의 실용화 가능

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 1. 5MT 저항성 계통과 ZFN 기술 이용 GBSS1 유전자 개량을 통한 고품질 벼의 실용화

### 가. 5MT 저항성 호모계통의 대사체 및 전사체 연구

- (1) RT-PCR에 의한 tryptophan 생합성회로상의 유전자의 발현분석
- (2) 5MT 저항성 계통의 안정화 및 농업적 특성 분석
- (3) 고정계통의 metabolomic 발현분석
- (4) Anthranilate synthase (AS) 활성 분석
- (5) 유리 아미노산 함량 분석

### 나. ZFN 기술이용 GBSS1 유전자 개량

- (1) GBSS1 유전자 이용 ZFN 벡터구축 (target site의 design 및 Yeast strain 구축)
- (2) Yeast nuclease assay를 통한 vector 선발
- (3) ZFN::GBSS1 벡터이용 gene targeting을 위한 형질전환 벼 육성 및 후대분석

## 2. Anthranilate synthase 유전자의 gene targeting 및 분자육종에 의한 고품질 벼 개발

### 가. AS 유전자 (S126F/L530D double mutations)의 gene targeting 및 분자육종

- (1) S126F/L530D double mutations된 게놈영역 제작 및 GT 벡터 구축, 형질전환체 육성, homologous recombination된 식물체 선발, 후대육성
- (2) 형질전환체의 특성분석
- (3) AS 유전자 항체를 이용한 western blotting
- (4) AS 유전자 영역에 도입유전자의 HR 확인 (flanking region증폭 및 염기서열)
- (5) 도입유전자의 발현분석

## IV. 연구개발결과

### 1. 5MT 저항성 계통과 ZFN 기술 이용 GBSS1 유전자 개량을 통한 고품질 벼의 실용화

#### 가. Tryptophan 생합성회로상의 유전자 발현분석

- (1) Tryptophan analog인 5-methyltryptophan (5MT) 저항성 벼 계통의 분자적 특성을 규명하기 위해 shikimate 생합성 대사경로상에 존재하는 14개 유전자들의 발현분석을 실시한 결과 14개의 유전자 중에서 anthranilate synthase, anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/ benzoyltransferase, phosphoribosyl anthranilate transferase, indole-3-glycerolphosphate synthase 유전자의 발현 시기가 빠르거나 발현량이 증가하였다.
- (2) 종자발육 단계별 유전자의 발현 수준을 살펴본 결과 Anthranilate synthase, Indole-3-glycerolphosphate synthase의 발현은 수정 후 초기에 높게 나타났으며 다른 생합성 유전자들은 유사한 발현 pattern을 보였다.

## 나. 5MT 저항성 돌연변이체의 microarray 분석

- (1) 5MT 저항성 돌연변이체의 전사수준에서 대조구와 어떤 유전자발현이 달라 배유내 아미노산의 축적을 달리하는지 여부를 검토하기 위해 5MT 저항성계통과 대조구에서 종자 발육단계를 총 5단계로 나누어 microarray 샘플을 구축하여 2반복으로 분석을 실시하였다.
- (2) 2번의 전처리 과정을 거친 filtered data의 probe 수는 11,655개였는데, 이 filtered data에서 10개의 샘플들 중 적어도 하나의 샘플에서 DEG로 판정된 probe의 수는 8,742개로 나타났다.
- (3) 얻어진 annotation 결과를 이용하여 발현 차이를 보이는 8,391 유전자가 벼 유전자에 annotated probe는 6,142개이었고, 애기장대 유전자에 상응하는 것은 5,645개로 나타났다. 이들 유전자들을 이용하여 Clustering 분석을 수행하였다.
- (4) Cluster C 영역 (down regulation group)에 속하는 339개 유전자중 cellular response to stress, oxygen and reactive oxygen species metabolic process, regulation of response to external stimulus, response to oxidative stress, cell development, carbohydrate metabolic process, response to inorganic substance, phenylpropanoid metabolic process, response to radiation, generation of precursor metabolites and energy 등의 생합성 관련 유전자 수는 76개로 나타났다.
- (5) D 영역(up regulation group)은 92개 유전자로 나타났다. 벼 유전자에 annotation된 애기장대 유전자 정보를 이용하여 야생형에 비해 돌연변이에서 특이적인 발현 패턴을 보이는 Cluster D 영역내 애기장대와 관련 있는 유전자의 수는 65개로 나타났으며, KEGG pathway에 4.6%로 나타났다.

## 다. 5MT 저항성 계통의 특성

- (1) 5MT 저항성 계통 선발
  - 벼에 EMS 처리에 의해 유도된 6개의 5MT 저항성 벼 개체를 500 uM 5-Methyl tryptophan이 포함된 1/2 MS 배지와 5-Methyl tryptophan이 포함되지 않은 배지에 각각 파종하여 강한 저항성을 보이는 벼 3 계통을 선발하여 각각 5MT-4, 5MT-5라 명명하였다.
- (2) 염기서열 분석
  - 5MT에 저항성을 보이는 계통들의 염기서열은 분석하여 트립토판 생합성에 중요한 역할을 하는 효소인 anthranilate synthase AS  $\alpha$  subunit 유전자의 변이여부를 확인하였다. 그 결과 5MT-2의 염기서열의 경우 변화가 없었으며, 5MT-4, 5 계통의 경우 124 bp 영역에서 Phe (F)이 Val(V)으로 바뀐 것을 확인할 수 있었다.
- (3) 생리적 특성
  - 선발된 2 개의 저항성 계통을 동안벼와 함께 anthranilate synthase (AS) 효소활성 분석을 실시한 결과 tryptophan의 농도가 증가할수록 동안벼에서 AS의 활성이 점점 감소하는 것에 비해 2 개의 저항성 계통들의 경우 모품종과 반대로 트립토판의 농도가 증가함에도 불구하고 지속적인 AS 활성 증가를 보였다.
  - 선발된 두 계통의 아미노산 함량을 분석한 결과 동안벼에 비해 5MT에 저항성을 보이는 두 계통의 총 아미노산 함량이 1.5 배 이상 증가한 것으로 나타났다. 19 개의

아미노산 중 asparagine (Asn), glutamine (Gln), glycine (Gly), valine (Val), lysine (Lys), tryptophan (Trp)이 저항성 계통에서 증가하였는데, 그 중 tryptophan 함량의 경우 동안벼에 비해 각각 23, 29배 증가하여 총 아미노산 함량 증가에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

- 동안벼와 5MT 저항성 계통의 viscosity를 측정한 결과 저항성 계통이 점도가 동안벼에 비해 약간 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 아밀로스 함량 분석 결과 5MT-4 계통의 경우 모품종인 동안벼에 비해 낮은 아밀로스 함량이 나타났고, 5MT-5의 경우 모품종과 비슷한 경향을 보였다.

#### (4) 농업형질 및 수량구성요소

- 동안벼 및 저항성 계통을 이용하여 2014년 농업형질을 조사한 결과는 Table 18과 같았다. 저항성 계통의 경우 개화일이 모품종에 비해 약 5일 정도 늦어졌다. 잎의 특성을 분석한 결과에서 잎의 길이가 모품종에 비해 증가하였으며, 5MT-4 계통의 경우 엽폭이 약간 감소하였다. 이삭의 길이가 동안벼에 비해 감소하는 경향을 보였고, 다른 벼의 특성에는 큰 차이를 보이지 않았다.

#### (5) 5MT 저항성 계통을 이용한 교배조합 육성

- 2012년 호품벼와의 교배조합에서 52 개, 삼광벼와의 교배조합에서 97 개의 F<sub>1</sub> 종자를 얻었고, 이를 2013년 포장에 전개하여 호품벼와의 교배조합에서 878 개, 삼광벼와의 교배조합에서 1,481 개의 F<sub>2</sub> 식물체를 증식하였고, 현재 유전분석을 위하여 교배 후대 F<sub>2</sub> 개체들 중에서 우수한 개체를 선발하여 F<sub>3</sub> 종자를 수확하였으며. 5MT 저항성 계통의 돌연변이 sequence 부위의 유전여부를 조사하고 5MT 저항성 여부를 분석한 다음, 아미노산 분석을 통해 우수한 교배계통을 선발하기 위하여 정밀분석을 실시 중에 있다 .

### 라. 전분대사 관련 유전자 발현제어 형질전환체 육성

- (1) Tryptophan 함량을 증가시키는 5MT 저항성 벼 계통의 미질 개선을 위하여 아밀로스 함량을 낮추면서 아밀로펙틴과 아밀로스의 물리적 조정이 개선된 변이체를 육성하여 품질이 우수한 5MT 저항성 고품질미 벼를 육성하고자 하였다.
- (2) 전분대사 중에서 배유 발달의 중, 후기에 많이 발현하는 amylose 합성을 유도하는 효소인 waxy (GBSS1) 유전자와 SSS1 유전자의 발현억제를 유도하기 위하여 35S promoter를 유전자의 앞 부위에 부착하여 RNA interference (RNAi)에 의하여 각 유전자의 발현억제를 유도함으로써 아밀로펙틴의 생산량을 증가시키고 고식미 발현을 위한 최적의 전분조성을 유도하기 위하여 재조합 RNAi 벡터를 작성하였다. 유전자의 발현억제를 위한 RNAi 운반체의 제작은 식물 유전자 운반체로서 HPT 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pCAMBIA1300 운반체에 Waxy 유전자와 SSS1 유전자를 이용하여 GUS linker DNA의 앞, 뒤에 상호 역방향으로 연결한 후 각각 pCAMW-Ri, pCAMS-Ri라 명명하였다. 현재 선발된 5MT 저항성 계통들을 이용하여 형질전환을 수행하여 일부 형질전환 개체를 얻어 유전자 도입여부를 확인 중에 있다.
- (3) 전분대사 중에서 amylose 합성에 관련된 주요 효소 유전자의 무발현 변이체와 함께 저발현 벼 계통을 육성하여 고식미도를 구성하는 낮은 아밀로스 함량의 전분조성을 유도하고자 Waxy 유전자와 SSS1 유전자를 이용하여 35S promoter에 의해 조절되고

HPT 유전자가 포함된 pCAMBIA1300 벡터에 각각의 유전자를 antisense 방향으로 각각 삽입하여 antisense 벡터를 구축하여 AS-GBSS, AS-SSS1으로 명명하였다. 현재 재조합 유전자를 *Agrobacterium* 방법을 이용한 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 형질전환을 진행하고 있으며, 일부 형질전환체를 확보하여 genomic DNA를 추출한 후 목표 유전자의 도입여부를 확인하고 있는 중이다.

#### 마. TALEN 및 ZFN 기술을 이용한 유전자 발현제어 형질전환체 육성

##### (1) TALEN 기술을 이용한 GBSS1 발현제어

- GBSS1 유전자의 효율적인 발현제어를 위하여 GBSS1 유전자의 구조분석 결과 첫 번째 Intron과 2번째 Exon 사이에서 transcription을 조절하여 유전자 발현에 변화를 줄 수 있을 것으로 생각되어 regulatory element가 있는 부위에 mutation을 주는 방식으로 발현의 정량적인 variation을 유도하고자 이 부분을 타겟으로 선정하였다.
- TALEN target site 탐색 후 binding site 디자인을 위하여 4개의 조합을 구축하였고, 합성된 TALENs 세트를 이용하여 TALEN::GBSS1 벡터 제작을 수행하였다.
- 디자인된 염기서열 합성과 TALENs 조합을 위해 기본 TALEN 스크리닝 벡터에 left half-site와 right half-site를 각각 붙이고 non homologous end-joining (NHEJ) frame을 제작하였고, GFP 활성으로 합성 여부를 확인하였다.
- 식물 형질전환용 운반체는 pTA7002를 모벡터로 사용하였고, 목표유전자의 발현을 검정하기 위하여 본 연구실에서 클로닝한 OsGBSS1 유전자를 CaMV 35S 프로모터에 연결하여 제작하였다.
- 각각의 TALEN::GBSS1 L1/R1, TALEN::GBSS1 L2/R2, TALEN::GBSS1 L3/R3, TALEN::GBSS1 L4/R4 clone으로부터 TALEN-형질전환체 육성하여 항생제 선발배지에서 선발을 진행하고 있는 중이다.

##### (2) ZFN 기술을 이용한 SSS4 유전자 ZFN-vector 작성

###### (가) SSS4 유전자 구조분석

- SSS4A 염기서열 내에 ZFN binding site를 찾기 위해 SSS4A의 exon sequence 만을 추출하여 분석한 결과 엑손 1영역에서 5'-CCCGCTTGCC-GTGAGTGCCT-3', 엑손 2 영역에서 5'-TGTGTGGTAG-GTACTGCCTT-3', 엑손 3영역에서 5'-ATTAACACAG-GTATGGAATG-3', 엑손 4영역에서 5'-ACATGGCTAG-GTATTAAATT-3'와 같이 총 4개의 엑손에서 ZFN binding이 가능한 영역이 존재함을 확인하였다.
- SSS4A 4 개의 엑손 영역에서 확인된 ZFN binding site 중 ZFN::SSS4A 벡터 구축용 target 영역선발을 위해 10 개의 다양한 binding site를 확보하였다. ZFN target site 탐색 후 binding site 디자인을 위하여 binding 활성이 높은 zinc finger nuclease를 이용하여 최종 3 개 또는 4 개의 세트가 5'과 3' 방향으로 각각 결합될 수 있도록 ZFN binding site를 조합하였다.
- 디자인된 염기서열 합성과 ZFNs 조합을 위해 기본 ZFN 스크리닝 벡터에 left half-site와 right half-site를 각각 붙이고 non homologous end-joining (NHEJ) frame을 제작하였고, GFP 활성으로 합성 여부를 확인하였다. 확인한 결과 reporter gene에 ZFN::SSS4A이 결합된 벡터의 활성은 control과 비교하여 오차 범위 내에서 결합과 활성이 양호한 것으로 확인되었다.

- 최종 완성된 ZFN vector는 nucleotide spacer 부분에 DNA cleaving-domain인 FokI enzyme을 결합하고 상보적으로 양 끝에 3개 혹은 4개의 ZFNs binding site를 결합하여 벼 게놈내에 target 유전자 SSS4A 4번째 엑손 영역에 binding 할 수 있게 디자인 하였다.

(나) ZFN 기술을 이용한 SSS4 유전자 ZFN-vector 작성

- 식물 형질전환용 운반체는 pPDG1 벡터와 pTA7002를 모벡터로 사용하였고, 목표유전자의 발현을 검정하기 위하여 본 연구실에서 클로닝한 OsSSS4A 유전자를 CaMV 35S 및 PDG1 프로모터에 연결하여 제작하였다.
- 벼에 형질전환을 위해 벼 발아초기 종자를 이용한 단기형질전환 방법을 이용하였다. 벼 형질전환방법을 통해 재분화 식물체를 대상으로 genomic DNA를 분리한 후 도입유전자 pGDI-pinII Bar vector에서 Bar 유전자 및 pTA7002 vector에서 hygromycin (HPT) 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. pTA7002 vector를 사용한 경우 30개의 형질전환체를 확보하여 PCR을 수행한 결과 그 중 26개의 재분화 식물체에서 HPT 유전자가 검출되었다.

## 2. Anthranilate synthase 유전자의 gene targeting 및 분자육종에 의한 고품질 벼 개발

본 연구는 식물체내 tryptophan biosynthesis pathway의 feedback inhibition 작용에 의하여 tryptophan의 생합성을 조절하는 anthranilate synthase 유전자의 ORF상에 점돌연변이가 발생한 특정 변이체를 육성하고 이를 이용한 생합성과정의 유전자 발현조절로 고품질 tryptophan 생합성 벼를 개발하고자한다.

가. Tryptophan analog 인 5-methyltryptophan 저항성계통 #2와 #4 계통을 5MT 50ppm MS 배지에서 뿌리 및 shoot 생육은 정상적이었으며, 대조구에서는 생육이 되지 않았다. 이런 결과는 5-methyltryptophan이 포함된 배지에서 생육할 수 있는 것은 세포내 Trp 생합성계에 이상이 생겨 feedback inhibition 작용을 하지 못하도록 변이가 유도되어 결국 세포내에 tryptophan 함량이 대조구에 비해 8배 이상 높게 나타났다.

나. 5MT 저항성 계통은 Trp 생합성계의 제어는 tryptophan 합성계 중에서 작용하는 key enzyme인 anthranilate synthase AS $\alpha$  subunit 유전자는 전장은 2248bp이며, 1824bp의 ORF와 35bp 크기의 5UTR, 349bp의 3UTR으로 이루어졌다. 5MT 저항성 계통에서는 2개의 점돌연변이가 TCC(S), CTT(L)로 나타났다.

다. Trp 생합성회로의 key enzyme인 Anthranilate synthase (AS) 관련된 유전자는 OsASA1과 OsASA2로 알려져 있다 (NCBI database). 이들 유전자는 3번 염색체상에 위치하고 있으며, OsASA1은 short arm에 존재하며 11개의 엑손으로 구성되어 있으며, 총 1,831bp의 ORF로 이루어졌다. 또한 OsASA2 유전자는 3번 염색체 long arm에 위치하며, 10개의 엑손영역과 9개의 인트론 영역으로 1,821bp의 ORF로 이루어져 있다.

라. 식물 형질전환용 운반체는 pPDG1 벡터를 모벡터로 사용하였고, 목표유전자의 발현을 검



정하기 위하여 본 연구실에서 클로닝한 OsASA2 (anthranilate synthase) 유전자를 CaMV 35S 및 PDG1 프로모터에 연결하여 제작하였다. 형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 Bar 유전자를 이용하였다.

마. 형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 OsASA2 유전자의 copy 수를 알아보기 위해, 재 분화된 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도입유전자 Bar 및 OsASA2 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 조사한 20개의 재분화 식물체에서 Bar 및 OsASA2 유전자가 검출되었다.

바. TaqMan PCR에 의한 Single copy도입 형질전환체 선발하기 위하여 OsASA2 유전자 말단에 있는 nos terminator 영역에 특이적 배열을 labeling한 probe primer를 이용 PCR 분석한 결과 20개 형질전환 T0 개체 중에서 16개 식물체가 도입유전자가 single copy로 삽입되어 있었다. OsASA2 유전자가 도입된 형질전환체의 발현량 분석을 위해 RT-PCR 및 qRT-PCR법을 수행한 결과 형질전환체에서 도입 유전자인 OsASA2 발현이 모품종에 비해 높게 나타났다.

사. 형질전환 계통들 중 single copy로 도입되어 발현량이 높은 #5, #20을 선발하여 유리 아미노산을 분석한 결과 형질전환체 #5 및 #20의 유리아미노산 총량은 대조구에 비해 약 1.8배로 높게 나타났다. 특히 tryptophan, phenylalanine, threonine, serine 및 valine 함량에서 대조구에 비해 6.7, 4.6, 3.6, 2.8 및 2.0배가 높게 나타났다.

아. T<sub>1</sub>식물체(분리세대)에서 single copy이면서 호모개체가 총 20개의 식물체로부터 TaqMan PCR 결과 4개 식물체를 선발하였고, 이들 식물체를 이용하여 LB와 RB 인접서열의 PCR 분석한 결과 도입 유전자가 intergenic으로 확인되었다.

자. 형질전환체의 농업 형질조사는 출수 일수, 간장, 수장, 분얼수, 임실율, 임실/식물체, 종자 건물중/30식물체, 화분임성, 1000립중 등을 측정한 결과 출수 일수는 100일 정도, 간장은 78-81cm, 수장은 18-20cm 등 대조 품종인 동안벼와 MOCK등의 결과와 거의 유사한 결과를 얻었다.

차. OASA2 유전자가 도입된 형질전환체는 Trp생합성 경로 상류에 위치한 chorismate 경로에 관련된 효소들의 기본 유전자 중에서 특히 대사 제어에 중요하다고 추정된 DAHP합성 효소 4종류, chorismate kinase 3종류, EPSP합성 효소 1종류에 대해서 단백질 합성을 하고 효소 등 기본 기능 해석을 실시한 결과 chorismate kinase는, 방향족 아미노산 및 관련 화합물에서 형질전환체들에서 발현량이 월등히 높게 나타났다.

카. 형질전환체에 대한 의한 transcript의 발현양상을 규명하기 위해 대조구인 동진벼와 형질전환계통 DG-T1과 DG-T2을 50 ppm 5MT가 함유된 MS 배지에서 3주간 배양한 식물체간 microarray 실험 결과 transcript 발현 양상의 차이가 형질전환체에 의한 genotype에 따른 발현 차이를 보였다.

타. Talen기법을 OsASA2 유전자를 가위손에 의해 자를 수 있는지에 대해 실험에서 T<sub>0</sub> 식물체를 대상으로 Talen 활성 부위 특이적으로 효소가 작용하여 유전자를 targeting 하는지 여부를 확인한 결과 몇몇 식물체에서 Talen 활성부위로부터 수 bp 정도 deletion된 변이체를 확보하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 신품종 개발, 지적재산권 출원 및 활용

- 가. 개발된 고품질 및 기술의 품종보호권 또는 특허권 확보
- 나. 고품량 필수아미노산 생산 벼 품종의 실용화를 위한 벼 품종 육성
- 다. 약간의 추가적인 벼 육종절차 후에는 고품질 벼의 등록 및 실용화 가능

### 2. 농업적 유용 기능 유전자의 활용

- 가. 유전자의 과발현과 발현억제 기술을 활용하여 목적 유전자의 발현 조절을 통해 효율적으로 목표 형질을 개량
- 나. 확보된 돌연변이체 및 형질전환체의 우수한 교잡육종용 교배모본으로 활용

# SUMMARY

## I . Project title

Development of High Quality Rice Variety Producing High Content Tryptophan by Gene Targeting Technology

## II. Objective and Importance of the Project

### 1. Objective of the project

Development of High Quality Rice Variety Producing High Content Tryptophan by Gene Targeting Technology

- Practical application of high-quality rice through the 5MT resistant rice and GBSS1 gene improvement by ZFN technology
- High quality rice development by gene targeting and molecular breeding of Anthranilate synthase gene

### 2. Importance of the project

- A. Through this research, superior and highly competitive rice variety will arise for commercial use
- B. Since tryptophan is one of the essential amino acids which the human body cannot produce, its presence in rice will enable to sustain our body's needs
- C. Zinc finger nucleases (ZFNs) are a class of engineered DNA-binding proteins that facilitate genome editing by creating a double-stranded break in DNA at a user-specified location. A double-stranded break is important for site-specific mutagenesis in that it stimulates the cell's natural DNA-repair processes, either by homologous recombination or non-homologous end joining (NHEJ).
- D. ZFN is an effective method to create knock-out mutant because it is possible to target specific gene in the tryptophan pathway.
- E. New rice varieties will be developed through the use of rice transgenic lines with useful agronomic functional genes

### III. Main Scope and Contents of the Project

#### 1. Improvement of high tryptophan rice by targetting the SSS4A gene through ZFN

##### A. Metabolites and transcripts analysis of 5MT resistance lines

- (1) Expression analysis of gene related with tryptophan pathway using RT-PCR
- (2) Evaluation of agronomic characteristics and yield performance of 5MT resistant lines
- (3) Metabolomic analysis of 5MT resistant lines
- (4) Anthranilate synthase (AS) enzyme activity analysis
- (5) Free amino acid analysis

##### B. Genetic improvement using ZFN technology

- (1) ZFN vector construction (Selection of target site and yeast strain construction)
- (2) Confirmation of ZFN activity through yeast nuclease assay
- (3) Development of transgenic lines using *Agrobacterium*-mediated transformation

#### 2. High quality rice development by gene targeting and molecular breeding of high tryptophan rice

### IV. Results of the Project

#### 1. Improvement of high tryptophan rice by targeting the SSS4A gene through ZFN

##### A. Gene expression analysis on the Tryptophan biosynthesis pathway

- (1) To investigate the molecular characteristics of 5-methyltryptophan (5MT) resistant rice lines, the expression profiles of 14 genes present in the shikimate biosynthetic metabolic pathway were examined. Of these, the expression levels of anthranilate synthase, anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, indole-3-glycerol phosphate synthase, and phosphoribosyl anthranilate transferase were relatively higher than the other genes examined.
- (2) The gene expression level at seed development stage of anthranilate synthase, Indole-3-glycerolphosphate synthase initially appeared higher after pollination, other biosynthetic genes showed a similar expression pattern.

## B. Microarray analysis of 5MT-resistant mutants

- (1) To find the cause of differential amino acid accumulation, the expression profiles between control group and 5MT-resistant mutants were examined using microarray analysis. Each RNA was extracted from seed and seedling samples which were divided into five developmental stage.
- (2) Probe number of filtered data passing through the two pre-treatment process was 11,655 pieces. The number of probe that has been determined from at least one sample and DEG out of 10 samples in the filtered data is 8,742 pieces were found.
- (3) Results based on gene annotation showed that out of 8,391 genes 6,142 genes has differential expression and 5,645 genes were found to correspond to the genes of *Arabidopsis*. Clustering analysis was performed using these genes.
- (4) Seventy-six out of 339 genes are biosynthesis-related genes (cellular response to stress, oxygen and reactive oxygen species metabolic process, regulation of response to external stimulus, response to oxidative stress, cell development, carbohydrate metabolic process, response to inorganic substance, phenylpropanoid metabolic process, response to radiation, generation of precursor metabolites and energy) belonging to Cluster C area (down regulation group).
- (5) Based on *Arabidopsis* gene information, among the 92 genes in Cluster D (up regulation group) 65 genes revealed specific expression patterns in mutant as compared to wild type.

## C. Characteristics of 5MT resistant lines

- (1) Selection of 5MT resistant line
  - Six 5MT resistant lines induced by EMS mutagenesis were screened in 500  $\mu$ M 5-Methyl tryptophan medium. Of these, three strong resistant lines were selected and named as 5MT-2, 5MT-4 and 5MT-5.
- (2) Sequence analysis
  - To determine whether the resistance to 5MT was a result of changes in anthranilate synthase AS  $\alpha$  subunit, we sequenced the anthranilate synthase AS  $\alpha$  subunit in 5MT resistant lines. As a result, 5MT-2 showed no difference in sequence while in 5MT-4 and 5MT-5, at 124 bp region, change of Phe (F) to Val (V) was confirmed.
- (3) Physiological property
  - Anthranilate enzyme activity showed a continuous increase of AS activity among the 5MT resistant lines given that these lines have a high concentration of tryptophan compared to its wildtype, Donganbyeo.
  - The total amino acid content of the two resistant lines showed a 1.5-fold increase compared to wildtype. Particularly, asparagine (Asn), glutamine (Gln), glycine (Gly), valine (Val), lysine (Lys) and tryptophan (Trp) were the amino acids that

showed higher amount among others. The 23 and 29-fold increase in tryptophan content in each mutant is believed to have affected the rise in total amino acid content.

- (4) Evaluation of agronomic characteristics and yield performance of 5MT resistant lines
  - To determine the agronomic characteristics of 5MT resistant lines, all developed lines were planted in the field arranged in an incomplete block design. 5MT resistant lines flowered five days later than wild type. Results of analysis of the characteristics of the leaves, the length of the leaves is increased compared to Dongan. There was no significant difference in the properties of other rice.
- (5) Conventional breeding between 5MT resistant lines and Korean cultivars
  - We obtained 52 F<sub>1</sub> seeds between Hopum and three 5MT resistant lines and 97 F<sub>1</sub> seeds from Samgwang and three 5MT resistant lines in 2012 and then we generated 878 F<sub>2</sub> seed with Hopum and 1,481 F<sub>2</sub> seed with Samgwang in 2013. Elite lines were selected within F<sub>2</sub> population and harvested F<sub>3</sub> seeds. We confirmed point mutation sites in the selected crossing lines.

#### **D. Development of transgenic plants by controlling gene expression related with starch metabolism**

- (1) In order to improve the rice grain quality with high tryptophan content, we generated transgenic plants by controlling the expression of genes related to starch synthesis pathway.
- (2) In vector construction of RNAi technology, GUS gene (AJ298139) was used as a spacer for dsRNA formation and was inserted between the sense SSSI fragment and the antisense SSSI fragment or the sense GBSSI fragment and the antisense GBSSI fragment, respectively. The DNA fragment was ligated into pCAMBIA1300 vector. The recombinant vector carrying RNAi-SSSI or RNAi-GBSSI was constructed under the control of CaMV 35S promoter and NOS terminator. PCR and RT-PCR experiments are on going to confirm the transgenic plants.

#### **E. Generation of transgenic plants using TALEN and ZFN technology**

- (1) Control of GBSS1 expression using ZFN technology
  - As a result of gene structural analysis for efficient control of GBSS1 gene expression, we selected a target region to induce quantitative variation of the expression that gives a change in a specific site where there is a regulatory element because it is possible to give a change in gene expression by regulation of transcription at the first intron and second exon sites.
  - We constructed four pairs of TALEN targetting different regulatory sites of GBSS1 gene and designed the plant transformation vector (TALEN::GBSS1) from the synthesized TALEN pairs.

- The left and right arms of each TALEN pair were in an individual basic screening vector. GFP activity was used to confirm its action.
  - For plant transformation, pTA7002 is used as a final vector with hygromycin phosphotransferase gene (HPT) under the control of 35S promoter to enable hygromycin-based plant selection.
  - We are selecting transgenic plants in the antibiotic selection medium after *Agrobacterium*-mediated transformation to carry out each of TALEN::GBSS1 L1/R1, TALEN::GBSS1 L2/R2, TALEN::GBSS1 L3/R3, TALEN::GBSS L4/R4.
- (2) ZFN::SSS4 vector construction using ZFN technology
- A) SSS4 gene structure analysis
- After analyzing the SSS4 sequence, four ZFN binding sites were identified. They are the following, 5'-CCCGCTTGCC-GTGAGTGCCT-3' in the first exon, 5'-TGTG TGGTAG-GTACTGCCTT-3' in the second exon, 5'-ATTAACACAG-GTATGGAA TG-3' in the third exon and 5'-ACATGGCTAG-GTATTAAATT-3' in the fourth exon.
  - Ten various binding sites in the four ZFN target area were selected for the construction of ZFN::SSS4A vector. ZFN binding sites were combined into three or four set combination and were coupled in 5' and 3' direction by using the high binding activity of zinc finger nuclease.
  - The left and right arms of each ZFN pair were in an individual basic screening vector. To confirm the validity and activity of each arm, GFP activity along with the reporter gene showed a positive binding activity.
  - The final ZFN vector was designed to enable the binding to SSS4A fourth exon region with nucleotide spacer combined with FokI enzyme (DNA cleaving-domain).
- B) Vector construction and rice transformation
- For plant transformation, we used the pPDG1 vector (Seoul National University) and pTA7002 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) as a final vector. The plant transformation vector carrying the ZFN-designed SSS4A is under the control of CaMV 35S and PDG1 promoters.
  - The ZFN construct was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and then introduced into rice using *Agrobacterium*-mediated transformation method. We selected 26 transgenic plants from 30 regenerated plants according to the PCR result with HPT primer.

## 2. Development of High Quality Rice by Gene Targeting and Molecular Breeding of Anthranilate synthase Gene

In this study, we developed specific variants having point mutation in the ORF of

anthranilate synthase gene which regulates the biosynthesis of tryptophan by feedback inhibition in plants and we also generate new rice variety with high tryptophan content by regulation of genes related to tryptophan biosynthetic process.

- A. 5-methyltryptophan (5MT) is a tryptophan analog added in MS medium to enable screening of rice mutants resistant to 5MT. Roots and shoot growth of #2 and #4 in MS medium with 50ppm 5-methyltryptophan is normal but wild type did not grow in the same medium. This result shows that 5MT resistant lines can be grown in medium with 5-methyltryptophan because the mutant lines have an induced mutations that avoid the feedback inhibition effect which also occurs abnormal in intracellular tryptophan biosynthesis, eventually the tryptophan content in cells is eight times or more higher compared to the wild type.
- B. Anthranilate Synthase AS<sub>a</sub> subunit gene, which is a key enzyme that acts in tryptophan synthesis system has a length of 1,824bp in ORF, 35bp in 5'UTR and 349bp in 3'UTR. The 5MT resistant lines have two point mutations, TCC (S) and CTT (L).
- C. Anthranilate synthase (AS) related to Trp biosynthesis is known as OsASA1 and OsASA2. These genes are located on chromosome 3, OsASA1 is located in short arm and has 11 exons and it has 1,831bp long ORF. While OsASA2 gene is located in chromosome 3 long arm with 10 exon regions and nine intron regions, with a length of 1,821bp ORF.
- D. For plant transformation, pPDG1 vector is used as a final vector, OsASA2 (anthranilate synthase) gene expression was controlled by the CaMV 35S promoter and PDG1 promoter. For selection of transformed callus and plants, Bar gene was used under the control of CaMV 35S promoter.
- E. To determine the copy number of OsASA2 genes from regenerated plants, we conducted PCR analysis using Bar primers and OsASA2 gene-specific amplification primer sets with the genomic DNA from regenerated leaves as a template. Bar and OsASA2 gene has been detected from 20 regenerated plants.
- F. To select single copy genes in transformed plants, using a probe primer labeling a specific sequence in the nos terminator region of the gene OsASA2 by TaqMan PCR, 16 transgenic plants out of 20 T<sub>0</sub> plants contain an inserted single copy gene. Moreover, OsASA2 gene expression in the transgenic plants is higher than wild type.
- G. Free amino acid contents of transgenic #5 and #20 which have a single copy gene have 1.8 times higher contents than wild type. Tryptophan, phenylalanine, threonine, serine and valine with 6.7, 4.6, 3.6, 2.8 and 2.0 times higher content than wild type contributed to the higher total free amino acid content.
- H. We generated a total of 20 lines of OsASA2 transgenic plants and selected four



homozygous single copy plants using Taqman PCR. We found the intergenic lines from sequencing analysis of LB and RB flanking regions.

- I. The agronomic characters of transgenic plants (DG-T1 and DG-T2) were almost same with wild type and mock treated plants.
- J. To investigate the differential gene expression between wild type and transgenic plants (DG-T1 and DG-T2), microarray analysis was performed. Three-week-old plants grown in with and without 5MT were used as RNA source. The microarray results showed the differential expression profile according to each genotype.
- K. The TALEN technique was carried out targetting the OsASA2 gene in T<sub>0</sub> plants. As a result, some T<sub>0</sub> plants showed deleted region from the target active site.

## **V. Proposal for Application**

### **1. Development and practical use of new rice mutant varieties**

- A. Acquisition of variety protection right with useful rice mutant lines
- B. Successive development of new rice varieties using useful rice transgenic lines

### **2. Practical application of useful agronomic functional genes**

- A. Application of functional genes using gene editing technology such as overexpression, RNAi, TALEN and ZFN
- B. Parent source for cross breeding using rice mutant genetic resources

# CONTENTS

Chapter 1. Outline of the Project .....	19
Chapter 2. Status of the R&D Related with This Project .....	23
1. Status of the domestic R&D .....	23
2. Status of the overseas R&D .....	23
3. Compare the current state of the domestic and outside of research .....	24
Chapter 3. Contents and Results of Research .....	25
1. Improvement of high tryptophan rice by targeting the SSS4A gene through ZFN .....	25
1-1. Gene expression analysis on the Tryptophan biosynthesis pathway .....	25
1-2. Microarray analysis of 5MT-resistant mutants .....	27
1-3. Characteristics of 5MT resistant lines .....	33
1-4. Development of transgenic plants by controlling gene expression related with starch metabolism .....	50
1-5. Generation of transgenic plants using TALEN and ZFN technology .....	52
2. High quality rice development by gene targeting and molecular breeding of high tryptophan rice .....	61
Chapter 4. Achievement of Research Goals and Contribution .....	91
Chapter 5. R & D results and performance utilization plan .....	92
Chapter 6. International Science and Technology Information .....	93
Chapter 7. Current status of research facilities and equipment .....	93
Chapter 8. References .....	94

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	19
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	23
제 1 절.	국내 연구 현황 .....	23
제 2 절.	국외 연구 현황 .....	23
제 3 절.	국내·외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야 .....	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	25
제1절(1세부)	5MT 저항성 계통과 GBSS1 유전자 gene targeting을 통한 고품질 벼의 실용화 .....	25
1.	Tryptophan 생합성회로상의 유전자 발현분석 .....	25
2.	5MT 저항성 돌연변이체의 microarray 분석 .....	27
3.	5MT 저항성 계통의 특성 .....	33
가.	5MT 저항성 계통 선발 .....	33
나.	농업형질과 수량 및 수량구성요소 .....	33
다.	식미도 및 관련 형질조사 .....	35
라.	5MT 저항성 계통의 유전적, 생리적 특성 .....	38
마.	5MT 저항성 계통을 이용한 교배조합 육성 .....	45
4.	전분대사 관련 유전자 발현제어 형질전환체 육성 .....	50
가.	RNAi 및 Antisense 기술을 이용한 발현제어 형질전환체 육성 .....	50
나.	전분대사 관련 유전자 과발현 형질전환체 육성 .....	51
5.	TALEN 및 ZFN 기술을 이용한 유전자 발현제어 형질전환체 육성 .....	52
가.	TALEN 기술을 이용한 GBSS1 발현제어 .....	52
나.	ZFN 기술을 이용한 SSS4 유전자 ZFN-vector 작성 .....	55
제2절(협동)	Anthranilate synthase 유전자의 gene targeting 및 분자유종에 의한 고품질 벼 개발 .....	61
1.	5-methyltryptophan 저항성 벼 계통 육성 .....	61
2.	AS1 및 AS2 유전자 분리 및 특성 .....	62
3.	AS1 및 AS2 유전자의 벼 게놈내 위치 확인 및 유전자 특성분석 .....	63
4.	5MT 돌연변이계통으로부터 ASA2 유전자 구조분석 .....	64

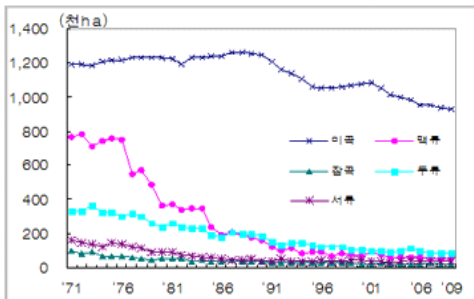
5. OsASA2 유전자 (S126F/L530D double mutations) 과발현용 Ti-plasmid 벡터구축 .....	65
6. OsASA2 유전자 (S126F/L530D double mutations) 도입 형질전환체 육성 .....	66
7. PCR법에 의한 도입유전자 확인 .....	68
8. TaqMan PCR에 의한 Single copy 도입 형질전환체 선발 .....	68
9. OsASA2 유전자가 도입 형질전환체의 발현량분석 .....	69
10. OsASA2 유전자 과 발현 형질전환체의 아미노산 분석 .....	70
11. 형질전환체 후대에서 호모계통육성 및 특성분석 .....	71
12. 선발한 single (S126F) double(S126F/L530D) 변이유전자 도입 형질전환체의 후대분석 .....	72
13. 형질전환 후대에서 아미노산 분석 .....	73
14. 형질전환 후대에서 도입유전자 확인 및 유전자 발현 해석 .....	74
15. 형질전환 후대에서 농업형질분석 .....	75
16. ASA유전자 도입 형질전환체를 이용한 Tryptophan 생합성계 제어 해석 .....	76
17. ASA유전자 도입 형질전환체를 이용한 2차대사산물 합성계 유전자들의 해석 .....	78
18. Microarray을 통한 형질전환체의 high-throughput screening .....	78
19. Homologus recombination을 위한 벡터구축 .....	84
20. Gene targeting을 위한 Talen 기술, homologous recombinant 기술 연구 .....	88
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	91
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	92
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	93
제 7 장 연구시설·장비 현황 .....	93
제 8 장 참고문헌 .....	94

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

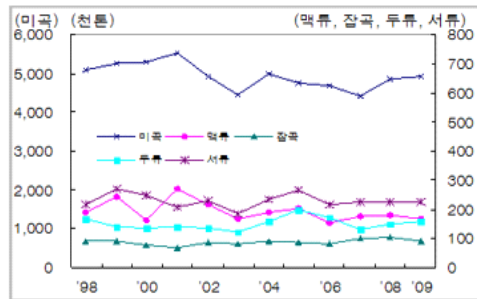
## (1) 연구개발의 필요성

- 쌀은 우리나라의 주식일 뿐만 아니라 세계 인구 절반의 주식이며, 2008년 기준으로 연간 국내 쌀생산액은 9조 3천억원, 부가가치액은 8조 888억원에 이르고, 전체 농가의 69%(827천호), 농지의 51%(892천ha)가 참여하는 단일 품목 중 최대 규모의 작물로서 막대한 경제적·산업적 가치를 가지고 있다.
- 2007년 우리나라 전체곡물의 자급율은 27.2%, 식량자급율은 51.6%이며, 쌀자급율은 95.8%로 쌀을 제외한 곡물자급율은 2.6%(2004년)에 불과하여 기초식량 안보가 위협받고 있다. 농림수산물식품부는 2000년 중반까지 전체 곡물자급율은 28.8%~32.8%, 순수 식용곡물은 50.5~54.2%의 식량자급율 목표치를 정하였는데, 쌀자급율을 100% 유지하지 않고는 목표달성이 불가능하다.
- 최근 들어 국제정세의 불안정은 곡물가격의 급등과 식량대란이 현실화 될 수 있음을 암시하고 있으며, 그런 상황에서 국내 쌀 생산량이 부족하게 된다면, 곡물 가격의 폭등과 아울러 사회 경제적 측면에서 엄청난 대가를 치를 수밖에 없는 상황이 발생됨. 또한 가까운 장래에 남북한 통일 시대를 대비해서도 충분한 식량 자급이 절실히 필요함.
- 세계무역기구에 의한 쌀 관세화 협상 결과 관세화 유예 조건으로 2005년부터 단계적으로 수입물량을 증가하여 2014년에는 총소비량의 7.95%(408,700톤)을 의무적으로 수입해야 하고, 수입물량의 10%(2005년)부터 30%(2014년)를 시장에 방출하게 되어 우리 쌀 시장 및 쌀 산업에 미칠 파급효과에 대한 우려가 크다.
- 쌀의 세계 총생산량의 약 92%는 아시아 국가에서 생산되며, 소비도 대부분 아시아 사람들이 하고 있다. 최근 WTO/DDA 농업협상, FTA 등 개방 확대에 우리 쌀 산업이 위협을 받고 있는 실정으로 시장개방이 불가피한 만큼 외국쌀과 견주어 경쟁력을 갖춘 우리 쌀을 반드시 확보해야 하며 이를 위해 최고품질의 쌀 개발이 필요한 실정이다.
- 식량작물의 재배면적과 생산량을 살펴보면 연평균 재배면적 153.6백만ha, 조곡기준 629.5백만톤, 정곡기준 422.4백만톤 정도 생산되고 있음 (USDA/FAS).

〈 식량작물 면적 〉

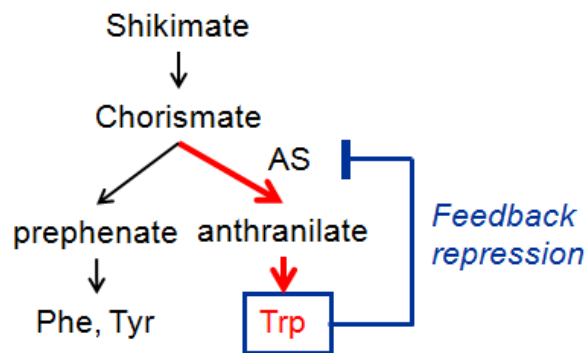


〈 식량작물 생산량 〉



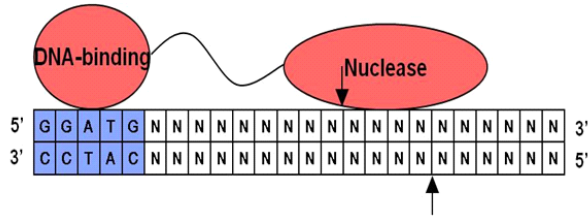
\* 자료 : 통계청, 「농작물생산조사」

- 라이신, 메치오닌, 트립토판과 같은 필수아미노산은 쌀과 같은 식품의 영양가 개선에 매우 중요하다. 그러나, 많은 작물에서 이들 필수아미노산 함량은 제한적이므로 고품질 쌀 품종의 육성을 위해서는 돌연변이체의 이용이나 생명공학기술의 활용이 매우 절실하다.
- 우리 쌀의 경쟁력을 높이기 위해 벼 품질강화를 위한 기초연구가 필요한데, 특히, 고품질미와 밀접한 관련이 있는 tryptophan 생합성에 관여하는 anthranilate synthase (AS) 효소의 feedback inhibition 기능 분석을 통하여 고품질 tryptophan 생산 벼의 개발이 절실히 필요하다.
- Tryptophan의 생합성은 anthranilate synthase (AS)  $\alpha$ -subunit이 tryptophan 생합성 회로의 최종 산물인 tryptophan에 의한 feedback inhibition의 표적이 되어 효소 활성을 조절한다. 따라서, AS  $\alpha$ -subunit의 feedback에 둔감한 돌연변이체를 만들면 필수아미노산인 tryptophan을 다량 축적하게 된다.



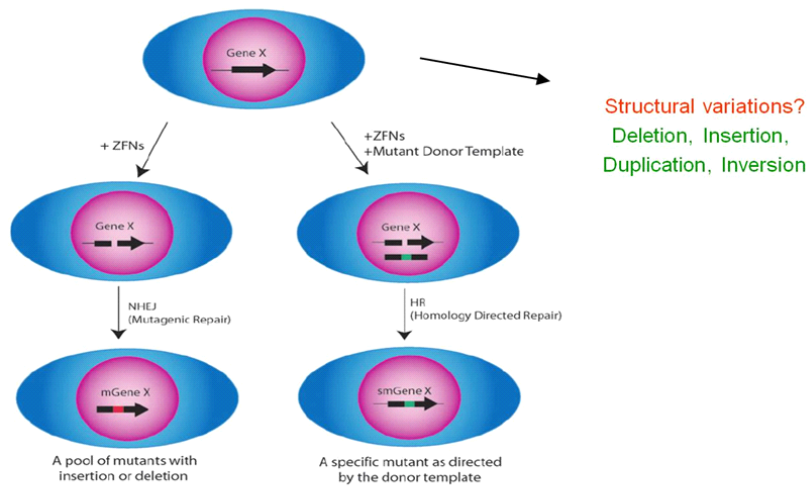
<Anthranilate syntase (AS) is a key enzyme of the tryptophan biosynthesis>

- Zinc finger nuclease (ZFN)를 이용한 Gene targeting 방법은 특정 염기서열에 부착하여 발현을 조절하고자 하는 유전자 단편을 삽입할 수 있도록 제작된 효소로써 유전자 전달분야에서 매우 혁신적인 기술이라고 할 수 있다. 2005년 6월 미국 캘리포니아에 위치하고 있는 Sangamo사의 연구진들은 Nature 저널에 interleukin 2 receptor  $\gamma$  (IL2R $\gamma$ ) 유전자 결함에 의해 유전병을 지닌 인간 세포를 ZFN 기술을 응용하여 유전자 적중법을 성공시켜 정상 세포로 유전자 수정 (gene correction)을 성공적으로 수행하였다 (Urnov et al. Nature 2005).
- ZFN 기술에서 필수요소인 FokI은 587 아미노산과 65.4 kDa의 분자량을 지닌 N-terminal DNA 결합도메인과 C-terminal에 위치한 non-specific DNA cleavage 도메인으로 이루어진 Type IIs 제한효소이다. 두 가지 도메인으로 이루어진 FokI 제한효소가 지니는 구조적인 특성과 생화학적인 활성으로 말미암아 DNA 결합도메인을 새로운 염기서열을 정확히 인식할 수 있도록 제작 한다면 이론적으로 모든 위치에서 유전자 적중을 도출할 수 있다.



<FokI restriction enzyme>

- 이 기술은 유전자 결함이 일어난 부분을 정상 염기서열로 치환하거나 삽입하고 세포내부의 endogenous promoter에 의해 domaination되기 때문에 정상 단백질이 생산되고 과량이나 소량이 아닌 정상수준으로 유전자 발현을 도출할 수 있다. 또한 정확한 유전자 편집기술을 통해 insertional mutagenesis, aberrant transcription, oncogene activation과 같은 유전자의 무작위 전달로 인해 초래될 수 있는 부작용을 줄여줄 수 있다.
- ZFN 기술은 기본적으로 특정 염기서열에 특이적으로 결합하여 결합된 부위를 절단시켜 DSB (double-stranded break)를 유도시킨 후 상동재조합 (homologous recombination)을 도출시키는 기술이다. 절단된 이후 정상 유전자 혹은 삽입하고자 하는 유전자를 절단부위에 상동재조합에 의하여 효율적으로 적중시킬 수 있다.
- 유전자가위 (ZFN) 기술은 세포 안에 존재하는 유전자를 대상으로 특정 위치만을 인식·절단함으로써 유전자를 교정 및 개량하는 새로운 방법으로, 시험관에서 DNA 단편을 조작하는 기존의 국한되는 유전공학 기술의 단점과 제약을 획기적으로 보완·극복하는 생명공학 신기술이다.



Cell. Mol. Life Sci. (2007) doi: 10.1007/s00018-007-7206-8

<ZFN 기술을 이용한 Gene targeting 방법>

## (2) 연구개발의 목적

- 기본적으로 세포의 genomic DNA와 유전자 전달체로부터 전달되는 exogenous DNA sequences 간의 상동재조합 (homologous recombination)에 의해서 주로 이루어지며, ① 전달하고자하는 유전자를 세포 본연의 유전자 통제 및 조절기능의 downstream에 삽입하여 외부유전자와 내부유전자를 동시에 발현시킬 수 있으며(knock-in), ② 염색체내에서 특정유전자의 일정염기서열을 제거하거나 인위적으로 결함을 주어 유전자 발현을 방해할 수도 있으며 (knock-out), ③ 결함 (mutation)이 발생한 특정유전자의 염기서열을 수정하여 치환해 줄 수 있다. 따라서 기존 방법과는 매우 차별화된 기술이다.
- 즉, Tryptophan 대사경로상의 특정 유전자만을 한정하여 knock-out 시켜 돌연변이체를 작성할 수 있는 zinc finger nuclease (ZFN) 방법과 같은 gene targeting 방법을 사용하면 효과적으로 knock-out mutant를 작성할 수 있고 이를 이용하여 wild type과 형태적, 생리적 및 생화학적으로 비교분석함으로써 보다 효율적으로 유전자의 발현과 기능을 분석하여 대사경로 네트워크를 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.
- 정확한 유전자 편집기술을 통해 유전자의 발현조절이 가능한 ZFN gene targeting을 이용하여 벼의 plastid에 anthranilate synthase (AS)  $\alpha$ -subunit의 발현을 조절하면 필수아미노산인 Tryptophan의 다량 생산이 가능하여 고함량 tryptophan 생산벼의 개발이 가능하다.
- 따라서 본 연구에서는 식물체내 tryptophan biosynthesis pathway의 feedback inhibition 작용에 의하여 tryptophan의 생합성을 조절하는 anthranilate synthase 유전자의 ORF상에 ZFN을 이용한 gene targeting 방법에 의하여 특정 변이체를 육성하고 이를 이용한 생합성 과정의 유전자 발현조절로 고함량 tryptophan 생합성 벼를 개발하여 실용화 하고자 한다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내 연구 현황

- 김진수 서울대 교수(화학부) 연구팀은 ZFN기술을 이용해 인간에서 에이즈 바이러스가 감염의 첫 단계로 세포 안으로 들어설 때에 그 관문이 되는 수용체인 인간 유전자 CCR5에 작동하는 ZFN을 만들어 CCR5를 제거 (knock-out)하는 방식으로 AIDS 치료제를 개발할 수 있다는 희망적 내용을 Genome Research에 2009, 2010년에 2편의 논문을 발표하였다. 30억 염기쌍 중에서 CCR5 유전자가 있는 자리를 정확히 찾아가 그 유전자 부위를 삭제함으로써 에이즈 감염 경로를 제거할 수 있었다. 현재는 배양한 인간세포에서 실험에 성공한 것이니 앞으로 더 높은 단계의 효율성, 안전성 검증 실험이 이어질 것으로 보인다.
- 국내의 고품질(양식미)쌀 육종에 대한 기초 연구는 90년대에 배유 전분의 물성, 호화특성, 아밀로스/단백질 함량, 외관 등과 식미와의 상호 관련성을 중심으로 이루어졌다. 그 후 기초연구는 자포니카와 인디카 품종간 교잡후대에서 식미와 관련한 양적형질 유전자좌 분석, 자포니카 품종간 식미 기본요소에 대한 품종조사와 그들의 DNA 마커들과의 관련성 등 단편적인 연구들만이 수행되었고, 식미 개량을 위한 유전자 차원에서의 기초 및 활용 연구는 최근에서야 시도되고 있는 추세이다.
- 농촌진흥청 식물유전체연구팀은 기능성 벼 품종인 고아미2호(식이섬유 강화, 아밀로스 28%), 백진주(현미밥 및 가공성 우수, 아밀로스 9%), 찰벼 품종의 유전체 염기서열 정보를 이용해 ‘아밀로스 합성유전자(GBSS I)’의 구조를 해독하고 동시에 유전자 발현분석을 통해 그 특성을 밝혀냈다.
- 필수아미노산 생합성 회로 및 전분대사 과정의 주요 유전자를 유전자가위 (ZFN) 방법에 의하여 제어함으로써 앞으로의 물질대사공학 분야 연구에 기여 할 것으로 생각된다. 또한, 우리 쌀의 경쟁력을 증가시키기 위해서는 품질 및 식미 관련 유전자를 적극 발굴하고 활용하는 분자 육종을 수행하여야 한다.

### 제 2 절. 국외 연구 현황

- 식물에서 ZFN을 이용한 연구는 2011년 1월 24일 미국 PNAS(Proceedings of National Academy of Sciences)에 발표된 논문에서 Magdy Mahfouz 박사와 연구팀은 환경 스트레스에 견딜 수 있는 식물을 유전적으로 조작하여 사우디아라비아나 중동과 같이 물의 수량 및 품질이 제한적인 지역의 경우, 증가하는 인구의 영양학적 수요를 충족시킬 뿐만 아니라 일본과 같은 GM 제한적인 시장에 잉여 작물을 수출할 수 있는 길을 열어주는 스트레스 내성 작물을 키워서 그 성과를 볼 수 있을 것이라고 밝혔다.
- Shukla 등은 2009년 4월 29일자 Nature 온라인판(AOP)에 “Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases” 라는 제목으로 옥수수의 IPK1 유전자를 변형시켜 이를 통해 제초제에 저항성을 가지면서 파이테이트 (phytate) 대사 (동물이 소화할 수 없는 옥수수의 화학물질)가 변형된 옥수수를 만들었다고 발표했다.
- 미네소타 주립대학과 메사츄세츠 종합 병원(MGH) 연구진은 2009년 4월 Nature지 발표에

서 ZFN을 이용해 담배 식물(tobacco plants)이 갖고 있는 하나의 유전자에 변형된 유전적 염기서열(altered genetic sequence)을 주입하여, 유전자에 의해 엔코딩된 단백질로 식물들로 하여금 제초제에 저항(Herbicide resistant)할 수 있도록 담배를 변형하는데 성공한 결과를 얻었다.

- 2005년 6월 미국 캘리포니아에 위치하고 있는 Sangamo사의 연구진들은 Nature 저널에 interleukin 2 receptor  $\gamma$  (IL2R $\gamma$ ) 유전자 결함에 의해 유전병을 지닌 인간 세포를 ZFN 기술을 응용하여 유전자 적중법을 성공시켜 정상세포로 유전자 수정 (gene correction)을 성공적으로 수행하였다 (Urnov et al. Nature 2005).

### 제 3 절. 국내·외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

- Forward와 reverse genetic의 연구 접근 방법을 살펴보면, 돌연변이원(mutagen)을 이용해서 어떤 형질에 대한 돌연변이체를 만들고, 이러한 돌연변이 형질을 바탕으로 교배 등을 통해서 형질을 나타내는 유전자(gene)를 규명하는 과정을 forward genetic 이라고 하며, 이는 많은 시간이 소요된다. 최근 많은 연구자들이 삽입돌연변이체에 의한 유전자 기능 연구, microarray를 이용한 유전자 대량 발현분석, FOX-hunting system에 의한 유전자 분석, gene silencing mutagenesis에 의한 유전자 기능 분석, proteomics에 의한 유전자 기능 분석 등과 같은 reverse genetic 연구를 수행하고 있다.
- 최근 들어 식물에서 Reverse genetics 연구의 일환으로 zinc finger nuclease (ZFN)을 이용하여 목적하는 유전자를 특이적으로 표적하는 기술이 알려졌다. 이 기술에서 매우 유전자 특이적으로 안정적인 돌연변이를 얻을 수 있다. 현재 국내·외에서 인간 유전체 연구에 적극 활용하여 성공적인 사례가 나오고 있으나 식물을 사용한 gene targeting 연구는 전무하여 그 성과 또한 미흡하다.
- 이 분야의 가장 큰 문제는 ZFN 제작의 어려움, 목표 지점 바깥의 돌연변이 제어(off-target mutation), ZFN 전달 기술(delivery) 등이다. Target DNA에 binding하여 염기서열을 제거하는 작업의 성공율이 23.24 % 정도로 연구진들은 보고 있는데, ZFN이 게놈 DNA에서 얼마만큼 특이적으로 cleavage를 일으키는지에 대해 게놈 수준에서 더 많은 기초 연구가 필요하다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제1절 (1세부) 5MT 저항성 계통과 GBSS1 유전자 gene targeting을 통한 고품질 벼의 실용화

##### 1. Tryptophan 생합성회로상의 유전자 발현분석

Tryptophan analog인 5-methyltryptophan (5MT) 저항성 벼 계통의 분자적 특성을 규명하기 위해 shikimate 생합성 대사경로상에 존재하는 14개 유전자들(Fig 1)의 특이적인 영역으로부터 primer를 합성하여 각각의 계통별 RT-PCR 분석을 실시하였다.

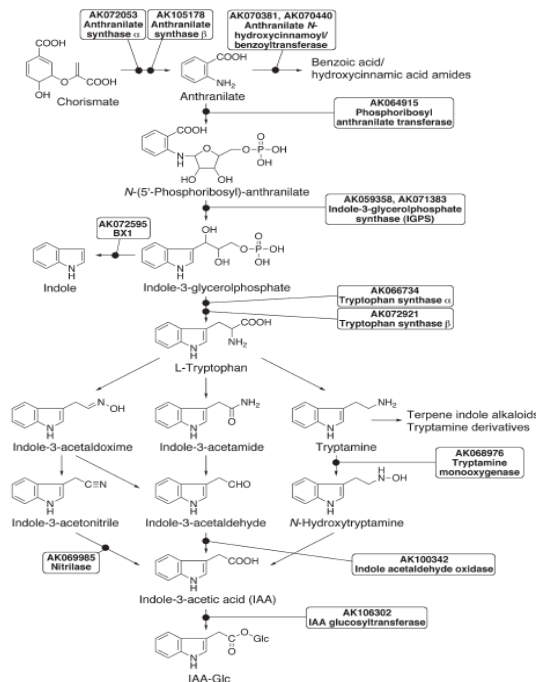


Fig. 1. Rice cDNAs with putative function in the synthesis and downstream processing of tryptophan biosynthesis. These accessions were identified using existing annotations in the KOME database and by homology search using pertinent proteins with known function via tBLASTn. (NB as of writing, only OsASA1 and OASB have been functionally verified in rice.)

트립토판 생합성에 관여하는 14개 유전자들의 특이적인 영역으로부터 primer를 합성하여 각각의 계통별 RT-PCR 분석을 실시한 결과 14개의 유전자 중에서 anthranilate synthase (AK072053), anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/ benzoyltransferase (AK070381, AK070440), phosphoribosyl anthranilate transferase (AK064915), indole-3-glycerolphosphate synthase (AK059358) 유전자들에서 대조구에 비해 유전자의 발현 시기가 빠르거나 발현량이 증가하였다(Fig 2). 이들 유전자들에서 종자발육 단계별 유전자의 발현 수준을 살펴본 결과

Anthranilate synthase (AK072053), Indole-3-glycerolphosphate synthase (AK059358) 유전자에서 5MT 돌연변이 고정 계통에서 수정 후, 초기에서 발현량이 매우 높게 나타났으며, 다른 생합성 유전자들은 유사한 발현 pattern을 보였다(Fig 3). 따라서 이들 두 유전자가 5MT 돌연변이체의 트립토판을 생합성하는데 수정초기에 역할을 담당하고 있다고 생각된다. 이런 결과는 옥수수, 벼, 담배 등의 amino acid analog 돌연변이체에서 연구되어 보고된 바 있으며, 이들 유전자들에서는 신호전달 유전자가 있거나, Feedback inhibition 작용에 의해 최종산물인 tryptophan pool 이 증가되고 유지된다고 생각된다. 아직도 특정 아미노산 analog에서 선발하여 특정 amino acid의 증가되는 생리적 생화학적 증거는 많이 입증되었으나, 분자수준에서 전사조절요인, 신호전달 등의 유전자의 전사 및 번역과정상의 해명이 더욱더 요구되고 있는 실정이다. 또한 Feedback inhibition 되는 요인에다 또 다른 요인 즉, AK099094, AK073222 유전자들의 발현제어를 통해 tryptophan 함량이 정상적으로 유지된다고 할 수 있다.

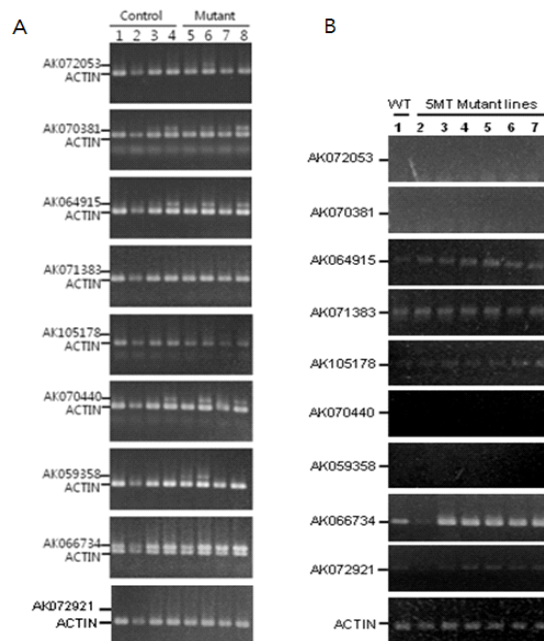


Fig. 2. RT-PCR analysis of cDNAs with putative function in the synthesis and downstream processing of Trp biosynthesis.

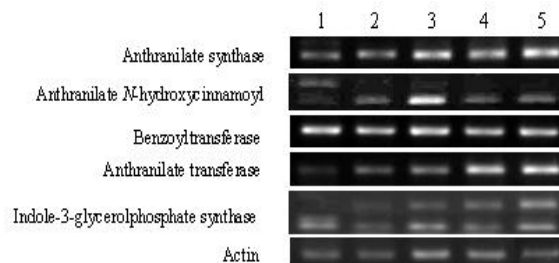


Fig. 3. Analysis of gene expressions in the developing stage of endosperm in 5MT rice mutants. 1; 5 days after fertilization, 2; 10 days after fertilization, 3; 15 days after fertilization, 4; 20 days after fertilization, 5; 30 days after fertilization.

## 2. 5MT 저항성 돌연변이체의 microarray 분석

5MT 저항성 돌연변이체의 전사수준에서 대조구와 어떤 유전자발현이 달라 배유내 아미노산의 축적을 달리하는지 여부를 검토하기 위해 5MT 저항성계통과 대조구에서 종자 발육단계를 총 5단계로 나누어 microarray 샘플을 구축하여 2반복으로 분석을 실시하였다.

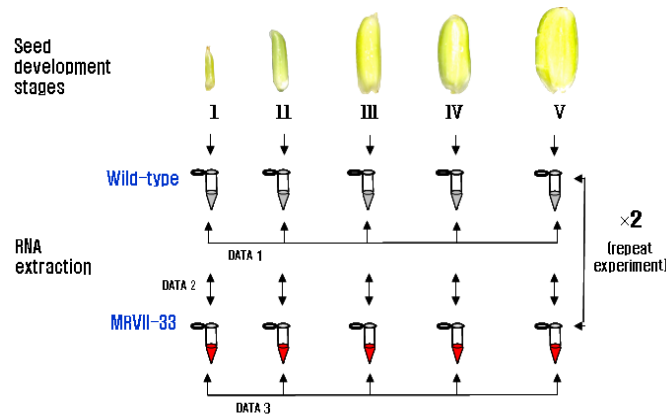


Fig. 4. Diagrammatic representation of the microarray strategy used to identify subsets of genes along the seed developmental stages.

각각의 샘플의 총 RNA를 추출하고 cDNA를 만들어 30 K microarray chip을 이용하여 분석하였다. Clustering을 위해 10개의 샘플에서 한 번이라도 Differentially Expressed Genes (DEG) 라고 판정된 probe를 모두 수집하여 clustering 분석을 수행하였다. 2번의 전처리 과정을 거친 filtered data의 probe 수는 11,655개였는데, 이 filtered data에서 10개의 샘플들 중 적어도 하나의 샘플에서 DEG로 판정된 probe의 수는 8,742개로 나타났다.

Table 1. Number of probe for Clustering Different Experiments.

	Filtered data	DEG for Clustering	Merged data
Number of probe	11,655	8,742	8,391

얻어진 annotation 결과를 이용하여 발현 차이를 보이는 8,391 유전자가 벼 유전자에 annotated probe는 6,142개이었고, 애기장대 유전자에 상응하는 것은 5,645개로 나타났다 (Table 2). 이들 유전자들을 이용하여 Clustering 분석을 수행하였다.

Table 2. Annotated result of probe by Clustering Different Experiments.

Number of probe	Number of annotated probe		
	Rice gene	<i>Arabidopsis</i> gene	Description
8,391	6,142	5,645	5,497

Clustering 결과는 좌측의 dendrogram으로 표현되었고, 10개로 나눈 cluster는 바로 우측의 막대그래프의 색과 알파벳(A-J)으로 표현되었다. 중앙의 heatmap과 우측의 line plot에서 각 cluster에 해당하는 발현 패턴을 확인할 수 있었고, 해당 cluster에 속한 DEG로 GO를 수행한 결과 벼 유전자에 annotation된 애기장대 유전자 (TAIR10 기준) 정보를 이용하여 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>)에서 제공하는 Gene Ontology Annotation Tool을 사용하여 GO를 수행하여 Clustering 결과 생성된 10개의 cluster의 GO(Biological Process)를 이용하여 Thresholds는 기능별 유전자의 count 최소 2 이상, FDR 0.1을 만족하는 Fisher's Exact Test를 사용하였다. 그 결과 C 영역에서는 down regulation group이었고, D 영역에서는 up regulation group로 나타났다. Cluster C 영역(down regulation group)의 유전자는 339개 이었고, 이 중 애기장대에서 기능이 알려진 유전자는 236개 이었다 (Table. 3).

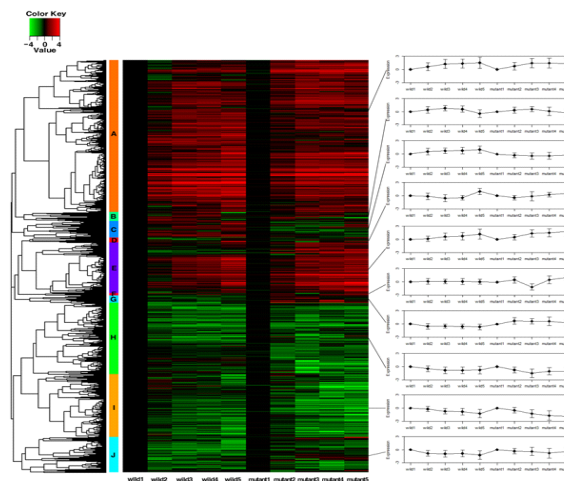


Fig 5. Clustering Different Experiments by DEG (Differentially Expressed Genes). The 8,742 probes with both diurnal cycling and differential expression in the dark were clustered. Ten representative patterns (A-J), each with an idealized graph representing patterns of expression are shown.

Table 3. Number of annotated DEG in Cluster C region

Cluster	Number of DEG	Number of annotated DEG by <i>Arabidopsis</i> gene
Cluster C	339	236

Cluster C 영역 (down regulation group)에 속하는 339개 유전자중 cellular response to stress, oxygen and reactive oxygen species metabolic process, regulation of response to external stimulus, response to oxidative stress, cell development, carbohydrate metabolic process, response to inorganic substance, phenylpropanoid metabolic process, response to radiation, generation of precursor metabolites and energy 등의 생합성 관련 유전자 수는 76개로 나타났다 (Table 4, Fig 6).

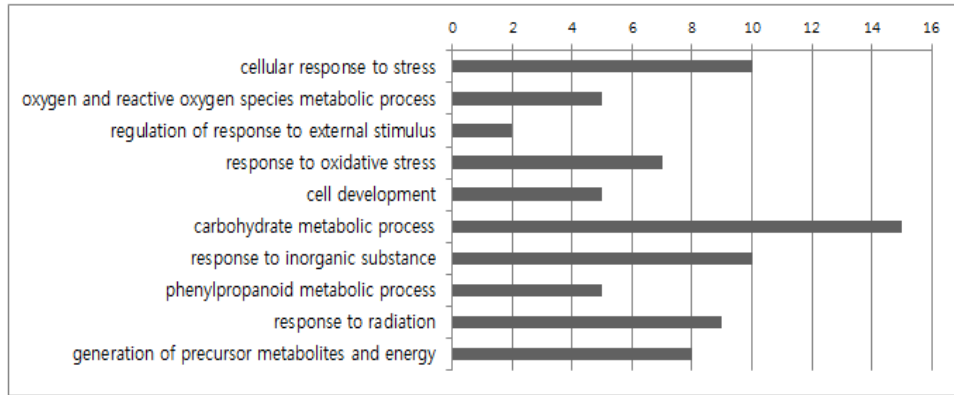


Fig 6. Functional grouping of differentially expressed genes. Categories of gene models expressed in at least one organ or in cultured cells and in all collected organs and cultured cells.

Table 4. Functional category (GO (Biological Process)) by gene annotated result.

Category	Term	Count	%
GOTERM_BP_3	cellular response to stress	10	4.366812
GOTERM_BP_3	oxygen and reactive oxygen species metabolic process	5	2.183406
GOTERM_BP_3	regulation of response to external stimulus	2	0.873362
GOTERM_BP_3	response to oxidative stress	7	3.056769
GOTERM_BP_3	cell development	5	2.183406
GOTERM_BP_3	carbohydrate metabolic process	15	6.550218
GOTERM_BP_3	response to inorganic substance	10	4.366812
GOTERM_BP_3	phenylpropanoid metabolic process	5	2.183406
GOTERM_BP_3	response to radiation	9	3.930131
GOTERM_BP_3	generation of precursor metabolites and energy	8	3.49345

해당 cluster에 속한 DEG을 GO를 수행한 결과 벼 유전자에 annotation된 애기장대 유전자 (TAIR10 기준) 정보를 이용하여 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>)에서 제공하는 Gene Ontology Annotation Tool을 사용하여 GO를 수행하여 Clustering한 결과 생성된 10개의 cluster의 GO(Biological Process)를 이용하여 Thresholds는 기능별 유전자의 count 최소 2 이상, FDR 0.1을 만족하는 Fisher's Exact Test를 사용하였다. 그 결과 D 영역(up regulation group)은 92개 유전자로 나타났다. 벼 유전자에 annotation된 애기장대 유전자 (TAIR10 기준) 정보를 이용하여 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>)에서 제공하는 Pathway Search Tool을 사용하였다. Thresholds는 기능별 유전자 count가 최소 2 이상, FDR 0.1을 만족하는 Fisher's Exact Test를 사용하여 야생형에 비해 mutant에서 특이적인 발현 패턴을 보이는 Cluster D영역내 애기장대와 관련 있는 유전자의 수는 65개로 나타났으며(Table 5), KEGG pathway에 4.6%로 나타났다 (Table 6).

Table 5. Number of annotated DEG in Cluster D region

Cluster	Number of DEG	Number of annotated DEG by <i>Arabidopsis</i> gene
Cluster D	92	65

Table 6. The result of KEGG pathway

Category	Term	Count	%
KEGG_PATHWAY	ath00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	3	4.615384

이중 5MT 저항성 계통의 분자적 특성을 알아보기 위해 수분 수정 후, 배유의 발육단계에 따른 유전자 발현 양상을 microarray 분석을 실시하여 5MT 저항성 계통과 대조구간의 microarray 분석을 통해 평균적으로 10배 이상의 발현량이 차이를 보이는 유전자를 선발하였다 (Table7).

Table 7. Significantly ten-fold up and down-regulated genes among genes in the 5-methyltryptophan resistant mutant line over the wild type using rice oligo chip

Gene ID	Description
AK073800	chitinase
AK109836	F-box domain containing protein
AK107646	ribosomal protein-like
AK060385	selenium-binding protein-like
AK103596	GTPase activating protein 3
AK061187	Oryza sativa 33-kDa secretory protein
AK069904	putative metal transporter Nramp2
AK060363	chitinase IIb
AK067626	putative cyclic nucleotide-regulated ion channel, cngc2
AK069821	vacuolar proton-ATPase
AK068167	phosphoglycerate mutase family
AK107425	steroleosin-B
AK067622	flavin-containing monooxygenase3

선발한 유전자의 특이적 프라이머를 합성한 후 RT-PCR 분석을 수행한 결과 대조구에 비해 돌연변이체에서 많은 유전자들의 발현 패턴이나 발현양의 변화를 보였다(Fig 7). 특이할 점은 배 발달 초기에 대조구보다 돌연변이체에서 많은 유전자들이 빠른 발현 패턴을 보였다.



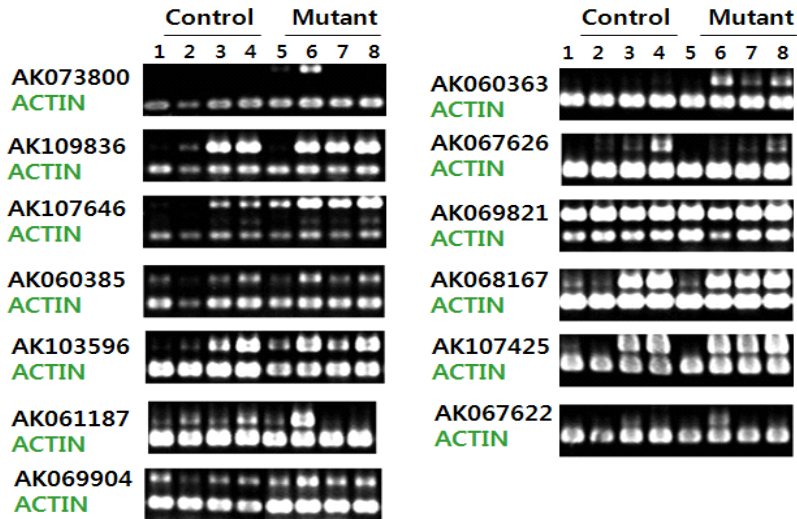


Fig 7. RT-PCR analysis of expression levels of candidate genes identified by microarray analysis in developing endosperm after self-pollination of 5-methyltryptophan resistant mutant and wild type plants. Lane 1 and 5: 2 day after fertilization, Lane 2 and 6: 4 day after fertilization, Lane 3 and 7: 10 day after fertilization, Lane 4 and 8: 12 day after fertilization.

또한 5MT 저항성 계통과 대조계통의 배 발육단계를 5단계에서 각각 발현양이 현저히 낮거나, 높은 20개의 유전자를 선발하였다. 선발한 염기배열을 이용하여 NCBI 데이터베이스로부터 염기서열의 정보를 이용하여 유전자 특이 primer를 합성하여 RT-PCR 분석을 통해 확인한 결과와, microarray의 결과와 거의 유사한 경향을 보였다 (Table 8, Fig 8, Fig 9).

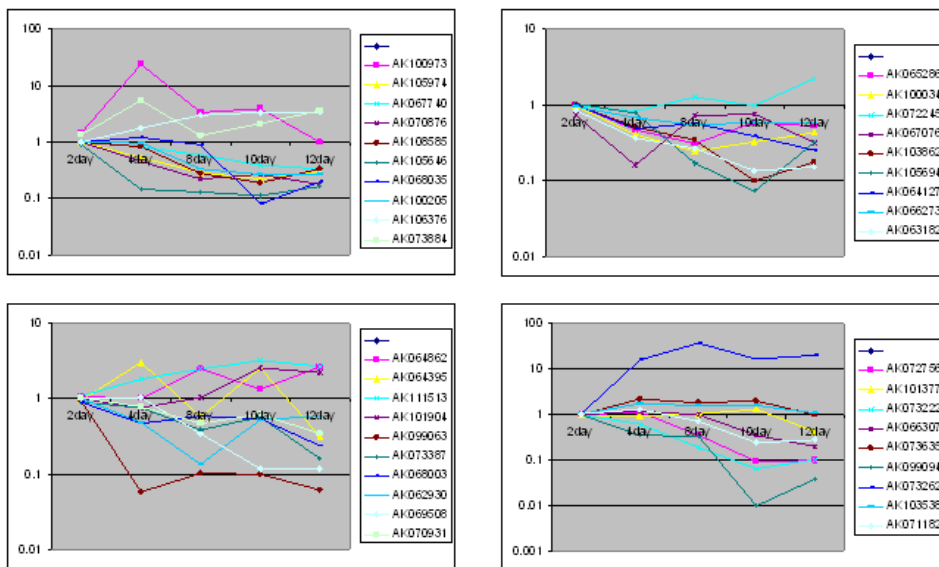


Fig 8. Gene expression levels of 5-methyltryptophan resistant mutant lines.

Table 8. Significantly up and down-regulated genes among genes related amino acids biosynthesis in the 5-methyltryptophan resistant mutant line over the wild type "Dongan" using rice oligo chip.

Description	Gene ID	Expression level (Ratio M/W)				
		2DAP*	4DAP	7DAP	10DAP	12DAP
branched-chainalkanoic acid dehydrogenase	AK065286	1.013661	0.471626	0.305511	0.593716	0.527606
12-oxophytodienoic acid reductase	AK100034	0.969653	0.406685	0.24549	0.325894	0.428272
acidic class III chitinase OsChib3a	AK072245	0.97973	0.824175	1.25613	0.992116	2.260846
fatty acid hydroperoxidelyase (13-hpl gene)	AK067076	0.747678	0.15825	0.727067	0.76275	0.312617
amino acid carrier	AK103862	1.019358	0.510551	0.347627	0.099125	0.175809
putative fatty acid longase (fae2 gene)	AK105694	1.02663	0.779246	0.170268	0.073025	0.31774
purple acid phosphatase	AK064127	1.017577	0.487706	0.572067	0.386276	0.251193
acidic nuclear phosphoprotein pp32 mRNA	AK066273	0.966479	0.685749	0.537494	0.5845	0.574928
UDP-glucose: salicylic acid glucosyl transferase (SA-GTase)	AK063182	0.847778	0.36206	0.269575	0.135579	0.153312
putative fatty acid longase (fae2 gene)	AK064862	1.067074	0.996231	2.507213	1.341973	2.650932
amino acid permease 6	AK064395	0.948218	3.085065	0.566341	2.534713	0.312553
branched-chain amino acid aminotransferase-like protein	AK111513	1.112448	1.823636	2.489081	3.246449	2.70463
purple acid phosphatase (PAP22)	AK101904	1.009204	0.757539	1.037274	2.533494	2.221338
putative defense associated acid phosphatase mRNA	AK099063	0.932392	0.057045	0.10306	0.098401	0.061993
amino acid transporter (LeAAP2) mRNA	AK073387	0.900446	0.759843	0.387069	0.576482	0.160966
branched-chain amino acid transaminase 5 (bcat5 gene)	AK073635	0.982985	2.228886	1.831408	2.019448	0.980498
caffeic acid O-methyl transferase mRNA	AK099094	1.00037	0.353676	0.326968	0.009477	0.038352
putative amino acid selective channel protein.	AK073262	1.047485	15.94782	36.87207	17.04294	20.05927
branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT2) mRNA	AK103538	1.013392	1.726814	1.565294	1.593873	1.097678
putative fatty acid longase (Atg2g28630) mRNA	AK071182	1.015097	1.287599	0.711153	0.243338	0.273967

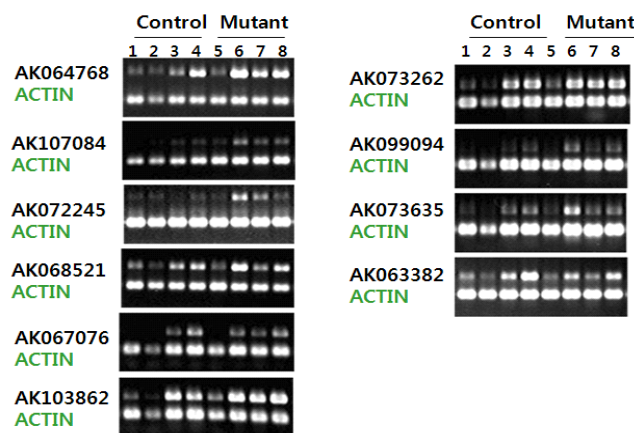


Fig 9. Semi-quantitative RT-PCR analysis of expression levels of candidate genes identified by microarray analysis in developing endosperm after self-pollination of 5-methyltryptophan resistant mutant and wild type plants. Lane 1 and 5: 2 days after fertilization, Lane 2 and 6: 4 days after fertilization, Lane 3 and 7: 10 days after fertilization, Lane 4 and 8: 12 days after fertilization

### 3. 5MT 저항성 계통의 특성

#### 가. 5MT 저항성 계통 선발

벼에 EMS 처리에 의해 유도된 6개의 5MT 저항성 벼 개체를 500  $\mu$ M 5-Methyl tryptophan이 포함된 1/2 MS 배지와 5-Methyl tryptophan이 포함되지 않은 배지에 각각 파종하여 강한 저항성을 보이는 계통을 선발하였다 (Fig 10). 6개의 계통 모두 지상부의 생육은 기본 배지와 동일한 양상을 보였으나, 그중 2, 4, 5 계통의 경우 다른 계통과 달리 지하부의 생육 또한 양호하게 나타났다. 따라서 5MT에 강한 저항성을 보이는 벼 3 계통을 선발하여 각각 5MT-2, 5MT-4, 5MT-5라 명명하였다.

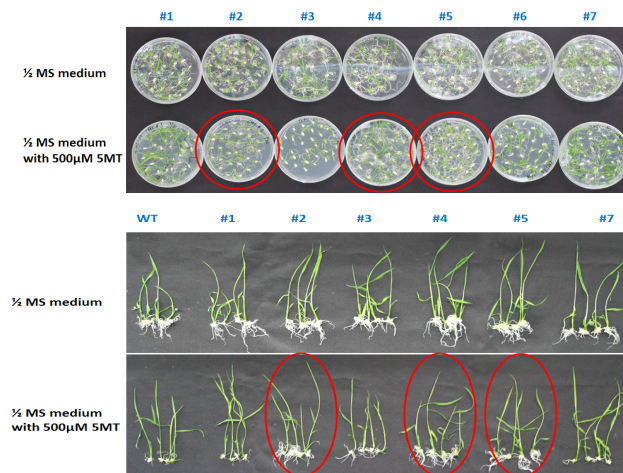


Fig 10. Phenotype of the wild type and mutant plants in rice. After 14 days of 5MT treatment plants were photographed.

#### 나. 농업형질과 수량 및 수량구성요소

2012년에 충북대학교 포장에서 5MT에 저항성을 보이는 돌연변이체의 농업적 특성을 분석하기 위하여 모품종인 동안벼와 5MT 저항성 6 계통을 포장에 증식하여 재배한 뒤 농업형질들을 조사하였다 (Fig 10, Table 9).

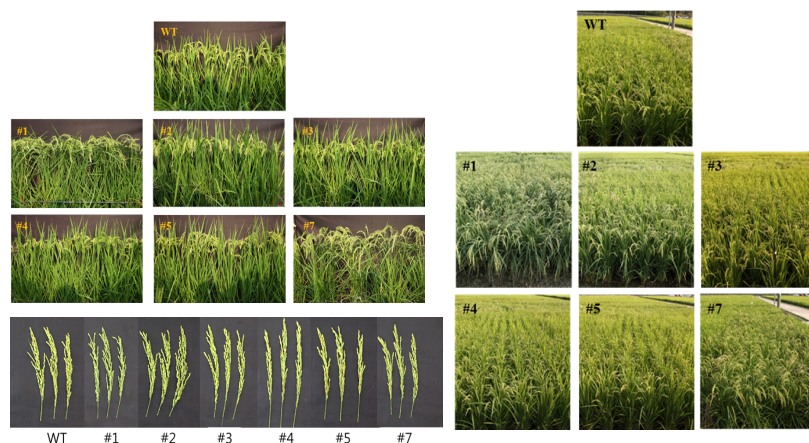


Fig 11. Phenotype of 5MT resistant plants and wild type Dongan in 2012.

트립토판 아날로그인 5-methyltryptophan (5MT)에 저항성을 나타낸 3 개 벼 계통과 wild type의 농업형질을 조사한 결과는 Table 9와 같이 wild type에 비하여 농업형질에 변이성을 나타내었는데, 전체적인 표현형을 포장에서 관찰한 바로는 5MT-5 계통이 wild type인 동안벼와 가장 유사한 형태적 특성을 보였고 수량성도 가장 높을 것으로 나타났다.

Table 9. Agronomic traits of 5MT resistance lines in 2012.

Traits	WT	5MT 2	5MT 4	5MT 5
Leaf length (cm)	23	26	27	32
Leaf width (cm)	1.4	1.3	1.2	1.4
Blade color	pale green	green	pale green	pale green
Basal leaf sheath color	green	green	green	green
Flag leaf angle	erect	erect	erect	erect
Days to heading (DAS)	105	103	110	110
Panicle length (cm)	21	21	19	19
Panicle type	compact	compact	compact	compact
Secondary branching	light	light	light	light
Productive tillers	16	13	16	13
Plant height (cm)	104	106	103	106

좀 더 세밀한 농업형질 및 수량 조사를 위하여 선발된 3 개의 계통과 모품종을 2013년 충북대학교 포장에 3반복으로 배치하여 표준재배법에 준하여 포장 재배한 후 시기별로 필요한 벼의 특징 및 농업형질과 수량 및 수량 구성요소들을 재조사하였다 (Fig 12). 모품종인 동안벼와 선발된 3 개의 계통의 농업형질을 조사한 결과 Table 10과는 같았다. 초장의 경우 모품종에 비해 들연변이 계통이 길게 나타났고, 잎의 길이 또한 26 cm 이상으로 길게 조사되었다. 다른 농업형질은 모품종과 유사한 경향을 보였다.

Table 10. Agronomic traits of wild type and three 5MT resistant rice plants in 2013.

Traits	Dongan	5MT-2	5MT-4	5MT-5
Leaf length (cm)	23	26	27	32
Leaf width (cm)	1.4	1.3	1.2	1.4
Blade color	pale green	green	pale green	pale green
Basal leaf sheath color	green	green	green	green
Flag leaf angle	erect	erect	erect	erect
Days to heading (DAS)	105	103	110	110
Panicle length (cm)	20	19.5	18.1	19.3
Panicle type	compact	compact	compact	compact
Secondary branching	light	light	light	light
Productive tillers	16	13	16	13
Plant height (cm)	104	106	103	106
Culm length (cm)	74	65	76	72
Days to heading (DAS)	105	103	110	110
Panicle length (cm)	20	19.5	18.1	19.3
Harvest index	0.62	0.48	0.48	0.45

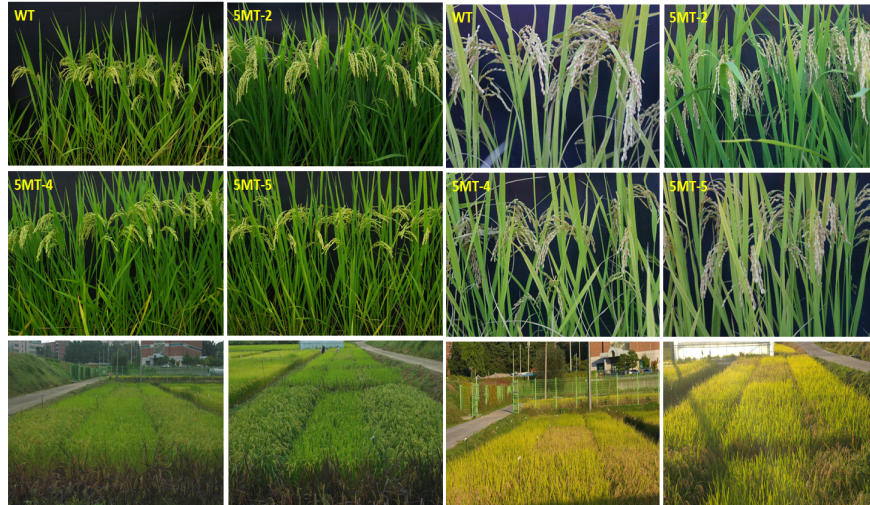


Fig 12. Phenotype of 5MT resistant rice plants and wild type Dongan, Left; 25 days after flowering, Right; 45 days after flowering in 2013.

2013년도에 동안벼 및 5MT 저항성 계통의 수량 및 수량구성 요소를 조사한 결과 분얼수의 경우 모품종의 11 개와 비슷한 10-12 개를 보였다. 주당 영화수는 모품종이 가장 많은 130개였고 5MT-2는 동안벼(WT)와 비슷한 129 개였고 5MT-5가 가장 적은 90 개였다. 친립중은 5MT-5가 28 g으로 가장 많았고 5MT-4가 27 g, 5MT-2와 wild type 동안벼가 26 g으로 가장 적었다. 등숙률은 5MT 돌연변이체들이 동안벼에 비해 증가된 경향을 보였다. 10 ha 당 수량에서는 wild type 동안벼 보다 5MT 돌연변이 벼에서 모두 수량이 낮은 결과를 나타내었다(Table 11).

Table 11. Yield and yield components of wild type and three 5MT resistant rice plants in 2013.

Traits*	WT	5MT#2	5MT#4	5MT#5
No. of tillers per hill	11	10	10	12
No. of spikelets per panicle	130	129	120	90
1000-grain weight (g)	26	26	27	28
Ripened grain ratio (%)	0.85	0.90	0.88	0.87
Yield(kg/10a)	707	665	637	570

#### 다. 식미도 및 관련 형질조사

모품종과 3 개의 5MT 저항성 계통의 주요 품질 특성을 조사한 결과는 Table 12와 같다. 종자의 단백질, 수분, 완전립, 싸라기, 피해립, 백도 등 쌀의 품질을 조사하였다. 그 결과 단백질의 경우 동안벼에 비해 5MT 저항성 계통에서 전체적으로 높은 값을 보였으며, 아밀로스 함량의 경우 wild type인 동안벼에 비하여 비슷하거나 조금 낮게 측정되는 경향을 보였다.

Table 12. Palatability quality parameters in polished rice of Dongan and 5MT resistant lines.

Lines	Protein contents	Water contents	Amylose contents	Whiteness	Perfect kernel	Broken rice	Chalky kernel	Damaged kernel	Heat-damaged kernel
Dongan	6.19	12.34	15.82	42.89	87.87	5.70	6.07	0.40	0.00
5MT-2	7.49	12.90	14.59	40.72	80.30	9.93	9.27	0.47	0.00
5MT-4	7.19	10.37	15.37	43.69	51.93	4.03	43.43	0.63	0.00
5MT-5	7.17	12.94	15.78	41.52	34.33	8.90	55.60	1.17	0.00

벼의 점도를 측정하기 위하여 쌀가루로부터 분리한 전분 분획 입자의 가열에 따른 호화특성을 신속점도측정계(RVA)를 이용하여 분석한 결과는 Table 13과 같다. 동안벼와 5MT 저항성 개체 간 쌀가루들의 호화개시 온도와 여러 가지 점도 특성에 차이를 나타냈으며, 쌀가루의 RVA 측정에 의한 호화 온도는 wild type인 동안벼의 호화온도에 비해 모든 형질전환체의 경우 호화 온도가 높게 나타났다. 전분입자의 팽윤 상태 및 열이나 전단(shear)에 대한 팽윤된 입자의 저항정도를 나타내는 최고점도(P)는 아밀로스 용출 속도에 영향을 받는데 wild type인 동안벼에 비해 5MT 저항성 개체에서 전체적으로 낮게 나타나는 경향을 보였다. 50°C의 냉각점도 및 setback은 전분의 노화 경향을 반영하며 값이 클수록 노화가 쉽다고 할 수 있는데 본 실험결과 setback 값이 실험구에 따라 변이차가 큰 것으로 나타났다.

Table 13. Pasting properties of Dongan and 5MT resistant lines by rapid visco-analyzer.

Lines	Peak1	Trough1	Breakdown	Final Viscosity	Setback	Peak Time	Pasting
Dongan	2628	1318	1310	2446	-182	6	80
5MT-2	2659	1405	1254	2555	-104	7	77
5MT-4	2586	1349	1237	2542	-44	7	67
5MT-5	2409	1224	1185	2310	-99	6	79

동안벼와 5MT 저항성 개체의 아미노산 함량을 비교하고자 Fluorometric Analysis system을 이용하여 백미와 현미에 각각 포함된 free amino acid 함량을 분석하였다 (Table 14, 15). 종자 6 개를 취해 곱게 마쇄한 뒤 10 mg을 취하여 PICO-tag 방법을 이용하여 PITC labeling을 실시하였다. PITC labeling된 시료를 400 ul의 buffer에 녹여 그 중 10 ul를 취하여 HPLC 분석을 수행하였다. 그 결과, 백미보다 현미에서 아미노산 함량이 높게 측정되었고, 5MT 저항성 개체에서 대조구에 비해 약 1.5 배 가량 높게 나타났다. 그 중 tryptophan 함량을 비교한 결과 5MT-4, 5MT-5 개체의 경우 대조구에 비해 20-30 배 가량 높은 함량을 나타냈다. 실험결과 5MT 저항성 계통은 아미노산 함량이 전체적으로 높고, 특정 아미노산이 높아지는 결과를 초래하였다.

Table 14. Free amino acid composition of unpolished rice in 5MT lines.

Amino acid	Free amino acid content (nmol g <sup>-1</sup> )			
	WT	5MT-2	5MT-4	5MT-5
Asp	334.1±43.3	338.7±84.9	493.0±16.8	419.5±22.3
Glu	224.6±28.0	202.7±21.0	280.5±4.5	192.6±3.4
Asn	126.2±20.8	110.6±27.4	213.1±7.8	152.4±7.2
Ser	49.1±5.5	43.6±12.7	72.4±3.8	52.7±0.5
Gln	66.9±5.9	62.6±4.0	110.4±1.2	53.9±6.5
Gly	39.7±5.2	51.0±8.0	51.5±2.1	64.1±1.1
His	60.1±12.5	53.9±1.9	73.3±3.2	69.6±1.5
Arg	103.7±1.9	92.0±27.6	134.7±20.4	126.1±1.1
Thr	37.5±5.1	36.3±4.4	49.9±4.8	55.6±0.4
Ala	133.4±7.8	168.2±60.1	193.5±6.5	152.2±2.9
Pro	59.8±25.8	39.4±4.3	46.1±5.2	42.0±0.7
Tyr	21.5±1.7	21.6±2.3	30.4±6.5	28.9±0.6
Val	23.0±3.8	30.0±0.8	36.8±2.9	25.6±2.1
Met	12.2±3.3	13.7±0.0	13.7±0.2	12.9±1.0
Ile	27.8±1.2	31.3±1.3	30.7±0.2	27.5±0.2
Leu	20.5±2.9	22.5±0.7	22.5±1.2	17.9±1.3
Trp	28.8±2.4	35.9±7.4	660.2±32.4	844.6±32.3
Lys	16.3±4.2	18.8±4.2	25.8±1.1	24.0±1.2
N_Leu	617.7±63.3	556.5±103.5	637.6±14.1	651.1±27.0
Total	2003.1±145.9	1930.4±176.1	3176.0±136.5	3015.2±114.0

Table 15. Free amino acid composition of unpolished rice in 5MT lines.

Amino acid	Free amino acid content (nmol g <sup>-1</sup> )			
	WT	5MT-2	5MT-4	5MT-5
Asp	149.0±9.7	125.9±9.6	203.4±6.4	183.3±3.5
Glu	74.1±5.4	60.8±1.7	105.3±4.9	93.2±3.1
Asn	52.8±0.9	62.5±16.4	78.9±0.3	62.0±0.1
Ser	25.6±4.3	31.5±5.6	30.2±2.9	36.3±1.0
Gln	57.6±2.0	54.0±1.0	70.8±0.3	79.3±1.6
Gly	49.3±10.3	33.8±0.7	30.0±1.1	31.0±2.3
His	26.3±1.2	34.7±4.3	30.9±3.3	40.9±5.2
Arg	62.0±2.6	62.7±3.9	57.9±1.3	60.0±2.4
Thr	20.8±0.0	24.0±3.0	25.6±2.4	29.4±5.0
Ala	46.3±2.5	50.0±0.6	56.2±1.7	59.0±6.4
Pro	34.7±3.6	33.5±2.1	31.8±3.4	36.1±3.8
Tyr	-	-	-	-
Val	16.1±0.2	16.5±4.4	17.2±1.2	24.6±1.3
Met		8.6±0.1	6.7±0.9	13.2±1.0
Ile	20.4±0.2	23.9±0.1	20.6±0.4	22.1±1.5
Leu	14.0±0.1	14.9±0.3	14.1±2.4	15.0±0.8
Trp	-	-	50.0±1.1	62.8±2.5
Lys	7.2±0.3	10.7±1.2	9.9±2.5	8.69±0.9
N_Leu	423.4±28.4	432.5±21.2	395.1±11.2	391.5±2.5
Total	1080.3±72.6	1079.8±76.8	1235.5±48.7	1249.4±45.7

## 라. 5MT 저항성 계통의 유전적, 생리적 특성

### (1) 저항성 계통 선발

아미노산 함량을 분석한 결과 5MT-4, 5 계통의 경우 트립토판 함량이 동안벼에 비해 각각 22, 30배 증가하였는데, 5MT-2의 경우 트립토판의 함량이 동안벼와 비교했을 때 크게 차이가 없어서 기존에 선발한 5MT-2, 4, 5 계통의 후대를 증식하여 5MT에 저항성 검정을 다시 실시하였다. 그 결과 Fig 13에서 보는 바와 같이 5MT-2는 전 세대에서는 저항성을 보였으나, 후대에서는 동안벼와 마찬가지로 500 uM 5-Methyl tryptophan이 포함된 배지에서 생육하지 못하는 것으로 나타났다.

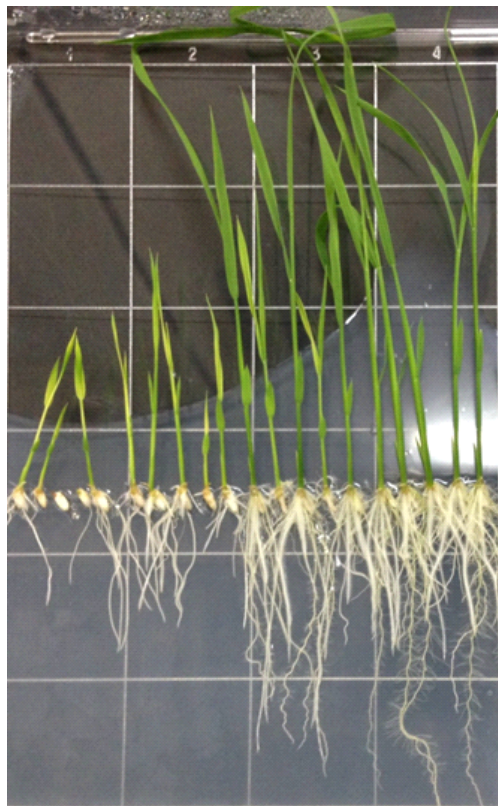


Fig 13. Various lines were screened by growing seeds in half strength Murashige and Skoog (MS) media with 500 uM 5-methyl-tryptophan. Top two insensitive mutant lines 5MT-4 and 5 showed well grown shoots and roots.

### (2) 염기서열 분석

5MT에 저항성을 보이는 계통들의 염기서열을 분석하여 트립토판 생합성에 중요한 역할을 하는 효소인 anthranilate synthase AS  $\alpha$  subunit 유전자의 변이여부를 확인하였다. 그 결과 5MT-2의 염기서열의 경우 변화가 없었으며, 5MT-4, 5 계통의 경우 124 bp 영역에서 Phe (F) 이 Val(V)으로 바뀐 것을 확인할 수 있었다 (Fig 14).



```

1                               50
ASA2  AGGCGCGGA  GCGTGGGAGC  GGGAAAGGCA  ACCTGGTGCC  CATGTGGGAG
5MT-2  AGGCGCGGA  GCGTGGGAGC  GGGAAAGGCA  ACCTGGTGCC  CATGTGGGAG
5MT-4  AGGCGCGGA  GCGTGGGAGC  GGGAAAGGCA  ACCTGGTGCC  CATGTGGGAG
5MT-5  AGGCGCGGA  GCGTGGGAGC  GGGAAAGGCA  ACCTGGTGCC  CATGTGGGAG
Consensus  AGGCGCGGA  GCGTGGGAGC  GGGAAAGGCA  ACCTGGTGCC  CATGTGGGAG

51                               100
ASA2  TGCATCGTCT  CCGACCACCT  CACCCCGGTG  CTGGCTAAC  GCTGCCTCGT
5MT-2  TGCATCGTCT  CCGACCACCT  CACCCCGGTG  CTGGCTAAC  GCTGCCTCGT
5MT-4  TGCATCGTCT  CCGACCACCT  CACCCCGGTG  CTGGCTAAC  GCTGCCTCGT
5MT-5  TGCATCGTCT  CCGACCACCT  CACCCCGGTG  CTGGCTAAC  GCTGCCTCGT
Consensus  TGCATCGTCT  CCGACCACCT  CACCCCGGTG  CTGGCTAAC  GCTGCCTCGT

101                               150
ASA2  CCCCAGGAC  AACATGGAGA  CGCCAGCTT  CCTTTCSAG  TCCGTCSAGC
5MT-2  CCCCAGGAC  AACATGGAGA  CGCCAGCTT  CCTTTCSAG  TCCGTCSAGC
5MT-4  CCCCAGGAC  AACATGGAGA  CGCCAGCTT  CCTTTCSAG  TCCGTCSAGC
5MT-5  CCCCAGGAC  AACATGGAGA  CGCCAGCTT  CCTTTCSAG  TCCGTCSAGC
Consensus  CCCCAGGAC  AACATGGAGA  CGCCAGCTT  CCTTTCSAG  TCCGTCSAGC

151                               177
ASA2  AGGGGCCGA  GGGCACCACC  AACGTGG
5MT-2  AGGGGCCGA  GGGCACCACC  AACGTGG
5MT-4  AGGGGCCGA  GGGCACCACC  AACGTGG
5MT-5  AGGGGCCGA  GGGCACCACC  AACGTGG
Consensus  AGGGGCCGA  GGGCACCACC  AACGTGG

```

Fig 14. Sequence analysis of anthanilate synthase (ASA2) gene for 5MT resistant lines. The red color box indicate the mutation site.

5MT 저항성 계통들의 품질 관련 형질을 평가하기 위하여 아밀로스 관련 유전자 발현 분석을 수행하고자 전분대사과정에서 발현되는 7 개의 유전자를 찾아 각각의 프라이머 조합을 제작한 후 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 모든 계통이 5MT를 처리하였을 때 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 모품종과 5MT 저항성 계통간에 발현량에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig 15).

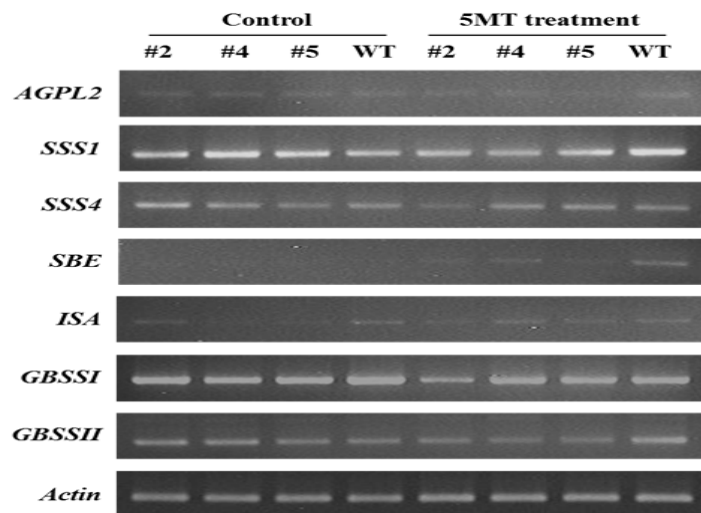


Fig 15. The semi-quantitative RT-PCR of *AGPL2*, *SSS1*, *SSS4*, *SBE*, *ISA*, *GBSSI*, *GBSSII* gene for wild type and 5MT resistant lines. Actin gene as the control was used for semi-quantitative RT-PCR.

(3) 생리적 특성

선발된 2 개의 저항성 계통을 동안벼와 함께 anthranilate synthase (AS) 효소활성 분석을 실시하였다 (Fig 16). 그 결과 tryptophan의 농도가 증가할수록 동안벼에서 AS의 활성이 점점 감소하는 것에 비해 2 개의 저항성 계통들의 경우 모품종과 반대로 트립토판의 농도가 증가함에도 불구하고 지속적인 AS 활성 증가를 보였다. 따라서 저항성 계통들은 트립토판 생합성 회로에서 AS가 피드백 작용을 하지 못해 지속적인 트립토판의 생성이 가능하여 벼 종실내에 트립토판 함량을 현저히 증가시킨 것으로 판단된다.

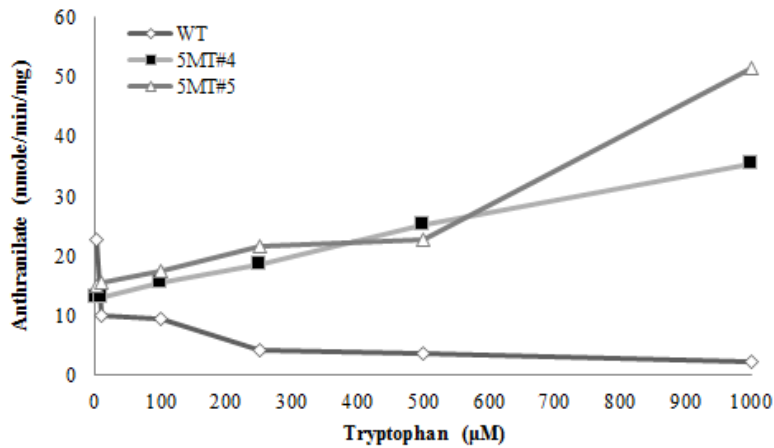


Fig 16. Feedback inhibition of anthranilate synthase activity by tryptophan. Anthranilate synthase activity in the presence of tryptophan (0, 10, 100, 250, 500, 1000 uM) with 10 mM glutamine and 100 mM chorismate as substrates.

선발된 저항성 계통의 벼 품질 및 식미 검정을 실시하였다 (Fig 17). 단백질 함량의 경우 모품종은 4.9%에 비해 5MT-4, 5의 경우 5.1, 5.2%로 모품종과 거의 비슷한 함량을 보였다. 아밀로스 함량의 경우 단백질 함량과는 달리 약간 증가하는 추세를 보였다. 그러나 전체적으로 큰 차이를 보이지는 않았다.

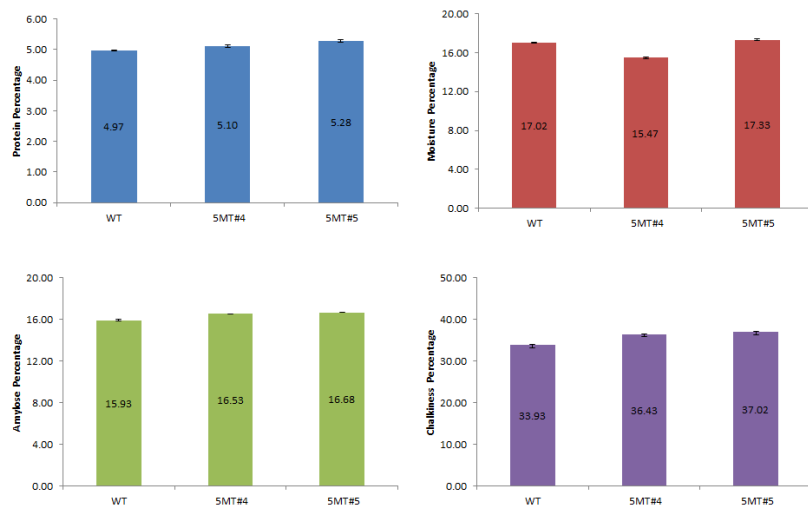


Fig 17. Protein, moisture, amylose and chalkiness of high tryptophan rice.

선발된 두 계통의 아미노산을 비교 분석한 결과는 Table 16과 같다. 19개의 아미노산 함량을 분석한 결과 동안벼에 비해 5MT에 저항성을 보이는 두 계통의 총 아미노산 함량이 1.5 배 이상 증가한 것으로 나타났다. 19 개의 아미노산 중 asparagine (Asn), glutamine (Gln), glycine (Gly), valine (Val), lysine (Lsy), tryptophan (Trp)이 저항성 계통에서 증가하였는데, 그 중 tryptophan 함량의 경우 동안벼에 비해 각각 23, 29배 증가하여 총 아미노산 함량 증가에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

Table 16. Free amino acid contents in mature seed of Donganbyeo, 5MT-4, and 5MT-5.

Amino Acid	Free amino acid content (nmol g <sup>-1</sup> )			5MT-4/ WT	5MT-5/ WT
	WT	5MT-4	5MT-5		
Asp	334 ± 43	493 ± 17	420 ± 22	1	1
Glu	225 ± 28	280 ± 5	193 ± 3	1	1
Asn	126 ± 21	213 ± 8	152 ± 7	2	1
Ser	49 ± 6	72 ± 4	53 ± 1	1	1
Gln	67 ± 6	110 ± 1	54 ± 7	2	1
Gly	40 ± 5	51 ± 2	64 ± 1	1	2
His	60 ± 13	73 ± 3	70 ± 2	1	1
Arg	104 ± 2	134 ± 20	127 ± 1	1	1
Thr	38 ± 5	50 ± 5	56 ± 0	1	1
Ala	133 ± 8	194 ± 7	153 ± 3	1	1
Pro	60 ± 26	46 ± 5	42 ± 1	1	1
Tyr	22 ± 2	30 ± 7	29 ± 1	1	1
Val	23 ± 4	37 ± 3	26 ± 2	2	1
Met	12 ± 3	14 ± 0	13 ± 1	1	1
Ile	28 ± 1	31 ± 0	28 ± 0	1	1
Leu	21 ± 3	22 ± 1	18 ± 1	1	1
Lsy	16 ± 4	25 ± 1	24 ± 1	2	2
N-Leu	617 ± 63	637 ± 15	652 ± 27	1	1
<b>Trp</b>	<b>29 ± 2</b>	<b>660 ± 33</b>	<b>845 ± 33</b>	<b>23</b>	<b>29</b>
Total	2003 ± 245	3176 ± 137	3015 ± 114	2	2

식미 분석을 위해 취반식미계 (SATAKE RICE TASTE ANALYZER)를 이용하여 분석하였다. 식미 측정을 위해 백미 30 g을 흐르는 물에 30 초간 세척하여 밥을 지은 후 상층에 있는 밥은 걸어내고 8 g의 밥을 이용하여 식미치, 외관, 경도, 점도, 밸런스를 분석하였다 (Table 17). 그 결과 식미치가 동안벼에 비해 약간 감소하였으나, 큰 차이를 보이지는 않았다.

Table 17. Eating quality of wild type and transgenic rice by RICE TASTE ANALYZER.

Rice entries	Perception	Hardness	Stickiness	Balance	Taste
WT	2	9	2	2	41
5MT-4	2	9	2	2	39
5MT-5	1	9	2	1	36

가열에 의한 쌀가루의 호화점도 특성은 Rapid Visco Analyzer (RVA)를 사용하여 분석하였다. RVA 원형용기(sample canister)에 쌀가루 3 g과 증류수 25 ml을 넣은 다음 잘 섞어 쌀가루 현탁액을 만들었다. 가열온도는 50℃에서 1 분간 유지한 다음 95℃까지 1 분당 12℃로 가열하고 95℃에서 2.5 분간 유지시킨 다음 50℃까지 냉각시키고 2 분간 유지하였다. RVA viscogram으로부터 호화개시온도(initial pasting temperature), 최고점도(peak viscosity), 최저점도(tough viscosity), 최종점도(final viscosity), 강하점도(breakdown, 최고점도-최저점도) 및 치반점도(set back, 최종점도-최고점도) 등의 RVA 특성을 조사하였다. 동안벼와 5MT 저항성 계통의 viscosity를 측정된 결과 (Fig 18) 저항성 계통이 점도가 동안벼에 비해 약간 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

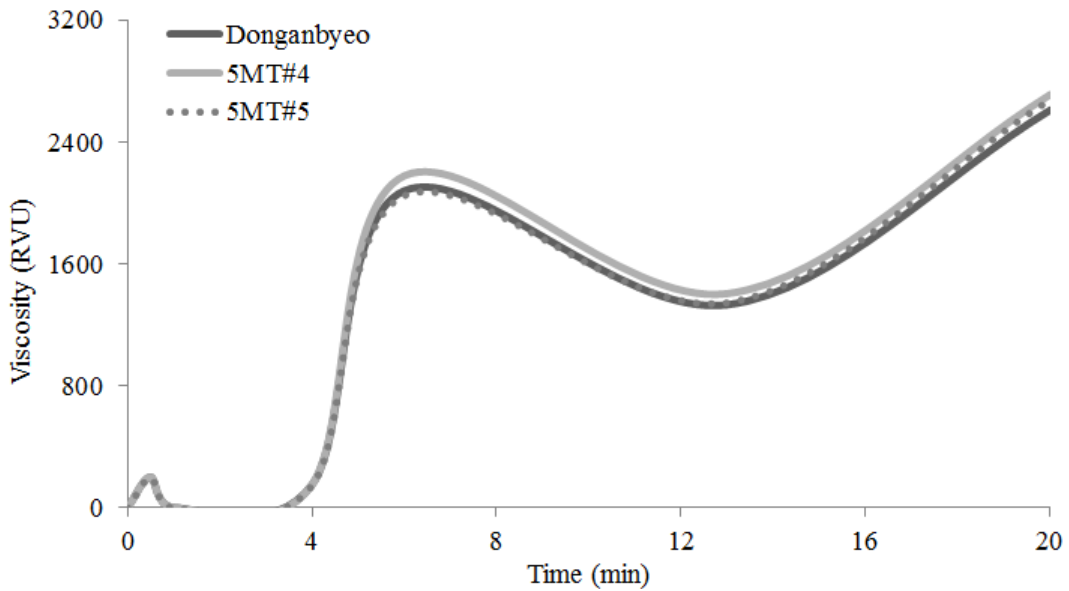


Fig 18. Viscosity curves obtained by Rapid Visco Analyser. Comparison of curves of the wild type and two 5MT resistant lines.

모품종 및 5MT 저항성 계통의 아밀로스 함량을 분석을 실시하였다. 쌀의 아밀로스 함량 측정은 아밀로스가 그의 나선구조 속에 요오드분자를 결합시켜 안정된 청자색 혼합물을 형성시키는 특성을 이용하여 아밀로스-요오드 혼합물의 청색을 가장 많이 흡수하는 비색계의 적색과장에서의 흡광도에 의해 검정하는 방법을 사용하였다. 아밀로스 함량 분석 결과 5MT-4 계통의 경우 모품종인 동안벼에 비해 낮은 아밀로스 함량이 나타났고, 5MT-5의 경우 모품종과 비슷한 경향을 보였다 (Fig 19).

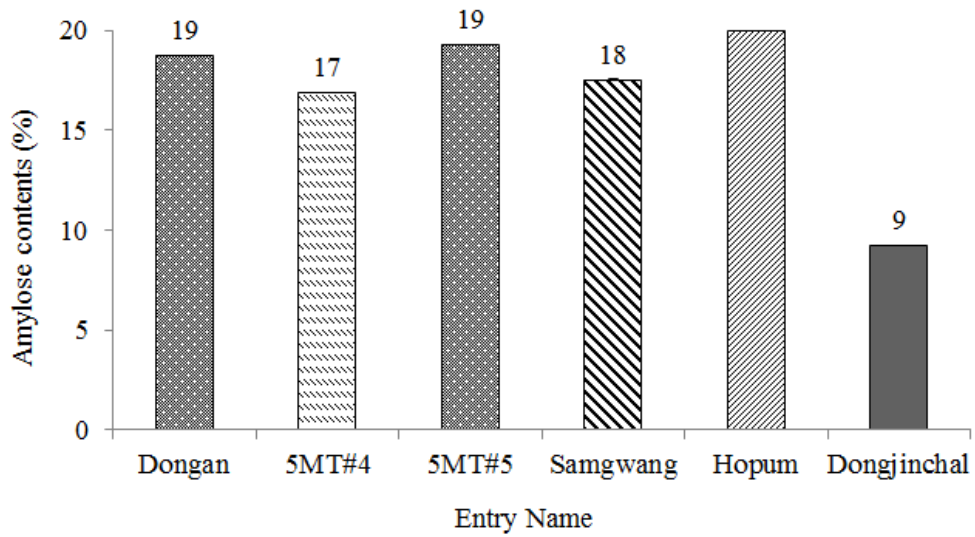


Fig 19. Amylose contents of Dongan, two 5MT resistant lines, Samgwang, Hopum and Dongjinchal.

아밀로스 함량을 시각적으로 확인하기 위하여 iodine 용액을 이용하여 5MT 저항성 계통을 이용하여 염색을 시도하였다. 쌀알의 형태적인 특성을 비교한 결과 동안벼는 쌀알의 색이 투명한 것에 비해 저항성 계통들은 약간 흰색을 띠는 부분(심복백)이 있었다. Iodine 염색 결과의 경우 동진찰벼의 경우 염색이 거의 되지 않은 것에 비해 다른 것들은 염색이 되었고 동안벼와 저항성 계통간에는 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig 20).

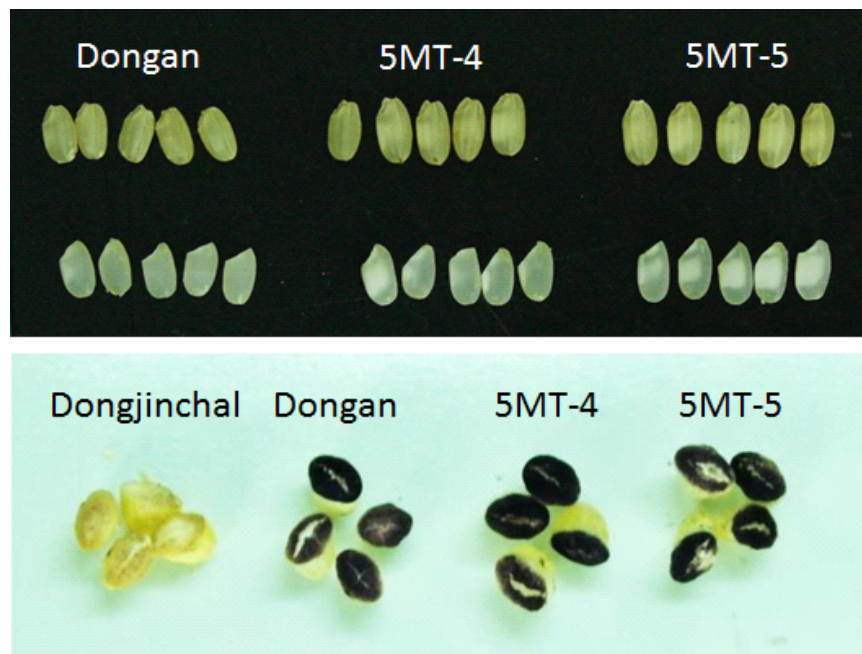


Fig 20. Iodine staining of Dongjinchal, Dongan and high tryptophan rice seeds.

(4) 농업형질 및 수량구성요소

동안벼 및 저항성 계통을 이용하여 2014년 농업형질을 조사한 결과는 Table 18 및 19와 같았다. 저항성 계통의 경우 개화일이 모품종에 비해 약 5일 정도 늦어졌다. 잎의 특성을 분석한 결과에서 잎의 길이가 모품종에 비해 증가하였으며, 5MT-4 계통의 경우 엽폭이 약간 감소하였다. 이삭의 길이가 동안벼에 비해 감소하는 경향을 보였고, 다른 벼의 특성에는 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 18. Descriptors of 5-methyl tryptophan resistant rice Lines.

Descriptors	Donganbyeo (WT)	5MT #4	5MT #5
Seed source	Korea	Korea	Korea
Country of origin	Korea	Korea	Korea
Variety group	Japonica	Japonica	Japonica
Days to 50% flowering (DAT)	75	80	80
Days to maturity (DAT)	145	150	150
<b>LEAF (below the flag leaf)</b>			
Length (cm)	22.7 ± 2.9	26.8 ± 3.9	31.9 ± 3.1
Width (cm)	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Blade Pubescence	glabrous	glabrous	glabrous
Blade Color	pale green	pale green	pale green
Basal leaf sheath color	green	green	green
Angle	erect	erect	erect
Flag leaf angle	erect	erect	erect
<b>LIGULE</b>			
Color	white	white	white
Shape	2-cleft	2-cleft	2-cleft
Collar color	pale green	green	green
Auricle color	pale green	pale green	pale green
<b>CULM</b>			
Number	16 ± 3	16 ± 4	13 ± 4
Angle	erect	erect	erect
Internode color	green	green	green
Strength	strong	strong	strong
<b>PANICLE</b>			
Length (cm)	21.0 ± 1.0	18.8 ± 3.3	18.6 ± 0.3
Type	compact	compact	compact
Secondary branching	light	light	light
Exsertion	moderately well exerted	moderately well exerted	moderately well exerted
Axis	straight	straight	straight
Shattering	very low	very low	very low
Threshability	easy	easy	easy
<b>GRAIN/SPIKELET</b>			
Awning	absent	absent	short and partly awned
Awn color	-	-	straw
Apiculus color	straw	straw	straw
Stigma color	yellow	yellow	yellow
Lemma and palea color	gold	gold	gold
Lemma and palea pubescence	short hairs	short hairs	short hairs
Sterile lemma color	straw	straw	straw
Sterile lemma length	short	short	short

다음으로 동안벼와 저항성 계통의 수량구성요소 및 수량을 분석하였다. 3년간의 분석결과는 Table 20과 같았다.

Table 20. Yield and yield components of 5-methyl tryptophan resistant rice lines for three years.

Yield Components	2012			2013			2014		
	WT	5MT #4	5MT #5	WT	5MT #4	5MT #5	WT	5MT #4	5MT #5
No. of tillers per hill	12	11	10	11	10	12	13	12	13
No. of spikelets per panicle	135	105	106	130	120	90	119	120	95
1000-grain weight (g)	26	30	28	26	27	28	27	27	26
Ripened grain ratio (%)	0.75	0.82	0.86	0.85	0.88	0.87	0.75	0.80	0.89
Yield(kg/10a)	693	628	562	707	637	570	689	674	639

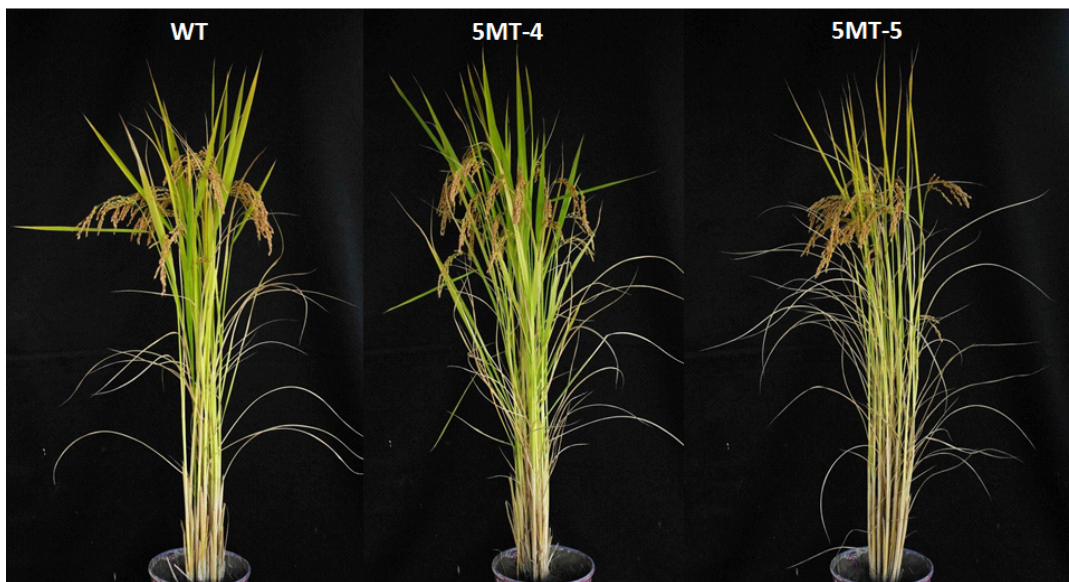


Fig 21. Phenotype of Dongan and 5-methyl tryptophan resistant rice lines.

#### 마. 5MT 저항성 계통을 이용한 교배조합 육성

Tryptophan 함량이 증가된 5MT 돌연변이 벼 계통을 가지고 품질 좋은 벼 품종을 육종하기 위하여 5MT 저항성 계통들과 현재 재배되고 있는 벼 품종 중 농업 형질이 우수하고 안정적으로 발현이 되는 호품벼와 삼광벼를 선택하여 5MT 저항성 형질을 도입하기 위하여 여교배를 실시하였다. 그 결과 호품벼와의 교배조합에서 52 개, 삼광벼와의 교배조합에서 97 개의 F1 종자를 얻었다 (Table 20).

Table 20. First filial generation of cross combinations from the cross between cultivars and 5MT resistant mutants grown in 2012.

Cross Combination	No. of F1 seeds
Hopum X 5MT-1	10
Hopum X 5MT-2	2
Hopum X 5MT-3	8
Hopum X 5MT-4	5
Hopum X 5MT-5	12
Hopum X 5MT-7	15
Samgwang X 5MT-1	1
Samgwang X 5MT-2	21
Samgwang X 5MT-3	22
Samgwang X 5MT-4	32
Samgwang X 5MT-5	3
Samgwang X 5MT-7	18
TOTAL	149

벼 품종 중 농업 형질이 우수한 호품벼와 삼광벼를 선택하여 5MT 저항성 형질을 도입하기 위하여 여교배를 실시하여 얻은 F<sub>1</sub> 식물체의 PCR 결과는 Fig 22과 같다.

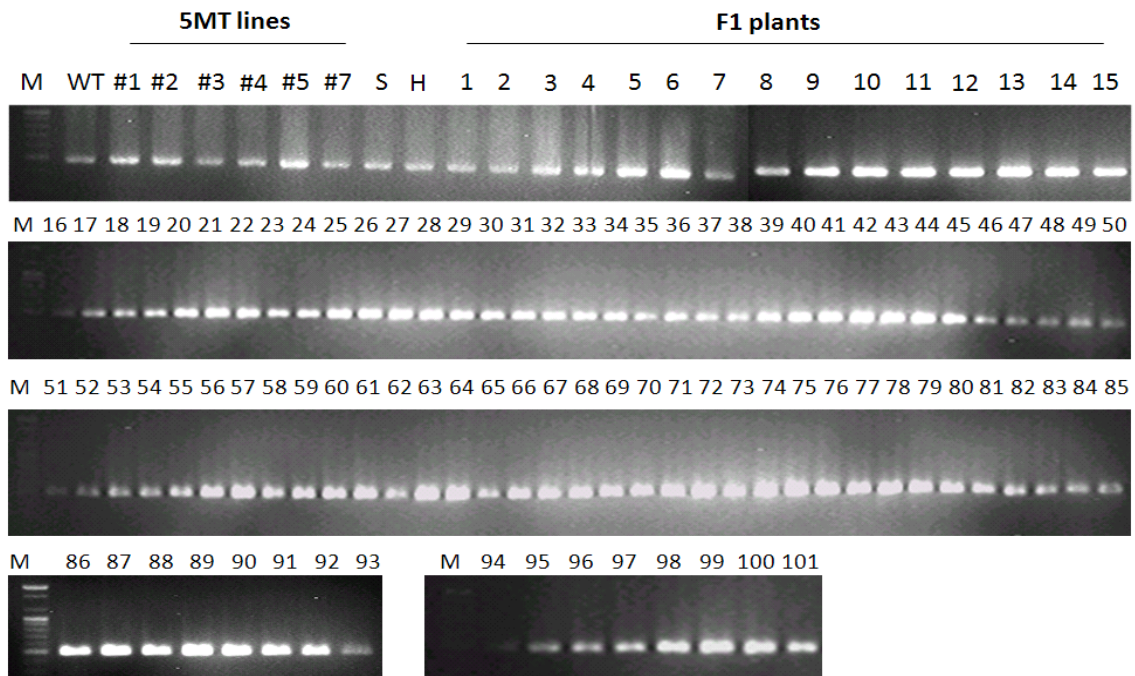


Fig 22. PCR analysis with primers derived from the mutated region of anthranilate synthase using the genomic DNA from F<sub>1</sub> plants from the crosses, Samgwang/5MT & Hopum/5MT lines.



2012년 호품벼와의 교배조합에서 52, 삼광벼와의 교배조합에서 97개의 F<sub>1</sub> 종자를 얻었고, 이를 2013년 포장에 전개하여 호품벼와의 교배조합에서 878, 삼광벼와의 교배조합에서 1,481개의 F<sub>2</sub> 식물체를 증식하였고 (Table 21, Fig 23), 현재 유전분석을 위하여 교배 후대 F<sub>2</sub> 개체들 중에서 우수한 개체를 선발하여 F<sub>3</sub> 종자를 수확하였으며 (Table 22). 5MT 저항성 계통의 돌연변이 sequence 부위의 유전여부를 조사하고 5MT 저항성 여부를 분석한 다음, 아미노산 분석을 통해 우수한 교배계통을 선발하기 위하여 정밀분석을 실시 중에 있다 .

Table 21. Second filial generation of cross combinations from the cross between cultivars and 5MT resistant mutants grown in 2013.

Field code	Cross combination	No. of F <sub>2</sub> plants
B	Hopum x 5MT-2	59
D	Hopum x 5MT-4	108
E	Hopum x 5MT-5	711
H	Samgwang x 5MT-2	815
J	Samgwang x 5MT-4	570
K	Samgwang x 5MT-5	96
Total		2,359

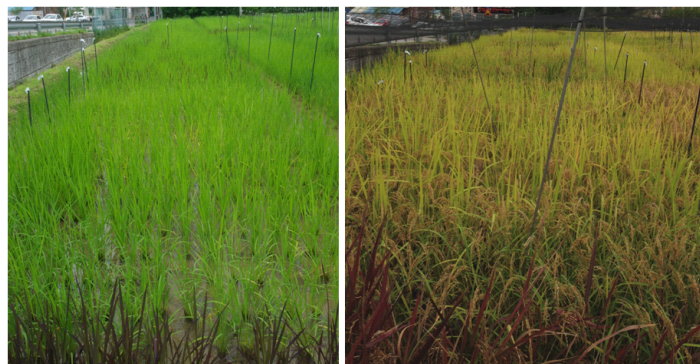


Fig 23. F<sub>2</sub> generation plants in tillering stage (65 DAS) and ripening stage (45 DAF) generated from different cross combinations of selected elite cultivars and 5MT-resistant rice lines.

Table 22. Number of F<sub>2</sub> plants selected from the crosses between Hopum, Samgwang and 5MT resistant lines (5MT-2, 5MT-4, & 5MT-5) grown in 2013.

Cross combination	No. of F <sub>2</sub> plants*	No. of F <sub>3</sub> lines selected
Hopum x 5MT-2	59	25
Hopum x 5MT-4	108	40
Hopum x 5MT-5	711	182
Samgwang x 5MT-2	815	205
Samgwang x 5MT-4	570	203
Samgwang x 5MT-5	96	47
Total	2,359	702

\* Plants selected in the field.

\* Non-transgenic lines were removed by screening on 5MT media.

2013년도 가을에 포장에서 선발한 702개 F<sub>3</sub> 계통들을 가지고 Anthranilate synthase (ASA2) 유전자에 돌연변이가 있는 계통을 선발하기 위하여 5MT 배지에서 저항성을 분석하여 5MT에 저항성을 나타낸 계통들만을 선발하여 Table 23과 같이 포장에 재배하였고, 포장에서 생육이 우수하고 초형, 이삭 등 전체적인 농업형질이 우수한 계통들을 선발하였다.

Table 23. Frequency of homogeneous and heterogeneous F<sub>3</sub> lines grown in 2014.

Code	Cross combination	No. of F <sub>3</sub> lines planted in the field
2014-F3-B	Hopum x 5MT-2	15 hetero
2014-F3-D	Hopum x 5MT-4	7 homo, 8 hetero
2014-F3-E	Hopum x 5MT-5	3 homo, 12 hetero
2014-F3-H	Samgwang x 5MT-2	40 homo
2014-F3-J	Samgwang x 5MT-4	30 homo
2014-F3-K	Samgwang x 5MT-5	15 homo
TOTAL		130

교배계통 중에서 2014년 선발된 계통들을 이용하여 5 methyl-tryptophan이 포함된 배지에서 저항성 여부를 판단하였다 (Fig 24). 그림과 같이 교배에 이용된 모품종인 삼광벼는 5 methyl-tryptophan이 포함된 배지에서 생육하지 못하였으나 5MT 저항성 계통과 교배해서 얻어진 후대는 저항성 계통과 마찬가지로 생육이 원활한 것으로 나타났다.

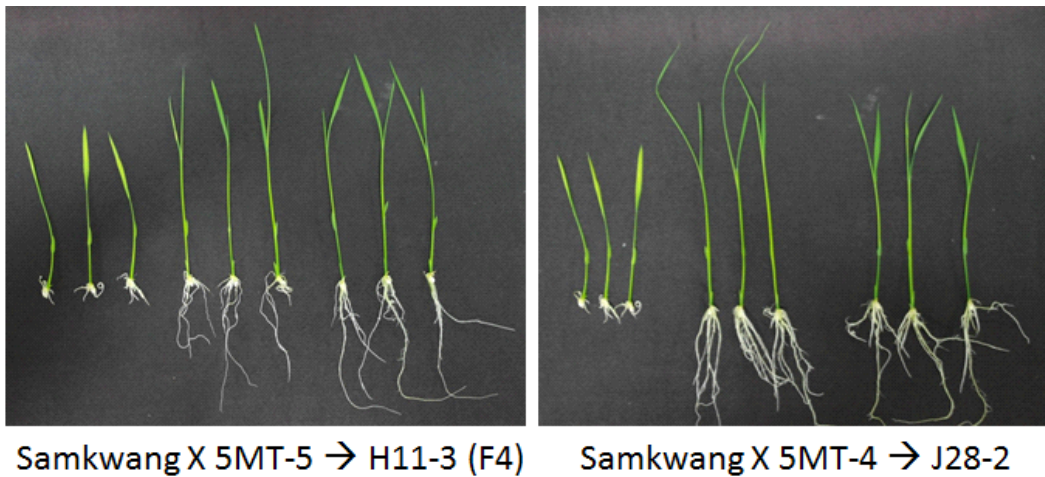


Fig 24. Various lines were screened by growing seeds in half strength Murashige and Skoog (MS) media with 500 uM 5-methyl-tryptophan.

선발된 교배조합도 AS 유전자의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 저항성 계통과 동일한 위치에서 염기서열의 점돌연변이가 일어나서 아미노산 서열이 치환된 것으로 나타났다 (Fig 25).

```

251                                     300
ASA2  TCTT..CGAG GCGGCGGAGC GTGGGAGCGG GAAGGGCAAC CTGGTGC0CA
5MT-4  TCTT..CGAG GCGGCGGAGC GTGGGAGCGG GAAGGGCAAC CTGGTGC0CA
Samkwang TCTT..CGAG GCGGCGGAGC GTGGGAGCGG GAAGGGCAAC CTGGTGC0CA
J28-2  TCCTTCCGAG GCGGCGGAGC GTGGGAGCGG GAAGGGCAAC CTGGTGC0CA
Consensus TCtT..CGAG GCGGCGGAGC GTGGGAGCGG GAAGGGCAAC CTGGTGC0CA

301                                     350
ASA2  TGTGGGAGTG CATCGTCTCC GACCACTCA CCCC0GTGCT CGDCTAC0GC
5MT-4  TGTGGGAGTG CATCGTCTCC GACCACTCA CCCC0GTGCT CGDCTAC0GC
Samkwang TGTGGGAGTG CATCGTCTCC GACCACTCA CCCC0GTGCT CGDCTAC0GC
J28-2  TGTGGGAGTG CATCGTCTCC GACCACTCA CCCC0GTGCT CGDCTAC0GC
Consensus TGTGGGAGTG CATCGTCTCC GACCACTCA CCCC0GTGCT CGDCTAC0GC

351                                     400
ASA2  TGDCCTCGTCC CCGAGGACAA CATGGAGACG CCCAGCTTCC TGTTCGAGTC
5MT-4  TGDCCTCGTCC CCGAGGACAA CATGGAGACG CCCAGCTTCC TGTTCGAGTC
Samkwang TGDCCTCGTCC CCGAGGACAA CATGGAGACG CCCAGCTTCC TGTTCGAGTC
J28-2  TGDCCTCGTCC CCGAGGACAA CATGGAGACG CCCAGCTTCC TGTTCGAGTC
Consensus TGDCCTCGTCC CCGAGGACAA CATGGAGACG CCCAGCTTCC TGTTCGAGTC

401                                     450
ASA2  CGTCGAGCAG GGGCCCGAGG GCAACCACAA CGTCGTACGG TATAGCATGG
5MT-4  CGTCGAGCAG GGGCCCGAGG GCAACCACAA CGTCGTACGG CCTTCTCC0C
Samkwang CGTCGAGCAG GGGCCCGAGG GCAACCACAA CGTCGTACGG CCTTCTCC0C
J28-2  CGTCGAGCAG GGGCCCGAGG GCAACCACAA CGTCGTACGG CCTTCTCC0C
Consensus CGTCGAGCAG GGGCCCGAGG GCAACCACAA CGTCGt aCGg ccTtctccc

```

Fig 25. Sequence analysis of 5MT resistant lines. The red color box indicate the mutation site.

선발된 교배 조합 중 유전분석을 통해 호모계통을 선발한 뒤 알려진 tryptophan 생합성 회로에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 5 개 유전자를 선발하여 RT-PCR을 통해 발현 분석을 수행하고자 프라이머를 합성하여 정밀분석을 수행 중에 있다 (Fig 26, Table 24).

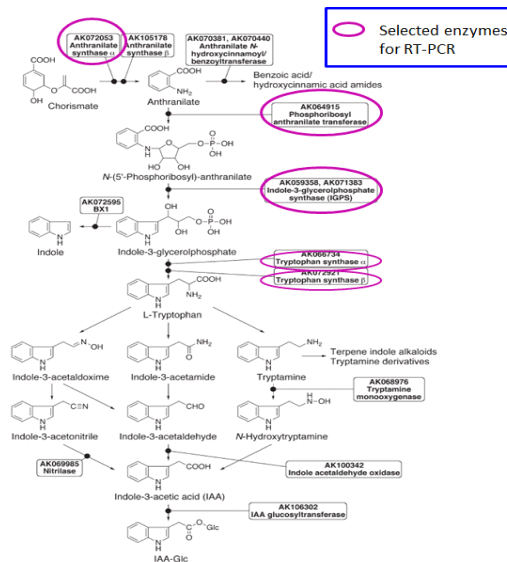


Fig 26. Biosynthetic pathway of tryptophan biosynthesis.

Table 24. Primer sequences of selected enzymes related to tryptophan biosynthetic pathway for RT-PCR analysis.

Accession Number	Name	Primer Sequences(5'--3')
Os03g0264400	anthranilate synthase 1	ASTGGAGAGTTGSRTGATSATCT CTACGAAWGRTGRTTYAGCAAGA
Os03g0126000	anthranilate phosphoribosyltransferase	CAAGATGGCTAAGGCAGCTCAG CAACTATTGGAAATCTTTATCCAG
Os04g0467700	indole-3-glycerol phosphate synthase	VGCRGATGCWRTTCTKYTKATTG CRTTVCCYWAHAGRCCAGCYAT
Os03g0797000	tryptophan synthase alpha chain	GCCGGYGTMCAWGGTCTWRTRG GCYCTSCCYATGATCACDCCA
Os08g0135900	tryptophan synthase beta chain	TGGCTATGGTGTAGACACTGAC CATCAAGGTACTTGCTGGCTGT

#### 4. 전분대사 관련 유전자 발현제어 형질전환체 육성

##### 가. RNAi 및 Antisense 기술을 이용한 발현제어 형질전환체 육성

쌀의 미질은 전분의 대부분을 구성하는 아밀로펙틴과 아밀로스의 물리적 조성이 고품질미의 특성을 좌우하게 되는데, 아밀로스의 함량이 20% 이상 너무 높게 되면 쌀알의 물리적 조성이 나빠져서 밥을 하였을 때 밥맛을 저하시키게 되므로 고품질미 품종의 육성을 위해서는 아밀로스 함량이 낮은 계통의 선발을 통하여 고품질미 벼 품종의 육성을 위한 노력이 매우 중요하다.

본 연구에서는 Tryptophan 함량을 증가시키는 5MT 저항성 벼 계통의 미질 개선을 위하여 아밀로스 함량을 낮추면서 아밀로펙틴과 아밀로스의 물리적 조성이 개선된 변이체를 육성하여 품질이 우수한 5MT 저항성 고품질미 벼를 육성하고자 하였다.

전분대사 중에서 배유 발달의 중, 후기에 많이 발현하는 amylose 합성을 유도하는 효소인 waxy (GBSS1) 유전자와 SSS1 유전자의 발현억제를 유도하기 위하여 35S promoter를 유전자의 앞 부위에 부착하여 RNA interference (RNAi)에 의하여 각 유전자의 발현억제를 유도함으로써 아밀로펙틴의 생산량을 증가시키고 고식미 발현을 위한 최적의 전분조성을 유도하기 위하여 재조합 RNAi 벡터를 작성하였다 (Fig 27). 유전자의 발현억제를 위한 RNAi 운반체의 제작은 식물 유전자 운반체로서 HPT 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pCAMBIA1300 운반체에 Waxy 유전자와 SSS1 유전자를 이용하여 GUS linker DNA의 앞, 뒤에 상호 역방향으로 연결한 후 각각 pCAMW-Ri, pCAMS-Ri 라 명명하였다. 현재 선발된 5MT 저항성 계통들을 이용하여 형질전환을 수행하여 일부 형질전환 개체를 얻어 유전자 도입여부를 확인 중에 있다.



Fig 27. Recombinant vector construction of 35S::Waxy-Ri (pCAMW-Ri) and 35S::SSS1-Ri (pCAMS-Ri).

또한, 전분대사 중에서 amylose 합성에 관련된 주요 효소 유전자의 무발현 변이체와 함께 저발현 벼 계통을 육성하여 고식미도를 구성하는 낮은 아밀로스 함량의 전분조성을 유도하고자 Waxy 유전자와 SSS1 유전자를 이용하여 35S promoter에 의해 조절되고 HPT (hygromycin resistance) 유전자가 포함된 pCAMBIA1300 벡터에 각각의 유전자를 antisense 방향으로 각각 삽입하여 antisense 벡터를 구축하여 AS-GBSS, AS-SSS1으로 명명하였다(Fig 28). 현재 재조합 유전자를 *Agrobacterium* 방법을 이용한 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 형질전환을 진행하고 있으며, 일부 형질전환체를 확보하여 genomic DNA를 추출한 후 목표 유전자의 도입여부를 확인하고 있는 중이다.

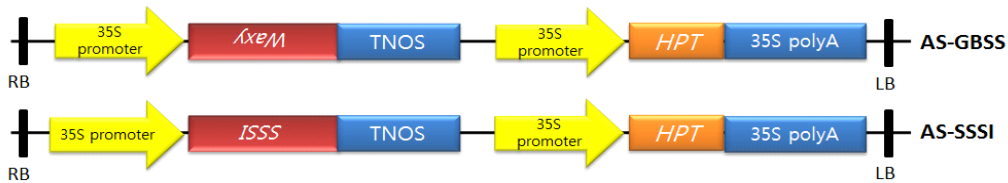


Fig 28. Recombinant vector construction of 35S::Waxy-AS (AS-GBSS) and 35S::SSS1-AS (AS-SSS1).

#### 나. 전분대사 관련 유전자 과발현 형질전환체 육성

전분대사 중에서 전분가지화효소인 Sbe1 유전자의 과발현을 위해 종자 특이적인 프로모터를 유전자 앞 부위에 부착하여 종자 형성시에 보다 효율적으로 유전자 발현을 유도하여 아밀로펙틴의 생산량을 증가시키고 고식미 발현을 위한 최적의 전분조성을 유도하기 위하여 globulin promoter에 의해 발현이 조절되고 bar 유전자를 선발마커로 사용한 벡터를 구축하였고 각각 pMGR로 명명하였다 (Fig 29).

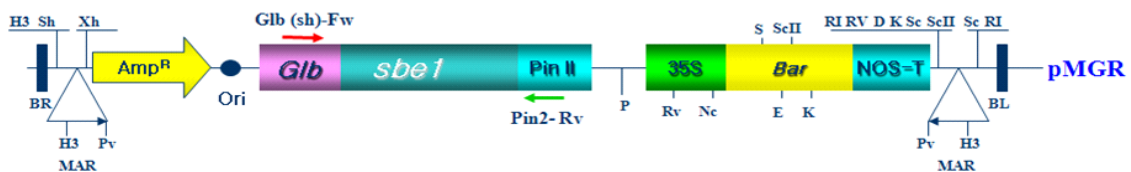


Fig 29. Recombinant vector construction of *Glb::Sbe1*.

벡터 구축 후 앞에서 설명한 벼 형질전환 방법을 이용하여 벼 캘러스에 형질전환하여 212개의 형질전환체를 육성하여 현재, 온실에서 재배중이며 genomic DNA를 이용해 선발마커와 유전자를 이용한 형질전환 여부를 확인하고 있다 (Fig 30).

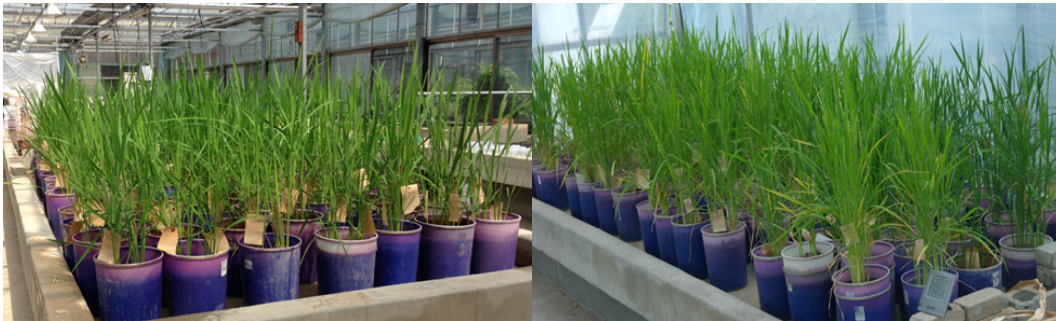


Fig 30. Growth and their phenotype of *Glb::Sbe1* T0 plants.

## 5. TALEN 및 ZFN 기술을 이용한 유전자 발현제어 형질전환체 육성

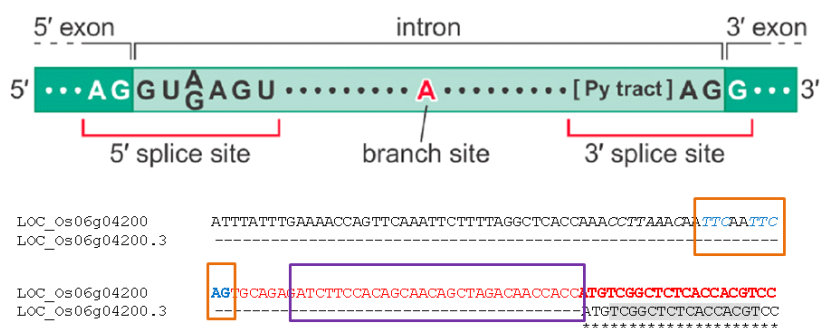
Tryptophan analog인 5MT에 저항성인 벼 계통의 전분조성을 개선하여 고품질미 벼 품종을 육성하기 위하여 다각적인 시도를 하고 있는 바, 전분대사 생합성회로의 마지막 부분에서 아밀로펙틴과 아밀로스의 생합성에 관여하는 GBSS1 및 SSS1 유전자의 발현을 조절함으로써 고품질미를 발현할 수 있는 변이체를 육성하기 위하여, 최근에 유전자의 발현조절에 새롭게 시도되고 있는 ZFN (zinc finger nuclease) 기술과 TALEN (transcription activator-like effector nuclease) 기술을 이용하여 GBSS1 및 SSS4A 유전자의 발현을 조절하는 실험을 수행하였다.

### 가. TALEN 기술을 이용한 GBSS1 발현제어

#### (1) 벡터 구축을 위한 유전자 구조분석

GBSS1 유전자의 효율적인 발현제어를 위하여 GBSS1 유전자의 구조분석 결과 Fig 31A와 같이 첫 번째 Intron과 2번째 Exon 사이의 splicing site에서 transcription을 조절하여 유전자 발현에 변화를 줄 수 있을 것으로 생각되어 regulatory element가 있는 부위에 mutation을 주는 방식으로 발현의 정량적인 variation을 유도하고자 이 부분을 타겟으로 선정하였다.

(A) Splicing consensus sequence



(B) TALEN Design

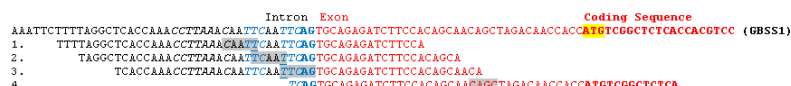


Fig 31. (A) Analysis of splicing consensus sequence in GBSS1 gene from *Oryza sativa Japonica* group. (B) Sequence analysis for TALEN design.

Fig 31에서 보는 바와 같이 box안이 small deletion on Intron 1/Exon 2 junction element이며 이중 파란색으로 표시된 부분이 splicing consensus에 일치한다. TALEN target site 탐색 후 binding site 디자인을 위하여 4개의 조합을 구축하였고, 합성된 TALENs 세트를 이용하여 TALEN::GBSS1 벡터 제작을 수행하였다 (Fig 31B, Fig 32).

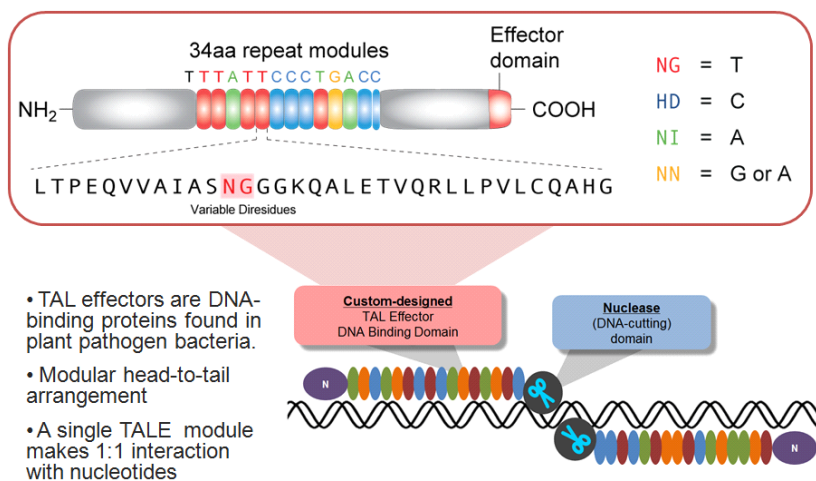


Fig 32. TALE DNA binding domain and overall structure of TALEN.

디자인된 염기서열 합성과 TALENs 조합을 위해 기본 TALEN 스크리닝 벡터에 left half-site와 right half-site를 각각 붙이고 non homologous end-joining (NHEJ) frame을 제작하였고, GFP 활성으로 합성 여부를 확인하였다 (Fig 33, Fig 34).

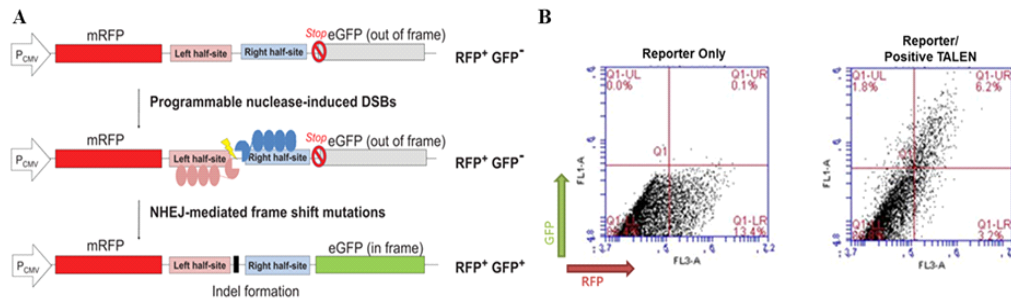
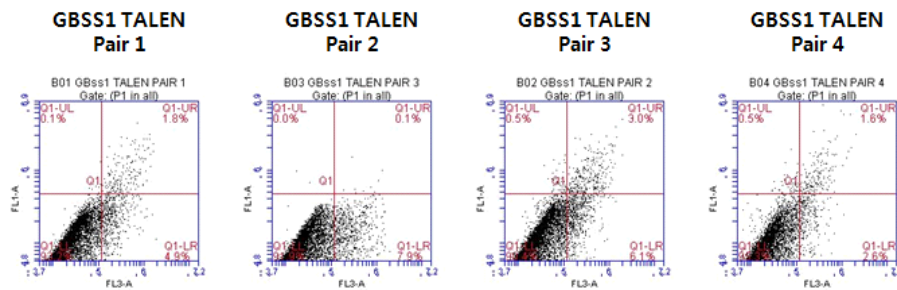


Fig 33. (A) Combination of TALENs binding site using a cell-based green fluorescent protein (GFP) reporter assay to determine if they are active in cell-culture-based system. (B) Analysis of fluorescence-activated cell sorting (FACS) for GFP with GFP+positive TALEN cells.



	Sample	Positive Control	%
Rice GBSS1 TALEN L1/R1 (CMV RG2S)	<b>1.9%</b>	8.0%	<b>23.75</b>
Rice GBSS1 TALEN L2/R2 (CMV RG2S)	<b>3.5%</b>	8.0%	<b>43.75</b>
Rice GBSS1 TALEN L3/R3 (CMV RG2S)	0.1%	8.0%	1.25
Rice GBSS1 TALEN L4/R4 (CMV RG2S)	<b>2.0%</b>	8.0%	<b>25.00</b>

Fig 34. Analysis of fluorescence-activated cell sorting (FACS) for GFP with GFP+GBSS1 TALEN cells.

## (2) TALEN::GBSS1 발현을 위한 식물벡터구축

식물 형질전환용 운반체는 pTA7002 (생명공학연구원에서 분양받음)를 모벡터로 사용하였고, 목표유전자의 발현을 검정하기 위하여 본 연구실에서 클로 OsGBSS1 유전자를 ning한CaMV 35S 프로모터에 연결하여 제작하였다. pTA7002 벡터는 갈락토오스에 의해 활성화되는 전사촉진인자로서 갈락토오스를 대사시키는 효소들의 생성에 관여하는 GAL4(GVG) binding domain이 6xUASg에 결합하여 전사를 촉진하므로 glucocorticoid-inducible (DEX)에 관여하는 특이적 프로모터에 의해 제어되는 유전자를 이용하여 형질전환체를 선발하고자 하였다. 실험에 사용된 운반체의 모식도는 Fig 35와 같다.

식물 발현용 vector 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 형질전환 시켰다. 28°C에서 동일한 방법으로 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* competent



cell GV3101를 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1  $\mu$ L와 섞어서 electroporation cuvette에 주입하였다. 그 다음 1,440 V로 전기충격을 가하여 형질전환 시킨 후 SOC 배지 1 mL을 주입하여 혼합한 후, 멸균된 시험관에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 50 mg/L을 포함한 AB agar 배지에 200  $\mu$ L를 피펫으로 떨어뜨려서 도말하고, 28°C 항온기에서 petri dish에 2~3일 동안 배양하여 colony를 관찰하였다. Colony PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하고, 확인된 균주의 배양은 kanamycin 50 mg/L이 첨가된 AB 액체배지에 접종한 후, 2~3일 동안 28°C incubator에서 200 rpm으로 배양했다. 배양액은 60% glycerol을 동량 첨가하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 저장하였다.



Fig 35. Recombinant vector construction of TALEN::GBSS1.

벼 성숙종자를 세척한 후 2,4-D가 포함된 N6 (Chu et al. 1975) 배지에 치상하여 30°C 암상 상태에서 5일간 배양한 뒤 건전한 캘러스가 형성되기 시작한 것을 15 mL의 아그로박테리움 현탁액이 담겨있는 튜브에 담가 약 20분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 아그로박테리움을 제거하였다. 아그로박테리움을 접종한 종자를 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mg/L silver nitrate(AgNO<sub>3</sub>), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 깔고 그 위에 치상하여 25°C 암조건에서 3일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해 필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25°C 암조건에서 4일간 공동 배양하였다.

각각의 TALEN::GBSS1 L1/R1, TALEN::GBSS1 L2/R2, TALEN::GBSS1 L3/R3, TALEN::GBSS1 L4/R4 clone으로부터 TALEN-형질전환체 육성: 공동배양 기간 동안 아그로박테리움의 과도한 성장을 막고 아그로박테리움 도입에 따른 식물세포의 방어기작으로 생성될 수 있는 물질을 줄이기 위해 1 mM dithiothreitol(DTT), 3 mg/L silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) 등을 배지에 포함하였다. 현재, 각각의 TALEN 조합들을 항생제 선발배지에서 선발을 진행하고 있는 중이다.

## 나. ZFN 기술을 이용한 SSS4 유전자 ZFN-vector 작성

### (1) SSS4 유전자 구조분석

SSS4 유전자의 ZFN binding이 가능한 영역을 조사하기 위하여 NCBI database를 이용하여 SSS4 유전자 구조분석 결과 SSS4A의 엑손의 크기는 2,998 bp로 ATG와 TAA 코돈을 포함하고 있으며, 이로부터 얻어진 cDNA full length 는 2,928 bp 이었다.

SSS4A 염기서열 내에 ZFN binding site를 찾기 위해 SSS4A의 exon sequence 만을 추출하여 분석한 결과 엑손 1영역에서 5'-CCCGCTTGCC-GTGAGTGCCT-3', 엑손 2영역에서 5'-TGTGTGGTAG-GTACTGCCTT-3', 엑손 3영역에서 5'-ATTAACACAG-GTATGGAATG-3', 엑손 4영역에서 5'-ACATGGCTAG-GTATTAAATT-3'와 같이 총 4개의 엑손에서 ZFN binding이 가능한 영역이 존재함을 확인하였다 (Fig 36).

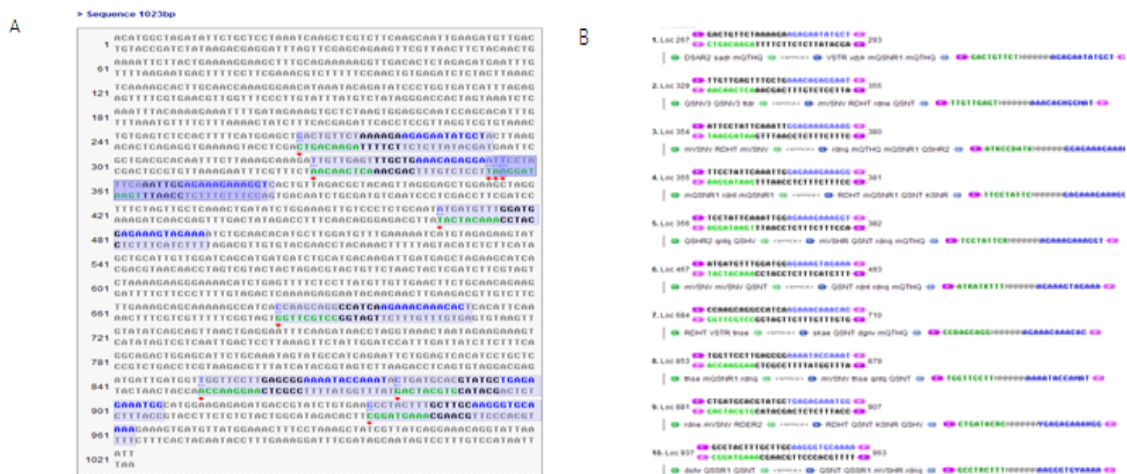


Fig 36. ZFN bind to the target site. A, Analysis of ZFN binding site in exon 4 region of SSS4A gene from chromosome 1 of *Oryza sativa* Japonica group. B, Selected locus of ZFN binding site in exon 4 region from SSS4A gene.

SSS4A 4 개의 엑손 영역에서 확인된 ZFN binding site 중 ZFN::SSS4A 벡터 구축용 target 영역선발을 위해 10 개의 다양한 binding site를 확보하였다. ZFN target site 탐색 후 binding site 디자인을 위하여 binding 활성이 높은 zinc finger nuclease를 이용하여 최종 3 개 또는 4 개의 세트가 5'과 3' 방향으로 각각 결합될 수 있도록 ZFN binding site를 조합하였다. 이와 같은 방법으로 합성된 ZFNs 세트를 이용하여 ZFN::SSS4A 벡터 제작을 수행하였다. 디자인된 염기서열 합성과 ZFNs 조합을 위해 기본 ZFN 스크리닝 벡터에 left half-site와 right half-site를 각각 붙이고 non homologous end-joining (NHEJ) frame을 제작하였고, GFP 활성으로 합성 여부를 확인하였다. 확인한 결과 reporter gene에 ZFN::SSS4A이 결합된 벡터의 활성은 control과 비교하여 오차 범위 내에서 결합과 활성이 양호한 것으로 확인하였다 (Fig 37).

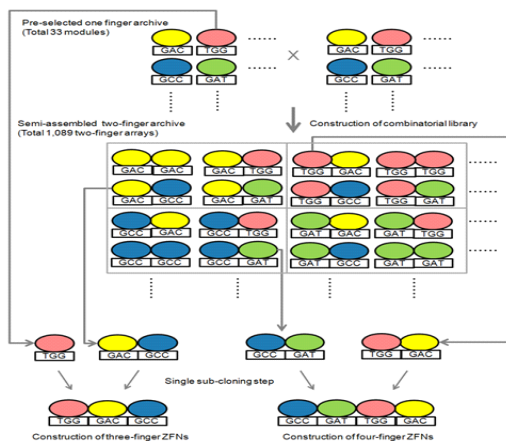


Fig 37. ZFN half-sites and resulting query sequences with 6 or 12 bp spacing. ZFN site generates six query sequences based on the two half-sites entered for homo-dimerization, and two different spacings are allowed between the half-sites.

SSS4A 유전자내 exon 4 중 ZFN target 부분으로 분석된 10 개의 binding site 중 Loc 355-381 영역 5'-TTCCTATTC-GAGAAAGAAAGG-3'의 binding site를 제작하여 먼저 reporter gene의 활성을 측정해 본 결과 control과 같은 활성을 보였음을 확인할 수 있었다 (Fig 38). 확인된 Loc 355-381의 ZFN binding site 제작을 위하여 SSS4A 유전자의 엑손 4 영역에 제작된 ZFN left와 right의 half-sites 영역을 각각 결합하고 각각의 half-site는 FokI enzyme으로 결합하여 binding site를 완성하였다. DNA cleaving-domain인 FokI enzyme이 결합된 조합을 p3-4 ZFN plasmid vector에 XmaI 과 XhoI 제한효소를 이용하여 cloning 하였다 (Fig 39).

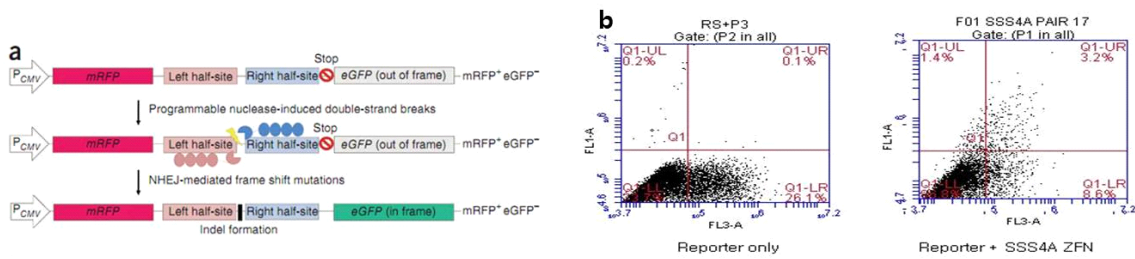


Fig 38. **a**, Combination of ZFNs binding site using a cell-based green fluorescent protein (GFP) reporter assay to determine if they are active in cell-culture-based system. **b**, Analysis of fluorescence-activated cell sorting (FACS) for GFP with GFP+SSS4A ZFN cells.

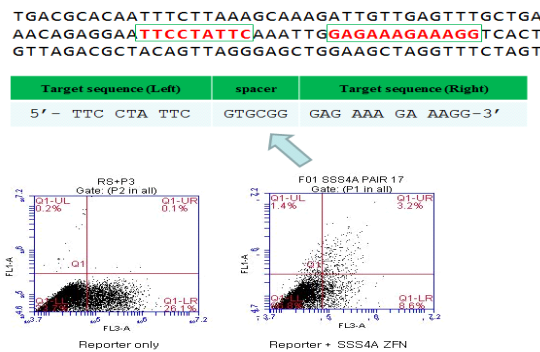
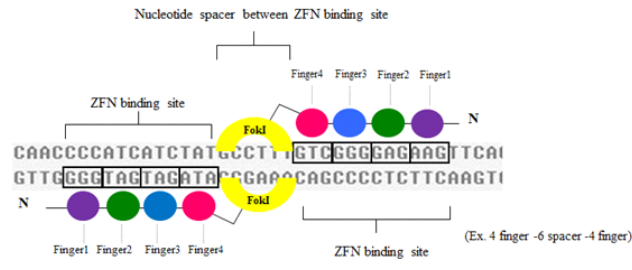


Fig 39. Combination of Loc 355-381 region using a cell-based green fluorescent-activated cell sorting assay.

최종 완성된 ZFN vector는 nucleotide spacer 부분에 DNA cleaving-domain인 FokI enzyme을 결합하고 상보적으로 양 끝에 3 개 혹은 4 개의 ZFNs binding site를 결합하여 벡터 게놈내에 target 유전자 SSS4A 4번째 엑손 영역에 binding 할 수 있게 디자인 하였다 (Fig 40).



\* ZFNs, which function as dimers, consist of an N-terminal zinc finger DNA-binding domain and a C-terminal FokI nuclease domain.

Fig 40. The N-terminal zinc finger DNA-binding domain and C-terminal FokI nuclease domain.

(2) ZFN 기술을 이용한 SSS4 유전자 ZFN-vector 작성

(가) Gene target site를 가진 ZFN::SSS4A 벡터구축

식물 형질전환용 운반체는 pPDG1 벡터 (서울대 김주곤 교수팀으로부터 분양받음)와 pTA7002 (생명공학연구원에서 분양받음)를 모벡터로 사용하였고, 목표유전자의 발현을 검정하기 위하여 본 연구실에서 클로닝한 OsSSS4A 유전자를 CaMV 35S 및 PDG1 프로모터에 연결하여 제작하였다. 실험에 사용된 운반체의 모식도는 Fig 41과 같다.

식물 발현용 vector 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다. 28°C에서 동일한 방법으로 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* competent cell LBA4404를 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1 µL와 섞어서 electroporation cuvette에 주입하였다. 그 다음 1,440 V로 전기충격을 가하여 형질전환 시킨 후 SOC 배지 1 mL을 주입하여 혼합한 후, 멸균된 시험관에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 50 mg/L을 포함한 AB agar 배지에 200 µL를 피펫으로 떨어뜨려서 도말하고, 28°C 항온기에서 petri dish에 2~3일 동안 배양하여 colony를 관찰하였다. Colony PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하고, 확인된 균주의 배양은 kanamycin 50 mg/L이 첨가된 AB 액체배지에 접종한 후, 2~3일 동안 28°C incubator에서 200 rpm으로 배양했다. 배양액은 50% glycerol을 동량 첨가하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 저장하였다.

형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 Bar 유전자를 이용하였다 (Fig 41A). 또한 pTA7002 벡터는 갈락토오스에 의해 활성화되는 전사촉진인자로서 갈락토오스를 대사시키는 효소들의 생성에 관여하는 GAL4(GVG) binding domain 이 6xUASg에 결합하여 전사를 촉진하므로 glucocorticoid-inducible (DEX)에 관여하는 특이적 프로모터에 의해 제어되는 유전자를 이용하였고, HPT 유전자를 이용하여 형질전환체를 선발 하였다 (Fig 41B).

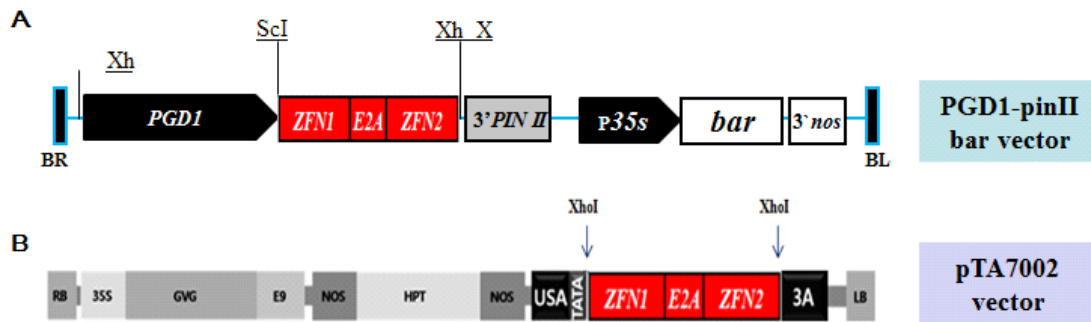


Fig 41. Ti-plasmid vector construct for overexpression of OsSSS4A gene in rice. B, The plasmid pTA7002 are vectors for inducible transcription. Both the cis- and trans- elements are carried in the T-DNA region of the plasmids.

(나) ZFN::SSS4A 벡터의 형질전환체 육성

벼 성숙종자를 세척한 후 2,4-D가 포함된 N6 (Chu et al. 1975) 배지에 치상하여 30°C 암상태에서 5일간 배양한 뒤 건전한 캘러스를 15 mL의 아그로박테리움 현탁액이 담겨있는 튜브에 담가 약 20분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 아그로박테리움을 제거하였다. 아그로박테리움을 접종한 종자를 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mg/L silver nitrate(AgNO<sub>3</sub>), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 깔고 그 위에 치상하여 25°C 암조건에서 3일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해 필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25°C 암조건에서 4일간 공동 배양하였다.

각각의 ZFN::SSS4A clone으로부터 ZFN-형질전환체 육성: 공동배양 기간 동안 아그로박테리움의 과도한 성장을 막고 아그로박테리움 도입에 따른 식물세포의 방어기작으로 생성될 수 있는 물질을 줄이기 위해 1 mM dithiothreitol(DTT), 3 mg/L silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) 등을 배지에 포함하였다. 공동배양시 아그로박테리움의 과도한 생육을 억제할 수 있는 항산화 물질의 첨가와 더불어 사용되는 호르몬의 적절한 조절은 공동배양 과정에서 효율적인 캘러스 형성 및 아그로박테리움에 의한 목표 유전자의 도입을 가능하게 할 수 있을 것으로 판단된다.

벼에 형질전환을 위해 벼 발아초기 종자를 이용한 단기형질전환 방법(Lee 등, 2011)을 이용하였다. 배발생 캘러스 선발을 위해 50 mg/L hygromycin (4 mg/L ppt)와 400 mg/L carbenicillin이 포함된 N6D 배지에 옮겨 32 °C 지속 광조건으로 2주 동안 배양하였고, 그 후에 선발배지에서 형질전환 캘러스를 선발하였다(Fig 42A, 42B, 42C). 배양 후 배반으로부터 왕성하게 증식하는 캘러스를 SF (shoot formation) 배지로 옮겨 식물체의 재분화를 유도하였다. 항생제가 포함된 배지에서 2주가 지난 후부터 캘러스에서 green spot이 형성되기 시작하였고 (Fig 42D, 42E), 약 3주의 배양기간 후에는 캘러스에서 shoot가 형성되기 시작하였다 (Fig 42F). 항생제 배지에서 SF 배지로 옮긴 후 green spot 형성 및 재분화 효율은 접종하는 유전자에 따라 다른 양상을 보였다. 지상부가 재분화된 식물체를 RF (root formation) 배지로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였으며(Fig 42G, 42H), 순화된 벼 형질전환 식물체를 온실에서 포트에 이식하여 재배하였다 (Fig 42I).

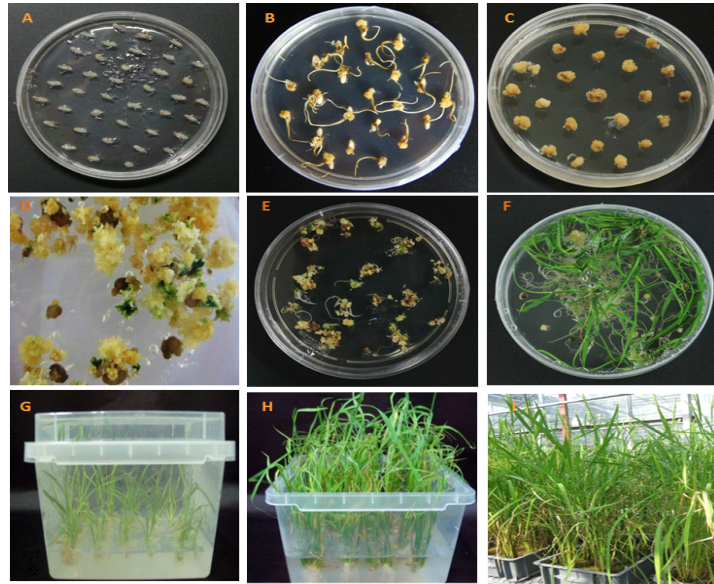


Fig 42. Introduction of *OsSSS4A* gene through *Agrobacterium*-mediated transformation. (A), (B) inoculation and co-cultivation in 2N6-AS media, (C) callus growing in the 2N6-C media, (D), (E) green spot formation, (F) shoot formation and elongation, (G), (H) root formation and elongation, and (I) acclimatization were conducted with protocol.

(다) PCR 분석에 의한 ZFN::SSS4 유전자 도입 확인

벼 형질전환방법을 통해 재분화 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 ZFN::SSS4 유전자의 도입여부를 알아보기 위해, 잎 시료를 채취하여 genomic DNA를 분리한 후 도입유전자 PGDI-pinII Bar vector에서 Bar 유전자 및 pTA7002 vector에서 hygromycin (HPT) 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. pTA7002 vector를 사용한 경우 30개의 형질전환체를 확보하여 PCR을 수행한 결과 그 중 26 개의 재분화 식물체에서 HPT 유전자가 검출되었다 (Fig 43). 이는 *OsSSS4A* 유전자가 벼 게놈에 잘 도입되어 있음을 의미하며, 이들 형질전환체는 T<sub>0</sub> 세대부터 계통번호를 부여하였다. PCR 결과를 통해 선발된 형질전환체들을 이용하여 이후의 분석을 수행하고 있다.



Fig 43. PCR amplification of transferred gene (HPT) in transgenic rice lines. The amplification products were separated using a 1.0% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane WT; wild type plant, Lane 1-30; independent transgenic lines.

## 제2절(협동) Anthranilate synthase 유전자의 gene targeting 및 분자 육종에 의한 고품질 벼 개발

### 1. 5-methyltryptophan 저항성 벼 계통 육성

5MT 저항성 계통 확인 (M<sub>10</sub>세대); tryptophan analog 인 5-methyltryptophan 50ppm을 포함한 MS 배지에서 14일간 생육시킨 결과는 Fig 1과 같다. 5MT 저항성계통 #2와 #4 계통의 뿌리 및 shoot 생육은 정상적이었으며, 대조구에서는 생육이 되지 않았다. 이런 결과는 5-methyltryptophan이 포함된 배지에서 생육할 수 있는 것은 세포내 Trp 생합성계에 이상이 생겨 feedback inhibition 작용을 하지 못하도록 변이가 유도되어 결국 세포내에 tryptophan 함량이 높아지는 현상이다. 초기 5MT 저항성 돌연변이체에서 tryptophan 함량이 대조구에 비해 8배 이상 높게 나타났다.

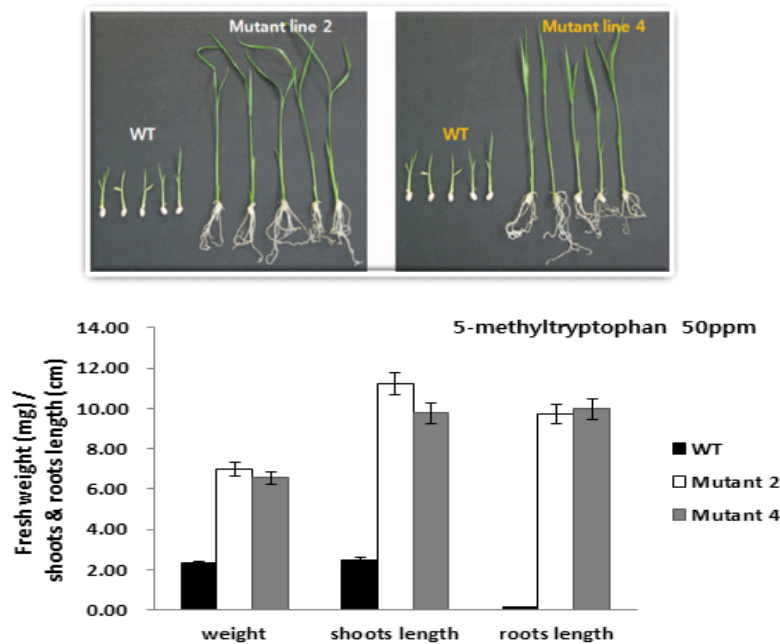


Fig 1. Phenotype of the wild type and mutant plants in rice. After 14 days of 5MT treatment plants were photographed (A) and examined for relative fresh weight, shoots and roots length from mutant plants of 5-methyltryptophan, (B). Average measurements and standard deviation are shown for five plants from one representative experiment.

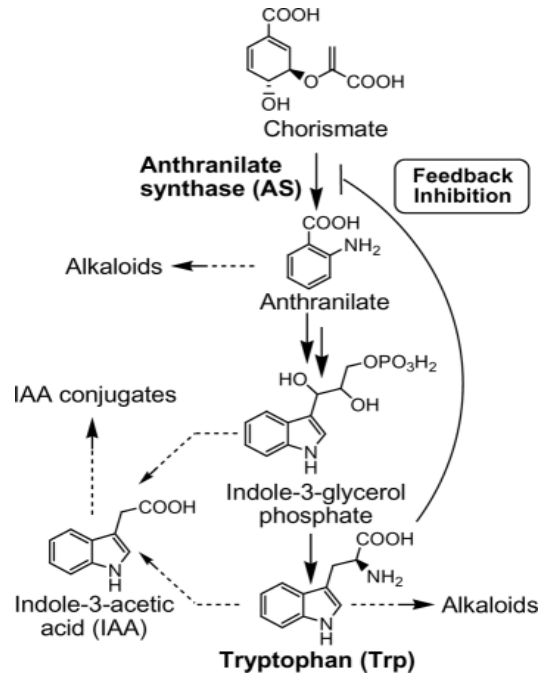


Fig 2. Biosynthetic pathway of tryptophan (Trp) in plants. Related pathways referred to in this study are also shown. The curved line from Trp to anthranilate synthase (AS) indicates negative feedback regulation.

## 2. AS1 및 AS2 유전자 분리 및 특성

5MT저항성 계통은 Trp 생합성계의 제어는 tryptophan 합성계 중에서 작용하는 key enzyme인 anthranilate synthase ASa subunit 유전자가 변이되어 최종 산물인 Trp 피드백 억제에 감도 낮게 나타났다. Anthranilate synthase (AS) 유전자의 double mutations (S126F/L530D) 영역에서 gene targeting 용 벡터 구축을 위하여 primers set를 제작하였다. primer 1 forward: ATGGAGTCCATCGCCGCCGCCA, reverse: AGAGGTTTGAGAGGCGAAC, primer 2 forward: GATGATGTTCTCGTCTTCGA, reverse: AGCTTTCGTAGACAAGGAATAG. 제작된 primers를 사용하여 PCR 분석을 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35 cycles 하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. PCR 산물을 0.8% agarose gel에 영동한 결과 예상했던 1.2kbp 밴드가 검출되었다 (Fig 3). 이들 밴드를 gel로부터 회수하여 pGEM T-easy vector에 삽입한 후 염기서열을 분석하였다 (Fig 4). 유전자의 전장은 2,248bp이며, 1,824bp의 ORF와 35bp크기의 5' UTR, 349bp의 3' UTR으로 이루어졌다. 5MT 저항성 계통에서는 2개의 점돌연변이가 TCC(S), CTT(L)로 나타났다.



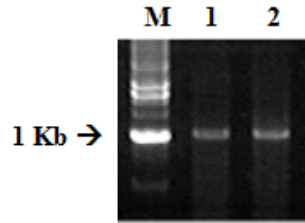


Fig 3. PCR amplification of double mutations region of anthranilate synthase (AS) gene. The amplification products size were 1.2 Kb, respectively. Lane M; DNA ladder, Lane 1 and 2 : PCR products of double mutations region by primer 1 and 2.

```

1  ATGGAGTCCGATCGCCCGCCGCGCGCTTCAAGGCGCTCGCCCTCGCCCGCCCGCCCGCACT  20
M E S I A A T F T F R L L A R R F A T
61  CCGGGCGCGCGCGCCCGCCGCTTGAAGGAGAGCGCGGTAGCGGAGGAGGAGGAGG  40
P A A A S A A A V R F A A G A G A G R R
121 AGAACGAGTAGCGCGCGCGCGCTGAGGCTCTCCCGGGGAGCCAGGCGAAGCGCGGTT  60
R T S S R C D Q A T R A I E S D R I R F F E A
181 ATCAACGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGGAGAGGAGGAGGAGGAGGCGTTCTCGAGGG  80
I H G S R A I A R R A I E S D R I R F F E A
241 GCGAGCGTGGAGCGGAGGCGCACTGGTGGCGATGTGGAGTGCATGCTGTCGAGC  100
A E R G S S K G S L V F F M W E S I V S D
301 CACCTCACCGCGCTGCTCCGCTACCGCTGCTCCCGGAGGCAAGATGAGAGCGCC  120
R D T F P L A Y R Q L V P E D H M E T P
361 AGCTTCCTCTCGAGTCTGGTGGAGGCGCGCGAGGCGCACCCAGCAGTGGTGGTAT  140
S F L F E R V E D G F E S T T R V G R
421 AGCATGGTGGAGCGCGCGCGCTGAGTGGAGTGGTGGGAAAGGAGGAGGCAAGGTGCAAT  160
S M V G A H P V M E V V A K E H K V T I
481 ATGACCCGAGAAAGCGAGCTGAGCGAGCGTGGATGATTCCTATTGAGATCCD  180
M D H E K G K V E G D V D D F M Q I P
541 AGAGCATGAGAGGATGGACCCGCGAGGATGGATGATGCGGATTCGCGATTCGAC  200
R S M M E G W H G Q G D G L F E D S F T
601 GGTGATGGTGGGTTGTTTGGTATGATACAGTCCGATATGTTGAAAGAGAGGCT  220
G Q W V G F F S V D T V R V V E K K K L
661 GCTTGTGGTGGGTTGTTTGGTATGATACAGTCCGATATGTTGAAAGAGAGGCT  240
F S G A P G D D R N L P D V H L G L V
721 GGTGATGGTGGGTTGTTTGGTATGATACAGTCCGATATGTTGAAAGAGAGGCT  260
D D V L V F D N V E K K V V V I H W V N
781 CTGATGGTGGGTTGTTTGGTATGATACAGTCCGATATGTTGAAAGAGAGGCT  280
L D R H A T T E D A F Q D G K S R L N L
841 TTGCTATTAAAGTCCGCAATTTCAATGTAGCGTAAAGCTTTTCGAGGATTTGTAAAGT  300
L S K V H N S H V P K L S P S F V K
901 CACACTGGCAGTTTGGTACACCTTTGAAACAATCAACCATGACAGATGATGATGAG  320
H T R Q D A T E H N K S T M T S D E V K
961 AATGCTGTTATGAGGCTAAGGAGCATATTAGGCTGGTATATTTCGAGTATTGTTA  340
H A V M Q A K E H I M G D I I F G V L
1021 AGCCAGAGGTTGAGAGGCGGACATACCGCAATCCATTGAAAGTCTTCGAGTTACGA  360
S D R F E R R T V A N P R E V V R A L R
1081 ATTGTGAACCCAAAGTCCATAGGATATGTACAGGCAAGAGGCTGTGCTGGTACGA  380
I V N P S Y M R V V G Q R I I R P L A
1141 TCTAGTCCGAAATTTACTGCTGTGAGGAGGTTAAATATTAAACCGTCCAGTTCCT  400
S P R E S L T T R P R K G K I I R P L A
1201 GGGACTGTTGAGAGGCGGACAGAGAGGAAAGTGAATGCAAGAGCAACAGTACTA  420
S E K K D A E G T T G A A C A T A T T A G C T T G A G A T T G G A A G A T A G T
1261 AGTGATGAAGAAGAGTGTGCAACATATTAGCTGTGAGATTGGAGGAGATAGCT  440
S E K K D M E S D S R H D V
1321 GGAAGGCTCCCAACCTGGATCTGTGAAAGTGGAGAAATTAATGAACATTGAAGGCTAD  460
G R V S K P G S V K V E K L M R I E R Y
1381 TCCATGATGAGCAFGATTCGACGGTGGAGGATGGATGATGATGATGATGATGAT  480
S H V M H I S S V S D E L D D H L O S
1441 TGGATGCTGAGAGCGCTGCTGGTGGAGGATGGAGGATGGAGGATGGAGGATGG  500
W D A L R A A L P V G T A S G P K V K
1501 GCGATGGAGCTATTAGAGGAGTGGAGGATGGAGGATGGAGGATGGAGGATGGAG  520
A M E L D E L P V T R R G P S G O L
1561 GAGGAGTATGATTTGAGGAGGATGGAGGATGGAGGATGGAGGATGGAGGATGGAG  540
G O I S F D G D M L I A L A L E T T I V F
1621 TCAACAGCGGCAAGCCAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  560
S T A P S H N T M V S V K D T E R R R E
1681 TGGTCCGCTCAGCTTCAGGCTGGTGGAGATGTTGCTGATAGGAGCGAGAGAGGAG  580
W V A H L D A O A G I V A D S S P D O E
1741 CAGCTGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  600
Q R E C E N K A A L A R A I D L A E S
1801 CGTTTCATGACACAGGATAGAGTCTCTCGAGAGAGTGTATTTTGTAGTCTTGTTG  600
A F V D E
ATGGTTCCTTCGCTGATGTTTGAAGGAGAAAGGTATCATCGAGTGGATTTGAGAGAAACA
TAAAGCTATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GCTGTTGATGAGAAAGGTATAGCTTTTGAAGTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTGATGAT
GTGGGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CACGGTGTGCAAGTTCCTCCGCTATCATCTTCAGTTAATTTCG

```

Fig 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the OsASA2 gene of anthranilate synthase alpha 2 subunit. The red color sequences indicate double mutations site. Underlined sequences indicate the primers for cloning and the restriction enzyme site is marked by bold.

### 3. AS1 및 AS2 유전자의 벼 게놈내 위치 확인 및 유전자 특성분석

Trp 생합성회로의 key enzyme인 Anthranilate synthase (AS)와 관련된 유전자는 OsASA1과 OsASA2로 알려져 있다 (NCBI database). 이들 유전자는 3번 염색체상에 위치하고 있으며, OsASA1 short arm에 존재하며 11개의 엑손으로 구성되어 있으며, 총 1,831bp의 ORF로 이루어졌다. 또한 OsASA2 유전자는 3번 염색체 long arm에 위치하며, 10개의 엑손영역과 9개의 인트론 영역으로 1,821bp의 ORF로 이루어져 있다 (Fig 5).

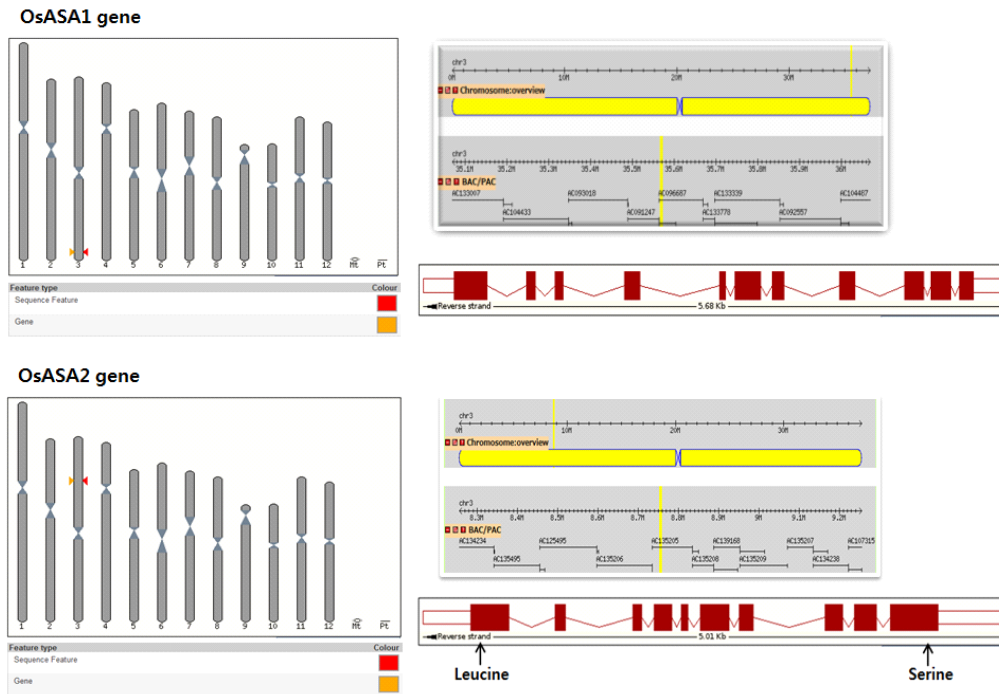


Fig 5. Genomic structure and transcript analysis of *OsASA 1* (upper photo) and *OsASA2* (under photo) gene. Red arrows were gene position of chromosomes in rice.

#### 4. 5MT 돌연변이계통으로부터 ASA2 유전자 구조분석

표현형 및 임성 등의 선발지표로 선발한 5MT 저항성 식물체로부터 Trp 생합성계의 제어는 tryptophan 합성계 중에서 작용하는 key enzyme인 anthranilate synthase ASa subunit 유전자가 변이되어 최종 산물인 Trp 피드백 억제에 감도 낮게 나타났다 (Fig 1). Anthranilate synthase (AS) 유전자의 분리를 위해 FW: ATGGAGTCCATCGCCGCCCA, RW: AGCTTTCGTAGACAAGGAATAG 등의 primers를 사용하여 PCR 분석을 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35 cycles 하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. PCR 산물을 0.8% agarose gel에 영동하여 band를 확인하고 pGEM T-easy vector에 삽입한 후 염기서열을 분석하였다. 그 결과 유전자의 전장은 2,248bp이며, 1,824 bp의 ORF와 35 bp 크기의 5' UTR, 349 bp의 3' UTR으로 이루어졌다. 5MT 저항성 7계통 중 #2와 #4 계통은 124bp 영역에서 F가 V로 바꾸었으며, 나머지 계통들에서는 2개의 점돌연변이가 126bp 영역에서 TCC(S), 530bp 영역에서 CTT(L)로 나타났다 (Table 1).

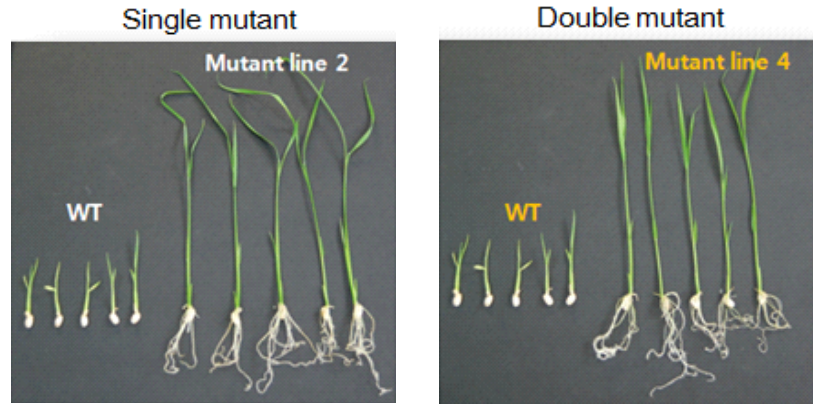


Fig 6. Phenotype of the wild type and mutant plants in rice. After 14 days of 5MT treatment plants were photographed

Table 1. Gene structure of ASA2 gene encoding anthranilate synthase ASa subunit of 5MT resistance lines

5MT lines	Variation regions (5' - 3')	
	F124V / S126F aa	L530D aa
1	■	■
2	■	
3	■	■
4	■	■
5	■	
6	■	■
7	■	■

### 5. OsASA2 유전자 (S126F/L530D double mutations ) 과발현용 Ti-plasmid 벡터구축

식물 형질전환용 운반체는 pPDG1 벡터 (서울대 김주곤 교수팀으로부터 분양받음)를 모벡터로 사용하였고, 목표유전자의 발현을 검정하기 위하여 본 연구실에서 클로닝한 OsASA2 (anthranilate synthase) 유전자를 CaMV 35S 및 PDG1 프로모터에 연결하여 제작하였다 (Fig 7).

형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 Bar 유전자를 이용하였다. 실험에 사용된 운반체의 모식도는 Fig. 6과 같다. 식물 발현용 vector 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다. 28°C에서 동일한 방법으로 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* competent cell LBA4404를 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1 µL와 섞어서 electroporation cuvette에 주입하였다. 그 다음 1,440 V로 전기충격을 가하여 형질전환 시킨 후 SOC 배지 1 mL을 주입하여 혼합한 후, 멸균된

시험관에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 50 mg/L을 포함한 AB agar 배지에 200 µL를 피펫으로 떨어뜨려서 도말하고, 28°C 항온기에서 petri dish에 2 ~ 3일 동안 배양하여 colony를 관찰하였다.

Colony PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하고, 확인된 균주의 배양은 kanamycin 50mg/L이 첨가된 AB 액체배지에 접종한 후, 2~3일 동안 28°C incubator에서 200 rpm으로 배양했다. 배양액은 50% glycerol을 동량 첨가하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 저장하였다.

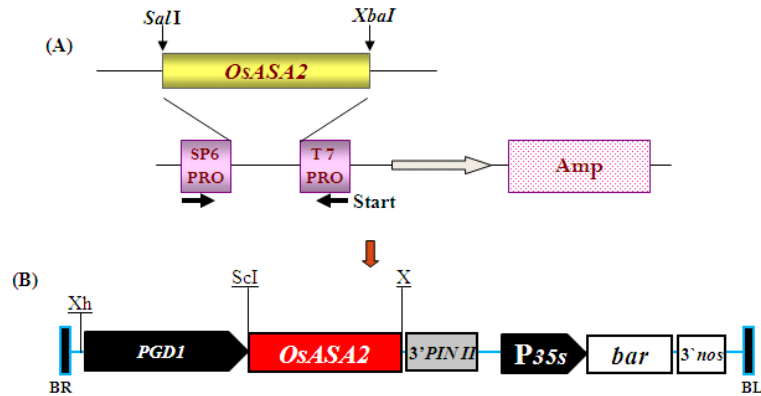


Fig 7. Ti-plasmid vector construct for overexpression of *OsASA2* gene in rice. A PGD1 promoter and CaMV 35s promoter gene, a 3'PINII: protease inhibitor II terminator gene, a herbicide-resistant gene Bar (phosphinotricine acetyltransferase gene) and a nopaline synthase terminator (3'nos). (A) *OsASA2* gene cloned into pGEM T-easy vector, (B) The pPZP-Bar binary vector harboring *OsASA2* gene.

## 6. *OsASA2* 유전자 (S126F/L530D double mutations) 도입 형질전환체 육성

형질전환체 육성 과정 및 육성: 벼에 형질전환하기 위해 일반적으로 많이 이용되는 방법은 벼 종자에서 캘러스를 유기한 후 캘러스에 아그로박테리움균과 함께 접종하는 방법이 주로 이용되고 있는데 보통 형질전환체를 얻기까지 약 4개월이 소요된다. 본 실험에서는 벼 형질전환에 소모되는 시간을 단축시키고자 벼 성숙종자를 세척한 후 N6 액체배지에 24시간 침종한 후 배반 부분이 부풀어 오르기 시작한 종자를 이용하여 아그로박테리움 접종을 시도하였다. 표면 살균한 종자를 2 mg/L 2,4-D가 포함된 N6 (Chu et al. 1975) 액체배지에 침종하여 30°C 암상태에서 24시간 동안 발아시켜, 배 부분이 부풀어 오르며 식물체가 분화가 되기 시작한 종자를 15 mL의 아그로박테리움 현탁액이 담겨있는 튜브에 담가 약 20분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 아그로박테리움을 제거하였다.

아그로박테리움을 접종한 종자를 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mg/L silver nitrate(AgNO<sub>3</sub>), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 깔고 그 위에 치상하여 25°C 암조건에서 3일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해

필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25℃ 암조건에서 4일간 공동 배양하였다. 공동배양 기간 동안 아그로박테리움의 과도한 성장을 막고 아그로박테리움 도입에 따른 식물세포의 방어기작으로 생성될 수 있는 물질을 줄이기 위해 1 mM dithiothreitol(DTT), 3 mg/L silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) 등을 배지에 포함하였다. 7일간의 공동 배양 후 호르몬에 따른 캘러스 형성률을 살펴본 결과는 박테리움에 감염 후 캘러스 형성 및 생육은 그렇지 않았을 경우보다 효율적이지 못하다.

공동배양시 아그로박테리움의 과도한 생육을 억제할 수 있는 항산화 물질의 첨가와 더불어 사용되는 호르몬의 적절한 조절은 공동배양 과정에서 효율적인 캘러스 형성 및 아그로박테리움에 의한 목표 유전자의 도입을 가능하게 할수 있을 것으로 판단된다. 본 실험에 사용한 종자는 아직 캘러스 증식이 충분치 않은 상태이기 때문에, 건전한 상태의 캘러스를 증식시키고 아그로박테리움의 성장 억제를 위해 400 mg/L litter carbenicillin 만이 포함된 N6D medium에 옮겨 32 °C 지속 광조건으로 1주 동안 배양하여 캘러스를 증식하였다(Fig 8).

캘러스 증식 1주 후 건전한 상태의 캘러스를 이용하여 유전자가 삽입된 캘러스 선발을 위해 50 mg/L litter hygromycin과 400 mg/L litter carbenicillin이 포함된 N6D 배지에 옮겨 32 °C 지속 광조건으로 2주 동안 배양하였다. 배양 후 배반으로부터 왕성하게 증식하는 캘러스를 SF (shoot formation) 배지로 옮겨 식물체의 재분화를 유도하였다. 항생제가 포함된 배지에서 2주가 지난 후부터 캘러스에서 green spot이 형성되기 시작하였고, 약 3주의 배양기간 후에는 캘러스에서 shoot가 형성되기 시작하였다. 항생제 배지에서 SF 배지로 옮긴 후 green spot 형성 및 재분화 효율은 접종하는 유전자에 따라 다른 양상을 보였다. 지상부가 재분화된 식물체를 RF (root formation) 배지로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였으며 순화된 벼 형질전환 식물체를 온실 에서 포트에 이식하여 재배하였다. 본 실험에서 사용한 동진벼는 형질전환 캘러스 115개 중 총 35 개의 형질전환 식물체를 얻어 높은 형질전환 효율을 보였다.

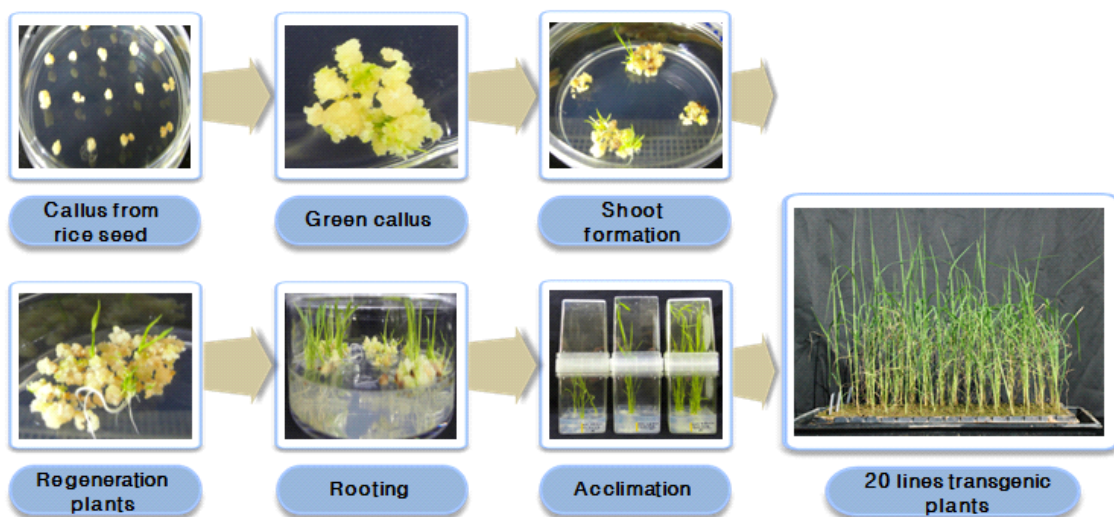


Fig 8. Introduction of OsASA2 gene through Agrobacterium-mediated transformation. Seed soaking in the N6D media, inoculation, co-cultivation in 2N6-AS media, callus growing in the 2N6-C media, shoot formation and elongation, root formation and elongation and acclimatization were conducted with protocol.

## 7. PCR법에 의한 도입유전자 확인

형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 *OsASA2* 유전자의 copy 수를 알아보기 위해, 재 분화된 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도입유전자 *Bar* 및 *OsASA2* 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 조사한 20개의 재분화 식물체에서 *Bar* 및 *OsASA2* 유전자가 검출되었다 (Fig 9). 이는 *OsASA2* 유전자가 벼 게놈에 잘 도입되어 있음을 의미하며, 이들 형질전환체는 T<sub>0</sub>세대부터 계통번호를 부여하였다.

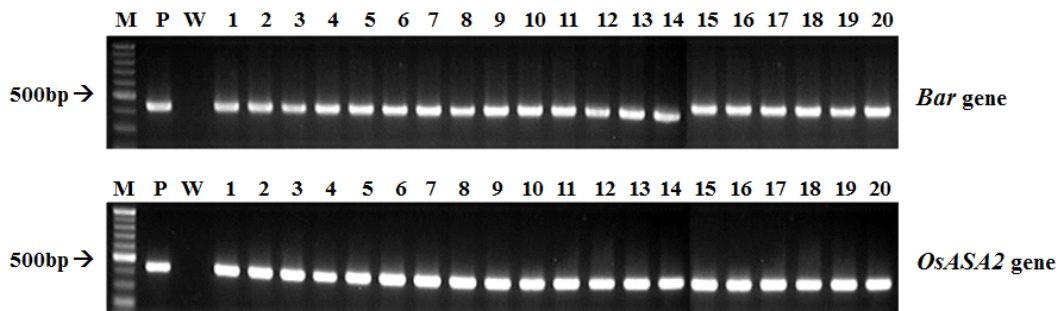


Fig 9. PCR amplification of transferred gene (*Bar*, *OsASA2*) in transgenic rice lines. The amplification products were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane P; PCR products generated from the DNA template of pPZP-*Bar* plasmid that contains the *OsASA2*. Lane W; wild type plant, Lane 1~20; independent transgenic lines.

## 8. TaqMan PCR에 의한 Single copy도입 형질전환체 선발

본 연구에서는 TaqMan PCR에 의한 Single copy도입 형질전환체 선발하기 위하여 Takara 사로부터 제공받은 protocol에 의해 *OsASA2* 유전자 말단에 있는 nos terminator 영역에 특이적 배열을 labeling한 probe primer를 이용하였다. 형질전환체는 *bar* 및 *OsASA2* 유전자로 PCR 분석에 의해 확인된 20개 식물체 게놈을 대상으로 게놈내 *OsASA2* 유전자의 정량을 위한 절대표준농도(absolute standard concentration)을 계산할 수 있었다. 그 총 20개의 형질전환 T<sub>0</sub> 개체중에서 16개 식물체가 도입유전자가 single copy로 삽입되어 있었다 (Fig 10). 이들 결과로부터 본 연구에서 사용된 형질전환 방법의 효용성 및 후대육성을 위해 매우 좋은 protocol이었으며, 얻어진 single copy 도입 식물체를 후대 육성 하고 있다.

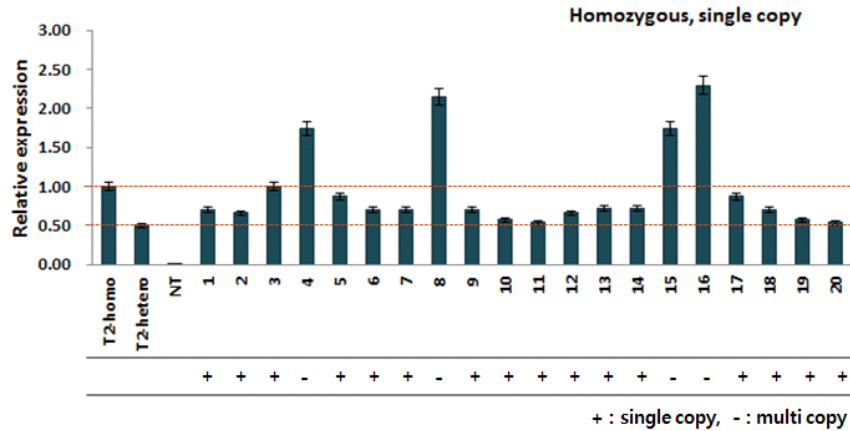


Fig 10. TaqMan PCR analysis for copy number assays used TaqMan probe for selected single copy in transgenic rice.

### 9. OsASA2 유전자가 도입 형질전환체의 발현량분석

OsASA2 유전자가 도입된 형질전환체의 발현량 분석을 위해 RT-PCR 및 qRT-PCR법을 수행한 결과 Fig 11과 Fig 12와 같다. RT-PCR 분석한 결과에서 band화로 나타나 발현량의 차이는 알 수 없으나, 형질전환체들 대부분에서 도입 유전자인 OsASA2 유전자가 세포내에서 잘발현 하고 있음을 시사한다. Real time PCR법에 의한 OsASA2 유전자 정량 결과를 대조구와 비교하여 배수로 표시했을 때, 대부분의 형질전환체에서 높은 발현량을 얻을 수 있었다. 형질전환체 계통 중 #5, #9, #11, #12, #13, #19, #20에서 상대적으로 높은 발현량을 얻을 수 있었다.

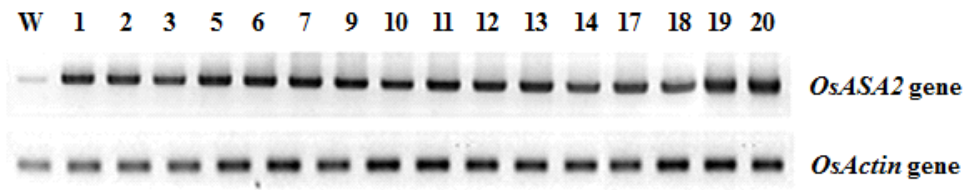


Fig 11. Analysis of OsASA2 expression in the transgenic lines obtained by reverse transcription polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from each plant, and 0.5ug of this RNA was amplified with gene specific primers. As a loading control, the samples were also amplified with specific primers for the rice actin gene. Lane W; PCR generated from the cDNA template of the wild type plant, Lane 1-3, 5-7, 9-14, 17-20; independent transgenic lines of selected single copy.

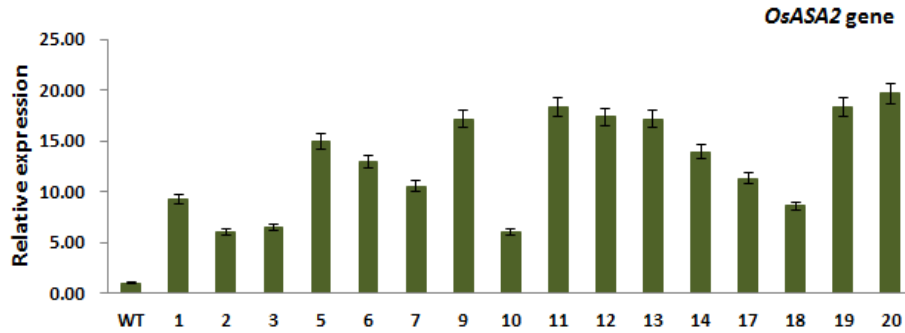


Fig 12. Quantitative RT-PCR analysis of RNA extracted from transgenic lines and wild type control. CT values were calculated using actin expression level as a control. Error bars show the standard error of the mean for three replicate measurements.

### 10. OsASA2 유전자 과 발현 형질전환체의 아미노산 분석

형질전환 계통들 중 single copy로 도입되어 발현량이 높은 #5, #20을 선발하여 유리 아미노산을 분석한 결과 형질전환체 #5 및 #20의 유리아미노산 총량은 대조구에 비해 약 1.8배로 높게 나타났다. 특히 tryptophan, phenylalanine, threonine, serine 및 valine 함량에서 대조구에 비해 6.7, 4.6, 3.6, 2.8 및 2.0배가 높게 나타났다 (Table 2). 따라서 OsASA2 유전자를 과발현 시키면, tryptophan 생합성 회로상에서 feedback inhibition이 둔감하게 되어 아미노산함량이 전체적으로 높아지고, 특정 아미노산이 높은 결과를 초래하였다.

Table 2. Free amino acid contents in transgenic plants and wild type plants. Numbers of given are n mole/g fresh weight.

Amino acid	Transgenic plants		Wild type
	#5	#20	
ASP	101.42	848.57	112.69
THR	851.32	472.85	142.09
SER	1546.49	2321.43	242.04
ASN	12297.36	12821.43	4918.8
GLU	667.33	3761.42	1153.36
PRO	266.46	338.57	232.24
GLY	219.5	508.57	274.38
ALA	6351.88	13521.43	1549.24
VAL	3297.88	790	633.44
MET	29.97	52.86	29.39
ILE	37.79	137.14	101.91
LEU	147.19	212.86	144.05
TYR	408.75	351.42	640.38
PHE	170.06	64.28	62.71
TRY	54.01	44.14	12.53
ARG	508.2	207.15	129.35
HIS	320.5	395.14	265.78
Total	27272.1	33687.8	10441.5



### 11. 형질전환체 후대에서 호모계통육성 및 특성분석

ASA2 유전자를 도입하여 T<sub>0</sub>세대 및 T<sub>1</sub> 세대 분석을 통해 유전자가 벼 게놈에 잘 도입되어 안정적으로 발현하였다. 본 연구에서는 도입된 형질전환체를 이용하여 Taq-Man PCR 방법을 이용하여 분리세대에서 Homo 개체를 Fig. 13와 같다. 본 연구에서는 T<sub>1</sub> 세대 및 T<sub>2</sub> 세대를 이용하여 TaqMan PCR에 의한 Single copy도입 및 호모 형질전환체 선별하기 위하여 Takara사로부터 제공받은 protocol에 의해 OsASA2 유전자 말단에 있는 nos terminator 영역에 특이적 배열을 labeling한 probe primer를 이용하였다. 형질전환체는 bar 및 OsASA2 유전자로 PCR 분석에 의해 확인된 20개 식물체 게놈을 대상으로 게놈내 OsASA2 유전자의 정량을 위한 절대표준농도(absolute standard concentration)을 계산할 수 있었다.

Fig 13A는 single copy로 삽입되었을 때 유전적 분리비에 대해 T<sub>1</sub> 세대에서 1 AA, 2 Aa, 1 aa로 멘델법칙에 의해 분리 양상을 나타낸 것이다. T<sub>1</sub> 식물체(분리세대)에서 single copy이면서 호모 개체가 총 20개의 식물체로부터 TaqMan PCR 결과 4개 식물체를 선별하였다 (Fig 13). 이들 결과로부터 본 연구에서 사용된 형질전환 방법의 효용성 및 후대육성을 위해 매우 좋은 protocol이었으며, 얻어진 single copy, 호모계통을 후대 육성하고 있다.

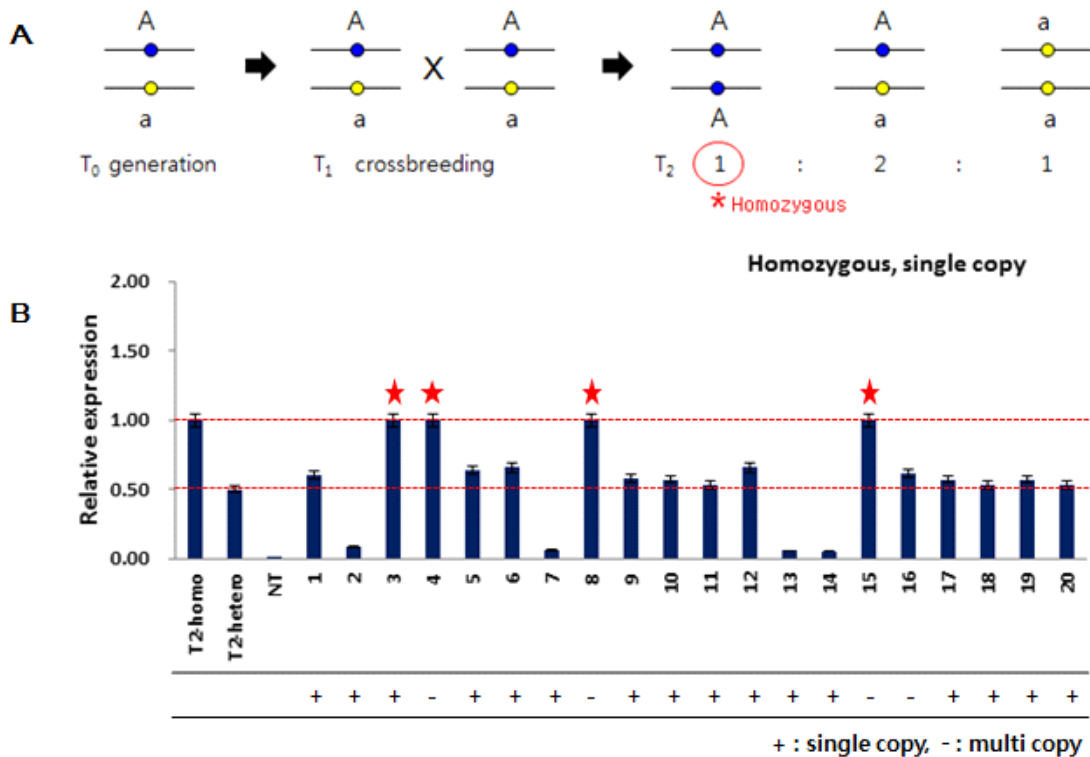


Fig 13. A schematic for selection of homozygous line from T<sub>0</sub> generation (A). TaqMan PCR analysis for copy number assays used TaqMan probe for selected single copy in transgenic rice (B).

12. 선발한 single (S126F) double(S126F/L530D) 변이유전자 도입 형질전환체의 후대 분석

Single copy로 도입된 형질전환체 RB 인접서열 분석에 사용한 primer는 NCBI BLAST에서 Genome Survey Sequences Database의 기존의 보고된 LB 인접서열의 유사성을 분석하여 수행한 결과 찾은 염기서열을 바탕으로 제작하였다.

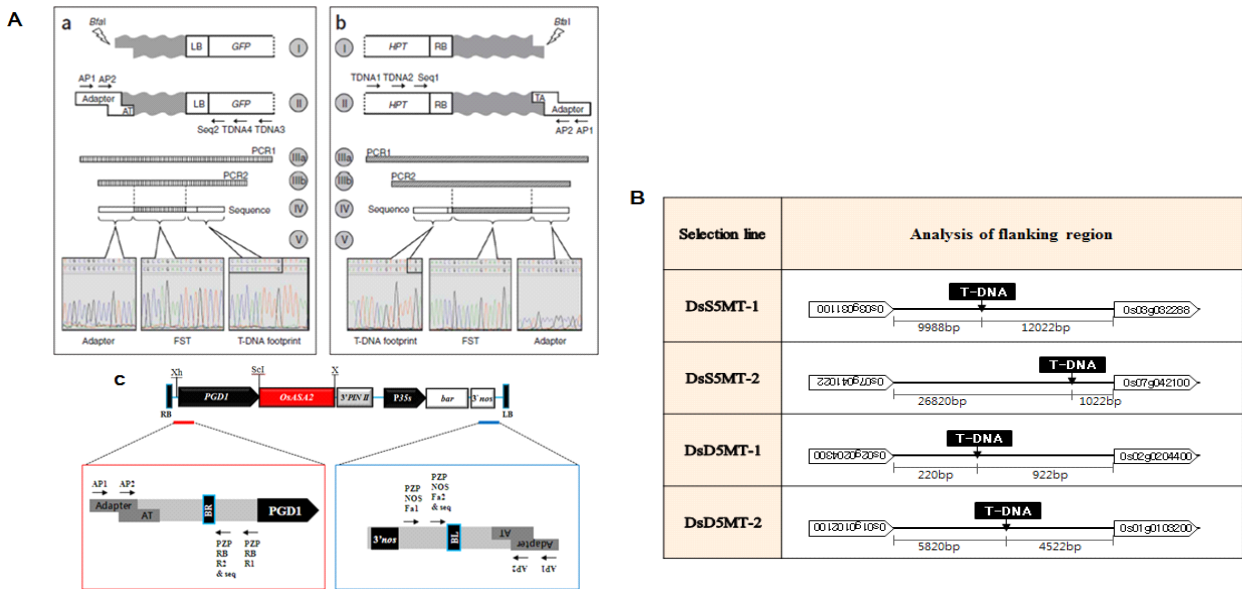


Fig 14. (A) Analysis of flanking regions adjacent to the left or right border of the T-DNA. In this example, the regions flanking the T-DNA correspond to Bd21 genomic sequence (gray waves) and therefore the sequences retrieved from left (a) and right (b) border analyses are flanking sequence tags (FSTs). Stage I: extraction and digestion of genomic DNA with Bfa I. Stage II: ligation of Bfa I adapter. Stage III a: PCR1 using primers specific to adapter and T-DNA (i.e., AP1+TDNA3 for LB analysis or AP1+TDNA1 for RB analysis). Stage III b: PCR2 using nested primer pairs (i.e., AP2+TDNA4 for LB analysis or AP2+TDNA2 for RB analysis). Stage IV: sequencing of PCR2 products (i.e., primer Seq2 for LB analysis or primer Seq1 for RB analysis). Stage V: identification of T-DNA footprint, FST and adapter sequences. The sequence of the left (5'-GTTTACACCAC) or right (5'-TGA) border footprint (i.e., part of the border sequence inserted into the plant genome) is boxed. Drawing is not to scale. (Vera Thole et al. 2009). (B) Analysis of Intragenic flanking region in transgenic rice plants (single copy plant).

벼의 gDNA와 유사할 것으로 판단되는 primer와 RB 인접서열에 가까운 삽입유전자의 부분의 primer 그리고 RB 부분 유전자의 안정적 삽입을 확인하기 위하여 T-DNA의 backbone 염기서열 primer를 선정하여 이들 primer를 이용하여 형질전환 벼의 gDNA에 대하여 PCR를

수행하였다. 수행조건은 94°C에서 3분간 변성 시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분의 단계로 35회 반복하여 실시하고, 72°C에서 10분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다. 확인된 PCR products는 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝하여 염기서열을 결정하였고, 염기서열의 유사성은 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

OsASA2 유전자가 도입된 형질전환체 20개체 중에서 homozygous single copy로 도입된 형질전환체 4개체를 이용하여 LB와 RB 인접서열을 PCR 분석한 결과 Fig. 3A과 같다. 게놈 DNA를 BfaI 제한효소로 소화하여 Flanking region의 실험에서는 작은 크기의 밴드가 얻어진다. 본 연구에서도 4개 형질전환체를 분석에서 약 200bp에서 1kb 이내의 밴드크기를 얻었다. 얻어진 밴드를 promega 재추출 kit를 이용하여 gel로부터 DNA를 수거한 후, 염기배열을 조사하였다 (GG BIO). 그 결과 도입 유전자가 Intergenic으로 확인되었다 (Fig 14).

### 13. 형질전환 후대에서 아미노산 분석

Single mutation을 일으킨 ASA2 유전자 및 double mutation을 일으킨 ASA2 유전자를 도입한 형질전환 후대에서 유리아미노산 총량은 대조구에 비해 약 10에서 30배로 높게 나타났다.

Table 3. Free amino acid composition of seed produced by field-grown transgenic rice lines

Amino acid	Free amino acid content (nmol g <sup>-1</sup> )					
	WT (Mean±SD)	Mock (Mean±SD)	S-TG (Mean±SD)		D-TG (Mean±SD)	
			#1	#2	#1	#2
Asp	118±12 a	132±22 a	108±13 a	548±59 b	489±44 b	221±16 a
Thr	89±29 a	142±12 a	321±102 b	472±157 b	187±37 a	211±42 b
Ser	198±45 a	242±32 a	778±301 b	1021±411 b	1521±189 b	388±104 a
Asn	1021±21 a	1918±10 a	3651±199 b	7811±201 b	6689±427 b	4878±521 b
Glu	980±17 a	872±19 a	879±65 a	3521±126 b	6887±145 b	3761±127 b
Pro	103±31 a	99±33 a	211±19 a	338±24 a	259±17 a	174±25 a
Gly	99±5 a	105±51 a	520±201 b	509±115 b	641±213 b	315±110 a
Ala	510±89 a	289±135 a	897±78 b	1041±141 b	948±84 b	610±49 b
Val	89±15 a	69±29 a	99±19 a	214±74 b	340±81 b	94±25 a
Gln	76±19 a	102±26 a	51±10 a	127±18 a	138±12 a	67±15 a
Lys	59±7 a	79±41 a	44±17 a	87±9 a	103±22 a	68±24 a
Met	26±8 a	11±5 a	15±7 a	38±9 a	47±11 a	29±12 a
Ile	38±12 a	21±11 a	37±11 a	128±37 b	98±12 b	77±20 b
Leu	102±47 a	87±23 a	320±44 b	212±35 a	514±118 b	225±71 a
Tyr	278±99 a	349±102 a	208±49 a	351±121 a	408±187 a	287±74 a
Phe	9±5 a	15±8 a	11±5 a	37±9 a	46±12 a	22±9 a
<b>Trp</b>	<b>18±9 a</b>	<b>20±5 a</b>	<b>197±27 b</b>	<b>589±65 b</b>	<b>493±42 b</b>	<b>251±39 b</b>
Arg	114±28 a	129±22 a	152±21 a	207±18 a	308±12 b	216±57 a
His	81±31 a	79±14 a	69±19 a	103±17 a	127±33 a	94±25 a
Total	4008±529 a	4760±231 a	8569±1207 b	17356±1646 b	20244±1698 b	11990±1365 b

# Data are expressed as nmol of amino acid g<sup>-1</sup> dry seed weight and are means ±SD of values from six seeds of Wild type (Dong-jin), Mock control (Ti-plasmid vector) or 5MT transgenic plant lines (single point and double point). Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (Student's *t* test).

또한, 아미노산 함량을 비교한 결과 single mutation 유전자가 double mutation 보다도 높게 나타났다. 특히 tryptophan, phenylalanine, threonine, serine 및 valine 함량에서 대조구에 비해 6.7, 4.6, 3.6, 2.8 및 2.0배가 높게 나타났다 (Table 3). 따라서 OsASA2 유전자를 과발현시키면, tryptophan 생합성회로상에서 feedback inhibition이 둔감하게 되어 아미노산함량이 전체적으로 높아지고, 특정 아미노산이 높은 결과를 초래하였다.

#### 14. 형질전환 후대에서 도입유전자 확인 및 유전자 발현 해석

형질전환실험에서 얻어진 형질전환 후대 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 OsASA2 유전자의 도입을 확인 및 유전자 발현 양상을 살펴본 결과는 Fig 15와 같다. 먼저 유전자 도입확인 은 T0식물체로부터 종자를 얻어 벼 유묘상자에 계통당 20개씩 종자를 파종하고, 발아시킨 후, 14일경에 4 ppm의 bastar 처리를 통해 저항성을 보인 식물체를 이용하여 도입유전자 Bar 및 OsASA2 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다.

조사한 Single mutation을 이끈 ASA2 유전자 및 double mutation을 일으킨 ASA2 유전자를 도입한 형질전환 후대에서 Bar 및 OsASA2 유전자가 검출되었다(Fig 15A). 또한 이들식물체에서 도입유전자가 대조구 및 MOCK 에서보다 많은 발현하였다 (Fig 15B). 이는 OsASA2 유전자가 벼 게놈에 잘 도입되어 후대에 잘 전이되었으며, 유전자의 발현이 잘 되고 있음을 의미한다.

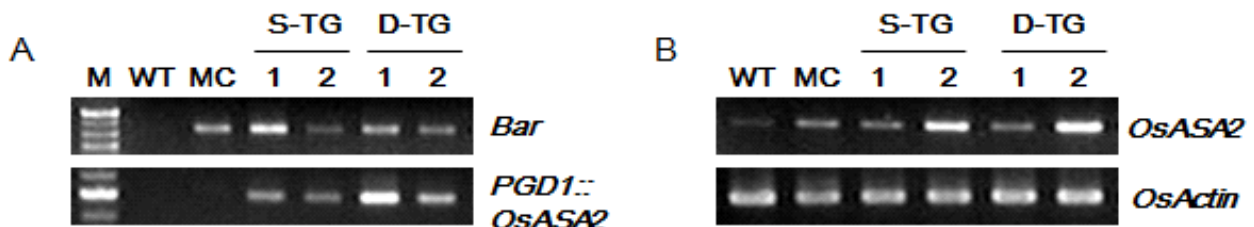


Fig 15. (A) PCR amplification of transferred gene (*Bar*, *PGD1::OsASA2*) in transgenic rice lines. The amplification products were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane WT; wild type plant, Lane MC; Mock control, Lane1~2; independent transgenic lines (S-TG; single point mutation, D-TG; double point mutation). (B) Analysis of *OsASA2* expression in the transgenic lines obtained by reverse transcription polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from each plant, and 0.5ug of this RNA was amplified with gene specific primers. As a loading control, the samples were also amplified with specific primers for the rice actin gene.

## 15. 형질전환 후대에서 농업형질분석

선발된 single copy를 가지고 호모계통이면서 intergenic인 형질전환체를 오창 생명공학 연구소 GMO포장 (T<sub>1</sub>세대), 충북대학교 GMO 포장 (T<sub>2</sub> 세대)에 계통별로 파종하여 수확하였다 (Fig. 16).

형질전환체의 농업 형질조사는 출수 일수, 간장, 수장, 분얼수, 임실율, 임실/식물체, 종자건물중/30식물체, 화분임성, 1000립중 등을 2013년 10월 2일에 수확하여 측정한 결과 Table 4와 같다. 출수 일수는 100일 정도, 간장은 78-81cm, 수장은 18-20cm 등 대조품종인 동안벼와 MOCK등의 결과와 거의 유사한 결과를 얻었다. 이런 의미는 형질전환체가 T<sub>2</sub> 세대에서 대조구와 거의 유사한 형질을 보여, 유전자 도입에 따른 영향이 크게 없는 것으로 간주된다. 따라서 본 재료를 이용해서 이벤트 식물 육성 및 T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 및 T<sub>5</sub> 세대를 육성 안정성을 꾀하고자 한다.

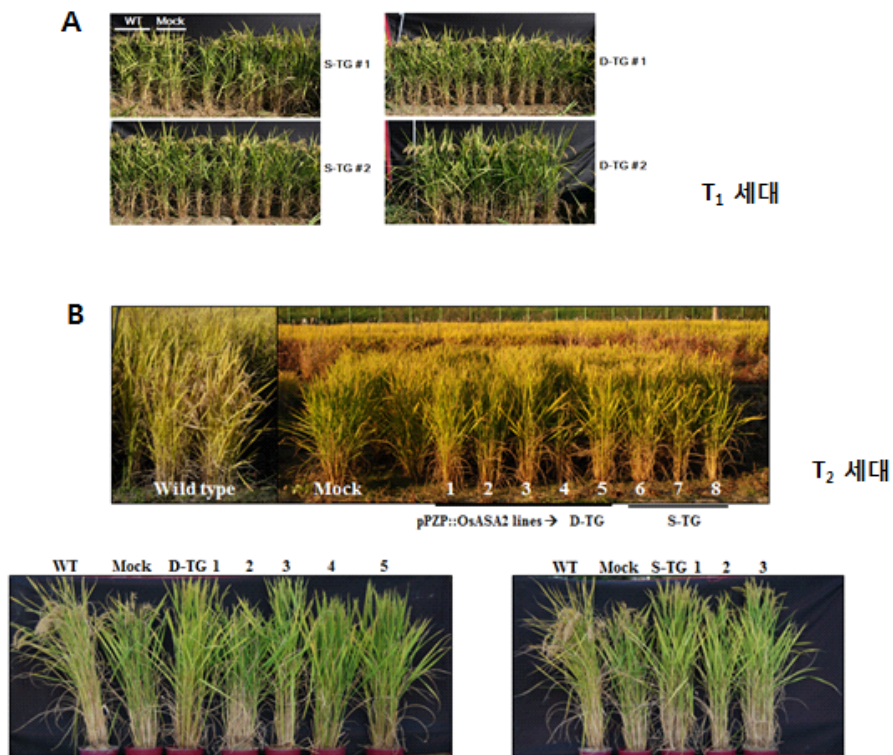


Fig 16. Phenotype of the wild type, mock control and OsASA2 transgenic plants in rice (S-TG; single point mutation, D-TG; double point mutation). A) T<sub>1</sub> generation, B) T<sub>2</sub> generation.

Table 4. Agronomic traits of S-TG (single point transgenic) and D-TG (double point transgenic) lines. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (Student's *t* test). The number of plants or plots for field conditions. Heading date, culm length, panicle length, and the number of tillers were recorded for each of 15 plants per plot in the field condition.

Line	Days to heading ±SD	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	No. of tillers plant <sup>-1</sup>	Spikelet fertility (%)±SD <sup>a</sup>	No. of spikelets plant <sup>-1</sup>	Mean dry matter of harvested seeds (30 plants g <sup>-1</sup> ) ±SD <sup>b</sup>	Pollen fertility (%) <sup>c</sup>	Brown seed weight (1000 grains g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
WT	100±0.50	78.9 a	18.8 a	15.5 a	82.8±2.99	118.2 a	758.2±21.09	98.1	20.1 b
Mock	100±0.50	76.5 a	17.6 a	13.8 a	78.2±3.62	94.1 b	642.8±27.21	95.2	20.0 b
S-TG #1	100±0.00	79.1 a	19.1 a	15.6 a	81.5±2.35	106.4 a	746.3±18.99	97.3	20.2 b
S-TG #2	101±0.50	80.3 a	19.7 a	12.9 a	88.3±2.11	116.1 a	769.1±24.22	98.2	20.6 a
D-TG #1	101±0.00	81.5 a	20.1 a	12.2 a	91.8±2.92	121.3 a	821.1±28.22	99.3	21.0 a
D-TG #2	100±0.50	80.1 a	19.2 a	13.1 a	89.2±2.01	109.3 a	781.4±22.34	98.6	20.6 a

<sup>a</sup> Spikelet fertility was recorded for all panicles of 10 plants in 2012 and for three panicles of main culms of 60 plants in 2013.

<sup>b</sup> Mean dry matter of harvested seeds which were air-dried (assumed moisture content of seeds was approximately 10 - 15%).

<sup>c</sup> Pollen fertility was recorded for three spikelets of each of three randomly selected plants. It was estimated from microscopic analysis of the shape and color of the pollen stained with I-KI solution (1%).

<sup>d</sup> The weight of 1000 seeds was determined from that of 20 or 100 grains in the field conditions.

## 16. ASA유전자 도입 형질전환체를 이용한 Tryptophan 생합성계 제어 해석

ASA2의 도입에 의한 유리 Trp 함량이 증가한 벼 호모 계통(T<sub>3</sub>세대)을 육성했다. 이 종자의 유리 Trp 함량은 비 재조합에 비해 15-33배 증가했고, 벼 종자 단백질인 프로모터에 의한 발현을 제어한 계통에서는 종자의 건물중의 차이는 약 0.4%에 달했다. 고 Trp 종자는 정상적으로 발아, 성장하고 임성을 가지고 있었다. 이들 식물체 중 아미노산 함량이 가장 많이 변한 계통을 이용하여 Fig. 5에 나타낸 부분마다 80% 아세톤 에서 추출해, 추출물을 역상계의 고체 카트리지를 사용하여 정제한 뒤 LC/MS/MS 분석을 수행하였다 (Fig 17).

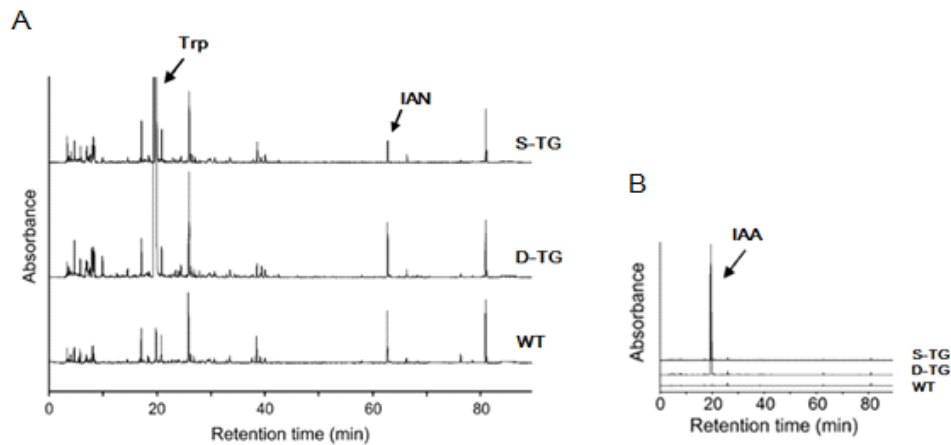


Fig 17. Representative chromatograms of wild-type (WT) and OsASA2 transgenic (S-TG and D-TG) rice seedlings. Extracts were subjected to metabolic profiling by HPLC combined with PDA detection. (A) Tryptophan and IAN (Indole-3-acetonitrile), (B) IAA (Indole-3-acetic acid).

Single 돌연변이 유전자 도입 형질전환체 (S-TG)와 double 돌연변이 유전자도입 형질전환체 (D-TG)의 Trp, IAN 및 IAA 함량을 뿌리, 줄기, 제1잎, 제2잎, 제3잎을 나누어 측정된 결과 Trp의 경우 모든 부위에서 형질전환체가 높게 나타났으며, 특히 leaf 3에서 대조구에 비해 월등히 높게 나타났다. IAN 및 IAA 함량은 거의 유사한 pattern을 보였다. 이들 결과로부터 OASA2 도입 벼는 대조구에 비해 IAA 함량은 식물체의 생장으로 유의로 증가하고 있었다. 흥미롭게도 IAA의 식물 체내에 생합성 분포는 Trp 축적과 같은 경향을 나타내고 있었다. 또한 IAN도 이들 두 성분과 같은 추세로 증가하고 있으며, 축적하고 있는 IAA가 Trp에서 IAN을 거쳐 생합성되고 있는 것으로 나타났다 (Fig 18).

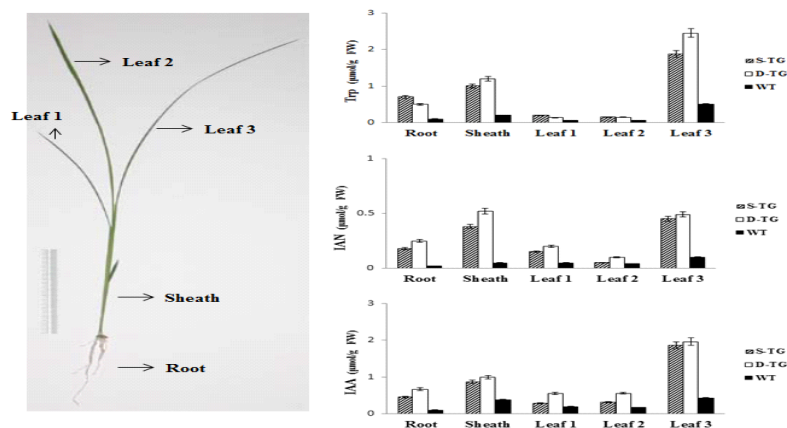


Fig 18. Trp, IAN and IAA contents of seeds derived from field-grown transgenic lines. The amounts of free Trp, IAN and IAA were quantitated in the same seeds of S-TG, D-TG, or wild type (WT) plants. Data are expressed as nanomoles of analyte per gram of dry seed weight and are means  $\pm$ SD of values determined from three groups of six seeds.

## 17. ASA유전자 도입 형질전환체를 이용한 2차대사산물 합성계 유전자들의 해석

OASA2 유전자가 도입된 형질전환체는 Trp, IAA함량이 대조구에 비해 높게 나타난 결과로부터 Trp의 축적량은 생화학적인 효소 기능을 반영하고 있음이 명백하며, 효소의 피드백 저해의 강약의 차이를 이용해 세포내에 Trp 축적 농도를 어느 정도 제어하는 것이 드러났다.

벼의 Trp생합성 경로 상류에 위치한 chorismate 경로에 관련된 효소들의 기본 유전자 중에서 특히 대사 제어에 중요하다고 추정된 DAHP합성 효소 4종류, chorismate kinase 3종류, EPSP합성 효소 1종류에 대해서 단백질 합성을 하고 효소 등 기본 기능 해석을 실시했다. Chorismate kinase는, 방향족 아미노산 및 관련 화합물의 생합성에 중요하며, 탄닌 등의 이차 대사물의 전구체도 된다. 본 효소 발현 해석에서 S-GT, GT-ST, ATR1 유전자에서 형질전환체들에서 발현량이 월등히 높게 나타났다. 이런 의미는 식물체내에 tryptophan 함량이 높아져 IAA 함량 및 2차대사산물인 S-GT, GT-ST, ATR1유전자를 코딩하는 단백질이 높게 발현하고 있다고 할 수 있다. 따라서 본 과제에서 선발된 재료를 대상으로 병원성 유무 실험을 수행해도 바람직하다고 생각된다 (Fig 19).

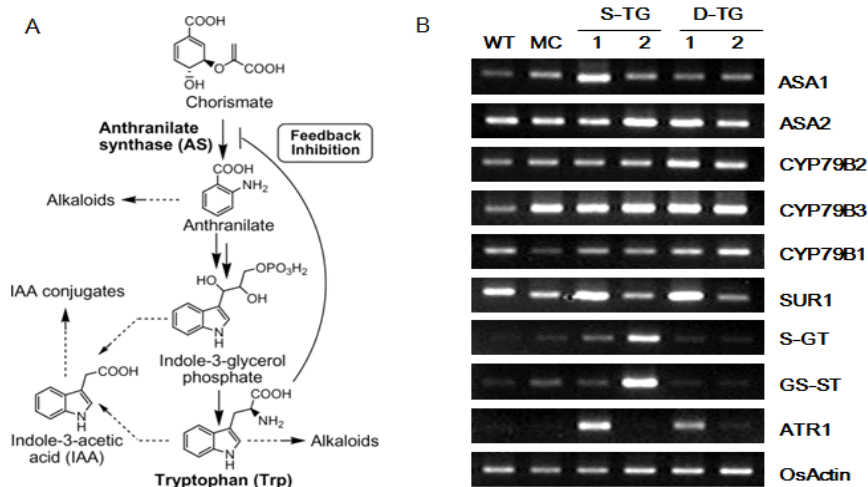


Fig 19. (A) Biosynthetic pathway of tryptophan (Trp) in plants. Related pathways referred to in this study are also shown. The curved line from Trp to anthranilate synthase (AS) indicates negative feedback regulation. (B) Expression levels of some genes associated with Trp metabolism. As a loading control, the samples were also amplified with specific primers for the rice actin gene for qRT-PCR values.

## 18. Microarray을 통한 형질전환체의 high-throughput screening

형질전환체에 대한 의한 transcript의 발현양상을 규명하기 위해 대조구인 동진벼와 형질전환계통 DG-T1과 DG-T2을 50ppm 5MT가 함유된 MS 배지에서 3주간 배양하였다.



5MT 무처리구에서는 대조구와 두 형질전환 계통간에 생육에 큰 차이를 보이지 않았으나, 대조구는 처리구에서 3주 후 생육이 급격히 떨어져 초장에서는 6.6 cm로 두 DG-T 계통의 23-23.7 cm에 비해 큰 차이를 보였다. 또한 뿌리 생육에 있어서도 대조구는 5MT 처리구에서 전혀 뿌리의 생장이 이루어지지 않은 반면 DG-T 계통은 정상적인 뿌리 생육을 보였고 DG-T2 계통은 오히려 5MT 처리구에서 뿌리 생육이 좋았다. 이들 재료는 microarray 분석을 위한 시료로 사용되었다. 먼저 각각의 계통에서 5MT 처리구와 무처리구로부터 RNA를 추출한 후, microarray 분석을 2반복으로 수행하였다. 데이터 분석은 각 계통의 5MT 처리구와 무처리구간 (DATA 1), 대조구와 DG-T1, DG-T2의 무처리구간 (DATA 2) 그리고 처리구간 (DATA 3)의 발현 차이를 분석하였다.

목적 cRNA probes와 hybridization은 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology, USA)을 사용하였으며, Microarray 분석을 위한 chip은 상용화 되고있는 Agilent Rice 4 X 44K Oligo microarray을 사용하였고, hybridization 후, image quantification은 GenePix Pro 4.0을 사용하였고, LOWESS 프로그램을 이용하여 각 spot의 nomalization을 수행하였다. 분석 프로그램은 Agilent GeneSpringGX 7.3을 사용하여 수행하였다. Microarray 결과를 바탕으로 data mining을 수행하여 transcript 발현 양상의 차이가 형질전환체에 의한 genotype에 따른 발현 차이를 보이는지 5MT 처리구 genotype 간에 차이를 살펴본 결과는 Fig. 20과 같다.

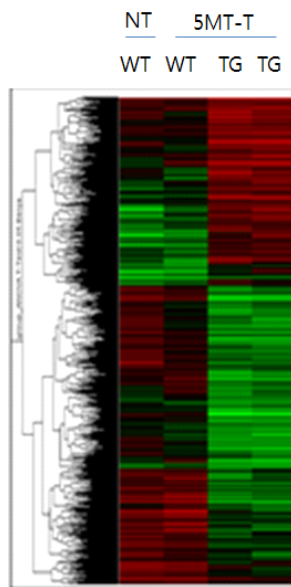


Fig 20. Gene trees according to the 4 data mining categories to identify the difference of these gene expression patterns are due to 5MT treatment or transgenic plants. NT; not treatment seedlings, 5MT-T; 5-methyltryptophan 50ppm treatment seedlings, WT; Dongin non transformants, TG; Transgenic plants.

Hybridization은 각각 2 반복으로 수행되어졌으며, reliable gene의 수는 대조구는 21,318, TG1은 21,360, TG2는 21,373 이었으며, 무처리구간 비교에서는 21,362 genes이 처리구간 비교에서는 21,234 genes이 reliable 한 유전자로 발현양이 비교되었다. 반복된 microarray 분석에서

총 reliable gene 중 p-value가 0.05 이하인 유전자 수는 대조구는 5,819, MRI은 4,935, MRII는 3,079개 이었으며, 이중 2배 이상의 발현양 차이를 보이는 유전자는 대조구의 경우 601개와 669개 유전자가 2배 이상 up- 또는 down-regulation 되었다. TG1의 경우에는 2,542개와 4,704 개의 유전자가 up- 또는 down-regulation 되었으며, TG2의 경우에는 2,634 개와 4,653 개의 유전자가 up- 또는 down-regulation 되었다 (Table 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Table 5. Expression profiling of commonly up-regulated genes by more than 2 folds responding to 5MT treatment between WT and transgenic plants (TG).

Probe ID	Genbank	UniGene	Normalized intensity		Description
			WT	TG-1	
A_71_P120836	AK111258	Os.57297	2.31	4.10	Unknown expressed protein
A_71_P114515	AK065486	Os.48269	2.28	4.03	clone MGC:5406 IMAGE:3447276, mRNA, complete cds. PRI
A_71_P100872	AK102745	Os.32822	2.46	4.94	putative receptor kinase (At3g47570) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P124491	AK058243	Os.15841	2.19	2.25	AT5g22580/MQJ16_12 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P126087	AK063993	Os.8771	5.77	4.67	Unknown expressed protein
A_71_P108807	AK072250	Os.53356	2.28	2.19	clone 117402 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P113340	AK099789	Os.3394	2.50	2.50	mRNA histidyl tRNA synthetase. PLN
A_71_P107379	AK067626	Os.58245	2.67	2.42	mRNA for putative cyclic nucleotide-regulated ion channel, cngc2. PLN
A_71_P117819	AK102448	Os.6411	2.62	2.38	OsPAA2 mRNA for alpha 1-2 subunit of 20S proteasome, complete cds. PLN

Table 6. Expression profiling of commonly up-regulated genes by more than 2 folds responding to 5MT treatment between WT and TG.

Probe ID	Genbank	UniGene	Normalized intensity		Description
			WT	TG2	
A_71_P113250	AK107819	Os.55295	56.90	2.62	mRNA for hypothetical protein, complete cds, expressed under carbonate stress. PLN
A_71_P116816	AK066954	Os.87669	2.14	2.38	bacterial-induced peroxidase mRNA, complete cds. PLN
A_71_P117713	AK103557	Os.409	90.04	11.97	OsNramp1=Nramp1 homolog/Bcg product homolog . PLN
A_71_P121562	AK103890	Os.21960	4.92	2.23	mRNA for ubiquitin/ribosomal protein S27a fusion protein. PLN
A_71_P122323	AK072749	Os.11296	4.47	7.89	AP2 domain containing protein (AP2DCP) mRNA, partial cds. PLN
A_71_P109957	AK112069	Os.1478	29.00	7.92	osnas1 mRNA for nicotianamine synthase 1, complete cds. PLN
A_71_P109956	AK112011	Os.9311	54.98	20.93	osnas2 mRNA for nicotianamine synthase 2, complete cds. PLN
			3.45	2.13	putative I-box binding factor (At5g04760)

A_71_P115338	AK107134	Os.54934			mRNA, complete cds. PLN
A_71_P115137	AK102039	Os.16538	4.64	2.23	hydrophobic LEA-like protein mRNA, complete cds. PLN
A_71_P128524	AK100280	Os.53824	2.21	3.11	At5g65740 mRNA for unknown protein, complete cds, clone: RAFL21-12-I06. PLN
A_71_P126180	AK103636	Os.9805	182.79	4.52	Unknown expressed protein
A_71_P123920	AK072077	Os.46062	2.32	2.56	At3g08040/T8G24.8 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P111136	AK110892	Os.89035	2.46	2.88	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase (SA-GTase) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P118320	AK101924	Os.12660	2.54	3.74	putative receptor protein kinase (At2g37710) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P101394	AK068661	Os.12629	337.49	11.42	Unknown expressed protein

Table 7. Expression profiling of commonly up-regulated genes by more than 2 folds responding to 5MT treatment between TG1 and TG2.

Agilent probe	Genbank	UniGene	Normalized intensity		Description
			TG1	TG2	
A_71_P108502	AK100680	Os.20190	3.05	2.83	At5g19390/F7K24_140 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P106009	AK064436	Os.24851	3.54	2.99	heat shock protein (SB100) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P117055	AK111086	Os.87804	2.43	4.26	Unknown expressed protein
A_71_P108781	AK072498	Os.18512	3.06	2.46	At1g76010/T4O12_22 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P114241	AK073230	Os.53549	2.20	2.01	DNA polymerase epsilon subunit B (pole2) mRNA, complete cds. VRT
A_71_P114182	AK073413	Os.20329	2.96	2.06	kinesin-like protein (At5g02370) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P124651	AK064170	Os.51881	2.00	2.14	At1g62110 mRNA for unknown protein, complete cds, clone: RAFL18-02-O19. PLN
A_71_P125682	AK063354		2.82	4.53	nad4 mRNA for NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4. PLN
A_71_P126707	AK106725	Os.47736	3.05	2.47	Similar to kinesin family member C3, clone IMAGE:5008217, mRNA, partial cds. ROD
A_71_P113674	AK103883	Os.54392	2.98	2.06	Unknown expressed protein
A_71_P121424	AK069250	Os.52786	2.47	3.60	Unknown expressed protein
A_71_P102487	AK070376	Os.18743	3.49	3.11	putative serine proteinase (At1g30600) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P106406	AK103476	Os.54336	2.32	2.06	selenium-binding protein-like (MPO12.16) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P110701	AK062366	Os.53245	2.99	2.05	At1g16520 mRNA for unknown protein, complete cds, clone: RAFL19-93-N10. PLN
A_71_P102943	AK064024	Os.33042	2.26	2.23	mRNA for microtubule-associated protein MAP65-1a (map65-1a gene). PLN
A_71_P108222	AK058575	Os.50790	2.84	3.38	clone RAFL15-03-O20 (R20290) unknown protein (At5g28640) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P105886	AK063512	Os.51717	2.53	2.03	Unknown expressed protein
A_71_P103280	AK109789	Os.29834	7.68	2.75	Unknown expressed protein

A_71_P123795	AK103093	Os.16605	2.57	2.01	Unknown expressed protein
A_71_P116595	AK103589	Os.54353	4.49	2.24	clone 15013 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P128593	AK101665		4.99	2.39	clone 10212 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P102152	AK064572	Os.36055	2.52	2.30	Unknown expressed protein
A_71_P111719	AK064614	Os.50566	2.27	2.33	unknown protein (At3g20490) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P112179	AK111976	Os.6028	3.95	2.46	cell cycle checkpoint protein MAD2 homolog (mad2) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P110829	AK064718	Os.4320	3.99	2.08	Unknown expressed protein
A_71_P103022	AK101382	Os.54024	2.03	2.69	putative serine carboxypeptidase II (At4g30610) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P112777	AK070205	Os.6219	4.92	2.74	MADS-box transcription factor CDM51 (cdm51) mRNA, complete cds. PLN

Table 8. Expression profiling of commonly down-regulated genes by more than 2 folds responding to 5MT treatment between WT and TG1.

Probe ID	Common	Genbank	UniGene	Normalized intensity		Description
				WT	TG1	
A_71_P113273	Os04g03993	AK105282	Os.54478	0.31	0.48	unknown protein (At1g12880) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P122056	Os09g03969	AK071589	Os.9660	0.33	0.23	Ccc1p (CCC1) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P117449	Os06g06575	AK101959	Os.21891	0.46	0.40	mRNA for open reading frame. PLN
A_71_P122307	Os09g03804	AK072517	Os.16493	0.37	0.42	Unknown expressed protein
A_71_P125957	Os12g06085	AK110310	Os.9468	0.43	0.50	putative receptor protein kinase (At2g37710) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P114919	Os05g04472	AK111659	Os.9339	0.46	0.46	Medicago truncatula mRNA for putative AUX1-like permease (lax2 gene). PLN
A_71_P116773	Os06g02109	AK110332	Os.56712	0.33	0.44	At1g45200 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P111906	Os04g05134	AK066850	Os.35154	0.28	0.27	beta-glucosidase mRNA, complete cds. PLN
A_71_P102212	Os01g03571	AK061893	Os.142	0.45	0.45	mRNA for ferredoxin-nitrite reductase, complete cds. PLN
A_71_P103612	Os01g05493	AK107646	Os.31233	0.26	0.18	Unknown expressed protein
A_71_P124224	Os10g03489	AK059264	Os.50889	0.47	0.44	Unknown expressed protein
A_71_P112517	Os04g03471	AK102369	Os.54178	0.23	0.29	mRNA for chitinase, complete cds. PLN
A_71_P100416	Os01g01502	AK099465	Os.12757	0.18	0.37	putative protein phosphatase (At5g10480; F12B17_170) mRNA, complete cds. PLN

Table 9. Expression profiling of commonly down-regulated genes by more than 2 folds responding to 5MT treatment between WT and TG2.

Probe ID	Genbank	UniGene	Normalized intensity		Description
			WT	MR II	
A_71_P101433	AK102809	Os.12501	0.24	0.48	Nt-gh3 deduced protein mRNA, complete cds. PLN
A_71_P107010	AK060722	Os.5479	0.22	0.25	Cyt-P450 monooxygenase (PM-II) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P109152	AK070517	Os.20163	0.42	0.50	clone 39127 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P102416	AK109763	Os.27505	0.38	0.45	mRNA for pectin esterase clone. PLN
A_71_P116870	AK101267	Os.54009	0.11	0.25	putative selenium-binding protein (At5g48910) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P122322	AK065344	Os.88551	0.19	0.18	AP2 domain containing protein (AP2DCP) mRNA, partial cds. PLN
A_71_P126544	AK072461	Os.53402	0.11	0.31	OsDTC1 mRNA for putative diterpene cyclase, complete cds. PLN
A_71_P118050	AK067895	Os.14948	0.28	0.17	At2g41900/T6D20.20 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P128331	AK111230		0.48	0.49	Unknown expressed protein
A_71_P112242	AK070216	Os.52974	0.33	0.34	At2g02040/F14H20.11 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P118328	AK105640	Os.16563	0.28	0.48	clone U10950 unknown protein (At2g44260) mRNA, complete cds. PLN

Table 10. Expression profiling of commonly down-regulated genes by more than 2 folds responding to 5MT treatment between TG1 and TG2.

Agilent probe	Genbank	UniGene	Normalized Intensity		Description
			MRI	MR II	
A_71_P117314	AK070128	Os.52961	0.42	0.38	Arabidopsis thaliana unknown protein (At5g65470) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P106665	AK067000	Os.15355	0.50	0.32	Gossypium hirsutum bacterial-induced peroxidase mRNA, complete cds. PLN
A_71_P106601	AK099932	Os.53772	0.47	0.35	A.thaliana mRNA for receptor like protein kinase. PLN
A_71_P122855	AK061438	Os.9417	0.41	0.44	Oryza sativa drought-induced S-like ribonuclease mRNA, complete cds. PLN
A_71_P101089	AK070748	Os.9487	0.50	0.48	Arabidopsis thaliana clone 15284 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P118529	AK068807	Os.15204	0.45	0.39	Arabidopsis thaliana At3g08840 mRNA for unknown protein, complete cds, clone: RAFL21-17-J10. PLN
A_71_P122987	AK106383	Os.2544	0.29	0.17	Zea mays tonoplast membrane integral protein ZmTIP3-1 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P116663	AK105426	Os.49707	0.32	0.31	Unknown expressed protein
A_71_P104142	AK107967	Os.55374	0.41	0.36	Arabidopsis thaliana unknown protein (At5g43260) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P105898	AK068833	Os.15987	0.38	0.34	Arabidopsis thaliana At5g16450 mRNA for putativeS-adenosylmethionine:2-demethylmenaquin one methyltransferase, complete cds, clone: RAFL21-09-H18. PLN

A_71_P105897	AK059923	Os.15987	0.44	0.34	Arabidopsis thaliana At5g16450 mRNA for putativeS-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase, complete cds, clone: RAFL21-09-H18. PLN
A_71_P118245	AK063034	Os.75710	0.32	0.22	Arabidopsis thaliana clone 11073 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P116583	AK099446	Os.8239	0.43	0.26	Oryza sativa HvB12D homolog mRNA, complete cds. PLN
A_71_P111730	AK107902	Os.55340	0.47	0.46	Arabidopsis thaliana unknown protein (At5g42500) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P112751	AK105704	Os.54559	0.47	0.39	Unknown expressed protein

## 19. Homologous recombination을 위한 벡터구축

가위손 역할로서 AS::ZFN 벡터구축: ZFN기술은 단백질 상호작용을 매개하는 zinc finger(ZF) module과 nuclease의 합성어로 FokI 제한효소를 가지는 독특한 구조적 특성을 갖는다. FokI 효소는 DNA-binding domain (DBD)와 DNA cleavage domain (DCD)로 구별하여 구축하게 된다. 잘 알려진 DBD로서 ZF module은 특정 유전자 염기서열을 특이적으로 인식하는 모듈화가 가능하기 때문에 ZFN 기법을 OsASA2 유전자를 가위손에 의해 자를 수 있는지에 대해 실험하였다. OsASA2 유전자의 특이적 ZF는 3염기씩 DNA 염기서열을 틀젠에서 제공하는 데이터베이스에서 얻어 합성하여 활성분석을 통해 CGCTGCCTCGTCCCGAGGACAACATGGA을 선발하였다 (Fig 21A).

얻어진 ZFN이 세포내에서 결합자리에 결합하게 되면 FokI의 nuclease domain이 마주보게 되어 dimer를 이루는 구조를 형성할 수 있게 된다. 그렇게 되면 nuclease activity가 활성화되어 DNA 상에서 DSB를 일으키게 된다 (Fig 21B). DSB가 일어난 다음에는 세포 자체적으로 repairing system, 즉, HR 또는 NHEJ(non-homologous end joining)에 의해 DSB가 치유된다.

EJ이란 DSB가 일어나고 주변부에 적당한 donor 염기서열이 존재하지 않을 때 염기의 삽입 및 소실이 일어나면서 결합되는 과정을 의미한다. 따라서 본 연구에서 얻어진 ZFN은 OsASA2 유전자의 double mutation 염기 중 첫 번째 염기 부근에 가위손 역할을 담당하게 구조를 만들었다. 한편 구축된 AS::ZFN 벡터의 활성 측정을 위해 Surrogate report system으로 ZFN 결합 자리 뒤쪽에 out of frame으로 형광단백질 또는 항생제 저항성 단백질 유전자가 reporter로써 연결하여 ZFN에 의해 절단이 일어나면 비특이적으로 DNA 염기 삽입 혹은 소실이 일어남에 따라 그중일부는 뒤쪽의 reporter 유전자의 in-frame을 유발하여 정상적으로 reporter 단백질이 합성되는 현상을 이용하여 ZFN 활성을 측정한 결과 OsASA2 유전자의 ZFN은 매우 높은 활성도를 얻었다 (Fig 21C).

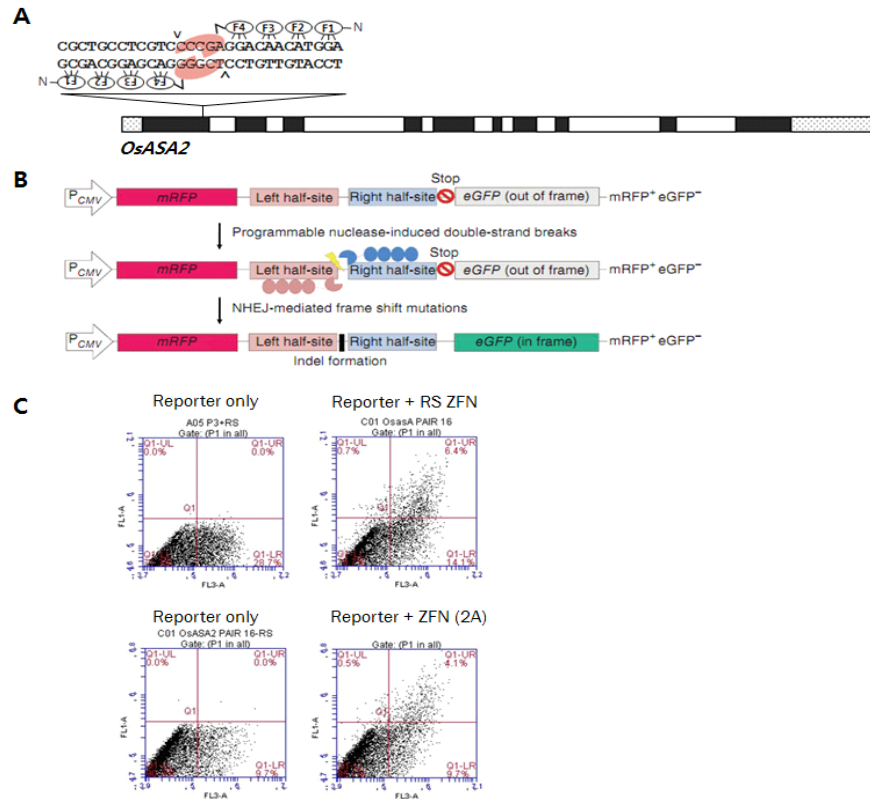


Fig 21. OPEN ZFN target sites in the *OsASA2* coding sequences. (A) The gene models of rice *OsASA2* loci in chromosome 3. Black rectangles represent exons; white rectangles represent introns. The position of OPEN ZFN target site is indicated by triangles. Each engineered ZFN consists of three zinc fingers (F1, F2, F3, F4), which together recognize a 12-bp target site. The two target sites are separated by 5-bp spacer sequences. Binding of the ZFAs to the target sequences enables the FokI nuclease monomers to dimerize and cleave within the spacer. The site of cleavage in the target sequences is indicated by black arrowhead. (B) Combination of ZFNs binding site using a cell-based green fluorescent protein (GFP) reporter assay to determine if they are active in cell-culture-based system. (C) Analysis of fluorescence-activated cell sorting (FACS) for GFP with GFP+*OsASA2* ZFN cells.

가위손 역할의 AS::Talen 벡터구축: *OsASA2* 유전자의 특이적 Talen는 3염기씩 DNA 염기서열을 틀젠에서 제공하는 데이터베이스에서 얻어 합성하여 활성분석을 통해 Fig 22와 같이 DNA binding domain을 합성하였다. 얻어진 Talen이 세포내에서 결합자리에 결합하게 되면 FokI의 nuclease domain이 마주보게 되어 dimer를 이루는 구조를 형성할 수 있게 된다.

그렇게 되면 nuclease activity가 활성화되어 DNA 상에서 TAL effector, Talen의 구조에 의해 원하는 자리에 활성을 볼 수가 있다 (Fig 23). 한편 구축된 AS::Talen 벡터의 활성 측정을 위해 Surrogate report system으로 ZFN 결합자리 뒤쪽에 out of frame으로 형광단백질 또는 항생제 저항성 단백질 유전자가 reporter로써 연결하여 Talen에 의해 절단이 일어나면 비특이적으로 DNA 염기 삽입 혹은 소실이 일어남에 따라 그중 일부는 뒤쪽의 reporter

유전자의 in-frame을 유발하여 정상적으로 reporter 단백질이 합성되는 현상을 이용하여 ZFN 활성을 측정한 결과 OsASA2 유전자의 Talen은 매우 높은 활성도를 얻었다 (Fig 24).

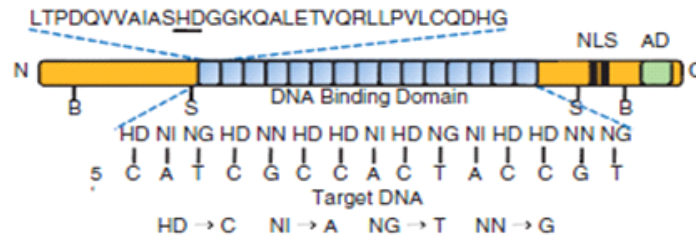


Fig 22. Structure of a naturally occurring TAL effector. A consensus repeat sequence is shown with the repeat-variable di-residue (RVD) underlined. The sequence of RVDs determines the target nucleotide sequence. The four most common RVDs, on which our designs and plasmids are based, are shown with their most frequently associated nucleotide. Some evidence suggests that the less common RVD NK (not displayed) has greater specificity for G than NN does and for that reason our plasmid set also includes NK modules.

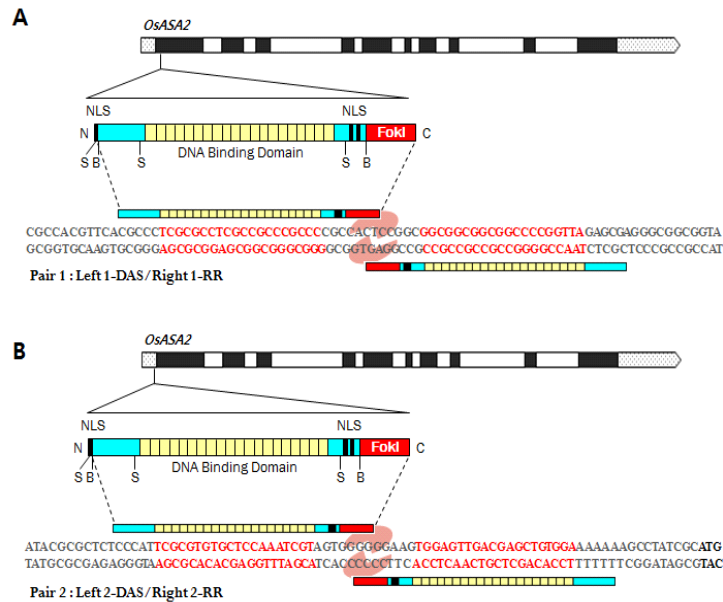


Fig 23. TAL effector and TALEN structure in *OsASA2* genome. (A) Structure of a TALEN in exon 1 region of *OsASA2* genome site in chromosome 3. Two monomeric TALENs are required to bind the target site to enable FokI to dimerize and cleave DNA. NLS, nuclear localization signal(s); B, BamHI; S, SphI. (B) Structure of a TALEN in 5'-UTR region of *OsASA2* genome site in chromosome 3.



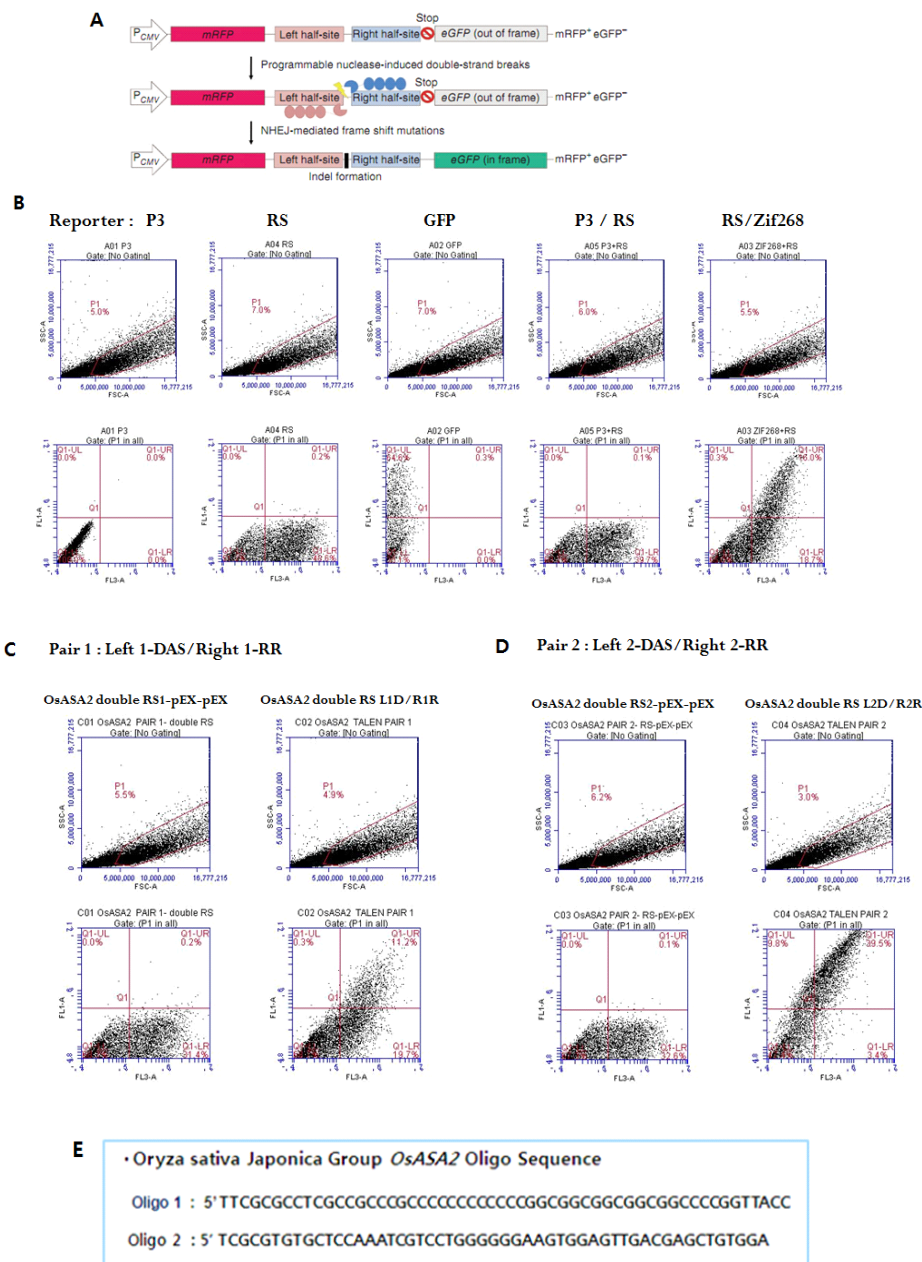


Fig 24. Activity of 20 custom TALEN pairs targeting diverse sequences in a reporter-based yeast assay. TALENs were targeted to gene sequences from the indicated organisms and to GFP and RFP using the software and constructed using the Golden Gate method and plasmids described in the text. Activity was measured in a yeast-based assay in which cleavage and recombination reconstitutes a functional lacZ gene.

Homologous recombination을 위한 HR::AS 벡터구축: OsASA2 유전자를 분리하여 F/D 부위에 double mutation된 cDNA를 Fig 16A와 같이 AS::ZFN, AS::Talen에 의해 자른 영역에 homologous left arm (3번 염색체, OsASA2 유전자 앞부분 인트론 포함 1.5kb DNA 영역을

PCR 합성하여 연결)과 homologous right arm (3번 염색체, OsASA2 유전자 뒷부분 인트론 포함 1.5kb DNA 영역을 PCR 합성하여 연결)을 이용하여 left arm::OsASA2 cDNA::GFP::Bar::right arm 또는 left arm::OsASA2 cDNA::Bar::right arm으로 구축하였다(Fig 25). 현재 이들 벡터를 Agrobacterium LBA4404에 도입하여 형질전환체를 육성하고 있다.

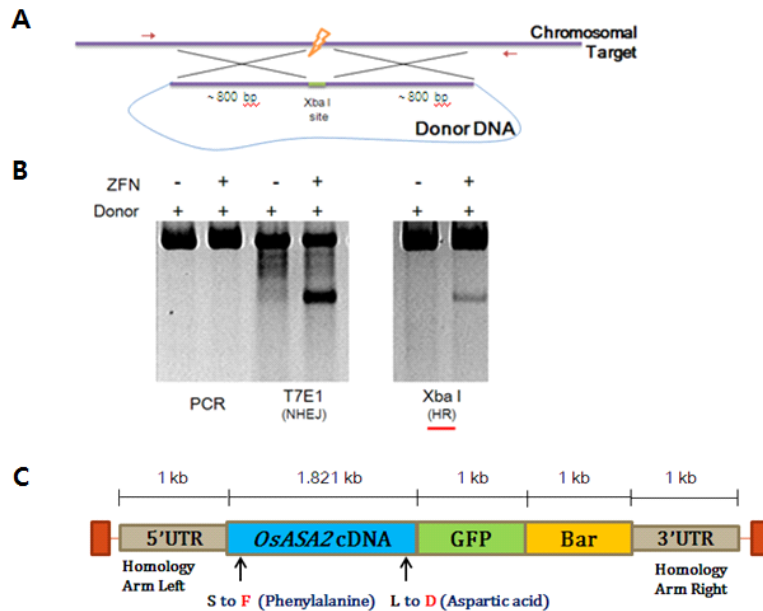


Fig 25. (A) Schematic of the target reporter and homologous recombination. (B) PCR analysis of genomic DNA isolated from Zinc finger nuclease expression cassettes, non homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) with ZFN doner. (C) Schematic of the target vector with gfp gene fragment (1 kb) for homologous recombination by ZFN in OsASA2 gene in rice.

## 20. Gene targeting을 위한 Talen 기술, homologous recombinant 기술 연구

가위손 역할로서 AS::Talen 벡터구축: Talen기술은 단백질 상호작용을 매개하는 Talen module과 nuclease의 합성어로 FokI 제한효소를 가지는 독특한 구조적 특성을 갖는다. FokI 효소는 DNA-binding domain (DBD)와 DNA cleavage domain (DCD)로 구별하여 구축하게된다. 잘 알려진 DBD로서 Talen module은 특정 유전자 염기서열을 특이적으로 인식하는 모듈화가 가능하기 때문에 Talen 기법을 OsASA2 유전자를 가위손에 의해 자를 수 있는지에 대해 실험하였다.

OsASA2 유전자의 특이적 ZF는 3염기씩 DNA 염기서열을 툴젠에서 제공하는 데이터베이스에서 얻어 합성하여 활성분석을 통해 -TCGCGCCTCGCCGCCCGCCCGCCACTCCGGCGGC GGCGGCGCCCCGGTTA-를 선발하였다.

Homologous recombination을 위한 HR::AS 벡터구축: OsASA2 유전자를 분리하여 F/D 부위에 double mutation된 cDNA를 AS::Talen, AS::Talen 에 의해 자른 영역에 homologous left arm (3번 염색체, OsASA2 유전자 앞부분 인트론 포함 1.5kb DNA 영역을 PCR 합성하여



두 개의 DNA-repair의 nonhomologous end joining (NHEJ)에 대하여 OsASA2 유전자의 첫 번째 엑손영역에서 TALEN vector가 binding 될 때 FokI enzyme site가 위치한 영역의 제한효소 (BglII)를 이용하여 벼의 게놈내로 TALEN::OsASA2 vector의 삽입 및 binding 되어 TALEN 작용이 나타났는지의 여부를 형질전환 callus를 이용하여 분석하였다.

Fig 27과 같이 형질전환 callus의 genomic DNA를 제한효소 (BglII)를 처리한 후 OsASA2의 첫 번째 엑손영역의 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. TALEN이 binding 되어 해당 부분의 염기서열이 삭제 혹은 치환 및 삽입과 같이 mutant 된 산물은 NHEJ으로 인해 증폭된 PCR band를 확인할 수 있다. 반면에 TALEN이 binding 되지 않은 callus는 제한효소 처리가 정상적으로 이루어져 439 bp와 61 bp의 cutting된 DNA 조각을 확인하였고, PCR 산물은 확인할 수 없었다.

형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 OsASA2 유전자의 도입여부를 알아보기 위해, 재분화된 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도입유전자 PGD1-pinII Bar vector에서 Bar유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 조사한 14개의 재분화 식물체에서 Bar 유전자가 검출되었다 (Fig 27B). 이를 통하여 OsASA2 유전자가 벼 게놈에 잘 도입되어 있음을 확인하였다.

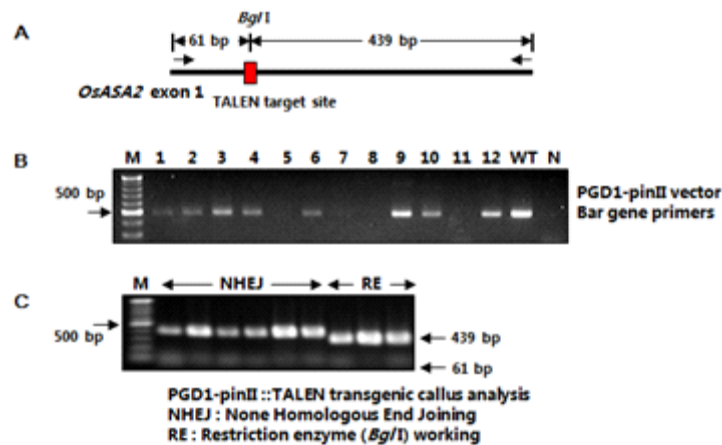


Fig 27. Detection of TALEN-induced mutations in rice protoplasts and somatic cells. A, Schematic of the strategy used to amplify and identify mutations at the TALEN target sites (red rectangle). B, PCR analysis used transgenic callus. C, Restriction endonuclease assay to detect TALEN-induced mutations in rice.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### (1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기술 이전
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 수 생 입 관 매 신 고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1							1	
	달성	1							1	
2차 년도	목표	1					1	1		
	달성	1					2	2		
3차 년도	목표	1	1			1	1	1		
	달성	1	1					2	1	
계	목표	3	1				2	3	1	
	달성	3	1				2	5	1	

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 돌연변이 육종을 통하여 고품질 tryptophan 벼를 개발하여 교배 모본으로 육성
- 함량 tryptophan 벼를 현재 재배 중인 고품질 내병충성, 내재해성 품종과의 교배를 통하여 안정적인 생산이 가능하며 고품질 tryptophan을 생산하는 우수 품종을 육성하여 안정적인 고품질 미를 육성함으로써 세계무역기구(WTO), 자유무역협정(FTA)로부터의 쌀 시장 개방 압력에 대비하여 국내외 쌀시장에서 경쟁력을 확보
- 고 기능성 국산 종자와 유용한 유전자원의 개발에 활용하며 새로운 '웰-빙 컨셉'과 맞물려 소비자의 관점에서 '기능성 쌀' 개발에 이용 가능

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Insights into genomics of salt stress response in rice	Kumar K	조용구	Kumar M 김성룡 류호진	Rice	7	국외	SCI
2013	Overexpression of <i>BrSACL1</i> encoding a phosphoinositide phosphatase isolated from Chinese cabbage ( <i>Brassica rapa</i> L) improved tolerance to cold, dehydration, and salt stresses in transgenic tobacco	정유진	강권규	한경희 Bayar 이인혜 최장선 노일섭 조용구	African J Biotechnolo gy	12(15)	국외	SCIE
2014	Modification of Starch Composition Using RNAi Targeting Soluble Starch Synthase I in Japonica Rice	이혜정	조용구	김준기 Sailila 노일섭	Plant Breed. Biotech.	2(3)	국내	비SCI
2013	Molecular characterization of BrRZFPs genes encoding C3HC4 type RING zinc finger protein under abiotic stress from Chinese cabbage( <i>Brassica rapa</i> L.)	정유진	강권규	조용구 이계동 노일섭	Journal of Plant Biotechnolo gy	40	국내	비SCI
2014	Key Roles of Cysteine Protease in Different Plant Pathosystem	Marjohn	조용구	김준기 이혜정 Sailila 노일섭	Plant Breed. Biotech.	2(2)	국내	비SCI
2014	Rice Transformation Efficiency use of the 5-Methyltryptophan with the Anthranilate Synthase Gene(ASA2) as a Selectable Marker for <i>Agrobacterium</i> Mediated Methods	정유진	강권규	조용구 노일섭	Journal of Plant Biotechnolo gy	41(4)	국내	비SCI
2012	Molecular and functional characterization of a <i>Brmecp</i> gene encoding 2-C-methyl-D -erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase from <i>Brassica rapa</i>	정유진	강권규	최장선 전남섭 노일섭 조용구	Journal of Plant Biotechnolo gy	39(3)	국내	비SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	5-메틸트립토판 저항성안트라닐레이트 합성효소 변이체 유전자 선별마커로서의 용도	충북대 산학협력단	대한민국	10-2014-0188533	2014	내염성유래의 OSMO의 용도	충북대 산학협력단	대한민국	10-1376522
2013	식품에서 아미노산 함량을 증가시키는 효소 변이체 및 이의 용도	충북대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0127844					
2012	내염성을 증가시키는 유래의 OSMO 및 이의 용도	충북대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0099311					

라. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

성과 연도	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2014	5	2	3			2	3			5
2013	5	2	4			3	3			6
2012	3	1	2			1	2			3

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

\* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

## 제 8 장 참고문헌

Anzala F, Paven MM, Fournier S, Rondeau D, Limami AM. 2006. Physiological and molecular aspects of aspartate-derived amino acid metabolism during germination and post-germination growth in two maize genotypes differing in germination efficiency. *Journal of Experimental Botany* 57, 645 - 653.

Bender J, Fink GR. 1998. A myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 5655 - 5660.

Bandurski RS, Schulze A. 1977. Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiology* 60, 211 - 213.

Chavadej S, Brisson N, McNeil JN, De Luca V. 1994. Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, 2166 - 2170.

Cho H-J, Brotherton JE, Song H-S, Widholm JM. 2000. Increasing tryptophan synthesis in a forage legume *Astragalus sinicus* by expressing the tobacco feedback-insensitive anthranilate synthase (ASA2) gene. *Plant Physiology* 123, 1069 - 1076.

DellaPenna D. 2001. Plant metabolic engineering. *Plant Physiology* 125, 160 - 163.

Eder K, Peganova S, Kluge H. 2001. Studies on the tryptophan requirement of piglets. *Archiv für Tierernährung* 55, 281 - 297.

Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward RT, Webber P. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology* 13, 577 - 582.

Heine W., Radke M., and Wutzke K.-D. (1995) The significance of tryptophan in human nutrition. © Springer-Verlag *Amino Acids* 9:191-205

Henry Y, Se'Ve B, Colle'aux Y, Ganier P, Saligaut C, Je'go P. 1992. Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma free amino acids and hypothalamic serotonin. *Journal of Animal Science* 70, 1873 - 1887.

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6, 271 - 282.



Ibaraki Prefecture Standard Lowland Rice Cultivation. 1990. In: Standard cultivation of crops in Ibaraki Prefecture. Ibaraki Prefecture, 1 - 12.

Kreps JA, Town CD. 1992. Isolation and characterization of a mutant of *Arabidopsis thaliana* resistant to  $\alpha$ -methyltryptophan. *Plant Physiology* 99, 269 - 275.

Lai J, Messing J. 2002. Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *The Plant Journal* 30, 395 - 402.

Limami AM, Rouillon C, Glevarec G, Gallais A, Hirel B. 2002. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. *Plant Physiology* 130, 1860 - 1870.

Ludwig-Muller J, Sass S, Sutter EG, Wodner M, Epstein E. 1993. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. I. Identification and quantification. *Plant Growth Regulation* 13, 179 - 187.

Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK (2011) De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *PNAS* 108: 2623-2628.

Massey KA, Blakeslee CH, Pitkow HP. 1998. A review of physiological and metabolic effects of essential amino acids. *Amino Acids* 14, 271 - 300.

Matsuda F, Miyazawa H, Wakasa K, Miyagawa H. 2005. Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 778 - 783.

Mazur B, Krebbers E, Tingey S. 1999. Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* 285, 372 - 375.

Moffett J. and Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) **81**, 247-265; doi:10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01177.x

Morandini P, Salamini F. 2003. Plant biotechnology and breeding: allied for years to come. *Trends in Plant Science* 8,70 - 75.

Morino K, Matsuda F, Miyazawa H, Sukegawa A, Miyagawa M, Wakasa K. 2005.

Metabolic profiling of tryptophan overproducing rice calli that express a feedback-insensitive a subunit of anthranilate synthase. *Plant and Cell Physiology* 46, 514 - 521.

Morris CF, Mueller DD, Faubin JM, Paulsen GM. 1988. Identification of L-tryptophan as an endogenous inhibitor of embryo germination in white wheat. *Plant Physiology* 88, 435 - 440.

Movig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, Craig S, Spencer D, Higgins TJV. 1997. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94,8393 - 8398.

Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, 5222 - 5226.

Ramaih S, Guedira M, Paulsen GM. 2003. Relationship of indole acetic acid and tryptophan to dormancy and preharvest sprouting of wheat. *Functional Plant Biology* 30, 939 - 945.

Sakai M, Iida S, Maeda H, Sunohara Y, Nemoto H, Imbe T. 2003. New varieties for whole crop silage use in Japan. *Breeding Science* 53, 271 - 275.

Sakai M, Imbe T, Nemoto H, et al. 2003b. A new rice variety for whole-crop silage "Kusahonami". *Bulletin of National Institute of Crop Science* 4, 1 - 15.

Se've B. 1999. Physiological roles of tryptophan in pig nutrition. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 467, 729 - 741.

Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA et al (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437-441.

Sung ZR. 1979. Relationships of indole-3-acetic acid and tryptophan concentrations in normal and 5-methyltryptophan-resistant cell lines of wild carrots. *Planta* 145, 339 - 345.

Takeoka Y, Shimizu M, Wada T. 1993. Panicles. In: Matsuo T, Hoshikawa K, eds. *Science of the rice plant, Vol. 1. Morphology*. Food and Agriculture Policy Research Center, 295 - 338.

Takimoto I, Christensen AH, Quail PH, Uchimiya H, Toki S.1994. Non-systemic expression

of a stress-responsive maize polyubiquitin gene (Ubi-1) in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology* 26, 1007 - 1012.

Urnov FD, Miller JC, Lee Y-L, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD and Holmes MC (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435: 646-651.