

최 종
연구보고서

Bromelain 및 hCAP18 유전자를 이용한
항균물질생산 형질전환 배추 계통육성 및 이용

Breeding and Utilization of Transgenic
Brassicarapa Lines for Antimicrobial by Using
Bromelain and hCAP18 Genes

주관연구기관 : 한경대학교

협동연구기관 : 셀 텍(주)

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Bromelain 및 hCAP18 유전자를 이용한 항균물질생산 형질 전환 배추 계통육성 및 이용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007. 5. 24.

주관연구기관명 : 한경대학교

총괄연구책임자 : 강 권 규

연 구 원 : 이 순 열

연 구 원 : 정 유 진

협동연구기관명 : 셀 텍(주)

협동연구책임자 : 문 병 현

요 약 문

I. 제 목

Bromelain 및 hCAP18 유전자를 이용한 항균물질생산 형질전환 배추
계통육성 및 이용

II. 연구개발 목적 및 필요성

유전자 재조합기술은 지금까지 행하여 왔던 육종기술을 초월하여 전 생물계를 대상으로 유용한 유전자를 선택하여 특정 종에 도입하여 발현시키는 것으로 새로운 농업혁명의 수단이 되고 있다. 1990이후 농업분야에서 분자생물학 기술을 이용한 작물개량은 해충, 병원균 및 제초제 등의 저항성 개체를 선발하여 불리한 환경에서 견딜 수 있도록 하거나 또는 과일의 숙기(성숙) 조절, 화색 등의, 질적 factor를 개량하는데 많은 성과를 보여 그 응용범위가 매우 넓다. 최근 들어 고등 식물에서 재조합 단백질의 생산은 기존에 사용하고 있는 대장균체계보다 생물간 차이에 따른 면역성 저하문제가 해결할 수 있으며, 함께 공급되는 식물 조직에 의해 항원이 위장의 적대적 조건들을 회피할 수 있게 하는 점에서 효용성이 매우 높다. 그 예로 경구백신용 형질전환 식물체를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 이미 감자에서 cholera toxin B 나 hepatitis virus 에 대한 항체를 생산하여 그 효능을 확인되어진 바 있고, 토마토 및 바나나 등에서 식물유래 백신생산에 관한 연구가 보고 되고 있어 멀지 않아서 성공적인 임상결과를 통하여 실용화가 가능할 것으로 보인다. 또한 monoclonal 항체를 식물에서 발현시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 바이러스에 대한 항체 유전자의 도입을 통해 항바이러스성 식물체가 개발되었다. 파인애플 (*Ananas comosus*)은 오래전부터 세계 여러 곳에서 민간 약용물질로 많이 이용되었으며, 1876년에 약용물질이 bromelain이라고 알려지면서 의약품으로 도입되어 사용되기 시작하였다. 주로 파인애플 줄기에서 얻어지는 bromelain은 단백질 분해효소 중 cystein protease로 분류되는 protease의 복합체로서 의약품 및 다이어트 상품으로 시중에서 팔리고 있다. Bromelain의 기능은 (1) 항혈청 응고제 (혈소판의 응고를 저해) (2) 파이프리노젠의 분해 능력을 가짐 (3) 소염 작용: 염증을 일으키는 단백질의 작용을 억제 (4) 항암작용 (5) cytokines 조절 및 면역작용 (6) 피부 좌멸 조직 제거

(7) 다른 약제의 흡수 증강 (8) 소화 보조제 (9) 순환계 활성 증강 등으로 현재 외상 및 외과수술 후 부종을 줄이거나 통증, 치료시간 감소를 위하여 또는 항암 보조제로서 의약적으로도 많이 사용되는 물질이다. 또한 일반인에게는 다이어트 보조 식품으로 사용되고 있는데 이는 이 효소가 지방산을 분해하여 체중을 줄일 수 있다고 발표된 바가 있기 때문이다. Bromelain의 분자적 특성은 분자량이 약 33,000의 염기성단백질로서 283개의 아미노산으로 구성되어 있다. 또한 단백질 분해능은 동일해도 조직 및 기관에 따라 서로 다른 효과를 보이는 것으로 Khan 등은 bromelain의 glycosylation 정도에 따라 그 활성이 달라지는 것을 보고하였다 (Khan et al., 2003). Bromelain의 흡수력은 소화기관에서 40% 까지도 섭취한 그대로 흡수되는 것으로 보고되었는데 주로 섭취 후 1시간 후에 혈액에서 가장 많이 발견이 된다. Bromelain은 안정성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없으며, 계속 사용하여도 신체 내에 내성이 생기지 않는다고 보고되었다. 또한 283개의 amino acid로 구성된 단백질로서 다른 단백질과 같이 대사가 되어 분해가 되는 물질로 인체에 해가 없어 bromelain은 복용할 수 있는 의약품으로 최근 관심을 받고 있다. 최근 Ko 등은 monoclonal antibody를 담배에서 발현시켰는데 glycosylation이 천연상태와 유사하게 이루어졌음을 확인하였다 (Ko et al., 2003). 이는 매우 고무적인 결과로 본 연구에서도 그와 같은 system을 이용하여 배추에 활성을 가진 bromelain을 발현시킨다면 앞에서 설명한 유익한 기능의 bromelain을 음식물로 복용할 수 있는 효과를 보일 수 있다.

또한 항균 peptide는 동식물을 비롯한 모든 다세포 생물은 미생물의 침입에 효과적으로 방어하기 위한 자연면역계 (innate immune system)를 진화시켜왔는데, 항균펩티드 (antimicrobial peptide)는 연체동물에서 사람에게 이르기까지 널리 분포하여 미생물에 대한 일차적 방어 수단으로 매우 중요한 역할을 담당해왔다. 항균 펩티드는 미생물을 동물이나 식물로부터 구별 짓는 원핵 세포막을 표적으로 하여 작용하기 때문에 다양한 그람양성과 그람음성 세균, 바이러스, 곰팡이 등 그 항균 효과가 넓게 나타나는 것이 특징이다. 이렇게 미생물에 대한 일차적 방어수단으로 작용할 뿐 아니라 자연면역반응과 적응면역반응 (adaptive immune response)을 조절하는 조절인자로도 작용한다. 나아가 항균펩티드의 장점은 미생물이 항균 peptide 에 대해 미생물이 내성을 획득하는 빈도가 매우 낮으므로 기존의 항생제를 대체할 수 있는 약제 개발의 새로운 분야로 떠오르고 있다.

특히 인체 유래 항균성 peptide는 주로 자연 면역체계에서 사용되는 peptide로

서 주로 15-45의 amino acid 으로 구성되어 있으며 전체적인 전하 (net charge) 는 양이온을 띄고 있다 (Boman, 2002). 현재 database에는 동, 식물 및 곤충들을 포함한 여러 종 기원의 800 여개의 peptide가 보고 되어있다. 주로 이들은 하나의 전구체로 얻어지며 이들 peptide 들은 박테리아의 세포막에 작용하여 멸균 효과를 보인다고 한다. 인간의 경우는 크게 두 종류의 peptide 들이 존재하는데 defensin (α -defensin 과 β -defensin) 과 cathelicidine 으로부터 유래한 선형의 LL-37 이다. 임상 연구결과 이들 peptide가 결여되면 치명적인 증상을 보인다고 한다 (Boman, 2002). 정상적인 피부에서는 이들 peptide의 양은 매우 소량 존재하지만 염증이 생기면 이들 peptide 항생제들이 증가하게 된다. 그 예를 보면 염증을 유발하고 LL-37 과 defensin의 발현 정도를 보면 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이들은 보통 *Staphylococcus aureus* 같은 bacteria 에 활성을 가진다.

본 연구는 항균기능을 가진 파인애플 유래 bromelain 관련 BAA1 유전자와 인체 유래 항균성 펩타이드 cathelicidin 관련 LL-37 유전자를 이용하여 배추에 도입하여 항균기능을 가진 고부가가치성 배추 식물체를 육성하여 실용화 하고자 한다.

III. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구는 분자 육종기술을 이용하여 국민건강을 목적으로 파인애플 및 인체 유래 항균성 물질을 분리한 후, 배추에 형질 전환하여 항균기능을 가진 고부가가치성 식물체를 육성하고자 한다. 일반적으로 Bromelain은 (1) 항 혈청 응고제 (혈소판의 응고를 저해) (2) 파이버리노젠의 분해 능력을 가짐 (3) 소염 작용: 염증을 일으키는 단백질의 작용을 억제 (4) 항암작용 (5) cytokines 조절 및 면역작용 (6) 피부 궤멸 조직 제거 (7) 다른 약제의 흡수 증강 (8) 소화 보조제 (9) 순환계 활성 증강 등으로 현재 외상 및 외과수술 후 부종을 줄이거나 통증, 치료 시간 감소를 위하여 또는 항암 보조제로서 의약적으로도 많이 사용되는 물질이다. 또한 인체유래 peptide는 동식물을 비롯한 모든 다세포 생물은 미생물의 침입에 효과적으로 방어하기 위한 자연면역계 (innate immune system)를 진화시켜왔는데, 항균펩티드 (antimicrobial peptide)는 연체동물에서 사람에 이르기까지 널리 분포하여 미생물에 대한 일차적 방어 수단으로 매우 중요한 역할을 담당해왔다.

항균펩티드는 미생물을 동물이나 식물로부터 구별 짓는 원핵 세포막을 표적으로 하여 작용하기 때문에 다양한 그람양성과 그람음성 세균, 바이러스, 곰팡이 등 그 항균효과가 넓게 나타나는 것이 특징이다.

따라서 이들 관련 유전자를 분리하여 도입한 형질전환 배추에 도입된 외래 유전자의 후대 유전분석을 실시하고 우량품종을 고정시킴으로서 항균기능이 부여된 육종소재의 창출하는데 있다.

표 1. 연구 개발 내용 및 범위

| 연구 개발 내용 | 연구 범위 |
|---|---|
| 차세대 항균 peptide 생산을 위한 형질전환체 육성 및 실용화 기술개발 | (1) Bromelain유전자를 도입한 형질전환 배추의 후대 육성 및 유전분석 (2) 항균 peptide (LL-37) 유전자의 분리 (3) 항생제 항균 peptide 유전자(hCAP18/LL37)의 식물 발현 Vector에 구축 (4) 항균 peptide 유전자 (LL-37)의 형질전환 배추 육성 및 항균성 검정 |
| 형질전환체의 동물임상 실험을 통한 항균성의 효용성 검증 및 실용화 | (1) Bromelain 유전자가 도입한 배추 및 당근을 이용한 동물 임상 실험 - 동물 임상 실험 방법 확립(BALB/c) - Bromelain 발현 배추의 임상실험(BALB/c 사용) - Bromelain을 발현하는 배추를 사료와 혼합하여 투여 - 대조군과 항균성 비교 (2) 형질전환식물체들의 동물임상 실험을 통한 항균성의 실제적 이용 - 닭에 임상 실험 |

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구에서 효율적인 병 방제를 위해 항균활성을 가지는 파인에플 유래 bromelain 유전자와 인체유래 cathelicidine 계열의 항균펩티드 (LL-37)를 이용하여 형질전환 식물체를 육성하고 저항성 증진 효과를 살펴보았다. 파인에플 유래 bromelain 효소는 열대식물에 많이 존재하며 임상실험에서 antiproliferation, antimetastatic 및 암세포 성장을 억제 (Batkin et al., 1988; Munzig et al., 1994; Grabowska et al., 1997)하며, 항혈청응고제, 항암작용, 피부 좌멸 조직제거 등 (Engwerda et al., 2001) 의약품에 널리 이용되는 물질이다. 현재 보고 되어진 bromelain 관련 유전자군의 연구는 의·약학적인 이용에 관한 연구 외에 식물을 이용한 유전자의 기능분석 연구는 거의 없는 실정이기에 그 기능을 예측할 수는 없었으나, 본 연구에서는 파인에플로부터 분리한 bromelain (BAA1) 유전자를 식물에 도입하여 그 기능을 분석하였다.

BAA1 유전자를 Chinese cabbage 'OSOME'에 도입하여 나타난 기능을 연구한 결과 배추의 무름병을 유발하는 *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*에 대해 저항성 증진 효과가 있다는 결과를 얻었다. 식물병원균 *Pectobacterium*속은 여러 작물에 무름병 증상을 일으킨다. 이 세균이 pectatylases, polygalacturonases, cellulase 및 proteases와 같은 여러 가지 식물조직을 파쇄하는 효소를 생성할 때, BAA1 유전자가 도입됨으로써 식물체에 생성된 물질이 무름병을 유발하는 균의 성장을 억제하여 저항성이 증진되었다고 생각되어진다.

이와는 반대로 균의 침입을 효과적으로 방어하는 자연면역계 (innate immune system)중 인체유래 항균펩티드 (AMP; antimicrobial peptide)의 cathelicidin으로부터 유래한 선형의 LL-37은 임상실험 결과 매우 소량의 존재 하에서도 염증 치료 및 항균성이 탁월하다고 알려져 있다 (Zaiou et al., 2003; Frohm et al., 1999; Sorensen et al., 1997). 본 연구는 2002년 Schmidtchen 등이 보고한 cathelicidine 계열의 LL-37 유전자를 식물 세포내에 도입하여 많은 미생물에 광범위한 내성을 지닌 Chinese cabbage 'OSOME'를 육성하고 그 기능을 분석하기 위해 LL-37 유전자가 도입된 배추의 세균병 및 진균병에 대한 저항성 증진 효과에 대해 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

제 1 절 파인애플 유래 Bromelain 유전자 (BAA1) 분리, 형질전환 배추의 육성 및 항균성 실험

1. 파인애플 유래 bromelain 관련 유전자를 분리하기 위해 NCBI data 분석을 통해 합성한 primer Br1 (5'-ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTG-3')과 Br4 (5'-TCAAGTTTCAGAAACCATCTT-3')를 이용하여 RT-PCR 분석한 결과 각각 기관에서 약 1050bp으로 개시 코돈과 종지 코돈을 포함하고 있는 full length cDNA로 1997년 Muta 등이 보고한 bromelain 관련 유전자와 99% 상동성을 보였다. 또한 아미노산 배열 중에 cystein protease만이 보존하고 있는 배열 E₅₃XXXR₅₇XXXF₆₁XXN₆₄XXXI₆₈XXXN₇₂ motif가 존재 하였다. 따라서 아미노산 구조로 볼 때 BAA1 유전자의 산물인 bromelain은 papain subfamily 중 cathepsin L 이었다.

2. BAA1 유전자의 아미노산 배열과 이미 보고 된 유전자 간에 계통수를 작성 하였다. 계통수 작성에는 NCBI 검색 결과 얻어진 bromelain 관련 유전자의 accession number를 유전자 이름으로 대신하였다. 계통수 작성 결과, 현재 보고 되어진 bromelain 관련 유전자군은 크게 두개의 그룹으로 나뉘어지는 것을 알 수 있었다.

3. 식물 발현 binary vector 구축을 위하여 pIG121Hm의 GUS 유전자를 *Bam*HI 과 *Sac*I 처리에 의해 제거한 후, 그 위치에 파인애플로부터 분리한 BAA1 유전자를 삽입시켜 구축하였다.

4. BAA1 유전자의 형질전환은 배축법 (Takasaki et al., 1997; Kuginuki et al., 2001)을 이용하였다. *Agrobacterium*을 감염시킨 배축의 절편은 callus 유도배지에서 배양 10일 후부터 callus가 형성되기 시작하였다. 또한 재분화 배지에 2회째의 계대배양 후기부터 callus에서 부정아가 형성되기 시작하였으며 3회 계대배양에서는 많은 multi-shoot가 발생하였다. 작은 싹들은 성숙배지에서 초장이 7-8cm 정도 될 때까지 성장시킨 후, hygromycin 50mg/L이 포함된 MS hormone free 배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 발근된 개체는 포트에 옮겨 순화시켰으며, 8-10°C, 40일간 저온처리 후, 개화를 유도하였다. 개화된 개체는 뇌수분하여 자식세대

(T1)를 획득하였다.

5. 형질전환체에서 도입유전자의 유전분석을 위해 T1 분리세대의 종자를 계통별로 25립씩 선별하여 hygromycin 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 파종하여 분리양상을 살펴보았다. 파종 21일 후, hygromycin에 대한 저항성 개체와 감수성 개체로 확인할 수 있었다. 각각의 계통으로부터 도입유전자의 분리비를 살펴본 결과 B65 계통을 제외한 나머지 계통에서는 멘델의 법칙에 따라 저항성과 감수성의 비율이 3:1의 통계적 유의성이 있어 이들 계통에서 T2 종자를 획득하였다.

6. 형질전환 식물체에서 도입한 유전자의 유·무를 알기 위해 항생제에 내성을 가진 T1식물체와 대조식물체를 이용하여 HPT, NPTII 및 BAA1 유전자 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 이용하여 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과 유전자를 도입하지 않은 대조식물체에서는 증폭산물을 얻을 수 없었으나, 형질전환 식물체들에서 HPT와 NPTII 유전자 산물이 확인되었다. 또한 BAA1 유전자의 PCR 분석에서 936bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다.

7. 형질전환 식물체에서 BAA1 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 각 계통에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과 도입한 BAA1 유전자가 정상적으로 mRNA로 전사되고 있음을 확인하였다.

8. Bromelain은 cysteine protease의 복합체로 알려져 있다. 그러므로 형질전환체의 세포내에 단백질 가수분해효소인 endo-protease 활성을 알아 본 결과 대부분의 형질전환체에서 대조구에 비해 높은 활성을 보였다. 또한 형질전환체들 간에 비교한 결과 endo-protease 활성의 차이를 보였다.

9. 항생제 내성실험을 위하여 뇌수분에 의해 획득한 T1 25개체의 자식종자를 Hyg 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 멸균하여 치상하였다. 치상 10일 후, 발아, 생육 및 고사 정도를 판정하여 18개체(72%)가 형질전환체임을 확인하였다. 이들 18개체(이하 계통이라 함)들을 배지로부터 pot로 옮겨 본 엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후, 위와 같이 저온처리 후 자식종자(T2)를 획득하였다.

10. 18개체 중 3개체(63-16-3, 64-10-2, 66-23-2)는 non-transformants, 11개체(63-9-2, 63-9-3, 63-16-1, 63-16-2, 64-10-1, 64-10-3, 64-12-1, 64-12-3, 66-3-3, 66-23-1, 66-23-3)는 도입된 유전자가 heterozygotes, 4개체(63-9-1, 64-12-2, 66-3-1, 66-3-2)는 도입된 유전자가 transgenic events이었다.

11. 도입유전자가 호모상태인 형질전환체임을 확인하기 위하여 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2로부터 각각 4개체의 total DNA를 template로 HPT와 NPTII primer 및 BAA1 유전자 primer를 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 그 결과, 유전자를 도입하지 않은 대조구에서는 PCR 산물이 검출되지 않았으나 Transgenic events에서는 목적 size의 DNA 단편이 명확히 검출되었다.

12. 형질전환 후대에서 BAA1유전자의 발현양을 확인하기 위하여 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2의 mRNA를 이용하여 RT-PCR 및 realtime PCR분석을 실시한 결과, β -actin primer에서는 wild type plants를 포함한 모든 transgenic events에서 균일한 발현정도의 산물이 증폭되었다.

13. 형질전환체에서 mRNA level에서 높게 나타난 homo계통을 이용하여 Western blot 분석을 실시한 결과 형질 전환체에서는 BAA1 단백질 33kDa 부근에서 band가 검출되었으나 wild type 식물체에서는 검출되지 않았다.

14. 형질전환체에서 BAA1 단백질 양을 검출하기 위해 ELISA분석한 결과 B66-3-1계통은 총 단백질에서 0.9%의 BAA1단백질로 매우 높은 단백질을 생산하고 있었다.

15. Microarray 실험에서 얻어진 data를 분석한 결과 B66-3-1에서 대조식물과 3.1배 이상 발현 변이를 보이는 유전자는 총 20개로 나타났다. 이들 유전자들의 기능을 살펴보면 protease 관련 유전자가 6개, stress 관련 유전자가 8개, ribosomal 관련 유전자가 2개, 그리고 알려지지 않은 유전자가 4개로 나타났다.

16. 배추를 기주로 무름 증상을 유발하는 병원균 (*P. carotovorum* ssp. *carotovorum*)을 배양하여 2×10^4 와 2×10^6 CFU/ml의 농도로 접종 실험한 결과

B63-9-1과 B64-12-2계통에서는 무름병에 저항능력이 증진되었다.

제 2 절 인체 유래 Cathelicidin 유전자 (LL-37) 도입에 의한 배추의 항균력 증진

1. 항균성 펩타이드 LL-37 유전자 (Gene bank accession no. NM- 004345)의 염기배열 정보로부터 primer를 합성하여 3 단계의 PCR 반응을 시킨 결과 114bp의 염기배열을 갖는 LL-37 유전자를 얻었다.
2. LL-37 유전자를 *E. coli* 세포에 발현시키기 위해 pET28 vector에 cloning 하여 GST와 fusion 시켜 SDS-PAGE 분석한 결과 IPTG에 의해 유도된 cell에서 8kDa 부근의 band가 나타났다.
3. *E. coli* 세포에서 LL-37 단백질이 항균활성을 보이는지를 알기위해 그람 음성 및 그람 양성균을 이용해 항균활성여부를 검토한 결과 그람 음성균 *E. coli* DH5a 와 그람 양성균 *Bacillus subtilis*의 성장을 분석한 결과 균 생장이 억제되는 clear zone을 볼 수 있었다.
4. *Agrobacterium*을 이용하여 배추 배축에 감염시켜 얻어진 형질전환체는 pot에 옮겨 순화시켰으며, 8-10°C, 40일간 저온처리 후, 개화를 유도하고, 개화된 개체는 뇌수분하여 자식종자 (T1)를 획득하였다.
5. 도입유전자 특이 primer set를 이용하여 PCR반응을 실시한 결과 유전자를 도입하지 않은 대조식물체에서는 35S promoter 영역의 PCR product가 발견되지 않았으나 T1 식물체들에서는 300bp상에 PCR product가 확인되었으며, hygromycin 유전자 특이 primer set를 사용하여 PCR 한 결과 형질 전환체에서 713bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다.
6. 형질 전환체에서 LL-37 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 각 계통에서 Total RNA를 추출하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과 형질 전환체에서 도입한 LL-37 유전자가 정상적으로 기능을 발휘하여 전사되고 있음을 확인하였다. 또한 형질 전환체를 이용하여 Western blot 분석을 실시한 결과 형질 전환체에서는 LL-37 단백질 4kDa 부근에서 band가 검출되었으나 대조식물체에서는 검출되지

않았다.

7. 배추에서 세균에 의해 병을 유발하는 무름병균 (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*)을 형질 전환체에 접종한 결과 B21, B22, B24 계통에서는 무름병 증상이 전혀 보이지 않았다.

8. 형질전환 계통들에서 진균병에 대한 저항성 증진효과를 알아보기 위해 시들음병균 (*F. oxysporum.*), 탄저병균 (*C. higginsianum*) 및 밑둥썩음병균 (*R. solani*)을 잎에 상처 및 무 상처로 접종한 결과 조사한 세 종류의 진균병원균에 대해 저항성이 증진되었다.

제 3 절 형질전환 배추의 사료내 첨가가 육계의 생산 성적에 미치는 영향

브로멜라인은 식물성 단백질분해효소의 일종으로서 탁월한 소염작용과 항균작용을 가진 것으로 널리 알려져 있으며 천연물질로서 내성이 없고 부작용이 없어 식품, 의약품 분야에서 광범위하게 사용되고 있다. 최근에는 축산 수의분야에서도 Bromelain 다양한 기능을 이용하려는 시도가 많은데 아직까지 사용효과나 사용방법, 경제성에 대한 연구가 부족한 실정이다.

본 연구에서는 유전자재조합이라는 새로운 기술을 이용하여 브로멜라인 생성 사료작물을 개발하여 사료형태로서 가축에 급여할 수 있는 방안을 제시하기 위하여 본 연구를 실시하였으며 다음과 같은 결과를 관찰하였다.

1. 형질전환 배추의 처리구는 대조구에 비해 육계의 성장률이 높았고 희토 처리구는 성장률과 사료 효율이 높아지는 결과를 보였다. Bromelain과 형질전환 배추의 급여는 별다른 영향이 없었다.

2. 복강지방의 비율에 미치는 영향은 처리구가 대조구에 비해 감소하는 경향은 보였지만 유의차는 없었고, 희토 처리구에서는 뚜렷한 감소효과가 있었다.

3. 간의 무게는 bromelain처리구가 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였지만 유의

차가 없었고 소장길이의 변화도 처리구가 대조구에 비해 짧아지는 경향을 보였지만 통계적인 유의차는 없었다.

4. 처리구는 대조구에 비하여 HDL-cholesterol은 증가하고 LDL-cholesterol은 감소하는 경향을 보였지만 통계적인 유의차는 발견되지 않았다.

2. 기대효과 및 활용방안

가. 기대효과

1) 기술적측면

- 국내의 배추 재배에서 문제시되고 있는 주요 질병은 노균병, 무름병, 무사마귀병, 밑둥썩음병, 흰녹가루병, 모자이크병 등으로 이들 병해의 방제를 위해 다량의 약제 살포가 요구되고 있다. 특히 무름병의 경우, 그 피해가 심각하여 여름철 배추 생산의 가장 큰 장애요인으로 우리나라 뿐 만아니라 일본 및 중국에서도 많이 발생하는 병으로 약제 살포 효과가 낮기 때문에 방제가 어려운 실정이다.

- 최근 분자생물학의 발달로 병해충에 강한 작물을 개발하고자 하는 노력이 세계 여러 나라에서 중요한 연구 주제로 급부상되어 많은 연구를 수행하고 있으나 그 방어기작에 대해서 정확한 해명이 이루어지지 않은 실정이다

-배추의 형질전환체계 확립으로 본 과제에서 이용한 유전자 뿐 아니라 어떤 종류의 유전자도 항균성 물질을 생산 할 수 있는 벡터의 구축개발 및 발현체계를 확립하였다. 따라서 병저항성 유전자원 source의 극복이 가능하다.

2) 경제 산업적 측면

- 내성이 없는 항생물질을 발현시키는 식물체를 생산한다면 차세대 항균제로서 사용할 수 있을 것으로 기대되며, 특히 이는 구강용 병균에 대하여 지대한 효과를 보여 경제·산업적으로 이용가치가 매우 높다

- LL-37 은 넓은 spectrum 의 박테리아에 멸균력을 보이는데 이는 bacteria의 세포벽에 위치하는 LPS를 중화시켜 멸균하는 것으로 보고되었다. 또한 세균물질에 의한 대식세포 활성화를 억제함으로써 염증반응에 동반되는 조직손상을 제한하여 적응면역반응을 조절하는 인자로서도 작용한다. 그러므로 LL-37 은 Gram-positive 와 Gram-negative 그리고 곰팡이에도 작용을 하는 광범위하게 사용할 수 있는 antimicrobial peptide 로서 그 임상학적 가치는 지대하다고 볼 수 있다.

- 유사한 cathelicidin계 항균peptide가 폐지에서도 발견이 되었는데 PR-39 으로 명명되었다. 이는 proline을 많이 함유하고 있는 항균 peptide로서 심근경색, 등의 효과를 보인다고 한다. 반면 유사한 물질인 protegrin이라는 물질 또한 방사선이나 화학요법으로 인한 구강 염증치료제로서 임상 3 단계 실험중이다 (Lehrer and Ganz., 2002).

- 구강 내 항균펩티드의 발현 및 구강질환과의 연관성: Murakami et al. 은 LL-37 이 skin 뿐 아니라 거의 모든 상피세포와 타액에서도 발견이 된다고 보고하였다. 즉 광범위한 spectrum을 보이는 이 peptide 항생제가 충치 치료제로 사용 가능함을 시사하고 있다 (Murakami et al., 2002). 구강조직은 끊임없이 다양한 종류의 세균에 노출되어 있으며, 이들 세균에 의한 감염이나 질환이 발생할 가능성이 항상 존재한다. 항균펩티드는 초기 방어기능을 담당하므로 다양한 구강질환, 특히 주요 구강질환인 치주염 원인균 뿐 아니라 구강 내 다양한 상주균 및 병원균에 대하여 항균펩티드의 항균효과를 기대할 수 있다.

3) 사회 문화적 측면

- 대체로 현대인들은 바쁜 생활로 인하여 의약품 복용을 잊거나 거부감을 갖는 경우가 있는데 이러한 배추나 당근을 부식으로 섭취하여 환자들의 치료효과를 보거나 다이어트 식품으로는 섬유질이 풍부하여 그 자체로도 다이어트 식품일 수 있는 부식이 약효까지 보이는 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.

나. 활용방안

- 항균성 물질의 식물에 발현 체계 확립함에 따라 타작물의 병저항성 계통이 육성할 수 있다. 또한 자연면역 system을 이용하기 때문에 자연친화적인 품종의 육성이 가능하다고 생각한다.

SUMMARY

Section 1. Isolation of BAA1 gene encoding bromelain and breeding of transgenic Chinese cabbage

1. Bromelain in pineapple is known as antiproliferation, antimetastatic and inhibitor of cancer cell growth as results of animal clinical test and widely uses. Muta et al. (1997) was reported bromelain gene was isolated. We also isolated similar gene, BAA1 from pineapple plant by RT-PCR and this gene contained start and stop codon is 1050bp. BAA1 gene is similar to BAA21929 and T10516, which are 95% and 90% homologous respectively. Cys proteinase motif in ORF region, E₅₃xxxR₅₇xxxF₆₁xxN₆₄xxxI₆₈xxxN₇₂, which is only contained in Cathepsin L of papain subfamily, is also found in BAA1 gene. Therefore, BAA1 gene might be one of papain superfamily.

2. Isolated gene was inserted into GUS removed pIG121Hm digested with *Bam*HI and *Sac*I. This expression construction was transformed into *Agrobacterium* and then plant tissues of *Brassica rapa* were infected. The tissues were replaced on callus inducing media. The explant tissues were placed onto the pre-incubation plates ensuring good contact with the media and incubated under low light condition. After 2 days, the explants were transferred onto selective media containing antibiotics and were incubated under low light conditions for 7-8 days. The plates were moved on normal light condition and the explant were transferred to fresh selective media plates every 3 weeks. The callus were incubated onto shooting media containing antibiotics. Shoots formed from callus were excised, placed onto rooting media containing 50mg/L hygromycin and were incubated as above until roots formed. Transgenic plants that rooted on kanamycin were transferred to compost. After 40 days incubation of in 8-10C, flowering was induced and to get self pollination seeds from transgenic plants.

Transformation rate was 4%, which is higher than He et al. (1990) transformation rate 2.5%.

3. 25 Seeds from transgenic plants (T₀) were germinated on each selective media containing hygromycin 50mg/L. Most lines were segregated 3:1 or 15:1 as Mendel's law but some of lines were not. We selected T₂ generation seeds, which were segregated as 3:1 and these plants might be single copy induced lines. Transgenic plants were analyzed by PCR with 35S specific primer and BAA1 specific primer. T₁ transgenic plants showed 300bp (35S specific primer and BAA1 specific primer) and 620bp (BL1 specific primer set) PCR products but some plants were not because of segregation. RT-PCR was used to confirm expression of transgene BAA1 in transgenic plants and transgene was detected in most plants.

4. T₂ transgenic seeds from 18 T₁ lines were germinated on selective media containing hygromycin 50 mg/L. To select transgenic homozygote lines, PCR was used with 35S promoter specific primer set, 35S promoter specific primer and BAA1 gene specific primer, or NPTII primer set. The results were that 63-16-3, 64-10-2, 66-23-2 lines were not detected, 11 lines such as 63-9-2, 63-9-3, 63-16-1, 63-16-2, 64-10-1, 64-10-3, 64-12-1, 64-12-3, 66-3-3, 66-23-1 and 66-23-3 might be heterozygotes and other 3 lines such as 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 and 66-3-2 were homozygotes. Bromelain gene expression was confirmed by RT-PCR and realtime PCR.

5. Western blot analysis showed approximately 33kDa BAA1 protein in transgenic plant when BAA1 antibody was used as a probe but the band was not found in wild type plant. 0.9% BAA1 protein in total proteins obtained from ELSA method was highly produced in B66-3-1 line.

6. In comparison between homozygote line and wild type, 5.3% of total genes, 2013 genes in homozygote line were expressed in 2 fold higher or lower. 1352 gene in homozygote line were overexpressed more than 2 fold higher but 661 gene were down-regulated more than 2 fold lower.

7. The results of microarray analysis were that the expressions of 20 genes in homozygote line were 5 fold higher: 6 protease, 8 stress, 2 ribosomal related genes, and 4 unknown genes. In the further study, the results of serin protease, lipase and cystatin related gene expressions were analyzed by RT-PCR and realtime PCR and 10-15 fold up-regulated in homozygote line than in wild type.

8. Serin protease, lipase and cystatin related gene were highly up-regulated in BAA1 overexpressed 66-3-1 line. These results might imply transgenic plants sensitively respond to biotic stress such as plant disease. To study biotic stress major disease of Brassica rapa., soft rot or bottom rot was inoculated. *Pectobacterium carotovorum* ssp. was inoculated under different concentrations to 63-9-1 and 64-12-2 transgenic lines and then plants were incubated for 2days. Transgenic plants infected under 2×10^4 CFU/ml concentration were not showed any marceration or showed low infection rates but high infection was showed in wild type plant. In transgenic plants resistance ability was increased and BAA1 gene might involve in disease resistance.

Section 2. Expression of a antimicrobial peptide gene (Cathelicidin LL-37) in Chinesecabbage enhances resistance to both fungal and bacterial pathogens

1. Cathelicidine LL-37 peptide gene was amplified by PCR, and constructed at *E. coli* expression vector pET 28. As the result of examining the antifungal ability to gram negative *E. coli* DH5 α and gram positive *Bacillus subtilis*, the clear

inhibition zone was found.

2. Plant infection vector VB2 with LL-37 gene was constructed, transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 line, infected the cotyledon of cabbage and raised 20 transgenic plants. Presence of HPT, 35S promoter, and LL-37 genes in four transgenic plants were confirmed by PCR analysis.

3. LL-37 mRNA was detected in four transgenic plants by RT-PCR analysis and the expected 4kDa sized protein band was found in the four transgenic plants by Western blot analysis.

4. To find out the resistance to the soft rot of transgenic cabbage which LL-37 gene is expressed, leaves of transgenic lines were inoculated with *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* at the density of 2×10^4 and 2×10^6 CFU/ml. After 12 hours, tissues of the leaves of the wild type plant began to soften and soft rot symptoms were found all over the leaves after 48 hours. However, in transgenic lines except line B23, there was no soft rot symptom developed even until 72 hours after inoculation.

5. Transgenic plant harboring LL-37 gene showed 66%, 75%, and 80% more resistance to *Colletotrichum higginsianum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*, respectively than wild type plant.

Section 3. The effect of dietary supplementation of transgenic cabbage containing bromelain on production of broilers

Bromelain, an extract from the pineapple plant and a proteolytic enzyme, has been demonstrated to show anti-inflammatory and anti-bacterial properties and usually consumed with food and medicines without tolerance and adverse effects. Recently, it has been tried to define functions of

bromelain on animal production and veterinary medical treatments. Never the less, it needs more research works especially to know feeding effects and methods, and economic analysis when bromelain is fed on livestock. Therefore, the study was carried out to develop bromelain-producing transgenic plant and investigate proper supplementation level of the plant for broiler production.

1. Feeding Seoul transgenic cabbage and rear earth supplement(RE) significantly increased the growth rate of broiler chicks compared with control($P<0.05$), while RE only improved feed conversion ratio ($P<0.05$).

2. The rear earth supplement clearly decreased abdominal fat content compared with other treatments ($P<0.05$). Liver weight tended to be decreased by all bromelain supplements and the length of the small intestine of chicks to be shorten.

3. All treatments tended to increase HDL-cholesterol concentrations in the serum of broilers but decrease LDL-cholesterol.

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Summary (in Korean) | 1 |
| Summary | 14 |
| Contents | 19 |
| Contents (in Korean) | 21 |
| Chapter 1. General Introduction | 22 |
| Chapter 2. Current Status of Technical Development | 29 |
| Chapter 3. Contents and Results of Research and Development | 33 |
| Section 1. Isolation of BAA1 gene encoding bromelain and breeding of transgenic Chinese cabbage | 33 |
| 1. Introduction | 33 |
| 2. Materials and Methods | 34 |
| 3. Results and Discussions | 50 |
| Section 2. Expression of a antimicrobial peptide gene (Cathelicidin LL-37) in Chinese cabbage enhances resistance to both fungal and bacterial pathogens | 82 |
| 1. Introduction | 82 |
| 2. Materials and Methods | 84 |
| 3. Results and Discussions | 91 |
| Section 3. The effect of dietary supplementation of transgenic cabbage containing bromelain on production of broiler | 104 |
| 1. Introduction | 104 |
| 2. Materials and Methods | 105 |
| 3. Results and Discussions | 108 |

| | |
|--|-----|
| Chapter 4. Achivement degree of Objective and Contribution degree to related field | 116 |
| Chapter 5. Future Plant Due to the Results of Research and Development | 119 |
| Chapter 6. Collected scientific and technical informations from Overseas | 120 |
| Chapter 7. References | 121 |

목 차

| | |
|---|-----|
| 요약문 (국문) | 1 |
| 요약문 (영문) | 14 |
| 목 차 (영문) | 19 |
| 목 차 (국문) | 21 |
| 제1장 연구개발과제의 개요 | 22 |
| 제2장 국내외기술개발 현황 | 29 |
| 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과 | 33 |
| 제1절 파인애플 유래 Bromelain 유전자 (BAA1) 분리, 형질전환 배추의 육성 및 항균성 실험..... | 33 |
| 1항 서론 | 33 |
| 2항 재료 및 방법 | 34 |
| 3항 결과 및 고찰 | 50 |
| 제2절 인체 유래 Cathelicidin 유전자 (LL-37) 도입에 의한 배추의 항균력 증진..... | 82 |
| 1항 서론 | 82 |
| 2항 재료 및 방법 | 84 |
| 3항 결과 및 고찰 | 91 |
| 제3절 형질전환 배추의 사료내 첨가가 육계의 생산 성적에 미치는 영향..... | 104 |
| 1항 서론 | 104 |
| 2항 재료 및 방법 | 105 |
| 3항 결과 및 고찰 | 108 |
| 4항 Bromelain을 이용한 사료첨가제와의 효능과 안정성 평가 검토...111 | |
| 제4장 목표달성도 및 관련분야의 기여도 | 116 |
| 제5장 연구개발결과의 활용 계획 | 119 |
| 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 120 |
| 제7장 참고문헌 | 121 |

제 1장 연구개발과제의 개요

배추 (*Brassica rapa* L.)는 십자화과에 속하는 온대성 식물로 13세기경 우리나라에 전래되어 재배되고 있다. 세계적으로 십자화과 식물은 배추, 양배추, 브로콜리, 겨자 및 유채 등 350속 3,000종으로 분화되어 게놈 진화 이론 (U's triangle)의 확립을 통한 유전학적, 육종학적 연구에 많은 성과를 보이고 있다. 주요 십자화과 식물의 게놈은 배추 (*B. rapa* $2n=20$ AA), 무 (*Raphanus sativus*, $2n=18$), 양배추 (*B. oleracea*, $n=9$, CC), 배추와 양배추가 교잡된 유채 (*B. napus*, $2n=4\times=38$, AACC), 배추와 흑겨자가 교잡된 갓 (*B. juncea*, $2n=4\times=36$, AABB) 등으로 구성되어 있으며, 이를 통해 다양한 품종으로 육성되어 시판하고 있다. 국내에서 배추는 4대 채소작물 중의 하나이며, 총 야채 재배면적의 1/4 정도를 차지하여 약 4만 ha에서 연간 240만 톤을 생산한다. 오래전부터 국내의 많은 배추 연구자들은 고온다습한 환경 조건에서 재배 가능한 품종으로 수량, 결구형, 숙기 및 내병성 등을 개선하려고 노력하고 있으며, 각 작형에 맞는 생태형 품종 및 품종 개선에 중점을 두고 육성하고 있다. 그럼에도 불구하고 해마다 배추의 여러 가지 병해로 인한 경제적인 피해가 막대하다.

국내의 배추 재배에서 문제시되고 있는 주요 질병은 노균병, 무름병, 무사마귀병, 밀둥썩음병, 흰녹가루병, 모자이크병 등으로 이들 병해의 방제를 위해 다량의 약제 살포가 요구되고 있다. 특히 무름병의 경우, 그 피해가 심각하여 여름철 배추 생산의 가장 큰 장해요인으로 우리나라 뿐 만아니라 일본 및 중국에서도 많이 발생하는 병으로 약제 살포 효과가 낮기 때문에 방제가 어려운 실정이다.

최근 분자생물학의 발달로 병해충에 강한 작물을 개발하고자 하는 노력이 세계 여러 나라에서 중요한 연구 주제로 급부상되어 많은 연구를 수행하고 있으나 그 방어기작에 대해서 정확한 해명이 이루어지지 않은 실정이다.

현재까지 분자생물학적 기법을 이용하여 식물의 병 저항성 증진에 사용된 유전자는 크게 3가지 유형으로 i) 병원균에 직접적으로 대항해서 항균능을 가지는 유형, ii) toxin과 같이 발병요인에 대항해서 항균능을 가지는 유형, iii) 자연면역반응계에 의해 항균능을 가지는 유형으로 분류된다 (Yun et al., 1997; Broekart et al., 1990). 이들 유형들 중에서 항균작용관련 유전자의 대다수는 병원균 세포막의

chitin 및 glucan의 가수분해에 의해 균의 성장을 저해하는 chitinase 및 beta-1,3 glucanase와 같은 효소 관련 유전자가 보고되었다 (Boller, 1987). 또 다른 항균능을 가진 방어관련 단백질들은 주로 식물 중에 알려져 있는 cystein-rich antimicrobial peptides (AMPs)로 이것은 defensins 및 lipid transfer proteins (LTPs) 및 thionins 등을 포함 한다 (Broekart et al., 1997). 이들 peptide는 짧은 alpha-helices의 안정화를 위해 2개, 3개 또는 4개의 이황화물 고리를 갖고 있다. 또 다른 항균능을 가진 단백질로는 thaumatin like proteins (TLPs), ribosome inactivating proteins (RIPs) 및 병원성관련 PR-protein 등이 있다 (Leah et al., 1991; Van Loon, 1997). 그들 중에서 TLPs는 *Thaumatococcus danielle*의 과실에서 분리한 15-26kDa의 크기를 가지는 펩타이드 이다 (Lin et al., 1996). 이와 상동성을 보이는 유전자들로 담배의 osmotin (Stintzi et al., 1991) 옥수수의 zeamatin (Roberts et al., 1990), 곡류 등에서 분리한 병원성유도 TLPs 등이 이들 그룹에 속한다 (Vigers et al., 1992). RIPs는 감수성식물, 진균 및 동물세포에서 단백질합성에 직접적으로 영향을 주는 것으로 이때 PR-protein의 축적이 동시에 일어난다 (Girbes et al., 1996). 그러나 단백질 합성과정에서 축적된 PR-protein의 기능은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나, 몇몇 연구자들의 보고에 의하면, 병원균에 대해 오랜 시간 동안 독성의 역할을 한다고 보고하였다 (Linthorst, 1991; Yun et al., 1997). 지금까지 glucanase (Yoshikawa et al., 1993), chitinase (Brogliè et al., 1991; Lin et al., 1995), pathogenesis-related protein 1 (Alexander et al., 1993), osmotin (Liu et al., 1994), defensin (Terras et al., 1994), thionin (Carmona et al., 1993) 및 lipid transfer protein (Molina et al., 1997)들을 도입하여 발현한 GMO 식물은 병원균에 대한 저항성이 증진 되었다는 결과를 보여주었다. 식물의 품종마다 특이적으로 저항성을 보이는 유전자들과는 달리 AMPs는 넓은 spectrum을 가지기 때문에 많은 종류의 병원균에 저항성이 증진된다고 보고 되고 있다 (Anzai et al., 1989; Higgins et al., 1998; Yang et al., 1997).

최근 들어 국내에서 배추의 유전자에 관한 연구가 몇몇 대학 및 연구소를 중심으로 유전자인행 구축, 기능 유전자의 분리 및 분자적 특성, RNAi법에 의한 유전자의 발현 제어, 유전자의 발현 강화, EST 비교 분석, microarray 기법을 이용한 유전자발현 해석 등이 활발하게 진행되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 항균기능을 가진 파인애플 유래 bromelain 관련 BAA1 유전

자와 인체 유래 항균성 펩타이드 cathelicidin 관련 LL-37 유전자를 이용하여 형질전환 식물체 육성을 통해 배추 재배 시 문제시되는 주요 질병에 저항성 증진 효과를 조사하였다.

제 1절 연구의 필요성

1) 기술적 측면

유전자 재조합기술은 지금까지 행하여 왔던 육종기술을 초월하여 전 생물계를 대상으로 유용한 유전자를 선택하여 특정 종에 도입하여 발현시키는 것으로 새로운 농업혁명의 수단이 되고 있다. 1990이후 농업분야에서 분자생물학 기술을 이용한 작물개량은 해충, 병원균 및 제초제 등의 저항성개체를 선발하여 불리한 환경에서 견딜 수 있도록 하거나 또는 과일의 숙기(성숙) 조절, 화색 등의, 질적 factor를 개량하는데 많은 성과를 보여 그 응용범위가 매우 넓다. 최근 들어 고등 식물에서 재조합 단백질의 생산은 기존에 사용하고 있는 대장균체계보다 생물간 차이에 따른 면역성 저하문제가 해결할 수 있으며, 함께 공급되는 식물 조직에 의해 항원이 위장의 적대적 조건들을 회피할 수 있게 하는 점에서 효용성이 매우 높다. 그 예로 경구백신용 형질전환식물체를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 이미 감자에서 cholera toxin B 나 hepatitis virus 에 대한 항체를 생산하여 그 효능을 확인한 바 있으며 토마토 및 바나나 등에서 식물유래 백신생산에 관한 연구가 보고 되어 있어 머지않아 성공적인 임상결과를 통하여 실용화가 가능할 것으로 보인다. 또한 monoclonal 항체를 식물에서 발현시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 바이러스에 대한 항체 유전자의 도입을 통해 항 바이러스성 식물체가 개발되었다. 파인애플 (*Ananas comosus*)은 오래전부터 세계 여러 곳에서 민간 약용물질로 많이 이용되었으며, 1876 년에 약용물질이 bromelain 이라고 알려지면서 의약품으로 도입되어 사용되기 시작하였다. 주로 파인애플 줄기에서 얻어지는 bromelain은 단백질 분해효소 중 cystein protease로 분류되는 protease의 복합체로서 의약품 및 다이어트 상품으로 시중에서 팔리고 있다. Bromelain의 기능은 (1) 항 혈청 응고제 (혈소판의 응고를 저해) (2) 파브리노젠의 분해능력을 가짐 (3) 소염 작용: 염증을 일으키는 단백질의 작용을 억제 (4)

항암작용 (5) cytokines 조절 및 면역작용 (6) 피부 좌멸 조직 제거 (7) 다른 약제의 흡수 증강 (8) 소화 보조제 (9) 순환계 활성화 증강 등으로 현재 외상 및 외과 수술 후 부종을 줄이거나 통증, 치료시간 감소를 위하여 또는 항암 보조제로서 의학적으로도 많이 사용되는 물질이다. 또한 일반인에게는 다이어트 보조 식품으로 사용되고 있는데 이는 이 효소가 지방산을 분해하여 체중을 줄일 수 있다고 발표된 바가 있기 때문이다. Bromelain의 분자적 특성은 분자량이 약 33,000의 염기성단백질로서 283개의 아미노산으로 구성되어 있다. 또한 단백질 분해능은 동일해도 조직 및 기관에 따라 서로 다른 효과를 보이는 것으로 Khan 등은 bromelain의 glycosylation 정도에 따라 그 활성이 달라지는 것을 보고하였다 (Khan et al., 2003). Bromelain의 흡수력은 소화기관에서 40% 까지도 섭취한 그대로 흡수되는 것으로 보고 되었는데 주로 섭취 후 1시간 후에 혈액에서 가장 많이 발견이 된다. Bromelain은 안정성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없으며, 계속 사용하여도 신체 내에 내성이 생기지 않는다고 보고되었다. 또한, 283개의 amino acid로 구성된 단백질로서 다른 단백질과 같이 대사가 되어 분해가 되는 물질로 인체에 해가 없어 bromelain을 복용할 수 있는 의약품으로 최근 관심을 받고 있다. 최근 Ko 등은 monoclonal antibody를 담배에서 발현시켰는데 glycosylation이 천연상태와 유사하게 이루어졌음을 확인하였다 (Ko et al., 2003). 이는 매우 고무적인 결과로 본 연구에서도 그와 같은 system을 이용하여 배추에 활성을 가진 bromelain을 발현시킨다면 앞에서 설명한 유익한 기능의 bromelain을 음식물로 복용할 수 있는 효과를 보일 수 있다.

또한, 항균 peptide는 동식물을 비롯한 모든 다세포 생물은 미생물의 침입에 효과적으로 방어하기 위한 자연면역계 (innate immune system)를 진화시켜왔는데, 항균펩티드 (antimicrobial peptide)는 연체동물에서 사람에 이르기까지 널리 분포하여 미생물에 대한 일차적 방어 수단으로 매우 중요한 역할을 담당해왔다. 항균 펩티드는 미생물을 동물이나 식물로부터 구별 짓는 원핵 세포막을 표적으로 하여 작용하기 때문에 다양한 그람양성과 그람음성 세균, 바이러스, 곰팡이 등 그 항균 효과가 넓게 나타나는 것이 특징이다. 이렇게 미생물에 대한 일차적 방어수단으로 작용할 뿐 아니라 자연면역반응과 적응면역반응 (adaptive immune response)을 조절하는 조절인자로도 작용한다. 나아가 항균펩티드의 장점은 미생물이 항균 peptide에 대해 미생물이 내성을 획득하는 빈도가 매우 낮으므로 기존의 항생제를 대체할 수 있는 약제 개발의 새로운 분야로 떠오르고 있다.

특히 인체 유래 항균성 peptide 는 주로 자연 면역체계에서 사용되는 peptide로서 주로 15-45의 amino acid 으로 구성되어 있으며 전체적인 전하 (net charge) 는 양이온을 띄고 있다 (Boman, 2002). 현재 database 에는 동, 식물 및 곤충들을 포함한 여러 종 기원의 800 여개의 peptide가 보고되어 있다. 주로 이들은 하나의 전구체로 얻어지며 이들 peptide 들은 박테리아의 세포막에 작용하여 멸균 효과를 보인다고 한다. 인간의 경우는 크게 두 종류의 peptide 들이 존재하는데 defensin (α -defensin 과 β -defensin)과 cathelicidine으로부터 유래한 선형의 LL-37 이다. 임상 연구결과 이들 peptide 가 결여되면 치명적인 증상을 보인다고 한다 (Boman, 2002). 정상적인 피부에서는 이들 peptide의 양은 매우 소량 존재하지만 염증이 생기면 이들 peptide 항생제들이 증가하게 된다. 그 예를 보면 염증을 유발하고 LL-37 과 defensin의 발현 정도를 보면 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이들은 보통 *Staphylococcus aureus* 같은 bacteria에 활성을 가진다.

본 연구는 항균기능을 가진 파인에플 유래 bromelain 관련 BAA1 유전자와 인체 유래 항균성 펩타이드 cathelicidin 관련 LL-37 유전자를 이용하여 배추에 도입하여 항균기능을 가진 고부가가치성 배추 식물체를 육성하여 실용화 하고자 한다.

2) 경제 산업적 측면

- 내성이 없는 항생물질을 발현시키는 식물체를 생산한다면 차세대 항균제로서 사용할 수 있을 것으로 기대되며, 특히 이는 구강용 병균에 대하여 지대한 효과를 보여 경제·산업적으로 이용가치가 매우 높다

- LL-37 은 넓은 spectrum 의 박테리아에 멸균력을 보이는데 이는 bacteria 의 세포벽에 위치하는 LPS를 중화시켜 멸균하는 것으로 보고 되었다. 또한 세균물질에 의한 대식세포 활성화를 억제함으로써 염증반응에 동반되는 조직손상을 제한하여 적응면역반응을 조절하는 인자로서도 작용한다. 그러므로 LL-37 은 Gram-positive 와 Gram-negative 그리고 곰팡이에도 작용을 하는 광범위하게 사용할 수 있는 antimicrobial peptide 로서 그 임상학적 가치는 지대하다고 볼 수 있다.

- 유사한 cathelicidin계 항균 peptide 가 돼지에서 발견이 되었는데 PR-39 으

로 명명되었다. 이는 proline을 많이 함유하고 있는 항균 peptide로서 심근경색 등의 효과를 보인다고 한다. 반면 유사한 물질인 protegrin이라는 물질 또한 방사선이나 화학요법으로 인한 구강 염증치료제로서 임상 3 단계 실험중이다 (Lehrer and Ganz., 2002).

- 구강 내 항균펩티드의 발현 및 구강질환과의 연관성: Murakami et al 은 LL-37 이 skin 뿐 아니라 거의 모든 상피세포와 타액에서도 발견이 된다고 보고하였다. 즉 광범위한 spectrum 을 보이는 이 peptide 항생제가 충치치료제로 사용가능함을 시사하고 있다 (Murakami et al., 2002). 구강조직은 끊임없이 다양한 종류의 세균에 노출되어 있으며, 이들 세균에 의한 감염이나 질환이 발생할 가능성이 항상 존재한다. 항균펩티드는 초기 방어기능을 담당하므로 다양한 구강질환, 특히 주요 구강질환인 치주염 원인균 뿐 아니라 구강 내 다양한 상주균 및 병원균에 대하여 항균펩티드의 항균효과를 기대할 수 있다.

3) 사회 문화적 측면

- 대체로 현대인들은 바쁜 생활로 인하여 의약품 복용을 잊거나 거부감을 갖는 경우가 있는데 이러한 배추나 당근을 부식으로 섭취하여 환자들의 치료효과를 보거나 다이어트 식품으로는 섬유질이 풍부하여 그 자체로도 다이어트 식품일 수 있는 부식이 약효까지 보이는 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절 연구개발내용 및 범위

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|---------------------|--|--|
| 1차년도 (2004-2005) | <ul style="list-style-type: none"> -Bromelain 유전자를 도입한 형질전환 배추의 후대 육성 및 유전 분석 -인체유래 LL-37 peptide 유전자 분리 -형질전환체를 이용한 동물 임상 실험 방법 확립 | <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 자식종자 육성 - 형질전환후대에서 발현량조사 - 형질전환체 후대에서 bromelain량 분석 - RT-PCR산물의 cloning후, 염기서열분석 - LL-37 유전자의 대장균에서의 발현 및 항균력 - 상시 발현 pHCE system을 이용 - pET system을 이용하여 induction을 유도하여 발현여부 확인 - 항균력 test를 수행 - 동물 임상 실험 방법 확립 |
| 2차년도 (2005-2006) | <ul style="list-style-type: none"> -Bromelain 유전자를 도입한 형질전환 배추의 후대 육성 및 유전 분석 -인체유래 LL-37 peptide 유전자 형질 전환체 육성 -형질전환체를 이용한 동물 임상 실험 | <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환후대에서 고발현 및 bromelain량이 높은 계통 육성 - 농업형질조사에 따라 정상형 형질 전환체 선발 - 안정적 발현 계통 유지 및 증식 - GFP 및 GUS포함 형질전환용 Ti-plasmid vector를 이용하여 hCAP18/LL37 유전자 구축 -구축한 Vector를 Freeze-thaw방법 (Gelvin et al. 1988)을 통해 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404에 형질전환 - bromelain이 발현하는 배추를 사료와 혼합하여 투여 - 대조군과 항균성 비교 |
| 3차년도 (2006-2007) | <ul style="list-style-type: none"> -Bromelain 유전자를 도입한 형질전환 배추의 항균성 실험 -인체유래 LL-37 peptide 유전자 형질 전환체의 후대 육성 및 항균성 실험 -형질전환체를 이용한 닭에 임상실험 | <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 후대에서 무름병원균의 항균성 실험 - microarray 분석에 의한 발현 변이 탐색 - 재분화 식물체에서 유전자 도입확인 - 형질전환체에서 유전자 발현분석 - 형질전환체의 자식종자 육성 - 형질전환후대에서 발현량조사 - 세균병원 및 진균병원균의 항균성 실험 - 인체 병원균의 항균성 실험 형질전환식물체들의 동물임상 실험을 통한 항균성의 실제적 이용 |

제 2 장 국내외 기술개발 현황

파인애플 줄기에서 분리된 bromelain (EC 3.4.4.24)은 1957년 Hunter등에 의해 처음 발견된 이후, 효소분리 (Ota et al., 1964; Murachi, 1970), 생화학적 특성 및 약학적 이용 (Cooreman et al., 1976) 등이 보고되었다. Hausain과 Lowe (1970)는 줄기 유래 bromelain의 활성부위인 cysteine 과 histidine 주변의 아미노산 배열을 찾아 cystein protease로 분류되는 protease의 복합체로 파인애플의 줄기 및 과실에 고농도로 존재한다고 하였다. 또한 Muta 등 (1997)은 파인애플 줄기 및 과실유래 cysteine protease 분리 및 유전자 구조 분석, Sawano 등 (2003)은 bromelain 관련 활성을 가지는 유전자군을 분리하여 *E. coli*에 발현시키는 연구를 하였다.

파인애플은 중세 시대부터 세계 여러 곳에서 민간 약용물질로 사용되어왔으며, 파인애플로부터 추출되어진 bromelain은 보조소화제, 소염제(Mynott et al., 2002; Manhart et al., 2002; Gaspani et al., 2002; Maurer 2001), 항혈청, 응고제, 항암작용, cytokines 조절 및 면역작용, 피부 좌멸 조직제거, 순환계 활성 증강 등의 의약품으로도 효과가 있는 것으로 보고하였다 (Engwerda et al., 2001).

Bromelain은 보통 얻어진 기원으로부터 과실유래와 줄기유래로 대별 되는데, 현재 줄기 유래 bromelain이 의약품으로 널리 이용되어지고 있다. bromelain은 단백질 분해효소 외에 peroxidase, acid phosphatase, protease inhibitor 등 여러 물질이 함유되어 있기 때문에 단백질 분해능은 동일해도 그 유래에 따라 서로 다른 효과를 보인다고 하였다 (Manhart et al., 2002; Gaspani et al., 2002). 또한 papain, bromelain 및 ficin 등과 같은 cysteine protease는 latex를 생산하는 많은 열대식물에 존재하며 독성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 이들 독성 물질들은 동물 및 임상실험에서 antiproliferation, antimetastatic 및 암세포 성장억제 등에 효과가 있어 산업적으로 널리 이용되고 있다 (Batkin et al., 1988; Munzig et al., 1994; Garbin et al., 1994; Harrach et al., 1994; Grabowska et al., 1997). Khan 등 (2003)은 이들 효과를 단백질 합성과정이나 저장과정에서 glycosylation의 정도에 따라 활성의 변화를 보인다고 하였다. 일반적으로 bromelain 은 안정성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없고 가장 중요한 특징 중 하나는 계속 사용하여도 신체 내에 내성이 생기지 않으며, 섭취량의 40% 정도가 전혀 변화되지 않은 채로 흡수되고, 주로 섭취 후 1시간 후에 혈액

에서 가장 많이 발견이 된다. 또 다른 특징 중 하나는 351개의 아미노산으로 구성된 단백질로 다른 단백질과 함께 대사과정상 분해되어 인체에는 해가 없다고 보고되었다 (Mynott et al., 2002).

배추, 무, 당근 및 감자 등 주요 채소류에 경제적 손실을 초래하는 무름병 병원성은 세포의 사멸과 세포벽을 분해하는 펙틴효소의 생산에 의하여 발생된다. 무름병 저항성은 양적 형질로 미동유전자에 의해 지배되기 때문에 저항성 유전자의 집적이 어려워 무름병에 대한 저항성 품종이 전무한 실정이다 (Li, 1981; Kikumoto, 1981). 다만 종간교잡 및 체세포융합에 의하여 내성을 증진시키려 하는 연구가 다수 이루어졌다 (Shimizu et al., 1962; Yoshikawa et al., 1989). 종간교잡의 자식 및 무교잡에 의한 후대 분리로부터 무름병의 내성은 양적형질에 의하여 조절되는 것이 밝혀졌다 (Yamagishi et al., 1990; Nishi et al., 1970).

최근 들어 무름병에 저항성이 향상된 식물을 육성하기 위해, 식물 자체가 갖고 있는 PR-protein 및 phytoalexin 생합성 관련 유전자들을 이용하여 무름병에 대한 저항성 증진 식물체를 개발하고자하는 연구가 보고 되고 있다 (Andres et al., 2001; Tao et al., 2005; Ajay et al., 2005). 일반적으로 농작물의 피해는 해충 및 선충에 의한 피해, 식물의 병에 의한 피해, 잡초에 의한 피해 등으로 대변할 수가 있다. 그 중 사람이나 식물체에 발생하는 대부분의 병은 세균 감염에 의한 것으로 특히, 진균 감염에 의해 발생하는 농작물의 피해는 15-20% 정도이며, 병해는 70-80% 정도가 이룬다 (Kang *et al.* 1996; Bark *et al.* 1996). 이들 진균의 병원성을 해결하는데 지금까지 많은 노력을 기울여 왔으며, 사람에서 질병을 일으키는 원인의 대부분이 세균이나 진균이라는 사실과 19세기 중엽 감자 역병 발생에 대한 deBary의 연구에 의해 비로소 식물병이 진균에 의해 유발된다는 것이 입증된 후, 여러 방면으로 항균성 물질에 대한 탐색이 행해지고 있다.

그러나 최근에 화학물질성 약제들을 연속적으로 장기간 사용함으로 인하여 미생물 유래의 항생제에 대한 저항 유전자의 출현되고 있어(Russell, 1991; Koch, 1981; Ogawara, 1981; Kang *et al.* 1996; Bark *et al.* 1996), 인체와 식물 및 환경에 무해한 새로운 대체 물질의 개발은 필수적이며 특히 최근에는 식물을 소재로 하는 천연물질 유래의 항균제 개발이 관심의 대상이 되고 있다 (Taniguchi and Kubo, 1993; Mitscher *et al.* 1987).

동식물을 비롯한 모든 다세포 생물은 미생물의 침입에 효과적으로 방어하기 위한 자연면역계 (innate immune system)를 진화시켜왔는데, 항균펩티드

(antimicrobial peptide)는 연체동물에서 사람에 이르기까지 널리 분포하여 미생물에 대한 일차적 방어 수단으로 매우 중요한 역할을 담당해왔다 (Brogden et al., 2003; Scott and Hancock, 2000; Yang et al., 2004). 항균펩티드는 미생물을 동물이나 식물로부터 구별 짓는 원핵세포의 막을 표적으로 하여 작용하기 때문에 다양한 그람양성세균과 그람음성 세균, 바이러스, 곰팡이 등 그 항균효과가 넓게 나타나는 것이 특징이다 (Nagaoka et al., 2000; Frohm et al., 1999; Sorensen et al., 1997, 2001). 이렇게 미생물에 대한 일차적 방어수단으로 작용할 뿐 아니라 자연면역반응과 적응면역반응 (adaptive immune response)을 조절하는 조절인자로도 작용한다. 나아가 항균펩티드의 장점은 미생물이 항균 peptide에 대해 미생물이 내성을 획득하는 빈도가 매우 낮으므로 기존의 항생제를 대체할 수 있다고 하였다 (Turner et al., 1998).

항균성 peptide는 주로 자연 면역체계에서 사용되는 peptide로서 주로 15-45 개의 amino acid 으로 구성되어 있으며 전체적인 전하 (net charge)는 양이온을 띄고 있다 (Boman, 2002). 현재 database에는 동, 식물 및 곤충들을 포함한 여러 종 기원의 800여개의 peptide가 보고되어있다 (Yasin et al., 2000; Niyonsaba et al., 2001). 주로 이들은 하나의 전구체로 얻어지며 이들 peptide 들은 박테리아의 세포막에 작용하여 멸균 효과를 보인다고 한다. 인간의 경우는 크게 두 종류의 peptide 들이 존재하는데 defensin (α -defensin과 β -defensin) 과 cathelicidin으로부터 유래한 선형의 LL-37 이다 (Heilborn et al., 2003). 임상 연구결과 이들 peptide가 결여되면 치명적인 증상을 보였다 (Boman, 2002). 정상적인 피부에서는 이들 peptide의 양은 매우 소량 존재하지만 염증이 생기면 이들 peptide 들이 증가한다고 하였다 (Zaiou et al., 2003). 그 예를 보면 염증을 유발시키고 LL-37 과 defensin의 발현 정도를 통해 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이들은 보통 *Staphylococcus aureus* 같은 bacteria에 활성을 가진다. LL-37 의 작용기전 및 임상학적 결과에 관한 연구 또한 활발히 진행되고 있는데 antimicrobial peptide인 LL-37 과 defensin 등의 멸균력 작용기전에 대하여는 정확히 알려져 있지는 않지만 양이온을 띤 이들 peptide들이 음이온을 띤 박테리아에 결합하여 작용한다고 추정되고 있다 (Frohm et al., 1999; Sorensen et al., 1997). 그 외에 이들은 면역체계에도 작용을 한다고 보고가 되었는데 예를 들면 면역세포들을 소집하여 감염된 곳으로 집합할 수 있도록 면역계를 도와 박테리아를 멸균하는 작업까지 하는 것으로 보고되었다 (Haynes et al., 1998; Daher et

al., 1986). 즉 LL-37은 여러 기능을 하여 멸균작용을 하는 peptide이다 (Tjabringa et al., 2003). LL-37를 adenovirus를 매개체로 하여 mouse airway에 overexpression 시켜 본 결과 *Pseudomonas aeruginosa* 감염이나 LPS를 투여하여도 현저히 감염도가 감소되는 것을 확인하였다 (Bals et al., 1999).

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 파인애플 유래 Bromelain 유전자 (BAA1) 분리, 형질전환 배추의 육성 및 항균성 실험

1 항. 서 론

파인애플 줄기에서 분리된 bromelain (EC 3.4.4.24)은 1957년 Hunter등에 의해 처음 발견된 이후, 효소분리 (Ota et al., 1964; Murachi, 1970), 생화학적 특성 및 약학적 이용 (Cooreman et al., 1976) 등이 보고되었다. Hausain과 Lowe (1970)는 줄기 유래 bromelain의 활성부위인 cysteine 과 histidine 주변의 아미노산 배열을 찾아 cystein protease로 분류되는 protease의 복합체로 파인애플의 줄기 및 과실에 고농도로 존재한다고 하였다. 또한 Muta 등 (1997)은 파인애플 줄기 및 과실 유래 cysteine protease 분리 및 유전자 구조 분석, Sawano 등 (2003)은 bromelain 관련 활성을 가지는 유전자군을 분리하여 *E. coli*에 발현시키는 연구를 하였다.

파인애플은 중세 시대부터 세계 여러 곳에서 민간 약용물질로 사용되어왔으며, 파인애플로부터 추출되어진 bromelain은 보조소화제, 소염제(Mynott et al., 2002; Manhart et al., 2002; Gaspani et al., 2002; Maurer 2001), 항혈청, 응고제, 항암작용, cytokines 조절 및 면역작용, 피부 좌멸 조직제거, 순환계 활성 증강 등의 의약품으로도 효과가 있는 것으로 보고하였다 (Engwerda et al., 2001).

Bromelain은 보통 얻어진 기원으로부터 과실유래와 줄기유래로 대별 되는데, 현재 줄기 유래 bromelain이 의약품으로 널리 이용되어지고 있다. Bromelain은 단백질 분해효소 외에 peroxidase, acid phosphatase, protease inhibitor 등 여러 물질이 함유되어 있기 때문에 단백질 분해능은 동일해도 그 유래에 따라 서로 다른 효과를 보인다고 하였다 (Manhart et al., 2002; Gaspani et al., 2002). 또한 papain, bromelain 및 ficin 등과 같은 cysteine protease는 latex를 생산하는 많은 열대식물에 존재하며 독성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 이들 독성 물질들은 동물 및 임상실험에서 antiproliferation, antimetastatic 및 암세포 성장억제 등에 효과가 있어 산업적으로 널리 이용되고 있다 (Batkin et al., 1988; Munzig et al.,

1994; Garbin et al., 1994; Harrach et al., 1994; Grabowska et al., 1997). Khan 등 (2003)은 이들 효과를 단백질 합성과정이나 저장과정에서 glycosylation의 정도에 따라 활성의 변화를 보인다고 하였다. 일반적으로 bromelain 은 안정성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없고 가장 중요한 특징 중 하나는 계속 사용하여도 신체 내에 내성이 생기지 않으며, 섭취량의 40% 정도가 전혀 변화되지 않은 채로 흡수되고, 주로 섭취 후 1시간 후에 혈액에서 가장 많이 발견이 된다. 또 다른 특징 중 하나는 351개의 아미노산으로 구성된 단백질로 다른 단백질과 함께 대사과정상 분해되어 인체에는 해가 없다고 보고되었다 (Mynott et al., 2002).

배추, 무, 당근 및 감자 등 주요 채소류에 경제적 손실을 초래하는 무름병 병원성은 세포의 사멸과 세포벽을 분해하는 펙틴효소의 생산에 의하여 발생된다. 무름병 저항성은 양적 형질로 미동유전자에 의해 지배되기 때문에 저항성 유전자의 집적이 어려워 무름병에 대한 저항성 품종이 전무한 실정이다 (Li, 1981; Kikumoto, 1981). 다만 중간교잡 및 체세포융합에 의하여 내성을 증진시키려 하는 연구가 다수 이루어 졌다 (Shimizu et al., 1962; Yoshikawa et al., 1989). 중간교잡의 자식 및 무교잡에 의한 후대 분리로부터 무름병의 내성은 양적형질에 의하여 조절되는 것이 밝혀졌다 (Yamagishi et al., 1990; Nishi et al., 1970).

최근 들어 무름병에 저항성이 향상된 식물을 육성하기 위해, 식물 자체가 갖고 있는 PR-protein 및 phytoalexin 생합성 관련 유전자들을 이용하여 무름병에 대한 저항성 증진 식물체를 개발하고자하는 연구가 보고 되고 있다 (Andres et al., 2001; Tao et al., 2005; Ajay et al., 2005).

따라서, 본 장에서는 파인애플의 과실유래 BAA1 유전자를 분리하여 유전자 구조 분석과 형질전환 배추를 육성하여 무름병에 대한 저항성 증진 효과를 조사하였다.

2 항. 재료 및 방법

가. BAA1 유전자 분리

1) Total RNA 분리

식물조직 0.1g을 측정하여 미리 차갑게 준비해 놓은 막자사발과 막대를 이용하여 액체질소로 마쇄하였다. 갈아진 조직은 계량스푼을 사용하여 1ml의 TRIzol-reagent (1ml TRIzol-reagent/50-100mg 조직)가 담긴 1.5ml 원심분리용 튜브에 넣어 섞어주고, 핵단백질체가 완전히 분리 되도록 상온에 15분간 두었다. 1ml TRIzol-reagent에 대해 0.2ml chloroform을 넣어 15초 동안 vortex하고, 상온에서 5분간 방치한 후 11,000rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리 하여 단백질을 따라 오지 않도록 상층만을 새 튜브로 옮겼다. 상층은 0.5ml의 isopropanol (1ml TRIzol-reagent당)과 0.25ml의 high salt precipitation solution (0.8M sodium citrate/1.2M NaCl)을 넣어 잘 섞어주고 상온에서 10분간 방치하여 RNA를 침전시켰다. 이렇게 추출한 산물을 11,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 RNA 침전물에 1ml의 75% ethanol을 넣고 11,000rpm으로 4°C에서 5분 동안 원심분리 했다. 그 다음 상층액을 제거하고 RNA 침전을 진공상태에서 5-10분간 건조시켰다. 마지막으로 50 μ l-100 μ l의 DEPC 처리된 멸균수에 녹이고, spectrophotometer로 RNA양을 정량하여 사용하였다.

2) cDNA 합성 및 RT-PCR 분석

Total RNA는 RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco SuperscriptII) protocol에 따라 수행하였으며, first strand cDNA는 5 μ g total RNA로부터 합성하였다. RNA template 5 μ g에 50mM oligo-dT 1 μ l, 10mM dNTP 1 μ l, DEPC water 10 μ l을 첨가하여 17 μ l로 맞추고 65°C incubator에서 5분간 변성시킨 후, 얼음에 두어 냉각시키고 5 \times First strand buffer 4 μ l와 0.1M DTT 1 μ l, RNase Inhibitor (40units/ μ l) 1 μ l, SuperscriptII RTase (200units/ μ l) 1 μ l를 첨가하여 최종 부피 20 μ l로 조제한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 1시간 반응시키고 72°C에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 합성된 cDNA 2 μ l를 주형으로 10 \times PCR buffer (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl) 5 μ l와 50mM MgCl₂ 1.5 μ l, 10mM dNTP mix 1 μ l, Taq DNA polymerase (5units/ μ l) 0.4 μ l, forward primer (10 μ M), reverse primer (10 μ M)를 각각 1 μ l씩 첨가하고 멸균수 38.1 μ l로 최종 부피 50 μ l를 만든 후 PCR을 실시하였다. 이때 사용한 primer는 NCBI database로부터 얻어진 정보로부터 (5'-ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTG-3'), (5'-TCAAGTTTCAGAAACCATCTT-3')를 합성하여 사용하였다. PCR반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간

extension과정을 35cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. 증폭산물은 pGEM T-Easy vector (Promega)에 cloning하여 염기서열을 조사하였고, 유전자간 상동성 비교는 BLAST분석에 의하여 실시하였다.

3) Cloning

cDNA의 3'-end에 A-tailing이 되는 것을 이용하여 pIG121Hm vector에 클로닝하였다.

가) Vector DNA의 준비

GUS 유전자를 포함하고 있는 pIG121Hm vector의 GUS유전자를 제거하기 위해 제한효소 처리 시 *Bam*HI (10units/ μ l) 0.5 μ l, *Sac*I (10units/ μ l) 0.5 μ l, 10 \times buffer 1.5 μ l, vector DNA 5 μ l (200ng/ μ l)를 넣고 멸균수 7.5 μ l로 최종 부피가 15 μ l로 하였다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 0.8% agarose gel상에서 확인했다. Vector DNA를 gel로부터 재추출하여 탈 인산화 반응을 하였다. BAP처리는 vector DNA 34 μ l, 10 \times buffer 5 μ l, BAP 1.5 μ l 및 멸균수 9.5 μ l를 튜브에 모아 55°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

나) Competent cell 준비

LB agar 배지 [tryptone 10g/L, yeast extraction 5g/L, sodium chloride (NaCl) 10g/L, bato agar 15g/L]에 50% glycerol stock상태로 -80°C 초 저온 냉동고에 보관중인 *E. coli* DH5 α 균주를 streaking하여 37°C에서 16시간 동안 배양했다. Single colony는 멸균한 LB broth [tryptone 10g/L, yeast extraction 5g/L, sodium chloride (NaCl) 5g/L] 10ml가 담겨진 50ml 튜브에서 37°C, 200rpm으로 16시간 동안 배양했다. 배양액 2.5ml을 250ml의 LB broth에 넣고 37°C에서 200rpm으로 4시간 동안 OD₆₀₀= 0.6이 될 때까지 배양한 후, 얼음에 10분 동안 보관하여 차게 한 뒤 배양액을 200ml 원심관에 나누어 담고 5,000rpm으로 4°C에서 10분 동안 원심분리 했다. 상등액은 버린 후 침전된 세포에 배양액과 같은 양의 멸균수를 넣고 4°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 3회 반복하여 원심분리 했다. 마지막으로 침전된 세포에 10% glycerol을 400 μ l씩 넣고 1.5ml tube에 50 μ l씩 분주한

후, 즉시 액체질소에 넣어 냉동시켜 -80°C 초 저온 냉동고에 보관하였다.

다) plasmid vector와 insert DNA의 ligation

Ligation을 위해 GUS 유전자를 제거한 vector (pIG121Hm) : insert DNA (BAA1 gene)의 비율이 1 : 3 이 되도록 준비하고, T4 DNA ligase 10× buffer 1 μl , T4 DNA ligase (3 Weiss units/ μl) 1 μl , vector DNA (50ng) 1 μl , Insert DNA(20ng) 1 μl 를 넣고 멸균수로 최종 부피를 10으로 맞춘 뒤 4°C 에서 16시간 이상 반응시켰다.

라) Electroporation을 이용한 형질전환

-80°C 초 저온 냉동고에 보관해둔 competent cell을 꺼내 얼음에 넣어 녹인 후 ligation을 마친 DNA 1-3 μl 와 섞어서 electroporation cuvette에 주입한 후 1440V 로 전기충격을 가해서 형질전환 시켰다. 그리고 SOC배지 1ml을 첨가하여 혼합한 후 멸균된 시험관에 넣고 37°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, kanamycin 50mg/L을 포함한 LB agar 배지에 839mM IPTG (Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranoside) 10 μl 와 50mg/ml X-gal (5-Bromo- 4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside) 40 μl 를 배지 위에 떨어뜨리고 밀대로 골고루 퍼준 뒤, 37°C 에 10분 두었다가 배양액 200 μl 를 피펫으로 떨어뜨려서 도말 하였다. 37°C 항온기에 서 샤레를 16시간 동안 배양하여 colony를 관찰했다. white colony는 모두 colony PCR analysis를 수행하여 plasmid의 크기를 관찰하고 ligation 유·무를 확인했다. 이를 NCBI database로부터 얻어진 BAA1 gene의 primer를 이용하여 도입여부를 PCR로 확인하였다.

마) plasmid DNA 추출

colony PCR을 통해서 총 12개의 시료를 선별하고 plasmid DNA를 추출하였다. Single bacterial colony는 kanamycin 50mg/L을 포함한 LB배지 5ml에 접종한 후 37°C incubator에서 200rpm으로 shaking하여 16시간 동안 배양하였다. 배양액 1ml을 1.5ml 튜브에 분주하고 4°C 에서 12,000rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 침전된 cell에 차가운 상태의 GTE solution I [glucose 2.25g, 1M Tris-Hcl (pH 8.0) 6.25ml, 0.5M EDTA 5ml per 250ml] 200 μl 를 첨가하여 혼합하고 solution II (0.2N

NaOH, 1%SDS) 200 μ l를 첨가한 후, tapping하였다. 곧바로 solution III (3M potassium acetate pH 7.5) 200 μ l를 첨가하여 tapping하고 -20°C에 5분 동안 보관한 뒤 4°C에서 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 다른 튜브에 옮겨, 3 μ l의 RNase (10mg/ml)를 첨가하고 37°C 항온기에서 30분간 방치한 뒤 PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol, 25:24:1)를 500 μ l 넣고 실온에서 12,000rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. 상층액에 100% ethanol 1ml를 첨가해서 30분 동안 -20°C 냉동고에 보관한 후, 4°C, 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 plasmid DNA를 침전시켰다. 그 후, 70% ethanol 500 μ l를 넣고 tapping하고 12,000rpm으로 5분간 원심분리 해서 최종 침전물을 건조하여 멸균수 50 μ l에 녹여 사용하였다.

나. 형질전환용 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 작성

1) 식물발현 vector 구축

GUS유전자를 포함하고 있는 pIG121Hm vector를 *Bam*HI과 *Sac*I처리 에 의해 GUS유전자를 제거한 후, 그 위치에 936bp의 BAA1유전자를 삽입시켰다. 이 재조합 된 vector는 *E. coli*에 형질전환 시킨 후, kanamycin 50mg/L을 포함한 LB배지에서 선발된 단일 colony로부터 plasmid를 추출하여 insert DNA의 유무를 확인하였다.

2) *Agrobacterium tumefaciens*에 형질전환

식물 발현의 vector구축을 위해 확인된 plasmid는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 형질전환 시켰다. 28°C에서 동일 방법으로 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* competent cell LBA 4404는 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1 μ l와 섞어서 electroporation cuvette에 주입하였다. 그 다음 1440V로 전기충격을 가해서 형질전환 시킨 후 SOC배지 1ml을 주입하여 혼합한 후, 멸균된 시험관에 넣고 28°C 에서 200rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 50mg/L을 포함한 AB agar 배지 (stock I: K₂HPO₄ 3g, stock II: NaH₂PO₄ 1g, NH₄Cl 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3g, KCl 0.15g, CaCl₂ 0.01g, stock III: FeSO₄ · 7H₂O 2.5mg, glucose 5g/L)에 200 μ l를 피펫으로 떨어뜨려서 도말 하고, 28°C 항온기에서 샤레를 2-3일 동안 배양하여 colony를 관찰하였다. white colony는 모두 colony PCR 방법으로 형질전환여부를 확인하고, 확인 된 균주의 배양은 kanamycin 50mg/L이

첨가된 AB 액체배지에 접종한 후, 2-3일 동안 28°C incubator에서 200rpm으로 배양했다. 배양액은 50% glycerol을 동량 첨가하여 초 저온 냉동고 (-80°C)에 저장하였다.

다. 배추 형질전환식물체 육성

1) 배추법에 의한 형질전환식물체 육성

가) 식물재료

Brassica rapa ('Osome')의 내흔계 line "소송체 (TAKI 종묘)"을 형질전환 식물체의 재료로 사용하였다.

나) *Agrobacterium*의 배양

초저온 냉동고 (-80°C)에 저장된 glycerol stock을 꺼내어 항생제(hygromycin 50mg/L)가 첨가된 LB 한천배지에 streaking하여 28°C에 거꾸로 놓고 48시간 동안 암 배양하였다. 4°C에 저장하였다가 배추를 절단하기 하루 전날 항생제 (hygromycin 50mg/L)가 첨가된 LB 액체배지 15ml에 완전한 colony를 찍어서 배지에 접종한 후 28°C, 200rpm에서 OD₆₀₀에서 0.9가 될 때까지 진탕 배양하였다.

다) 종자멸균 및 파종

펄프 재질의 티백 (6cm × 4.5cm)에 종자를 넣어 봉하고 멸균한 100ml 비커에 75% ethanol 80ml을 넣고 티백을 적신 후 종자를 2분간 소독하였다. 1% 차아염소산 용액이 들어있는 멸균한 100ml비커에 티백을 옮긴 후 15분간 소독하였다. 멸균수가 들어있는 비커에 티백을 옮기고 1분씩 3회 수세하였다. 마지막으로 티백을 멸균된 샐레에 옮기고 3방향으로 매스를 이용해 자른 후, phyto agar 0.8%의 1/10 MS배지 (1/10 MS salts stock, 1/10 vitamins, pH 5.8)가 들어있는 무균배양용기 한 개당 15-20립 정도 1cm의 간격으로 파종하였다. 파종한 종자는 22-25°C에서 16시간 일장으로 직사광선을 피하여 7일간 배양하였다.

라) 배추의 절단

멸균 후 미리 균희농은 0.8%의 한천이 첨가된 MS-1배지 (MS salts, MS

vitamins, 200mg/L KH_2PO_4 , 1mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3% (w/v) sucrose, pH 5.8)에 담배 현탁 배양액을 1.5ml씩 분주하고 간극이 생기지 않도록 잘 펼친 후 멸균한 여지를 공기가 들어가지 않도록 깔았다. 배양용기에서 식물체의 자엽을 핀셋으로 잡은 후, 끊어지지 않도록 뽑아서 멸균된 샬레에 놓고 성장점을 완전히 제거하였다. 배축을 5-7mm 정도로 자른 후 한 개의 샬레에 50절편씩 나열하였으며 surgical tape로 봉해서 25°C에서 24시간 동안 암 배양 하였다.

마) *Agrobacterium*의 감염

*Agrobacterium*의 배양액이 $\text{OD}_{300} = 0.9$ 가 되도록 조정된 후, acetosyringone (3, 5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone, 10mg/ml)을 포함한 액체 MS-1배지 (pH 5.2) 9ml와 *Agrobacterium* 배양액 1ml를 샬레에 넣고 혼합하였다. 한 샬레당 배축 100분을 넣고 파라필름으로 밀봉한 후, 실온에서 40rpm으로 30분간 진탕 배양하였다. 배양 후 피펫으로 배지를 흡수하여 버리고, 배축 200분당 키타올 1매를 사용하여 배축에 남은 *Agrobacterium* 배양액을 닦아내었다. 배축을 본래의 MS-1 배지에 50분씩 나누어 치상한 후 파라필름으로 밀봉한 뒤 일시를 적고 3일간 25°C에서 암 배양하였다.

바) Callus유도 배지에 계대배양

B5-1배지 [B5 salts, B5 vitamin, 1mg/L 2,4-D, 3% (w/v) sucrose, 500mg/L carbenicillin, 0.8% (w/v) agar, pH 5.8]의 샬레에 40분씩 나열하였다. Callus유도 배지는 surgical tape로 봉하여 일시를 적고 25°C에서 16시간 일장으로 callus가 충분히 유도되도록 10일간 배양하였다. 배축이 흑갈색을 띄거나, 신장하였거나, 담배 현탁 배양액이 증식하여 여과지 위로 올라와도 무관하다고 판단하였다.

사) 재분화 배지에 계대배양

B5-BZ배지 [B5 salts, B5 vitamin, 3mg/L 6-benzylamino purine (BA), 1mg/L zeatin, 500mg/L carbenicillin and 50mg/L hygromycin, 1% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) agar, pH 5.8]에 callus를 계대하였다. 샬레 1매당 배축을 30분씩 나열하였다. 계대배양은 7일 후에 1회, 14일 후에 2회씩 총 3회를 실시하였으며, AgNO_3 는 최초 계대배양 7일 동안만 첨가하였고, 항생제의 농도는 hygromycin 10mg/L을 시작으로 10mg/L씩 높여가면서 최종적으로 50mg/L에서 선발하였다. 2회째의 계

대시에는 21분, 3회째는 14분을 한 샐레에 나열하였다. 형질전환 된 신초는 대부분 늦게 나오는 경우가 많기 때문에 3회째의 계대가 끝나도 계속 계대배양 하였다.

아) 성숙배지에 계대배양

신초를 callus로부터 절단하여 B5-0배지 [B5 salts, B5 vitamin, 500mg/L carbenicillin and 50mg/L hygromycin, 1% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) agar, pH 5.8]의 샐레 1매당 신초를 4-5개씩 치상하였다. 치상 후 surgical tape로 봉하여 3주간 배양하였고, 3주가 지나도 자라지 않은 신초는 다시 한번 B5-0배지에 계대하였다.

자) 발근 배지에 계대배양

B5-0배지에서 신장한 신초의 남아있는 callus를 완전히 제거한 후 B5-R [B5 salts, B5 vitamin, 1mg/L indole-3-butyric acid (IBA), 500mg/L carbenicillin and 50mg/L hygromycin, 1% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) agar, pH 5.8]배지에 계대하였다. 이때 너무 큰 것은 반 정도 잘라서 계대하였다. B5-0배지에서 발근되어 있는 경우는 계대하지 않았다. B5-R에 옮길 때는 배지에 격자 상의 상처를 내고 계대하여 뿌리를 자르지 않도록 주의하였다. 3주가 지나도 발근하지 않는 경우는 callus가 남아있을 가능성이 있는 신초이므로 뿌리 부분을 잘라서 새로운 B5-R배지에 옮겼다.

차) 형질전환체의 순화

순화는 포트의 하부 구멍을 사방 2cm중이로 막고 멸균한 흙 (버미큘라이트 : 원예용 상토 = 1 : 1)을 넣은 후 물을 주어 습하게 하였다. 증류수가 들어있는 용기 속에서 각 배지에서 꺼낸 식물체를 구분하여 넣고 조심스럽게 배지를 제거한 후 뿌리 부분이 완전히 묻히도록 심고 라벨을 붙였다. 각 포트마다 투명한 비닐봉지를 씌우고 5일정도 경과한 후 비닐봉지에 두개 정도의 구멍을 뚫고 잎의 모양을 보면서 공기가 통하도록 하였다. 최종적으로 10일정도 지나면 비닐을 벗겨내고 2주정도 배양실에서 키운 후 정식하였다.

2) 도입유전자의 유전분석

가) Total DNA 분리

유전자의 도입여부를 위해 total DNA의 분리는 CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 법을 이용하였다. 형질전환체 및 대조 식물로부터 채취한 0.5g의 잎은 액체질소를 이용하여 미세하게 분쇄하였고, DNA extraction buffer [100mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM EDTA, 500mM NaCl] 400 μ l가 담긴 1.5ml 원심분리용 튜브에 갈아진 조직을 넣고 상하로 20회 혼합하였다. 그 후, 2 \times CTAB buffer [2% (w/v) CTAB, 100mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% pvp-40 (polyvinylpyrrolidone)] 200 μ l를 첨가하여 같은 방법으로 혼합하고 10% SDS를 넣고 10회 정도 상하로 섞어 준 후, 65°C 항온수조에 20분간 방치하였다. 5M potassium acetate (pH 7.5) 200 μ l를 첨가하고 50회 정도로 상하로 섞어 준 후, PCI [Phenol/Chloroform/Isoamylalchol (25: 24: 1)]를 700 μ l 넣고 30회 정도 상하로 섞어 실온에서 12,000rpm, 10분간 원심 하여 단백질을 분리해냈다. 상층 400 μ l정도를 새 1.5ml tube로 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C 냉동고에 20분간 보관하였다가 4°C의 12,000rpm에서 15분간 원심분리 하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% ethanol 1ml를 넣고 세척한 다음 실온에서 완전히 건조시키고 RNase (1mg/ml) 2 μ l가 첨가된 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.4) 50 μ l에 충분히 녹인 후 37°C에서 1시간 방치하여 사용하였다.

나) 도입유전자 검정을 위한 PCR분석

BAA1 gene의 도입여부를 확인하기 위한 PCR반응은 20ng의 주형 DNA를 사용하였고, 아래와 같이 세 종류의 primers를 합성하여 각각 이용 하였다. Hygromycin 저항성 유전자 (HPT) 특이적으로 증폭하는 primer set (forward 5'-GCGTGACCTATTGCATCTCC-3', reverse 5'- TTCTACACAGCCATCGGTCC -3') 로 96°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 30cycles 하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. Kanamycin 저항성유전자 (NPTII) 특이적으로 증폭 할 수 있는 primer set (forward 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3', reverse 5'-ATCGGGAGCGGCGATAC CGTA -3')로 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. BAA1

유전자 특이적으로 증폭 할 수 있는 primer set (forward 5'-ATGGCTTCCAAA GTTCAACTCGTG-3', reverse 5'-TCAAGTTTCAGAAACCATCTT-3')로 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. 얻어진 증폭 산물은 1.5% agarose gel 상에 영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 band를 확인하였다.

다) 도입유전자의 유전분석

PCR 분석에 의해 유전자가 도입된 형질전환체로부터 자식종자 (T1)를 획득하여 계통별로 25립씩 hygromycin 50 mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하여 형질전환 식물체에서 도입유전자의 분리 양상을 살펴보았다. 유전분석은 멘델법칙에 따라 Pearson's chi-square로 검정하였으며, 배지에서 살아남은 계통은 포트에 이식하여 후대를 육성하였다.

3) RT-PCR에 의한 BAA1 유전자 발현 분석

유전자 도입이 확인된 형질전환체의 BAA1 유전자의 발현정도를 분석하기 위해 잎 조직 (0.2g)에서 mRNA를 분리하여 RT-PCR 분석을 하였다. 분리한 mRNA는 reverse transcriptase (Promega, USA)를 사용하여 cDNA로 전환하고 spectrophotometer에 의해 일률적으로 조정된 cDNA를 주형으로 사용하였다. RT-PCR에 사용한 BAA1 유전자의 primer set는 forward 5'-ATGGCTTCCAA AGTTC AACTCGTG-3', reverse 5'-TCAAGTTTCAGAAACCATCTT-3'로 합성하여 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. RT-PCR의 정량적 기준으로는 actin 유전자를 이용하였다. β - actin 유전자의 primer set는 forward 5'-ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA-3', reverse 5'-TCT TTAATGTCACGGACGATT-3'로 합성하여 이용하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30cycles로 하였고 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 각각의 band를 확인하였다.

4) Endo-protease 활성 검정

형질전환체 후대 (T1) 계통의 endo-protease 활성은 azo-casein (Megazyme Ltd. Co) 방법에 의해 결정하였다. 조직 100mg을 1ml phosphate buffer (100mM sodium phosphate, 30mM cysteine, 30mM EDTA, pH 7.0)에서 마쇄한 후, 2시간 동안 4°C에서 vortex 하여 protease를 추출하였다. 그 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심한 후, 상층을 동량의 2% azo-casein과 함께 40°C에서 24시간 방치하였다. 그리고 3ml trichloroacetic acid (5%, w/v) 첨가하여 반응을 정지 시킨 후, 상층을 440nm의 흡광도를 측정하여 protease 활성을 결정하였다.

라. 형질전환체 후대계통 분석

1) 형질전환체 후대 육성

형질전환체 (T0)로부터 순화과정을 거쳐, 저온처리 (5°C에서 45일간) 후 개화시켜 자식종자 (T1)를 획득하여 계통화 하였다. T1 계통들을 hygromycin 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하여 살아남은 개체를 토양에 옮겨, 본 엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후 위와 같이 저온처리 후 자식종자 (T2)를 획득하였다. 또한, T2 종자의 약제내성 검정을 위하여 T1 세대 10 계통의 T2종자를 계통당 15-20립씩 hygromycin 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하였다. 치상 10일 후 지속적 성장여부를 판정하여 도입유전자의 고정계통 (이하 homo line이라 칭함)을 선발하였다. 선발된 homo line은 배지로부터 포트에 옮겨 본 엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후 저온처리 후 자식종자 (T3)를 획득하였다.

2) Real-time PCR에 의한 유전자 발현 분석

Standard curve 범위 내에서 BAA1 유전자와 reference로 actin 유전자의 발현을 정량하였다. 각 형질전환 후대 계통의 cDNA stock (5ng/ μ l)을 50배 희석하여 튜브마다 5 μ l를 넣었다. 정량 PCR에는 SmartCycler II (TaKaRa, Japan)와 SYBR RT-PCR kit (Perfect Real Time)을 이용하였으며, 증폭된 DNA와 결합한 SYBR Green I을 검출하는 방법을 사용하였다. 검출된 값으로부터 standard curve를 이용하여 상대 발현량을 계산하였으며, 각 sample에 대해 2반복으로 측정하였고 평균값을 분석에 이용하였다. 또한, 각 계통마다 actin 유전자의 발현량을 1로 보정

하였고, 그 값에 대한 BAA1 유전자의 발현량을 계산하여 그래프로 표시하였다.

마. 형질전환체의 단백질 분석

1) BAA1 유전자의 항원 준비

Bromelain 유래 항체를 얻기 위해 항원은 BAA 유전자의 아미노산서열을 이용하여 N-말단영역 (MAEYGRVYKDNDEKMRRFC)과 C말단(CSYVRSNDESM KYA -NH₂)을 합성하여 이용하였다.

2) 항체제작

합성한 항원 300 μ g은 토끼에 피내주사 (subcutaneous injection)를 2주에 한번씩 150 μ g씩 두 번에 걸쳐 booster 하였다. 토끼 혈청준비는 토끼를 ether로 죽인 후, 심장에서 blood를 주사기로 수집한 후에 실온에서 30-60분 방치한 후, 냉장고에서 2시간 또는 하룻밤 방치한다. 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 모아서 냉장고 보관한다. 만약 오래 보관하고자 할 경우 0.02% sodium azide (방부제)를 넣고 냉장고에 보관한다. 얻어진 항체의 titer는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay)에 의해 확인하였다.

3) Western blot 분석

Western 분석은 BAA1 유전자가 도입되어 발현량이 높은 형질전환체와 비형질전환체의 잎으로부터 total 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 15% SDS polyacryamide gel에 영동하여 단백질을 분획한 후, nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech)에 blotting 하였다. Immunoblot는 BAA1에 대응하는 항체와 alkaline phosphatase detection 방법을 이용하여 검출하였다.

4) 단백질정량을 위한 ELISA 분석

Indirect ELISA 방법으로 항체와 반응하는 두 번째 항체 (secondary antibody)에 효소를 붙여서 검사하는 방법으로 total 단백질과 BSA를 PBS를 이용하여 200 μ g/ml되게 만들어 well에 넣고, 실온에서 2시간 반응하여 plate에 항원을 붙였다. 그 다음 증류수로 세 번 세척하고 blocking buffer를 well에 가득 넣고 하룻

밤 방치한 후, 증류수로 세 번 세척하였다. 0.05% Tween 20으로 토끼 유래 anti-BAA1 antiserum을 500배 희석한 후, well에 100 μ l씩 넣었다. 실온에서 2시간 반응하고 증류수로 세 번 세척하였다. 0.05% tween 20으로 HRP conjugated goat anti-mouse IgM 항체를 1000배 희석한 후, well에 100 μ l씩 넣고 0.05% tween-20을 같은 양 첨가하고 실온에서 2시간 방치한 후, 증류수로 세 번 세척하였다. 기질 반응 용액을 각 well에 100 μ l씩 넣은 다음, 37°C에서 30분간 반응시켜 색깔 변화를 유도한 다음, ELISA reader를 이용하여 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. 형질전환체의 microarray 분석

1) Total RNA 분리

Total RNA는 RNeasy kit (Qiagen)를 사용하여 형질전환 고정계통 (B66-3-1)과 대조구로는 vector가 삽입되지 않은 wild type 식물을 같은 조건으로 파종하여 생육시킨 후, 기관별로 채취하여 추출하여 같은 양으로 모아 사용하였다.

2) Oligonucleotide microarray chip

본 실험에 사용한 microarray chip은 *Arabidopsis* 37k Oligochip (Agilent사)을 사용하였다. 이들 37k chip에는 *Arabidopsis* subsets 중 transcript sequence gene (37685개)과 chip quality 확인과 normalization을 위하여 control sample (2256개)를 점적하였다. Agilent *Arabidopsis* whole genome 37k Oligochip에 spotting 되어 있는 spot은 control 유전자 및 non gene spot을 포함하여 총 44290개의 spot가 포함되어 있으며 이들은 103개의 column과 430개의 row로 구성되어 있었다. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.agilent.com>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.tigr.org/tigr>, <http://arabidopsis.org/servlets>)

3) Hybridization

Fluorescent target RNA labelling, array hybridization과 washing은 TIGR (<http://www.tigr.org>)에서 기술한 방법을 이용하였다. 목적하는 RNA의 Indirect aminoallyl labelling은 total RNA (20 μ g)과 oligo-dT 18 (2 μ g)을 섞은 후에 10분간 70°C에서 반응시키고 얼음에서 차갑게 하였다. 역전사반응은 총 45 μ l volume으로 하여 10mM DTT, 0.5mM의 dATP, dCTP, dGTP, 0.2mM dTTP, 0.3mM dUTP

와 400U SuperscriptII (Invitrogen)를 넣은 후, 3시간 동안 42°C에서 반응시켰다. RNA은 1M NaOH and 0.5M EDTA를 각각 15 μ l씩 넣어 제거한 후, 1M HCl를 15 μ l넣어 중화시켰다. cDNA는 MinElute PCR kit (Qiagen)를 이용하여 정제하고 10 μ l phosphate elution buffer (4mM phosphate buffer pH 8.6)로 두 배 희석하였다. Cy3 또는 Cy5 monofunctional dye ester (Amersham Biosciences)는 10 μ l DMSO에 녹여 정제한 cDNA (0.2M NaHCO₃ pH 9.0)에 1 μ l를 넣었다. Cy dyes는 dark 상태로 실온에서 1시간동안 cDNA를 방치한 후, 4M hydroxylamine hydrochloride용액을 넣어 30분간 두어 반응을 정지시켰다. Labelled cDNAs는 MinElute PCR kit (Qiagen)로 정제하여 사용하였다. Slides는 prehybridization buffer (5 \times SSC, 0.1% SDS, 1% BSA)로 50°C에서 1시간동안 prehybridization시켰다. 그리고 증류수 (\times 2)에 의해 원심한 후, 건조시켰다. Hybridizations을 위해 먼저, wild type 유래 cDNA는 Cy3으로 hybridization 시켰으며, transgenic line은 Cy5으로 하였다. 정제된 목적 cDNAs는 polyA DNA (2 μ g; Amersham)으로 5분간 95°C에서 denaturation한 후, SlideHyb buffer 1 (Ambion)의 3배로 넣고, HybriSlip (Grace Bio-Labs)로 덮었다. Arrays는 humid chamber에서 50°C 조건으로 16시간 반응시킨 후, buffer (1 \times SSC, 0.1% SDS)를 이용하여 50°C에서 한번 닦은후, 실온에서 0.1 \times SSC으로 한번 더 닦았다. 그 후, 증류수와 isopropanol을 이용하여 마지막으로 닦았다. Arrays는 원심하여 건조시키고 WoRx Auto scanner (Applied Precision)에 의해 9.756 μ m resolution으로 Cy3 (595nm) 와 Cy5 (685nm)으로 검출하였다.

4) Hybridized slide glass scanning

Hybridization을 마친 DNA microarray slide glass는 microarray scanner를 이용하여 scanning을 진행했는데, 각 spot에서 방사 (emission)되는 Cy3와 Cy5의 fluorescence intensity를 수치화 했다. Intensity의 수치값은 각각의 pixel들이 가지고 있는 16-bit TIFF image의 고유한 값을 전환시킨 것으로 microarray image에서 얻을 수 있는 수치값은 0~65535의 값을 가질 수 있다. 최대값 (65535) 이상으로 방사된 intensity는 분석 과정에서 detection 한계를 벗어난 수치로서 signal ratio 분석에는 이용하지 못하게 된다. Scanning 과정에서 Cy3와 Cy5의 intensity 불균형을 조절하기 위해서는 PMT (Photomultiplier tube) 값을 조절함으로써 가능해진다. PMT는 slide glass에서 방사되는 fluorescence intensity가 낮을 경우에

인위적으로 intensity를 높여주는 것으로서 두 가지 channels에서 방사되는 형광 강도를 유사한 수준으로 맞추어주는 역할을 하게 된다. Scanning된 image를 분석하는 과정에서 비정상적인 spot이나 외부의 이물질로 인한 failed spot은 flagging을 통하여 분석과정에서 제거된다. Scanner의 분석용 software (Gene Pix pro 4.1) 프로그램을 이용해서 전환된 수치 값은 마이크로소프트 엑셀 프로그램 등을 사용하여 intensity-based normalization을 실시하게 되는데 각 spot에서 얻어진 수치 데이터는 slide glass 표면에서 방사되는 background intensity에 의한 값이 포함되어 있으므로 정확한 intensity 값은 spot의 foreground intensity에서 spot 주위의 background intensity 값을 제외한 값으로 계산한다.

5) Spot intensity scatter plot

Signal intensity의 최종 분석을 통하여 얻어진 intensity ratio (Cy5/Cy3)는 X, Y plot chart로 표시될 수 있으며 이와 같은 chart를 통하여 유의한 유전자를 확인할 수 있다. 이러한 X, Y plot chart를 일반적으로 scatter plot이라 하며 대부분 45°의 기울기를 나타낸다.

6) Spot intensity M vs A plot

Graph에 사용된 intensity ratio는 raw signal intensity를 사용하지 않고 log-transformed intensity를 사용하게 된다. Log-transformed intensity를 사용하는 이유는 raw signal intensity의 값은 0~65535의 값에 따라서 넓은 범위에 걸쳐 분포하고 있으며 낮은 intensity (1000이하) 값이 많을 경우 상대적으로 한쪽 방향으로 치우쳐 있게 된다. 즉 log-transformed intensity를 사용함으로써 scatter plot에서 spot의 intensity를 전체적으로 고르게 분산시킬 수 있으며 이것은 데이터의 확인을 더 용이하게 할 수 있는 장점이 있다. 각 spot에 대한 log differential expression ratio는 $M = \log_2 R/G$ 로 표시할 수 있으며 spot의 log intensity는 $A = 1/2 (\log_2 R \times G)$ 로 표시된다. (M은 minus의 약자로서 $M = \log_2 R - \log_2 G$ 를 의미하며, A는 add의 약자로서 $A = \log_2 R + \log_2 G$ 를 의미한다). 수식을 통해서 얻을 수 있는 값 M은 Cy5와 Cy3 intensity ratio를 log₂ 형태로 전환한 값으로서 M= 0은 변이가 없다는 것을 의미하며, M= 1은 log₂ 1= 1이므로 2배가 증가했다는 것을 의미한다. A는 Cy5와 Cy3의 intensity의 밝기를 나타내는 수치로

서 같은 ratio를 가진 spot이라고 할지라도 A= 2의 차이를 보이는 spot은 $\log_{22} = 4$ 배의 밝기 차이를 나타낸다는 것을 의미한다. 이와 같이 M (Y axis) versus A (X axis)를 사용한 scatter plot은 X vs Y scatter plot을 45°각도로 기울인 형태로 서 두 가지 channels를 사용해서 실험을 실시한 microarray의 data를 가장 보편적으로 분석할 수 있는 그래프 방법이라고 할 수 있다 (Dudoit, Y. et al., 2000). M vs A plot은 여러 가지 differential expression level을 쉽게 확인할 수 있게 하며, 또한 분석 과정에서 differential expression과 intensity간의 관계를 보여줄 수 있다는 장점이 있다.

7) 발현차이를 보인 유전자들의 발현 양상

B66-3-1과 대조식물에서 발현하고 있는 유전자군의 해석을 위해 RT-PCR 분석을 수행하였다. 4.0 μ g의 total RNA은 Life Technologies Superscript reverse transcriptase protocol에 의해 따라 정확하게 정량하였다. Primer의 염기서열은 microarray의 결과에 따라 과 발현되는 유전자를 NCBI database에서 염기서열의 정보를 얻어 유전자특이적인 배열을 합성하여 수행하였다.

사. 형질전환체의 배추 무름병에 대한 저항성 검증

1) 식물병원세균의 배양 및 접종

무름병 (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*) 병원균은 농촌진흥청 농업과학기술원 식물 병리과로부터 분양받아 사용하였다. 병원세균은 NA (Nutrient agar) 배지에서 1-2일간 배양에서 얻은 세균을 멸균수로 현탁하여 세균 현탁액을 만든 후, 분광광도계를 이용하여 최종농도는 2.5×10^8 CFU/ml에 상응하는 OD₆₀₀= 0.2가 되도록 조정하였다. Ren 등 (2001)의 방법에 따라 침봉으로 상처를 낸 부위에 무름병균이 포말된 agar slurry를 접종하였다. 접종 후 식물체를 비닐 피복한 후, 1일 3회 관수함으로써 고습도를 유지시켰다.

2) 병징발현 및 저항성 정도 분석

접종한 후 24시간, 48시간, 72시간 후, 병원성의 진전여부를 확인하였다. 마지막으로 각각의 처리구에서 다음과 같은 scale로 점수화 하였다. 각각의 scale로는 0= 병반이 없는 것 (0cm), 1= 병반이 0.1-1cm, 2= 병반이 1-2.5cm, 3= 병반이

2.5-5cm, 4= 병반이 5-10cm, 5= 병반이 10cm이상이거나 심하게 걸려 죽게 되는 것 등으로 점수화 하였다.

3) Yeast 발현 vector 구축 및 병원균 성장 분석

BAA1 유전자를 yeast 발현 vector (YEP352)의 *Sac* I 과 *Kpn* I site 에 구축하여, yeast에 형질전환 하였다. YEP352-BAA1 vector를 함유한 yeast는 생장배지 (PDB; potato dextrose broth 24g/L)에서 28°C, 180rpm으로 20시간 동안 액체 배양한 후, 200ml 원심관에 넣고 12000rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액과 침전물을 각각 분리하여 용기에 담고, 침전물은 초음파 세포막 분쇄기 (ultrasonic dismembrator)를 이용해서 세포막을 파괴시킨 후 각각 여과하여 무균 상태로 준비해 놓았다. Nutrient broth 배지를 control로 준비하고 한 처리구는 Nutrient broth + 상층액, 또 다른 처리구는 Nutrient broth + 침전물로 나누었다. 이 세 가지 처리구에 각각 *P. carotovorum*의 colony를 접종한 후, 28°C 180rpm으로 배양하면서 spectrophotometer를 사용하여 OD₆₀₀에서의 12시간 동안 균의 생장을 조사하였다.

3 항 결과 및 고찰

가. BAA1 유전자 구조분석

1) 유전자 구조 분석

파인애플 유래 bromelain 관련 유전자를 분리하기 위해 NCBI data 분석을 통해 합성한 primer Br1 (5'-ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTG-3')과 Br4 (5'-TCAAGTTTCAGAAACCATCTT-3')를 이용하여 PCR 분석한 결과 각각의 기관에서 약 1050bp 크기의 증폭산물을 얻었다 (Fig. 1). 이들 단편의 DNA를 gel로부터 추출하여, TA cloning vector (pGEM easy vector; Promega사)에 cloning하여 염기배열을 조사한 결과 개시 코돈과 종지 코돈을 포함하고 있는 full length cDNA로 1997년 Muta 등이 발표한 bromelain 관련유전자와 99% 상동성을 보였다 (Fig. 2). 분리한 유전자를 BAA1으로 명명하고, NCBI database에서 상동성을 검색한 결과 아미노산배열에서 BAA21929 유전자와 95%, T10516 유전자와 90%

의 유사성을 보였다 (Table 1). BAA1 유전자의 ORF 영역 내에 cystein 잔기를 포함하는 protease는 아미노산 level에서 Barrett 등 (1986)이 보고한 papain superfamily로 분류되었다.

BAA1 유전자의 아미노산 배열을 이용하여 Hydrophobicity 분석 및 von Heijne 방법으로 분석한 결과 signal을 가지는 배열은 A₂₃이었다. 또한 cystein protease 수의 비교에서 BAA1 유전자의 N말단 상에 첫 번째로 존재하는 L₁₀₃ 과 P₁₀₄의 아미노산이 기존에 알려진 단백질과의 높은 상동성을 보인 것으로 미루어 볼 때 L₁₀₃의 아미노산이 BAA1 유전자 산물을 구성하는 단백질 구조의 종지영역으로 생각된다. 보통 cystein protease는 활성 효소를 생산하기 위해 아미노산 말단영역을 제거하는 과정이 필요하다.

아미노산 말단영역은 proregion이라고 불리며 효소활성의 제어뿐만 아니라 새롭게 만들어진 단백질을 올바르게 사슬화 하는 역할을 담당한다.

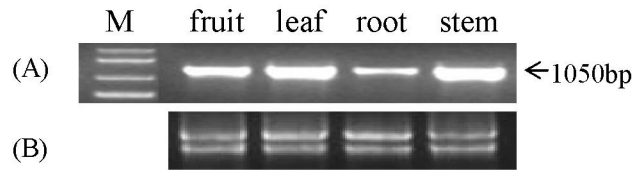


Figure 1. RT-PCR analysis for isolation of gene encoding bromelain in pineapple plant. Lane M; DNA ladder.

그리고 pH 조건이 갑자기 변할 때 변성효과에 대한 보호 역할을 수행한다. 현재 까지 알려진 cystein protease의 N 말단 아미노산 배열과 본 연구에서 분리한 BAA1유전자 산물인 bromelain은 구조면에서 매우 유사하며, 33kDa protease 이다. 따라서 proregion의 영역에 따라 papain 계의 cystein protease는 N 말단영역의 아미노산이 약 60개정도로 구성하는 cathepsin B와 약 100개의 아미노산으로 구성되는 cathepsin L 의 subfamily로 나눌 수 있다 (Fig. 3). 또한 아미노산 배열 중에 cystein protease만이 보존하고 있는 배열 E₅₃xxxR₅₇xxxF₆₁xxN₆₄xxxI₆₈xxxN₇₂ motif가 존재 한다 (Table 2). 따라서 아미노산 구조로 볼 때 BAA1 유전자의 산물인 bromelain은 papain subfamily 중 cathepsin L 이었다.

ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTGGTTTCTTTCTTGTGTTCTCTGTGCGATGTGGGCTTCG 60
M A S K V Q L V F L F L F L C A M W A S
CCATCGGCAGCTTCTCGTGACGAACCCAATGATCCCATGATGAAGCGGTTTGAAGAATGG 120
P S A A S R D E P N D P M M K R F E E W
ATGGCAGAGTACGGCCGAGTGTACAAGGACAACGACGAGAAGATGCGCCGTTTCAGATA 180
M A E Y G R V Y K D N D E K M R R F Q I
TTCAAGAACAACGTGAACCATATCGAAACCTTTAACAGTCGCAACGAAATTCGTACACT 240
F K N N V N H I E T F N S R N G N S Y T
CTCGGTATCAATCAGTTTACCGATATGACAAAAAGCGAATTTGTTGCTCAATATACCGGC 300
L G I N Q F T D M T K S E F V A Q Y T G
GTATCTCTCCCACTAAATATCGAGAGAGAGCCAGTGGTGTCAATTTGATGACGTAACATC 360
V S L P L N I E R E P V V S F D D V N I
TCCGCAGTGCCCAAAGTATTGATTGGAGAGACTATGGTGCCGTAACGAGGTCAAGAAT 420
S A V P Q S I D W R D Y G A V N E V K N
CAAAACCCCTGTGGTTCTTGCTGGTCATTTCGCTGCAATTGCGACGGTGGAGGGAATCTAC 480
Q N P C G S C W S F A A I A T V E G I Y
AAGATCAAAACAGGGTATTTAGTATCTTTATCGGAGCAAGAAGTTCTCGATTGTGCTGTT 540
K I K T G Y L V S L S E Q E V L D C A V
AGCTACGGGTGCAAAGGCGGCTGGGTGAACAAGGCCTACGATTTTCATCATATCTAACAAC 600
S Y G C K G G W V N K A Y D F I I S N N
GGTGTGACCACCGAAGAAAACCTATCCTTATCAAGCATACCAAGGCACCTGCAACGCCAAT 660
G V T T E E N Y P Y Q A Y Q G T C N A N
AGCTTTCCTAATTCAGCTTACATTACTGTTATTTCATATGTGCGAAGGAACGACGAACGC 720
S F P N S A Y I T G Y S Y V R R N D E R
AGTATGATGTACGCTGTGTGCAATCAACCAATAGCTGCTCTTATCGATGCCAGTGAANAAC 780
S M M Y A V S N Q P I A A L I D A S E N
TTTCAATATTACAATGGCGGTGTGTTTAGTGACCCTGTGGAAGTCTCAATCATGCC 840
F Q Y Y N G G V F S G P C G T S L N H A
ATCACCATTATAGGTTACGGGCAGGATAGCAGTGGAACACAATATTGGATTGTAAAGAAC 900
I T I I G Y G Q D S S G T Q Y W I V K N
TCATGGGGTAGCTCATGGGGTGAACGTGGATACATCCGTATGGCGAGAGGTGTGTCTTCG 960
S W G S S W G E R G Y I R M A R G V S S
TCTGGATTATGTGGAATCGCCATGGATCCTCTCTATCCCACTCTACAATCAGGGGCTAAT 1020
S G L C G I A M D P L Y P T L Q S G A N
GTCGCAGTTATTAAGATGGTTTCTAAAAC**TGA** 1053
V A V I K M V S K T *

Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of a BAA1 gene encoding fruit bromelain in pineapple plant. Dark block; conserved region of cystein protease, arrow; primer region.

단백질의 3차구조로 살펴볼 때 papain family는 2개의 domains이 관여하는데 N 말단 domain은 α -helical인 반면에 C말단 domain은 β -sheet가 포함하고 있다.

Table 1. Homology analysis among 11 cysteine protease in papain superfamily with amino acid level.

| Gene designation ^{a)} | (% Homologous | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | BAA 21848 | BAA 21849 | BAA 21929 | BAA 22543 | BAA 22544 | BAA 22545 | BAA 22546 | CAA 05487 | CAA 08860 | CAA 08861 |
| BAA1 | 90 | 96 | 89 | 90 | 78 | 89 | 95 | 80 | 78 | 85 |
| BAA21848 | | 86 | 100 | 100 | 77 | 97 | 86 | 79 | 77 | 83 |
| BAA21849 | | | 84 | 86 | 77 | 86 | 97 | 79 | 77 | 84 |
| BAA21929 | | | | 100 | 75 | 93 | 86 | 75 | 75 | 81 |
| BAA22543 | | | | | 77 | 97 | 86 | 79 | 77 | 83 |
| BAA22544 | | | | | | 76 | 77 | 81 | 98 | 83 |
| BAA22545 | | | | | | | 83 | 79 | 76 | 83 |
| BAA22546 | | | | | | | | 78 | 77 | 84 |
| CAA05487 | | | | | | | | | 80 | 87 |
| CAA08860 | | | | | | | | | | 83 |

^{a)} BAA1; candidate bromelain gene isolated in this study

BAA21848, 21849, 21929; fruit bromelain gene of cathepsins in papain subfamily (Muta E, et al. 2000). BAA22543, 22544, 22545, 22546; cystein protease gene from pineapple (Muta E, et al. 1997). CAA05487, 08860, 08861; cystein protease gene from pineapple (Robertson CE, et al. 2005).

이들 domain에 대한 활성 site가 Cys와 H로 구성되어 수소결합을 하고 있다. BAA1 유전자의 아미노산에는 C₁₅₃과 H₂₆₇이 존재하며 이들 아미노산 영역이 활성 site이고 그중 Cys 아미노산은 disulfide 결합을 형성하는 것으로 모든 papain계의 유전자에서 보고되었다 (Trysellius et al., 1997; Rawlingsand 1994; Pernas et al., 1998). 또한 C 말단 영역에는 2개의 매우 유사한 보존영역이 존재하며 이들 영역은 벼, 토마토, 키위, *Arabidopsis* 등 에서도 잘 알려져 있다 (Chen et al., 2006;

Beers et al., 2004; Oguchi et al., 2001; Domoto et al., 1995).

2) 유전자의 계통주 분석

본 실험에서 분리한 BAA1 유전자의 아미노산 배열과 이미 보고 된 유전자 간에 계통주를 작성 하였다. 계통주 작성에는 NCBI 검색 결과 얻어진 bromelain 관련 유전자의 accession number를 유전자 이름으로 대신하였다. 계통주 작성 결과, 현재 보고 되어진 bromelain 관련 유전자군은 크게 두개의 그룹으로 나뉘어지는 것을 알 수 있었다.

| | | |
|----------|---|-----|
| CAA08861 | MASKVQLVFLFLFLCVMWASPSAASRDEPSDPMMKRFEEWMAEYGRVYKDNDKMRRFQI | 60 |
| BAA1 | MASKVQLVFLFLFLCAMWASPSAASRDEPNPMMKRFEEWMAEYGRVYKDNDKMRRFQI | 60 |
| BAA21849 | MASKVQLVFLFLFLCAMWASPSAASRDEPNPMMKRFEEWMAEYGRVYKDDDKMRRFQI | 60 |
| | *.****:***:**** * | |
| CAA08861 | EKNNVNHIETFSRNGNSYTLGINQFTDMINNEFVAQYTG-VSLPLNIEREPVVSFDDVD | 119 |
| BAA1 | EKNNVNHIETFSRNGNSYTLGINQFTDMTKSEFVAQYTG-VSLPLNIEREPVVSFDDVN | 119 |
| BAA21849 | EKNNVKHIETFSRNENSYTLGINQFTDMTKSEFVAQYTG-VSLPLNIEREPVVSFDDVN | 119 |
| | *****:*****.*.*****:*****.*.*:*****.* * **::*****: | |
| CAA08861 | ISAVPQSIDWRNYGAVTSVKNHIPCGSCWAFAAIATVESIYKIKRGLYLSLSEQQVLDCA | 179 |
| BAA1 | ISAVPQSIDWRDYGAVNEVKNQNPCGSCWSFAAIATVEGIYKIKTGVLVSLSEQEVLDCA | 179 |
| BAA21849 | ISAVPQSIDWRDYGAVNEVKNQNPCGSCWSFAAIATVEGIYKIKTGVLVSLSEQEVLDCA | 179 |
| | **:* *****: **.*.*: **:*.*:*****.* ** * .*****:***** | |
| CAA08861 | VSYGDKGGWVNKAYDFIISNKGVASAATYPYKASQGGTCRIRINGVPNSAYITGYTRVQSN | 239 |
| BAA1 | VSYGDKGGWVNKAYDFIISNNGVTTEENYPYQAYQG--TCNANSFPNSAYITGYSYVRRN | 237 |
| BAA21849 | VSYGDKGGWVNKAYDFIISNNGVTTEENYPYLAQGG--TCNANSFPNSAYITGYSYVRRN | 237 |
| | . **.*: .*:*****:***: ** * * : * * . ***** : * * * | |
| CAA08861 | NERSMYAVSNQPIAASIEAS-GDFQHYKRGVFSGPGTSLNHAITIIIGYGQDSSGKKFW | 298 |
| BAA1 | DERSMYAVSNQPIAALIDAS-ENFQYYNGGVFSGPGTSLNHAITIIIGYGQDSSGTQYW | 296 |
| BAA21849 | DERSMYAVSNQPIAALIDAS-ENFQYYNGGVFSGPGTSLNHAITIIIGYGQDSSGTQYW | 296 |
| | :* . * ** * :***: . :*. : *:*: ** * .***** *****: *****.*.:** | |
| CAA08861 | I VRNSWGASWGERGYIRMARDVSSSSGLCGIAIRPLYP--TLQSGANVEVIKMVSESRS | 356 |
| BAA1 | I VRNSWGSSWGERGYIRMARGVSSS-GLCGIAMDPLYP--TLQSGANVAVIKMVSKT--- | 350 |
| BAA21849 | I VRNSWGSSWGEGERGYIRMARGVSSSSGVCGIAMAPLFP--TLQSGANAIVIKMVSET--- | 351 |
| | **:*:*:*: ** * **:*:*:*:* * * * * : * * : . . . | |
| CAA08861 | V | 357 |
| BAA1 | - | |
| BAA21849 | - | |

Figure 3. Alignment and deduced amino acid sequences of the coding regions of bromelain genes (CAA08861, BAA21849; NCBI data, BAA1; Isolated in this study). Putative signal peptide and active site domain are shaded. Regions of cystein protease include E₅₃xxxR₅₇xxxF₆₁xx N₆₄xxxI₆₈xxxN₇₂ motif.

Table 2. Amino acid position of ERFNIN motif, 12 amino acid conserved sequence and catalytic site of BAA1, CAA08861 and BAA21849.

| Gene | ERFNIN motif | 12aa conserved sequence | Catalytic site |
|----------|---|---|------------------------------------|
| BAA1 | E ⁵³ ***R ⁵⁷ ***P ⁶¹ **N ⁶⁴ ***I ⁶⁸ ***N ⁷² | ⁷⁸ SYTLGINQFTDMT ⁹⁰ | C ¹⁴⁴ -H ²⁷⁹ |
| CAA08861 | E ⁵³ ***R ⁵⁷ ***P ⁶¹ **N ⁶⁴ ***I ⁶⁸ ***N ⁷² | ⁷⁸ SYTLGINQFTDMT ⁹⁰ | C ¹⁴⁴ -H ²⁸¹ |
| BAA21849 | E ⁵³ ***R ⁵⁷ ***P ⁶¹ **N ⁶⁴ ***I ⁶⁸ ***N ⁷² | ⁷⁸ SYTLGINQFTDMT ⁹⁰ | C ¹⁴⁴ -H ²⁷⁹ |

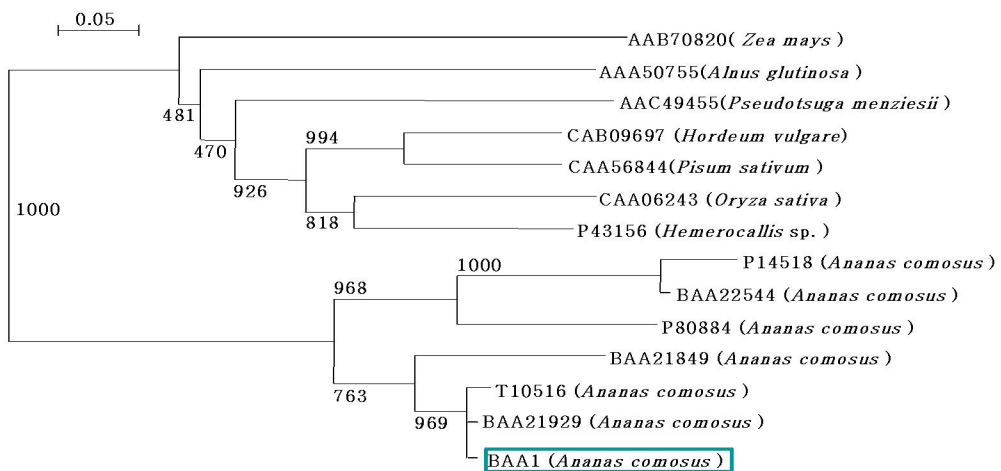


Figure 4. Phylogenetic tree of plant bromelain genes by Clustal W. The number next to the nodes give bootstrap values from 1000 replicates. BAA1; isolated gene in this study, BAA21929 and T10516; isolated from pineapple (Muta E, et al. 2000).

유전자 기능에 대한 정보가 거의 없는 실정이라 그 기능은 예측 할 수 없으나, 두 그룹의 유전자 그룹이 기능적으로 분리되어 있을 가능성을 시사하고 있다. 본 실험에서 분리된 BAA1은 파인애플로부터 분리된 accession number BAA21849, T10516, BAA21929 유전자와 같은 cluster를 형성하고 있는 것이 확인되어졌다

(Fig. 4). 이러한 결과들로부터 BAA21849, T10516, BAA21929 유전자들은 파인애플에서 분리된 유전자로서 cystein protease 활성을 가진 단백질 분해 기능이 있는 것으로 보고되어 (Manhart et al., 2002) 본 실험에서 얻어진 BAA1 유전자는 이들과 유사한 기능을 가질 것으로 추정된다.

나. BAA1 유전자 도입 형질전환 및 후대 육성

1) 식물발현 binary vector 구조 분석

식물 발현 binary vector 구축을 위하여 pIG121Hm의 GUS 유전자를 *Bam*HI 과 *Sac*I 처리에 의해 제거한 후, 그 위치에 파인애플로부터 분리한 BAA1 유전자를 삽입시켰다 (Fig. 5). 따라서 BAA1 유전자는 35S promoter의 지배 하에 발현하도록 하였다. 선발 marker 유전자로 kanamycin 저항성유전자 (NPTII) 및 hygromycin 저항성유전자 (HPT)를 포함하고 있어 재 분화 과정상 강한 선별을 할 수 있을 것으로 생각된다.

2) 형질전환 배추 육성 및 선발

BAA1 유전자의 형질전환은 배추법 (Takasaki et al., 1997; Kuginuki et al., 2001)을 이용하였다. *Agrobacterium*을 감염시킨 배추의 절편은 callus 유도배지에서 배양 10일 후부터 callus가 형성되기 시작하였다 (Fig. 6A). 또한 재분화 배지에 2회째의 계대배양 후기부터 callus에서 부정아가 형성되기 시작하였으며 3회 계대배양에서는 많은 multi-shoot가 발생하였다 (Fig. 6B). 이들 작은 싹들은 정숙배지에서 초장이 7-8cm 정도 될 때까지 성장시킨 후, hygromycin 100mg/L이 포함된 MS hormone free 배지로 옮겨 발근을 유도하였다 (Fig. 6C). 발근된 개체는 포트에 옮겨 순화시켰으며, 8-10°C, 40일간 저온처리 후, 개화를 유도하였다. 개화된 개체는 뇌수분하여 자식종자 (T1)를 획득하였다 (Fig. 6D). 990년 He는 배추 형질전환법을 확립한 이래 Bt 저항성 및 병 저항성 식물체들을 육성하였다 (Halfhill et al., 2002; Li et al., 2003; Adamchuk et al., 1999).

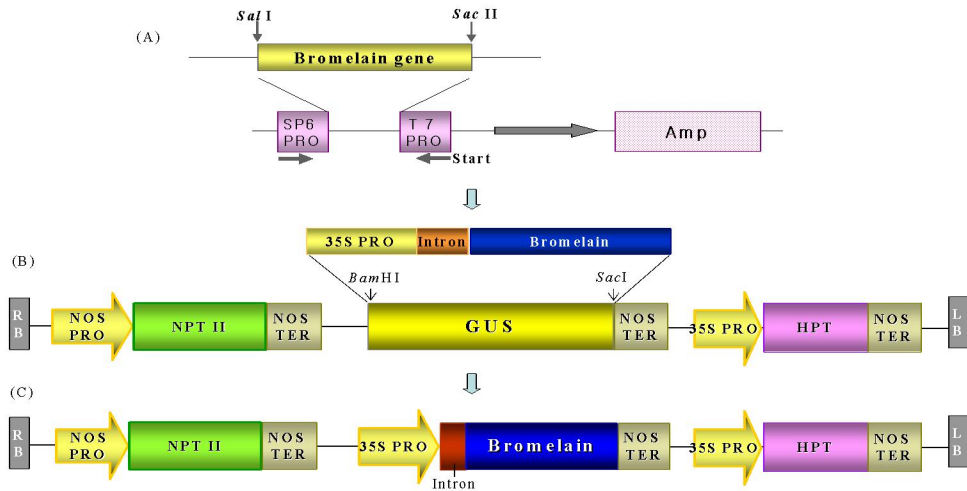


Figure 5. Ti-plasmid vector construct for overexpression of BAA1 gene. Nos-p; nos gene promoter, Nos-t; nos gene terminator, HPT; hygromycin phosphotransferase gene, 35S-p; Cauliflower mosaic virus 35S-promoter, LB; left border, RB; right border. (A); BAA1 gene cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), (B); GUS region was removed using *BamHI* and *SacI* in pIG121Hm binary vector and BAA1 gene with 35S promoter was inserted into the gus region. (C); The pIG121Hm binary vector harboring BAA1 gene.

최근 들어 antisense법, RNAi법 등을 이용해 자가불화합성관련 유전자의 발현을 제어하여 자가화합성을 가진 형질전환체를 육성하고 있다 (Shiba et al., 2000; Takasaki et al., 1999). 이들 실험에서 배추의 형질전환율은 2% 이내로 보고 되었으나 본 연구에서는 이들이 보고한 형질전환율보다 1.5배가 높게 나타났다. 이는 형질전환에 사용한 *Brassica rapa* 품종 중에 재분화율이 매우 높은 genotype을 선발하여 사용했기 때문으로 생각된다. 소송체는 결구배추와도 교배가 용이하기 때문에 국내에서 주로 사용하는 결구형 배추와 교배하여 backcross 시킨다면 도입 유전자를 쉽게 결구형 배추에 도입할 수 있을 것으로 생각된다. 형질전환체에서 도입유전자의 유전분석을 위해 T1 분리세대의 종자를 계통별로 25립씩 선별하여 hygromycin 50mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 파종하여 분리양상을 살펴보았다.

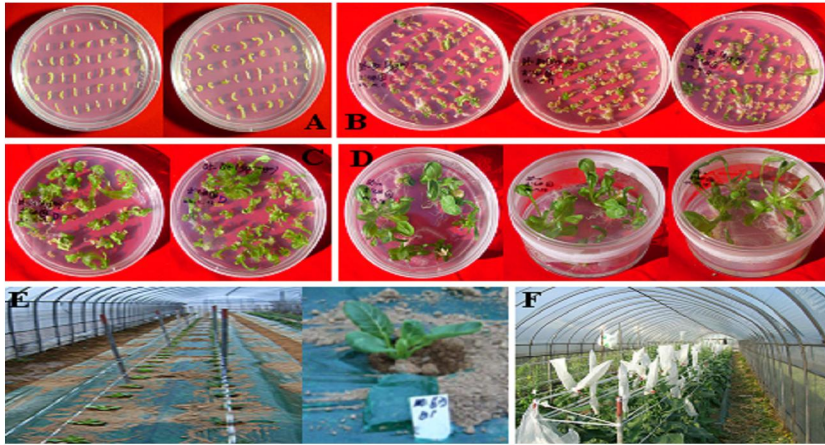


Figure 6. 'Osome' (*Brassica rapa* L.) plants transformed with pIG121Hm vector containing BAA1 gene. A; Callus formation, B and C; Multi-shoot differentiation, D; Regenerated plants in rooting medium. E; Acclimation of transgenic plants, F; Selfing to obtain T1.

Table 3. Chi-square analysis in T1 generation after transformation with BAA1 gene in *Brassica rapa*.

| Acc No. | Strain No. | Sowing No. | No. of plant ^{a)} | | χ^2 - test | p |
|---------|------------|------------|----------------------------|-----------|-----------------|----------------|
| | | | Resistant | Sensitive | | |
| 1 | 63 | 20 | 17 | 3 | 1.06 | 0.25 < P < 0.5 |
| 2 | 64 | 22 | 20 | 2 | 2.96 | 0.05 < P < 0.1 |
| 3 | 65 | 21 | 7 | 14 | 19.44 | P < 0.005 |
| 4 | 66 | 23 | 14 | 9 | 2.44 | 0.1 < P < 0.25 |
| 5 | 67 | 25 | 16 | 9 | 1.61 | 0.1 < P < 0.25 |

^{a)} Fourteen days after sowing in 1/10 MS medium containing 50mg/L hygromycin.

파종 21일 후, hygromycin에 대한 저항성 개체와 감수성 개체로 확인할 수 있었다. 각각의 계통으로부터 도입유전자의 분리비를 살펴본 결과 B65 계통을 제외한 나머지 계통에서는 멘델의 법칙에 따라 저항성과 감수성의 비율이 3:1의 통계적 유의성이 있어 이들 계통에서 T2 종자를 획득하였다 (Table 3).

통상적으로 외래유전자를 식물 세포에 도입할 경우 임의적으로 게놈 내에 integration 되기 때문에 도입유전자의 copy수가 매우 중요하며, 호모게체를 육성하기 위해 single copy로 도입되는 것이 바람직하다. 본 연구에서 육성한 형질전환체들 중에 single copy로 도입된 형질전환체는 5계통으로 조사한 것 중의 절반에 해당되었다. Cho 등 (Cho et al.2004)의 보고에서도 *Agrobacterium*을 매개로 형질전환 하였을 경우 particle gun법보다 single copy로 도입될 수 있는 확률이 높다고 하였다.

3) 도입유전자의 확인

형질전환 식물체에서 도입한 유전자의 유·무를 알기 위해 항생제에 내성을 가진 T1식물체와 대조식물체를 이용하여 HPT, NPTII 및 BAA1 유전자 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 이용하여 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과 유전자를 도입하지 않은 대조식물체에서는 증폭산물을 얻을 수 없었으나, 형질전환 식물체들에서 HPT와 NPTII 유전자 산물이 확인되었다. 또한 BAA1 유전자의 PCR 분석에서 936bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 따라서 유전자레벨에서 선발 마커로 사용된 유전자 및 목적으로 하는 BAA1 유전자가 배추 게놈에 안정적으로 도입되어 있다고 할 수 있다.

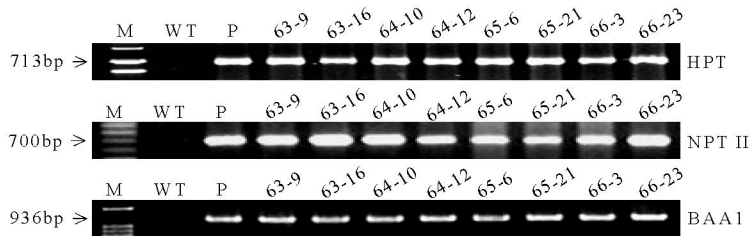


Figure 7. PCR amplification of transferred genes (HPT, NPTII, BAA1) in transgenic chinese cabbage lines. The amplification products were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane WT; PCR generated from the DNA template of the wild type plant, Lane P; PCR product generated from the DNA template of the pIG121Hm plasmid that contains the BAA1, Lane 63-9~66-23; PCR products generated from the DNA template of independent transgenic lines.

4) 유전자의 발현 분석

형질전환 식물체에서 BAA1 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 각 계통에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과 도입한 BAA1 유전자가 정상적으로 mRNA로 전사되고 있음을 확인하였다. 또한 형질전환체간에서도 BAA1 유전자의 발현 정도가 현저한 차이를 보였다 (Fig. 8). 이상의 결과로부터 파인애플로부터 분리된 BAA1 유전자가 배추계놈 내에 도입되어 안정적으로 발현하고 있다고 할 수 있다.

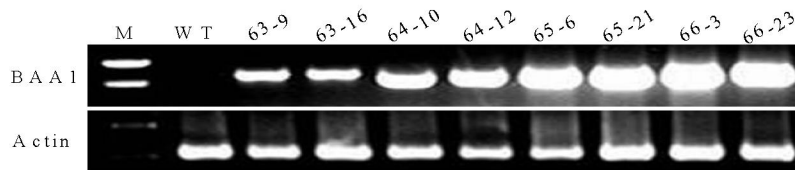


Figure 8. Analysis of BAA1 expression in the transgenic chinese cabbage lines by reverse transcription polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from each plant, and $0.5\mu\text{g}$ of this RNA was amplified with BAA1-specific primers. As a loading control, the samples were also amplified with specific primers for the chinese cabbage actin gene. The amplification products were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA-ladder, Lane WT; PCR generated from the cDNA template of the wild type plant, Lane 63-9~66-23; PCR products generated from the cDNA template of independent transgenic lines.

5) Endo-protease 활성 검정

Bromelain은 cysteine protease의 복합체로 알려져 있다. 그러므로 형질전환체의 세포내에 단백질 가수분해효소인 endo-protease 활성을 알아 본 결과 대부분의 형질전환체에서 대조구에 비해 높은 활성을 보였다. 또한 형질전환체들 간에 비교한 결과 endo-protease 활성의 차이를 보였다 (Fig. 9).

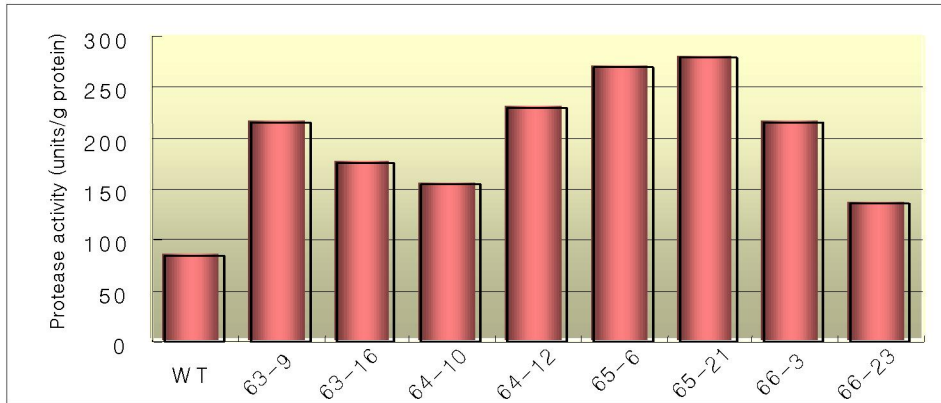


Figure 9. Endo-protease activity in transgenic chinese cabbage lines.

Total protein were extracted in phosphate buffer (100mM sodium phosphate, 30mM cysteine, 30mM EDTA, pH 7.0) from leaf tissues and protease activity was determined by hydrolysis of azo-casein at pH 7.0, 40°C.

이들 결과로부터 endo-protease의 활성이 높은 형질전환체들에서 BAA1 유전자 발현량이 많았다. 따라서 BAA1 유전자가 세포내에서 발현함에 따라 세포내 다른 효소활성의 변화가 초래한 것으로 생각된다. 또한 endo-protease활성은 serine protease 및 cysteine protease 등 여러 종류의 protease 값으로 형질전환체들의 세포내에서 protease간의 상호작용에 의해 활성 차이를 보이는 것으로 생각되어진다. Protease는 세포내에서 대사 작용 신호전달, 아미노산 합성 등 식물의 성장과 발육하는 과정상에 생리적으로 변화되는 것으로 노화과정상에 변화가 많다고 알려졌다 (Yuh et al.,2004; Alonso, 1995; Feller, 1994).

6) 형질전환 후대계통 육성

형질전환의 T1 분리세대로부터 멘델의 법칙에 따라 3:1로 분리된 각각 계통들에서 hygromycin에 내성을 보인 개체를 배지로부터 포트에 옮겨 순화과정을 거쳐서 본 엽 5-6매 정도까지 성장시킨 유묘에 춘화처리 후 계통 당 10개체로부터 자식종자 (T2)를 획득하였다 (Fig. 11).

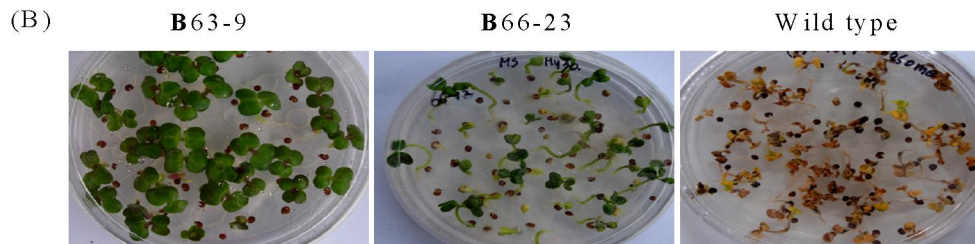
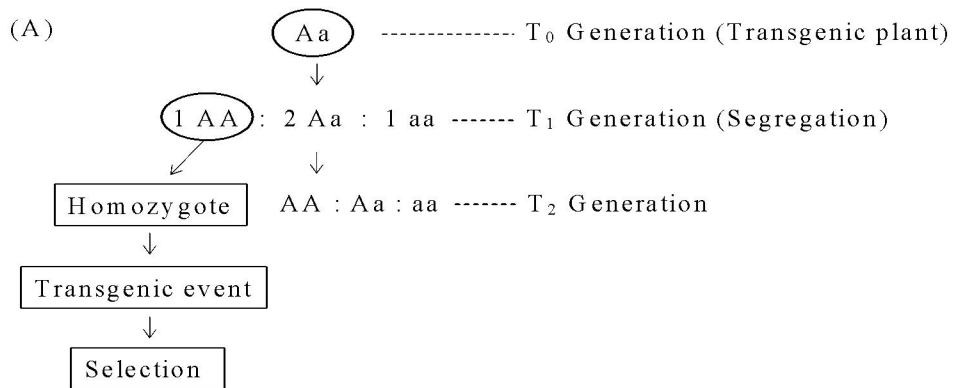


Figure 10. Selection procedure of homozygote transgenic lines with hygromycin resistance. Transgenic plants were grown in 1/10 MS medium containing 50mg/L hygromycin.

(A) Segregation pattern of a single gene per generation. Transgenic event was investigated in T₂ generation plants.

(B) Growth of T₁ plants in hygromycin containing 1/10 MS medium indicates segregation of hygromycin resistance gene that transferred into chinese cabbage with BAA1 gene. Deduced genotype is AA (B63-9 line) and Aa (B66-23).

Table 4. Segregation ratio of transgene in transferred hygromycin gene T2 lines.

| Transgenic T ₂ lines | No. of plant ^{a)} | | Ratio of Allelic |
|------------------------------------|----------------------------|-----------|------------------|
| | Resistant | Sensitive | |
| B 63-9-1 | 20 | 0 | 20:0 |
| B 63-9-2 | | | |
| B 63-9-3 | | | |
| B 63-16-1 | 52 | 28 | 3:1 |
| B 63-16-2 | | | |
| B 63-16-3 | 0 | 20 | 0:20 |
| B 64-10-2 | 0 | 20 | 0:20 |
| B 64-10-1 | | | |
| B 64-10-3 | | | |
| B 64-12-1 | 53 | 27 | 3:1 |
| B 64-12-3 | | | |
| B 64-12-2 | 20 | 0 | 20:0 |
| B 66-3-1 | 20 | 0 | 20:0 |
| B 66-3-2 | 20 | 0 | 20:0 |
| B 66-3-3 | | | |
| B 66-23-1 | 41 | 19 | 3:1 |
| B 66-23-3 | | | |
| B 66-23-2 | 0 | 20 | 0:20 |

^{a)} T₂ generation seeds were planted in 1/10 MS medium containing 50mg/L hygromycin and checked resistance level at 14 days after germination.

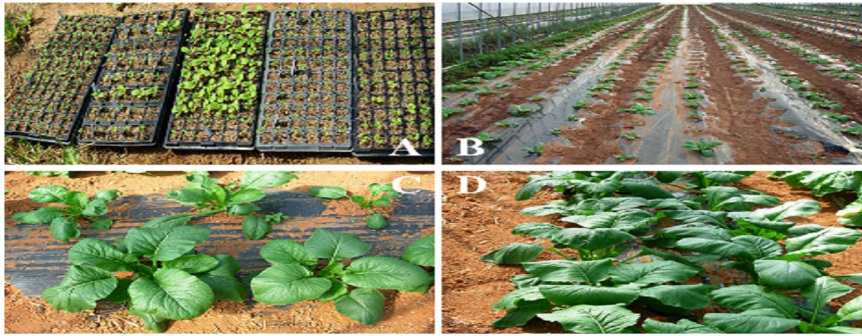


Figure 11. Growth and development pattern of transgenic event plants in the field. A; Acclimation of transgenic plants in pot. B, C and D; Growth of transgenic plants in the field.

T1 5계통 유래 총 18개의 식물체로부터 얻어진 T2 종자를 15-20립씩 hygromycin 50mg/L이 포함된 1/10 MS 배지에 무균적으로 파종한 후, 발아, 생육 및 고사정도를 판정한 결과 (Fig. 10), Table 4와 같다. 18계통 중 63-16-3, 64-10-2, 66-23-2 등의 3계통은 선발배지 상에 파종 후 발아가 시작되면서 엽록소의 결핍현상 등으로 인해 모두 고사되었다. 63-9-2, 63-9-3, 63-16-1, 63-16-2, 64-10-1, 64-10-3, 64-12-1, 64-12-3, 66-3-3, 66-23-1 및 66-23-3 등의 11계통은 선발배지 상에서 항생제에 내성을 보여 건전하게 자라는 개체와 감수성을 보여 발아 후, 고사현상을 보이는 개체들로 분리되었다. 그리고 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2 등의 4계통은 선발배지에서 파종한 모든 종자에서 건전한 생육을 보였다. 이를 통해 도입유전자가 형질전환 후대에서 멘델의 법칙에 의해 고정된 계통은 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2 등임을 확인할 수 있었다. 또한 선발배지 상에서 분리하고 있는 11계통의 식물체중에는 이론적으로 볼 때 도입유전자가 homo 상태 및 hetero 상태로 함께 공유하고 있는 것으로 고정계통을 육성하기 위해서 T3세대의 육성 및 재 선발을 통해야만 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

7) 형질전환 후대에서 BAA1 유전자 확인

T2 세대에서 모든 개체가 hygromycin 내성을 보인 계통 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2로부터 HPT, NPTII 및 BAA1 유전자의 도입여부를 확인한 결과, 선발된 형질전환 후대에서 도입유전자들이 정상적으로 유지되어 초기에 보여

준 PCR 단편과 같은 크기의 증폭 산물이 명확하게 검출되었다 (Fig. 12A, B, C). 따라서 BAA1이 도입된 형질전환체는 후대에서 안정적으로 유전되고 있다고 할 수 있다.

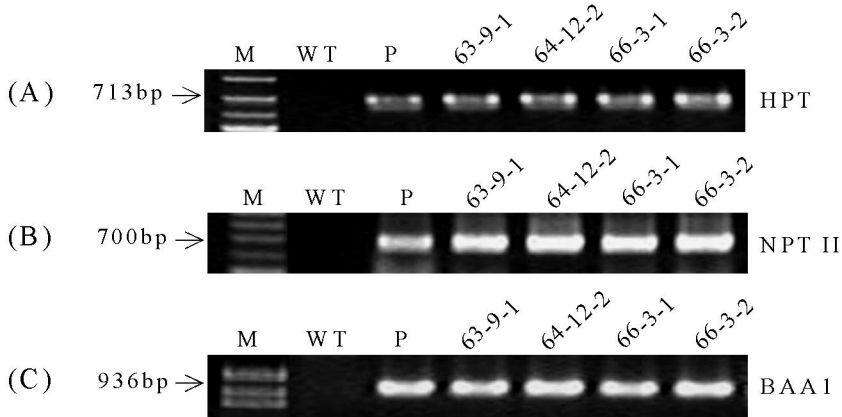


Figure 12. PCR analysis of transgenic event lines. The amplification products of the BAA1 were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane WT; PCR generated from the DNA template of the wild type plant, Lane P; PCR product generated from the DNA template of the pIG121Hm plasmid that contains the BAA1, Lanes 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 and 66-3-2; independent transgenic event lines.

8) 형질전환 후대에서 도입유전자 발현 정량 분석

형질전환 후대에서 선발한 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2 계통에서 발현 정도를 알기위해 RT-PCR 분석을 실시한 결과 BAA1 유전자의 발현은 계통 간에 많은 차이를 보였다 (Fig. 13D). 또한 선발 maker HPT 및 NPTII 유전자의 발현은 초기의 형질전환체와 유사한 발현 양상을 보였다 (Fig. 13A, B, C).

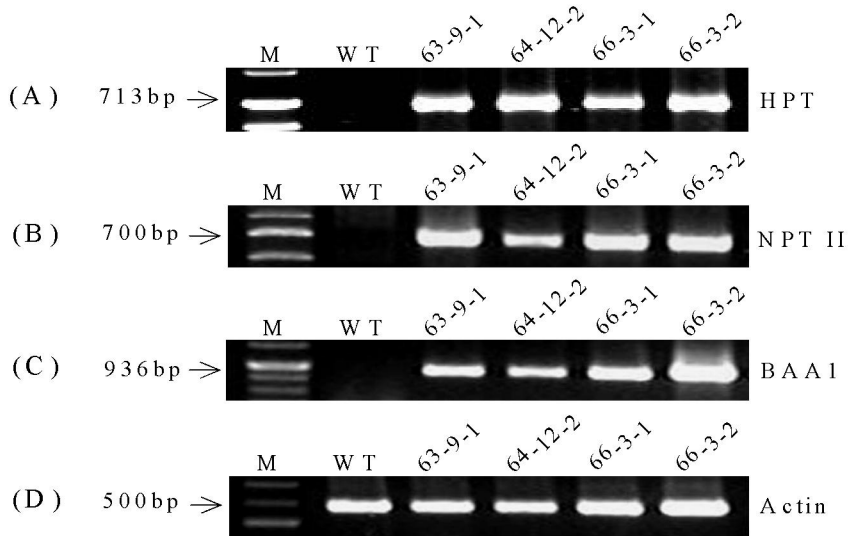


Figure 13. Expression of BAA1 gene in transgenic event lines. (A); Hygromycin resistant gene, (B); Kanamycin resistant gene, (C); BAA1 gene, (D); Actin gene. The amplification products were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA-ladder, Lane WT; wild type plant, Lanes 63-9-1, 64-12-2, 66-3-1 and 66-3-2; independent transgenic event lines.

형질전환 후대에서 63-9-1, 63-16-1, 64-10-1, 64-12-1, 64-12-2, 66-3-1 및 66-3-2, 66-23-1 계통에서 BAA1 유전자의 발현량을 알기위해 real-time PCR을 실시하여 상대적 발현비를 조사하였다 (Fig. 14). 조사한 모든 계통에서 BAA1 유전자의 발현량은 현저한 차이를 보였으며 이 중 66-3-1 계통은 다른 계통과 비교해 볼 때 2-3배 높은 발현량을 보였다. 그리고 발현량이 가장 낮은 계통은 63-16-1로서 형질전환 초기의 결과와 비슷한 양상을 보였다. 그러나 형질전환 초기의 66계통에서 분리된 66-3-1, 66-3-2, 66-23-1의 발현량의 차이는 정확히는 알 수 없으나 후대에서 도입되어진 유전자의 조환 및 발현에 미치는 요인 등에 의해 차이를 보이는 것으로 생각된다. 형질전환 후대에서 고정된 계통들은 도입유전자가 안정적으로 유지되며 발현되고 있었다. 이들 계통들에서 mRNA로 전사된 산물이 단백질로 올바르게 번역되었는지를 알기 위해 BAA1 유전자 유래 항체를 사용하여 Western blot 분석을 실시하였다. 형질전환 후대 계통들에서는 120kDa 부근

에서 BAA1 단백질 band가 검출되었다 (Fig 15). 따라서 파인애플 유래의 BAA1 유전자가 배추계놈 내에 안정적으로 삽입되어 mRNA로 전사되고, 최종적으로 단백질 합성까지 활발하게 이루어진 것으로 나타났다.

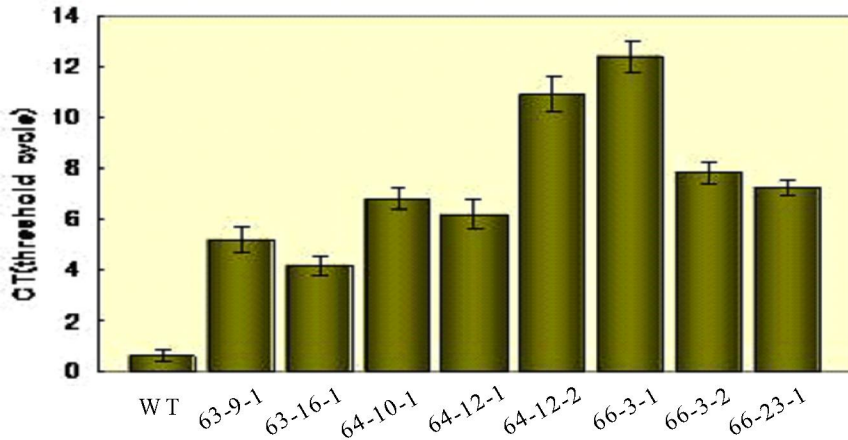


Figure 14. Quantitative RT-PCR analysis of RNA extracted from transgenic chinese cabbage lines and wild type control. CT values were calculated using actin expression level as a control. Error bars show the standard error of the mean for three replicate measurements. WT; Wild type plant of chinese cabbage, 63-9-1~66-23-1; Independent transgenic event lines.

9) 형질전환 후대에서 BAA1 단백질 정량 분석

BAA1 유전자의 항체를 이용하여 ELISA방법에 의해 형질전환 계통의 BAA1 단백질량을 검출하였다. 형질전환체의 BAA1 단백질은 총 soluble단백질에서 BAA1 단백질이 차지하는 비율 (%)로 결정하였다. B66-3-1 계통은 총 단백질에서 0.9%의 BAA1단백질로 매우 높은 단백질을 생산하고 있었다 (Fig. 16). 이들 결과는 Western blot 분석에서도 비슷한 결과를 보였다. 따라서 총 단백질이 30 μ g으로 가정한다면 BAA1 단백질은 300ng의 수치로 계산 될 수 있다. 이런 결과로 입각해 볼 때 생체 중 1g의 잎 조직으로부터 BAA1이 합성하고 있는 단백질의 양은 30-35 μ g 정도라고 할 수 있다. 이와 유사한 결과는 Kang 등 (2004)이 보고한

콜레라 toxin 유전자를 담배에 발현 시켰을 때와의 비슷한 양상을 보였다.

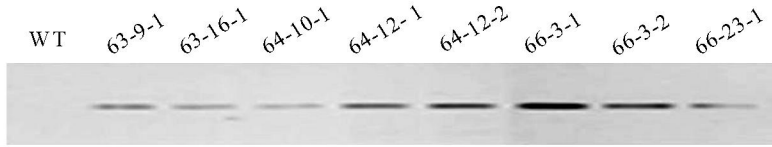


Figure 15. Expression of BAA1 gene in transgenic chinese cabbage T2 lines visualized by immunoblotting. Anti-BAA1 raised in rabbit and Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG were used as antibody. Lane WT; wild type plant, Lane 63-9-1~66-23-1; eight transgenic lines. All the lanes were run with equal concentration of protein extract (20 μ g).

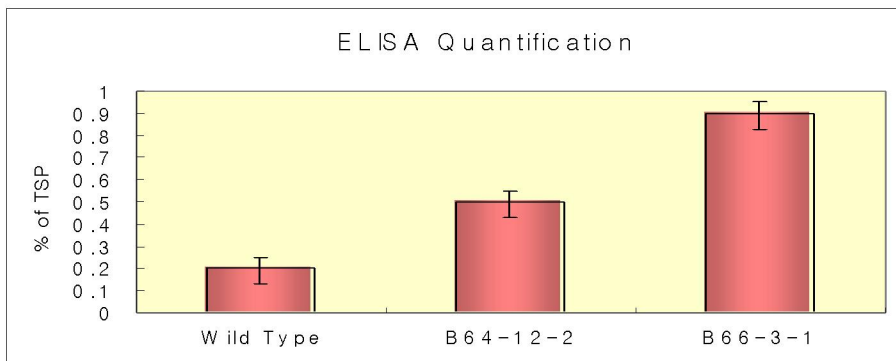


Figure 16. ELISA quantification of BAA1 protein levels in the leaves of transgenic event plants. Wild-type and two transgenic lines (B64-12-2, B66-3-1) were investigated. Absorbance was measured at 405nm. TSP; total soluble protein.

다. Microarray 분석을 통한 형질전환체의 유전자 발현 양상

B66-3-1 계통과 대조계통에서 유전자 발현 변이 차이를 알기 위해 microarray 분석을 실시하였다. DNA chip 실험에 사용한 B66-3-1 계통과 대조계통의 RNA, quality를 check한 결과 매우 양호하였다 (Fig. 17).

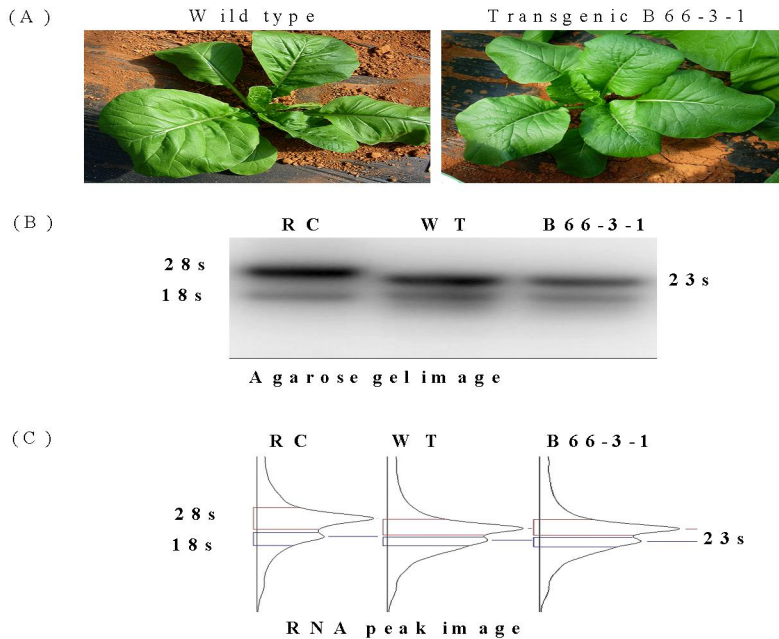


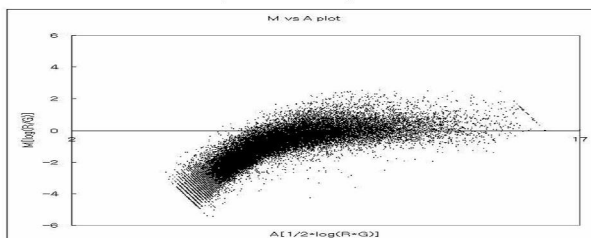
Figure 17. Agarose gel and RNA peak image of mRNA isolated from transgenic event line (B66-3-1) and wild type plant. (A); phenotype of B66-3-1 line and wild type. mRNA was separated in the 1% agarose gel (B) and peaked bands (C). RC; RNA control, WT; Wild type plant of chinese cabbage, B66-3-1; Transgenic event plant.

분리 정제한 Total RNA은 역전사효소에 의해 형광색소로 표식한 dCTP가 포함된 cDNA를 합성하여 *Arabidopsis* 유래 37,000개의 유전자로 구성된 oligochip (Agilent co.)에 hybridization을 실시하였다 (Fig. 18). DNA chip 결과의 분석 과정은 scanning을 통하여 얻어진 spot의 signal intensity 수치 데이터 ($M = \log_2 (R-G)$, $A = \log_2 (R+G)$; R: 빨간색, G: 녹색 plot)를 사용하여 hybridization된 plot 색을 균일화하기 위해 명암을 조정하여 M vs A plot으로 표시하였다 (Fig. 19). 실험 결과로 얻어진 모든 유전자들의 분포를 histogram으로 표시하였으며 이것은 normalization이 끝난 data의 분포도와 비교 검토하여 실험 결과의 정확성을 확인하였다 (Fig. 20). B66-3-1 계통과 대조구와의 microarray 분석을 통해 얻어진 발현변이 유전자들을 plot의 명암에 따라 표시한 결과 빨간색 plot와 녹색 plot 간의



Figure 18. Hybridization image of microarray analysis in transgenic event line (B66-3-1) and wild type by using *Arabidopsis* 37k oligochip.

(A) Raw data intensity M vs A plot



(B) Normalized data intensity M vs A plot

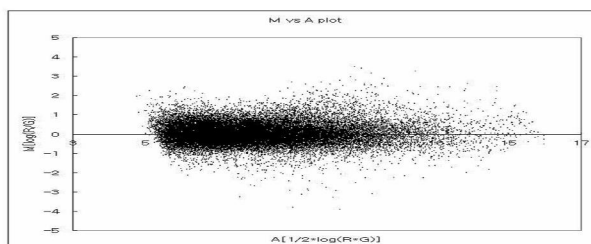


Figure 19. Raw and normalized data intensity M vs A scatter plot. M; minus ($M = \log_2 R - \log_2 G$), A; add ($M = \log_2 R + \log_2 G$), R and G; red dye and green dye. (A); before normalization, (B); after normalization.

정규분포로 색도의 변화를 보였다. plot의 색도가 log 3.0~3.9 사이를 보이는 clone이 4개, log 2.0~2.9 범위로 보이는 clone이 76개이었다. 반면 log -2.0~-2.9 범위의 clone이 36개, log -3.0~-3.9 범위의 clone 이 6개로 나타났다 (Fig. 21). plot의 명암에 따른 분석으로 살펴 볼 때 microarray에 사용한 두 집단간의 발현 변이 실험이 매우 양호함을 알 수 있다.

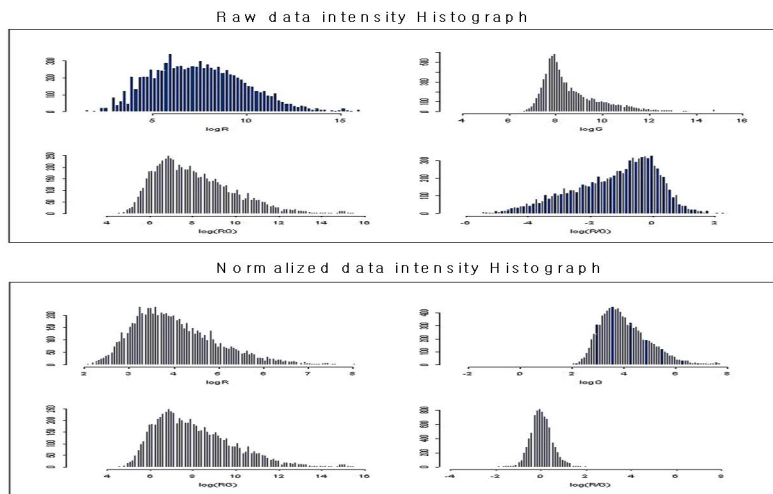


Figure 20. Raw and normalized data intensity histogram after microarray analysis.

B66-3-1과 대조식물의 유전자 발현변이는 총 2,013개 (5.3%)의 유전자가 microarray에서 유의한 수준으로 발현변이를 나타내었다. 2배 이상 발현 변이를 보이는 유전자들 중 overexpression 유전자들은 총 1,352개로 나타났다. 그 외에 1,796개 유전자들은 발현량이 낮아졌다 (Fig. 21).

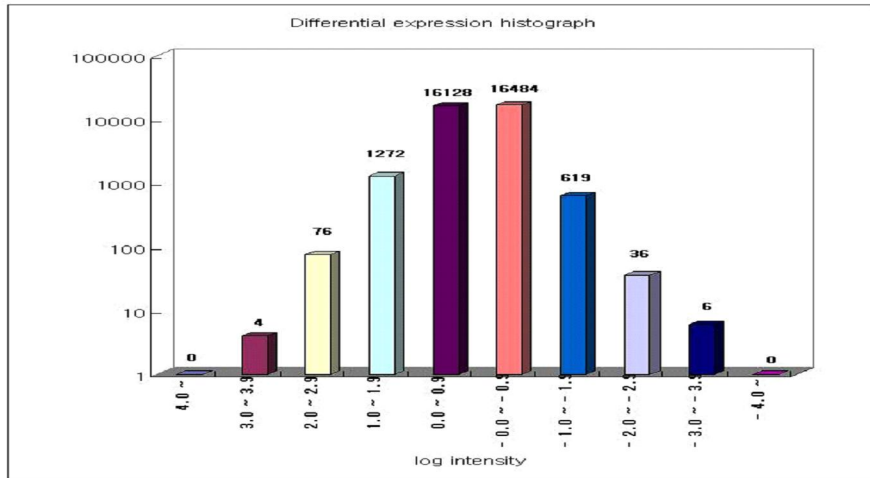


Figure 21. Signal intensity ratio histogram obtained through microarray analysis in between transgenic event line (B66-3-1) and wild type plants.

1) Overexpression 유전자군

Microarray 실험에서 얻어진 data를 분석한 결과 B66-3-1에서 대조식물과 3.1 배 이상 발현 변이를 보이는 유전자는 총 20개로 나타났다. 이들 유전자들의 기능을 살펴보면 protease 관련 유전자가 6개, stress 관련 유전자가 8개, ribosomal 관련 유전자가 2개, 그리고 알려지지 않은 유전자가 4개로 나타났다 (Table 5).

Table 5. Clones that are consistently expressed at higher levels in BAA1-expressing plant (B66-3-1) than in wild type controls.

| Clone ^{a)} number | Fold over expression | gene ID ^{b)} | Description |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|---|
| 33382 | 11.2 | At1g20760.1 | calcium-binding EF hand family protein contains |
| 790 | 10.5 | At4g33666.1 | expressed protein |
| 927 | 9.4 | At5g19580.1 | glyoxal oxidase-related contains similarity to glyoxal oxidase precursor [Phanerochaete chrysosporium] |
| 23 | 6.0 | At4g25780.1 | pathogenesis-related protein, putative similar to gene PR-1 protein - <i>Medicago truncatula</i> |
| 16875 | 5.9 | At1g75830.1 | plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.1) identical to SP P30224 Cysteine-rich antifungal protein 1 precursor (AFP1) (Anther-specific protein S18 homolog) { <i>Arabidopsis thaliana</i> } |
| 3537 | 5.3 | At2g40560.1 | protein kinase family protein contains protein kinase domain |
| 12650 | 4.6 | At5g47970.1 | nitrogen regulation family protein strong similarity to unknown protein |
| 39487 | 3.8 | At5g38195.1 | protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein contains |
| 30446 | 3.7 | At2g39350.1 | ABC transporter family protein |
| 3999 | 3.6 | BX821750 | <i>Arabidopsis thaliana</i> Full-length cDNA Complete sequence from clone GSLTSIL70ZF08 of Silique of strain col-0 of <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| 1187 | 3.5 | At2g38870.1 | protease inhibitor, putative similar to SP P24076 Glu <i>S.griseus</i> protease inhibitor (BGIA) { <i>Momordica charantia</i> }; contains Pfam profile PF00280: Potato inhibitor I family |
| 3009 | 3.5 | At1g63730.1 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative domain signature TIR-NBS-LRR exists |
| 28132 | 3.4 | At3g54620.1 | bZIP transcription factor family protein contains |
| 1074 | 3.4 | At5g12120.1 | ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein contains Pfam profile PF00627: UBA/TS-N domain |

^{a)} Clone numbers; Agilent *Arabidopsis* gene index reference numbers.

^{b)} Gene ID; NCBI reference data from clone numbers.

(continue)

| Clone number | Fold over expression | gene ID | Description |
|--------------|----------------------|-------------|--|
| 19312 | 3.3 | At5g06180.1 | expressed protein similar to unknown protein (sp Q9ZE28) |
| 13470 | 3.3 | At5g44420.1 | plant defensin protein, putative (PDF1.2a) plant defensin protein family member |
| 4651 | 3.2 | At3g46320.1 | histone H4 nearly identical to histone H4 [Arabidopsis thaliana] |
| 18638 | 3.2 | At1g64160.1 | disease resistance-responsive family protein |
| 4583 | 3.1 | At1g66270.1 | beta-glucosidase (PSR3.2) nearly identical to GI:2286069 from (Arabidopsis thaliana) |
| 760 | 3.1 | At5g21105.1 | L-ascorbate oxidase, putative similar to L-ascorbate oxidase from {Nicotiana tabacum} |
| 14261 | 3.1 | At3g07080.1 | membrane protein contains Pfam profile: PF00892 Integral membrane protein |
| 33508 | 3.1 | At4g12530.1 | protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein similar to pEARLI 1 (Accession No. L43080) |
| 12960 | 3.0 | At3g05740.1 | DNA helicase (RECQ11) identical to DNA Helicase [Arabidopsis thaliana] |
| 13327 | 2.9 | At3g20610.1 | non-race specific disease resistance protein, putative similar to non-race specific disease resistance protein NDR1 [Arabidopsis thaliana] |
| 13333 | 2.8 | At5g53810.1 | O-methyltransferase, putative similar to GI:2781394 |
| 1181 | 2.8 | At5g41685.1 | mitochondrial import receptor subunit TOM7 |
| 29319 | 2.7 | At4g12980.1 | auxin-responsive protein |
| 3290 | 2.6 | At2g21100.1 | disease resistance-responsive protein-related / dirigent protein-related similar to dirigent protein [Thuja plicata] |
| 33735 | 2.5 | At5g44030.1 | cellulose synthase, catalytic subunit (IRX5) nearly identical to cellulose synthase [Arabidopsis thaliana] |
| 29796 | 2.0 | AA394485 | Arabidopsis thaliana mRNA |

2) Downexpression 유전자군

B66-3-1에서 대조식물과 0.4배 이하의 발현 변이를 보이는 유전자는 총 9개로 나타났다. 이들 유전자의 기능을 살펴보면 cytochrome P450, transcription factor, 스트레스관련 유전자 4개 및 발육조절 GTP결합 유전자, alcohol 가수분해효소 유전자 등으로 나타났다 (Table 6).

Table 6. Clones that are consistently expressed at lower levels in BAA1-expressing plant (B66-3-1) than in wild type controls.

| Clone ^{a)} number | Fold down expression | gene ID ^{b)} | Description |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|---|
| 37803 | 0.4 | At5g51900.1 | cytochrome P450 family similar to cytochrome P450 86A1 (SP:P48422) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] |
| 32847 | 0.4 | At3g02150.1 | TCP family transcription factor, putative similar to transcription factor PCF6 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] |
| 36763 | 0.4 | At1g02530.1 | multidrug resistance P-glycoprotein, putative similar to multidrug-resistant protein CjMDR1 GI:14715462 from [<i>Coptis japonica</i>] |
| 18986 | 0.4 | At5g01410.1 | stress-responsive protein, putative similar to ethylene-inducible protein HEVER [<i>Hevea brasiliensis</i>] |
| 29103 | 0.4 | At1g80510.1 | amino acid transporter family protein similar to amino acid transporter system N2 [<i>Rattus norvegicus</i>] |
| 7492 | 0.4 | At5g16120.1 | hydrolase, alpha/beta fold family protein similar to monoglyceride lipase from [<i>Homo sapiens</i>] |
| 12091 | 0.4 | At1g72660.1 | developmentally regulated GTP-binding protein |
| 43144 | 0.4 | At1g58400.1 | disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) |
| 18826 | 0.4 | At1g09490.1 | cinnamyl-alcohol dehydrogenase family / CAD family similar to cinnamyl alcohol dehydrogenase, <i>Eucalyptus gunnii</i> |
| 37499 | 0.3 | At1g49630.1 | peptidase M16 family protein / insulinase family protein contains Pfam domain |
| 34845 | 0.3 | At5g27360.1 | sugar-porter family protein 2 (SFP2) identical to sugar-porter family protein 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] |
| 15020 | 0.3 | At5g56080.1 | nicotianamine synthase, putative similar to nicotianamine synthase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] |

^{a)} Clone numbers; Agilent *Arabidopsis* gene index reference numbers.

^{b)} Gene ID; NCBI reference data from clone numbers.

(continue)

| Clone number | Fold down expression | gene ID | Description |
|--------------|----------------------|-------------|---|
| 39997 | 0.3 | At2g43550.1 | trypsin inhibitor, putative similar to SPP26780 Trypsin inhibitor 2 precursor (MTI-2) { <i>Sinapis alba</i> } |
| 10213 | 0.3 | At5g04350.1 | self-incompatibility protein-related similar to self-incompatibility [<i>Papaver nudicaule</i>] |
| 4457 | 0.3 | At2g29650.1 | inorganic phosphate transporter, putative similar to brain specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter [<i>Rattus norvegicus</i>] |
| 32181 | 0.3 | At1g79950.1 | helicase-related similar to BRCA1-binding helicase-like protein BACH1 (GI:13661819) <i>Homo sapiens</i>] |
| 17080 | 0.3 | At2g01110.1 | thylakoid membrane formation protein |
| 24567 | 0.3 | TC275044 | <i>Arabidopsis thaliana</i> AT4g32710 [AY060577] |
| 40712 | 0.3 | At5g07350.1 | tudor domain-containing protein / nuclease family protein contains Pfam domains PF00567: Tudor domain and PF00565: Staphylococcal nuclease homologue |
| 33441 | 0.3 | At1g06120.1 | fatty acid desaturase family protein similar to delta 9 acyl-lipid desaturase GB:BAA25180 GI:2970034 (ADS1) from [<i>Arabidopsis thaliana</i>] |
| 15516 | 0.3 | At4g02510.1 | chloroplast outer membrane protein, putative similar to chloroplast protein import component Toc159 [<i>Pisum sativum</i>] |
| 30506 | 0.3 | At1g51440.1 | lipase class 3 family protein similar to DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] |
| 7901 | 0.2 | BX830692 | <i>Arabidopsis thaliana</i> Full-length cDNA Complete sequence from clone GSLTLS14ZH01 of Adult vegetative tissue of strain col-0 of <i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress) |
| 16748 | 0.2 | TC271750 | AB023042 Ca ²⁺ -transporting ATPase-like protein { <i>Arabidopsis thaliana</i> ;} |
| 31345 | 0.1 | At4g01610.1 | cathepsin B-like cysteine protease, putative similar to cathepsin B-like cysteine proteinase GI:609175 from [<i>Nicotiana rustica</i>]; contains an unusually short, 5nt exon |

3) Overexpression 유전자군의 발현 분석

Overexpression 유전자 중에 3배 이상 발현변이를 보이는 유전자의 염기서열을 NCBI database에서 검색하였다. 유전자별로 RT-PCR용 primer를 각각 합성하여 분석한 결과 B66-3-1에서 대조구에 비해 발현량이 높은 유전자는 At1g75830, At2g40560 및 At5g38195로 cystein-rich antifungal protein, protein kinase, protease inhibitor와 관련 되었다 (Fig. 22).

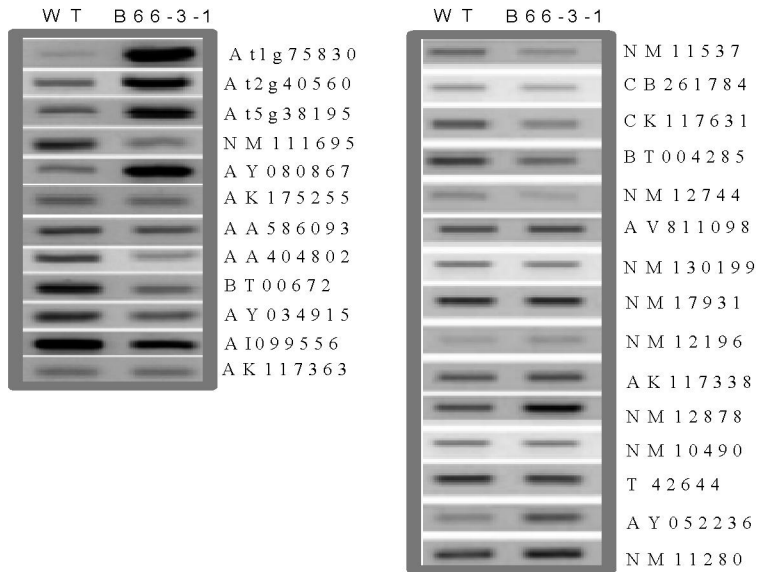


Figure 22. Semi-quantitative RT-PCR analysis of expression levels of candidate genes identified by microarray analysis in the plants from transgenic event line (B66-3-1) and wild type controls. Agilent *Arabidopsis* gene index clone identity numbers are given.

At1g75830; cystein-rich antifungal protein, At2g40560; protein kinase, At5g38195; protease inhibitor.

B66-3-1과 대조식물에서 At1g75830, At2g40560 및 At5g38195 유전자의 발현량을 알기위해 realtime PCR 분석을 수행한 결과 대조식물에 비해 B66-3-1에서 10 배 이상의 발현차이를 보였다 (Fig 23). 따라서 배추 게놈에 BAA1 유전자를 부과하여 발현시킴에 따라 cystein-rich antifungal protein, protein kinase, protease inhibitor 관련 유전자들의 발현에 촉매 역할을 하고 있는 것으로 생각되어 진다.

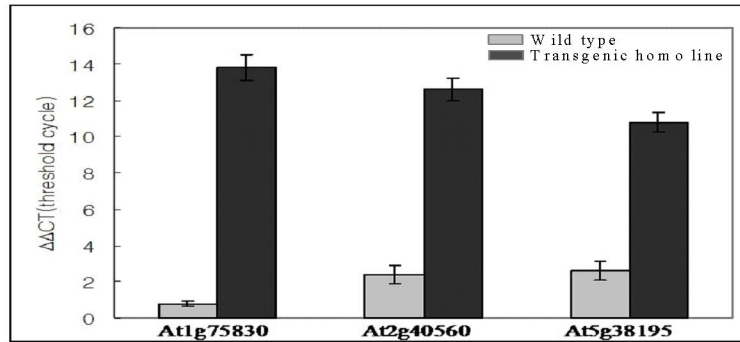


Figure 23. Quantitative RT-PCR analysis of RNA extracted from transgenic event line (B66-3-1) and wild type control. At1g75830, At2g40560 and At5g38195 were showed Agilent *Arabidopsis* gene index reference numbers, encoding cystein-rich antifungal protein, protein kinase and protease inhibitor respectively. CT values were calculated using actin expression level as a control. Error bars show the standard error of the mean for three replicate measurements.

라. 형질전환체 후대계통의 배추 무름병에 대한 저항성 증진 효과

1) 병 저항성 증진 효과

도입한 BAA1유전자를 고정된 계통들 사이에서 발현량이 높고, 표현형에서 대조식물과 유사한 B63-9-1, B64-12-2 및 B66-3-1 계통을 선발하여 병원성 증진 효과를 조사하였다. 배추를 기주로 무름 증상을 유발하는 병원균 (*P. carotovorum* ssp. *carotovorum*)을 배양하여 2×10^4 와 2×10^6 CFU/ml의 농도로 하여 잎에 직접 접종하여 24시간 후의 발병률을 3반복에 걸쳐서 조사하였다 (Fig 24). 균의 농도가 2×10^4 CFU/ml로 접종하였을 경우 대조식물의 잎에서 90%정도 무름증상을 보였다. 또한 2×10^6 CFU/ml에서는 잎의 형태를 구분할 수 없을 정도로 무름증상을 보였다.

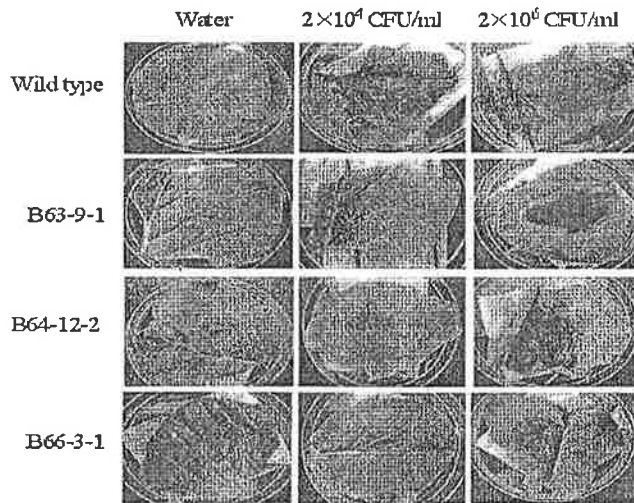


Figure 24. Transgenic plants expressing BAA1 show enhanced resistance to bacterial infection. The development of disease symptoms (tissue maceration) caused by *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* stain was assessed visually and scored as no maceration or maceration.

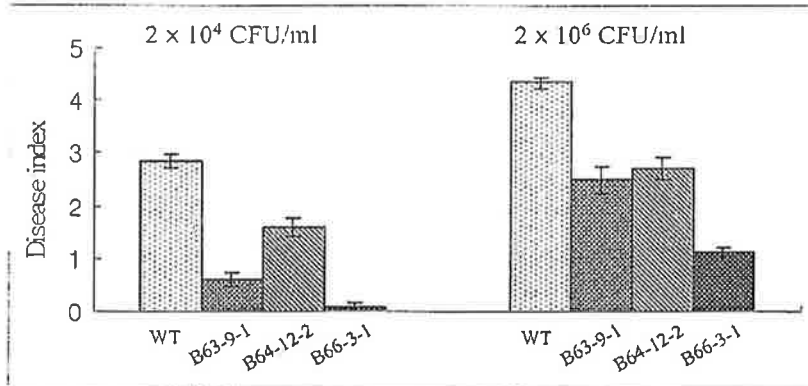


Figure 25. Degree of symptom development of transgenic chinese cabbage seedlings when those wild type controls were inoculated with *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. symptoms were assessed 48hrs after inoculation and plants showing detectable maceration were scored as infected. Bar represents standard error of 5 replicated plants. Disease index: 1; size of symptom 0.1-1cm, 2; 1-2.5cm, 3; 2.5-5cm, 4; 5-10cm, 5; over 10cm or plant died, 0; no symptom.

그러나 B63-9-1과 B64-12-2계통에서는 2×10^4 CFU/ml의 농도에서 접종부위에 약간의 증상을 보였으며 이들 수준이 2×10^6 CFU/ml 농도에서도 유지되었다. 그러나 B66-3-1 계통에서는 2×10^4 CFU/ml의 농도에서 무름증상이 전혀 보이지 않았으며, 2×10^6 CFU/ml 농도에서 접종부위를 중심으로 약간의 무름증상은 보였다 (Fig. 24, Fig 25). 따라서 도입한 BAA1 유전자 산물이 *P. carotovorum*의 증식을 억제하여 B66-3-1에서 무름병에 대한 저항성이 증진된 것으로 생각된다.

2) 병원균 증식 억제 효과

BAA1 유전자 산물이 *P. carotovorum*의 성장을 억제하는 물질인지를 구명하기 위해 BAA1 유전자를 yeast 발현 벡터(YEP352)의 *Sac*I/ *Kpn*I 위치에 삽입하여 *in vitro*에서 발현을 유도하도록 벡터를 구축하였다 (Fig. 26).

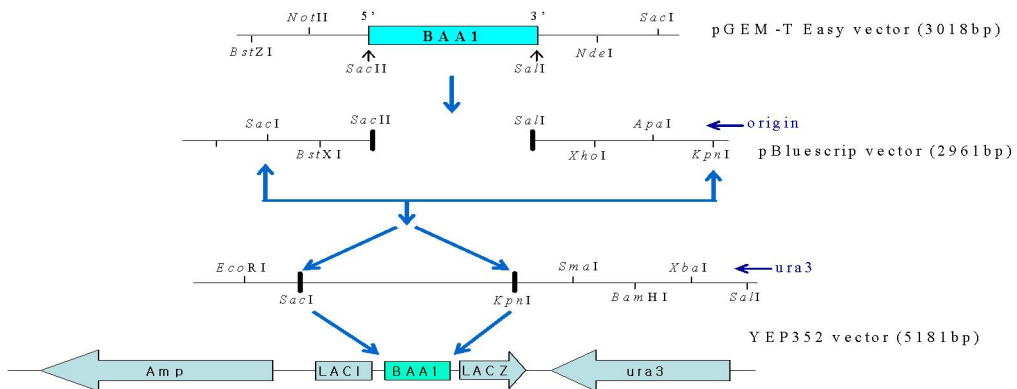


Figure. 26. Construction of yeast expression vector (YEP352) of BAA1 gene. BAA1 gene was constructed in *Sac*I and *Kpn*I site of YEP351 vector.

Yeast에서 생성된 BAA1 산물이 포함된 배지에서 *P. carotovorum*균의 성장 pattern을 시간별로 조사한 결과 배양 4시간 후부터 대조구에 비해 균의 생장이 억제되었다 (Fig. 27). 이들 결과로 살펴 볼 때 BAA1 유전자 산물이 균의 성장에 저해되어 무름병 저항성이 증진된 것으로 생각되어진다.

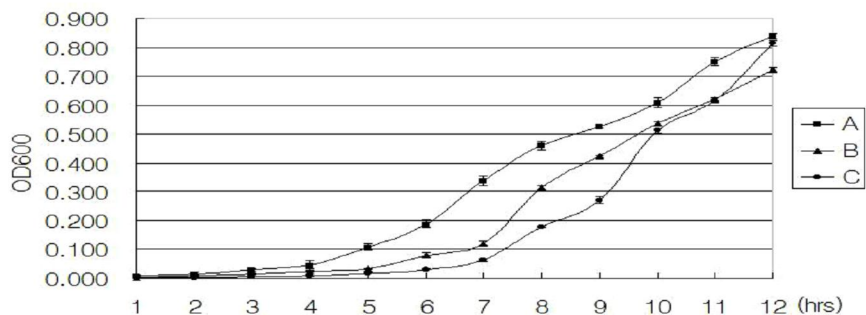


Figure 27. Growth inhibition rate of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* in nutrient broth medium containing extra and inter soluble protein of recombinant (BAA1) yeast cell. A; Nutrient broth medium, B; Nutrient broth medium containing extra soluble protein in yeast recombinant cell, C; Nutrient broth medium containing inter (mediate) soluble protein in yeast recombinant cell.

제 2 절 인체 유래 Cathelicidin 유전자 (LL-37) 도입에 의한 배추의 항균력 증진

1 항 서 론

일반적으로 농작물의 피해는 해충 및 선충에 의한 피해, 식물의 병에 의한 피해, 잡초에 의한 피해 등으로 대변할 수가 있다. 그 중 사람이나 식물체에 발생하는 대부분의 병은 세균 감염에 의한 것으로 특히, 진균 감염에 의해 발생하는 농작물의 피해는 15-20% 정도이며, 병해는 70-80% 정도가 이룬다 (Kang *et al.* 1996; Bark *et al.* 1996). 이들 진균의 병원성을 해결하는데 지금까지 많은 노력을 기울여 왔으며, 사람에서 질병을 일으키는 원인의 대부분이 세균이나 진균이라는 사실과 19세기 중엽 감자 역병 발생에 대한 deBary의 연구에 의해 비로소 식물병이 진균에 의해 유발된다는 것이 입증된 후, 여러 방면으로 항균성 물질에 대한 탐색이 행해지고 있다. 그러나 최근에 화학물질성 약제들을 연속적으로 장기간 사용함으로 인하여 미생물 유래의 항생제에 대한 저항 유전자의 출현되고 있어 (Russell, 1991; Koch, 1981; Ogawara, 1981; Kang *et al.* 1996; Bark *et al.* 1996), 인체와 식물 및 환경에 무해한 새로운 대체 물질의 개발은 필수적이며 특히 최근에는 식물을 소재로 하는 천연물질 유래의 항균제 개발이 관심의 대상이 되고 있다 (Taniguchi and Kubo, 1993; Mitscher *et al.* 1987). 동식물을 비롯한 모든 다세포 생물은 미생물의 침입에 효과적으로 방어하기 위한 자연면역계 (innate immune system)를 진화시켜왔는데, 항균펩티드 (antimicrobial peptide)는 연체동물에서 사람에 이르기까지 널리 분포하여 미생물에 대한 일차적 방어 수단으로 매우 중요한 역할을 담당해왔다 (Brogden *et al.*, 2003; Scott and Hancock, 2000; Yang *et al.*, 2004). 항균펩티드는 미생물을 동물이나 식물로부터 구별 짓는 원핵세포의 막을 표적으로 하여 작용하기 때문에 다양한 그람양성세균과 그람음성 세균, 바이러스, 곰팡이 등 그 항균효과가 넓게 나타나는 것이 특징이다 (Nagaoka *et al.*, 2000; Frohm *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 1997, 2001). 이렇게 미생물에 대한 일차적 방어수단으로 작용할 뿐 아니라 자연면역반응과 적응면역반응 (adaptive immune response)을 조절하는 조절인자로도 작용한다. 나아가 항균펩티

드의 장점은 미생물이 항균 peptide 에 대해 미생물이 내성을 획득하는 빈도가 매우 낮으므로 기존의 항생제를 대체할 수 있다고 하였다 (Turner et al., 1998). 항균성 peptide 는 주로 자연 면역체계에서 사용되는 peptide로서 주로 15-45개의 amino acid 으로 구성되어 있으며 전체적인 전하 (net charge)는 양이온을 띄고 있다 (Boman, 2002). 현재 database에는 동, 식물 및 곤충들을 포함한 여러 종 기원의 800 여개의 peptide가 보고되어 있다 (Yasin et al., 2000; Niyonsaba et al., 2001). 주로 이들은 하나의 전구체로 얻어지며 이들 peptide 들은 박테리아의 세포막에 작용하여 멸균 효과를 보인다고 한다. 인간의 경우는 크게 두 종류의 peptide 들이 존재하는데 defensin (α -defensin과 β -defensin)과 cathelicidin으로부터 유래한 선형의 LL-37 이다 (Heilborn et al., 2003). 임상 연구결과 이들 peptide가 결여되면 치명적인 증상을 보였다 (Boman, 2002). 정상적인 피부에서는 이들 peptide의 양은 매우 소량 존재하지만 염증이 생기면 이들 peptide 들이 증가한다고 하였다 (Zaiou et al., 2003). 그 예를 보면 염증을 유발시키고 LL-37 과 defensin의 발현 정도를 통해 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이들은 보통 *Staphylococcus aureus* 같은 bacteria에 활성을 가진다. LL-37의 작용기전 및 임상학적 결과에 관한 연구 또한 활발히 진행되고 있는데 antimicrobial peptide인 LL-37 과 defensin 등의 멸균력 작용기전에 대하여는 정확히 알려져 있지 않지만 양이온을 띤 이들 peptide들이 음이온을 띤 박테리아에 결합하여 작용한다고 추정되고 있다 (Frohm et al., 1999; Sorensen et al., 1997). 그 외에 이들은 면역 체계에도 작용을 한다고 보고가 되었는데 예를 들면 면역세포들을 소집하여 감염된 곳으로 집합할 수 있도록 면역계를 도와 박테리아를 멸균하는 작업까지 하는 것으로 보고 되었다 (Haynes et al., 1998; Daher et al., 1986). 즉 LL-37은 여러 기능을 하여 멸균작업을 하는 peptide이다 (Tjabringa et al., 2003). LL-37를 adenovirus를 매개체로 하여 mouse airway에 overexpression 시켜 본 결과 *Pseudomonas aeruginosa* 감염이나 LPS를 투여하여도 현저히 감염도가 감소되는 것을 확인하였다 (Bals et al., 1999).

따라서, 본 장에서는 아직까지 미지의 상태로 있는 항균성 펩타이드 LL-37 유전자를 이용하여 형질전환 배추의 육성을 통해 병원균에 저항성이 증진되고 인체에 무해한 식물체를 개발하고자 한다.

2 항 재료 및 방법

가. 항균성 펩타이드 LL-37 유전자의 분리

1) Coding region 합성 및 분리

항균성 펩타이드 LL-37 유전자 (Gene bank accession NM-004345)의 염기배열 정보 (Fig. 1)로부터 primer를 합성하였다 (Table 1). 합성한 primer의 양끝에 제한효소 *EcoRV* 영역을 첨가하여 합성하고 각각의 primer를 이용하여 단편화 하여, 2% agarose gel상에 전기 영동하여 분획한 후, gel로부터 DNA 단편을 회수하였다. 최종적으로 합성한 DNA 단편들 간 PCR 분석을 통해 완전한 full size의 유전자를 증폭하였다 (Fig. 2). PCR 증폭 산물을 pGEM T-Easy vector에 cloning하여 염기배열을 조사하여 확인하였다.

2) *E. coli*에서 fusion protein 유도 및 정제

LL-37 유전자를 *E. coli*에 발현시키기 위해, pET 28 vector의 *EcoRV* site에 LL-37 유전자를 구축하였다. 구축한 발현용 vector를 BL21 cell에 형질전환 하였으며, fusion protein의 유도를 위해 kanamycin 50mg/L가 포함된 LB배지에서 OD₆₀₀= 0.6이 되도록 37°C에서 진탕배양 하였다. 그리고 IPTG 200 μ g/ml의 농도를 첨가하고 같은 조건으로 계속하여 4시간 배양하였다. fusion protein의 정제는 IPTG 유도한 1000ml를 5000 \times g 으로 10분간 원심하여 세포를 수확하고, 용출 buffer (10mM Tris-HCl, NaH₂PO₄, 8M Urea, pH 8.0)로 녹인 후, 실온에서 2시간 방치하였다. 그리고 10000 \times g으로 30분간 원심하여 얻어진 상층을 Ni-NTA agarose에 분주하여 용출시켰다. 비 특이적인 protein을 제거하기 위해 washing buffer (10mM Tris-HCl, NaH₂PO₄, 8M Urea, pH 6.3)를 이용하여 2회 닦아내었으며 최종적으로 fusion protein은 elution buffer (10mM Tris-HCl, NaH₂PO₄, 8M Urea, pH 4.5)에 의해 회수하였다.

```

aagcaaaacccagccacaccctggcagggcagccagggatgggtggatcaggaaggctcc 60
tggttgggcttttgcatacaggctcaggctgggcataaaggaggctcctgtgggctagagg 120
gaggcagacatggggaccatgaagacccaaagggatggccactccctggggcggtgggtca 180
M K T Q R D G H S L G R W S
ctgggtgctcctgctgctggggcctgggtgatgcctctggccatcattgcccaggctcctcagc 240
L V L L L L L G L V M P L A I I A Q V L S
tacaaggaaagctgtgcttctgctctatagatggccatcaaccagcggtcctcggatgctaac 300
Y K E A V L R A I D G I N Q R S S D A N
ctctaccgctcctggacctggaccgccagggcccacgatggatggggaccagacacaccca 360
L Y R L L D L D P R P T M D G D P D T P
aagcctgtgagcttcacagtgaaaggagacagtggtgccccaggacgacacagcagtcacca 420
K P V S F T V K E T V C P R T T Q Q S P
gaggatgtgacttcaagaaggacgggctggtsaagcgggtgatggggacagtgaccctc 480
E D C D F K K D G L V K R C M G T V T L
aaccaggccaggggctcctttgacatcagttgtgataaggataacaagagatttgccttg 540
N Q A R G S F D I S C D K D N K R F A L
ctgggtgatttcttccggaaatctaaagagaagattggcaagagattttaaagaattgtc 600
L G D F F R K S K E K I G K E F K R I V
cagagaaatcaaggattttttgaggaaatcttgtaccaggacagagtcctagtggtgccc 660
Q R I K D F L R N L V P R T E S -
taccctggctcaggcttctgggctctgagaaataaactatgagagcaatttcaaaaaaaaa 720
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 737

```

Figure 1. The Nucleotide and deduced amino acid sequences of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP) from human (*Homo sapiens*) (GeneBank Acc No. NM-004345). C-terminal region is LL-37 coding region (NH'-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES-O OH').

Table 1. Primer sequences used to isolate hCAP18 (human cathelicidin antimicrobial peptide) gene.

| Name of primer | Sequence of primer (5'-3') | Base length |
|----------------|--|-------------|
| LL-A | 5'-CTGCTGGGTGATTTCTTCCGGAAATCTAAAGAGAAGATTGG-3' | 41 |
| LL-B | 5'-TTAAAAGAATTGTCCAGAGAATCAAGGATTTTTTGCGBAATC-3' | 42 |
| LL-C | 5'-CTAGGACTCTGTCTGGGTACAAGATTCCGCAAAAAATCC-3' | 40 |
| LL-D | 5'-CTGGACAATTCTTTTAAACTCTTTGCCAATCTTCTTTTAGA-3' | 42 |
| LL-RV-S | 5'-CCCGATATCATGCTGCTGGGTGATTTCTTC-3' | 30 |
| LL-RV-AS | 5'-CCGGATATCCTAGGACTCTGTCTGGGTAC-3' | 30 |
| Rol-A | 5'-GGAGAGTGTGGTTGTAGGTTCAATTATTACTATTTTTGAAG-3' | 41 |

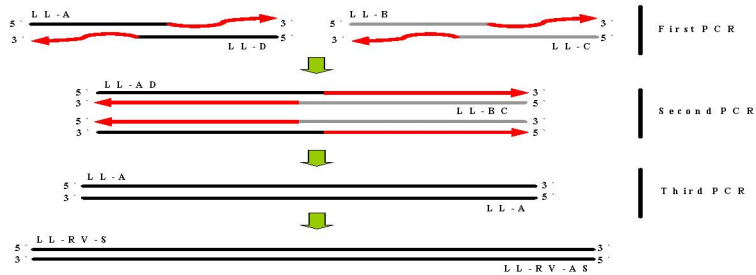


Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) strategies to isolate LL-37 coding sequence.

가) Fusion protein의 확인

IPTG 유도한 cell 및 유도하지 않은 cell로부터 fusion protein을 정제하고 20% acryamide gel을 이용하여 SDS-PAGE한 후, coomassie brilliant blue R250으로 염색하여 단백질의 분획여부를 확인하였다. Western blot 분석을 위해 확인한 단백질을 같은 조건으로 SDS-PAGE한 후, nitrocellulose membrane에 옮겨 TBST (150mM NaCl, 25mM Tris, 0.1% Tween 20 pH 7.5) buffer에 5% non-fat milk을 넣어 실온에서 2시간 동안 처리하였다. 그리고 membrane은 LL-37항체 MAb (Hycult Biotechnology Holland)을 blocking buffer로 1:10으로 희석하여 처리한 후, TBST buffer로 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 그리고 2차 항체로 ELC (Amersham Bioscience) IgG anti mouse을 0.5% nonfat milk-TBST buffer에 넣어 실온에서 2시간동안 처리한 membrane을 x-ray film에 15분 간격으로 반응시켜 band화 하였다.

3) 항균활성 분석

항균성활성은 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) 방법에 의해 측정하였다. 그람 음성균 *E.coli* DH5a 와 그람 양성균 *Bacillus subtilis* KCCM 12248을 영양 배지 (Beef extract 3g, pepton 5g, agar 15g per 1 liter)에 배양하여 얻어진 colony를 PBS buffer에 희석하여 영양배지의 표면에 중층 하였다. 그리고 정제된

항균성 단백질을 멸균한 filter paper에 묻혀 배지 상에 올려놓고 37°C에 하룻밤동안 배양한 후 균의 성장 억제되는 zone의 크기를 측정하였다.

4) 식물발현 vector 구축

항균성 펩타이드 LL-37 유전자가 포함된 pGEM LL-37 plasmid를 *EcoRV*의 제한효소로 소화하여 얻어진 단편을 Ti-plasmid VB2 vector의 *EcoRV* site에 ligation하였다. 따라서 LL-37 유전자는 35S mosaic virus에서 유래한 항시적 발현 promoter에 의해 유전자 발현이 지배되고, 선발 marker로는 hygromycin 저항성을 보이는 HPT유전자이며, 또한 세포 level로 확인 가능한 GFP 유전자 등이 내포되어 있다. 구축한 vector는 LL-37영역의 primer로 염기배열을 조사하여 codon을 확인하였다. 확인된 Ti-plasmid VB2-LL-37 vector를 *Agrobacterium strain* LBA 4404에 전기충격에 의해 형질전환 한 후, 초 저온 냉동고 (-80°C)에 보관하였다.

나. LL-37 유전자의 형질전환체 육성

1) 배축법에 의한 배추 형질전환

LL-37 유전자를 식물체에 도입하여 발현시키기 위한 형질전환체의 육성은 제 1장에서 기술한 식물재료, *Agrobacterium*의 배양 및 형질전환체 육성 방법에 의해 수행하였다.

2) PCR 분석을 통한 형질전환체 확인 및 발현 분석

가) Total DNA 추출

형질전환체의 유·무를 확인하기 위해 유전자가 도입된 식물(T0)의 genomic DNA는 제1장에서와 같이 CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 법을 이용하여 추출하였다.

나) PCR analysis

형질전환 식물체들에서 LL-37 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여 포트에 이

식하기 전 0.5g의 잎을 채취하여 total DNA를 추출하였다. PCR반응은 20ng의 주형 DNA를 이용하였고, 아래와 같이 세 종류의 primer를 합성하여 증폭하였다. HPT primer (forward 5'-GCGTGACCTATTGCATCTCC-3', reverse 5'-TTCTACACAGCCATCGGTCC-3')로 96°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 30cycles 하였으며, 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. 35S primer (forward 5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCG-3', reverse 5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3')로 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles 하였으며, 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. LL-37유전자는 특이적인 primer set (forward Rol-A: 5'-GGAGAGTGTGGTTGTAGGTTCAATTACTATTTTTGAAG-3', Rv LL-RV-AS: 5'-CCGGATATCCTAGGACTCTGTCCTGGGTAC-3')를 합성하여 이용하였다. PCR 반응온도는 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles로 하였으며, 72°C에서 마지막 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 band를 확인하였다.

다) RT-PCR 분석

형질전환체에서 LL-37 유전자 발현정도를 분석하기 위해 엽조직 (0.2g)에서 mRNA를 추출 (Novagen, Inc., Madison, Wis. USA)하였다. RT-PCR을 위하여 mRNA를 reverse transcriptase (Promega, USA)를 cDNA로 전환하였고, LL-37유전자 특이적인 primer set (Fw Rol-A: 5'-GGAGAGTGTGGTTGTAGGTTCAATTACTATTTTTGAAG-3', Rv LL-RV-AS: 5'-CCGGATATCCTAGGACTCTGTCCTGGGTAC-3')를 합성하여 이용하였다. PCR반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 extension을 실시하였다. β -actin primer (forward 5'-ATGGTTGGGATGGGTCAAAA-3', reverse 5'-TCTTTAATGTCACGGACGATT-3')를 이용하여 94°C에서 4분간 pre-denaturation시킨 후 94°C 에서 1분간 denaturation, 58°C 에서 1분간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension 과정을 30cycles로 하였고 72°C에

서 5분간 extension을 실시하였다. 얻어진 증폭 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 band를 확인하였다.

라). Western blot 분석

Western 분석은 LL-37 유전자가 도입되어 발현량이 높은 형질전환체와 대조식물체의 잎으로부터 total 단백질을 추출하여 제 1장에서 기술한 방법에 의해 분석하였다.

다. 형질전환체의 항균력 검정

1) 식물병원세균에 대한 항균능 검정

십자화과 식물에서 세균에 의해 병을 유발하는 검은 썩음병(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 및 무름병 (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*) 병원균은 농촌진흥청 농업과학기술원 식물 병리과로부터 분양받아 사용하였다. 병원세균은 NA (Nutrient agar) 배지에서 1-2일간 배양에서 얻은 세균을 멸균수로 현탁하여 세균 현탁액을 만든 후, 분광광도계를 이용하여 최종농도는 2.5×10^8 CFU/ml에 상응하는 OD₆₀₀ = 0.2이 되도록 조정하였다. 병원균의 농도는 6단계(10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml)로 나누어 5엽기 및 6엽기의 엽신 및 엽맥에 멸균한 플라스틱 피펫팁으로 상처를 준 후, 그 위에 세균현탁액을 올려놓고, 접종 배추 잎을 플라스틱 상자에 넣어 수분이 증발하지 않도록 뚜껑으로 밀폐하여 25°C의 성장상에 방치하였다. 접종한 후 24시간, 48시간, 72시간 후, 병원성의 진전여부를 확인하였다. 마지막으로 각각의 처리구에서 다음과 같은 scale로 점수화 하였다. 각각의 scale로는 0= 병반이 없는 것 (0cm), 1= 병반이 0.1-1cm, 2= 병반이 1-2.5cm, 3= 병반이 2.5-5cm, 4= 병반이 5-10cm, 5= 병반이 10cm이상이거나 심하게 걸려 죽게 되는 것 등으로 점수화 하였다.

2) 식물병원진균에 대한 항균능 검정

본 연구에 사용한 시들음병균 (*Fusarium oxysporum* f. sp.), 탄저병균 (*Colletotrichum higginsianum*) 및 밑둥썩음병균 (*Rhizoctonia solani*)은 농촌진흥청 농업과학기술원 식물 병리과에서 분양 받아 사용하였다. 병원균들은 PDA (Potato Extract 4.0g, Dextrose 20.0g, Agar 15.0g) 배지에서 1-2일간 배양하여 사

레로부터 0.5cm × 0.2cm의 크기로 잘라내어 5엽기 및 6엽기의 잎 표면에 상처 및 무 상처에 각각 올려놓고 플라스틱 박스에 수분이 증발하지 않도록 뚜껑으로 밀폐하여 25°C 성장상에 방치하였다. 접종한 후 7일까지 매일 주입 조직에서의 피사 반응을 관찰하여 병반의 크기를 측정하였다.

3) 인체 병원균의 배양 및 항균능 실험

본 실험에서는 항균 펩타이드 LL-37을 식물 세포에 도입하여 펩타이드의 생성 여부를 Western 분석을 통해 발견하고 있는 형질전환체를 이용하여 항균능 실험을 수행하였다. 본 실험에 이용한 그람 음성 및 그람 양성균은 인체에서 방광염, 신우병, 식중독 등의 염증을 유발하는 대장균 (*E. coli*), 낫도균 유래의 *Bacillus*속 2종 (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*), 식중독 및 피부의 화농성, 중이염 등을 유발하는 *Staphylococcus aureus*(황색 포도상구균), 심내막염이나 폐렴구균을 유발하는 *Senatia marcescens*, 및 염증을 유발하는 *Gelidibacter* sp. 균주 등 총 6 균주를 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 환경대학교 생명공학과 미생물실험실에서 분양받아 NA (Nutrient agar)배지에서 1-2일간 배양하여 에서 얻은 세균을 멸균수로 현탁 하여 세균 현탁액을 만든 후, 분광광도계를 이용하여 최종농도는 2.5×10^8 CFU/ml에 상응하는 OD₆₀₀= 0.2가 되도록 조정하여 사용하였다.

식물 유래의 LL-37 peptide는 형질전환체 및 대조식물체 잎 5g을 멸균수로 3번 세척한 후에 filter paper로 잎 표면에 묻어 있는 여분의 물기를 제거하고, 막자사발을 이용하여 잘 분쇄하였다. 분쇄된 식물조직을 50ml 원심관에 넣어 12000rpm으로 10분간 원심하여 식물체내에 존재하는 peptide를 포함한 즙액을 추출하였다. 단백질의 양은 분광광도계에 의해 측정하였다. LL-37 펩타이드가 포함된 즙액의 단백질 50ug을 1.5ml의 microtube에 옮겨 1×10^4 농도의 병원균를 첨가하여 실온에 4시간 방치하였다. 각각의 병원균의 항균능 실험은 두 가지로 체크하였다. 먼저 병원균과 LL-37 펩타이드가 포함하여 4시간 배양한 것으로부터 50ul을 취해 NA 액체배지 1ml을 첨가하여 9시간 진탕배양한 후, 분광광도계에 OD= 600에서 균의 성장밀도를 측정하였다. 두 번째는 병원균과 LL-37 펩타이드가 포함하여 4시간 배양한 것으로부터 50ul을 취해 NA 액체배지로 1/100 및 1/1000으로 희석하여 NA 고체배지에 도말하여 24시간 후, colony 수에 의해 항균능을 알아보았다.

3 항 결과 및 고찰

가. LL-37 유전자 구조 분석 및 *E.coli* 에서의 발현

1) 유전자의 구조 분석

항균성 펩타이드 LL-37 유전자 (Gene bank accession no. NM- 004345)의 염기배열 정보로부터 primer를 합성하여 3 단계의 PCR 반응을 시킨 결과 114bp의 염기배열을 갖는 LL-37 유전자를 얻었다 (Fig. 3). PCR 증폭 산물을 pGEM T-Easy vector에 cloning하여 염기배열을 조사한 결과 Schmidtchen 등 (2002)이 보고한 염기 및 아미노산 배열이 100% 일치하였다 (Fig. 4). 분리한 LL-37 유전자 내의 아미노산 배열 중 Arg19-Ile20, Arg23-Ile24, Leu31-Val32가 존재 하였으며, 이들 peptide 결합 부위에서 가수분해가 일어나 강한 항균성을 일으킨다고 하였다 (Magdalena et al. 2004).

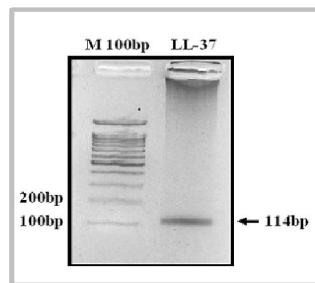


Figure 3. Gel electrophoresis of synthesized LL-37 coding sequence by PCR. Lane M100bp; 100bp ladder DNA size marker (Intron, Korea), Lane LL-37; PCR product.

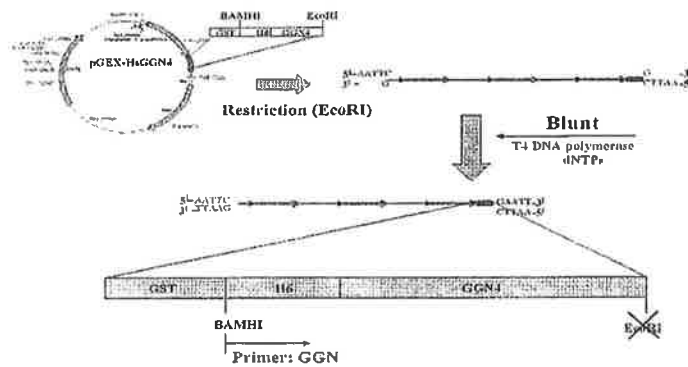


Figure 4. Construction of fusion protein expression vector pET28-GL-37 for expression of antimicrobial peptides GGN4/LL-37 coding region in *E. coli* using pET28 vector.

2) *E. coli*에서 LL-37 유전자의 발현

LL-37 유전자를 *E. coli* 세포에 발현시키기 위해 pET28 vector에 cloning 하여 GST와 fusion 시켜 SDS-PAGE 분석한 결과 IPTG에 의해 유도된 cell에서 8kDa 부근의 band가 나타났다 (Fig. 5). 이들 결과를 미루어 볼 때 생성된 8kDa 단백질은 pET28-LL37에서 생성된 fusion protein이라고 할 수 있다. 따라서 pET28-LL37에서 생산한 단백질을 Ni affinity chromatograph을 이용하여 정제한 후, SDS-PAGE 한 결과 8kDa 및 30kDa 크기를 가진 두개의 band가 나타났다 (Fig. 5). 이중 30kDa 부근의 band는 비 특이적으로 나타난 것으로 간주하고, 예상했던 8kDa의 크기를 가진 band가 목표로 했던 단백질로 *E. coli* 세포내에서 안정적으로 단백질을 생산하고 있다고 할 수 있다.

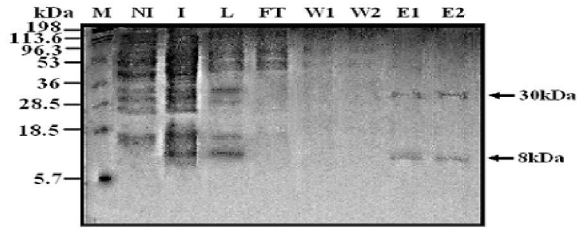


Figure 5. Purification of 6x His-tagged protein GL-37 from *E.coli*. 6x His-tagged lysate of IPTG induced cells (BL21-pET28-GL-37) was purified by Ni-NTA agarose chromatography. M; marker, NI; non induced cells, I; cells induced with IPTG, L; lysate, FT; flow through, W; wash, E-eluates.

3) LL-37 유전자 발현 단백질의 항균활성 검증

E. coli 세포에서 LL-37 단백질이 항균활성을 보이는지를 알기위해 그람 음성 및 그람 양성균을 이용해 항균활성여부를 검토하였다. *E. coli* 세포내에서 정제한 LL-37유래의 fusion protein을 ADD (Agar Disk Diffusion)법을 사용하여 그람 음성균 *E. coli* DH5 α 와 그람 양성균 *Bacillus subtilis*의 성장을 분석한 결과 균 생장이 억제되는 clear zone을 볼 수 있었다 (Fig. 6). 이런 결과로 미루어 볼 때, *in vitro*에서 생산한 LL-37 단백질은 *E. coli* DH5 α 와 *Bacillus subtilis*에 항균 효과가 있었다.

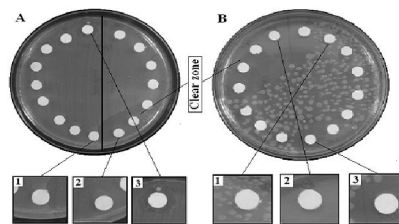


Figure 6. Antimicrobial activity assay of GL-37. A; Test of inhibitory effect of recombinant GL-37 against *E.coli* (DH5 α), B; Test of inhibitory effect of recombinant GL-37 against *Bacillus subtilis*. 1. negative control (1xPBS solution) 2. positive control (ampicillin) 3. antimicrobial fused protein GL-37.

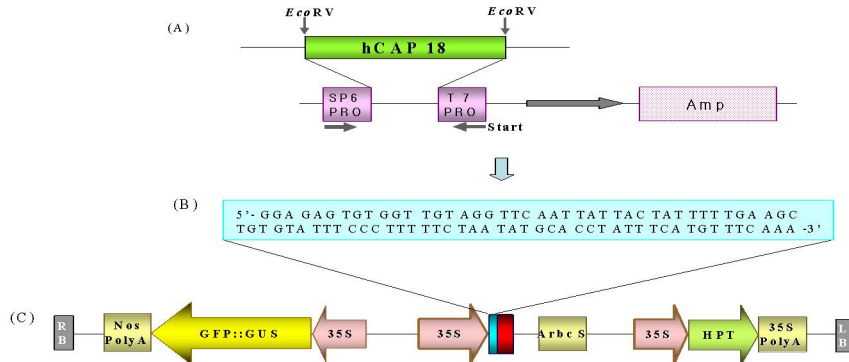


Figure 7. Cloning of the gene hCAP18 under 35S promoter (A); hCAP18 gene was cloned at TA-cloning site of TA cloning vector (Promega) obtained from PCR analysis, (B); Transcription enhance regulator region (TERR) obtained from role gene encoding cytokinin synthesis (Gene Bank Accession No. NM-004345), (C) Ti-plasmid VB2 vector construction.

나. LL-37 유전자의 형질전환체 육성

식물발현 vector VB2에 LL-37 펩타이드가 coding된 유전자를 식물에서 알려진 발현 조절인자와 연결하여 35S promoter의 지배 조건에 안정적으로 발현 가능하도록 구축하였다 (Fig. 7). Ti-plasmid 벡터를 배축법 (Takasaki et al., 1997; Kuginuki et al., 2001)에 의하여 소송체 (*Brassica rapa*)에 도입하였다. *Agrobacterium*을 감염시킨 절편체를 callus 유도배지에서 배양 10일 후부터 callus가 형성되기 시작하였고, 재분화 배지에 2회째의 계대배양 후기부터 callus에서 부정아가 형성되기 시작하였으며 3회 계대배양에서는 많은 multi-shoot가 발생하였다 (Fig. 8A). 이들 작은 싹들은 성숙배지에서 초장이 7-8cm 정도 될 때까지 성장시킨 후, kanamycin 100mg/L이 포함된 MS hormone free 배지로 옮겨 발근을 유도하였다 (Fig. 8B). 발근된 개체는 pot에 옮겨 순화시켰으며, 8-10°C, 40일간 저온처리 후, 개화를 유도하였다. 개화된 개체는 뇌수분하여 자식종자 (T1)를 획득하였다 (Fig. 8C and D).

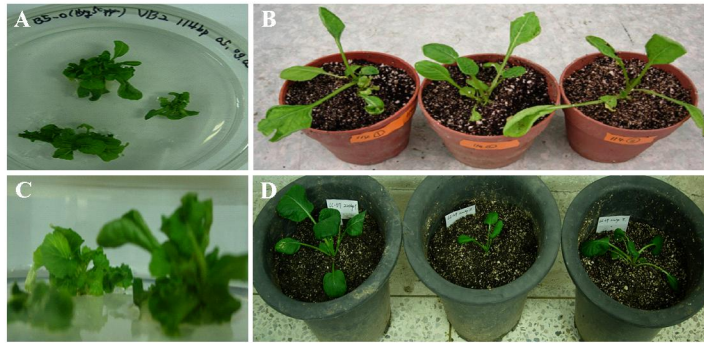


Figure 8. Development of transgenic plant 'Osome' (*Brassica rapa*) with LL-37 gene. A; Multi-shoot differentiation from callus formation, B; Regenerated plants in rooting medium, C and D; Acclimation of transgenic plants.

1) 도입유전자의 확인

형질전환체를 확인하기 위하여 hygromycin 에 저항성을 보이는 T1식물체와 대조 식물체로부터 total DNA를 추출하여 35S promoter 특이 primer set 와 HPT, LL-37유전자 특이 primer set를 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 유전자를 도입하지 않은 대조식물체에서는 35S promoter 영역의 PCR product가 발견되지 않았으나 T1 식물체들에서는 300bp상에 PCR product가 확인되었으며, hygromycin유전자 특이 primer set를 사용하여 PCR 한 결과 형질전환체에서 713bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다. 또한 LL-37 유전자 특이 primer set를 사용하여 PCR을 수행한 결과 220bp상에서 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

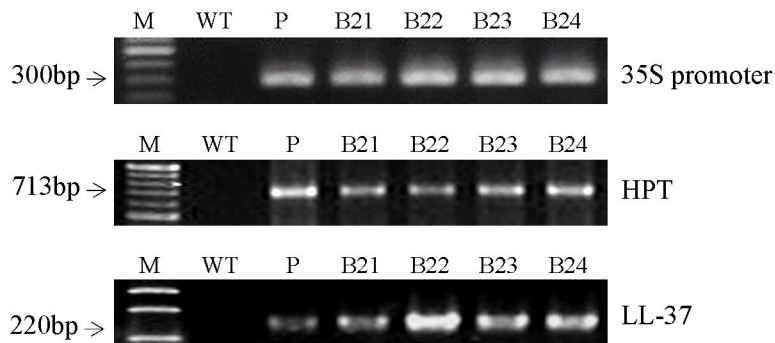


Figure 9. PCR amplification of transferred genes for genes in transgenic chinese cabbage lines. The amplification products of the BAAl were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane WT; wild type plant, Lane P; VB2 vector plasmid that contains the LL-37, Lane B21~B24; PCR products generated from the DNA template of independent transgenic lines.

2) 유전자의 발현 분석

형질전환체에서 LL-37 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 각 계통에서 Total RNA를 추출하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과 형질전환체에서 도입한 LL-37 유전자가 정상적으로 기능을 발휘하여 전사되고 있음을 확인하였다. 형질전환체간에서도 LL-37 유전자의 발현 정도는 거의 비슷한 양상을 보였다 (Fig. 10). 또한 형질전환체를 이용하여 Western blot 분석을 실시한 결과 형질전환체에서는 LL-37 단백질 4kDa 부근에서 band가 검출되었으나 대조식물체에서는 검출되지 않았다 (Fig 11). 따라서 인체유래의 LL-37 유전자가 배추계놈 내에 안정적으로 도입되어 과잉의 mRNA로 전사되어져, 최종적으로 단백질합성과정 및 세포 내로의 저장과정에서 glycosylation이 일어나 펩타이드의 활성을 보인 것으로 생각된다.

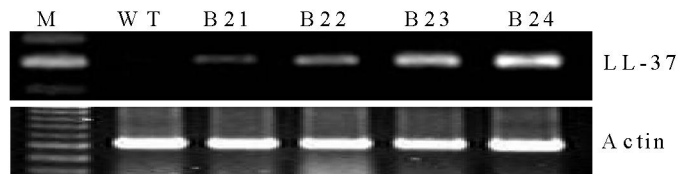


Figure 10. Analysis of LL-37 gene expression in the transgenic chinese cabbage lines by reverse transcription polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from each plant, and 0.5 μ g of this RNA was amplified with LL-37 specific primers. As a loading control, the samples were also amplified with specific primers for the chinese cabbage actin gene. The amplification products of the LL-37 were separated using a 1.5% agarose gel. Lane M; DNA ladder, Lane WT; wild type plant, Lane B21~B24; PCR products

generated from the cDNA template of independent transgenic lines.

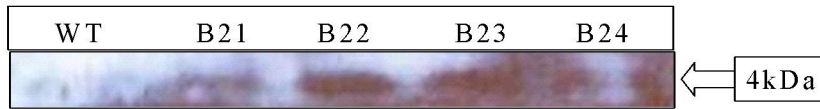


Figure 11. Western blot of transgenic plant Osome (*Brassica rapa*). Plant proteins were transferred to 0.22 micron nitrocellulose membrane, for 2 hours 300mA, membrane was washed by first antibody-human antibody hCAP18/LL-37 (1:10 dilution) and second antibody-ECL rabbit anti-mouse IgG antibody (1:2000 dilution). After reactions, membrane was blotted to X-ray film in dark area. Lane WT: wild type plant, Lane B21~B24: transgenic plants using LL-37 gene.

다. 형질전환 배추에서 항균력 증진 효과

1) 무름병에 대한 저항성 증진 효과

배추에서 세균에 의해 병을 유발하는 무름병균 (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*)을 NA배지에서 1-2일간 배양하여 멸균수로 현탁액을 만든 후, 분광광도계를 이용하여 균의 농도를 10^4 , 10^6 , 10^8 CFU/ml로 3단계로 나누어 조사하였다.

균의 농도를 5엽기의 엽신에 10^6 CFU/ml 및 엽맥에 10^4 CFU/ml으로 하여 동시에 접종하여 24시간, 48시간, 72시간 후, 병 진전여부를 확인한 결과 대조식물에서는 접종 후 12시간부터 조직이 무르기 시작하여 24시간 후에는 육안으로 구분할 수 있을 정도로 병징이 진전 되었다. 그리고 48시간 후에는 병징이 잎 전체로 확산되어 72시간 후에는 식물조직이 완전히 물러 고사하는 양상을 보였다. 그러나 B23계통을 제외한 B21, B22, B24 계통에서는 접종 72시간 후까지 무름증상이 보이지 않았다 (Fig. 12).

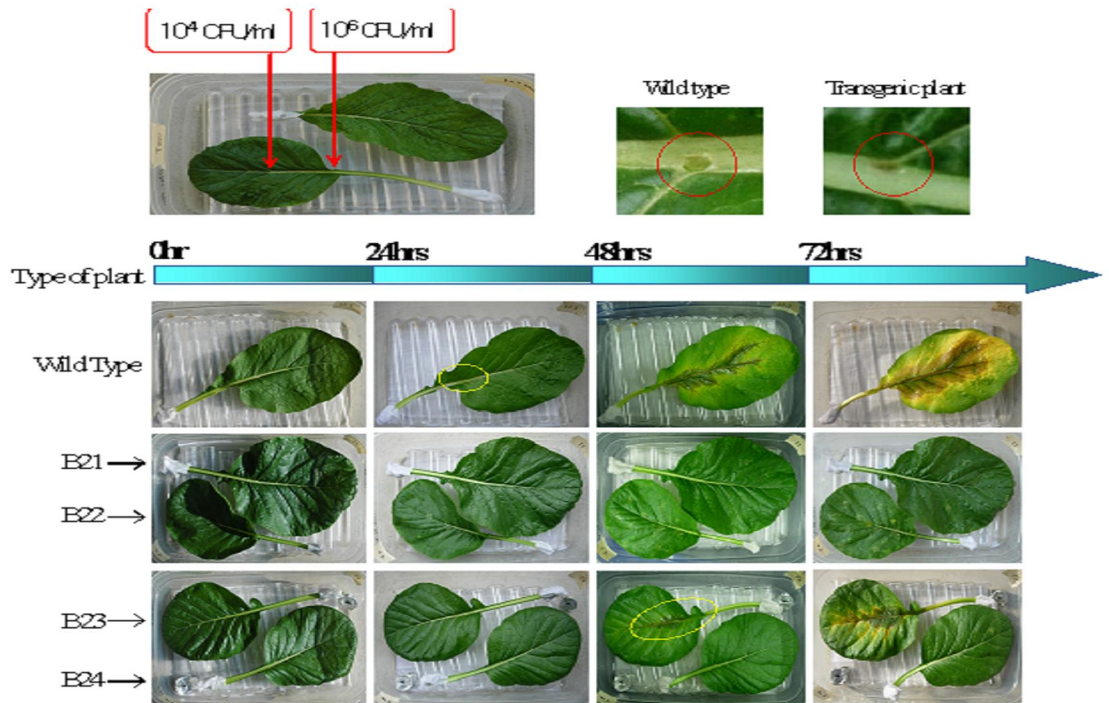


Figure 12. Temporal development of soft rot in chinese cabbage ('Osome') plants when leaves were inoculated with *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. B21-B24; Transgenic lines.

균의 농도를 10^8 CFU/ml으로 접종하였을 경우 대조식물에서는 12시간부터 무름 증상이 보였고, 접종 24시간 후부터 잎의 형태를 구분 할 수 없었다. 그러나 형질 전환 계통들은 접종부위를 중심으로 약간의 무름증상이 보였다 (Fig. 13). 따라서 형질전환 계통과 대조식물에서 확연히 구분될 수 있는 균의 농도는 10^4 및 10^6 으로 통계적 유의성이 있었으며, 접종 후 48시간 정도에서 무름병 저항성을 검정하는 것이 바람직하다고 생각 한다 (Fig. 13).

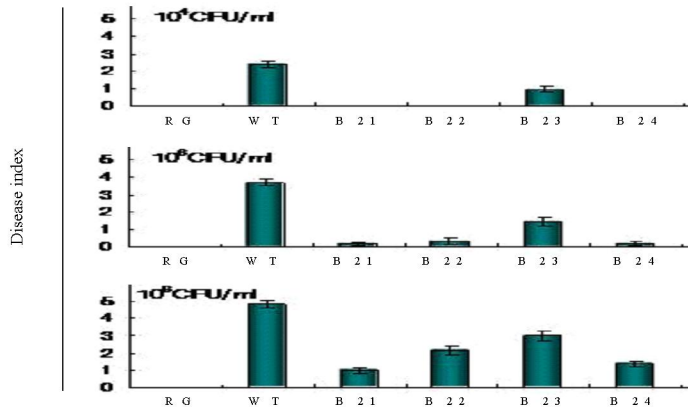


Figure 13. Disease development in LL-37 transgenic chinese cabbage lines which were inoculated with 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU/ml of *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* respectively. Disease scoring was conducted 3 days after inoculation. RG; water, WT; wild type plant, T1~T4 ; LL-37 transgenic lines. Disease index 1; size of symptom 0.1-1cm, 2; 1-2.5cm, 3; 2.5-5cm, 4; 5-10cm, 5; over 10cm or plant died, 0; no symptom.

2) 진균병에 대한 저항성 증진 효과

형질전환 계통들에서 진균병에 대한 저항성 증진효과를 알아보기 위해 시들음병균 (*F. oxysporum*.), 탄저병균 (*C. higginsianum*) 및 밑둥썩음병균 (*R. solani*) 을 잎에 상처 및 무 상처로 접종하였다. *F. oxysporum*에서는 대조식물체에 비해 형질전환 B24 계통을 제외한 B21, B22 및 B23에서 저항성이 증진 효과를 보였다. 특히 B21 계통에서 병반이 다른 형질전환 계통보다도 매우 작은 양상을 보였다. *C. higginsianum*와 *Rhizoctonia solni* 에서는 형질전환 계통들에서 대조식물에 비해 저항성을 보인 반면에 대조식물에서는 접종 6일째 병반이 크게 나타나 괴사되었다 (Table 2, Fig. 14). 이들 결과로 볼 때, 형질전환 계통에서 LL-37 유전자 산물에 의해 진균병을 일으키는 병원균들의 항균활성을 보인 것으로 생각된다.

Table 2. Response of transgenic chinese cabbage plant with LL-37 against several fungal pathogens.

| Type of plant | Lesion size (cm) when inoculated with | | |
|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. | <i>Colletotrichum higginsianum</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> |
| WT | 1.8 | 1.2 | 12.0 |
| B21 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |
| B22 | 0.9 | 0.6 | 3.0 |
| B23 | 0.7 | 0.1 | 6.0 |
| B24 | 1.4 | 0.2 | 0.5 |

WT; Wild type, B21-B24; transgenic lines.

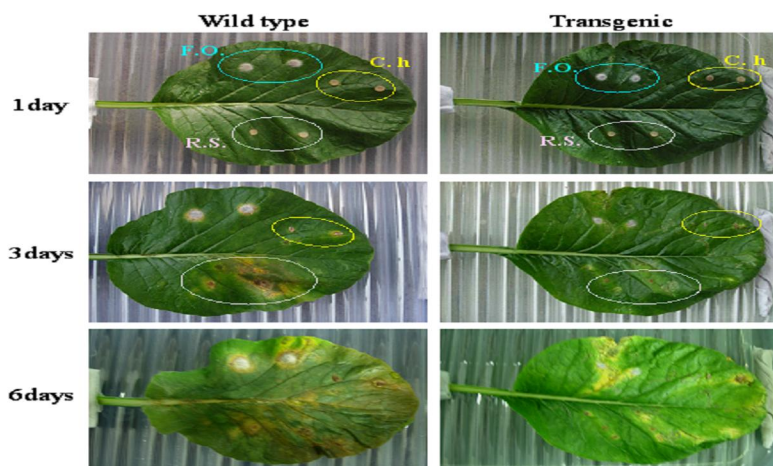


Figure 14. Enhanced disease resistance of transgenic chinese cabbage lines to several fungal pathogens, F.O.; *Fusarium oxysporum*, C.h.; *Colletotrichum higginsianum*, R.S.; *Rhizoctonia solani*. Disease assessed until 6 days after inoculation.

Table 3. Antifungal activity of recombinant fusion protein LL-37 produced in *E. coli* against several fungal pathogens.

| Tested fungal pathogen | Inhibition of fungal growth |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. | - |
| <i>Colletotrichum higginsianum</i> | + |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | ++ |

* Inhibition of fungal growth was determined as described by Yun et al. (1996). About 50 μ g of antimicrobial peptide (LL-37) extracted from *E. coli* and diluted in 100 μ l distilled water was used for determination of antifungal activity. The relative antifungal ratings were: +++, high inhibition (no hyphal growth on disk); ++, slight inhibition surrounding the disk; +, just detectable inhibition; -, no visible inhibition.

또한 진균 병원균에 대한 항균활성 분석은 *E. coli*에 발현시켜 얻어진 fusion protein을 이용하여 항균활성을 분석한 결과 식물체에 직접 접종한 실험결과와 일치함을 보였다 (Table 3). 이상의 결과로부터 LL-37은 원핵 세포막을 표적으로 작용하여 그람양성과 그람음성 세균, 바이러스, 곰팡이 등 그 항균효과가 넓게 나타난다는 Schmidtchen 등(2002)의 보고와 일치하였다.

3) 인체병원균의 항균효과

본 실험에서는 항균 펩타이드 LL-37을 발현하는 형질전환체 이용하여 인체에 해가 되는 병원균 6종을 대상으로 항균능 실험을 수행하였다. 식물 유래의 LL-37 peptide는 형질전환체 및 대조식물체 및 유래 내분비물을 이용하여 병원균의 항균능 실험은 두가지로 체크하였다. 먼저 병원균과 LL-37 펩타이드가 포함되어 4시간 배양한 것으로부터 50ul을 취해 NA 액체배지 1ml을 첨가하여 9시간 진탕배양한 후, 분광광도계에 OD=600에서 균의 성장밀도를 측정된 결과 *Bicillus*속 2균주를 제외하고 균의 생장에 제해를 보였다(Fig. 15).

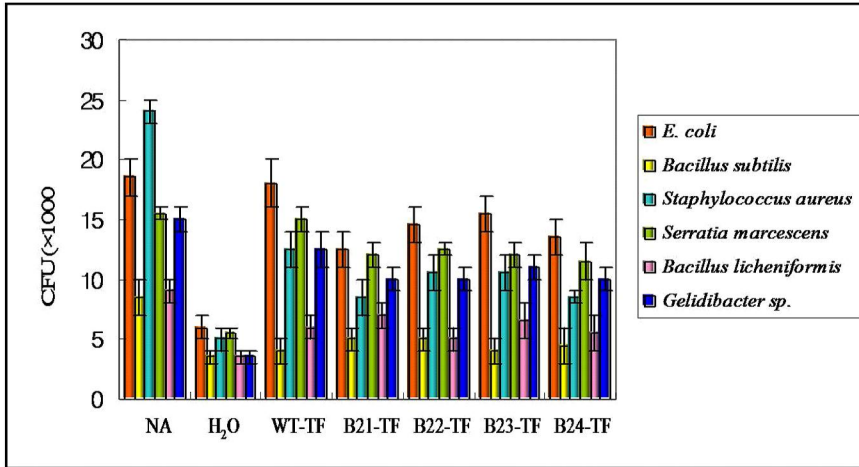


Figure 15. Effects of total (TF) fluid from the LL-37 expressing lines on A, B, C, D, E, F, TF from wild type and transgenic plants, sterile distilled water(H₂O) and NB were used as controls.

The initial bacterial concentration was 10⁴CFU/ml, and there were three replications per treatment.

두 번째 실험에서는 병원균과 LL-37 펩타이드가 포함되어 4시간 배양한 것으로부터 50ul을 취해 NA 액체배지로 1/100 및 1/1000으로 희석하여 NA 고체배지에 도말하여 24시간 후, colony 수를 측정한 결과 첫 번째 실험과 유사한 결과로 나타났다 (Fig. 15). 이는 식물에서 생산한 내분비물속에 LL-37 peptide가 존재하여 균의 사멸을 초래하고 배양하는 과정에서 균의 밀도에 많은 영향을 준 것으로 생각된다. 결과적으로 볼 때 식물체에서 생산한 LL-37 펩타이드는 인체유래의 주요 병원균에 항균능을 보인다고 할 수 있다. 이런 결과는 E. coli에 과 발현시켜 순수하게 분리하여 항균활성을 본 실험에서도 같은 결과를 초래하였다(Table 4).

Table 4. Antibacterial activity of recombinant LL-37

| Tested bacterial pathogen | Inhibition of bacterial growth |
|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | +++ |
| <i>Bacillus subtilis</i> | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + |
| <i>Serratia marcescens</i> | ++ |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | - |
| <i>Gelidibacter</i> sp. | ++ |

* Inhibition of bacterial growth was determined as described by Alan et al. (2004). About 30 μ g of recombinant LL-37 in 100 μ l distilled was used for determination of antibacterial activity. The relative antibacterial ratings were: +++, high inhibition; ++, slight inhibition; +, just detectable inhibition; -, no visible inhibition.

따라서 항균효과가 탁월한 인체유래 LL-37 펩타이드를 이용하여 많은 작물에 활용한다면, 병원균에 강력한 항균활성을 가지며 인체에 무해한 식물체를 개발하여 인체의 유해성, 토질오염 및 환경오염을 피할 수 있는 대체물질로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3 절 형질전환 배추의 사료내 첨가가 육계의 생산 성적에 미치는 영향

1 항 서론

브로멜라인은 파인애플에서 유래된 효소로서 근섬유나 콜라겐(collagen)과 같은 단백질을 가수분해하는 효소의 일종으로서 주로 소화효소제나 항염증 작용제 및 통증완화제로서 사용되어 왔다. 브로멜라인은 Cysteine protease이 주성분이며 미량의 peroxidase, acid phosphatase, protease inhibitors, amylase and cellulase, calcium포함되어 있으며(Pike R.N., D. Bagarozzi Jr. and J. Travis. 1997). protease나 Peptidases와 같은 가수분해 효소이다. 브로멜라인은 papain이나 다른 protease와 마찬가지로 단백질을 분해시키기 물 분자가 사용되므로 가수분해 효소로 분류한다.

현재까지 알려진 Bromelain의 주요용도는 육류연화제나 소화제의 원료, 염증 치료를 위한 항생제의 보조제, 고지혈증 치료제, 세포내 신호경로에 의하여 매개되는 질병과 증상의 치료제, 상처 치유 과정 중에 사용되는 보조 요법제, 퇴행성 신경 장애 치료제, 고리형 뉴클레오티드 경로에 의하여 매개되는 질병의 치료제등 그 용도가 매우 다양하다.

브로멜라인의 약리적인 작용과 특징을 보면 흡수된 효소가 직접 또는 섬유소 용해 효소계 등을 개제시켜 간접적으로 염증의 산물인 피브린과 변성단백질을 분해 제거하고, 염증을 유발하는 기인성 폴리펩타이드, 브리디키닌 등을 분해하며, 염증산물로 저해된 국소순환을 개선하는 효과가 있다. 또한 부작용이 없는 천연 식물효소라는 점 때문에 의약품 분야에서는 관절염이나 류마치스 치료제 및 소화제의 원료로서 광범위하게 사용되어 왔고 식품분야에서도 육류연화제나 기타 첨가물로서 사용되어 왔다.

최근에는 축산 수의약품 분야에서도 소염작용과 우유 중의 체세포수를 줄이는

목적으로 사용량이 꾸준히 증가하고 있지만 아직 경제성에 대한 검토가 미흡하고 사용효과 차원에서도 급여수준과 사용방법에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 또한 브로멜라인은 정제과정과 역가(순도)에 따라 사용분야와 용도가 달라지고 원료 가격도 차이가 큰데, 축산사료분야의 입장에서 보면 고도 정제방법을 통해 생산된 값비싼 브로멜라인 보다는 다소 역가가 떨어지더라도 생산비가 저렴하고 사료의 형태로서 급여할 수 있는 방식이 훨씬 경제적인 것이다.

따라서 본 연구에서는 유전자재조합 기술을 이용하여 브로멜라인 생성 사료작물을 개발하여 사료형태로서 가축에 급여할 수 있는 방안을 제시하고자 하며 그 방안 중의 하나로서 유전자 재조합이 용이한 배추를 이용하여 브로멜라인 생성 여부를 확인하였고 이를 가축에 급여하여 생산성에 미치는 영향을 조사하였다.

2 항 연구수행 방법

가. 시험사료

시험사료로는 옥수수과 대두박(corn-soy diet)을 위주로 하여 제조된 시판용 배합사료를 이용하였으며, 사육초기(1week이내), 사육전기(2-3weeks), 사육후기(4-5weeks)사료의 조단백질 함량은 각각 22%, 20%와 19%이며, 에너지 수준은 각각 3,200kcal/kg, 3,100kcal/kg, 3,000kcal/kg 이었다.

나. 시험동물 및 사양관리

본 실험에서는 육용종계장에서 부화된 브로일라(Avaica 품종)1일령 병아리 암·수 300수를 공시하였고 5처리 4반복으로 처리구의 pen별 평균 개시체중이 비슷하도록 15수씩 배치하여 2006년 4월 7일부터 5월 12일까지 5주간 실시하였다. 5주 동안 사양실험 기간 중 실험 개시 후 1주간은 초기사료를 급여하였고, 3주간은 육계 전기사료를 급여하였고, 마지막 2주간에는 육계 후기 사료를 급여하였다. 육추실은 콘크리트 바닥으로 된 평사이며, 공시 병아리는 플라스틱 망에 pen 별로

구획을 나누어 병아리들을 수용하였으며, 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 하고, 점등 방법은 24시간 연속 점등을 실시하였다.

다. 시료의 준비 및 시험설계

본 실험에는 Transgenic cabbage 사용효과를 비교하기 위하여 Bromelain과 RE를 처리구에 배치하였다. Bromelain은 식품 원료용으로서 역가는 600CDU/mg 였고, RE처리구는 소엽과 향균작용이 있는 것으로 알려져 있는 희토(rear earth)가 10%로 함유된 사료첨가제 제품을 사용하였다. Transgenic cabbage처리구는 Seoul품종과 Osome품종을 경기도 평택시 안중읍에 소재한 비닐하우스에서 2005년 5월에 파종하여 10월에 수확하였고 이를 온도가 40-50°C로 유지된 건조장에서 강제 열풍방식으로 약 1주일간 건조하였다. 건조된 Transgenic cabbage는 잎과 줄기를 분리하지 않고 모두 분쇄하여 Bromelain함량을 분석하였고 이때 Bromelain 함은 Table1.과 같다.

Table1. Bromelain content of Transgenic cabbage

| Item | Bromelain(CDU/kg) |
|------------------|-------------------|
| Control (Seoul) | 0 |
| Transgenic Seoul | 214,000±6,280 |
| Control(Osome) | 0 |
| Transgenic Osome | 276,000±7,400 |

본 실험에서 처리한 Bromelain함량의 결정은 현실적으로 사료첨가가 가능한 Transgenic cabbage 첨가수준을 정한 다음 Transgenic cabbage 에 함유된 Bromelain 함량과 동일한 수준으로 첨가하였다. 이때 처리구의 Bromelain 함량은 100,000cdu/kg수준이었고 처리방법은 Table2와 같다.

Table 2. Experimental design

| Treatments | 첨가수준(%, DM) | Bromelain함량 (CDU/kg/feed) |
|------------------|-------------|------------------------------|
| Control | – | – |
| RE-100 | 0.05 | – |
| Bromelain | – | 540 |
| Seoul Transgenic | 0.20% | 536 |
| Osome Transgenic | 0.25% | 552 |

라. 조사항목

1) 증체량 (body weight gain; BWG)

시험 개시체중은 1일령 병아리를 pen 별로 총 체중을 측정하여 pen 별 병아리 수로 나누어 평균 개시체중으로 하였고, 사육 후 사육초기 체중 (1 week), 전기체중(2-3weeks)과 사육후기체중(3-5weeks)으로 나누어 개체별로 측정하여 사육후기체중에서 개시 또는 사육초기, 전기체중과 비교하여 증체량을 측정하였다.

2) 사료 요구율(feed conversion ratio; FCR)

사료 요구율(FCR)은 평균 사료 섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였다.

3) 체중에 대한 간 및 복강지방 비율과 소장길이

실험 종료시 각 처리구에서 체중이 비슷한 육계를 pen별로 2수씩 선발하여 소장길이,, 복강 내 지방과 간 무게를 측정하고 생체 중에 대한 비율로 계산하였다.

4) 혈청 중 콜레스테롤 및 중성지방 함량

사양시험이 종료한 후에 12시간 절식 시킨 후, 6수씩 체중이 비슷한 개체를 처리구별로 선발하여 혈액을 채취 후 분석에 이용하였다.

혈액분석은 아산제약주식회사에서 생산한 Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 측정용 시액을 사용하여 함량을 측정하였다. LDL-cholesterol은 직접 측정하지 않고 {LDL-cholesterol= Total cholesterol -HDL-cholesterol-(0.2×Triglyceride)}(Folch 등 1957)의 계산법으로 산출하였다.

5) 통계분석

본 실험에서 얻어진 모든 데이터는 SPSS Program(2002)을 이용하여 분산분석 하였으며, 유의성 검정시 처리구간의 통계적인 차이는 LSD 검정법을 이용하였으며, 신뢰수준은 95%수준 (P<0.05)으로 하였다.

3 항 결과 및 고찰

본 실험은 유전자 재조합방법에 의해 생산된 Bromelain을 생성Transgenic cabbage가 육계의 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다.

시험설계에 따라 Transgenic cabbage 및 Bromelain, 희토(稀土)처리구를 통해 육계의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향을 Table 3, 4에 나타내었고 육계의 체조성과 장기에 미치는 영향과 혈중 cholesterol의 변화는 Table 5, 6에 나타내었다.

Table 3. Effect of dietary supplementation of Bromelain and RE on weight gain of broiler chicks

| Age (week) | Control | Treatments | | | |
|------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | | RE | Bromelain | Seoul Transgenic | Osome Transgenic |
| 0-1 | 125.34±3.77 | 132.75±2.41 | 122.01±0.87 | 125.00±6.33 | 125.54±3.72 |
| 2-3 | 744.77±12.57 | 739.98±15.27 | 770.24±3.51 | 774.18±7.85 | 736.54±9.30 |
| 4-5 | 1200.24±23.90 ^b | 1315.67±8.83 ^a | 1249.86±8.96 ^b | 1249.86±8.96 ^b | 1244.05±8.46 ^b |
| 0-5 | 2070.35±35.04 ^c | 2188.41±12.78 ^a | 2104.13±21.23 ^{bc} | 2149.04±20.54 ^{ab} | 2106.13±4.28 ^{bc} |

Values are means±SE

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^{a,b,c} Values with no common letters are significantly different between RE supplemental level (P<0.05).

Table 4. Effect of dietary supplementation of Bromelain and RE on Feed conversion ratio (FCR) by broiler chicks

| Age (week) | Control | Treatments | | | |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | RE | Bromelain | Seoul Transgenic | Osome Transgenic |
| 0-1 | 1.169±0.042 | 1.079±0.043 | 1.203±0.057 | 1.143±0.098 | 1.144±0.080 |
| 2-3 | 1.369±0.007 | 1.341±0.018 | 1.363±0.027 | 1.373±0.018 | 1.463±0.077 |
| 4-5 | 1.766±0.032 ^a | 1.626±0.028 ^b | 1.848±0.055 ^a | 1.744±0.037 ^{ab} | 1.737±0.032 ^{ab} |
| 0-5 | 1.609±0.017 ^a | 1.501±0.018 ^b | 1.637±0.021 ^a | 1.588±0.034 ^a | 1.615±0.015 ^a |

Values are means±SE, Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^{a,b} Values with no common letters are significantly different between RE supplemental level (P<0.05).

Table 5. Effect of dietary supplementation of Bromelain and RE on carcass characteristics by broiler chicks

| Treatments | Abdominal fat/ body weight (%) | Liver/body weight (%) | Small Intestine (cm) |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Control | 1.881±0.131 ^a | 1.814±0.059 | 160.19±3.78 |
| RE | 1.314±0.081 ^b | 1.806±0.063 | 162.94±5.45 |
| Bromlain | 1.745±0.118 ^a | 1.689±0.026 | 159.00±2.77 |
| Seoul Transgenic | 1.751±0.103 ^a | 1.739±0.040 | 159.75±3.01 |
| Osome Transgenic | 1.773±0.110 ^a | 1.841±0.046 | 154.88±2.98 |

Values are means±SE, Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^{a,b} Values with no common letters are significantly different between RE supplemental level(P<0.05).

Table 6. Effect of dietary supplementation of Bromelain and RE on total cholesterol, the ratios of HDL-cholesterol to, the ratios LDL-cholesterol, triglyceride in the serum of broiler chicks.

| Treatments | Total cholesterol(mg/dl) | HDL/Total (%) | LDL/Total (%) | Triglyceride |
|---------------------|-----------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Control | 148.41±14.37 | 50.43±6.00 | 44.07±6.17 | 39.25±2.52 |
| RE | 137.25±9.70 | 53.76±4.21 | 39.79±4.42 | 42.86±2.35 |
| Bromlain | 144.58±12.24 | 53.04±4.37 | 41.44±4.78 | 38.25±2.25 |
| Seoul Transgenic | 140.86±12.60 | 53.69±5.09 | 40.70±5.18 | 38.50±2.57 |
| Osome Transgenic | 140.55±8.72 | 51.89±3.57 | 41.73±3.47 | 43.63±1.91 |

Values are means±SE

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

총 5주간에 걸친 육계의 성장 반응에서 Seoul Transgenic cabbage가 대조구에 비해 증체량이 3.8% 높아졌다. 그러나 Osome Transgenic cabbage 및 Bromelain처리구는 육계의 성장률이나 사료효율에 영향을 미치지 못했다. 하지만 회토 처리구는 대조구에 비해 각각 성장률은 5.7%, 사료효율은 6.7% 높은 결과를 보였다. 복강지방의 비율에 미치는 영향은 대조구에 비해 Seoul Transgenic cabbage 및 Osome Transgenic cabbage와 Bromelain 처리구에서 다소 감소하는 경향은 보였지만 유의차는 없었고, 회토 처리구에서는 대조구에 비해 약 30%정도 감소효과를 보였다. 간의 무게는 Bromelain처리구가 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의차는 없었고 소장 길이도 Osome Transgenic처리구가 대조구에 비해 짧아지는 경향을 보였지만 통계적인 유의차는 없었다. 혈중 cholesterol함량은 대조구에 비해 처리구 모두 HDL-cholesterol은 증가하고 LDL-cholesterol은 감소하는 경향을 보였지만 통계적인 유의차는 발견되지 않았다.

이상의 결과에서 브로멜라인 함유 배추를 사료첨가제로 이용함으로써 사료의 효율을 높여주고 성장률을 높이는 것을 알 수 있었다. 이것은 형질전환 배추에 함유된 브로멜라인 성분이 근섬유나 콜라겐(collagen)과 같은 단백질을 가수분해하여 소화를 촉진 시키는 것으로 생각된다. 또한 브로멜라인의 항염증 및 통증완화작용으로 육계의 스트레스 감소 효과가 있을 것으로 사료된다.

4 항. Bromelain을 이용한 사료첨가제의 효능과 안정성, 경제성 평가 검토

축산 수의약품분야에서는 아직까지 활용도가 높은 편은 아니지만 유방염 치료제나 소화제의 원료로서 일부 사용되고 있으며 항생제에 비해 잔류 문제로 인한 유해성과 약제 내성의 우려가 없고, 아연(Zn)과 같은 무기물에 비해 흡수율이 높아 환경오염의 우려가 없다는 점 때문에 꾸준히 사용량이 증가하고 있다. 그러나 이와 같은 Bromelain은 대단히 높은 가격일 뿐만 아니라 전량 수입에 의존해야하는 원료이며 기존의 항생제나 무기물 제품에 비해 안정성은 높지만 효과에 대한 검증이나 경제적인 사용량 및 사용지침 등 앞

으로 많은 연구가 이루어져야 한다.

그러나 최근에는 식품이나 축산물의 안정성에 대한 관심이 그 어느 때 보다 높고 친환경축산과 안전한 축산물 생산을 통해 경쟁력 강화하는 것이 현재의 축산산업의 경향임을 고려하면 앞으로 활용도는 점차 높아질 것으로 생각된다.

1) 유방염 치료 및 예방을 위한 Bromelain의 활용

낙농산업에서 가장 큰 손실은 유방염으로 인한 손실이다. 우유 생산량이 증가함에 따라 유방염도 증가하는데 유방염에 감염된 젖소는 우유량 생산량이 5-30%정도가 감소되고 유방염으로 인한 손실은 전체 손실의 65-70% 정도에 달한다. 또한 유방염의 감염은 항생제를 처방함으로써 폐기해야 하는 우유 손실 외에도 감염으로 인한 조산, 노동력 증가, 우유의 검사 비용, 유방염 예방을 위한 수의약품의 사용등 부가적인 손실이 발생한다.

그러나 유방염 치료를 위한 과도한 항생제와 화학제의 사용은 식품의 안전과 건강을 위협할 뿐만 아니라 항생제의 계속적 사용은 오히려 약제내성균의 발달을 확산시키고 결국은 더 강력한 항생제를 개발해야 하는 악순환을 유발할 수 있다.

따라서 항생제를 대체할 수 있는 천연 요법제의 활용과 개발에 대한 많은 연구가 이루어져하며 브로멜라인의 활용이 대체 방안으로서 관심을 끌고 있다.

파인애플 줄기에서 분리된 브로멜라인은 천연물질로서 젖소의 유선조직을 미생물부터 감염을 예방하고 유방염 치료에 사용하는 항생제의 양을 최소화하거나 대체하므로써 내성균을 확산을 방지하는데 도움을 줄 수 있다.(Paape,M,J., Oostveldt,K.V and Meyer,E.1999). 또한 체세포 수가 높은 우유를 생산하는 젖소에 급여할 경우 체세포수를 감소시켜 우유의 품질을 높이므로써 농가에 실질적인 도움을 줄 수 있다.

(2) 항생제 대체 효과 및 소화효소제로서 Bromelain의 활용

동물은 체내에서 소화 과정 중에 효소가 분비되는데(Pond, Church, and Pond, 1995), 원료를 삶거나(Sunde, 1973), 발효(Oldfield, 1973) 펠렛(Slinger, 1973) 등과 같은 다양한 물리적 화학적 방법을 통하여 가공함으

로 인해서 사료의 영양 이용률을 높일 수 있지만 과도한 가공은 오히려 사료 품질이나 영양소 함량, 영양소 이용율을 감소시킨다(Morrison, 1951; Sunde, 1973). 따라서 외부로부터 사료에 효소를 첨가하는 것은 기호성 증진과 사료효율을 증진시키고 폐사율을 감소시키며 부적절한 원료에서 발생한 독성을 어느 정도 감소시키는 효과가 있다. 또한 축분의 냄새를 감소되고 축분을 비료화된 할 때도 품질에 영향을 준다.(Nielsen, et al., 1991).

사료에 효소제의 첨가는 사료의 소화율과 기호성을 향상되는데, (Bedford, 1995) 자돈사료에 효소제로서 브로멜라인을 첨가한 실험에서 250mg/day의 급여한 시험구에서 좋은 효과를 보였다. 이때 casein을 분해하기 위한 비율은 bromelain: casein의 1:500였다.

소화제 역할로서 브로멜라인은 미생물이나 곰팡이를 이용하여 생산된 효소제에 비해 그 효과가 우수한 것으로 알려져 있는데(Gallagher, Kanekanian, and Evans, 1994). 브로멜라인은 스스로는 생체 내에서 변화되지 않고 화학적 반응을 촉진시키는 촉매 역할을 한다(Budaveri, 1996). 일반적인 단백질 분해효소와 마찬가지로 브로멜라인도 동물이나 식물조직의 단백질을 소화가 용이한 더 작은 입자의 펩타이드로 분해한다.(Fennema, 1996). 특히 동물실험에서는 브로멜라인이 소장에서 약 40% 정도가 화학적인 변화 없이 흡수되어 항부종(anti-edema) 항 소염작용(anti-inflammatory), 응고억제효과(coagulation-inhibiting effects)를 가지는 것으로 알려져 있다(Lotz-Winter H. 1990)

또한 단백질을 분해시키는 효과가 있으며 의학적으로는 항염작용제와 약품의 사용효과를 높이는 보조제로도 사용되며(Jayaran, Ahluwalia, and Cooney, 1991). 자돈에서는 E. coli에 의한 설사를 방지하는데도 효과가 있는 것으로 보고되었다(Mynott, Luke, and Chandler, 1996; Chandler and Mynott, 1998)

브로멜라인은 혈청내의 fibrinolytic activity를 향상시키고 피브리노겐 합성이 억제되며(Lotz-Winter, 1990). 악성세포의 성장을 억제시키고(Taussig and Batkin, 1988; Lotz-Winter, 1990)종양으로 인한 부종의 생성이 억제되거나 방해되는 것으로 보고되고 있다(Lotz-Winter, 1990). 또한 자돈에서 브로멜라인을 경구 급여할 경우에는 소장에 부착되어 증식하는 E coli에 의한 내생 독소성 설사를 방지하는 효과가 있다(Mynott, Luke, and

Chandler, 1996).

따라서 동물사료로서 파인애플 부산물이나 껍질과 같은 품질이 우수한 식물성 원료를 사료원료로 사용할 경우에는 저질 사료의 이용률을 높일 수 있을 뿐만 아니라(Morrison, 1951), 소화 효소제를 대체할 수 있으며 축산 분야에서 브로멜라인의 활용은 항생제나 화학제를 대체할 수 있는 유기축산물 생산을 위한 방안이 될 수 있다(Aiello, 1998).

(3) 가축에 대한 Bromelain의 안정성

브로멜라인은 쥐나 토끼를 이용한 실험에 따라 급성독성은 거의 없는 것으로 보고되었고(Lotz-Winter, 1989), 쥐와 토끼를 이용한 LD50 실험에서도 브로멜라인은 무독성인 것으로 보고되었다. 또한 브로멜라인은 대부분의 연구결과 항암작용(Taussig and Batkin, 1988; Lotz-Winter, 1990)과 같은 효용성을 보고하였다.

브로멜라인은 단백질의 분해를 촉진시켜 이용효율을 향상시키는 작용과(Chandrasiri, et al., 1990; Gallagher, Kanekanian, and Evans, 1994). 농축 대두단백질의 쓴맛을 유발시키는 peptide를 제거하기 위하여 브로멜라인을 처리할 경우 라이신의 이용을 2배 이상 높일 수 있으며, acetylated soy protein의 처리할 경우에도 동일한 효과가 있다고 보고하였다(Yeom, Kim, and Rhee, 1994).

(4) Transgenic Bromelain의 경제성

환경교란이나 생리적 안정성에 대한 우려에도 불구하고 유전자 재조합 기술을 이용한 내병성 작물이나 특정성분을 생산하려는 시도는 사료곡물 뿐만 아니라 식용작물에 이르기까지 광범위하게 생산에 이용되고 있다. 특히 축산산업에서는 그동안 생산성을 높이는 것이 중요한 과제였고 유전자 재조합 기술은 일정 부분 기여를 한 것이 사실이다.

본 연구는 Bromelain을 함유하는 Transgenic 배추를 생산하고 이를 사료첨가제로서 개발 가능성을 검토 하는 것이었으나 안정성이나 경제성에 대해서는 추가적인 연구와 검토가 있어야 할 것으로 생각된다. 그러나 가축사육을 위한 항생제나 화학제의 사용이 제한되고 있고 점차 규제가 엄격

해지고 있는 추세이고 보면 결국 사육환경을 개선하거나 안정성이 높은 대체제를 개발하는 것이 중요할 수밖에 없다. 따라서 본 연구에서는 시도되지 않았지만 안정성을 갖추고 종자로서도 문제가 없는 Bromelain 생성 사료작물을 개발한 다면 그만큼 가축질병을 감소시키고 항생제나 화학제의 사용량을 대체할 수 있어 농가소득에도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구에서 효율적인 병 방제를 위해 항균활성을 가지는 파인애플 유래 bromelain 및 인체유래 cathelicidin 유전자를 이용하여 형질전환 식물체를 육성하고 저항성 증진 효과를 살펴보았다.

파인애플 유래 bromelain은 cysteine protease의 일종으로 cathepsin L subfamily에 속하는 것으로 열대식물에 많이 존재하며 임상실험에서 antiproliferation, antimetastatic 및 암세포 성장을 억제 (Batkin et al., 1988; Munzig et al., 1994; Grabowska et al., 1997)하며, 항혈청응고제, 항암작용, 피부 좌멸 조직제거 등 (Engwerda et al., 2001) 의약품에 널리 이용되는 복합물질이다. 지금까지 bromelain 관련 유전자 분리 및 *E. coli* 내에서 발현 등에 관한 의약적 연구는 많이 시도 되었으나, 식물체내에 도입하여 발현시킨 연구는 전무한 실정이다. 본 실험에서는 BAA1 유전자를 도입한 고정계통 (B66-3-1)에서 무름병균 (*Pectobacterium carotovorum* spp *carotovorum*)에 저항성 증진효과를 보였다. 일반적으로 *Pectobacterium*속 병균은 여러 작물에 무름병 증상을 일으키는 세균으로 pectatylases, polygalacturonases, cellulase 및 proteases등의 식물조직을 파괴하는 효소를 생성한다. 이를 위해서는 세포외 효소 (exoenzyme) 생산 및 감염 후 병균 수의 증식이 조직파괴에 매우 중요한 요인으로 알려져 있다 (Andres et al., 2001; Fuqua et al., 1994; Pierson et al., 1998). 무름병균에 저항성이 증진된 B66-3-1 고정계통은 BAA1이 도입되어 세포내의 endoprotease 활성이 대조식물에 비해 3배 이상의 효과를 보였다. 이는 형질전환체의 세포내에 여러 종류의 protease가 도입 유전자에 의해 활성이 증진되어 무름병균에 저항성이 증진된 것으로 사료된다. Microarray분석에서도 B66-3-1과 대조식물체의 발현차이를 보이는 유전자는 cystein-rich antifungal protein, protein kinase, protease inhibitor 등으로 무름병균의 저항성 증진에 촉매 역할을 하고 있는 것으로 생각되어 진다. 또한 yeast에서 생산한 BAA1 산물이 무름병균의 성장 억제실험에서 배양 초기에 병균의 생장이 억제된

결과를 미루어 볼 때, 형질전환 배추의 잎에서 균의 밀도가 낮을 경우 감염된 균의 생장이 억제되어 무름병증으로 나타나지 않아 결국 저항성이 증진된 것으로 사료된다. 이와는 반대로 균의 침입을 효과적으로 방어하는 자연면역계 (innate immune system)를 위한 항균펩티드 (antimicrobial peptide)는 많은 미생물에 광범위한 저해활성을 지니고 있다 (Broekaert et al., 1997). 특히 동물에서 AMP는 Cecropins (Van Hofsten et al., 1985) 과 magainins (Zaslloff 1987)등 2종류가 알려져 있는데 건강을 위협하는 미생물에 치료효과가 탁월하여 많은 연구가 되고 있는 실정이다. 최근 들어 미생물에 대한 일차적 방어수단으로 자연면역반응계에 이용되는 항균성 peptide로 인체 유래 AMP의 cathelicidin으로부터 유래한 선형의 LL-37은 임상실험 결과 매우 소량의 존재 하에서 염증치료 및 항균성이 탁월하다고 알려져 있다 (Zaiou et al., 2003; Frohm et al., 1999; Sorensen et al., 1997). 본 연구에서는 2002년 Schmidtchen 등이 보고한 cathelicidine 계열의 LL-37 유전자를 *E. coli* 세포에 성공적으로 발현시켜 그람 음성균 및 그람 양성균에 항균효과를 보인 것으로 미루어 볼 때 미생물에 광범위한 항균성을 보일 것으로 사료된다. 또한 LL-37 유전자는 *Agrobacterium*을 매개로 배추에 도입한 형질전환체에서 세균병균 및 진균병균에 대한 저항성 증진 효과를 보였다. 세균병으로 무름병균에 대한 저항성 조사에서 T3 계통을 제외하고 10^6 CFU/ml의 균의 밀도에서도 72시간이 지난 상태에서도 완전저항성을 보였다. T3계통의 경우 10^6 CFU/ml 하에서 24시간까지 병반이 형성되지 않았지만 그 후, 점차 병반의 크기가 증가되었다. 그러나 대조구에 비하면 현격한 차이를 보였다. 이 계통의 Western 분석에서도 다른 형질전환 계통과 비교할 때 발현하는 단백질량에서 현격한 차이를 보인 것으로 미루어 볼 때, 균에 대한 멸균작용이 발현량과 상관이 있다고 생각된다. 또한 배추 진균병으로 시들음병균, 탄저병균 및 밀둥썩음병균을 대상으로 실시한 저항성 조사에서도 저항성 증진 효과를 보였다. 지금까지 보고된 동물 유래 magainin type의 AMP를 토마토에 도입한 실험에서 *A. solani* 및 *P. infestans*등의 병원균에 저항성이 증진되었다고 보고하였다

(Alan et al., 2001). 비록 본 실험에 사용된 AMP는 지금까지 알려진 동물 유래의 AMP와 다른 종류이며, 동물 임상실험 결과에서도 지금까지 알려진 것보다 월등한 항균력을 보였다. 따라서 본 연구에 사용된 1종의 세균 병원균 및 3종류의 진균병원균에 대하여 항균효과가 탁월한 것으로 미루어 볼 때 spectrum이 넓은 항균력을 지닌 AMP라고 할 수 있다.

지금까지 몇몇 연구 group에서 동물 유래 AMP를 이용하여 세균, 진균 및 해충에 대한 병원균에 대해 저항성이 증진된 ECF12 peptide 도입 바나나, 담배, Myb30 peptide 도입한 poinsettia 및 MSI-99 peptide 도입 토마토, poplar 식물 등이 보고되었다 (Smit et al., 1998; Degray et al., 2001; Li et al., 2001; Liang et al., 2002; Chakrabarti et al., 2003). 이들 사용한 AMP 유전자는 형질전환 작물이 다르고, 유전자의 발현체제가 다르며, 병원균의 차이가 있지만 도입한 유전자가 발현한 식물체 모두에서 저항성이 증진되었다. 따라서 본 실험에서 사용한 AMP 'LL-37'은 식물에서 저항성을 증진시키는 좋은 소재로 생각되는데 매우 작은 peptide 이기 때문에 식물 세포에 도입하여 발현시킬 전략과 검출할 수 있는 system의 개발이 요구된다.

제 5 장 연구개발과제의 활용계획

1. 항균활성을 가지는 파인애플 유래 bromelain 및 인체유래 cathelicidin 유전자를 이용하여 육성한 형질전환 식물체는 다른 병원균에 항균활성 효과에 활용할 수 있다.

2. Bromelain 관련 유전자 분리 및 *E. coli* 내에서 발현 등에 관한 의약적 연구는 많이 시도 되었으나, 식물체내에 도입하여 발현시킨 연구는 전무한 상태로 고발현 식물체 및 *E. coli* 유래 단백질을 정제하여 산업적으로 활용 가능 하다.

3. Microarray분석에서 발현차이를 보이는 유전자는 cystein-rich antifungal protein, protein kinase, protease inhibitor 등을 이용해 병 방어 기작의 연구에 활용가능 하다.

3. 미생물에 대한 일차적 방어수단으로 자연면역반응계에 이용되는 항균성 peptide로 인체 유래 AMP의 cathelicidin으로부터 유래한 선형의 LL-37은 임상실험 결과 매우 소량의 존재 하에서 염증치료 및 항균성이 탁월하다고 알려져 있다 (Zaiou et al., 2003; Frohm et al., 1999; Sorensen et al., 1997). 본 연구에서는 2002년 Schmidtchen 등이 보고한 cathelicidine 계열의 LL-37 유전자를 *E. coli* 세포에 성공적으로 발현시켜 그람 음성균 및 그람 양성균에 항균효과를 보인 것으로 미루어 볼 때, 분리한 LL-37 유전자는 미생물에 광범위한 항균성을 보여 저항성 식물체를 육성하는데 활용 가능하다.

4. LL-37 유전자 도입 형질전환 배추에서 세균병원균 및 진균병원균이외 다른 병원균과의 상호작용을 조사하는데 활용되며, 이를 이용해 품종육성하는 교배모본으로의 활용이 가능하다.

5. 항균 펩타이드 LL-37을 발현하는 형질전환체 이용하여 인체에 해가되는 병원균 6종을 대상으로 항균능 실험 결과로 볼 때 병원균의 항균효과가 있어 인체 병리학적으로 활용가능하다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고 문헌

- Adamchuk NI, NF Mikhaylenko, EK Zolotareva, E Hilaire, JA Guikema. 1999. Spaceflight effects on structural and some biochemical parameters of *Brassica rapa* photosynthetic apparatus. J. Gravit Physiol. 6(1): 95-96.
- Aiello, S. (ed.) 1998. Merck Veterinary Manual. Philadelphia: Merck and Co.
- Ajay-Kumar Pandey, Ger Mang-Jye, Huang Hsiang-En, Yip Mei-Kuen, Zeng Jiqing and Feng Teng-Yung. 2005. Expression of the hypersensitive response-assisting protein an *Arabidopsis* result in harpin-dependent hypersensitive cell death in response to *Erwinia carotovora*. Plant Molecular Biology 59: 771-780.
- Alexander DRM, RM Goodman, M Gut-Rella, C Glascock, K Weymann, L Friedrich, D Maddox, P Ahl-Goy, T Luntz, E Ward, J Ryals. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proc Natl Acad Sci USA 99: 7327-7331.
- Alonso JM and A Granell. 1995. A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in citrus fruit, Plant Physiol 109: 541-547.
- Andess Mäe, Marcos Montesano, Vila Koiv, E Tapio Palva. 2001. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. Mol. Plant Microb. Interact. 14(9): 1035-1042.

- Anzai H, K Yoneyama, I Yamaguchi. 1989. Transgenic tobacco resistant to bacterial disease by the detoxification of a pathogen toxin. *Mol Gen Genet* 219: 492-494.
- Association of American Feed Control Officials (AAFCO). 1998. Official Publication. Atlanta, GA: Association of American Feed Control Officials.
- Bals R, DJ Weiner, AD Moscioni, RL Meegalla, JM Wilson. 1999. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun.* 67(11): 6084-9.
- Batkin S, SJ Taussig, J Szekerezes. 1998. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114: 507-508.
- Beers EP, AM Jones, AW Dickerman. 2004. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry.* 65(1): 43-58.
- Bedford, M.R. 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Sci. and Tech.* 53: 145-155.
- Bode W and R Huber. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *J. Biochem.,* 204: 433-451.
- Boller T. 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: T Kosuge, EW Nester eds, *Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Aspects*, New York: McMillan, 384-413.

- Broekart WF, FRG Terras, BPA Cammue, J Vanderleyden. 1990. An automated quantitative assay for fungar for fungal growth-inhibition. FEMS Microbiol Lett 69: 55-59.
- Broekart WF, BPA Cammue, MFC De Bolle K Thevissen, GW De Samblanx, RW Osborn. 1997. Antimicrobial peptides from plants, Crit Rev Plant Sci 16: 297-323.
- Brogden KA, M Ackermann, PB Jr McCray, BF Tack. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int J. Antimicrob Agents. 22: 465-478.
- Brogliè K, I Chet, M Holliday, R Cressman, P Biddle, S Knowlton, CJ Mauvais, R Brogliè. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science 254: 1194-1197.
- Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence, J. Exp. Bot. 48: 181-199.
- Canadian General Standards Board. 1999. Organic Agriculture. Ottawa: Canadian General Standards Board.
- Carmona MJ, A Molina, JA Fernandez, JJ Lopez-Fando, F Garcia-Olmedo. 1993. Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J. 3: 457-462.
- Chandler D.S. and T.L. Mynott. 1998. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. Gut 43: 196-202.

- Chandrasiri, V., L. Guermani, H.M. Bau, C. Villaume, L. Mejean, and J.P. Nicolas. 1990. Yield and physical characteristics of soybean curds obtained by physicochemical and enzymatic coagulations. *Sciences des Aliments* 10: 333-342.
- Chen HJ, DJ Huang, WC Hou, JS Liu, YH Lin. 2006. Molecular cloning and characterization of a granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves. *J. Plant Physiol.* 163(8): 863-76.
- Cho MA, DW Choi, JR Liu, C Tom, PS Choi. 2004. Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens* Kor J. *Plant Biotech* 31: 255-259.
- Collins, J.L. 1960. *The Pineapple*. New York: Interscience.
- Cooreman WM, S Scharpe, J Demeester, A Lauwers. 1976. Bromelain, biochemical and pharmacological properties. *Pharm. Acta Helv.*, 51, 73.
- Daher KA, ME Selsted, RI Lehrer. 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60: 1068-1074.
- Domoto C, H Watanabe, M Abe, K Abe, S Arai. 1995. Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cysteine proteinases. *Biochim Biophys Acta.* 19; 1263(3): 241-244.
- Engwerda CR, D Andrew, A Ladhams, TL Mynott. 2001. Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 25; 210(1): 66-75.
- Feller U and A Fischer. 1994. Nitrogen-metabolism in senescing leaves, *Crit.*

Rev. Plant Sci. 13; 241-273.

Fennema, O.R. (Ed). 1996. Food Chemistry 3rd Ed. Marcel Decker. New York, NY.

Frohm Nilsson M, B Sandstedt, O Sorensen, G Weber, N Borre-gaard, M Stahle-Backdahl. 1997. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun.* 67: 2561-2566.

Fuqua C, SC Winans, EP Greenberg. 1996. Census and con-sensus in bacterial ecosystems: The LuxR -LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 727-751.

Fuqua WC, SC Winans, EP Greenberg. 1994. Quorum sens-ing in bacteria: The LuxR -LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275.

Gallagher, J., A.D. Kanekanian, and E.P. Evans. 1994. Hydrolysis of casein: A comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. &Tech.* 29: 279-285.

Garbin F, T Harrach, K Eckert, HR Maurer. 1994. Bromelain proteinase F9 augments human lymphocyte-mediated growth inhibition of various tumor cells in vitro. *Int. J. Oncol.* 5: 197-203.

Gaspani L, E Limioli, P Ferrario, M Bianchi. 2002. *In vivo* and *in vitro* effects of bromelain on PGE(2) and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. *Pharmacology* 65: 83-86.

Gennaro R and Zanetti M. 2000. Structural features and biological activities of

the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 55: 31-49.

Girbes T, JM Ferreras, R Iglesias, L Citores, C de Torre, ML Carbajales, P Jimenez, FM DE Benito, R Munoz. 1996. Recent advances in the uses and application of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cell Mol Biol* 42: 461-471.

Grabowska E, K Eckert, I Fichtner, K Schulze-Forster, HR Maurer. 1997. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of B16F10 mouse melanoma cells. *Int. J. Oncol.* 11: 243-248.

Halfhill MD, RJ Millwood, PL Raymer, CN Jr Stewart. 2002. Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. *Environ Biosafety Res.* 1(1): 19-28.

Hanfrey C, M Fife, V Buchanan-Wollaston. 1996. Leaf senescence in *Brassica napus*: Expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.*, 30: 597-609.

Harrach T, F Gebauer, K Eckert, R Kunze, HR Maurer. 1994. Bromelain proteinases modulate the CD44 expression on human Molt4/8 leukemia and SK-Mel 28 melanoma cells *in vitro*. *Int. J. Oncol.* 5: 485-488.

Harrison SJ, JP Marcus, KC Goulter, JL Green, DJ Maclean, JM Manners. 1997. An antimicrobial peptide from the Australian native *Hardenbergia violacea* provides the first functionally characterized member of a subfamily of plant defensins. *J. Plant Physiol* 24: 571-578.

- Haynes RJ, PJ Tighe, HS Dua. 1998. Innate defence of the eye by antimicrobial defensin peptides. *Lancet*. 352: 451-452.
- He YK. 1990. Plant regeneration from Ri T-DNA transformed roots of cabbage. *Chin J. Biotechnol.* 6(2): 131-137.
- Heilborn JD, MF Nilsson, G Kratz, et al. 2003. The cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J. Invest Dermatol.* 120: 379-389.
- Higgins VJ, L Huogen, T Xing, A Gelli, E Blumwald. 1998. The gene-for-gene concept and beyond; Interactions and signals. *Can J. Plant Pathol* 20: 150-157.
- Huang Y, RO Nordeen, M Di, LD Owens, JH McBeath. 1997. Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Phytopathology* 87: 494-499.
- Hunter RG, GW Henry, RM Heinicke. 1957. The action of papain and bromelain on the uterus. *Am J Ob Gyn* 73: 867-873.
- Husain SS and G Lowe. 1970. The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues of stem bromelain. *Biochem J.* 117(2): 341-346.
- Jayaram, H.N., G.S. Ahluwalia, and D.H. Cooney. 1991. Enzyme applications (therapeutic). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 9: 621-646.

- Jiang Y, M Camara, R Chhabra, KR Hardie, BW Bycroft, A Lazdunski, GPC Salmond, GSAB Stewart, P Williams. 1998. *In vitro* biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-butanoyl-L-homoserine lactone. Mol. Microbiol. 28: 193-203.
- Jianping Ren, Petzoldt Rixana, H Dickso Michael. 2001. Screening and identification of resistance to bacterial soft rot in *Brassica rapa*. Euphytica 188: 271-280.
- Kang JH, MK Lee, KL Kim, KS Hahm. 1996. Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. Int. J. Peptide Protein Res. 48: 357-363.
- Khan RH, S Rasheedi, SK Haq. 2003. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. J. Bio. Sci. 28: 709-714.
- Kikumoto T. 1981. Studies on the soft rot disease of Chinese cabbage in Japan. In: T.S Talakar & T.D Griggs (Eds.), Chinese Cabbage, pp. 113-127. Pro First Symp AVRDC, Shanhua, Tainan, Taiwan.
- Kikumoto T. 1980. Ecological aspects of the soft rot bacteria. Rep Ins Agr Res Tohoku Univ 31: 19-41.
- Koch AL. 1981. Evolution of antibiotic resistance gene function. Microbiol. Rev. 45(2): 355-378.
- Kuginuki Y and H Tsukazaki. 2001. Regeneration ability and *Agrobacterium*-mediated transformation of different cultivars in *Brassica oleracea* L. and *B. rapa* L. (syn. *B. campestris* L.) Journal of the Japanese society for Horticultural Science, 70(6):

682-690.

- Last DI and DJ Llewellyn. 1997. Antifungal proteins from seeds of Australian native plants and isolation of an antifungal peptide from *Atriplex nummularia*. NZ J. Bot 35: 385-394.
- Le Boulay C, A Van Wormhoudt, D Sellos. 1995. Molecular cloning and sequencing of two cDNAs encoding cathepsin L-related cysteine proteinases in the nervous system and in the stomach of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). Comp Biochem. Physiol. 111 (B): 353-359.
- Leah R, H Tommerup, I Svendsen, J Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties J. Biol Chem 266: 1564-1573.
- Li D, AM Ashby, K Johnstone. 2003. Molecular evidence that the extracellular chitinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. Mol Plant Microbe Interact. 16(6): 545-552.
- Li, CW. 1981. The origin, evolution, taxonomy and hybridization of Chinese cabbage. In: T.S Talakar & T.D Griggs (Eds.), Chinese Cabbage, pp. 3-10. Pro First Symp AVRDC, Shanhua, Tainan, Taiwan.
- Lin KC, WR Bushnell, LJ Szabo, AG Smith. 1996. Isolation and expression of a host response gene family encoding thaumatin-like proteins in incompatible oat-stem rust fungus interactions. Mol Plant Microbe Interact 9: 511-522.
- Lin W, CS anuratha, K Datta, I Potrykus, S Muthukrishnan, SK Datta. 1995.

Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechnology* 13: 686-691.

Linthorst HJM. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit Rev Plant Sci.* 10: 123-150.

Liu D, KG Raghothama, PM Hasegawa, RA Bressan. 1994. Osmotin overexpression in potato delays the development of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 1888-1892.

Lotz-Winter, H. 1990. On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Planta medica* 56: 249-253.

Lotz-Winter H. 1990. *lanta Med.* Jun;56(3):249-53.

Morrison, F.B. 1951. *Feeds and Feeding.* Ithaca, NY: Morrison Publishing Co.

Magdalena SL, M Piotr, K Katarzyna, W Kinga, P Magdalena, L Boguslaw, S Piotr, S Jerzy, R Matthew, P Jan, S William, M Fionnuala, F Timothy, T Jim, P Jan. 2004. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *AAC.* 48(12): 4673-4679.

Manhart N, R Akomeah, H Bergmeister, A Spittler, M Ploner, E Roth. 2002. Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4⁺ cells and the interferon-gamma response in Peyer's Patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. *Cell Immunol.* 215: 113-119.

Marus JP, KC Goulter, JL Green, SJ Harrison, JM Manners. 1997. Purification and characterization of an antimicrobial peptide from *Macadamia*

integrifolia. Eur J. Biochem 244: 743-749.

Matsumoto I, H Watanabe, K Abe, S Arai, Y Emori. 1995. A putative digestive cysteine proteinase from *Drosophila melanogaster* in predominantly expressed in the embryonic and larval midgut. Eur. J. Biochem. 227: 582-587.

Matsumoto I, Y Emori, K Abe, S Arai. 1997. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. J. Biochem. 121: 464-476.

Maurer HR. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cell Mol Life Sci. 58(9): 1234-1245.

Mitscher LA, S Darke, SR Gollapudi, SK Okwute. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. J. Nat. Prod. 50(6): 1025-1040.

Molina A, F Garcia-Olmedo. 1997. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LPT2. Plant J. 12: 669-675.

Munzig E, K Eckert, T Harrach, H Graf, HR Maurer. 1994. Bromelain protease F9 reduces the CD44 mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells. FEBS Lett. 351: 215-218.

Murachi T. 1970. Bromelain enzymes. In "Methods in enzymology" Perlmann, G. E. and Lorand, L. (eds.), Academic Press. New York, 19: 273.

Muta E, H Aramaki, Y Takata, A Kono, Y Okamoto, S Ota. 1993. Cloning and

sequencing of fruit bromelain, D14058, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- Muta E, Y Okamoto, S Ota. 1997. *Ananas comosus* mRNA for FBSB precursor, complete cds. accession D38532 [gi:2463583] from NCBI. Cloning and sequencing of cysteine proteinases in *Ananas comosus*.
- Mynott, T.L., R.K.J. Luke, and D.S. Chandler. 1996. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic *Escherichia coli* receptor activity in piglet small intestine. *Gut* 38: 28-32.
- Mynott TL, B Crossett, SR Prathalingam. 2002. Proteolytic inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infection and Immunity* 70: 86-95.
- Nagaoka I, S Hirota, S Yomogida, A Ohwada, M Hirata. 2000. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res.* 49: 73 - 79.
- National Institute of Environmental Health Sciences. National Toxicology Program. (NTP) 1993. Toxicity Studies of Sodium Cyanide, (CAS No. 143-33-9) Administered by Dosed Water to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. Washington, DC: US Department of Health and Human Services.
- Newman MA, J Conrads Strauch, G Scofield, MJ Daniels, MJ Dow. 1994. Defence-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 553-563.
- Newman MA, MJ Daniels, JM Dow. 1995. Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defence-related gene expression in *Brassica campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 778-780.

- Nishi SM, S Umeda Toda, T Toyoda. 1970. Studies on the breeding of cruciferae vegetables by interspecific and intergeneric hybridization. II. Breeding of disease resistant Chinese cabbage by backcrossing to interspecific hybrids between cabbage and Chinese cabbage. Bull Hort Res Sta A9: 101-128.
- Niyonsaba F, A Someya, M Hirata, H Ogawa, I Nagaoka. 2001. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. Eur J Immunol. 31: 1066 - 1075.
- Ogawara, H. 1981. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria, with special reference to beta-lactam antibiotics. Microbiol. Rev. 45(4): 591-619.
- Oguchi S, H Sassa, H Hirano. 2001. OsPAA2, a distinct alpha 1 subunit gene for the 20S proteasome in rice (*Oryza sativa* L.). Gene. 11; 272(1-2): 19-23.
- Oldfield, J.E. 1973. Effect of fermentation on the chemical and nutritional value of feeds, in Effect of Processing on the Nutritional Value of Feeds: 34-47. Washington: National Academy Press.
- Ota S, S Moore, WH Stein. 1964. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelain. Biochemistry, 3: 180.
- Paape M.J., Oostveldt. K.V and Meyer,E. 1999. Phagocytic defense of the bovine mammary gland. Journees Nationales GTV-INRA pp. 23-28.
- Pernas M, R Sanchez Monge, L Gomez, G Salcedo. 1998. A chest nut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from

closely related pests. *Plant Mol. Biol.*, 38:(6): 1235–1242.

Perombelon MMC, A Kelman. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Ann Rev Phytopathol* 18: 361–387.

Pierson LS, DW Wood, EA Pierson. 1998. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 207–235.

Pike R.N., D. Bagarozzi Jr. and J. Travis. 1997. Immunological cross-reactivity of the major allergen from perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Lol p I, and the cysteine proteinase, bromelain. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112:412–414.

Pirhonen M, D Flego, R Heikinheimo, ET Palva. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12: 2467–2476.

Pond, W.G., D.C. Church, and K.R. Pond. 1995. *Basic Animal Nutrition and Feeding* (4th Ed.) New York: John Wiley & Sons.

Rawlings ND and AJ Barrett. 1994. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, 244: 461–486.

Ren J, R Petzoldt, MH Dickson. 2001. Screening and identification of resistance to bacterial soft rot in *Brassica rapa*. *Euphytica* 118: 271–280.

Roberts WK and CP Selitrennikoff. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-preme-ablizing activity. *J Gen Microbiol* 136: 1771–1778.

- Russell AD. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 71(3): 191-201.
- Ryan CA. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425-429.
- Reynolds, JEF (ed.).1996. *Martindale: The Extra Pharmacopeia*, 31st edition. London: Royal Pharmaceutical Society.
- Salmond GPC, BW Bycroft, GSAB Stewart, P Williams. 1995. The bacterial "enigma": Cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* 16: 615-624.
- Sawano Y, T Muramatsu, KL Hatano, K Nagata, M Tanokura. 2003. *Ananas comosus* bromelain inhibitor precursor, gene, complete cds. accession AF509782 [gi:31323667] from NCBI.
- Schmidtchen A, IM Frick, E Andersson, H Tapper, L Björck. 2002. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 46: 157-168.
- Scott MG and RE Hancock. 2000. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol.* 20: 407-431.
- Shiba H, N Kimura, S Takayama, K Hinata, A Suzuki, A Isogai. 2000. Alteration of the self-incompatibility phenotype in Brassica by transformation of the antisense SLG gene. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64(5): 1016-1024.

- Shimizu S, K Kanazawa, T Kobayashi. 1962. Studies on the breeding of Chinese cabbage for resistance to soft rot. III. The breeding of the resistant variety 'Hiratsuka No. 1' by interspecific crossing. Bull Hort Res Sta A1: 157 - 174.
- Slinger, S.J. 1973. Effect of pelleting and crumbling methods on the nutritional value of feeds, in Effect of Processing on the Nutritional Value of Feeds: 48-66. Washington: National Academy Press.
- Simpson CG and JW Brown. 1995. Applications of RT-PCR. Methods in Molecular Biology 49: 257-269.
- Smith C and JA Bartz. 1990. Variation on the pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* isolated from different hosts. Plant Dis. 74: 505-509.
- Sorensen O, K Arnljots, JB Cowland, DF Bainton, N Borregaard. 1997. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. Blood. 90: 2796-2803.
- Sorensen OE, P Follin, AH Johnsen, et al. 2001. Human cathelicidin, hCAP- 18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. Blood. 97: 3951 - 3959.
- Stepek G, DJ Buttle, IR Duce, A Lowe, JM Behnke. 2005. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vitro*. Parasitology. 130(2): 203-211.
- Stintzi A, T Hents, S Kaiffmann, M Legrand, B Fritig. 1991. Identification of

a basic pathogenesis-related thaumatin-like proteins of *virus* infected tobacco as osmotin. *Physiol Mol Plant Pathol* 38: 137-146.

Swift S, JP Throup, P Williams, GPC Salmond, GSAB Stewart. 1996. Quorum sensing: A population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem. Sci.* 21: 214-219.

Sunde, M.L. 1973. Chemical and nutritional changes in feeds brought about by heat treatment, in *Effect of Processing on the Nutritional Value of Feeds*: 23-33. Washington: National Academy Press.

Taipalensuu J, A Falk, L Rask. 1996. A wound-and methyl jasmonate-inducible transcript coding for a myrosinase-associated protein with similarities to an early nodulin. *Plant Physiol.* 110: 483-491.

Taipalensuu J, E Andreasson, S Eriksson, L Rask. 1997. Regulation of the wound-induced myrosinase-associated protein transcript in *Brassica napus* plants. *Eur. J. Biochem.* 247: 963-971.

Takasaki T, K Hatakeyama, K Ojima, M watanabe, K Toriyama, K Hinata. 1997. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa*. *Breed Sci* 47:127-134.

Takasaki T, K Hatakeyama, M Watanabe, K Toriyama, A Isogai, K Hinata. 1999. Introduction of SLG (S locus glycoprotein) alters the phenotype of endogenous S-haplotype, but confers no new S-haplotype specificity in *Brassica rapa* L. *Plant Mol Biol.* 40(4): 659-668.

Taniguchi M and L Kubo. 1993. Ethnobotanical drug discovery based on

medicine men's trials in the *African savanna*: screening of east African plants for antimicrobial activity II. *J. Nat. Prod.* 56(9): 1539-1546.

Taussig, S.J. and S. Batkin. 1988. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *Journal of ethno-pharmacology.* 22: 191-203.

Tao DU, Yao WANG, HU Qin-Xue, CHEN Jie, LIU Sheng, HUANG Wen-Jin, LIN Mu-LAN. 2005. Transgenic *Pualownia* expressing shiva-1 gene has increased resistance to *Pualownia* witches' broom disease. *Journal of Integrative Plant Biology.* 47(12): 1500-1506.

Terras FRG, K Eggermont, V Kovaleva, NV Raikhel, RW Osborn, A Kester, SB Ress, S Torrekens, F Van-Leuven, J Vanderleyen, BPA Gammue, WF Broekaert. 1994. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *Plant Cell* 7: 573-588.

Tinsley, I.J. 1979. *Chemical Concepts in Pollutant Behavior.* New York: Wiley-Interscience.

Thangstad OP, P Winge, H Husebye, AM Bones. 1993. The myrosinase (Thioglucoside glucohydrolase) gene family in *Brassicaceae*. *Plant Mol Biol* 23(3): 511-524.

Tjabringa GS, J Aarbiou, DK Ninaber, JW Drijfhout, OE Sorensen, N Borregaard Rabe, KF, PS Hiemstra. 2003. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Immunol.* 15: 171(12): 6690-6696.

- Trysellius Y and D Hultmark. 1997. Cysteine proteinase 1 (CP1), a chatepsin L-like enzyme expressed in the *Drosophila melanogaster* haemocyte cell line mbn-2. *Insect Mol. Biol.*, 6(2): 173-181.
- Tsuyama H and M Sakamoto. 1953. Some observations on the behavior of the soft rot bacteria in the rhizosphere of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*). 92nd Rpt Inst Agr Res Tohoku Univ pp. 79-88.
- Tucker, G.A. and L.F.J. Woods. 1995. *Enzymes in Food Processing*. London: Blackie Academic and Professional.
- Turner J, Y Cho, NN Dinh, AJ Waring, RI Lehrer. 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 2206 - 2214
- Val D E and JE Jr Cronan. 1998. In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are sub-stress for the LuxI family of autoinducer synthases. *J. Bacteriol.* 180: 2644-2651.
- Van Loon LC. 1997. Induced resistance in plant and role of pathogenesis-related proteins. *Eur J. Plan Pathol* 103: 753-765.
- Vigers AJ, S Wiedemann, WK Roberts, M Legrand, CP Selitrennikoff, B Fritig. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci* 83: 115-161.
- Yamagishi H, H Yoshikawa, S Yui. 1990. Leaf morphology and soft rot resistance in offspring of a somatic hybrid between Chinese cabbage and kale (*Cruciferae*). *Euphytica* 47: 215 - 221.
- Yamamoto Y, K Takimoto, S Izumi, M ToriyamaSakurai, T Kageyama, SY

- Takahashi. 1994. Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, J. Biochem., 116: 1330-1335.
- Yang Y, J Shal, DF Klessing. 1997. Signal perception and transduction in plant defence responses. *Gens Dev.* 11: 1621-1639.
- Yang D, A Biragyn, DM Hoover, Lubkowski J, Oppenheim JJ. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 22: 181-215.
- Yasin B, M Pang, JS Turner, et al. 2000. Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.* 19: 187-194.
- Yeom, H.W., K.S. Kim, and J.S. Rhee. 1994. Soy protein debittering by lysine acetylation. *J. Food Sci.* 59: 1123-1126.
- Yoshikawa H, T Sawada, H Yamagishi, S Yui. 1989. Soft rot resistance of progenies of somatic hybrid: Chinese cabbage plus Kale. *J. Japan Soc Hort Sci* 58(1): 190-191.
- Yoshikawa M, M Tsuda, Y Takeuchi. 1993. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase from soybean. *Natur.Wissenschaften* 80: 417-420.
- Yun DJ, RA Bressan, PM Hasegawa. 1997. Plant antifungal proteins. *Plant Breed Rev.* 14: 39-88.
- Zaiou M, V Nizet, RL Gallo. 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J*

Invest Dermatol. 120: 810 – 816.

Tomita,Y., Wang, Y. and Paape, M.J. 1999. Influence of bispecific antibodies on neutrophil function. F.A.S.E.B.J. 13:841.

Committee on Drug Use in Food Animals. 1999. The Use of Drugs in food Animals. Benefits Risk. National Research Council, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington. D.C.

엄정렬 2001. 사료내 Bromelain첨가가 거세한우의 비육능력, 도체 성적 및 이화학적 성질에 미치는 영향. 건국대학교 석사학위논문

백정환 1998. 착유우에 Bromelain급여시 산유량, 유성분 및 체세포 수에 미치는 영향. 동아대학교 석사학위논문

包玉民. 2001. 동물사육을 위한 회토의 연구 및 응용. 회토광물의 농업적 이용에 관한 국제심포지움. 전북대학교 농업과학기술연구소. 10.

송태화, 2004. 회토의 쥐에 대한 급여효과와 미생물 생장에 미치는 영향. 전북대학교 석사학위논문

함숙경. 2003. 회토(稀土)가 양계의 생산성에 미치는 영향. 전북대학교 석사학위논문.



주 의

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