

보안과제 (), 일반과제 (0) 과제번호: 106074-3

온도, 수분, 염, 산화 스트레스 감응 유전자를
이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 생산
(Production of Broad Spectral Abiotic Stress-Tolerant
Transgenic Rice with Temperature, Water, Salt, and
Oxidative Stress Responsive Genes)

연구기관
전남대학교 농업생명과학대학

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “온도, 수분, 염, 산화 스트레스 감응 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 생산 ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명	: 전남대학교
총괄연구책임자	: 한 옥 수
제 1 세부연구책임자	: 한 옥 수
제 2 세부연구책임자	: 홍 석 환
연구원	: 강 훈 승
협동연구기관명	: (주) 현농
협동연구책임자	: 김 철 홍

요 약 문

I. 제 목

온도, 수분, 염, 산화 스트레스 감응 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

벼는 보리·밀과 함께 세계적으로 중요한 작물로서 세계 총생산량의 약 92%는 아시아 여러 나라에서 생산되며, 한국인의 주식으로 농업적 경제적 가치가 매우 높은 작물이다. 최근 비만 등 성인병 발병의 증가와 더불어 벼를 주식으로 하는 다이어트에 대한 관심이 증대되면서 벼 품종 개량 및 복합 재해 내성 연구를 통한 벼의 생산성을 증진시키고자 하는 연구가 요구되고 있다. 복합 재해 내성 유전자를 활용한 벼 품종의 개발에 관한 연구는 생산성 저하 및 재배 면적 제한을 극복하고 재배 시기 조절의 어려움을 해소하는 등 중요성이 있으며, 통일을 대비하여 북방 농업을 위한 국가의 미래 식량 수급 전략을 위해서도 중요하다. 특히, 벼의 게놈 크기는 430 Mb로서 비교적 작아서 다른 단자엽 식물의 모델로 사용되기 적합하며, 벼 염색체 12개의 염기서열 draft가 TIGR (The Institute for Genome Research)에 발표되어 있으므로 게놈 연구 및 기능 단백질 연구에 적합한 대상이라고 할 수 있다. 본 연구팀은 다년간 벼를 비롯한 식물의 스트레스 저항성에 관여 하는 유전자 발굴 및 형질전환 식물체의 개발을 수행한 경험과 지식을 바탕으로 (Agrawal et al., 2004; Song et al., 2004; Chandru et al., 2003) 광범위 스트레스에 대한 저항성 및 저온에 내성을 보이는 벼 유전자를 확보하고 병해 뿐 만 아니라 저온에도 복합적으로 내성을 보이는 벼를 개발하고자 하였다.

본 연구팀은 다년간 벼를 비롯한 식물의 스트레스 저항성에 관여 하는 유전자 발굴 및 형질전환 식물체의 개발을 수행한 경험이 있고, 본 연구 수행을 위하여 관련된 지식을 충분히 확보하고 있으며, 연구에 필요한 재료와 시설도 완벽하게 갖추고 있다. 그림 1-1-1에서 언급된 스트레스에 대한 복합재해 내성 벼를 개발하기 위하여 그림 1-1-2에 설명된 바와 같이 산화스트레스, 온도스트레스, 수분스트레스가 각각 연결 될 수 있는 LOX, zRBP, AQP 유전자를 이용하여 다음과 같은 최종 연구 목표를 달성하고자 하였다.

▶LOX 형질전환 벼에서 특이하게 발현이 유도 또는 감소되는 단백질에 대하여 분석하고 복합재해 내성과의 상관관계를 분석한다.

- ▶ zinc finger RNA-결합 단백질(zRBP) 유전자의 저온 유도성 발현 및 저온 내성 기능을 규명한다.
- ▶ LOX 형질전환 벼를 재료로 사용하여 zRBP 유전자를 사용하여 형질전환 함으로서, LOX와 zRBP가 동시 발현되는 형질전환 벼를 생산한다.
- ▶ LOX 형질전환 벼를 재료로 사용하여 LOX 와 aquaporin (AQP)이 동시 발현되는 형질전환 벼를 생산한다.
- ▶ 생산된 각각의 형질전환 벼에서 발현이 유도 또는 감소되는 단백질을 분석한다.
- ▶ 생산된 형질전환 벼에 대하여 저온, 가뭄, 염, 산화 스트레스에 대한 내성을 평가하고 복합재해 저항성 벼를 생산한다.

III. 연구내용 및 범위

제 1 세부과제: 리폭시지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질전환 벼의 개발

- ▶ 이미 확보하고 있는 LOX 형질전환 벼의 내냉성, 내건성, 내염성을 분석한다.
- ▶ microarray 방법으로 LOX 형질전환 벼에서 특이하게 유도 또는 감소되는 유전자를 분석한다.
- ▶ microarray 결과와 스트레스 내성의 결과를 비교 분석함으로써 유전자 발현과 스트레스 내성을 상호 비교 분석한다.
- ▶ LOX/zRBP가 동시 발현되는 형질전환 벼를 생산한다.
- ▶ LOX/zRBP double transformant에 대한 내한성, 내냉성, 내염성을 분석한다.

제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 개발

- ▶ 애기장대로부터 이미 분리하여 기능을 확인한 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 벼에 형질전환하여 저온 내성 형질전환 벼를 확보한다.
- ▶ zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 도입한 형질전환 벼를 확보하여 유전자의 발현과 저온 내성과의 상관관계를 규명한다.
- ▶ 애기장대의 aquaporin 유전자를 벼에 도입한다.
- ▶ 유사 유전자를 벼에서 분리하고 그들의 발현 양상과 활성 연구를 통해 그들의 기능을 규명한다.
- ▶ aquaporin 형질전환 벼에 대한 내한성과 회복 과정에서 aquaporin의 기능을 규명한다.

협동 1과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질전환 벼의 내냉성 및 내병성 평가

- ▶효과적인 형질전환 방법 및 homo line 생산 기술 확보
- ▶품종과 사용되는 조직, vector, *Agrobacterium* strain 등 조건에 따fms 재분화시 배지 및 생장조절 물질 등 형질전환 효율 증대
- ▶병 저온 복합내성을 가지는 형질전환체 개발 및 실용화 분석
- ▶내냉성 및 내병성 검정: 전라남도 농업기술원의 고조도 식물생장상을 이용하여 도열병과 흰잎마름병을 인공접종하고 실내유묘검정을 실시하여 저항성 평가 실시
- ▶자연발병과 인공접종의 2가지 방법으로 포장저항성을 평가 실시
- ▶병해 내성 및 저온 내성 형질전환 벼의 내냉성 및 내병성 검정 및 생육과 수량성 평가

IV. 연구개발 결과

1. 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내건성 및 내염성 분석

복합재해로 고려되는 저온, 고온, 건조, 염 스트레스 등이 공통적으로 산화 스트레스의 한 부분적 표현이므로, 세포막 산화의 대표적 예인 리폭시지나아제는 복합재해 저항성 기작에서 핵심적 역할이 기대되었다. 본 연구팀은 리폭시지나아제가 과다발현되어 병원균에 대한 저항성이 보고된 T3 세대의 형질전환벼의 복합재해 내성을 조사하기 위하여 내건성 및 내염성을 조사하였다. 형질전환 벼의 내건성을 분석한 결과 그림 3-1-1과 같이 초기에는 형질전환 벼의 ion leakage 가 높았으나, 후기에는 내건성에 대한 저항성이 관찰되었다. 형질전환 벼의 내염성을 분석한 결과 그림 3-1-2와 같이 형질전환 벼는 염 스트레스에 민감하게 반응하였다. 결과적으로 형질전환 벼는 wild type에 비하여 내건성은 증가하였으나 내염성은 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 리폭시지나아제가 지질의 과산화에 직접적으로 관여함을 시사하고 있다.

2. 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 microarray 분석

리폭시지나아제가 constitutive promotor에 의하여 발현되는 형질전환벼는 방어관련 유전자들의 발에 있어서 wild type 벼와 비교할 때 많은 차이가 있을 것으로 예측할 수 있다. 본 연구에서는 발현이 증가 혹은 감소되는 유전자들을 체계적으로 알아보기 위하여 microarray 실험을 수행하였으며, 그 결과 밝혀진 몇 개의 주요 유전자에 대하여서는 RT-PCR법으로 다시 재확인하였다. micrarray 결과에서 시간별로 발현이 유도 또는 감소되는 유전자들을 기능에 따라 분류한 결과 발현 양상과 유전자군의 기능이 잘 일치함을 알 수 있었으며 (그림 3-2-4), 일반적으로 ABA-responsive 유전자 및 salicylic acid responsive 유전자들의 발현이 감소함에 비하여, oxidative 스트레스 및 defense 관련 유전자의 발현은 증가함을 알 수 있었

다.

3. LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 스트레스 감응 분석

옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환 벼에 glycine을 다량으로 함유한 RNA결합단백질을 encode 하는 AtRZ1a (AY76) 유전자를 pCAMBIA1201를 사용하여 벼에 형질전환 시키고, 생산된 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 flag 오프를 사용하여 몇 가지 환경 스트레스 조건 하에서 저항성을 비교하고 두 유전자 역할 간의 상호작용 가능성을 분석하였다. 그 결과, 이중 형질전환 벼에서 salt에 대해 높은 저항성을 보이는 결과를 나타냈다. 이중형질전환 벼와 LOX 형질전환 벼의 유사한 결과는 RNA 결합 단백질의 과 발현이 salt 조건 하에서 negative effect를 나타낸다는 결과와 연관 지어 볼 때, salt에 대한 반응 경로에서 리폭시지나아제가 RNA 결합 단백질 효과 억제를 유도한 것으로 예상되며 salt 반응 경로에서 서로 상호작용이 있었음을 시사하고 있다. 삼투압 스트레스와 관련된 mannitol 실험에서도 세 가지 mannitol 농도에서 식물체의 반응을 비교했을 때, 비 형질전환 벼에 비해 이중 형질전환 벼가 mannitol에 대해 더 높은 저항성을 보였다. 건조 조건 하에서 수분 손실이 일어나는 속도를 비교해 봤을 때, 비 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼에서의 수분 손실 속도는 크게 차이가 나지 않으며, 이중형질전환 벼에서의 수분 손실은 두 식물체에 비해 빠른 속도로 나타났다. 애기 장대에서 RNA 결합 단백질 (RZ1a)의 과 발현이 건조 조건 하에서 negative effect를 나타냄과 연관지어볼 때, RNA 결합 단백질은 리폭시지나아제와 무관하게 건조 조건에서 수분손실에 관련되어 있을 것으로 보인다. 항산화 효소 활성이 상처 후 어떤 변화를 보이는지 살펴봤을 때 CAT의 경우에는 세 종류의 벼에서 모두 상처에 의한 활성 증가를 보였고, 리폭시지나아제 형질전환 벼에서는 상처 후 SOD 활성 감소를, 이중 형질전환 벼에서는 POD 활성 감소를 보였다 (표 3-3-3).

4. LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 스트레스 감응 분석

1 M NaCl 처리구에서 AtTip4:1과발현 형질전환 벼는 염에 대한 더 강한 내성을 보였다 (그림 3-4-3). 이들 결과는 애기장대의 AtTip4:1 유전자를 벼에서 과발현 시켰을 때 이 유전자가 직접적으로 염 스트레스 내성기작에 기여하고 있음을 시사한다. 염 스트레스가 주어지면 이 유전자가 더욱 과발현 됨으로서 water channel 역할이 강화되어 세포내외간의 삼투조절이 원활히 작동되어 결과적으로 염 스트레스 내성에 기여했을 것으로 사료된다. 삼투압 스트레스와 관련된 mannitol 실험에서도 비 형질전환 벼에 비해 이중 형질전환 벼에서 mannitol에 대해 더 높은 저항성을 보이는 결과를 나타냈다. 이중 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼 사이에는 큰 차이를 보이지 않고 이중 형질전환 벼에서는 개체간의 차이를 보였다. 건조 조건 하

에서 수분 손실이 일어나는 속도를 비교해 봤을 때, 비 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼에서의 수분 손실 속도는 크게 차이가 나지 않으며, 이중형질전환 벼에서의 수분 손실은 두 식물체에 비해 빠른 속도로 나타난다. 액포막 단백질의 과 발현에 의한 결과로 해석된다. 고온 조건 하에서의 반응을 살펴보았을 때, 리폭시지나아제 형질전환 벼가 비 형질전환 벼와 비교하여 눈에 띄게 민감한 반응을 보였다. 이에 비해 이중 형질전환 벼는 비 형질전환 벼와 유사한 결과를 보이는 것으로 보아 리폭시지나아제 과 발현에 의한 고온 스트레스 하에서의 민감성이 액포막 단백질 과 발현으로 인해 보완된 것으로 사료된다.

5. AtTIP4-1 aquaporin 유전자 분리 및 발현 특이성 분석

주어진 장소에서 평생을 살아야 하는 식물에게 수분은 성장을 결정하는 주요한 요인이다. 따라서 식물은 동물에 비해 매우 복잡한 수분 흡수 및 분배 기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구팀은 Tonoplast Intrinsic Protein(TIP)에 속하는 aquaporin을 애기장대로부터 분리하였다. 이 유전자를 연구를 통해 수분 스트레스에 강한 벼 작물을 개발에 필요한 원천 기술 개발을 위해 AtTIP4-1 유전자 분리 및 형질전환 연구를 실시하였다.

RT-PCR을 통해 분리한 AtTIP4-1 cDNA를 분리하였고 sequencing analysis를 통해 전체 766 bp 길이 가운데 750 bp open reading frame과 249 아미노산을 가지는 단백질을 암호하는 DNA fragment로 DNA sequencing analysis 결과 확인되었다. internet-based program, TRUST를 이용하여 분리한 단백질의 특성 분석 결과 다른 aquaporin 단백질에서 보이는 6개의 transmembrane domain과 head-to-head 배열을 발견하였다. N-terminal half(아미노산 14부터 102까지 89 아미노산을 가지는 부분)는 C-terminal half(아미노산 132부터 215까지 84 아미노산을 가지는 부분)은 서로 구조적으로 유사하며 quasi-twofold axes로 대칭구조를 이룬다 (그림 3-5-1). AtTIP4-1 유전자의 기능을 이해하기 위해서는 그들의 조직 특이적 발현 양상을 이해하는 것이 매우 중요하다. 이러한 조직특이적 발현 양상을 규명하고자 다양한 조직으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot analysis와 Western analysis를 실시하였다. AtTIP4:1 특이적인 항체를 사용하여 애기장대의 뿌리(R), 잎(CL; cauline leaves, RL; rosette leaves), 꽃(F) 그리고 줄기(S)에서 AtTIP4:1 단백질의 발현을 조사하였다. 뿌리에서 AtTIP4:1 단백질이 강하게 발현됨을 확인하였다 (그림 3-5-3).

6. AtTIP4-1 유전자 발현이 증가 혹은 억제된 애기장대 돌연변이 분리

특정 유전자들의 발현양의 변화를 유도한 돌연변이 혹은 과다발현체들의 비교 연구는 해당 유전자의 특성 연구에 매우 중요하다. AtTIP4:1 유전자 과다발현체

및 Knock-out 돌연변이를 분리하여 정상 애기장대와의 비교 연구를 통해 AtTIP4;1 유전자의 식물내에서 기능 이해에 매우 중요하다. 유전학적 방법을 이용하여 AtTIP4;1 유전자의 기능을 연구하고자 Salk institute에서 AtTIP4;1 유전자에 T-DNA가 삽입된 line을 얻었다. 두 개의 gene-specific primers와 하나의 T-DNA specific primer의 조합을 이용하여 PCR analysis를 통해 segregation pool에서 AtTIP4-1 knock-out 돌연변이를 분리하였다. 우선적으로 overexpression(OX) line과 knock-out(KO) line에서 AtTIP4-1 transcripts를 확인하기 위해 Northern blot analysis와 Western analysis를 실시하였다. 정상 조건에서 10일 자란 wild-type, KO 그리고 seedling에서 total RNA를 분리하여 Northern blot analysis를 하였다 (그림 3-6-2). AtTIP4;1 transcript가 정상개체에서는 발견되지 않았다. 이는 AtTIP4;1 유전자의 발현이 매우 낮음을 보여준다. 또한 AtTIP4;1 knock-out 돌연변이에서도 mRNA가 발견되지 않았는데 이는 정상 개체에서도 발견되지 않을 정도로 낮은 mRNA가 KO돌연변이에서 발견되지 않는 것은 일반적이다. 그러나 35S promoter에 의한 과다발현 개체는 강한 AtTIP4;1 transcript 발현을 확인할 수 있었다. 따라서 이상의 실험 결과로 35S promoter에 의한 AtTIP4;1 유전자 과다발현 형질전환 애기장대를 실험적으로 확인하였다. Northern blot analysis에서 AtTIP4;1 KO line의 발현을 적은 transcript 양을 확인하지 못하여 이미 확보한 AtTIP4;1 antibody를 이용하여 KO와 과다발현 개체에서 AtTIP4;1 단백질 양을 확인하였다. AtTIP4;1 단백질이 정상개체에서 검출되었으나 AtTIP4;1 KO line에서는 정상개체에서 발견되는 단백질조차도 발견되지 않는 것으로 보아 AtTIP4;1 KO 돌연변이 임이 확인하였다.

7. AtTIP4-1 유전자 과다발현과 knock-out 돌연변이의 환경 스트레스 반응 및 Urea uptake 증가 실험

많은 생화학적 연구들은 aquaporin 유전자들이 potential gradient에 따라 생체 내에서 물 분자의 흐름과 분배에 관여한다고 알려졌다. 그들의 생리적 기능은 최근에서야 돌연변이 연구를 통해 확인되고 있다. 식물에서 수분 분배에 관여하는 단백질의 생리적 기능을 이해하기 위해서는 다양한 성장 조건에서 특정 유전자 발현 증가 및 억제된 돌연변이를 정상개체와 비교하는 것은 매우 중요하다. AtTIP4;1 유전자의 생리적 기능을 유전학적 접근을 위해 T-DNA insertion에 의한 knock-out line과 over-expression line에 의한 정상 조건에서 식물 성장에 미치는 영향을 확인하였다. 10일, 3주, 그리고 6주에서 loss-of-function mutation과 gain-of-function mutation 개체들은 정상개체와 거의 유사한 양상으로 성장함을 확인하였다 (그림 3-6-4). AtTIP4-1 유전자의 발현량의 변화에 따른 성장 및 발달에는 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. AtTIP4;1 KO와 과다발현 애기장대를 이용하여 가뭄과 같은 환경스트레스에 대한 반응을 조사하였다. 가뭄 조건을 반복적으로

로 동일하게 가하기 위해 식물을 흙에 심지 않고 rock wool에서 키웠다. 정상개체와 KO line은 매우 민감하게 반응하나 과다발현체들은 정상 개체와 비교하여 강한 가뭄 저항성을 보였다 (그림 3-6-5). aquaporin 유전자들은 potential gradient에 따라 물 흐름을 촉진하는 막 단백질로 잘 알려져 있다. 따라서 해당 유전자의 발현량의 변화에 따른 loss-of-function mutation과 gain-of-function mutation이 식물에 미치는 영향을 조사하였다 (그림 3-6-6). AtTIP4-1 유전자의 knock-out 혹은 과다발현이 고염에 의한 스트레스에 크게 영향을 주지 못하는 것처럼 관찰 되었다. 이는 AtTIP4;1 유전자가 환경 스트레스 반응에 중요한 역할을 수행하지 않거나 다른 TIP aquaporin 유전자들이 AtTIP4;1의 기능을 대신해 준다고 생각할 수 있다. 우선적으로 AtTIP4;1 유전자가 식물에서 nitrogen (N) nutrition에 관여하는지 알아보기 위해 N 결핍배지에서 AtTIP4;1 단백질의 발현 변화를 조사하였다 (그림 3-6-7). Western analysis는 AtTIP4;1 단백질은 N 결핍 배지에서 5일 정도 배양하면 증가함을 확인하였다. aquaporin은 높은 농도에서 작용하며 concentration dependent urea uptake에 관여하기 때문에 urea를 liquid fertilizer로 사용하는 경우 그 효과가 크다고 할 수 있다. 3주 성장한 정상개체, T-DNA insertion line, 그리고 AtTIP4;1-overexpressed line에서 잎을 얻어 14C-Urea를 포함하는 배지 넣고 30, 60분 incubation하였다. T-DNA insertion line에서는 정상 개체에 비하여 urea uptake rate 변화가 없으나, AtTIP4;1 overexpression line에서는 71.6%와 90.2%가 증가하였다 (그림 3-6-8).

8. 벼에서 유사 유전자 분리 및 발현 특이성 분석

모든 식물에서 aquaporin 단백질들은 세포내의 수분을 흡수하고 재분배하는데 매우 중요한 기능을 수행한다. 수분 스트레스에 강한 벼 작물을 개발하고자 Tonoplast Intrinsic Protein(TIP)에 속하는 aquaporin을 벼에서 분리하여 특성을 연구하였다. 우선 AtTIP4-1 유전자와 구조를 가지는 벼의 aquaporin 유전자를 기초로 두 개의 gene-specific primer를 제작하였다. 이 primer를 이용한 RT-PCR을 통해 벼에서 aquaporin 유전자를 분리하였다. OsAQP1 유전자의 전체 길이는 839 bp이다. 또한 753 bp 길이를 가지는 open reading frame은 250 아미노산을 암호화하고 있다 (그림 3-7-1). RT-PCR을 통해 분리한 OsAQP1 유전자의 integrity를 확인하기 위해 OsTIP1;1 nucleotide sequence와 비교하였다 (그림 3-7-2). 이 비교를 통해 A273G, A278G, 그리고 G363A 변이가 OsAQP1에 PCR 도중 발생하였음을 확인하였다. 이들 point mutation들은 빨간색으로 표시하였다 (그림 3-7-2). OsAQP1 단백질은 아미노산을 기초로 하여 계산되는 분자량과 pI value는 각각 25.7 kDa와 5.6을 가지는 단백질을 가짐을 알 수 있다. 또한 multiple alignment analysis를 통해 tonoplast intrinsic protein (TIP) subfamily 계열의 aquaporin들과 유사성이 매우 높음을 보여준다. OsAQP1 단백질은 AtTIP4;1과 50% 유사성을 보인다. membrane

plane에 있는 quasi-twofold axis를 중심으로 N-terminal half는 (17 - 108 residues, 92 amino acids)과 C-terminal half (138 - 220 residues, 93 amino acids)은 연결되어있다. 이들 두 개의 symmetric halves들은 그림 #에서 마주보는 화살표로 표시하였다. 거의 모든 aquaporin 단백질에서 발견되는 NPA (Asn-Pro-Ala) motif는 C-terminal half에는 발견되나 N-terminal half에는 NPA 대신에 DPA motif가 발견되었다. 이는 PCR error에 의한 point mutation이라고 생각된다. 어린 벼의 잎 부분과 뿌리 부분을 분리하여 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 하여 조직별 발현 양상을 알아보려고 RT-PCR을 수행하였다 (그림 3-7-4). OsTIP1;1 유전자는 잎과 뿌리에서 거의 유사한 양이 발현됨을 확인하였다. 이는 OsTIP1;1 유전자가 constituous expressed gene임을 시사한다. 애기장대의 AtTIP4-1 유전자와 구조적으로는 유사하나 뿌리에 특이적으로 발현하는 AtTIP4-1 유전자와는 다른 발현 조절 양상을 보였다. 벼의 잎과 뿌리에서 거의 동일하게 OsTIP1;1 유전자가 발현됨을 확인하였다. 많은 aquaporin 유전자들이 환경 스트레스에 대해 발현양이 조절을 받는다고 알려졌다. 우선 어린 동진벼를 다양한 농도의 NaCl에 3 시간 처리한 후 분리한 total RNA를 바탕으로 RT-PCR을 수행하였다 (그림 3-7-5 A). OsTIP1;1 유전자는 고염에 따른 환경 스트레스에 transcripts 양이 변하지 않았다. 다른 조건의 환경 스트레스를 가하기 위해 동일한 발달 단계에 있는 잎을 4°C (그림 3-7-5 B) 혹은 건조한 filter paper위에 (그림 3-7-5 C) 올려 놓고 주어진 시간 뒤에 sample을 취해 total RNA 분리하고 first strand cDNA를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다. 환경 스트레스의 변화에 대해 OsTIP1;1 유전자의 발현양은 변화하지 않음을 확인하였다.

9. 벼의 효율적인 재분화 조건 개발

벼의 성공적인 형질전환을 위해 조직배양에서 배양기간에 따른 callus 형성과 식물체 재생의 효율 및 배양조건을 확립하고 다양한 형질전환의 방법을 시도하기 위하여 본 연구에서는 형질전환시 조건을 다양화 하여 형질전환 수율 및 시간을 단축하는 시도를 하였는데 Callus 유도 시에는 다른 배지보다 2mg/L의 2,4-D가 포함된 N6배지(N6CIM)에서 분열이 더욱 왕성하였으며, 정상 또한 밝은 노란빛을 띤 균일한 양상을 보여주었다. 또한 캘러스가 급격하게 유리화(vitrification)를 막고 갈변화를 극복하기 위한 방법으로 반투명비닐의 sealing film(Whatman) 대신 micropore sealing tape(3M)을 사용하였으며, 그 결과 유리화 및 갈변화율이 현저히 감소되었을 뿐만 아니라, 조밀하고 잘 건조된 최상의 캘러스를 선별할 수 있었다. 항생제 저항성 캘러스를 선별하기 위하여 phosphinotricin(PPT)과 hygromycin 두 종류의 항생제를 단일 처리 및 복합 처리하여 실험한 결과, PPT 만을 선별마커로 사용한 실험구의 경우, 캘러스의 생존율은 약 90.2%로 매우 높게 나타났으며, hygromycin 만을 선별마커로 사용한 실험구의 경우, 캘러스의 생존율은 약 42.1%로 나타났다. 반면,

PPT와 hygromycin을 조합하여 처리한 실험구에서의 캘러스 생존율은 약 28.6%로 현저히 감소되어 나타났다. 따라서 PPT와 hygromycin을 조합하여 처리함으로써 원활한 저항성 캘러스의 선별이 가능함을 나타내었다. 신초를 효과적으로 유도하기 위하여 N6PR 배지에서 2주간 배양한 캘러스를 탄소원으로 sucrose와 sorbitol이 함유된 MS배지(MSR) 및 maltose와 sorbitol이 함유된 MS배지(MMSR) 두가지를 사용하여 배양한 결과 maltose가 함유된 MMSR배지가 sucrose를 함유한 MSR 배지에 비하여 월등히 높은 캘러스 분화능 및 신초의 형성율을 보여주었으며 BAP에 의해 신초의 형성이 활발히 진행되었다. BAP의 농도를 2mg/L로 적정하여 NAA 1mg/L와 조합하여 처리한 결과 항생제 저항성 캘러스로부터 green-like callus(GC)의 발생율은 90.14% 였으며, 이들 green-like callus로부터의 신초 형성율은 74.21%로 나타났다. 또한, 이들 신초 중 91%는 뿌리와 함께 형성되었다.

AY84 유전자가 도입된 형질전환체인 AY84-41, AY84-45 그리고 AY84-56의 3가지 line의 T0 seed를 대상으로 항생제에 대한 저항성을 알아본 결과 hygromycin 50mg/L가 첨가된 형질전환체 선발배지에서 발아력은 약 43.6%였으며 항생제 저항성을 갖는 개체를 대상을 저온 저항성을 테스트 한 결과 약 88.2%가 저온내성을 보였다. 이들 AY84 형질전환체 T1세대의 genomic DNA PCR 검정 결과 AY84-41-1, AY84-41-2, AY84-41-3, AY84-41-4, AY84-45-7 그리고 AY84-45-11에서 Positive control과 같은 위치의 밴드를 확인할 수 있었다. AtTIP4:1 유전자가 도입된 형질전환체 T0 세대의 온실 재배를 통하여 AtTIP4:1-13-1, AtTIP4:1-13-3 그리고 AtTIP4:1-16의 3가지 line의 T0 seed를 확보하여 항생제에 대한 저항성을 검정한 결과 hygromycin 50mg/L가 첨가된 형질전환체 선발배지에서 약 67.8%의 발아력을 보였고 항생제 저항성을 갖는 개체를 대상을 저온 저항성을 테스트 한 결과 약 80.3%가 저온내성을 보였다. 이들 AtTIP4:1 형질전환체 T1세대의 genomic DNA PCR 검정 결과 AtTIP4:1의 positive control과 동일한 위치의 밴드를 확인할 수 있었다.

10. 온실 포장에서 형질전환 벼의 내병성 평가

낙동벼와 각각의 형질전환체에 도열병균을 접종한 후 발생한 도열병의 병발생율을 조사한 결과 wild type인 낙동벼의 경우는 병반 면적율이 약 0.31%였으며 RBP 유전자가 형질전환된 AY84-41 T1과 AY84-56 T1의 경우 각각 0.26% 및 0.29%의 병반면적율을 보여주었다. LOX 단일 형질전환된 T4 seed LOX의 경우는 wild type 보다는 병반면적이 낮았지만 결과의 유의성은 없었다. AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1-13-1 T1과 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 각각 0.32%와 0.26%의 병반 면적율을 보여주었다. 이병율에 있어서도 낙동벼가 가장 높은 이병율을 보여주었고 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 T4 seed LOX와 AtT1p4:1-16 T1는 wild type과 비교하여 낮은 이병율을 나타내었다. 반면에 AtT1p4:1-13-1 T1의 경우에는

이병율에 있어 wild type 별차이를 보이지 않았다. 이러한 사실은 RBP 유전자가 형질전환된 AY84와 AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1의 경우는 도열병에 대한 어느 정도의 병저항성을 나타내지만 각각의 형질전환 라인에 따라 병저항성 유도 능력에 차이가 있음을 의미한다.

낙동벼와 각각의 형질전환체를 대상으로 발못자리 상태에서 도열병균을 접종한 후 발생한 병발생율을 조사한 결과 wild type인 낙동벼의 경우는 병반 면적율이 약 0.34%가 나왔으며 AY84-41 T1과 AY84-56 T1의 경우 각각 0.28% 및 0.27%의 병반면적율을 보여주었다. LOX 단일 형질전환된 T4 seed LOX의 경우는 병반면적율이 0.27%로 wild type과 비교하여 가장 낮은 병발생 경감효과를 보여주었다. AtT1p4:1-13-1 T1과 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 각각 0.29%와 0.3%의 병반면적율을 보여주었으며 wild type과 비교해서도 유의성 있는 수준에서 병저항성을 보여주었지만 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 T4 seed LOX 보다는 병경감 수준이 낮았다. 이병율에 있어서는 낙동벼와 AtT1p4:1-16 T1 가장 높은 이병율을 보여주었고 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 T4 seed LOX와 AtT1p4:1-16 T1는 wild type과 비교하여 낮은 이병율을 나타내었다. AY84와 AtT1p4:1의 경우 발못자리 검정을 통한 도열병에 대한 저항성 유도 능력은 어느 정도 효과가 있음을 확인하였으며 특히 AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1 보다는 RBP 유전자가 형질전환된 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 LOX 단일 형질전환된 T4 seed LOX에서 도열병에 대한 저항성 유도 능력이 우수하다고 판단되어 진다.

온실에서 재배되고 있는 수잉기의 형질전환 벼에 흰잎마름병에 대한 저항성 유도 능력을 알아보기 위하여 가위를 이용한 절엽접종 시험한 결과 wild type인 낙동벼의 경우는 절엽부위부터 하위엽으로 병이 진전되어 나간 병반장의 길이가 약 6.69cm 정도였으며 AY84-41 T1과 AY84-56 T1의 경우 각각 6.25cm 및 6.19cm의 병진전 길이를 보여주었으나 유의성은 없었다. LOX가 단일 형질전환된 T4 seed LOX의 경우는 병반장이 약 6.57cm로 wild type과 거의 동일한 병진전 형태를 보여주었으며 AtT1p4:1-13-1 T1과 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 각각 6.43cm 및 6.25cm의 병진전 길이가 약간 감소한 것처럼 보이지만 wild type과 비교해서 유의성은 없었다. 병이 진전된 병반을 채집하여 병반내에 함유되어 있는 병원성 세균의 함량을 조사한 결과 wild type인 낙동벼가 5.57×10^7 cfu/g으로 가장 많았고 AY84-41 T1는 1.79×10^7 cfu/g으로 가장 낮았다. AY84-56 T1의 경우도 2.57×10^7 cfu/g로 낙동벼와 비교하여 낮은 수준의 균수를 보여주었고 AtT1p4:1-16 T1의 경우도 3.5×10^7 cfu/g으로 낙동벼와 비교하여 유의성 있는 수준에서 감소됨을 확인하였다. 반면에 T4 seed LOX와 AtT1p4:1-13-1의 경우에는 wild type인 낙동벼에 비해 균수는 적었지만 유의성 있는 수준에서 차이를 나타내지는 못하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 기술적 성과

본 연구를 통하여 1) 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환 벼에 glycine을 다량으로 함유한 RNA결합단백질을 encode 하는 AtRZ1a (AY76) 유전자 또는 aquaporin의 한 종류인 AtTip4:1 유전자를 도입시켜 생산한 생산된 LOX/zRBP 및 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 염스트레스, mannitol 스트레스, 건조스트레스에 대한 저항성을 분석하고 두 유전자 역할 간의 상호작용 가능성을 분석하였다. 2) 작물에서 aquaporin 단백질의 과다발현을 통해 작물의 가뭄 스트레스 증가함을 증명하였다. 이러한 사실을 바탕으로 벼를 포함하는 많은 작물에서 수분 스트레스 증가를 인위적으로 유도할 수 있음을 증명하였다. 본 연구팀도 AtTIP4-1 과다발현 애기장대에서 정상개체에 비해 Urea 흡수 속도가 증가됨을 증명하였다. 벼에서 AtTIP4-1과 아미노산 구조가 매우 유사한 OsAQP1 단백질은 조절 면에서 크게 차이가 있음을 확인하였다. 이러한 사실은 aquaporin이 새로운 기능을 밝힌 것으로 수분 스트레스를 넘어 질소계 비료의 흡수 효율을 높여 친환경적 작물 개발에 응용을 위한 추가 연구에 대한 지원이 필요하다고 생각된다. 또한, 본 연구의 결과로 볼 때 RBP 유전자가 형질 전환된 AY84-41과 AQP 유전자가 형질 전환된 AtTIP4:1를 벼에 형질 전환한 결과 도열병에 대한 저항성 유도 능력을 어느 정도 효과가 있음을 확인하였으나 흰잎마름병에 대한 효과는 미비한 것으로 나타났다. 하지만 병반내 흰잎마름병을 일으키는 세균의 밀도에서는 wild-type의 낙동벼와 비교해서 현저하게 감소됨이 확인되었다. 채종된 LOX/zRBP 유전자 및 LOX/AQP 유전자가 도입된 형질전환 벼 종자는 특허권이 인정되는대로 기업화가 가능할 것으로 판단된다. 그러나, 2008년도부터 포트실험외의 포장시험은 허가된 지역에서만 재배가 가능하도록 하는 LMO 관련 법령이 시행됨에 따라 GMO 작물의 시험재배가 규제되고 있어서 기업화를 위한 기술적 문제가 수반되고 있다. 이에 대한 적절한 해결 방안이 모색되어야 하리라고 판단된다.

2. 학문적 성과

본 연구에서는 온도, 수분, 염 등의 복합 스트레스의 극복에 있어서 lipoxygenase, glycine-rich RNA binding protein, aquaporin의 역할을 규명하고, 형질전환 방법을 통하여 복합재해 내성을 지닌 벼를 생산하고자 하였다. 이러한 유전자 기능은 계속적인 연구를 통해 우수한 작물 개발에 응용되어야 한다고 생각한다. 관련 연구들을 전문 연구 잡지와 학회에 “ 제 5 장 연구 개발 성과 및 성과 활용계획, 제 2 절 학문적 측면에서의 성과 ” 에 기술한 바와 같이 보고하였다.

SUMMARY

INTRODUCTION

Most lipoxygenases are non-heme iron-containing dioxygenases that catalyze the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids with a cis, cis-1,4-pentadiene structure (Siedow, 1991; Roshal, 1996; Brash, 1999). Various isozymes of LOX are known in plants, but the physiological functions of specific LOX isozymes are not yet clear. Accumulated evidences suggest that expression of the specific isoform of LOX may play important role in providing specific octadecanoid signaling molecules depending on stress factors. A number of LOX isozymes induced by wounding and/or MeJA are identified, corresponding genes were isolated, and their expressions have been characterized in Arabidopsis, barley, tomato, potato, maize, and others. The detailed cellular and subcellular localization of LOX isoforms has been determined in soybean. The positional specificity of LOX could be an important factor in JA-mediated stress response since the JA biosynthesis requires only C-13 positional specificity and therefore, the biosynthetic pathway of JA can be distinguished from other pathways by the positional specificity of the LOX. Several studies have focused on the biological role of 13-LOX. For example, studies on antisense-mediated depletion of 13-LOX proved that the 13-LOX pathway plays an instrumental role in the regulation of wound-induced gene expression in potato plants. Chloroplast 13-LOX induced by MeJA was also activated by salicylic acid (SA), and metabolic profiling of oxylipins demonstrated that SA stimulates conversion of 13-hydroperoxyoctadecatri(di)enoic (HPOT(D)) acid into 13-hydroxyoctadecatri(di)enoic (HOT(D)) acid, which blocks JA biosynthesis. In barley and cucumber, esterified fatty acids are preferentially oxygenated by 13-LOX instead of 9-LOX, suggesting that 13-LOX could be involved in the degradation of stored lipids.

Proteins that contain RRM in the N-terminal half and a glycine-rich region in the C-terminal half (glycine-rich RNA-binding proteins; GRPs) have been described in plants including maize, Arabidopsis thaliana, tobacco, barley, Brassica, leafy spurge and alfalfa. Although the function of these proteins was not characterized in detail, it has been suggested that some may play a role in stress responses, as their mRNA levels increased following exposure to a

variety of environmental stresses, including cold, wounding, water stress, phytohormones, viral infection, UV radiation and heavy metals. This has led us to hypothesize the possible involvement of GRPs in plant responses to changing environmental conditions. However, understanding of their functions and importance in stress responses is severely limited due to the lack of clear in vivo functional data. The Arabidopsis genome encodes 196 RRM-containing proteins, of which 27 are classified as glycine-rich and small RRM-containing proteins. Recently, we have shown that an Arabidopsis GRP, designated atRZ-1a, affects seed germination and seedling growth at low temperatures, and plays a role in the enhancement of freezing tolerance of Arabidopsis plants, demonstrating a role of GRP in plant responses to environmental stress.

Two major pathways for urea uptake in yeast cells: one is an active transport system with a rather low K_m of 14 mM, while the other is a passive transport system that operates at concentrations above 0.5 mM. Active transport is the predominant route of urea entry at extracellular concentrations below 0.25 mM. Besides energy-dependent pathway in plant roots, urea uptake is also mediated through facilitative urea transporters. Two aquaporins from tobacco, NtPIP1 and NtTIPa, stimulated ^{14}C -urea fluxes when expressed in *Xenopus* oocytes (Eckert et al, 1999; Gerbeau et al., 1999). In yeast complementation, which used an expression library from zucchini, an aquaporin belonging to NIP subfamily was identified (Klebl et al., 2003). The heterologous complementation of a urea uptake-defective yeast mutant made it possible to isolate genes encoding aquaporins from a cDNA DNALibrary from Arabidopsis (Liu et al., 2003). Even though heterologous experiments have shown that several plant aquaporins serve as urea transport in yeast and *Xenopus* oocytes, their physiological functions still remain elusive in plants. Several TIP aquaporin genes of Arabidopsis have been identified by their ability to complement the urea uptake-defective yeast. This could be attributed, at least partially, to the high abundance of TIP cDNAs in the library used for yeast complementation experiments. The high expression of *AtTIP1;1*, *AtTIP1;2* and *AtTIP2;1* was confirmed by Northern blot analysis and/or the existence of several ESTs (Quigley et al., 2002 Liu et al., 2003). On the other hand, *AtTIP4;1* transcript was shown to be very low expressed. These findings might reflect higher potential of *AtTIP4;1* products for urea transport. To further understand the physiological roles of aquaporins in urea uptake in plant, we examined expression pattern of *AtTIP41* gene in Arabidopsis.

In order to produce transgenic rice plants with broad spectral abiotic

stress-tolerance with temperature, water, salt, we introduced genes of glycine-rich RNA-binding protein (zRBP) or aquaporin(AtTIP4;1) to the transgenic rice plant overexpressing dual positional specific lipoxygenase and analyzed responses to temperature, water, salt and other oxidative stress of double transgenic rice plants.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Analysis of double transgenic rice plants overexpressing LOX and zRBP genes

Previous study indicated that the nontraditional positional specificity of wound- and MeJA-responsive maize LOX is involved in response to abiotic and biotic stresses. The double transgenic rice plant overexpressing LOX and zRBP genes showed the increased resistance toward salt stress, osmotic stress by mannitol. In terms of the activation of antioxidative enzymes, the catalase activity was increased while the peroxidase activity was decreased in the double transgenic rice plants. Results indicated that the lipoxygenase gene may interact with the introduced zRBP gene for the activation of antioxidative enzymes and stress-resistance mechanism.

2. Analysis of double transgenic rice plants overexpressing LOX and AQP genes

The AQP gene homologous to AtTIP4:1 was isolated from rice and their high level of expression pattern was confirmed in root. The double transgenic rice plant overexpressing LOX and AQP genes showed the increased resistance toward salt stress, osmotic stress by mannitol. Interestingly, the sensitivity of transgenic rice plants overexpressing LOX could be compensated by double transgenic expression with AQP. Results indicated that AQP is possibly related to the functional expression of LOX regarding the activation of antioxidative enzymes.

3. Aquaporin and urea transport in water stress

We undertook reverse genetic approaches to study the biological function of *AtTIP4;1* in urea uptake, and growth and development in plants: (1) analysis of its expression in various organs and under nitrogen defective conditions (2) isolation of loss-of-function and gain-of-function mutation in *AtTIP4;1* in *Arabidopsis* (3) determination of the effect of its loss-of-function and gain-of-function mutation on growth and developments, and on urea uptake in

plants. We showed that expression of *AtTIP4;1* products was highly restricted to root and apical meristem. Western blot analysis also revealed induction following nitrogen starvation for 5 d, suggesting a possible physiological roles of *AtTIP4;1* in plant nitrogen nutrition. We also provided evidence that increase in urea-uptake rate could be achieved from overexpression of *AtTIP4;1* without detectable defects in growth and development in *Arabidopsis*. These results suggest that *AtTIP4;1* products might play a role in urea accumulation in vacuole for transient storage of nitrogen source. This report also shows the possible way to improve urea utilization as nitrogen fertilizer through overexpression of genes encoding aquaporins in plants. However, these observations raise several questions about its function and regulation in plants. Aquaporins have been shown to function as urea transport only under relatively high concentration of urea. However, urea is rapidly degraded to ammonium and CO₂ by urease secreted by microorganisms in nature (Watson et al., 1994). This biological activity keeps urea concentration very low, ranging between 0.1 – 0.3 mM (Mitamura et al., 2000). If it is, then there must be the existence of urea transport systems to mediate active transport. Heterologous complementation study of urea uptake-defective yeast showed that *AtDUR3* products conferred yeast growth on 2 mM urea and mediated proton-stimulated urea transport (Liu et al., 2003). This active transport system might mediate high urea accumulation in cytoplasm from environments with low concentrations of urea. We can speculate that *AtTIP4;1* products would contribute to high accumulation of urea in vacuole through facilitating passive transport using potential gradient generated by active transport systems. Even though urea uptake was increased by its overexpression, it cannot be ruled out that urea might not be an endogenous substrate for *AtTIP4;1* products under normal conditions. Northern and Western blot analysis showed the very low expression level of *AtTIP4;1* products in normal conditions and under nitrogen deficient conditions. This low expression level might be adverse for rapid transport of urea under nitrogen deficient conditions. The expression level suggests its possible transport of uncharged organic molecule with structure similar to urea. This broad spectrum of substrates might allow increase in urea-uptake rate in transgenic plants overexpressing *AtTIP4;1*. Recent reports have shown that plant aquaporins promote the membrane transport of small substances like CO₂, hydrogen peroxide, boron or silicon (Uehlein et al., 2003; Ma et al., 2006; Bienert et al., 2007). Resolving their substrate specificity and the connected physiological function would give an opportunity for a better understanding of plant

physiology and response to environmental changes. Biochemical studies with *AtTIP4;1* knock-out and overexpressed plants would provide essential information for its endogenous substrates in Arabidopsis.

3. Analysis of double transgenic rice plants toward biotic stresses

The transformation efficiency could be increased by using N6CIM medium micropore sealing tape from 3M Co. Both of phosphinotricin(PPT) and hygromycin were used as selection markers. Rooting and regeneration were most effective in MMSR medium with 2mg/L of BAP and 1mg/L of NAA. With this optimized conditions, double transgenic lines with AY-84-gene, AY84-41, AY84-45, AY84-56 lines were produced and its expression was confirmed by PCR. Based on evaluation results in paddy field and green house, resistance toward of blast fungi was increased in AY84-41 T1 and AY84-56 T1 lines. Eventhough the resistance toward bacterial blight was not observed in double transgenic lines, the number of infected spots were remarkably decreased.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Research	2
1. Purpose and aims of reaserch	9
1.1. Purpose	9
1.2. Aims	3
1.3. Strategy	3
Chapter 2. Current status of related research	4
1. Stage of research	5
2. Status of related technologies	5
Chapter 3. Results of research	4
1. Analysis of drought and salt–resistance of LOX TR	6
1.1. Analysis of drought resistance of LOX TR	5
1.2. Analysis of salt resistance of LOX TR	5
2. Microarray analysis of LOX TR	59
3. Production and stress responsive analysis of LOX/zRBP TR	66
3.1. Production of LOX/zRBP TR	66
3.2. Stress response of LOX/zRBP TR toward salt	68
3.3. Stress response of LOX/zRBP TR toward osmotic stress with mannitol	69
3.4. Stress response of LOX/zRBP TR toward drought stress	70
3.5. Activation of antioxidative enzymesby wound stress in LOX/zRBP	71
3.6. Analysis of hydrogen peroxide accumulation by wound stress in LOX/zRBP	73
4. Production and stress responsive analysis of LOX/AQP TR	74
4.1. Production of LOX/AQP TR	74
4.2. Stress response of LOX/AQP TR toward salt	76
4.3. Stress response of LOX/AQP TR toward osmotic stress with mannitol	78
4.4. Stress response of LOX/zRBP TR toward drought stress	79
4.5. Stress response of LOX/zRBP TR toward high temperature stress	79
4.6. Activation of antioxidative enzymesby wound stress in LOX/AQP	80
4.7. Analysis of hydrogen peroxide accumulation by wound stress in LOX/zRBP	81

5. Production and confirmation of knock-out mutant and overexpressed line of TIP4-1 aquaporin gene in Arabidopsis	8
5.1. Isolation of AtTIP4-1 gene and construction of binary vector	38
5.2. Production of AtTIP4-1 antibody	58
6. Analysis of knock-out mutant and overexpressed line of TIP4-1 aquaporin gene in Arabidopsis	88
6.1. Analysis of knock-out mutant and overexpressed line of AtTIP4-1 gene by Northern analysis and Western blot analysis	8
6.2. Analysis of growth and development of knock-out mutant and overexpressed line of AtTIP4-1 under drought and salt stress	29
6.3. Analysis of urea uptake of knock-out mutant and overexpressed line of AtTIP4-1	9
7. Isolation and expression pattern of TIP4-1 homologs in rice	79
7.1. Isolation of TIP4-1 homologs in rice	79
7.2. Tissue specific expression pattern of TIP4-1 homologs in rice	101
8. Development of efficient rice transformation techniques	110
8.1. Development of efficient regeneration condition	110
8.2. Development of efficient rice transformation condition	110
8.3. Confirmation of transgenic plants	110
9. Evaluation of infection resistance in green house	116
9.1. Evaluation of blast-fungi resistance of TR	116
9.2. Evaluation of blast-fungi resistance of TR in paddy field	118
9.3. Evaluation of bacterial blight of TR	122
Chapter 4. Achievement of aims and contribution to related fields	127
1. Achievements of specific aims	127
1.1. Aims, evaluation scores and achievements of the first year research	127
1.2. Aims, evaluation scores and achievements of the second year research	128
1.3. Aims, evaluation scores and achievements of the third year research	129
1.4. Overall evaluation on achievements of the research	131
2. Contribution to related areas	131
Chapter 5. Application of results	132
1. Technical aspects	134
1.1 Technical achievements	134
1.2. Futher studies and Industrialization	134

2. Academic aspects	136
2.1. Academic journals	136
2.2. Patents	137
2.3. Conferences	137
Chapter 6. Information collected from abroad during the research period	141
1. Lipoxygenase and cold-tolerance	143
1.1. Lipid unsaturation and lipoxygenase	143
1.2. Regulation of lipoxygenase and Ca^{2+} under stresses	143
2. Water stress and lipoxygenase	144
1.1. Lipoxygenase gene induced under water stress	144
Chapter 7. References	145

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	29
1. 연구개발의 목적 및 필요성	29
2. 연구개발의 목표 및 내용	33
3. 연구개발의 추진 전략·방법 및 추진체계	38
제 2 장 국내외 기술개발 현황	48
제 1 절 연구의 수준	50
제 2 절 국내외의 관련 기술 현황	51
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	54
제 1 절 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내건성 및 내염성 분석	56
1. 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내건성 분석	56
2. 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내염성 분석	57
제 2 절 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 microarray 분석	59
제 3 절 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 창출 및 스트레스 감응분석	66
1. LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 창출	66
2. 염 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 반응	68
3. Mannitol에 의한 삼투압 스트레스에 조건에서 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 반응	69
4. 건조 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의반응	70
5. 상처 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼에서 항산화 효소 활성의 변화	71
6. 상처 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼에서 과산화수소의 축적 분석	73

제 4 절 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 창출 및 스트레스 감응 분석	74
1. LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 창출	74
2. 염 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응	76
3. Mannitol 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응	78
4. 건조 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응	79
5. 고온 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응	79
6. 상처 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼에서 항산화 효소 활성의 변화	80
7. 상처 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼에서 과산화수소의 축적 분석	81
제 5 절 애기장대에서 TIP4-1 aquaporin 유전자 knock-out 돌연변이 및 과다발현체 제작 및 검증	83
1. 애기장대 AtTIP4-1 유전자 분리 및 TIP4-1 유전자 벼와 애기장대 형질전환체를 위한 binary vector 제작	83
2. 애기장대 AtTIP4-1 단백질 항체 제작	85
제 6 절 분리된 애기장대 TIP4-1 aquaporin knock-out 돌연변이 및 과다발현 형질전환체의 특성분석	88
1. Northern analysis 및 Western blot analysis를 통한 AtTIP4-1과다 발현과 knock-out 돌연변이 애기장대에서 TIP4-1 단백질 및 전사체 발현 검증	8
2. 정상 조건 및 가뭄, 고염과 같은 환경 스트레스 조건에서 AtTIP4-1 과다발현과 knock-out 돌연변이 애기장대 성장 및 발달 양상 검증	92
3. AtTIP4-1 과다발현과 knock-out 돌연변이 애기장대에서 Urea 흡수 정도 비교 검사	94
제 7 절 벼에서 애기장대 TIP4-1 유전자와 유사한 aquaporin	

유전자 분리 및 발현 특이성 규명	97
1. 애기장대 AtTIP4-1 유전자와 비슷한 구조를 가지는 유전자를 벼로부터 분리	97
2. 조직별 및 환경스트레스에 대한 벼 aquaporin 유전자의 발현 양상 규명	100
제 8 절 효율적인 벼 형질전환 조건 개발	103
1. 벼의 효율적인 재분화 조건 개발	103
2. 벼의 효율적인 형질전환 조건 개발	105
3. 형질전환 벼의 검정	110
제 9 절 온실 포장에서 형질전환 벼의 내병성 평가	116
1. 형질전환 벼의 도열병 저항성 검정	116
2. 도열병 발못자리 검정	119
3. 벼 흰잎마름병 저항성 검정	122
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	125
제 1 절 목표 달성도	127
1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	127
2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	128
3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	129
4. 최종평가의 착안점 및 목표 달성도	130
제 2 절 관련 분야에의 기여도	131
제 5 장 연구개발성과 및 성과활용계획	132
제 1 절 기술적 측면에서의 성과	134
1. 기술적 성과	134
2. 추가 연구의 필요성 및 기업화 방안	134
제 2 절 학문적 측면에서의 성과	136
1. 학술지	136
2. 특허	137
3. 학술회의 발표	137

4. 본 연구팀에서 발표된 논문의 인용 정도	139
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	141
제 1 절 lipoxygenase 와 저온 저항성	143
1. 세포막의 불포화도 와 lipoxygenase	143
2. 스트레스조건에서 lipoxygenase와 Ca ²⁺ 의 조절	143
제 2 절 수분 스트레스와 lipoxygenase	144
1. 수분 스트레스 조건에서 유도되는 lipoxygenase 유전자	144
제 7 장 참고문헌	145

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적 및 필요성

화석연료 등 각종 에너지 사용이 폭발적으로 증가함에 따라 지구환경이 과거와는 달리 급속도로 바뀌어 가고 있다. 이들 기상이변은 농업생산에 막대한 피해를 입히고 있으며 유엔환경계획(UNEP)은 지구환경전망 2000 보고서에서 인류가 직면 할 가장 중요한 양대 과제는 「물 부족」 과 「지구 온난화」 가 될 것이라고 전망한 것처럼 물의 소중함에 대한 지구적 관심이 갈수록 증가하고 있다. 물 문제는 지구촌의 미래를 결정짓는 가장 소중한 자원이며, 전 세계적인 문제로 대두되고 있다. 인구의 증가, 경작지 감소 그리고 기상이변 등에 의한 식량부족은 피할 수 없는 현실로 다가오고 있다. 식량 산업은 사회 안전을 담보로 하는 기초산업으로, UR 협상 이후 세계적으로 급변하고 있는 쌀 시장에 적극 대응하기 위해서는 쌀의 생산비 감소를 통한 농업 경제성 향상은 가장 시급한 당면 과제 중의 하나이다.

1) 복합재해 저항성 벼 연구의 필요성

벼는 보리·밀과 함께 세계적으로 중요한 작물로서 세계 총생산량의 약 92%는 아시아 여러 나라에서 생산되며, 한국인의 주식으로 농업적 경제적 가치가 매우 높은 작물이다. 최근 비만 등 성인병 발병의 증가와 더불어 벼를 주식으로 하는 다이어트에 대한 관심이 증대되면서 벼 품종 개량 및 복합 재해 내성 연구를 통한 벼의 생산성을 증진시키고자 하는 연구가 요구되고 있다. 복합 재해 내성 유전자를 활용한 벼 품종의 개발에 관한 연구는 생산성 저하 및 재배 면적 제한을 극복하고 재배 시기 조절의 어려움을 해소하는 등 중요성이 있으며, 통일을 대비하여 북방 농업을 위한 국가의 미래 식량 수급 전략을 위해서도 중요하다. 특히, 벼의 게놈 크기는 430 Mb로서 비교적 작아서 다른 단자엽 식물의 모델로 사용되기 적합하며, 벼 염색체 12개의 염기서열 draft가 TIGR (The Institute for Genome Research)에 발표되어 있으므로 게놈 연구 및 기능 단백질 연구에 적합한 대상이라고 할 수 있다.

본 연구팀은 다년간 벼를 비롯한 식물의 스트레스 저항성에 관여 하는 유전자 발굴 및 형질전환 식물체의 개발을 수행한 경험과 지식을 바탕으로 (Agrawal et al., 2004; Song et al., 2004; Chandru et al., 2003) 광범위 스트레스에 대한 저항성 및 저온에 내성을 보이는 벼 유전자를 확보하고 병해 뿐 만 아니라 저온에도 복합적으로 내성을 보이는 벼를 개발하고자 하였다.

2) 복합재해 저항성 벼의 개발은 이론적으로 가능한가?

여러 가지 종류의 스트레스에 대하여 모두 저항성을 지니는 식물체의 개발을 위해서는 이들 다양한 조율의 스트레스 인자들이 공통적으로 지니는 생물학적

현상이 존재함으로서 이론적으로 수월하게 된다. 비정상적인 수분 조건과 온도 조건에 의하여 야기되는 건조, 저온, 염 등의 서로 다른 스트레스 인자는 스트레스 신호의 인지, 전달, 극복의 과정에서 하나의 경로로 표현됨을 알 수 있으며, 다양한 이들 스트레스 요인은 대체로 산화스트레스 신호의 인지, 전달, 극복의 과정이라고 하는 공통점을 지닌 비생물적 스트레스로 간주 될 수 있다(그림 1-1-1). 따라서, 작물의 성장에 있어서 대표적 재해인 온도의 변화(저온 또는 고온 스트레스), 수분의 공급(건조 스트레스), 염 농도의 변화(salt stress)에 대한 저항성을 복합적으로 증진시킬 수 있는 방법은 이론적으로 가능하며, 다양한 종류의 재해에 대한 저항성을 동시에 지니는 작물을 개발 할 수 있다는 측면에서 효율성이 높다고 할 수 있다.



그림 1-1-1. 산화 스트레스에 의하여 공통적으로 연결될 수 있는 복합재해 저항성 (내냉성, 내건성 및 내염성).

3) 리폭시지나아제 과대발현 형질전환 벼를 재료로 연구하는 이유

스트레스 인자가 도달되는 최초의 장소는 세포막이므로 스트레스 신호의 출발은 세포막에서부터 시작되는 것이 일반적이다. 따라서, 세포막에 존재하는 막단백질들이나 세포막을 이루는 불포화 지질 분자는 스트레스 신호전달 cascade의 초기에 위치함이 일반적이다. 특히, 세포막을 구성하는 불포화 지질 분자의 산화는 peroxide 등의 활성 산소종을 생성하여 세포막의 산화적 파괴를 유도하기도 하지만, 중요한 신호 전달 매개 물질인 과산화수소 생성과도 연결되고, 리폭시지나아제 경로를 통하여 C6-알데히드, 자스몬산 등 스트레스 극복 물질들을 생성하기도 한다 (Lee et al., 2005; Lee et al., 2004; Kim et al., 2003). 복합재해로 고려되는 저온, 고온, 건조, 염 스트레스 등이 공통적으로 산화스트레스의 한 부분적 표현이므로, 세포막 산화의 대표적 예인 리폭시지나아제는 복합재해 저항성 기작에서 핵심적 역할이 기대되었다.

본 연구팀은 스트레스 감응 octadecanoid pathway 연구에 있어서 단자엽 식물의 중요성을 인지하고, 그동안 벼와 옥수수 등의 단자엽 식물에서 octadecanoid

pathway의 초기단계에 위치하는 lipoyxygenase (MzLOX)와 allene oxide synthase (AtAOS) 유전자의 클로닝 및 이들 유전자에 의하여 encode되는 단백질의 특성을 규명하여 왔으며, 리폭시지나아제가 과대발현되고 유전적으로 안정한 형질전환 벼를 T3 세대까지 육성하여 왔다 (Kim et al., 2003; Song et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 리폭시지나아제를 과대 발현시킨 형질전환 벼를 실험 재료로 사용하여, RNA-결합 단백질 유전자, aquaporin 유전자가 추가적으로 도입된 복합재해내성 형질전환 벼를 생산하고자 하였다.

4) 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자를 이용하는 이유

저온은 가뭄, 고염분과 함께 작물의 생산성을 저해하는 가장 주요한 스트레스의 하나로, 특히 벼의 경우 냉해로 인한 작물의 생산성 저하 및 재배 면적 제한, 재배 시기 조절의 어려움 등 많은 문제점이 있다. 식물체가 저온스트레스에 노출되면 일련의 반응을 통하여 저온내성 유전자의 발현이 조절되는데, 유전자 발현의 조절은 전사인자(transcription factor)를 통한 전사단계의 조절과, 전사된 mRNA의 가공(processing), 안정성(stability) 및 번역(translation) 등 전사 후 단계의 조절로서 이루어진다. 지금까지의 연구는 주로 스트레스에 반응하는 유전자의 특정 염기서열(cis-element)을 규명하고 이 cis-element에 결합하는 단백질(trans-acting factor)을 찾고 그 기능을 규명하는 등 전사과정과 연관된 연구가 주로 이루어지고 있다. 이러한 연구결과, 저온 신호 전달에 관여하는 유전자의 발현 양상과 그 기능이 조금씩 밝혀지고 있으며, 전사인자 유전자를 형질전환 시킨 식물체가 저온에 내성을 가진다는 보고가 있어 저온 내성 작물의 개발이 가능할 것이라는 기대를 낳고 있다. 그러나 유전자의 발현은 전사단계에서 뿐만 아니라, 전사된 mRNA의 가공, 안정성 및 번역 등과 같은 전사 후 단계에서의 조절 또한 전반적인 유전자의 발현 및 조절 측면에서 매우 중요하다.

전사 후 유전자의 조절은 RNA와 이에 결합하는 단백질간의 상호작용으로 이루어지는데, 이러한 단백질을 RNA-결합 단백질이라 한다. 특히 저온 스트레스 하에서 식물체가 전사 후 단계의 조절을 통하여 어떻게 저온을 극복하는지를 연구하는 것은 저온 스트레스 내성 작물의 개발을 위하여 반드시 필요하다. 저온 스트레스 하에서 RNA의 가공, 안정성 및 번역에 관여하여 저온 스트레스 내성에 관여할 것으로 여겨지는 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 발굴하고 그 기능을 밝히는 연구는, 전사 후 조절을 통한 저온 스트레스 내성 기작을 규명하고 이를 활용한 저온 내성 작물의 개발을 위해 대단히 중요하다.

저온 내성 유전자를 활용한 내냉성 벼 품종의 개발에 관한 연구는 생산성 저하 및 재배 면적 제한을 극복하고 재배 시기 조절의 어려움을 해소하는 등 중요성이 있다. 향후 남북한이 통일이 되어 북한의 식량을 지원해야하는 상황이 되었을 때, 저온 내성 벼 품종의 필요성은 더욱 가시화될 것이다. 이러한 상황을 고려할 때 국내외적으로 아직 시도되지 않은 전사 후 유전자 조절이라는 새로운 개념을 활용

하여 저온 내성 벼 품종을 육성할 수 있는 기술을 개발하는 것은, 벼의 생산성 제고를 통한 농가의 소득향상 뿐만 아니라 통일을 대비한 국가의 미래 식량 수급 전략을 위해서도 중요하다. 저온 내성 벼 품종 육성기술의 개발은 국내외적으로 기술을 인정받을 수 있으며, 갈수록 거세지고 있는 농업의 개방 압력에 대응하여 독자 개발한 기술을 활용하여 고부가가치 작물의 개발을 가능케 하여, 우리나라 농업의 경쟁력을 높이는데 필요하다. 갈수록 줄어만 가는 농업인구를 고려할 때, 노동절약형 작물의 개발은 상대적으로 중요한 의미를 갖는다. 본 연구는 사회적으로도 선진 농업으로 향하는 중요한 발판을 마련한다는 측면에서 필요하다.

5) Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질 전환 벼 개발연구의 이유

가뭄과 고염을 포함하는 환경 스트레스는 식물의 분포를 결정하는 가장 중요한 요인이다. 가뭄에 의해 세계적으로 전체 수확량의 10% 이상이 감소되며 열대와 아열대 지역에서는 전체 수확량의 20% 이상이 감소된다. 역설적이지만, 이들 수분 부족 극복을 위한 관개시설은 제한된 경작지에 식물의 성장을 억제하는 고염 스트레스를 야기한다. 잘못된 관개시설과 과도한 비료의 사용에 의한 고염 피해는 전체 경작지 감소의 20%에 해당한다. salinity를 증가시키는 다른 요인들로 광산으로부터의 수분 유입, 산림 훼손 등의 인위적 요인을 들 수 있다. 이러한 경작지의 염분 축적은 경작지 감소의 가장 큰 요인이다(Jones 1981).

뿌리에서 흡수된 수분은 세포벽을 따라 이동하는 apoplastic pathway와, 세포와 세포사이를 지나서 이동하는 symplastic pathway 및 transcellular pathway 등 세 가지로 구분된다(Steudle et al., 1998). 다양한 수분 이동경로의 의존도는 식물체의 종류에 따라 달라지는 것으로 보고 되어 있으나, 최근의 연구결과 가뭄 등 환경스트레스에 노출된 식물체의 경우에는 뿌리의 cell-to-cell 경로인 symplastic pathway를 이용하여 수분의 섭취가 이루어진다는 알려졌다. 뿌리가 토양 수분을 흡수하기 위해 세포막 단백질, aquaporin (water channel)을 필요로 한다. 대부분의 식물은 30여개 이상의 aquaporin 유전자를 가지고 있다고 알려졌다(Yamada et al., 1995). 아기장대의 aquaporin 유전자들은 다양한 환경 스트레스와 식물 성장 호르몬에 대해 특이한 시, 공간적 발현 양상을 보인다. 또한 overexpression과 antisense를 이용한 transgenic plant 연구들은 수분 부족에 의한 스트레스에서 aquaporin은 수분 흡수, 분배, 그리고 회복 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려졌다.

2. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 성격

1) 연구의 총괄 목표

본 연구팀은 다년간 벼를 비롯한 식물의 스트레스 저항성에 관여 하는 유전자 발굴 및 형질전환 식물체의 개발을 수행한 경험이 있고, 본 연구 수행을 위하여 관련된 지식을 충분히 확보하고 있으며, 연구에 필요한 재료와 시설도 완벽하게 갖추고 있다. 그림 1-1-1에서 언급된 스트레스에 대한 복합재해 내성 벼를 개발하기 위하여 그림 1-1-2에 설명된 바와 같이 산화스트레스, 온도스트레스, 수분스트레스가 각각 연결 될 수 있는 LOX, zRBP, AQP 유전자를 이용하여 다음과 같은 최종 연구 목표를 달성하고자 하였다 (그림 1-1-2).

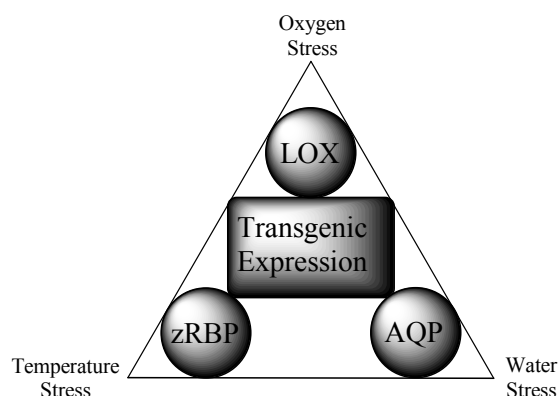


그림 1-1-2. 온도(zRBP), 수분(AQP), 산화 스트레스(LOX) 조절을 위하여 각 세부과제에서 사용되는 유전자 및 연구방법의 상호 연관성.

- ▶ LOX 형질전환 벼에서 특이하게 발현이 유도 또는 감소되는 단백질에 대하여 분석하고 복합재해 내성과의 상관관계를 분석한다.
- ▶ zinc finger RNA-결합 단백질(zRBP) 유전자의 저온 유도성 발현 및 저온 내성 기능을 규명한다.
- ▶ LOX 형질전환 벼를 재료로 사용하여 zRBP 유전자를 사용하여 형질전환 함으로써, LOX와 zRBP가 동시 발현되는 형질전환 벼를 생산한다.
- ▶ LOX 형질전환 벼를 재료로 사용하여 LOX 와 aquaporin (AQP)이 동시 발현되는 형질전환 벼를 생산한다.
- ▶ 생산된 각각의 형질전환 벼에서 발현이 유도 또는 감소되는 단백질을 분석한다.
- ▶ 생산된 형질전환 벼에 대하여 저온, 가뭄, 염, 산화 스트레스에 대한 내성을 평가하고 복합재해 저항성 벼를 생산한다.

2) 연구의 세부 목표

본 세부 과제의 최종목표는 이미 모델 식물인 애기장대에서 기능이 알려진 유전자들을 벼에 도입하여 다양한 종류의 환경 스트레스에 대한 내성을 부여함으로써 복합재해 내성 벼를 생산함에 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해 다음과 같은 특정목표를 설정하였다.

(1) 제 1 세부과제: 리폭시지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질전환 벼의 개발

- ▶ 이미 확보하고 있는 LOX 형질전환 벼의 내냉성, 내건성, 내염성을 분석한다.
- ▶ microarray 방법으로 LOX 형질전환 벼에서 특이하게 유도 또는 감소되는 유전자를 분석한다.
- ▶ microarray 결과와 스트레스 내성의 결과를 비교 분석함으로써 유전자 발현과 스트레스 내성을 상호 비교 분석한다.
- ▶ LOX/zRBP가 동시 발현되는 형질전환 벼를 생산한다.
- ▶ LOX/zRBP double transformant에 대한 내한성, 내냉성, 내염성을 분석한다.

(2) 제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 개발

- ▶ 애기장대로부터 이미 분리하여 기능을 확인한 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 벼에 형질전환하여 저온 내성 형질전환 벼를 확보한다.
- ▶ zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 도입한 형질전환 벼를 확보하여 유전자의 발현과 저온 내성과의 상관관계를 규명한다.
- ▶ 애기장대의 aquaporin 유전자를 벼에 도입한다.
- ▶ 유사 유전자를 벼에서 분리하고 그들의 발현 양상과 활성 연구를 통해 그들의 기능을 규명한다.
- ▶ aquaporin 형질전환 벼에 대한 내한성과 회복 과정에서 aquaporin의 기능을 규명한다.

(4) 협동1 과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질전환 벼의 내냉성 및 내병성 평가

- ▶ 효과적인 형질전환 방법 및 homo line 생산 기술 확보
- ▶ 품종과 사용되는 조직, vector, *Agrobacterium* strain 등 조건에 따fms 재분화시 배지 및 생장조절 물질 등 형질전환 효율 증대
- ▶ 병저온 복합내성을 가지는 형질전환제 개발 및 실용화 분석

- ▶내생성 및 내병성 검정: 전라남도 농업기술원의 고조도 식물생장상을 이용하여 도열병과 흰잎마름병을 인공접종하고 실내유묘검정을 실시하여 저항성 평가 실시
- ▶자연발병과 인공접종의 2가지 방법으로 포장저항성을 평가 실시
- ▶병해 내성 및 저온 내성 형질전환 벼의 내생성 및 내병성 검정 및 생육과 수량성 평가

나. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

<1차년도(2006년도)>

세부과제 구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위
제 1 세부과제: 리폭시지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질전환 벼의 개발	- 형질 전환 LOX의 내생성, 내건성, 내염성 분석 및 microarray 분석	-이미 확보하고 있는 LOX 형질전환 벼의 내생성, 내건성 내염성을 분석한다. -microarray 방법으로 LOX 형질전환 벼에서 특이하게 유도 또는 감소되는 유전자를 분석한다.
제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 개발	-저온 내성 zinc finger RNA-결합 단백질 및 aquaporin 유전자를 이용한 형질전환	-이미 확보하고 있는 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자 벼로 도입 -aquaporin 유전자 벼로 도입 -형질전환체에서 외래 유전자 발현과 내성 관계 분석
협동1 과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질전환 벼의 내생성 및 내병성 평가	-효율적 벼의 재분화 조건 개발 - 병 및 저온 내성 유전자의 형질전환 (1,2 세부과제로부터 제공받음)	-조직 재분화율 비교 -hormone 농도, 비율 및 기타 배지 조성 물질 변화 -형질전환 효율 비교: Agrobacterium strains; pre-culture, co-cultivation time; Vectors; selection markers; Transformation method

<2차년도(2007년도)>

세부과제 구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위
제 1 세부과제: 리폭시 지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질전환 벼의 개발	-LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 생산	<ul style="list-style-type: none"> - zRBP 발현을 위한 벡터 제작 - LOX/zRBP 동시발현 형질전환 - LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 생산
제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 개발	-zRBP 및 AQP 유전자를 이용한 형질전환 및 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자의 내 냉성 및 내한성 기능 확인 - 벼에서 AQP 유사 유전자 분리 - 유사 유전자 발현 연구
협동1 과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질전환 벼의 내냉성 및 내병성 평가	<ul style="list-style-type: none"> -유전자 형질전환율 향상 -병, 저온 복합내성 유전자 형질전환 -병해 저항성 검정 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - callus 형성율이 높고, 세포 분열능력과 건강한 재분화가 양호한 line을 대상으로 중점적으로 형질전환 시도 - 상업적 promoter, 연구소 자체 개발된 promoter 사용 - 도열병, 흰잎마름병 - 실내유묘검정 및 포장검정 체계 확립

<3차년도(2008년도)>

세부과제 구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위
제 1 세부과제: 리폭시지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질 전환 벼의 개발	-LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 종자 확보 및 유전적 안정성 평가	- LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 종자 확보 - LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 유전적 안정성 평가
제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질 전환 벼 개발	-저온 및 가뭄 내성 형질전환 벼 개발 -복합재해 내성 유전자 돌연변이 유도 및 애기장대로의 형질전환	- 유전자의 저온 내성 및 가뭄 내성 기능 확인 - 벼의 aquaporin 유전자의 발현 특이성 분석 - 벼 형질전환 및 복합 재해 내성 형질전환체 선별 - 돌연변이 유전자 유도 및 애기장대에서 기능 분석
협동1 과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질 전환 벼의 내냉성 및 내병성 평가	-형질전환체 분석 -내병성 및 내냉성 평가	- Southern 및 Northern 방법으로 형질전환체 확인 - 형질전환된 유전자의 발현조사(GUS, GFP) - 생산성 등의 기타 형질 조사 - 저온, 내 복합성등의 단백질 축적 양상 조사 - 실내유묘검정 및 포장검정 - 생육 및 수량조사

3. 연구개발의 추진전략방법 및 추진체계

가. 연구개발의 추진전략방법

1) 추진 전략

세부 과제명	추진 전략
제 1 세부과제: 리폭시지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질전환 벼의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - microarray 분석 - 복합재해 내성 유전자 선별 - 벼 형질 전환 - 복합재해 저항성 형질전환 벼 개체 선발 - 형질전환 벼의 내냉성, 내한성, 내염성 분석 - 형질전환 벼에서 유전자발현과 스트레스 내성 상관 관계조사
제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 내성 유전자 분리 및 형질전환용 벡터 제작 - 벼 형질전환 및 복합 재해 내성 형질전환체 선별 - 형질전환 벼에서 유전자발현과 스트레스 내성 상관 관계조사 - 벼에서 AQP 유사 유전자 분리 - 돌연변이 유전자와 애가장대를 이용한 유전자 가능 강화
협동1 과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질전환 벼의 내냉성 및 내병성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 벼 callus 형성 비교 - 재분화조건 확립 - 유전자 형질전환 - 형질전환체 재분화률 향상 - Southern 및 Northern 방법으로 형질 전환체의 확인 - 식물생장상에서 내냉성 및 내병성 검정 - 밭못자리에서 내냉성 및 내병성 검정 검정 - 포장에서 내냉성 및 내병성 검정

2) 연구의 방법

제 1 세부과제: 리폭시지나아제 및 RNA 결합 단백질 유전자의 동시 발현에 의한 복합재해 내성 형질전환 벼의 개발

(1) LOX-zRBP 유전자 동시발현을 위한 double transformation

LOX 유전자와 zRBP 유전자를 동시에 발현시키기 위해서는 일반적으로 두

유전자를 재조합하여 연결시키고 연결된 유전자를 벡터에 삽입하는 fusion-gene 방법이 사용된다. 그러나 본 연구실에서는 이미 LOX가 과다발현된 형질전환 벼를 T3 세대까지 확보하고 있으며, 이들 형질전환 벼는 유전적으로 안정함도 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 LOX가 과다발현된 형질전환 벼를 zRBP 유전자가 삽입된 벡터를 사용하여 double transformation 시킴으로서 두 개의 유전자가 발현된 형질전환 벼를 생산하고자 하였다. 다만, LOX가 과다발현된 형질전환 벼는 hygromycin을 사용하여 selection 하였으므로 zRBP 유전자를 이용한 double transformant에서는 제초제 저항성 유전자를 selection marker로 사용할 예정이며, 형질전환 벼의 생산을 위해서는 그동안 본 연구실에서 정립된 방법을 사용하였다.

(2) LOX-zRBP 유전자 동시발현 형질전환 벼의 microarray 분석

2 주된 비형질전환 벼와 형질전환 벼 앞에서 0.1 ~ 0.14 g 취해 막자사발과 액체질소를 이용하여 잘게 간 후 QIAGEN의 RNeasy Plant Mini Kit로 RNeasy Mini Handbook 지시에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 추출된 전체 RNA의 정성과 정량분석은 Nano Drop기기를 이용하여 실시하였다. RNA 400 ng으로 부터 Agilent사의 Low RNA Input Linear Amp Kit를 이용하여 cDNA를 만들고, Cyanine3 CTP와 Cyanine5 CTP로 각각 표지된 cRNA들을 PCR로 증폭시킨다. Nano Drop기로 표지된 cRNA들의 정성과 정량분석을 실시 후 1,000 ng을 각각 취해 Agilent사의 In Situ Hybridization Kit Plus 절차에 따라 rice DNA chip과 60도 17시간 6 rpm으로 혼성화하였다. 혼성화된 rice DNA chip들을 각각의 buffer로 4번 씻고, 질소 가스로 물기를 제거하였다. Genepix scanner에 물기가 제거된 DNA chip을 넣고 Gene Pix Pro 4.0 프로그램으로 스캔한 후 Gene spring 6.0으로 분석하였다. dye-swap approach 방법에 의해 비형질전환 벼와 형질전환 벼에서 각각 발현된 유전자의 레벨을 normalization 한 후 최소 2배 이상 유전자 발현 차이를 나타내는 유전자들을 정리하였다.

(3) LOX-zRBP 유전자 동시발현 형질전환 벼 복합재해 내성 분석

내냉성, 내염성 등 복합재해 내성 분석은 conductivity 측정을 통한 electrolyte leakage test 방법을 이용할 것이다. ion leakage 측정은 형질전환 벼와 비형질전환 벼의 잎을 직경 1 cm 간격으로 절단하여 mutiple petridish에 담근 후 3 차 증류수 15 ml을 첨가 하고, Conductivity/TEMP Meter C75 (ISTECK, Korea)를 사용하여 시간에 따른 증류수의 전기전도도를 측정하였다. 벼 잎의 ion leakage는 전기전도도를 intensity (uS/g)로 표시하였다.

제 2 세부과제: 저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자와 Aquaporin 유전자를 이용한 복합재해 내성 형질전환 벼 개발

(1) 저온 내성 유전자의 분리 및 벼 형질전환 용 벡터 제작

벼로부터 저온내성에 관여하는 유전자의 분리는 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 대상으로 수행하였다. 각 유전자의 염기서열 특이적 primers를 제작하고 RT-PCR을 통해 해당 유전자를 확보하였다. 분리한 유전자는 pGEM T-easy vector에 우선 클로닝한 다음 그 염기서열을 확인하였다.

분리한 유전자를 벼 형질전환 용 벡터인 pGA1611에 클로닝하였다.

(2) 저온 내성 유전자를 이용한 벼 형질전환

본 연구진의 연구결과 애기장대와 담배에서 저온 내성에 관여하는 것으로 확인된 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 벼에 형질전환하였다. 이와 동시에 벼에 존재하는 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 확보하여 벼에 형질전환을 시도하였다. 형질전환에 소요되는 시간을 최대한 줄이기 위하여, 제 3 세부과제팀과 협동으로 형질전환을 시도하였다.

(3) 형질전환 벼의 스트레스에 따른 유전자의 발현양상 및 복합 스트레스 내성 조사

도입한 유전자가 스트레스에 어느 정도 관련이 있는지를 조사하기 위하여, 스트레스에 따른 유전자 발현 정도를 측정하였다. 형질전환 벼를 재배한 후 저온, 고염분, 가뭄 스트레스 등 복합 스트레스를 처리하고, total RNA를 추출하여 real-time RT-PCR 방법을 이용하여 유전자의 발현 정도를 측정하였다. 유전자의 발현과 스트레스 하에서의 형질을 관찰하여 저온 뿐만아니라, 고염분, 가뭄 스트레스 등 복합 스트레스에 내성을 가진 형질전환 벼를 선별하고, 저온내성을 극대화할 수 있는 기술을 제시하였다.

(4) 가뭄과 고염 내성에 관여한다고 알려진 Arabidopsis Aquaporin 유전자들을 벼에 도입

최근들어 전 세계적인 이상 기온으로 인해 많은 경작지가 예측할 수 없는 가뭄 혹은 홍수와 같은 환경스트레스로 극심한 수확량 감소를 초래했다. 이러한 스트레스 조건에서 다른 식물에 상대적인 보습 혹은 흡수력의 우위는 다시 수분이 공급되었을 때 작물의 회복과 그에 따른 수확량 증가에 필수적인 요소이다. 이미 많은 연구들을 통해 aquaporin은 식물의 주변의 수분을 흡수하는데 매우 중요하다고 알려졌다. 본 연구팀은 모델 식물로 잘 알려진 애기장대에서 다수의 aquaporin 유전자와 그들의 돌연변이체들의 연구로부터 aquaporin 결여는 수분 부족에 대해 매우 취약해 짐을 확인하였다. 따라서 이들 Arabidopsis aquaporin 유전자들을 벼에 도입하여 과다발현을 유도하여 수분이 부족한 경우와 수분이 다시 공급되는 경우 벼 형질전환체의 상대적인 성장 속도 증가 혹은 생존력 증대를 목표로 하였다. 이를 위해 본 연구팀이 보유하고 있는 aquaporin 유전자를 35S promoter와 같은 과다발현

프로모터 조절하에 두어 과다발현 시킨다.

(5) 벼에서 유사 유전자들의 분리 및 그들의 스트레스 조건에서 발현 연구

벼에서도 주변 환경으로부터 수분을 흡수하는데 관여하는 aquaporin 유전자들이 존재한다. 그러나 이들 유전자들의 효율적인 이용을 위해서는 정상 조건을 포함하는 다양한 환경 조건, 조직에 따른, 그리고 발달 단계별에 이들 유전자들의 발현 양상 연구는 필수적이다. 따라서 벼에서 cDNA library를 작성하고 DNA sequence 유사성을 기초로 하여 cDNA library screening 및 RT-PCR을 이용해서 aquaporin 유전자를 분리하였다. 본 연구팀은 현재 aquaporin에 대한 antibody를 가지고 있으므로 이들 antibody를 이용하여 벼 aquaporin 단백질의 발현 양상을 상기 조건에서 확인하였다. 이때 모든 실험 조건은 이미 확립된 조건에서 실시하였다.

(6) 벼 형질전환체들의 외래 유전자 발현 및 가뭄, 고염 내성 분석

선발된 형질전환체들은 Western 혹은 Northern analysis를 이용하여 외래 유전자들의 존재를 확인하였다. 동시에 이들 유전자들의 발현 양을 결정하였다. 또한 이들 유전자들의 여러세대에 걸쳐 안정적인 발현 조사도 필요하다. 포장 조건에서 형질전환 벼들이 성장 및 발달을 정상 개체와 비교하면서 외래 유전자들에 의한 형질전환체의 악영향을 평가와 우수 품종을 선별하였다. 특히 aquaporin 유전자 과다발현에 의해 수분 흡수율과 다른 조직들에 대한 수분 분배 증가와 정상조건에서 NaCl과 같은 해로운 염의 세포질 격리에 의한 성장 촉진을 기대할 수 있다. 이런 발상으로 정상 개체보다 빠른 성장을 보이는 개체 선발에도 주안점을 둔다. 선발된 정상적인 성장과 발달을 보이는 개체들을 정상개체와 함께 가뭄 혹은 수분이 부족한 조건에서 그들의 발달, 클로필 함량, 광합성 효율등을 측정하였다. 특히 이들 형질전환체에서 외래 유전자들의 발현 양을 결정하여 그들의 표현형과 유전자 발현의 상호 관계를 이해하는데 활용하였다.

협동1 과제: 복합내성 프로모터를 이용한 형질전환 벼 개발 및 포장에서 형질전환 벼의 내냉성 및 내병성 평가

(1) 효율적 벼 형질전환 기법을 위한 재분화 최적 조건 확립

이미 기존의 방법이 있으나 효율적으로 개선하기 위해 새로운 벼 품종을 선택하여 실행하고자 하며, 선행된 실험을 바탕으로 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

▶ 벼 callus 형성 비교

형질전환을 위한 동진벼의 Callus 유도에 다른 시간적 단축과 안정된 조건

을 확립하기 위하여 호르몬 첨가에 따른 callus 유도를 실험하였다. 2,4-D와 BAP가 혼용 처리된 2N6 배지에 암배양 ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) 한 결과는 figure 1과 같다.

호르몬 처리에 따른 비교를 살펴보면, 2,4-D 가 첨가된 배지의 경우 BAP의 농도와는 별 상관없이 고른 callus 생성 양상을 보여 주었다. 그중 BAP 무처리 2,4-D 10 μM 첨가된 배지에서의 캘러스들이 더 밀집되고 밝은 노란빛으로 분열이 더 왕성한 모습을 보여 주었다. 그러나 2,4-D가 1 μM 첨가된 BAP 첨가 배지에서는 캘러스의 분열은 이러나지 않고 root의 왕성한 신장만을 보여주었다. 이 결과에서 나타나는 바와 같이 callus 생성율이 높을수록 root의 형성이 억제되고, 대조적으로 callus 형성율이 낮을수록 root의 형성이 활발하여 callus 형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 첨가된 2,4-D의 영향에 따라 형성되는 callus와 root의 성장이 반비례하는 것으로 추측된다. 따라서 callus 유도에 있어서 성장조절제 2,4-D 가 중요한 역할을 하며, 가장 좋은 적정 호르몬 농도는 10 μM 로 최적의 조건을 마련하였다.

선행된 실험에서 확립한 2N6 - 2,4-D 10 μM 배지에서 형성된 callus를 다시 계대 배양한 조건에서는 callus가 더 단단해지고 안정되어 분열이 활발하게 진행되었으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 며의 callus 유도결과 figure 2에서 보는 바와 같이 이와 같은 결과에 따라 3주의 배양기간은 callus 분열이 가장 활발하며, 4주 배양한 경우 분열이 안정화 되어 3주-4주의 배양기간이 가장 적당한 조건이라고 사료된다.

▶ 재분화조건 확립

재분화체의 생존능이 저조한 이유는, 배양기 내에서 재분화가 쉽게 유리화되기 때문이다. 그러므로 본 실험에서는 유리화현상을 억제하기 위하여 배양 조건을 개선하고자 하였다. 유리화는 배양용기 내에서 온도나 습도로 인하여 배지의 농도, pH가 낮아져서 생기는 현상이기 때문에 일차적으로 계대배양의 횟수를 증가시키고자하였다. 또한 다양한 성장 호르몬, 탄소원의 종류와 최적 농도를 조사하였다. 건강한 재분화체는 발근이 용이하고, 반복적으로 계대 배양하는 방법으로 순화과정에서 효율적으로 적응시키고자 하였다. 선행실험으로, 2N6 - 2,4-D 10 μM 배지에서 유도한 callus를 3-4주 배양 후, shoot 형성을 유도하기위한 조건 확립 실험을 시행하였다. Kim 등 (1993), Raina 등(1998), Lee 등 (2000)의 논문에서 실험되어진 조건들을 바탕으로 재분화율이 높은 BAP와 NAA 또는 kinetin 혼합배지에서 배발생을 유도하고 식물체 재분화를 유도하였다 (Figure 3). 이결과를 바탕으로 shoot 형성유도의 가장 효과적인 조건을 확립하였다. 이렇게 형성된 shoot를 MS free medium으로 계대배양한 후 root를 형성하여 정상적인 식물체를 형성하였다.

(2) 저온 복합내성 유전자 형질전환

효율이 낮으나 기존의 연구소에서 확립된 방법으로 분리된 유전자를 형질전

환 하며, 계속적인 실험으로 인해 방법이 완료되면 그 방법으로 형질전환을 지속하였다.

▶유전자 형질전환

본 연구소에서는 Callus 유도배지에서 형성된 callus를 Agrobacterium 에 형질전환 한 다음 acetosyringone (AS)이 첨가된 배지에서 3일 동안 공조배양한 후 항생제 배지 (2N6- CH; Hygromycin 40ug/l, cefataxim 250 mg/l) 에 subculture시킨다. 계대 배양한 결과 Hygromycin 저항성 유전자를 갖는 형질전환 callus 세포는 다시 분열을 시작하였으나 형질전환이 이뤄지지 않는 세포는 갈변화 되어 괴사하였다.

▶형질전환 효율조사

표준화된 형질전환 실험에서 유래한 재분화체를 뿌리형성을 유도한 다음에, 기내 유지 상태에서 개체별로 reporter gene GUS와 GFP의 발현 활성을 관찰하는 방법으로 조사하였다. 선행된 본 연구소의 실험에서 GFP가 reporter gene으로 삽입되어진 pCAMBIA 1302 vector를 형질전환 한 결과 배발생 캘러스로부터 유식물체를 형성시켰다. 형성되어진 잎 조직과 뿌리 조직으로부터 GFP의 발현 양상을 살펴본 결과 성공적인 발현을 관찰할 수 있었다.

▶형질전환율의 향상

Agrobacterium 접종 조건 최적화 : 형질전환 실험의 단계 중에서, 전처리 그리고 selection 단계에 대한 최적조건에 대한 조사를 시행하였다. 또한 Agrobacterium의 virulence를 induction하는 조건과 접종조건을 결정하였다. Virulence induction을 위하여 phenolic 화합물의 종류와 농도 및 처리시간에 대한 효과를 조사하였다. 벼 callus에 대한 접종 조건을 확립하기 위하여 Agrobacterium 을 배양기간과 접종 농도 등을 중심으로 실험을 진행하였다

(3) 형질전환체 특성파악

선발되어진 형질전환 식물체를 온실에서 배양한 후 종자를 확보하며, 저온 복합내성의 유전자의 발현 양상을 조사하였다. 또한, 형질전환체의 기타 형질에 관해서도 조사하였다.

▶Southern 및 Northern 방법으로 형질 전환체를 확인하였다.

- 병, 저온 복합내성 유전자의 발현 조사
- 생산성 등의 기타 형질 조사
- 유전자 단백질의 축적 양상 조사
- 저항성 유전자를 형질전환 한 경우에는 단백질을 추출하여 ELISA방법으로 저항

성 단배질의 축적량을 조사하였다.

(4) 형질전환 벼의 도열병 포장저항성 검증

▶시험품종

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수¹의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 1A T1 종자 30 line과 제 1세부과제에서 선발된 homozygous T2 종자를 line별로 100개씩 상토에 과종하여 2주간 28 ~ 30°C인 배양실에 발아시킨다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시키며 2주 짜리 유묘를 포장으로 옮기고 재배하였다.

▶재배법

낙동벼와 형질전환 벼를 5월 6일 상토에 과종한 후, 발아된 벼를 주당 본수를 3 ~ 4본으로 재식거리는 30 × 15 cm로 하여, 전남 나주시 산포면 전라남도 농업기술원 포장에 6월 5일에 이앙한다. 포장의 시비량은 22-7-8 (N-P-K, kg/10a)로 하여 농촌진흥청 표준 재배법에 준하여 재배한다.

▶조사항목

시험 포장에서 낙동벼와 형질전환 line의 도열병 발생 정도는 20포기 이상을 대상으로 조사한다. 잎 도열병 병반 면적율을 발병 최성기인 7월 하순에 1회 조사하고, 이삭도열병의 이병수율은 출수 5주 후에 조사한다. 포기당 평균 병무늬면적율은 병에 걸린 포기당 병반면적율 합계/조사포기수로 하여 조사한다. 포기당 조사 기준은 다음의 기준에 준하여 조사한다.

병무늬 면적율	병에 걸린 정도
0.2%	밑부위 잎에 대형 병무늬 1개와 소형 병무늬 1-2개 또는 소형 병무늬만 10개 이내
0.5%	밑부위 잎에 대형 병무늬 2-3개와 또는 소형 병무늬 20개 정도가 포기 전체에 고르게 퍼져 있음
1%	대형 병무늬 4-5개와 주위에 약간의 소형 병무늬가 퍼져있거나 또는 소형병무늬만 30-40개 정도 퍼져 있음
2%	밑부위 1-2잎이 병무늬로 거의 덮이거나 또는 대형 병무늬 10-15개가 밑위에 퍼져있음
5%	밑부위 2-3매 잎이 반 정도 말라죽거나 또는 대형 병무늬 30-40개가 퍼져 있음
11%	밑부위 2-3매 잎이 완전히 말라죽고 밑에 5-6개 잎에 대형 병무늬가 퍼져 있음
25%	윗부위 잎을 포함하여 7-8매 잎이 완전 또는 부분적으로 말라죽고 모든 잎에 각각 10개 정도의 병무늬가 고루 퍼져 있음
55%	전체 잎 수의 반 이상이 완전히 또는 부분적으로 말라 죽거나 죽지 않은 잎에는 무수한 병무늬가 있음
100%	포기 전체가 주저앉으며 말라 죽음

▶ 형질전환 벼의 수량 및 생육 조사.

생육조사는 6월 19일부터 출수기까지 15일 간격으로 분얼수와 초장을 측정하고, 수량조사는 농촌진흥청 농사시험연구 조사기준 (농촌진흥청, 1995)에 따라 단위면적당 수수, 수당입수, 천립중, 등숙율을 조사한다.

(5) 도열병 발못자리 검정

▶ 시험품종 및 재배

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 1A T1 종자 30 line과 제 1세부과제에서 선발된 homozygous T2 종자를 line별로 100개씩 전라남도 나주시 산포면 전라남도 농업기술연구원의 밭 못자리 검정 포장에 6월 하순 - 7월 상순에 직파한다. 밭못자리 검정시 도열병 발병율을 높이기 위해서 주위에 이병성 품종인 낙동벼를 함께 파종한다. 밭못자리 검정 포장의 시비량은 N-P2O5-K2O = 24-8-12(kg/10a)로 하고 단, 질소질의 50%는 추비로 파종 후 14일 후에 시용한다.

▶ 조사 시기 및 잎도열병 판정 기준

파종후 30일에 형질전환 벼의 잎도열병 이병정도(0~9)를 조사한다. 잎도열병의 이병정도는 다음과 같은 기준에 의해 조사한다.

- 0 : 무병반
- 1 : 바늘끝 같은 작은 갈색반점 병반
- 2 : 직경 1-2mm의 다소 큰 갈반점이 하위엽에 드물게 있는 것
- 3 : 2와 동일한 반점으로 그 수가 증가하여 상위엽에 나타나는 것
- 4 : 전형적 회색의 급성도열병반 1-2cm 길이 전 엽면적의 4% 이내 이병

- 5 : 4-10% 사이의 전형적 병반
- 6 : 11-25% 정도 이병된 병반
- 7 : 잎면적의 26-50% 가 전형적 병반으로 이병
- 8 : 전 엽면적의 51-75% 가 전형적 병반으로 이병 9 : 모든 잎이 75% 이상 이병된 것 또는 완전 고사

(6) 벼 흰잎마름병 저항성 검정

▶시험품종

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 1A T1 종자 30 line과 제 1세부과제에서 선발된 homozygous T2 종자를 line별로 100개씩 상토에 파종한다. 2주간 28 ~ 30℃인 배양실에 발아시킨다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시킨다. 2주짜리 유묘를 포장으로 옮기고 재배한다.

▶재배법

낙동벼와 형질전환 벼를 4월 25일 상토에 파종한 후, 발아된 벼를 주당본수를 1 본으로 재식거리는 30 × 15 cm로 하여 전남 나주시 산포면 전라남도 농업기술원 포장에 6월 1일에 이앙한다. 포장의 시비량은 17-4.5-7.5 (N-P-K, kg/10a)로 하여 농촌진흥청 표준 재배법에 준하여 재배한다.

▶조사항목

접종 검정: 접종균계는 농촌진흥청 농업과학기술원 식물병리과에서 분양받은 K1, K2, K3 race를 공시하고, 접종방법은 최고 분얼기 - 수잉기에 형질전환벼를 가위절엽접종하여 병반길이를 조사한다.

포장 저항성: 검정방법은 형질전환 벼가 이식된 포장의 주변에 흰잎마름병에 이병성인 품종을 이식하여 검정품종 주변의 이병성 품종에 K1, K2, K3 균계를 최고 분얼기에 가위 절엽접종하여 2차 전염을 유기한다. 수잉기에서 호숙기 사이에 2차 전염 정도(0-9)를 조사한다. 2차 전염 정도의 기준은 다음에 준하여 조사한다.

- 0 : 무병반
- 1 : 총 엽면적의 1% 이내가 이병된 상태
- 3 : 총 엽면적의 1-5% 이병된 상태
- 5 : 총 엽면적의 6-25% 이병된 상태
- 7 : 총 엽면적의 25-50% 이병된 상태
- 9 : 총 엽면적의 51% 이상이 이병된 상태

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구의 수준

병충해로 인한 감염이나 환경에 대한 저항성을 높이는 벼 품종 개발은 매우 경제적 가치가 높은 분야로서 많은 연구가 필요하다. 세포막을 구성하는 지질 분자의 대사에 관여하는 octadecanoid pathway의 리폭시지나아제에 관한 연구는 주로 애기장대에서 많이 이루어져 왔으나 본 연구팀은 일본연구진과 공동으로 벼의 octadecanoid pathway 유전자를 벼 유전체 염기서열 분석을 통해 분석하였으며 현재 다양한 유전자의 생체 내 활성 및 기능 연구가 상당히 진행된 상태이다. 또한 벼의 성장 뿐 만 아니라 전사 후 유전자 조절을 통한 저온 스트레스 내성 작물의 개발에 대한 연구는 국내외적으로 전무하며, 식물체에서 cold shock protein의 기능을 규명한 연구도 국내외적으로 전무한 실정이다. cold shock protein이 RNA chaperone으로 작용하여 저온에 처한 대장균 및 몇몇 미생물의 저온 내성에 관여한다는 보고가 최근 들어 발표되고 있다. 본 연구팀은 지난 2년 동안 저온 스트레스 내성에 관련된 RNA-결합 단백질을 탐색하고 그 기능을 규명하는 연구를 수행해 왔으며, 특히 애기장대의 cold shock protein 유전자를 분리하였고 과발현 형질전환체 및 knock out 돌연변이체를 활용한 연구를 통하여, cold shock protein 유전자에 의한 저온 내성 기작을 밝히는 연구를 상당부분 진행하여, 본 과제를 본격적으로 진행하기 위한 기반 자료를 충분히 확보한 상태이다. 특히, 벼 유전체 연구는 상당한 진전을 보여 염색체 1번, 4번 10번의 염기서열 분석이 끝나 결과가 발표되었으며 TIGR에는 12개 벼 염색체의 염기서열 draft 가 발표되어 있다. 벼의 유전정보가 공개됨에 따라 한국 지역의 토양과 기후 조건에서 적응해 자라는 벼들의 유전정보를 확보하고 나아가 이들 유전자를 활용하여 온도나 스트레스에 강한 벼 품종 개발에 이용 가능하도록 하는 연구가 필요한 단계이다. 본 연구팀은 벼의 스트레스 내성 유전자에 관한 선행 연구 결과를 충분히 확보하고 있으며 유전자 다형성에 관한 풍부한 연구 경험을 바탕으로 병해와 저온 내성에 가진 복합재해 내성 벼를 성공적으로 개발하고자 하였다.

제 2 절 국내외의 관련 기술 현황

1) 리폭시지나아제를 이용한 형질전환 벼의 western 분석, ion leakage 측정, microarray 분석에 관한 현황

본 연구 팀은 유전적으로 안정하게 LOX를 과대발현시킨 형질전환 벼를 T3 세대까지 확보하고 있으며 (Kim et al., 2003), 그림 1-2-1에 나타낸 바와 같이 **western 분석 결과** 도입된 LOX 유전자가 단백질 수준에서 과대발현되고 있음을 확인할 수 있다 (그림 1-2-1A). 형질전환 벼의 수분 스트레스와 **염 스트레스에 대한 반응의 차이**를 보기위하여 각각 6 % agar 및 34 mM NaCl 용액에서 키웠을 때, wild type과 뚜렷한 차이를 보였다 (그림2B).

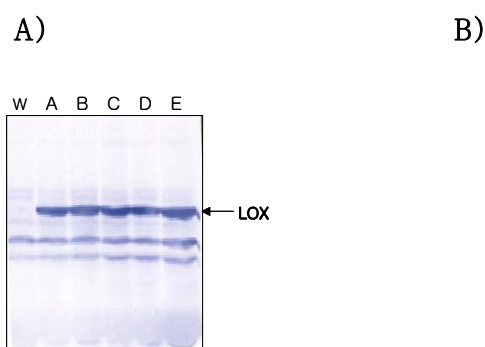


그림 1-2-1. A) 형질전환 벼(T3 세대)에서 LOX 유전자가 단백질 수준까지 안정적으로 발현됨을 확인하기 위한 Western blot analysis 결과. W: wild type, A ~ E: T3 generations of transgenic rice plants. B) 이온 누출 실험에서 뚜렷한 차이를 보여주는 형질전환 벼와 wild type. A, C: wild type; B, D: transgenic. A와 B는 6 % agar medium에서 C와 D는 34 mM의 NaCl을 포함한 0.6 % agar medium 에서 2 주 동안 키운 후 잎의 conductivity를 측정하였다.

2) 저온 내성기작에서 zinc finger RNA-결합 단백질의 기능에 관한 최근의 현황

전사 후 유전자 조절을 통한 저온 스트레스 내성 작물의 개발에 대한 연구는 국내외적으로 전무하며, 식물체에서 zinc finger RNA-결합 단백질의 기능을 규명한 연구도 국내외적으로 아주 미미한 실정이다. 본 과제 제안자는, 지난 3년 동안 저온 스트레스 내성에 관련된 RNA-결합 단백질을 탐색하고 그 기능을 규명하는 연구를 수행해 왔으며, 애기장대의 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 분리하고 과대발현 형질전환체 및 knockout 돌연변이체를 활용한 연구를 통하여, zinc finger RNA-결합 단백질 유전자가 식물체의 저온 및 동결 내성에 깊이 관여한다는 논문을 최초로 발표하였다(Kim et al., Plant J., 2005).

그림 1-2-2는 여러 가지 RNA-결합 단백질 가운데 zinc finger RNA-결합

단백질 유전자의 동결 내성 기능을 보여주는 결과로 **유전자의 과발현 결과 동결내성이 크게 증가함**을 알 수 있다. 본 제안자는 다양한 RNA-결합 단백질 유전자에 의한 저온 내성 기능을 밝히는 연구를 상당부분 진행하여 기반 자료를 충분히 확보한 상태이며, 타 세부과제에서 이미 확보하고 있는 재해 내성 형질전환체에 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 도입하여 복합 재해 내성 벼를 개발할 수 있는 여건을 갖추고 있다. 지금까지는 주로 애기장대 유전자를 이용하여 실험을 진행하였으나, 이러한 유전자를 활용하여 궁극적인 저온 내성 작물을 개발할 목적으로 오이의 형질전환도 시도하고 있다. 또한 벼의 형질전환을 통한 저온 내성 벼를 개발할 목적으로 애기장대의 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 pGA1617 벡터에 클로닝하였고, 현재 벼 형질전환을 시도하는 과정에 있다. 벼의 형질전환과 함께, 벼의 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 분리하여 그 기능을 확인하고 궁극적인 저온 내성 작물 개발에 활용할 목적으로, 벼의 지놈에 존재하는 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 분리하기 위한 실험도 함께 진행하고 있다.

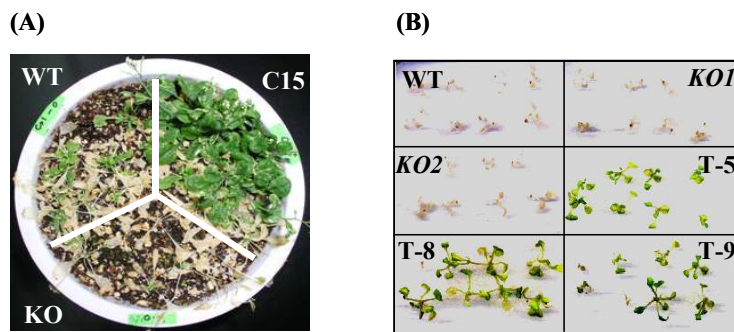


그림 1-2-2. Arabidopsis에서 zinc finger RNA-결합 단백질 유전자의 동결 내성 기능의 확인. (A) GR-RBP2 유전자가 과발현된 형질전환체(C15)의 경우 야생형(WT)과 knockout 돌연변이체(KO)에 비해 동결 내성이 크게 증가하였고, (B) zinc finger RNA-결합 단백질 유전자(atRZ-1a)가 과발현된 형질전환체(T-5, T-8, T-9)의 경우 야생형(WT)과 knockout 돌연변이체(KO1, KO2)에 비해 동결 내성이 크게 증가함.

3) Aquaporin과 복합재해에 관한 연구 현황

애기장대의 aquaporin 유전자들은 다양한 환경 스트레스와 식물 성장 호르몬에 대해 특이한 시, 공간적 발현 양상을 보인다. 또한 overexpression과 antisense를 이용한 transgenic plant 연구들은 수분 부족에 의한 스트레스에서 aquaporin은 수분 흡수, 분배, 그리고 회복 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 본 연구진은 aquaporin 유전자(PIP1:1 또는 PIP2:6)를 knock out 시킨 애기장대의 가뭄에 대한 반응을 본 결과 민감한 반응을 보임을 알 수 있었다.

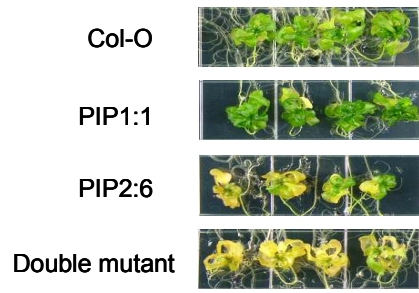


그림 1-2-3. aquaporin 유전자를 knock out 시킨 애기장대는 가뭄에 대하여 민감한 반응을 보인다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내건성 및 내염성 분석

1. 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내건성 분석

가. 서언

여러 가지 종류의 스트레스에 대하여 모두 저항성을 지니는 식물체의 개발을 위해서는 이들 다양한 조율의 스트레스 인자들이 공통적으로 지니는 생물학적 현상이 존재함으로서 이론적으로 수월하게 된다. 비정상적인 수분 조건과 온도 조건에 의하여 야기되는 건조, 저온, 염 등의 서로 다른 스트레스 인자는 스트레스 신호의 인지, 전달, 극복의 과정에서 하나의 경로로 표현됨을 알 수 있으며, 다양한 이들 스트레스 요인은 대체로 산화스트레스 신호의 인지, 전달, 극복의 과정이라고 하는 공통점을 지닌 비생물적 스트레스로 간주 될 수 있다. 복합재해로 고려되는 저온, 고온, 건조, 염 스트레스 등이 공통적으로 산화스트레스의 한 부분적 표현이므로, 세포막 산화의 대표적 예인 리폭시지나아제는 복합재해 저항성 기작에서 핵심적 역할이 기대되었다(Kim et al., 2003; Song et al., 2003). 본 연구팀은 리폭시지나아제가 과다발현되어 병원균에 대한 저항성이 보고된 T3 세대의 형질전환벼의 복합재해 내성을 조사하기 위하여 내건성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

wild type 과 형질전환 벼의 씨앗들을 70%의 에탄올로 소독하고 증류수로 씻어 암상태로 30도의 증류수에서 3일 동안 발아시켰다. 동일한 크기(0.3 mm-0.5 mm)로 발아된 씨앗들을 흙으로 옮긴 후 두 달 동안 배양실(28 °C, 16h light/8 h dark)에서 성장 시켰다. 형질전환 벼의 내건성을 분석하기 위하여 각각의 벼가 심어진 포트에 3일 동안 수분 공급을 중단함으로써 drought stress를 가하였다. wild type 과 형질전환 벼들의 전기전도도를 측정하고 phenotype의 변화를 관찰하여 내건성 분석을 하였다.

다. 결과 및 고찰

형질전환 벼의 내건성을 분석한 결과 그림 3-1-1과 같이 초기에는 형질전환 벼의 ion leakage 가 높았으나, 후기에는 내건성에 대한 저항성이 관찰되었다.

A

B

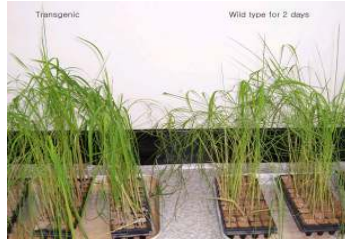


그림 3-1-1. 건조 스트레스 조건에서 wild type과 transgenic 벼의 반응 A: 건조 스트레스 조건에서 시간에 따른 전기전도도의 변화, B: 2 일 동안의 건조스트레스 조건에서 wild type과 transgenic 벼의 phenotype 변화

2. 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 내염성 분석

가. 서언

스트레스 인자가 도달되는 최초의 장소는 세포막이므로 스트레스 신호의 출발은 세포막에서부터 시작되는 것이 일반적이다. 따라서, 세포막에 존재하는 막단백질들이나 세포막을 이루는 불포화 지질 분자는 스트레스 신호전달 cascade의 초기에 위치함이 일반적이다. 특히, 세포막을 구성하는 불포화 지질 분자의 산화는 peroxide 등의 활성 산소종을 생성하여 세포막의 산화적 파괴를 유도하기도 하지만, 중요한 신호 전달 매개 물질인 과산화수소 생성과도 연결되고, 리폭시지나아제 경로를 통하여 C6-알데히드, 자스몬산 등 스트레스 극복 물질들을 생성하기도 한다 (Lee et al., 2005; Lee et al., 2004; Kim et al., 2003). 복합재해로 고려되는 저온, 고온, 건조, 염 스트레스 등이 공통적으로 산화스트레스의 한 부분적 표현이므로, 세포막 산화의 대표적 예인 리폭시지나아제는 복합재해 저항성 기작에서 핵심적 역할이 기대되었다. 본 연구팀은 리폭시지나아제가 과대발현되어 병원균에 대한 저항성이 보고된 T3 세대의 형질전환벼의 복합재해 내성을 조사하기 위하여 내염성을 조사하였다. .

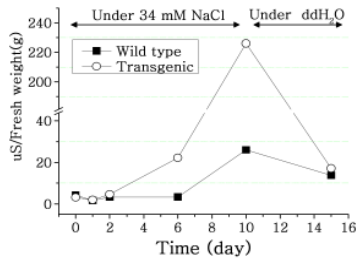
나. 재료 및 방법

wild type 과 형질전환 벼의 씨앗들을 70%의 에탄올로 소독하고 증류수로 씻어 암상태로 30도의 증류수에서 3일 동안 발아시켰다. 동일한 크기(0.3 mm-0.5 mm)로 발아된 씨앗들을 흙으로 옮긴 후 두 달 동안 배양실(28 °C, 16h light/8 h dark)에서 성장 시켰다. 형질전환 벼의 내염성을 분석하기 위하여 두 달 동안 자란 벼를 34 mM의 NaCl이 포함된 증류수에 옮겨 10일간 유지 하였고 이후 5일간 염이 없는 증류수에 담긴 채로 유지 하였다. wild type 과 형질전환 벼들의 전기전도도를 측정하고 phenotype의 변화를 관찰하여 내염성 분석을 하였다.

다. 결과 및 고찰

형질전환 벼의 내염성을 분석한 결과 그림 3-1-2와 같이 형질전환 벼는 염 스트레스에 민감하게 반응하였다. 결과적으로 형질전환 벼는 wild type에 비하여 내건성은 증가하였으나 내염성은 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 리폭시지나아제가 지질의 과산화에 직접적으로 관여함을 시사하고 있다.

A



B



그림 3-1-2. 염 스트레스 조건에서 wild type과 transgenic 벼의 반응. A:염 스트레스 조건에서 시간에 따른 전기전도도의 변화, B: 10일 동안의 염 스트레스 (34 mM NaCl) 조건에서 wild type과 transgenic 벼의 phenotype 변화.

제 2 절 리폭시지나아제 유전자 과다발현 형질전환 벼의 microarray 분석

가. 서언

리폭시지나아제가 constitutive promotor에 의하여 발현되는 형질전환벼는 방어관련 유전자들의 발에 있어서 wild type 벼와 비교할 때 많은 차이가 있을 것으로 예측할 수 있다. 본 연구에서는 발현이 증가 혹은 감소되는 유전자들을 체계적으로 알아보기 위하여 microarray 실험을 수행하였으며, 그 결과 밝혀진 몇 개의 주요 유전자에 대하여서는 RT-PCR법으로 다시 재확인하였다.

나. 재료 및 방법

1) RNA 분리

발아 후 2 주된 벼(WT 또는 TR)의 잎(0.1~0.14 g)을 액체질소와 함께 막자사발에서 분쇄시킨 후, QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Japan)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 정량적 혹은 정성적 분석을 위하여 nano drop machine 혹은 agarose 전기영동방법을 사용하였다.

2) Microarray 조건

WT 이나 TR로부터 추출된 RNA (400 ng)로부터 PCR (Low RNA Input Linear Amplification Kit, Agilent Technologies, USA)에 의하여 형광 cRNA를 합성하고 증폭하였다 (그림 3-2-1). cRNA의 형광은 nano drop machine을 사용하여 정량하였다. 형광 CRNA(1000 ng)과 Agilent Rice Oligo Microarray 22k DNA chips (Chip No 251210612657&251210612657, Agilent Technologies, USA)의 hybridization은 In Situ Hybridization Kit(Agilent Technologies, USA)을 사용하였다. hybridization 후 spot 강도는 Gene pix scanner(Gene Pix Pro4.0 program)를 사용하여 측정하였다. Background 수정, normalization, data 요약은 Gene Spring 6.0 software (Silicon Genetics, USA)을 이용하였다. 2 개의 독립된 반복실험결과로부터 최소 2 배이상 차이가나는 유전자들을 유도 혹은 억제되는 유전자로 분류하였다.

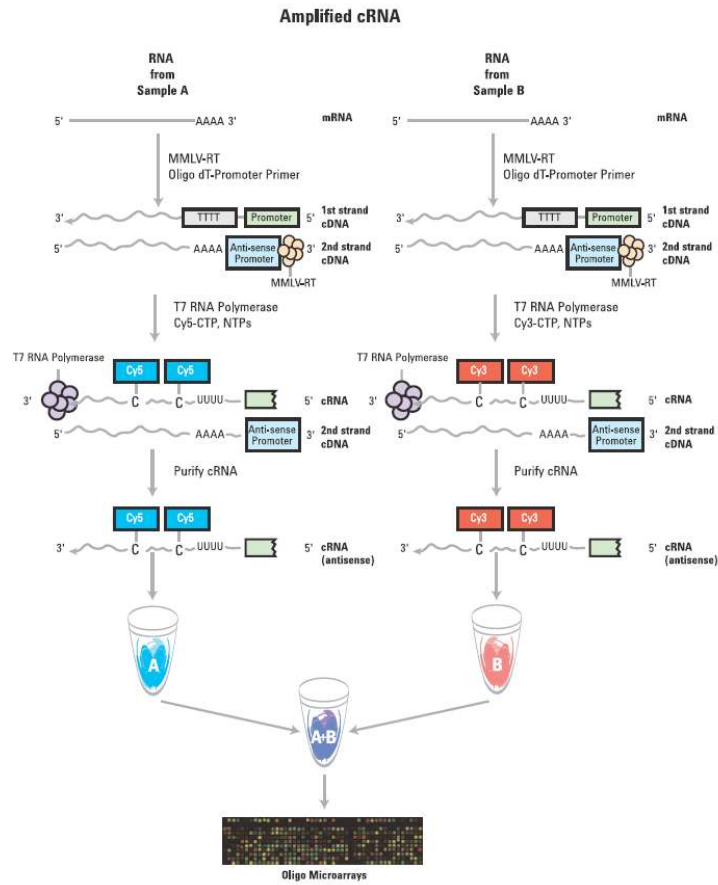


그림 3-2-1. microarray 실험절차의 모식도

다. 결과 및 고찰

1) Scattered plot

형질전환 벼의 잎을 이용하여 벼 genome 상에 존재하는 22,00개의 유전자에 대하여 발현 양상을 분석하였다. 분석은 KOMI의 data base를 이용하였다. 그 결과 220개의 유전자 발현이 변화하였음을 알 수 있었다. 그림 3-2-2는 microarray clone에서 정상화된 신호값의 scattered plot을 나타낸 것이다. 많은 종류의 유전자들이 대각선 방향에 존재함을 알 수 있다.

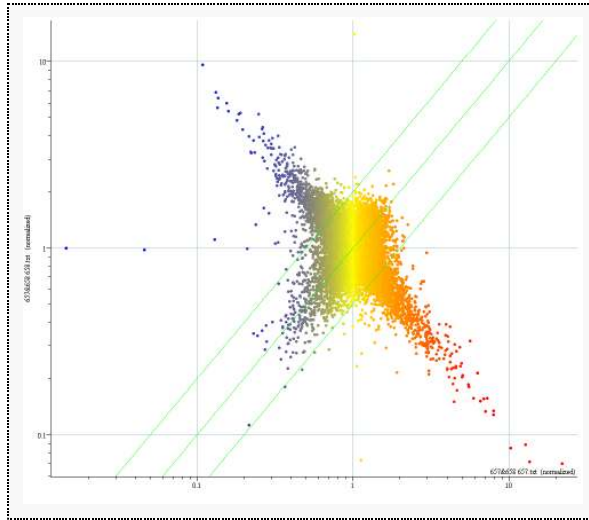


그림 3-2-2. microarray clone에서 정상화된 신호값의 scattered plot

2) microarray 분석에서 신호전달 및 조절에 관련된 유전자의 발현 양상

발현양상이 변화한 유전자들 가운데 스트레스 신호전달 및 리폭시지나아제 유전자의 발현을 조절할 가능성이 높은 유전자를 표 3-2-1에 정리하였다.

표 3-2-1 스트레스 신호전달 및 리폭시지나아제 유전자의 발현을 조절할 가능성이 높은 유전자의 발현율

Description	Accetion #	Fold	
phosphatases			
phosphatidic acid phosphatase-like	AK071250	3.82	
Putative inositol polyphosphate 5-phosphatase	AK101741	2.77	
protein phosphatase-2C (PP2C)	AK068836		-2.43
putative inorganic pyrophosphatase	AK069313	2.17	
purple acid phosphatase (PAP22)	AK073222	2.17	
putative protein phosphatase 2C (PP2C)	AK063334	2.11	
Ser/Thr specific protein phosphatase 2A B regulatory subunit beta isoform	AK107050	2.07	
Receptor-like protein kinases			
putative receptor-like protein kinase 4 (RLK4)	AK111734		-9.33
putative protein serine/threonine kinase	AK111752	4.38	
putative receptor protein kinase	AK067723		-3.74
putative receptor serine/threonine kinase	AK068816		-3.38
putative S-receptor kinase	AK068992	3.03	
receptor-like protein kinase homolog RK20-1	AK111865		-2.62
wall-associated kinase 2	AK111730	2.36	
putative receptor-protein kinase	AK101775	2.27	
putative mitogen-activated protein kinase wjumk1	AK061645	2.26	

putative leucine-rich receptor protein kinase	AK100376		-2.21
Non-Receptor protein kinases			
lectin-like protein kinase	AK065935		-3.21
ankyrin-kinase	AK100268	2.94	
protein kinase	AK102358		-2.58
putative protein kinase	AK107217		-2.57
protein kinase family protein	AK060019	2.56	
putative serine/threonine protein kinase	AK103032	2.43	
protein kinase CK2 regulatory subunit CK2B2	AK111555		-2.37
putative mitogen-activated protein kinase wjumk1 (wjumk1 gene)	AK100389	2.30	
putative arm repeat-containing protein , Binding of an arm repeat protein to the kinase domain	AK062592	2.28	
serine/threonine specific protein kinase-like	AK111753		-2.18
cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase	AK065739		-2.12
aspartate kinase-homoserine dehydrogenase	AK068391	2.14	
serine/threonine protein kinase-like protein	AK061220	2.05	
Cacium-binding proteins			
putative calcium sensor-like protein	AK101368	2.90	
putative calcium binding protein	AK062711	2.44	
calmodulin (CaM1) mRNA	AK059756	2.11	
calcium-dependent protein kinase	AK068315	2.06	
annexin (a family of calcium- and phospholipid-binding proteins)	AK072559		-2.01
GTP-binding proteins			
small GTP-binding protein	AK071303	4.24	
GTP-binding protein typA (tyrosine phosphorylated protein A)	AK072177	2.39	
small GTP-binding protein, RAB7D	AK070320	2.19	
AP2/EREB-type transcription factors			
putative DNA-binding protein RAV2	AK065008		-6.52
putative DRE-binding protein 1B	AK062422		-4.37
DRE-binding protein 1A	AK105599		-4.31
putative AP2 domain containing protein	AK066197		-3.80
WRKY-type trascription factors			
WRKY transcription factor 50 (WRKY50)	AK108522	2.08	
DNA-binding protein WRKY3 (wrky3)	AK061266	2.01	
MYB/MYC-type transcription factors			
syringolide-induced protein 1-3-1B (transcription factor MYBS1)	AK111571	3.33	
myb3	AK111782	2.98	
putative transcription factor (MYB59)	AK111626		-2.78

transcription factor MYC7E	AK099506		-2.60
ZmMYBIP45 R2R3 MYB-domain protein	AK111634		-2.40
putative myb protein	AK060684	2.05	
Zinc finger-type transcription factors			
zinc finger protein-like	AK100301		-3.15
putative zinc finger protein	AK067268		-2.97
zinc finger protein	AK071630		-2.62
putative RING protein (RING)	AK065326		-2.57
CONSTANS-like protein CO5 (CO5)	AK058536		-2.54
CONSTANS-like protein (CO4)	AK100097		-2.53
Dof-type zinc finger domain-containing protein	AK063318		-2.36
CONSTANS-like protein (CO4)	AK109732	2.27	
RING/C3HC4/PHD (zinc finger family protein)	AK067456	2.26	
bHLH-type transcription factors			
bHLH transcription factor/ethylene-responsive protein	AK059273	4.18	
putative bHLH transcription factor	AK063498	3.01	
putative transcription factor BHLH8	AK102252	2.28	
basix helix-loop-helix(bHLH) family protein	AK102594	2.23	
Other-type transcription factors			
repressor protein (transcriptional repression)	AK106713	4.81	
pseudo-response regulator-like	AK067314	3.67	
putative chloroplast nucleoid DNA-binding protein	AK061435	3.48	
H1 histone	AK067840	2.95	
H1 histone	AK099211	2.91	
putative ACT domain containing protein	AK100182	2.84	
sigma factor SIG6	AK068874		-2.70
pirin (an iron-binding nuclear protein and transcription cofactor)	AK109548	2.60	
response regulator 7	AK072736	2.30	
TINY-like protein (transcription factor)	AK107775		-2.27
PREG-like protein (negative regulator of NUC-1 transcriptional activator)	AK070478		-2.26
NAC-domain protein (SINAC1, a transcription factor)	AK071274	2.23	
putative transcription factor RPR1	AK068337	2.18	
DNA-binding protein (Smbp-2, the putative transcriptional activator)	AK058932	2.02	
Other-type regulators			
GAL83 protein (the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4)	AK068637		-7.47
putative regulatory uORF and eukaryotic translation initiation factor 4G I (EIF4GI)	AK062438	6.86	

cyclophilin	AK058898	4.99	
Gal83	AK071229		-2.72
putative RNA-binding protein MEI2 (the critical regulator of the initiation and progression of meiosis)	AK111503		-2.66
SPX domain containing protein (putative signal transduction protein)	AK066364		-2.61
RPT2 (a Signal Transducer Involved in Phototropic Response and Stomatal Opening)	AK060741		-2.56
RIM2 protein	AK065973		-2.52
putative DNA-directed RNA polymerase subunit	AK059611		-2.51
ribonuclease	AK058502	2.51	
Mo17 D-type cyclin (cycD1), led to the early activation of total CDK activity	AK070370	2.41	
amino oxidase family protein/SWIRM domain-containing protein	AK066792		-2.41
putative endonuclease	AK100529	2.39	
RPT2 (a Signal Transducer Involved in Phototropic Response and Stomatal Opening)	AK064985		-2.37
U2 snRNP auxiliary factor (splicing factor)	AK099481		-2.07

3) RT-PCR에 의한 대표적인 유전자들의 발현 검정

RT-PCR 방법으로 대표적인 유전자들의 발현을 재확인 한 결과 (그림 3-2-3), microarray 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다.

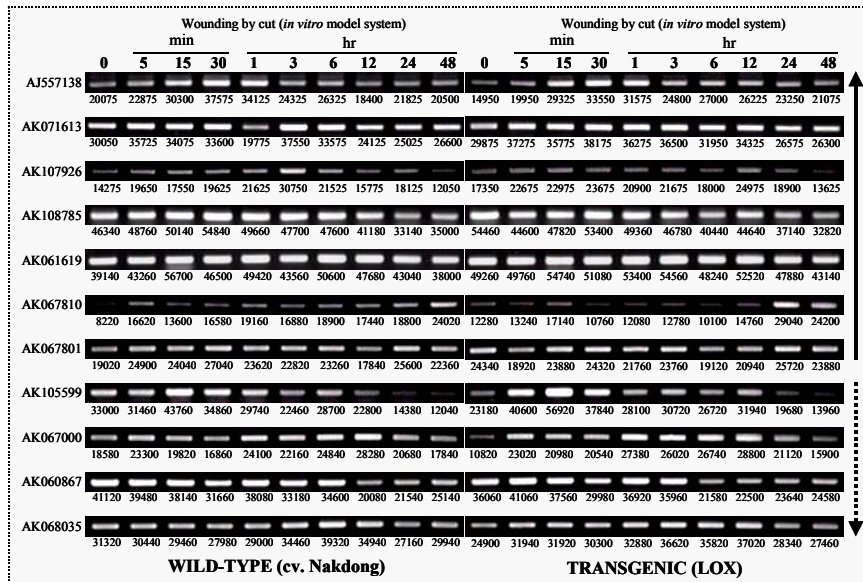


그림 3-2-3. RT-PCR에 의한 대표적인 유전자들의 발현 검정

4) microarray 결과에서 발현이 유도 또는 감소되는 유전자군의 기능에 따른 분류
 microarray 결과에서 시간별로 발현이 유도 또는 감소되는 유전자들을 기능에 따라 분류한 결과 발현 양상과 유전자군의 기능이 잘 일치함을 알 수 있었으며 (그림 3-2-4), 일반적으로 ABA-responsive 유전자 및 salicylic acid responsive 유전자들의 발현이 감소함에 비하여, oxidative 스트레스 및 defense 관련 유전자의 발현은 증가함을 알 수 있었다.



그림 3-2-4. microarray 결과에서 발현이 유도 또는 감소되는 유전자군의 기능에 따른 분류

제 3 절 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 창출 및 스트레스 감응 분석

전사인자 유전자를 형질전환 시킨 식물체가 저온에 내성을 가진다는 보고가 있어 저온 내성 작물의 개발이 가능할 것이라는 기대를 낳고 있다. 그러나 유전자의 발현은 전사단계에서 뿐만 아니라, 전사된 mRNA의 가공, 안전성 및 번역 등과 같은 전사 후 단계에서의 조절 또한 전반적인 유전자의 발현 및 조절 측면에서 매우 중요하다. 전사 후 유전자의 조절은 RNA와 이에 결합하는 단백질간의 상호작용으로 이루어지는데, 이러한 단백질을 RNA-결합 단백질이라 한다. 특히 저온 스트레스 하에서 식물체가 전사 후 단계의 조절을 통하여 어떻게 저온을 극복하는지를 연구하는 것은 저온 스트레스 내성 작물의 개발을 위하여 반드시 필요하다. 저온 스트레스 하에서 RNA의 가공, 안전성 및 번역에 관여하여 저온 스트레스 내성에 관여할 것으로 여겨지는 zinc finger RNA-결합 단백질을 유전자를 발굴하고 그 기능을 밝히는 연구는, 전사 후 조절을 통한 저온 스트레스 내성 기작을 규명하고 이를 활용한 저온 내성 작물의 개발을 위해 대단히 중요하다. 본 연구에서는 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환 벼에 glycine을 다량으로 함유한 RNA 결합단백질을 encode 하는 AtRZ1a (AY76) 유전자를 pCAMBIA1201를 사용하여 벼에 형질전환 시키고, 생산된 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 flag 단백질을 사용하여 몇 가지 환경 스트레스 조건 하에서 저항성을 비교하고 두 유전자 역할 간의 상호작용 가능성을 분석하였다.

1. LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 창출

가. 재료 및 방법

1) vector construction과 Agrobacterium을 이용한 벼의 형질전환 방법

옥수수의 LOX1을 과발현시킨 형질전환 벼를 이용하여 Ubiquitin 프로모터 조절 하의 애기장대 RNA 결합 단백질 (RZ1a) 유전자를 그림 3-3-1과 같이 vector를 제작하였다. 리폭시지나아제 형질전환 벼의 T4세대 씨에서 callus를 유도하여 RNA 결합 단백질을 삽입한 박테리아와 함께 배양하여 callus로의 RNA 결합 단백질 삽입을 유도 후, 선별 과정을 거쳐 유전자가 삽입된 callus들로부터 shoot와 root를 생성시켜 이중 형질전환 벼 식물체를 생산하였다.

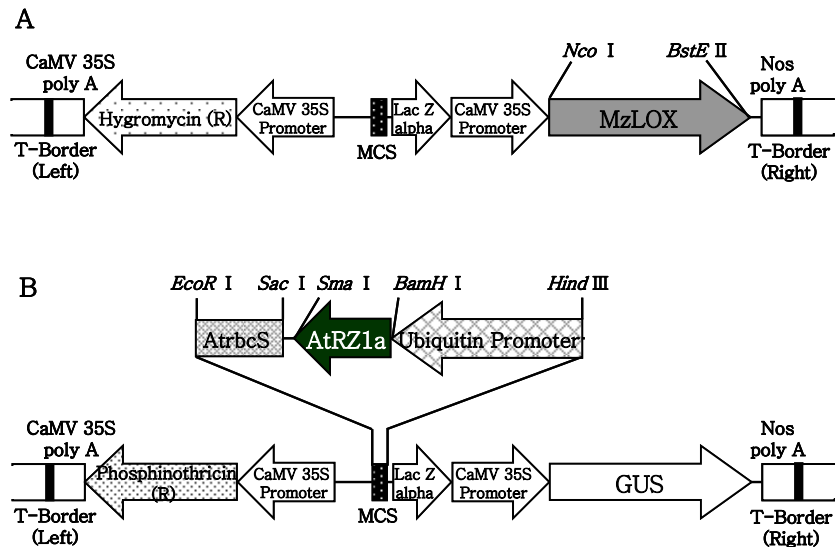


그림 3-3-1. LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벡터의 창출을 위한 벡터의 제작. A: LOX TR, B: LOX/zRBP TR.

2) 과발현 형질전환 벡터의 AtRZ1a 유전자 삽입여부확인 방법

생산한 T0세대의 이중 형질전환 벡터와 비 형질전환 벡터, 리폭시지나아제 형질전환 벡터의 앞에서 TRI reagent를 이용한 방법으로 Total RNA를 분리하고 표 3-3-1과 같은 specific primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

표 3-3-1. RT-PCR primer

Gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Amplified size (bp)
AtRZ1a	Forward	TGGGCTTGCTTGGACAAC GTC	659
	Reverse	TGTGCCTCTCACCTCCTG GAG	
MzLOX	Forward	CAAAATACCAGCCCTCGA GGAC	384
	Reverse	CTGTTCCACCCTGACCAGG AACG	
Rice 18S rRNA	Forward	TAAATGATAAGGTTCAA TGG	168
	Reverse	CTAGTAAGCGCGAGTCAT	

나. 결과 및 고찰

1) LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 확인 결과

아그로박테리아를 이용한 형질전환을 통하여 RNA 결합 단백질(AtRZ1a)과 리폭시지나아제(MzLOX)가 이중 과 발현되는 벼를 생산하였다. 항생제 선별과정과 regeneration과정을 거쳐 15개의 T0 line을 확보하였다. 생산된 T0 세대의 이중 형질전환 벼의 확인은 RT-PCR을 통해 확인하였다. AtRZ1a과발현 형질전환벼는 22개 line 모두에서 정확한 size의 AtRZ1a PCR band가 확인되었으며, LOX 유전자도 대부분의 line에서 확인할 수 있었다(그림 3-3-2). 따라서, LOX유전자와 zRBP 유전자의 이중 발현을 위한 유전자의 도입은 성공적으로 이라고 할 수 있었다.

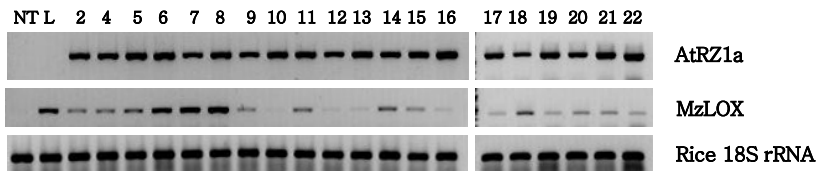


그림 3-3-2. LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼에서 RT-PCR을 이용한 AtRZ1 유전자의 도입확인 (NT: nully transgenic, L: LOX TR).

2. 염 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

약1달 정도 자란 T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎을 NaCl 용액에 담가 시간이 흐른 후 에탄올을 이용하여 추출한 클로로필 잔여 양을 측정하여 이들의 반응을 비교하였다. 클로로필의 양은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{총 클로로필 양} = [\text{Chl A}] + [\text{Chl B}]; [\text{Chl A}] = 13.36 \times A_{664} - 5.19 \times A_{648},$$

$$[\text{Chl B}] = 27.43 \times A_{648} - 8.12 \times A_{664}.$$

$$\text{클로로필 잔여 양(\%)} = (\text{스트레스 후 총 클로로필 양} / \text{스트레스 전 클로로필 양}) \times 100.$$

나. 결과 및 고찰

세 가지 salt 농도에서 식물체의 반응을 비교했을 때, 농도별로 반응에 차이는 있으나 1M 에서의 반응을 볼 때 비 형질전환 벼에 비해 리폭시지나아제 형질전환벼와 이중 형질전환벼에서 salt에 대해 더 저항성을 보이는 결과를 나타냈다. 이중형질전환 벼와 LOX 형질전환 벼의 유사한 결과는 RNA 결합 단백질의 과 발현이 salt 조건 하에서 negative effect를 나타낸다는 결과와 연관 지어 볼 때, salt에

대한 반응 경로에서 리폭지지나아제가 RNA 결합 단백질 효과 억제를 유도한 것으로 예상되며 salt 반응 경로에서 서로 상호작용이 있었음을 시사하고 있다.

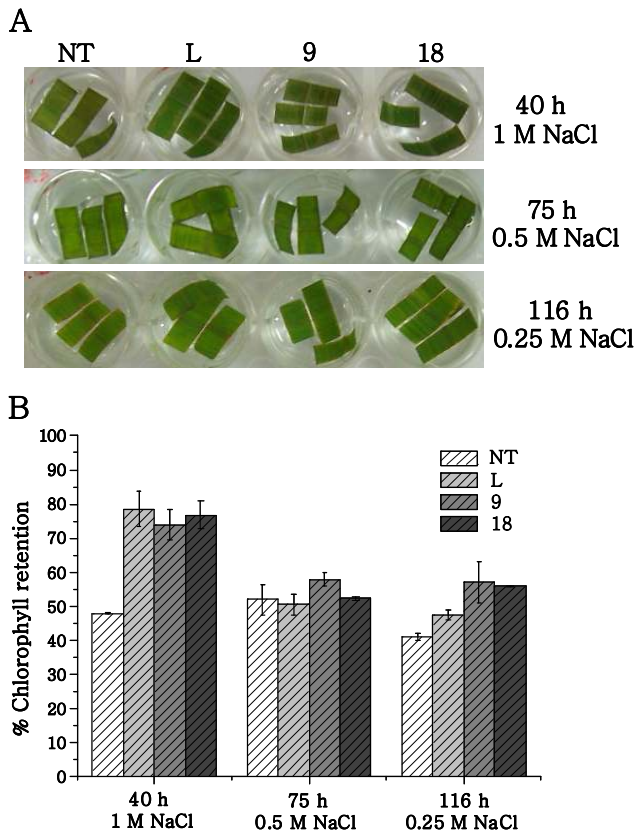


그림 3-3-3. 염 스트레스 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 염스트레스 조건에서 클로필 함량의 변화(NT; nully transgenic. L: LOX TR, 9,18: LOX/zRBP TR). A: Phenotype, B: 클로로필 유지율

3. Mannitol에 의한 삼투압 스트레스에 조건에서 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

염 스트레스처리와 마찬가지로 약1달 정도 자란 벼의 두 번째 잎을 사용하여 사방 0.5cm크기로 잘라내어 1 M, 500 mM, 250 mM mannitol용액에 담근후, 이온 분출 양을 측정하였다. 이온 분출량을 측정하기 위하여, 튜브에 4 ml의 3차 증류수와 시료 잎을 넣은 후, 상온에서 2시간정도 잘 섞어주고, conductivity meter C를 사용하여 conductivity를 측정하고, 잎이 들어있는 튜브를 autoclave하여 상온에서 식힌 후 다시 conductivity를 측정하였다. autoclave전 과 autoclave후의 conductivity의 비율로서 electrolyte leakage를 계산하였다. 이온 분출량은 다음과

같이 계산하였다.

- 이온 분출량(%)=(스트레스 후 이온 분출량/멸균 후 총 이온 분출량) x 100.

나. 결과 및 고찰

삼투압 스트레스와 관련된 mannitol 실험에서도 세 가지 mannitol 농도에서 식물체의 반응을 비교했을 때, 이 또한 농도별로 반응에 차이는 있으나 1M 에서의 반응을 볼 때, 비 형질전환 벼에 비해 리폭시지나아 형질전환벼와 이중 형질전환벼가 mannitol에 대해 더높은 저항성을 보였다.

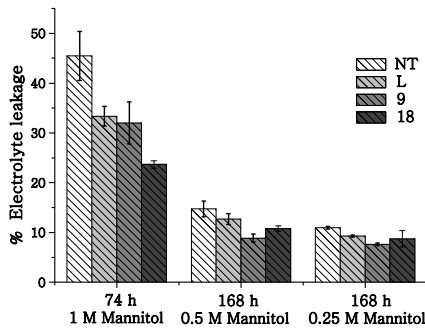


그림 3-3-4. Mannitol에 의한 삼투압 스트레스 조건에서 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 이온분출 비교(NT; nully transgenic. L: LOX TR, 9,18: LOX/zRBP TR).

4. 건조 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

각각의 genotype의 같은 부위의 잎을 선택하여 균일한 길이로 자른 후 건조시켜 잎의 변화를 관찰하였다. 동시에 T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎을 실온에서 건조시키며 수분 손실 정도를 측정하고, 다시 수분을 제공하였을 시 수분 재흡수 정도를 측정하여 반응을 비교해 보았다.

나. 결과 및 고찰

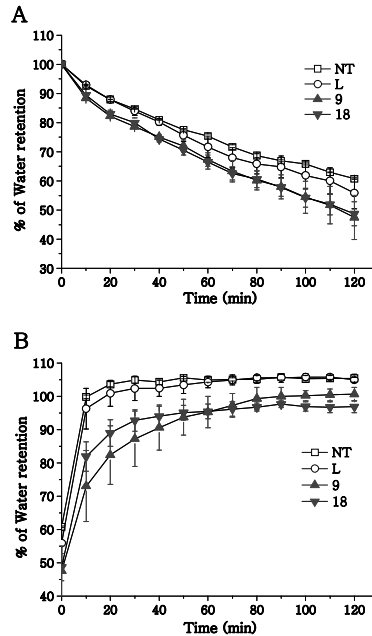


그림 3-3-5. 건조 스트레스에 조건에서 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 수분 손실 및 재흡수 비교(NT; nully transgenic. L: LOX TR, 9,18: LOX/zRBP TR). A: 수분 손실, B: 수분 재흡수.

건조 조건 하에서 수분 손실이 일어나는 속도를 비교해 봤을 때, 비 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼에서의 수분 손실 속도는 크게 차이가 나지 않으며, 이중형질전환 벼에서의 수분 손실은 두 식물체에 비해 빠른 속도로 나타난다. 애기 장대에서 RNA 결합 단백질 (RZ1a)의 과 발현이 건조 조건 하에서 negative effect를 나타냄과 연관지어볼 때, RNA 결합 단백질은 리폭시지나아제와 무관하게 건조 조건에서 수분손실에 관련되어 있을 것으로 보인다.

5. 상처 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼에서 항산화 효소 활성의 변화

가. 재료 및 방법

식물체 스트레스와 관련하여 대표적인 항산화 효소의 활성을 비교해 보고자 T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎에서 SOD, CAT, POD를 추출하여 각각의 항산화 효소의 활성을 측정

하였다. 그리고 상처 후 이들의 활성에 어떠한 변화가 있는지 알아보고자 같은 방법으로 SOD, CAT, POD를 추출하여 각각의 항산화 효소의 활성을 측정, 비교하였다.

나. 결과 및 고찰

환경스트레스와 관련하여 대표적인 세 가지 항산화 효소 활성을 측정해 본 실험에서는 비 형질전환 벼에 비해 리폭시지나아제 형질전환 벼에서 조금 높게 나타난 SOD와 CAT의 활성이 이중형질전환 벼에서 비 형질전환 벼에서보다 더 낮게 나타난 것으로 보아 RNA 결합 단백질이 SOD와 CAT 활성 저하에 관여할 것으로 보인다(표 3-3-2). 그리고 비 형질전환 벼에서 높게 나타난 POD 활성이 리폭시지나아제 형질전환 벼에서 확연히 낮아진 것과 이중 형질전환 벼에서 리폭시지나아제 형질전환 벼와 크게 차이가 나지 않음을 볼 때, 리폭시지나아제가 POD 활성 저하에 관여할 것으로 보인다.

표 3-3-2 항산화 효소의 활성 비교

	SOD (units*mg ⁻¹)	CAT (uM*min ⁻¹ *mg ⁻¹)	POD (uM*min ⁻¹ *mg ⁻¹)
NT	26.42 ± 0.584	10.20 ± 0.9	506.65 ± 123
L	29.73 ± 3.17	15.36 ± 0.8	142.48 ± 2.13
8	11.77 ± 1.19	9.490 ± 2.2	161.63 ± 9.71

N: nully transgenic, L: LOX TR, 8: LOX/AQP TR

이러한 항산화 효소 활성이 상처 후 어떤 변화를 보이는지 살펴봤을 때 CAT의 경우에는 세 종류의 벼에서 모두 상처에 의한 활성 증가를 보였고, 리폭시지나아제 형질전환 벼에서는 상처 후 SOD 활성 감소를, 이중 형질전환 벼에서는 POD 활성 감소를 보인다 (표 3-3-3).

표 3-3-3 상처 스트레스에 따른 항산화 효소의 활성 비교

	SOD (units*mg ⁻¹)	CAT (uM*min ⁻¹ *mg ⁻¹)	POD (uM*min ⁻¹ *mg ⁻¹)
NT	34.83 ± 1.57	18.39 ± 4.48	520 ± 58
L	28.27 ± 1.68	24.01 ± 1.97	150 ± 18
8	17.97 ± 2.78	20.41 ± 2.44	100.8 ± 19.1

N: nully transgenic, L: LOX TR, 8: LOX/AQP TR

6. 상처 스트레스에 대한 LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼에서 과산화수소의 축적 분석

가. 재료 및 방법

T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎에 상처를 준 후 과산화수소 축적을 확인해 보고자, DAB (3,3-diaminobenzidine) 용액을 이용하여 반응시킨 후 이를 비교해 보았다.

나. 결과 및 고찰

상처 후 식물체 내 과산화수소의 축적이 일어난다는 사실을 바탕으로 DAB assay를 수행한 결과로는, 시간이 지남에 따라 갈색이 짙어짐을 확인함으로써 과산화수소의 축적이 일어나고 있음을 확인할 수 있었으나 비 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼, 그리고 이중 형질전환 벼 사이에서의 차이는 크게 보이지 않았다.

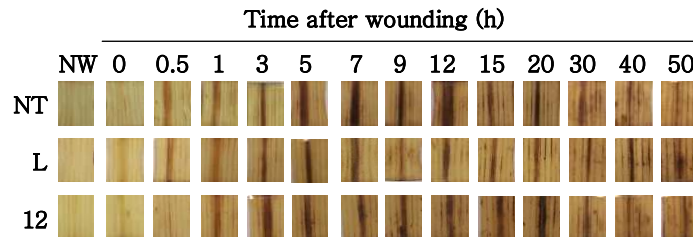


그림 3-3-6. 상처 스트레스에 조건에서 과산화수소의 축적(N; nully transgenic. L: LOX TR, 12: LOX/zRBP TR).

제 4 절 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 창출 및 스트레스 감응 분석

뿌리에서 흡수된 수분은 세포벽을 따라 이동하는 apoplastic pathway와, 세포와 세포사이를 지나서 이동하는 symplastic pathway 및 transcellular pathway 등 세 가지로 구분된다(Steudle et al., 1998). 다양한 수분 이동경로의 의존도는 식물체의 종류에 따라 달라지는 것으로 보고 되어 있으나, 최근의 연구결과 가뭄 등 환경스트레스에 노출된 식물체의 경우에는 뿌리의 cell-to-cell 경로인 symplastic pathway를 이용하여 수분의 섭취가 이루어진다는 알려졌다. 뿌리가 토양 수분을 흡수하기 위해 세포막 단백질, aquaporin (water channel)을 필요로 한다. 대부분의 식물은 30여개 이상의 aquaporin 유전자를 가지고 있다고 알려졌다(Yamada et al., 1995). 아기장대의 aquaporin 유전자들은 다양한 환경 스트레스와 식물 성장 호르몬에 대해 특이한 시, 공간적 발현 양상을 보인다. 또한 overexpression과 antisense를 이용한 transgenic plant 연구들은 수분 부족에 의한 스트레스에서 aquaporin은 수분 흡수, 분배, 그리고 회복 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 본 연구에서는 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환 벼에 아기장대에 존재하는 aquaporin의 한 종류인 AtTip4:1 유전자를 pCAMBIA1201를 사용하여 벼에 형질전환 시키고, 생산된 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 염스트레스, mannitol 스트레스, 건조스트레스에 대한 저항성을 분석하였다.

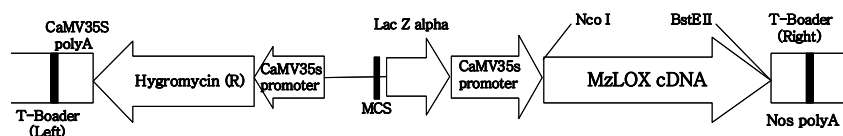
1. LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 창출

가. 재료 및 방법

1) vector construction과 Agrobacterium을 이용한 벼의 형질전환 방법

형질전환을 위한 vectordmp 제작을 위하여 CaMV 프로모터 조절 하의 아기장대 액포막 단백질(AtTip4:1)을 그림 3-4-1과 같이 제작하였다. 리폭시지나아제 형질전환 벼의 T4세대 씨에서 callus를 유도하여 액포막 단백질을 삽입한 박테리아와 함께 배양하여 callus로의 액포막 단백질 삽입을 유도 후, 선별 과정을 거쳐 유전자가 삽입된 callus들로부터 shoot와 root를 생성시켜 이중 형질전환 벼 식물체를 생산하였다.

A



B

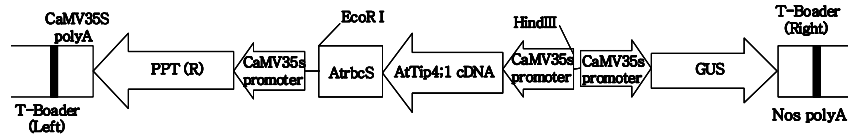


그림 3-4-1. LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 창출을 위한 vector의 제작. A: LOX, B: LOX/AQP

2) 과발현 형질전환 벼의 AtTip4:1 유전자 삽입여부확인 방법

Double 형질전환 벼의 잎 1-10 mg을 액체질소에 얼려 잘 간 후, extraction buffer (200 uM Tris-HCl, 250 uM NaCl, 25 uM EDTA, 0.5% SDS) 400 ul와 잘 섞는다. 원심분리하여 상등액에 isopropanol을 첨가후 다시 원심분리하여 DNA를 침전시켜 EtOH로 세척 후 물로 녹여 genomic DNA를 준비한다. AtTip4:1 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해서 genomic DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. 표 3-4-1과 같은 gene specific primer set와 gene specific forward primer와 vector에 존재하는 Arbc promoter reverse primer set를 사용하여 insertion여부를 확인하였다.

표 3-4-1. PCR primer

Primers	Sequences	Region amplification	Primer set Expected size(bp)
CaMVF-G25' 1A	5'-GACCTAACAGAACTC GCCGTA-3'	CaMV35S promoter	set 1
MzLOXR-1	5'-CTGTTACCCTGACCA GGAACG-3'	MzLOX gene	(1307)
CaMVF-2	5'-ACGTTCCAACCACGTC TTCA-3'	CaMV35S promoter	set 2
Tip4:1 R-3	5'-CAAGGGATCATATG-3'	AtTip4:1 gene	(590)
Tip4:1 F-3	5'-TAGGGCACCATAGCG AAGCG-3'	AtTip4:1 gene	set 3
Tip4:1 R-4	5'-TCCATTTCCTCCGGTG AGGT-3'	AtTip4:1 gene	(360)

나. 결과 및 고찰

항생제 선별과정과 regeneration과정을 7개의 Tip4:1 T0 line을 확보하였다. 각각의 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 insertion 삽입여부를 확인하였다. 재료 및 방법에서 기술한 primer set 를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 한편 Tip4:1 과발현 형질전환벼는 1번 line의 경우, gene specific primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 대부분의 line에서 AQP 유전자들이 확인되었다(그림

3-4-2).

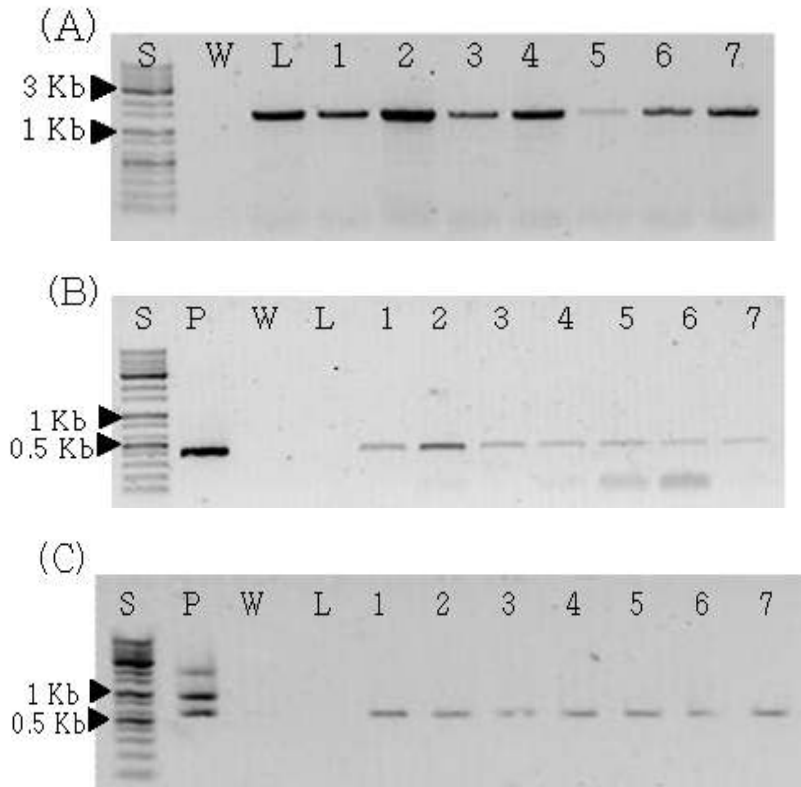


그림 3-4-2. LOX/AQP 형질전환 벼에서 RT-PCR을 이용한 AtRZ1 유전자의 도입 확인(S: size marker, P: control with Tip 4:1, W: wild type, L: LOX TR). A: Primer set 1, B: Primer set 2, C: Primer set 3

2. 염 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

1) 클로로필 함량의 측정

약1달 정도 자란 T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎을 NaCl 용액에 담가 시간이 흐른 후 에탄올을 이용하여 추출한 클로로필 잔여 양을 측정하여 이들의 반응을 비교하였다. 클로로필의 양은 다음과 같이 산출하였다.

- 총 클로로필 양 = [Chl A] + [Chl B]; [Chl A] = $13.36 \times A_{664} - 5.19 \times A_{648}$,
[Chl B] = $27.43 \times A_{648} - 8.12 \times A_{664}$.

- 클로로필 잔여 양(%) = (스트레스 후 총 클로로필 양/스트레스 전 클로로필 양)

x 100.

2) 이온 분출 측정

이온 분출량을 측정하기 위하여, 튜브에 4 ml의 3차 증류수와 시료 잎을 넣은 후, 상온에서 2시간정도 잘 섞어주고, conductivity meter C를 사용하여 conductivity를 측정하고, 잎이 들어있는 튜브를 autoclave하여 상온에서 식힌 후 다시 conductivity를 측정하였다. autoclave전 과 autoclave후의 conductivity의 비율로 electrolyte leakage를 계산하였다. 이온 분출량은 다음과 같이 계산하였다.

- 이온 분출량(%)=(스트레스 후 이온 분출량/평균 후 총 이온 분출량) x 100.

나. 결과 및 고찰

1 M NaCl 처리구에서 wild type과 LOX형질전환체는 이틀째부터 완전히 노랗게 변색되어 심각한 damage를 입은 반면, AtTip4:1과발현 형질전환벼는 염에 대한 더 강한 내성을 보였다 (그림 3-4-3). 염 스트레스하에서 세포막의 damage정도를 알아보기 위해 electrolyte leakage를 측정한 결과, AtTip4:1형질전환 벼는 매우 낮은 electrolyte leakage를 보였다.

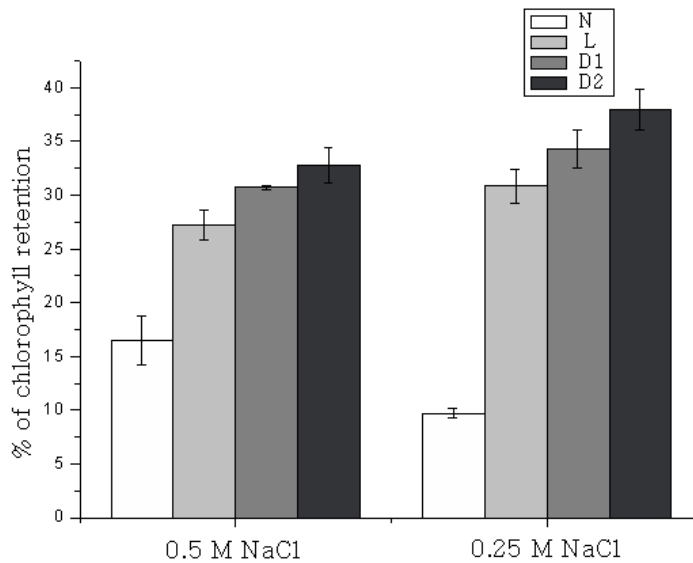


그림 3-4-3. 염스트레스 조건에서 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 클로필 함량의 변화(N; nully transgenic. L: LOX TR, D1, D2: LOX/zRBP TR).

수분 potential을 조절하는 유전자인 aquaporin을 애기장대와 담배 같은 식물체내에서 과발현시켰을 때, 염 스트레스에 대해 반응을 보인다는 결과가 보고 된 바 있다. 그러나 벼에서는 아직까지 aquaporin의 역할에 관한 연구결과가 전혀 보고 되고 있지 않다. 이들 결과는 애기장대의 AtTip4:1유전자를 벼에서 과발현 시켰을 때 이

유전자가 직접적으로 염 스트레스내성기작에 기여하고 있음을 시사한다. 염 스트레스가 주어지면 이 유전자가 더욱 과발현 됨으로서 water channel역할이 강화되어 세포내외간의 삼투조절이 원활히 작동되어 결과적으로 염스트레스 내성에 기여했을 것으로 사료된다.

3. Mannitol 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎을 mannitol 용액에 담가 시간이 흐른 후 이온 분출 양을 측정하여 이들의 반응을 비교해 보았다. 이온 분출량은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{이온 분출량(\%)} = (\text{스트레스 후 이온 분출량} / \text{평균 후 총 이온 분출량}) \times 100.$$

나. 결과 및 고찰

삼투압 스트레스와 관련된 mannitol 실험에서도 비 형질전환 벼에 비해 리폭시지나아제 형질전환 벼와 이중 형질전환 벼에서 mannitol에 대해 더 저항성을 보이는 결과를 나타냈다. 이중 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼 사이에는 큰 차이를 보이지 않고 이중 형질전환 벼에서는 개체간의 차이를 보였다.

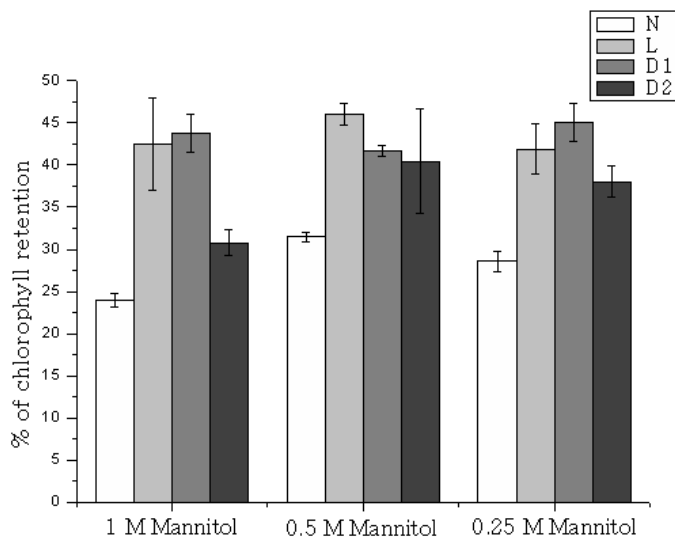


그림 3-4-4. mannitol에 의한 삼투압 스트레스 조건에서 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 염스트레스 조건에서 클로필 함량의 변화(N; null transgenic. L: LOX TR, D1, D2: LOX/zRBP TR).

4. 건조 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎을 실온에서 건조시키며 수분 손실 정도를 측정하고, 다시 수분을 재공하였을 시 수분 재흡수 정도를 측정하여 반응을 비교해 보았다.

나. 결과 및 고찰

여러 액포막 단백질들의 과 발현은 빠른 수분 손실을 가져온다는 결과들이 이미 여러 차례 보고된 바 있다. 건조 조건 하에서 수분 손실이 일어나는 속도를 비교해 봤을 때, 비 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼에서의 수분 손실 속도는 크게 차이가 나지 않으며, 이중형질전환 벼에서의 수분 손실은 두 식물체에 비해 빠른 속도로 나타난다. 액포막 단백질의 과 발현에 의한 결과로 해석된다.

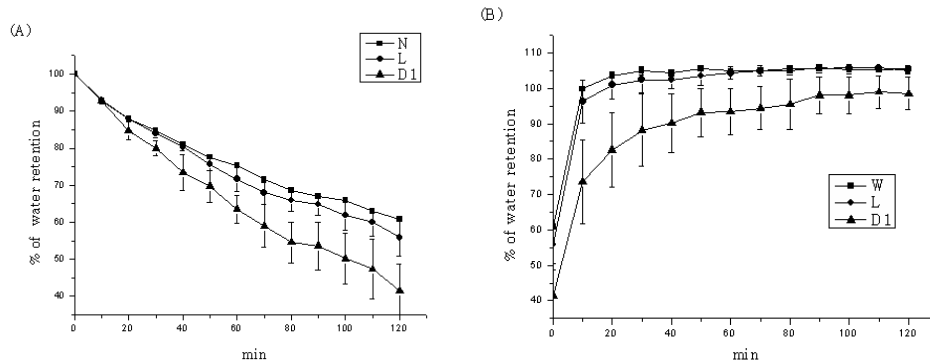


그림 3-4-5. 건조 스트레스에 조건에서 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 수분 손실 및 재흡수 비교(W; wild type. L: LOX TR, D1: LOX/AQP TR). A: 수분 손실, B: 수분 재흡수.

5. 고온 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 반응

가. 재료 및 방법

T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎을 물에 담가 50°C에 두고 시간이 흐른 후 에탄올을 이용하여 추출한 클로로필 잔여 양을 측정하였다.

- 총 클로로필 양 = [Chl A] + [Chl B]; [Chl A] = 13.36 x A₆₆₄ - 5.19 x A₆₄₈,

$$[\text{Chl B}] = 27.43 \times A_{648} - 8.12 \times A_{664}.$$

- 클로로필 잔여 양(%) = (스트레스 후 총 클로로필 양 / 스트레스 전 클로로필 양) x 100.

나. 결과 및 고찰

고온 조건 하에서의 반응을 살펴보았을 때, 리폭시지나아제 형질전환 벼가 비 형질전환 벼와 비교하여 눈에 띄게 민감한 반응을 보였다. 이에 비해 이중 형질전환 벼는 비 형질전환 벼와 유사한 결과를 보이는 것으로 보아 리폭시지나아제 과발현에 의한 고온 스트레스 하에서의 민감성이 액포막 단백질 과 발현으로 인해 보완된 것으로 사료된다.

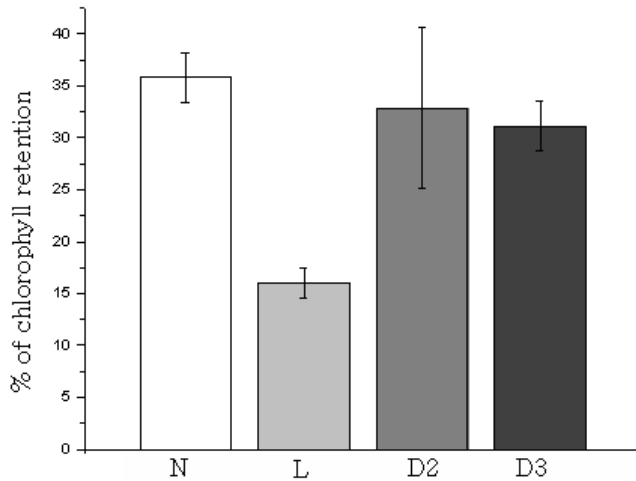


그림 3-4-6. 건조 스트레스에 조건에서 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 클로로필 함량 변화(N; nully transgenic. L: LOX TR, D2, D3: LOX/AQP TR)

6. 상처 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼에서 항산화 효소 활성의 변화

가. 재료 및 방법

식물체 스트레스와 관련하여 대표적인 항산화 효소의 활성을 비교해 보고자 T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎에서 SOD, CAT, POD를 추출하여 각각의 항산화 효소의 활성을 측정하였다. 그리고 상처 후 이들의 활성에 어떠한 변화가 있는지 알아보려고 같은 방법으로 SOD, CAT, POD를 추출하여 각각의 항산화 효소의 활성을 측정, 비교하였다.

나. 결과 및 고찰

환경스트레스와 관련하여 대표적인 세 가지 항산화 효소 활성을 측정해 본 실험에서는 상처 스트레스 후 항산화 효소의 활성을 살펴볼 때, 상처 전 비 형질전환 벼에 비해 이중 형질전환 벼에서 SOD가 높은 활성을 나타내고 POD가 낮은 활성을 보인다(표 3-4-2).

표 3-4-2. 형질전환 벼의 항산화 효소 활성 비교

	SOD (Units*mg ⁻¹)	CAT (uM*min ⁻¹ *mg ⁻¹)	POD (uM*min ⁻¹ *ug ⁻¹)
N	26.42±0.58	10.20±0.09	506.65±123
L	29.72±3.17	15.36±0.79	142.48±2.13
D2	37.00±4.23	17.30±1.30	227.88±7.69

N: nully transgenic, L: LOX TR, D2: LOX/AQP TR

상처 후 이들의 활성을 비교해 보면 비 형질전환 벼에 비해 이중 형질전환 벼에서 SOD의 활성은 낮게 나타나고 POD의 활성은 더 높게 나타남을 확인할 수 있다 (표 3-4-3). SOD와 POD가 서로 반대로 작용하고 있는 것으로 판단된다.

표 3-4-3. 상처 스트레스 조건에서 형질전환 벼의 항산화 효소 활성 비교

	SOD (Units*mg ⁻¹)	CAT (uM*min ⁻¹ *mg ⁻¹)	POD (uM*min ⁻¹ *ug ⁻¹)
N	34.83±2.64	18.39±4.48	520±58
L	28.27±2.91	24.01±1.97	150±18
D2	12.61±0.97	20.41±2.44	530±25

N: nully transgenic, L: LOX TR, D2: LOX/AQP TR

7. 상처 스트레스에 대한 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼에서 과산화수소의 축적 분석

가. 재료 및 방법

T0세대의 이중 형질전환 벼의 flag 잎과 비 형질전환 벼, 리폭시지나아제 형질전환 벼의 flag 잎에 상처를 준 후 과산화수소 축적을 확인해 보고자, DAB

(3,3-diaminobenzidine) 용액을 이용하여 반응시킨 후 이를 비교해 보았다.

나. 결과 및 고찰

상처 후 식물체 내 과산화수소의 축적이 일어난다는 사실을 바탕으로 DAB assay를 수행한 결과로는, 30분이 지난 후 비 형질전환 벼와 리폭시지나아제 형질전환 벼에서는 과산화수소의 축적이 확인되나 이중 형질전환 벼에서 과산화수소의 축적이 확인되지 않는 것으로 보아 액포막 단백질의 과 발현이 과산화 수소의 생성을 늦추는 데 관여할 것으로 보인다.

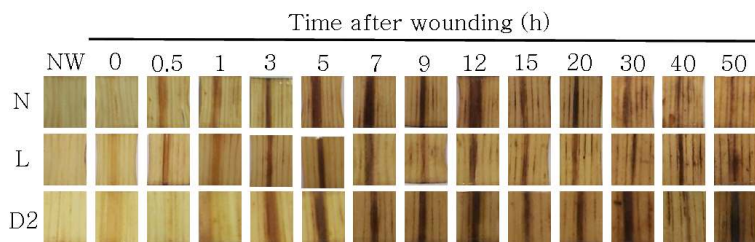


그림 3-4-7. 상처 스트레스에 조건에서 과산화수소의 축적(N; nully transgenic. L: LOX TR, D2: LOX/AQP TR).

제 5 절 애기장대에서 TIP4-1 aquaporin 유전자 knock-out 돌연변이 및 과다발현체 제작 및 검증

1. 애기장대 AtTIP4-1 유전자 분리 및 TIP4-1 유전자 과다발현 벼와 애기장대 형질전환체를 위한 binary vector 제작

가. 서언

수분 부족은 작물의 성장을 결정하는 주요한 환경스트레스이다. 주어진 장소에서 평생을 살아야 하는 식물은 동물에 비해 매우 복잡한 수분 흡수 및 분배 기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구팀은 Tonoplast Intrinsic Protein(TIP)에 속하는 aquaporin을 애기장대로부터 분리하였다. 이 유전자를 연구를 통해 수분 스트레스에 강한 벼 작물을 개발에 필요한 원천 기술 개발을 위해 AtTIP4-1 유전자 분리 및 형질전환 연구를 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) Total RNA 분리와 cDNA 합성

total RNA를 분리하기 위해 어린 애기장대를 액체 질소에 넣고 가루로 만든다. 이것을 DEPC-treated lysis buffer (0.1 M Hepes, 0.2 M EDTA, 10% SDS, 0.02 M EGTA (pH 7.5))에 넣고 동량의 Phenol solution과 섞어 상층액을 취한다. 이러한 상층액의 2배 ethanol을 넣어 Total RNA를 원심 분리하여 얻는다. Poly(A⁺) Track Kit (Promega, Madison, WI)를 이용하여 total RNA로부터 Poly(A⁺) RNA를 분리하였다. 0.5 ug mRNA를 template로, oligo (dT)₁₂를 primer로 하여 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Staratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 합성된 first-strand cDNA에 ultra-purified water를 넣어 전체 부피를 100 ul에 맞추고 -20°C에 보관한다.

2) RT-PCR

애기장대에서 AtTIP4-1 유전자를 분리하기 위해 해당 유전자에 특이적으로 결합하는 두 개의 primer(TIP41-up, 5'-GCTCTAGAATGAAGAAGATCGAGTTAGG-3'; TIP41-dn, 5'-gcgagcactaattcaacaatgggtgctcg-3')를 제작하여 RT-PCR primer로 이용하였다. First-strand cDNA로부터 second-strand DNA를 합성하기 위해 5 ul diluted first-strand cDNA, 1 ul dT-ACP2 (10 μM), 1 ul 10 μM arbitrary ACP, 그리고 10 ul 2 Master Mix (Seegene)를 넣고 ultra-purified water를 넣어 전체 부피를 20μl로 하였다. 이 혼합물을 50°C에서 1시간 반응하여 second strand cDNA를

합성하였다. second strand DNA 합성이 끝난후에 94°C 40초, 65°C 40초, 72°C 40초 반응을 40회 반복한 후, 72°C 5분 final extension 반응을 하는 PCR amplification protocol을 수행하였다. PCR product를 2% agarose gel에서 전개하여 증폭된 DNA band들을 확인하였다.

3) Cloning and sequencing analysis

RT-PCR product를 GENE CLEAN II kit (Q-bio gene, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 gel에서 extraction 하였다. 분리된 PCR product들은 manufacturer instruction에 따라 TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 하였다. 클로닝된 DNA는 제한효소로 잘라내어 DNA fragment의 존재와 길이를 확인하였다. 확인된 DNA는 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 sequence analysis를 하였다. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, Altschul et al., 1990)을 이용하여 각기 DNA product의 identification을 밝혔다.

다. 결과 및 고찰

1) 분리된 aquaporin 유전자의 특성 분석

RT-PCR을 통해 분리한 AtTIP4-1 cDNA는 전체 766 bp 길이 가운데 750 bp open reading frame과 249 아미노산을 가지는 단백질을 암호하는 DNA fragment로 DNA sequencing analysis 결과 확인되었다. internet-based program, TRUST(<http://zeus.cs.vu.nl/programs/trustwww/>)을 이용하여 분리한 단백질의 특성 분석 결과 다른 aquaporin 단백질에서 보이는 6개의 transmembrane domain과 head-to-head 배열을 발견하였다. N-terminal half(아미노산 14부터 102까지 89 아미노산을 가지는 부분)는 C-terminal half(아미노산 132부터 215까지 84 아미노산을 가지는 부분)은 서로 구조적으로 유사하며 quasi-twofold axes로 대칭구조를 이룬다 (그림 3-5-1). 각각 기본 구조들은 2개의 transmembrane을 포함하며 세 번째 conserved domain에는 aquaporin 단백질에서 잘 보존되어있는 NPA motif를 가지고 있다.

```

TIP4:1 1 ----MKGKPLGGHSEKAMPDCKRRLVVEFFITFLVVFAGVGSNAATDSLVGN-----T
TIP1:1 1 ---MPHNTLHGCPDEITRPALRRLAEFISTLIVFVACGSGHAFNRLTEN-----SA
TIP2:1 1 ----LAGAFCSPFQESLGRRLAEFISTLIVFVAGVGSNAATDSI-----SA
TIP3:1 1 MATSARATLGGKAEITLHPSRRLAEFISTLIVFVAGVGSNAATDSLRLVVEHAHAAT
TIP5:1 1 -MRRMPTPTSSQFQVLSKRLRCVVEFISTLIVFVAGVGSNAATDSLRLVVEHAHAAT
-----DV

TIP4:1 50 --LVGLFRAVAHAFVAVMISAGH-LSGGH NPAVTLGDLGGHTEVERFLVYVLDQLL
TIP1:1 53 TTSGLRAVAHAFPLFVAVSAGNISGGH NPAVTFGAFGGITLRLGLVYVIAQLL
TIP2:1 51 LDTPGLRAVAHAFPLFVAVSAGNISGGH NPAVTFGAVGGITVITGVYVIAQLL
TIP3:1 61 NTPGGLRAVAHAFPLFVAVSAGNISGGH NPAVTFGAVGGITVITGVYVIAQLL
TIP5:1 55 SGPPGMLIPALANALSSVYISVNSGGH NPAVTFRAVAGRISVPTLHNYVTSQHL

TIP4:1 107 SESACLRLRLTGGCHFWHTLASGFSYTCGLHEILLTFLHIVYATLDPKRGSLD
TIP1:1 113 GSTACLRLRLATGCHFWHTLASGFSYTCGLHEILLTFLHIVYATLDPKRGSLD
TIP2:1 111 GSTACLRLRLVTCGLAVETHSAGGSGHGVHEILLTFLVYVYATLDPKRGSLG
TIP3:1 121 GSTACLRLRLTGGCHFWHTLASGFSYTCGLHEILLTFLVYVYATLDPKRGSLG
TIP5:1 115 SESACLRLRLVTVNEQHTLTKLAEITGFGSVEGLLHIVYVYATLSDPRGLPL

TIP4:1 167 GFSPLTLGFMGANILAGCAFSGASINPAVAFGPAVNSUTLHHVYVWGPIGGGLAGF
TIP1:1 173 TLAPLAIGFIVGANILAGCAFSGASINPAVAFGPAVNSUTLHHVYVWGPIGGGLAGL
TIP2:1 171 TLAPLAIGFIVGANILAGGPFSGASINPAVAFGPAVNSGSHVYVWGPIGGGLAGL
TIP3:1 181 TLAPLAIGFIVGANILAGGPFSGASINPAVAFGPAVNSGSHVYVWGPIGGGLAGL
TIP5:1 174 AVGPIGFMGANILAGGPFSGASINPAVAFGPAVNSGSHVYVWGPIGGGLAGL

TIP4:1 227 IYENVLDRP-----HYLADDQPLLN
TIP1:1 233 IYDFFDNR-----HEQLFDNR
TIP2:1 231 IYENVGQSE-----HYLADDQPLN
TIP3:1 241 IYENVLDRPPTTHAHGVCLAPEDN-----
TIP5:1 234 IYENVLPVED-----DRGSEHGQAGV-

```

그림 3-5-1. AtTIP4:1 유전자의 아미노산 서열을 다른 aquaporin의 아미노산 서열과 alignment. 전체 단백질에서 아미노산 서열이 매우 유사하다. 특히 물분자의 이동에 관여하는 NPA motif(빨간색 상자로 표시)와 그 주변은 매우 잘 보존되어 있음을 알 수 있다.

2) 벼와 애기장대 형질전환을 위한 binary vector 제작

AtTIP4:1 유전자를 벼와 애기장대에 도입하여 과다발현 형질전환체를 제작하기 위해서 pCAMBIA3301 binary vector에 subcloning하였다 (그림1-1-2). 이렇게 완성된 binary vector를 GV3101 Agrobacteria에 형질전환하였다.

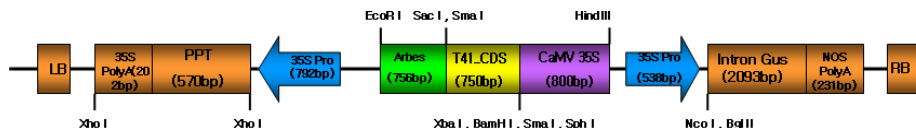


그림 3-5-2. AtTIP4:1 유전자 binary vector 제작. pCAMBIA3301 binary vector를 변형하여 35S promoter 뒤에 AtTIP4:1 유전자가 발현되게 조작하였다. 이 construct를 GV3101 Agrobacteria로 형질전환하여 벼 조직 배양을 통한 형질전환을 하였다.

2. 애기장대 AtTIP4-1 단백질 항체 제작

가. 서언

애기장대 AtTIP4-1 유전자를 식물에 형질전환시킨뒤에 발현형태를 결정하거나 정상개체에서 이들 유전자의 발현을 연구하기 위해 AtTIP4-1 단백질에 대한

antibody는 매우 중요하다.

나. 재료 및 방법

1) AtTIP4-1 단백질의 항체 제조

AtTIP4-1 단백질에 특이적으로 결합하는 antibody를 합성하기 위해 11 아미노산으로 이루어진 synthetic peptide(MKKIELGHSEA)를 제작하여 antigen으로 사용하였다. antibody 제작을 위해 KLH (keyhole limpet hemocyanin)-conjugated peptide를 Freund's adjuvant solution과 함께 21일 간격으로 2회 토끼에 주사하였다. 2회 주사 후 8일 뒤에 antiserum을 취하였다

2) Western blot analysis

식물에서 전체 단백질을 분리하기 위해 어린 잎을 SDS sample buffer[60mM Tris-HCl, pH 8.0, 60mM dithiothreitol, 2.0% (w/v) SDS, 15% (w/v) sucrose, 5mM caproic acid, 1mM benzamidine]에서 곱게 간다. Coomassie blue staining으로 준비된 protein sample의 단백질 농도를 결정하였다.

15% polyacrylamide을 포함하는 SDS-PAGE gel에 sample 단백질을 전개한 후, 전기장을 이용하여 단백질을 nitrocellulose membrane에 blotting하였다. 상온에서 10ml hybridization buufer(5% skim milk, 0.02% sodium azide, 0.02% Tween 20)에 blot을 방치한후 1/1,000으로 희석된 AtTIP4-1 항체를 새로운 hybridization buffer와 함께 10시간 상온에서 방치하였다. 1XPBS(8g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, 0.24g/l K₂HPO₄)에 5분간 3번 씻었다. 상온에서 2% Bovine Serum Albumin solution에 20분, alkaline phosphate conjugated secondary antibody(1:5000 희석)에서 1시간, 1XPBS solution에 10분간 3번 씻은 후 NBT/BCIP solution에서 membrane을 발색하였다.

다. 결과 및 고찰

AtTIP4-1 유전자의 기능을 이해하기 위해서는 그들의 조직 특이적 발현 양상을 이해하는 것이 매우 중요하다. 이러한 조직특이적 발현 양상을 규명하고자 다양한 조직으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot analysis를 하였다. 그러나 두 번의 반복 실험에서도 X-ray film에 일주일 이상의 오랜 노출에서도 특정 band가 형성되지 않았다. 따라서 이러한 문제를 극복하고자 N-terminal에 있는 11개의 아미노산을 기초로 AtTIP4-1 specific antibody를 제작하였다. 일반적으로 그림 1에서 빨간 밑줄을 한 N-terminal region이 다른 aquaporin과는 구분되는 서열을 가지

므로 이들에 대한 synthetic peptide를 합성하여 항원으로 사용하였다.

AtTIP4:1 특이적인 항체를 사용하여 애기장대의 뿌리(R), 잎(CL; cauline leaves, RL; rosette leaves), 꽃(F) 그리고 줄기(S)에서 AtTIP4:1 단백질의 발현을 조사하였다. 뿌리에서 AtTIP4:1 단백질이 강하게 발현됨을 확인하였다 (그림 3-5-3).



그림 3-5-3. AtTIP4:1 단백질의 조직별 발현 양상. 그림 1에서 붉은 색으로 밑줄이 그려진 AtTIP4:1 단백질의 N-terminal region에 대해 synthetic polypeptide를 합성하였다. 이 polypeptide를 항원으로 하여 토끼에서 AtTIP4:1 단백질에 대한 항체를 합성하였다. 이 항체는 AtTIP4:1에 매우 특이적인 아미노산 서열을 사용하여 다른 유사한 aquaporin 단백질과 cross-reaction을 하지 않도록 하였다. S; stem, CL; Caulin eleaves, RL; Rossete leaves, F; Flower, R; Root.

제 6 절 분리된 애기장대 TIP4-1 aquaporin knock-out 돌연변이 및 과다발현 형질전환체의 특성분석

1 Northern analysis 및 Western blot analysis를 통한 AtTIP4-1 과다발현 와 knock-out 돌연변이 애기장대에서 TIP4-1 단백질 및 전사체 발현 검증

가. 서언

AtTIP4:1 유전자 과다발현체를 제작하여 이러한 개체들을 정상 애기장대를 비교하며 환경스트레스 및 다양한 조건에서 반응을 비교 조사하는 것은 AtTIP4:1 유전자의 식물내에서 기능 이해에 매우 중요하다. 따라서 35S promoter에 의해 AtTIP4:1 유전자를 발현하게 하는 pBI121 binary vector를 제작하여 애기장대로 형질전환 하였다.

또한, AtTIP4:1 유전자의 기능을 다른 각도에서 연구하기 위해서 애기장대에서 해당 유전자가 없어진 돌연변이를 분리하여 그들의 반응을 정상개체 및 과다발현 형질전환체와 비교연구하는 것은 중요하다. 이를 위해 Salk institute에서 개발한 대량의 random T-DNA insertion pool에서 AtTIP4:1 유전자에 T-DNA가 삽입된 line을 얻었다.

나. 재료 및 방법

1) Agrobacteria-mediated transformation을 이용한 애기장대 형질전환

AtTIP4-1 유전자를 포함하는 binary vector를 electricity shock method를 통해 Agrobacteria에 도입한다. 이때 전압 2.5V, 10mS 자극을 가한 후 항생제가 들어있는 배지에서 원하는 vector를 가지는 cell line을 분리한다.

AtTIP4-1 binary vector를 가지는 agrobacteria를 SOC media에서 30°C에서 overnight한다. 이러한 cell culture solution을 transformation buffer(1/2 MS salt, 50g/l sucrose, 0.02% silweet)에 suspension한다. 건강한 6주 정도의 애기장대를 준비된 transformation buffer에 3분간 incubation하면서 vacuum을 가한다. 애기장대를 상온, 암조건에서 24시간 방치한 후 seed를 받아 kanamycin이 들어있는 배지에서 3세대에 걸쳐 저항성의 비율을 조사하여 homozygous line을 분리하였다.

2) Northern blot을 이용한 과다발현 형질전환체 확인

애기장대의 rosette leave을 liquid nitrogen에서 곱게 갈았다. 이러한 잎 가루를 TRIZOL agent에 suspension하여 vortexing한 후 상온에 방치하여 5분 방치한다. 원심분리를 통해 그들의 상을 분리한 후 상층액을 취하여 2배 volume 에탄올을

섞은 후 -20°C 에 방치한다. 분리된 total RNA는 1.2% denaturing agarose gel에 전개한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하여 hybridization을 한다. AtTIP4-1 cDNA를 ^{32}P 로 labeling하여 hybridization buffer(7% SDS, 1% BSA, 0.5 NaPO_4 , pH7.0)에서 overnight incubation한다. washing solution(0.1% SDS, 0.1XSSC)를 이용하여 상온에서 2회 washing후 X-ray film을 exposure한다.

3) PCR을 기초로한 T-DNA insertion mutants genotype 결정 및 homozygous line 분리

SALK(Signal T-DNA Express, SALK institute Genomic Analysis, La Jolla, CA) data base를 대상으로 AtTIP4-1 유전자(At2g25810)의 genomic DNA를 query로 하여 BLAST program을 통해 SALK_050663 line이 AtTIP4-1 유전자에 T-DNA를 가지고 있음을 확인하였다. 이들 식물들로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR을 통한 genotype을 규명하고자 하였다. PCR에 의한 genotype 규명을 위해 두 개의 gene specific primers(TIP41-UP; 5'-CCATGTGCTCCTTAGTCCTTACC-3', TIP41-DN; 5'-GTGAACCGGAGTTCCCTAATCAC -3')을 제작하였다. 또한 T-DNA specific primer를 위해 T-DNA left border를 기초로 T-DNA primer(5'-CAGGTGCCACGGAATAGT-3')을 제작하였다. 이들 primer들을 이용하여 gene specific DNA과 T-DNA specific DNA를 증폭하기 위해서는 TIP41-UP와 DN primer 그리고 T-DNA primer와 TIP41-DN primer를 이용하였다. PCR 조건은 94°C , 5분, 41회 반복 94°C , 1분, 55°C , 1분 그리고 72°C 2분 그리고 72°C 15분을 PCR하여 0.7% agarose gel에 전개하였다.

다. 결과 및 고찰

1) AtTIP4-1 knock-out 돌연변이 및 과다발현 형질전환체 분리

유전학적 방법을 이용하여 AtTIP4:1 유전자의 기능을 연구하고자 Salk institute에서 AtTIP4:1 유전자에 T-DNA가 삽입된 line을 얻었다. 이 segregating pool에서 PCR을 이용하여 knock-out homo line을 확인하였다. 이러한 PCR을 위해 그림 3-6-1 A은 AtTIP4:1 genomic structure와 두 개의 gene specific primers(화살표 1과 3)와 하나의 T-DNA specific primer(화살표 2)의 상대적인 위치를 보여준다. 그림 3-6-1 B에서 보듯이 wild-type plant는 gene specific primers를 사용한 PCR에서만 DNA band를 보이고 homozygous line에서는 T-DNA specific primer와 TIP41-DN primer를 사용한 PCR에서 DNA band를 보인다. 이러한 PCR band 형태로부터 segregation pool에서 AtTIP4-1 knock-out 돌연변이를 분리하였다.

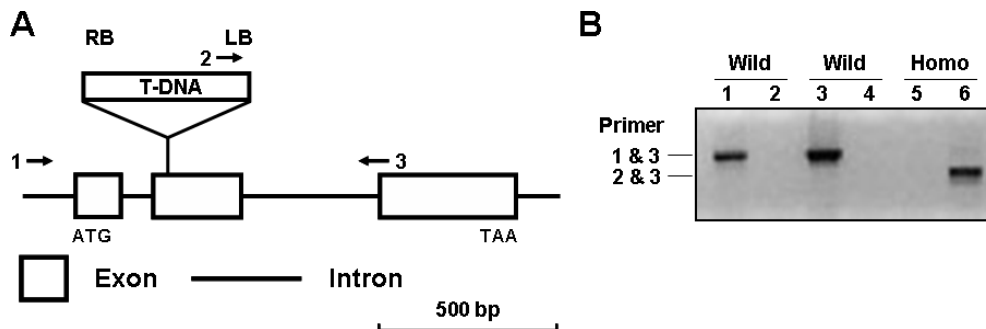


그림 3-6-1. AtTIP4:1 knock-out 돌연변이 애기장대 분리. A. AtTIP4:1 유전자의 genomic structure와 T-DNA insertion 위치 표시. 상자는 AtTIP4:1 유전자의 exon 을 표시하며 줄은 intron을 나타낸다. Salk institute에서 얻은 segregation pool에서 knock-out homo line을 얻기 위해 두개의 gene specific primer (1과 3으로 표시된 화살표)와 T-DNA specific primer(2번 화살표)를 제작하여 PCR을 하였다. B. PCR 을 이용한 T-DNA knock-out homo line 분리. 1과 2번 혹은 2와 3번 primer 조합 을 이용한 PCR에서 T-DNA insertion homo line은 정상과는 다른 PCR product pattern을 보여준다. 이러한 결과를 이용 하여 homo line을 분리하였다.

2) AtTIP4-1 과다발현 형질전환체 및 knock-out 돌연변이에서 AtTIP4-1 transcripts와 단백질 발현 확인

AtTIP4-1 유전자를 과다발현하는 homo line을 분리한 후 overexpression(OX) kine과 knock-out(KO) line에서 AtTIP4-1 transcripts를 확인 하기 위해 Northern blot analysis를 실시하였다. 정상 조건에서 10일 자란 wild-type, KO 그리고 seedling에서 total RNA를 분리하여 1.2% agarose gel에 running한 후 nylon membrane에 transfer하여 AtTIP4:1 유전자를 probe으로 하여 Northern blot analysis를 하였다 (그림2-1-2). AtTIP4:1 transcript가 정상개체에서 는 발견되지 않았다. 이는 AtTIP4:1 유전자의 발현이 매우 낮음을 보여준다. 또한 AtTIP4:1 knock-out 돌연변이에서도 mRNA가 발견되지 않았는데 이는 정상 개체 에서도 발견되지 않을 정도로 낮은 mRNA가 KO돌연변이에서 발견되지 않는 것은 일반적이다. 그러나 35S promoter에 의한 과다발현 개체는 강한 AtTIP4:1 transcript 발현을 확인할 수 있었다. 따라서 이상의 실험 결과로 35S promoter에 의한 AtTIP4:1 유전자 과다발현 형질전환 애기장대를 실험적으로 확인하였다.

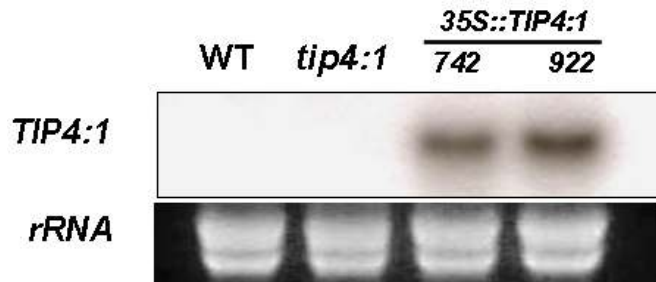


그림 3-6-2. Northern blot analysis를 통한 AtTIP4:1 유전자 과다발현 형질전환 애기장대 확인. pBI121 binary vector를 이용하여 35S promoter에 의해 발현되는 AtTIP4:1 유전자를 애기장대로 도입하였다. T3 세대에서 과다발현 homo line을 확보하고 이들 line에서 AtTIP4:1 유전자의 발현을 Northern blot analysis로 확인하였다.

Northern blot analysis에서 AtTIP4:1 KO line의 발현을 적은 transcript 양을 확인하지 못하여 이미 확보한 AtTIP4:1 antibody를 이용하여 KO와 과다발현 개체에서 AtTIP4:1 단백질 양을 확인하였다. 정상 조건에서 10일 성장한 개체에서 전체 단백질을 분리하였다. 이들 단백질을 12% SDS-PAGE gel에서 전개하여 nylon membrane에 옮겼다. 이를 AtTIP4:1 antibody를 이용하여 Western blot analysis를 하였다. 이 Western blot analysis는 정상개체에 비해 mRNA와 같이 AtTIP4:1 단백질도 과다발현 형질전환체에서 매우 많이 발현됨을 확인하였다 (그림 3-6-3). 또한 mRNA와는 다르게 AtTIP4:1 단백질이 정상개체에서 검출되었다. 또한 유전적 분석으로 확인한 AtTIP4:1 KO line에서는 정상개체에서 발견되는 단백질조차도 발견되지 않는 것으로 보아 AtTIP4:1 KO 돌연변이 임이 확인되었다.

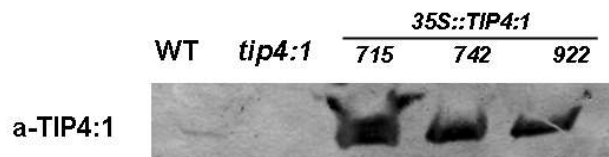


그림 3-6-3. Western blot analysis를 통한 AtTIP4:1 Knock-out 돌연변이 및 유전자 과다발현 형질전환 애기장대 확인. 정상조건에서 10일 성장한 정상개체, knock-out 돌연변이 그리고 과다발현 개체에서 전체 단백질을 분리하였다. 이들을 SDS-PAGE gel에 전개하여 AtTIP4:1 antibody를 이용하여 Western analysis를 하였다. 정상 개체에 비해 과다발현 개체는 많은 AtTIP4:1 단백질 발현을 보이는 반면 Knock-out 돌연변이는 AtTIP4:1 단백질이 발견되지 않는다.

2. 정상 조건 및 가뭄, 고염과 같은 환경 스트레스 조건에서 AtTIP4-1 과다발현 와 knock-out 돌연변이 애기장대 성장 및 발달 양상 검증

가. 서언

많은 생화학적 연구들은 aquaporin 유전자들이 potential gradient에 따라 물 분자의 흐름을 촉진한다고 보고하였다. 그들의 생리적 기능은 최근에서야 돌연변이 연구를 통해 확인되고 있다. 식물에서 수분 분배에 관여하는 단백질의 생리적 기능을 이해하기 위해서는 다양한 성장 조건에서 특정 유전자 발현 증가 및 억제된 돌연변이를 정상개체와 비교하는 것은 매우 중요하다.

나. 재료 및 방법

1) 식물 재배 조건

애기장대는 24°C, 장일조건(16h day/8h night)에서 키웠다. 애기장대의 동일한 발아를 위해서는 4°C에서 3일간 배양한 후 24°C로 옮겼다. 페트리 디쉬에서 식물의 반응을 조사할 필요가 있을 때에는 1.5% sucrose, 0.5mM MES (pH5.7) 1/2XMS에서 키운 후 다양한 반응을 조사하였다. 또한 가뭄에 대한 반응을 조사하기 위해 암면에 씨앗을 직접뿌린 후 저온 처리를 하고 24°C로 옮겨 3주 된 식물을 이용하여 가뭄에 대한 반응을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 정상 조건에서 wild-type, KO 그리고 OX line들의 성장 비교 분석

AtTIP4;1 유전자의 생리적 기능을 유전학적 접근을 위해 T-DNA insertion에 의한 loss-of-function mutation(KO line)과 35S promoter-driven over-expression(OX)에 의한 gain-of-function mutation을 이용하여 AtTIP4-1 유전자의 발현 변화에 대한 정상 조건에서 그들의 성장과 발달 과정을 관찰하였다. 10일, 3주, 그리고 6주에서 loss-of-function mutation과 gain-of-function mutation 개체들은 정상개체와 거의 유사한 양상으로 성장함을 확인하였다 (그림 3-6-4). AtTIP4-1 유전자의 발현양의 변화에 따른 성장 및 발달에는 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

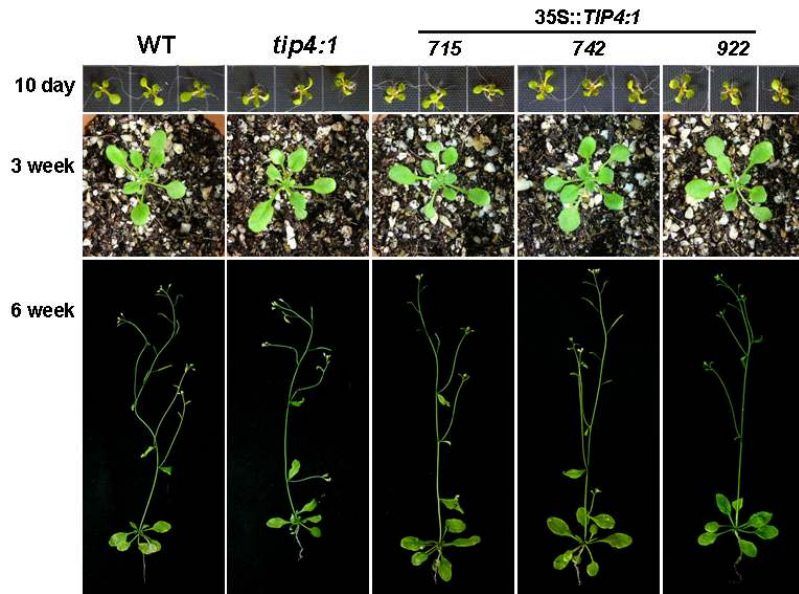


그림 3-6-4. 정상 조건에서 AtTIP4;1 loss-of-function과 gain-of-function 돌연변이들의 성장 및 발달. 정상 조건에서 wild-type, KO 그리고 OX line에 대한 발달과 성장을 비교하였다. 대체적으로 동일한 표현형을 보인다.

2) 가뭄과 고염 조건에서 wild-type, KO 그리고 OX line들의 성장 비교 분석

AtTIP4:1 KO와 과다발현 애기장대를 이용하여 가뭄과 같은 환경스트레스에 대한 반응을 조사하였다. 가뭄 조건을 반복적으로 동일하게 가하기 위해 식물을 흙에 심지 않고 rock wool에서 키웠다. 이 조건에서 3주간 성장한 정상개체, KO, 과다발현 식물을 더 이상 수분을 공급하지 않고 그들의 반응을 관찰하였다. 5일간 수분 공급하지 않고 키운 후 사진을 찍었다 (그림 3-6-5). 정상개체와 KO line은 매우 민감하게 반응하나 과다발현체들은 정상 개체와 비교하여 강한 가뭄 저항성을 보였다.

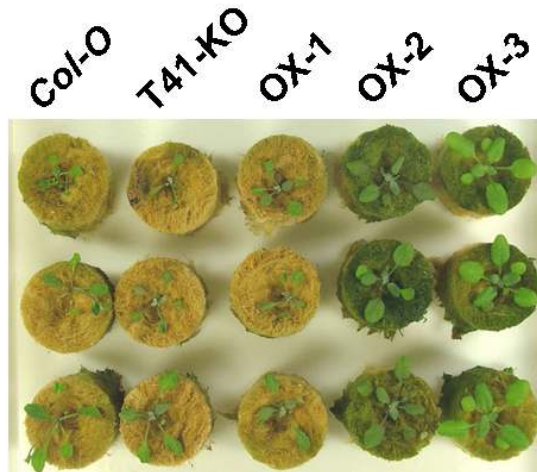


그림 3-6-5. AtTIP4;1 유전자 knock-out 돌연변이 및 과다발현 형질전환 애기장대의 가뭄스트레스에 대한 반응. 유전 분석을 통해 확인된 KO 및 과다발현 애기장대를 이용하여 가뭄에 대한 반응을 조사하였다. 식물 개개의 수분 공급을 효율적으로 조절하기 위해 rock wool에 seed를 파종하고 정상조건에서 2주간 키운 후 수분 공급을 5일간 중단한 후 사진을 촬영하였다.

aquaporin 유전자들은 potential gradient에 따라 물 흐름을 촉진하는 막 단백질로 잘 알려져 있다. 따라서 해당 유전자의 발현 양의 변화에 따른 loss-of-function mutation과 gain-of-function mutation이 고염 스트레스에 대한 식물에 미치는 영향을 조사하였다 (그림 3-6-6). AtTIP4-1 유전자의 knock-out 혹은 과다발현이 고염에 의한 스트레스에 크게 영향을 주지 못하는 것처럼 관찰 되었다. 이는 AtTIP4;1 유전자가 환경 스트레스 반응에 중요한 역할을 수행하지 않거나 다른 TIP aquaporin 유전자들이 AtTIP4;1의 기능을 대신해 준다고 생각할 수 있다.

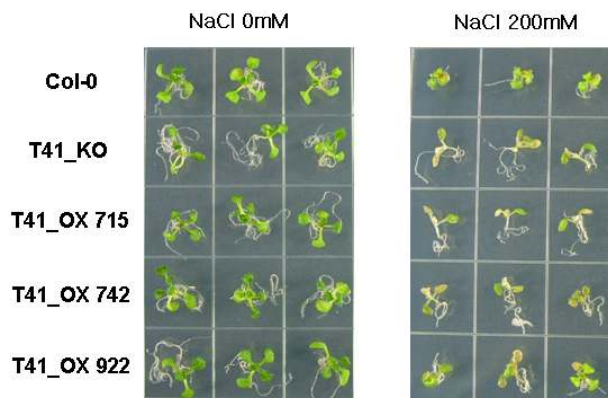


그림 3-6-6. 고염 조건에서 AtTIP4;1 loss-of-function과 gain-of-function 돌연변이들의 성장. 정상 조건에서 10일 성장한 개체들을 정상 조건과 고염 조건으로 옮긴 후 5일 후에 사진을 촬영하였다. 2회 반복 실험을 통해 정상개체와 거의 차이가 없음을 확인하였다.

3. AtTIP4-1 과다발현 와 knock-out 돌연변이 애기장대에서 Urea 흡수 정도 비교 검사

가. 서언

일부 애기장대의 TIP aquaporin 유전자들이 urea transport defective yeast 를 functional complementation함이 증명되었다. 그러나 이들이 식물 내에서도 urea

transport를 촉진 할 수 있는지 연구는 되지 않았다. 따라서 AtTIP4-1 유전자 발현을 변화시킨 돌연변이 식물에서 Urea transport 양을 비교분석 하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

1) N-deficient 애기장대 식물 재배

애기장대를 1.5% sucrose, 0.5mM MES (pH5.7) 1/2XMS를 포함하는 배지에 심고 동일한 발아를 위해 4°C에서 3일간 배양한 후 24°C에서 10일간 성장시켰다. 10일 성장한 애기장대를 N source가 결여된 조성배지에서 다양한 시간 별로 추가 배양한 후 전체 단백질을 분리하였다.

2) 애기장대에서 Urea uptake 실험

3주된 애기장대 잎을 10% (v/v) ¹⁴C-labeled urea(57.0 mCi/mol specific activity, American Radiolabeled Chemicals.,)을 포함하는 1/2 MS 배지에 올려 놓았다. 0.5와 1시간 배양 후 10mM cold urea를 포함하는 1/2 MS media로 세 번 씻어 남아있는 ¹⁴C-labeled urea를 제거하였다. 이 잎들을 homogenation buffer(10mM HEPES, 0.3 mM EDTA, pH7.5)에 넣어 마쇄한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 ¹⁴C을 측정하였다. 측정된 ¹⁴C의 양은 fresh weight으로 보정하였다.

다. 결과 및 고찰

1) N source가 부족한 조건에서 AtTIP4-1 유전자의 발현이 증가한다.

우선적으로 AtTIP4;1 유전자가 식물에서 nitrogen (N) nutrition에 관여하는지 알아보기 위해 N 결핍배지에서 AtTIP4;1 단백질의 발현 변화를 조사하였다 (그림 3-6-7). Western analysis는 AtTIP4;1 단백질은 N 결핍 배지에서 5일 정도 배양하면 증가함을 확인하였다. aquaporin은 높은 농도에서 작용하며 concentration dependent urea uptake에 관여하기 때문에 urea를 liquid fertilizer로 사용하는 경우 그 효과가 크다고 할 수 있다.

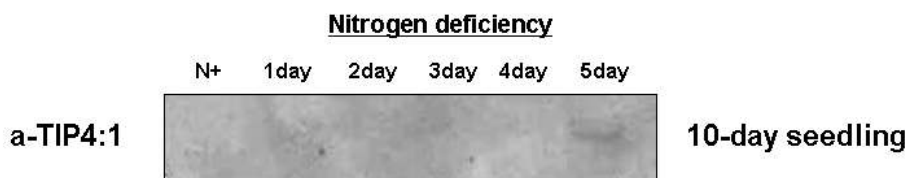


그림 3-6-7. Nitrogen 결핍 조건에서 AtTIP4;1 발현 양상. 10일 어린 애기장대를 N source가 결핍된 그림에 나타난 시간 동안 방치한 후 total protein을 얻은 후 Western analysis를 하였다. 5일 정도 처리하면 AtTIP4-1 단백질 양이 증가함을

확인할 수 있다.

2) AtTIP4-1 과다발현은 Urea uptake를 증가시킨다.

3주 성장한 정상개체, T-DNA insertion line, 그리고 AtTIP4;1-overexpressed line에서 잎을 얻어 ^{14}C -Urea를 포함하는 배지 넣고 30, 60 분 incubation하였다. 주어진 시간 동안 처리한 후 10mM urea를 포함하는 1/2 MS media로 5회 세척하여 잎 표면에 붙은 ^{14}C -Urea를 제거하였다. homogenization buffer (10 mM HEPES, 0.3 mM EDTA, pH 7.5)로 잎을 마세한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 세포에 있는 ^{14}C -Urea를 측정하였다. T-DNA insertion line에서는 정상 개체에 비하여 urea uptake rate 변화가 없으나, AtTIP4;1 overexpression line에서는 71.6%와 90.2%가 증가하였다 (그림 3-6-8).

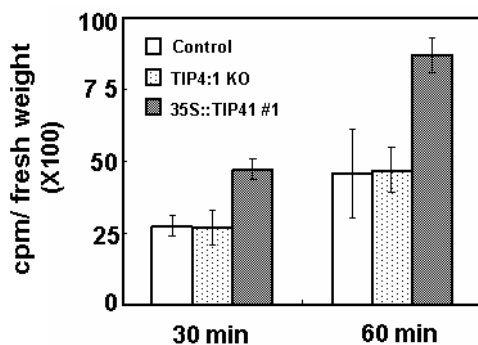


그림 3-6-8. ^{14}C -Urea-uptake 실험. 3주 된 애기장대에서 잎을 얻어 ^{14}C -Urea를 포함하는 배지 위에 올려놓고 주어진 시간 방치하였다. 잎을 homogenation한 후에 liquid scintillation counter에 넣고 ^{14}C 을 정량하였다. 독립적으로 3회 반복 실험을 통해 평균과 표준편차를 결정하였다.

제 7 절 벼에서 애기장대 TIP4-1 유전자와 유사한 aquaporin 유전자 분리 및 발현 특이성 규명

1. 애기장대 AtTIP4-1 유전자와 비슷한 구조를 가지는 유전자를 벼로부터 분리

가. 서언

모든 식물에서 aquaporin 단백질들은 세포내의 수분을 흡수하고 재분배하는데 매우 중요한 기능을 수행한다. 수분 스트레스에 강한 벼 작물을 개발하고자 Tonoplast Intrinsic Protein(TIP)에 속하는 aquaporin을 벼에서 분리하여 특성을 연구하였다.

나. 재료 및 방법

1) Total RNA 분리와 cDNA 합성

어린 동진벼를 이용하여 total RNA를 분리하였다. DEPC-treated lysis buffer[0.1 M Hepes, 0.2 M EDTA, 10% SDS, 0.02 M EGTA (pH 7.5)]에 동진 벼의 잎을 넣고 동량의 Phenol solution과 섞어 상층액을 취한다. 이러한 상층액의 2배 ethanol을 넣어 Total RNA를 원심 분리하여 얻는다. Poly(A⁺) Track Kit (Promega, Madison, WI)를 이용하여 total RNA로부터 Poly(A⁺) RNA를 분리하였다. 0.5 ug mRNA를 template로, oligo (dT)₁₂를 primer로 하여 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Staratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 합성된 first-strand cDNA에 ultra-purified water를 넣어 전체 부피를 100 ul에 맞추고 -20°C에 보관한다.

2) RT-PCR

애기장대에서 urea transport를 촉진하는 AtTIP4;1와 매우 유사한 OsTIP1;1 (AK058322, cDNA accession code) 유전자를 벼에서 분리하기 위해 두 개의 gene-specific primer를 디자인하였다. OsAQP1-up (5'-GAGCAGCAGAAGGGAGTAG-3')는 initiation codon에서 6 bp upstream 쪽으로 떨어져 있는 19-mer로, OsAQO1-dn (5'-ACGGTTGGATCGGAGTCGG-3')는 stop codon에서 downstream 쪽으로 42 bp 떨어져 있는 19mer를 이용하여 RT-PCR primer로 이용하였다. First-strand cDNA로부터 second-strand DNA를 합성하기 위해 5 µl diluted first-strand cDNA, 1 µl dT-ACP2 (10 µM), 1 µl 10 µM arbitrary ACP, 그리고 10 µl 2 Master Mix (Seegene)를 넣고 ultra-purified water를 넣어 전체 부피를 20µl로 하였다. 이 혼합물을 50°C에서 1시간 반응하여 second strand cDNA를 합성하였다. second strand DNA 합성이 끝난

후에 94°C 40초, 65°C 40초, 72°C 40초 반응을 40회 반복한 후, 72°C 5분 final extension 반응을 하는 PCR amplification protocol을 수행하였다. PCR product를 2% agarose gel에서 전개하여 증폭된 DNA band들을 확인하였다.

3) Cloning and sequencing analysis

RT-PCR product를 GENECLAN II kit (Q-bio gene, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 gel에서 extraction 하였다. 분리된 PCR product들은 manufacturer instruction에 따라 TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 하였다. 클로닝된 DNA는 제한효소로 잘라내어 DNA fragment의 존재와 길이를 확인하였다. 확인된 DNA는 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 sequence analysis를 하였다. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, Altschul et al., 1990)을 이용하여 각기 DNA product의 identification을 밝혔다.

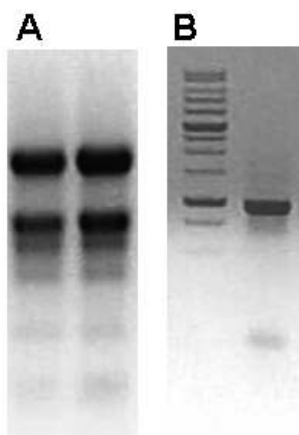


그림 3-7-1. 벼에서 분리 한 전체 RNA와 RT-PCR product. 어린 동진 벼 잎에서 total RNA를 분리하여 (A) RT-PCR을 하였다 (B). RT-PCR 결과 형성된 PCR product는 pGEM-Teasy vector에 cloning하여 sequencing analysis를 하였다.

다. 결과 및 고찰

1) OsTIP1;1 유전자 분리 및 sequencing analysis

pGEM-Teasy vector에 클로닝된 DNA fragment의 1차 구조를 분석하기 위해 sequencing analysis를 하였다. T7과 SP6 primer를 사용하여 양쪽 방향으로 sequence를 확인하였다 (그림 3-7-1). OsAQP1 유전자의 전체 길이는 839 bp이다. 또한 753 bp 길이를 가지는 open reading frame은 250 아미노산을 암호화하고 있

다. RT-PCR을 통해 분리한 OsAQP1 유전자의 integrity를 확인하기 위해 OsTIP1;1 nucleotif sequence와 비교하였다 (그림 3-7-2). 이 비교를 통해 A273G, A278G, 그리고 G363A 변이가 OsAQP1에 PCR 도중 발생하였음을 확인하였다. 이들 point mutation들은 빨간색으로 표시하였다 (그림 3-7-2).



그림 3-7-2. OsAQP1 nucleic acid sequence 비교. RT-PCR로 확보된 cDNA를 BLAST program으로 기존에 보고된 유전자와 비교하였다. 빨간색으로 표시된 nucleic acid는 보고된 유전자와 차이를 보인다.

2) OsTIP1;1 단백질의 구조적 특이성

OsAQP1 단백질은 아미노산을 기초로 하여 계산되는 분자량과 pI value는 각각 25.7 kDa와 5.6을 가지는 단백질을 가짐을 알 수 있다. 또한 multiple alignment analysis를 통해 tonoplast intrinsic protein (TIP) subfamily 계열의 aquaporin들과 유사성이 매우 높음을 보여준다. OsAQP1 단백질은 AtTIP4;1과 50% 유사성을 보인다. aquaporin 단백질의 구조적 특징인 head-to-head arrangement 구조가 OsAQP1 단백질에서도 존재함을 internet-based program TRUST (<http://zeus.cs.vu.nl/programs/trustwww/>)를 이용하여 확인하였다 (그림

3-7-3). membrane plane에 있는 quasi-twofold axis를 중심으로 N-terminal half는 (17 - 108 residues, 92 amino acids)과 C-terminal half (138 - 220 residues, 93 amino acids)은 연결되어있다. 이들 두 개의 symmetric halves들은 그림 #에서 마주보는 화살표로 표시하였다. 거의 모든 aquaporin 단백질에서 발견되는 NPA (Asn-Pro-Ala) motif는 C-terminal half에는 발견되나 N-terminal half에는 NPA 대신에 DPA motif가 발견되었다. 이는 PCR error에 의한 point mutation이라고 생각된다.

```

OsAQP1      M P I R N I A V G S H O E V Y H P G A L K A A L A E F I S T L I F V F A G O G S G M A F S K L T G G G A T T P A G L I A
AK058322    M P I R N I A V G S H O E V Y H P G A L K A A L A E F I S T L I F V F A G O G S G M A F S K L T G G G A T T P A G L I A
AtTIP4;1    - - M K K I E L G H H S E A A K P D C I K A L I V E F T I T F L F V F A G V G S A M A T D S I V G - - - N I L V G L E A

OsAQP1      A A V A H A F A L E V A V S V G A N I S G G R V D P A V T F G A F V G G N I T L F R G L L Y W I A Q L L D S T V A C F L
AK058322    A A V A H A F A L E V A V S V G A N I S G G H V N P A V T F G A F V G G N I T L F R G L L Y W I A Q L L G S T V A C F L
AtTIP4;1    V A V A H A F V V A V M I S A G - H I S G G H L N P A V T L G L L I G G H I S V F R A F L Y W I D Q L L A S S A A C F L

OsAQP1      I R F S T G G L A T G T F G L T G - V S V W E A L V L E I V M T F G I V Y T V Y A T A V D P K K G S L G T I A P I A I G
AK058322    I R F S T G G L A T G T F G L T G - V S V W E A L V L E I V M T F G I V Y T V Y A T A V D P K K G S L G T I A P I A I G
AtTIP4;1    L S Y L T G G M G T P V H T L A S G V S Y T O G I I W E L I L T F S I L F T V Y A T I V D P K K G S L D G F G P L L T G

OsAQP1      F I V G A N I L V G G A F D G A S M N P A V S F G P A L V S W S W E S Q W V Y W V G P L I G G L A G V I Y E V L F I S
AK058322    F I V G A N I L V G G A F D G A S M N P A V S F G P A L V S W S W E S Q W V Y W V G P L I G G L A G V I Y E V L F I S
AtTIP4;1    F V V G A N I L A G G A F S G A S M N P A R S F G P A L V S G N W T D H W V Y W V G P L I G G L A G F I Y E N V L I D

OsAQP1      H T H E Q L P T T D Y - - - -
AK058322    H T H E Q L P T T D Y - - - -
AtTIP4;1    R P E V P V A D D E Q P L L N

```

그림 3-7-3. OsAQP1과 유사한 TIP aquaporin 단백질들의 아미노산 서열

2. 조직별 및 환경스트레스에 대한 벼 aquaporin 유전자의 발현 양상 규명

가. 서언

벼에서 OsAQP1 유전자의 생리적 기능을 연구하기 위해서는 우선적으로 해당 유전자의 조직별 그리고 환경 스트레스에 대한 발현 양상을 규명하는 것이 우선되어야 한다.

나. 재료 및 방법

1) RT-PCR analysis를 통한 유전자 발현 양상 규명

total RNA를 분리하기 위해 다양한 환경 스트레스를 처리한 어린 유년 벼를 잎과 뿌리를 구분하여 액체 질소에 넣고 가루로 만든다. 이것을 DEPC-treated lysis buffer (0.1 M Hepes, 0.2 M EDTA, 10% SDS, 0.02 M EGTA (pH 7.5))에

넣고 동량의 Phenol solution과 섞어 상층액만을 취한다. 이러한 상층액의 2배 ethanol을 넣어 Total RNA를 원심 분리하여 얻는다. Poly(A⁺) Track Kit (Promega, Madison, WI)를 이용하여 total RNA로부터 Poly(A⁺) RNA를 분리하였다. 0.5 ug mRNA를 template로, Oligo (dT)₁₂를 primer로 하여 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Staratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 10 ng cDNA, 300 nM gene-specific primer를 포함하는 20 µl 2X SYBR Green Master mix (Applied Biosystems)으로 3회 반복 RT-PCR 반응을 하였다. PCR 반응 조건은 50°C 2분, 95°C 10분 처리 후에 40회 연속 반응 (95°C for 15 s and 60°C for 1 min)을 하였다. Rice actin을 RT-PCR하기 위해 actin specific primer를 제작하였다 (actin-up; CAGCCACACTGTCCCCATCTA actin-dn; AGCAAGGTCGAGACGAAGGA). 반응 후 0.8% agarose gel에 전개 하여 발현 양상을 확인하였다.

다. 결과 및 고찰

1) OsTIP1;1 유전자 조직별 발현 양상

어린 벼의 잎 부분과 뿌리 부분을 분리하여 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 하여 조직별 발현 양상을 알아보기로 RT-PCR을 수행하였다 (그림 3-7-4). OsTIP1;1 유전자는 잎과 뿌리에서 거의 유사한 양이 발현됨을 확인하였다. 이는 OsTIP1;1 유전자가 constitutive하게 발현되는 유전자임을 시사한다. 애기장대의 AtTIP4-1 유전자와 구조적으로는 유사하나 뿌리에 특이적으로 발현하는 AtTIP4-1 유전자와는 다른 발현 조절 양상을 보였다.

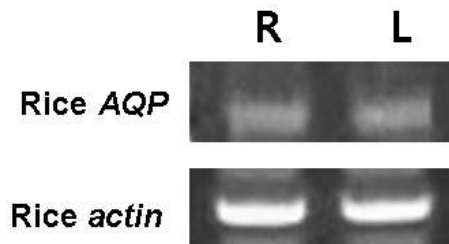


그림 3-7-4. 조직별 AQP1 발현 양상.

2) 고염 저온 및 가뭄에 대한 OsTIP1;1 유전자 발현 양상

벼의 잎과 뿌리에서 거의 동일하게 OsTIP1;1 유전자가 발현됨을 확인하였다. 많은 aquaporin 유전자들이 환경 스트레스에 대해 발현양이 조절을 받는다고 알려졌다. 우선 어린 동진벼를 다양한 농도의 NaCl에 3 시간 처리한 후 분리한 total RNA를 바탕으로 RT-PCR을 수행하였다 (그림 3-7-5 A). OsTIP1;1 유전자는 고염

에 따른 환경 스트레스에 transcripts 양이 변하지 않았다. 다른 조건의 환경 스트레스를 가하기 위해 동일한 발달 단계에 있는 잎을 4°C (그림 3-7-5 B) 혹은 건조한 filter paper위에 (그림 3-7-5 C) 올려 놓고 주어진 시간 뒤에 sample을 취해 total RNA 분리하고 first strand cDNA를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다. 환경 스트레스의 변화에 대해 OsTIP1;1 유전자의 발현양은 변화하지 않음을 확인하였다.

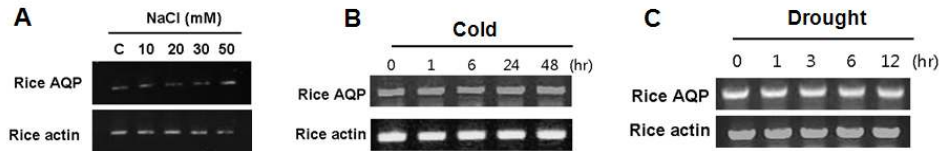


그림 3-7-5. 조직별 AQP1 발현 양상

제 8 절 효율적인 벼 형질전환 조건 개발

1. 벼의 효율적인 재분화 조건 개발

가. 서언

식물체에서 기초연구 뿐 아니라 분자생물학을 이용한 품종육성에 가장 큰 제약은 효과적인 형질전환 방법 및 homo line 생산까지의 긴 시간적 문제이다. 또한 품종과 사용되는 조직, vector, *Agrobacterium* strain 등 조건에 따라 재분화시 배지 및 성장조절 물질의 조건이 다르고 형질전환 효율이 다른 것으로 알려져 있다. 특히, 벼가 형질전환이 어려운 작물로 알려져 있어 많은 과학자들이 집중적으로 연구한 결과 현재 그 방법이 보편화 되어있다. 그러나 벼의 조직배양에서 공통된 특징은 재분화의 성공률이 낮고 배양기간이 길고 복잡하다는 것이다. 이렇듯 긴 시간의 소요로 유전자의 형질을 알고자하는데 많은 제약이 따르고 있다. 벼의 성공적인 형질전환을 위해 조직배양에서 배양기간에 따른 callus 형성과 식물체 재생의 효율, 배양조건을 확립하고 다양한 형질전환의 방법을 시도해 볼 필요가 있다.

나. 재료 및 방법

1) 벼 종자로부터 callus 형성 및 callus stock 유지

형질전환을 위하여 사용한 동진벼의 Callus 유도에는 2mg/L의 2,4-D가 포함된 N6배지(N6CIM)와 2N6배지(2N6CIM)등의 다양한 배지를 사용하여 상호 Callus 형성 효율을 조사하였으며(표 3-8-1), 캘러스가 유도되는 과정에서 급격하게 유리화(vitrification) 및 갈변화가 되는 것을 막기 위하여 반투명비닐의 sealing film(Whatman)과 micropore sealing tape(3M)을 사용하여 유리화 및 갈변화율의 감소 여부를 조사하였다.

2) *Agrobacterium* preparation

형질전환에 사용할 *Agrobacterium*은 AY84가 삽입된 pGA1611 벡터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 또는 T41 유전자가 삽입된 pCAM3301 벡터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101을 사용되었다. 이들 *Agrobacterium* strain은 각각 항생제가 포함된 AB plate 배지(ABKR)에서 28℃, 암조건 하에서 3일간 배양한 후, 이를 100uM의 Acetosyringone이 함유된 표 3-8-1. *Agrobacterium* 및 캘러스와 신초의 형성에 사용한 배지 조성

Culture medium	Composition
Agrobacterium culture(ABKR)	K_2HPO_4 $3g l^{-1}$, NaH_2PO_4 $1g l^{-1}$, NH_4Cl $1g l^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0.3g l^{-1}$, KCl $0.15g l^{-1}$, $CaCl_2$ $10mg l^{-1}$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $2.5mg l^{-1}$, glucose $5g l^{-1}$, agar $15g l^{-1}$ 와 $25mg l^{-1}$ Kanamycin, $10mg l^{-1}$ Rifampicin
Callus induction and propagation(N6CIM)	N6 salt $3.96g l^{-1}$, casamino acids $1g l^{-1}$, sucrose $30g l^{-1}$, 2,4-D $2mg l^{-1}$, phytigel $3g l^{-1}$
Agrobacterium infection(AAM)	KCl $2.95g l^{-1}$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $15mg l^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0.5g l^{-1}$, NaH_2PO_4 $56mg l^{-1}$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ $10mg l^{-1}$, H_3BO_3 $3mg l^{-1}$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $2mg l^{-1}$, KI $0.75mg l^{-1}$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ $0.25mg l^{-1}$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ $0.038mg l^{-1}$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ $0.025mg l^{-1}$, glutamine $0.44g l^{-1}$, aspartic acid $0.13g l^{-1}$, arginine $0.14g l^{-1}$, glycine $0.038g l^{-1}$, nicotinic acid $0.5mg l^{-1}$, pyridoxine $0.5mg l^{-1}$, thiamine HCl $0.1mg l^{-1}$, Na_2EDTA $37.3mg l^{-1}$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $27.85mg l^{-1}$, myo-inositol $100mg l^{-1}$, casamino acids $0.5g l^{-1}$, sucrose $68.5g l^{-1}$, glucose $36g l^{-1}$, acetosyringone $100uM$
Co-cultivation (N6CO)	N6 salt $3.96g l^{-1}$, casamino acids $1g l^{-1}$, sucrose $30g l^{-1}$, glucose $10g l^{-1}$, 2,4-D $2mg l^{-1}$, acetosyringone $100uM$, phytigel $3g l^{-1}$
Callus Selection (N6CS)	N6 salt $3.96g l^{-1}$, casamino acids $1g l^{-1}$, sucrose $30g l^{-1}$, 2,4-D $2mg l^{-1}$, cefotaxime sodium $250mg l^{-1}$, phosphinotricin $6mg l^{-1}$, hygromycin $50mg l^{-1}$, phytigel $3g l^{-1}$
Embryogenic callus induction(N6PR)	N6 salt $3.96g l^{-1}$, casamino acids $2g l^{-1}$, sucrose $30g l^{-1}$, sorbitol $30g l^{-1}$, 2,4-D $1mg l^{-1}$, 6-benzyladenine $0.5mg l^{-1}$, cefotaxime sodium $250mg l^{-1}$, phosphinotricin $6mg l^{-1}$, hygromycin $50mg l^{-1}$, phytigel $3g l^{-1}$
Plant Regeneration and rooting(MMSR)	MS salt $4.4g l^{-1}$, casamino acids $2g l^{-1}$, maltose $30g l^{-1}$, sorbitol $30g l^{-1}$, 6-benzyladenine $0.5mg l^{-1}$, naphthaleneacetic acid $1mg l^{-1}$, cefotaxime sodium $250mg l^{-1}$, phosphinotricin $6mg l^{-1}$, hygromycin $50mg l^{-1}$, phytigel $3g l^{-1}$

AAM 배지(표 3-8-1)에서 OD₆₀₀ 값 1.5가 되도록 희석하여 벼의 캘러스와 함께 공조배양 하였다.

다. 결과 및 고찰

형질전환을 위한 동진벼의 Callus 유도에는 2mg/L의 2,4-D가 포함된 N6배지(N6CIM) 및 2N6배지(2N6CIM)를 사용한 결과 2N6CIM에서 보다 N6CIM배지에서 분

열이 더욱 왕성하였으며, 성장 또한 밝은 노란빛을 띤 균일한 양상을 보여주어, 이를 캘러스의 지속적인 유지를 위한 배지로 사용하였다(표 3-8-1). 그러나 캘러스의 분화가 진행될수록, 배양기내에서의 습도상승 및 에틸렌가스의 축적으로 인하여 캘러스가 급격하게 유리화(vitrification)될 뿐만 아니라, 갈변화가 진행되어 더 이상 형질전환에 사용할 수 없는 상태에 이르렀다. 이를 극복하기 위한 방법으로 본 실험에서는 반투명비닐의 sealing film(Whatman) 대신 micropore sealing tape(3M)을 사용하였으며, 그 결과 유리화 및 갈변화율이 현저히 감소되었을 뿐만 아니라, 조밀하고 잘 건조된 최상의 캘러스를 선별할 수 있었다(그림 3-8-1). 더욱 최상의 조건의 캘러스를 선별하여 형질전환에 이용하기 위하여 본 실험에서는 캘러스를 3주 간격으로 동일한 조성의 새로운 배지에 계대배양 하여 증식함으로써 이후의 모든 실험에 사용하였다.

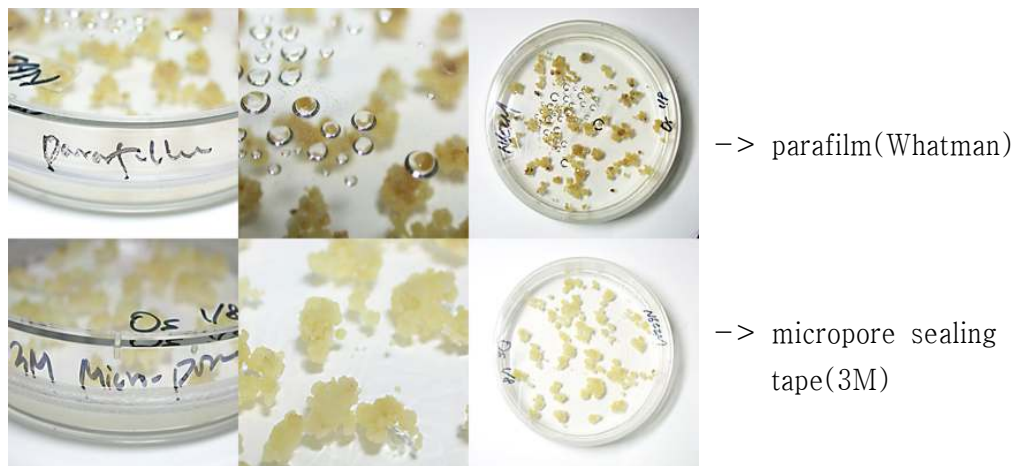


그림 3-8-1. 캘러스 유지 및 증식

2. 벼의 효율적인 형질전환 조건 개발

가. 서언

형질전환에 주로 이용되는 *Agrobacterium* 매개 형질전환법은 *Agrobacterium tumefaciens*나 *Agrobacterium rhizogenes*에 유용유전자를 포함하는 유전자 운반체를 도입한 후 식물 절편체나 callus 와의 공동배양(cocultivation)으로 식물 세포의 형질전환을 유도한다. 이 후 형질전환된 세포로부터 기관형성이나 체

세포배형성 경로를 거쳐 형질전환 식물체(transgenic plant)를 재생시키게 된다. 식물의 형질전환 과정에 있어서는 식물체 재생의 적정 조건을 기본으로 하여 *Agrobacterium*과 식물 절편체와 cellus와의 접촉에 있어서 접촉시간과 *Agrobacterium*의 농도, 공동배양 기간, *Agrobacterium*의 virulence를 증대하는 acetosyringone의 농도, 그리고 *Agrobacterium*과 유전자운반체의 종류 등이 형질전환 효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 효율적인 형질전환을 위해서는 식물체 재생 및 형질전환 과정에 영향을 미치는 다양한 요인의 최적화가 전제되어야 하며 이를 바탕으로 할 때 유용 유전자가 도입된 신품종 개발이 이루어질 수 있을 것이다.

나. 재료 및 방법

1) *Agrobacterium*과 캘러스의 공조배양

형질전환에 이용할 캘러스는 캘러스 유도배지에서 3주간 잘 증식된 캘러스를 대상으로 하여, 지름이 약 3~5mm 크기의 맑은 노란빛을 띤 잘 건조되고 조밀한 캘러스군집 만을 취하여 너무 건조되어 마르지 않도록 미리 준비된 AAM 배지에 선별하여 옮긴 후, 이를 미리 OD₆₀₀ 값 1.5로 적정된 *Agrobacterium* 균주와 함께 진탕배양 하였다. 진탕배양은 상온의 진탕배양기에서 rpm(분당 회전수) 90으로 하여 30분간 수행하였다. 진탕배양이 끝난 후 캘러스는 동일한 배지로 3회 수세작업을 거쳐 멸균된 3M paper를 사용하여 남은 물기를 제거한 후, 공조배양 Agar 배지(N6CO)에 치상하였다(표 3-8-1). Callus 유도배지에서 형성된 callus를 *Agrobacterium*에 형질전환 한 다음 acetosyringone (AS)이 첨가된 배지에서 3일 동안 공조배양한 후 항생제 배지(2N6-CH; Hygromycin 40ug/l, cefataxim 250 mg/l)에 subculture시킨다. *Agrobacterium*과 캘러스의 공조배양은 25°C, 암조건 하에서 진행되었으며, 배양 2일 후 캘러스 주위에 맑은 우유빛으로 *Agrobacterium*이 자라나는 것이 보일 때 까지 공조배양 하였다. 벼의 형질전환에 관한 전체적인 모식도는 그림 3-8-2과 같다.

2) 항생제 저항성 캘러스 선별

형질전환 유무를 판단하기 위하여 선별 마커로 사용하는 항생제들의 효과적인 적용법을 밝혀내기 위하여 먼저 다양한 항생제를 이용하여 캘러스를 선별하였다. 캘러스의 선별에 사용된 항생제는 *hpt*유전자에 특이적으로 작용하는 phosphotricin(PPT)과 hygromycin 두 종류였으며, 각각 6mg/L, 50mg/L의 농도로 단독 배합하거나 복합으로 배합하여 배지에 첨가하였다.

System of Rice Transformation

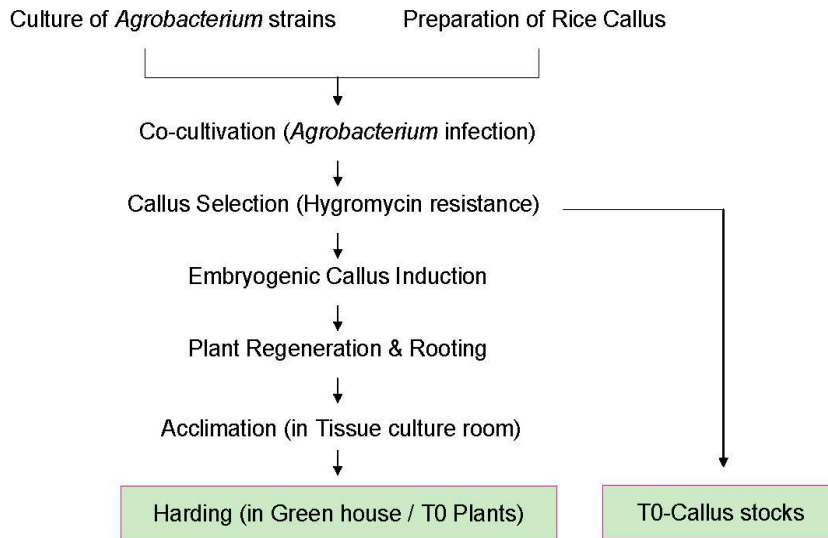


그림 3-8-2. 벼의 형질전환 모식도

3) 신초의 형성 및 발근

신초를 유도하기 위하여 N6PR 배지에서 2주간 배양한 캘러스는 이후, 탄소원으로 sucrose와 sorbitol이 함유된 MS배지(MSR) 및 maltose와 sorbitol이 함유된 MS배지(MMSR)의 두가지를 사용하여 탄소원의 차이에 의한 신초의 형성 및 발근에 어떠한 영향을 미치는지 그 효과를 조사하였다.

4) 순화 및 경화

뿌리를 포함하는 잘 유기된 신초는 이후, 질석과 펄라이트 및 상토를 1: 1: 2로 혼합한 토양(Soil)에 이식하고, 봉지를 씌워 습도를 유지하며 약 1주일간의 순화과정을 거친 후, 못자리용 상토로 옮겨 온실에서 경화시켰으며, 대부분의 재분화 식물체가 건강한 완전 식물체로 성장하였다(그림 3-8-3).



그림 3-8-3. 순화 및 경화

다. 결과 및 고찰

1) 캘러스 선발을 위한 항생제 선별

항생제 저항성 캘러스를 선별 하기 위하여 phosphinotricin(PPT)과 hygromycin 두 종류의 항생제를 단일 처리 및 복합 처리하여 실험한 결과, PPT 만을 선별마커로 사용한 실험구의 경우, 캘러스의 생존율은 약 90.2%로 매우 높게 나타났으며, hygromycin 만을 선별마커로 사용한 실험구의 경우, 캘러스의 생존율은 약 42.1%로 나타났다. 반면, PPT와 hygromycin을 조합하여 처리한 실험구에서의 캘러스 생존율은 약 28.6%로 현저히 감소되어 나타났다. 이러한 결과는 PPT 단일 항생제의 처리만으로는 캘러스의 선별이 불가능하며, 또한, hygromycin을 단일로 하여 처리하는 것 보다 PPT와 hygromycin을 조합하여 처리함으로써 원활한 저항성 캘러스의 선별이 가능함을 보여주고 있다(표 3-8-2, 그림 3-8-4). 캘러스 선별배지에서 저항성을 보이는 캘러스는 AY84 유전자가 삽입된 캘러스는 56개 line, 그리고 T41 유전자가 삽입된 캘러스는 76개 line이 선별되었으며, 이후 항생제 저항성을 갖는 캘러스는 배 발생유도배지(N6PR)에 계대배양 하여 25℃, 암조건 하에서 2주간 배양하였다(표 3-8-1).

표 3-8-2. PPT 및 Hygromycin을 이용한 저항성 캘러스 선별

antibiotics	total callus	alive	resistance(%)
PPT	1,141	1,029	90.18
Hygromycin	679	286	42.12
PPT + Hygromycin	612	175	28.59

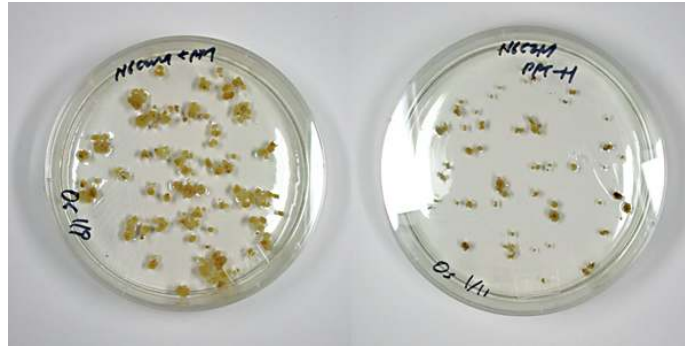


그림 3-8-4. PPT 및 Hygromycin을 이용한 저항성 캘러스 선발

2) 탄소원에 따른 신초의 형성 및 발근 촉진 효과

신초를 효과적으로 유도하기 위하여 N6PR 배지에서 2주간 배양한 캘러스를 탄소원으로 sucrose와 sorbitol이 함유된 MS배지(MSR) 및 maltose와 sorbitol이 함유된 MS배지(MMSR) 두가지를 사용하여 배양한 결과 maltose가 함유된 MMSR배지가 sucrose를 함유한 MSR 배지에 비하여 월등히 높은 캘러스 분화능 및 신초의 형성을 보여주었다(그림 3-8-5). 신초의 분화가 이루어지기 전, 캘러스 선별에 사용한 항생제에 더욱 강한 저항성을 보이는 캘러스를 이후의 모든 배양 과정에서 지속적으로 선별작업을 수행하였으며, 그 결과 AY84 및 T41을 삽입한 캘러스 line을 각각 5개씩 선별할 수 있었다. MMSR배지에 계대배양한 각각의 실험구는 25℃, 낮과 밤의 주기를 16:8로 하여 $60\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광조건 하에서 배양하였다. MMSR 배지로 옮겨진 캘러스는 약 1~2주일 후 녹색의 분열조직이 관찰되었으며, 이후 1주가 더 경과되면 이들 녹색의 캘러스로부터 신초들이 형성되었다(그림 3-8-5). 뿐만 아니라, 신초 중의 약 91% 이상이 뿌리와 동시에 유기되어 나타나 이들 신초가 Embryogenic callus(배발생캘러스)로부터 유기되고 있음을 보여주었다(표 3-8-3).

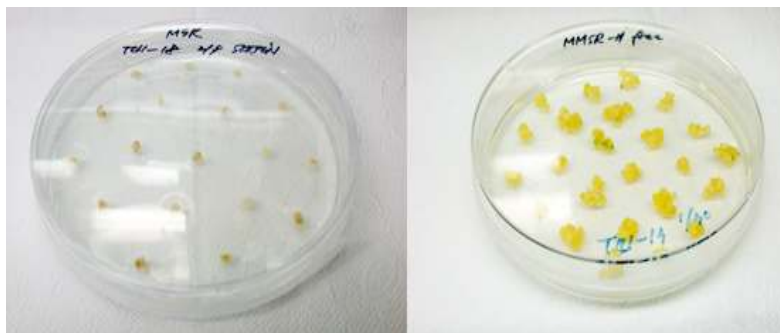


그림 3-8-5. 탄소원에 따른 캘러스 및 신초의 형성

캘러스의 유기 및 증식은 2,4-D의 영향을 지배적으로 받는 반면, 신초의 형성은 일반적으로 싸이토카인(cytokinin)에 의해 이루어지는데, 본 실험에서도 마찬가지로 BAP에 의해 신초의 형성이 활발히 진행되었다. BAP의 농도는 선행된 실험에서 최적으로 판명되었던 2mg/L로 적정하였으며, NAA 1mg/L와 조합하여 처리하였

다. 그 결과 항생제 저항성 캘러스로부터 green-like callus(GC)의 발생율은 90.14%였으며, 이들 green-like callus로부터의 신초 형성율은 74.21%로 나타났다. 또한, 이들 신초 중 91%는 뿌리와 함께 형성되었다(표 3-8-3, 그림 3-8-6).

표 3-8-3. BAP 2mg1⁻¹, NAA 1mg1⁻¹에서의 신초 및 뿌리의 형성

Antibiotics resistance callus	Formation of green-like callus (%)	Shoot regeneration from GC (%)	Regenerated shoots with root (%)
710	90.14	74.21	91

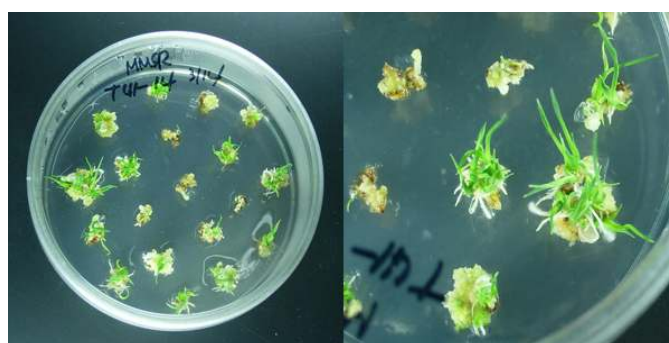


그림 3-8-6. Green-like callus로부터 신초의 형성 및 신장

3. 형질전환 벼의 검정

가. 서언

환경 스트레스에 대한 저항성 능력을 지닌 형질전환 벼의 생산 비율을 향상시키기 위하여 지금까지 다양한 배지를 이용한 적정 배지 선별과 선별 마커 항생제의 다양한 조합에 관하여 실험하여 최적의 조건을 형질 전환 조건을 작성하였다. 이를 바탕으로 AQP 유전자인 애기장대의 AtTip4;1유전자와 RBP 유전자인 애기장대의 AY84 유전자를 벼에 형질전환 시켜 최종적으로 형질전환된 벼의 유전자 삽입 유무의 확인과 삽입된 유전자의 발현 능력을 검정하여 완벽하게 형질전환된 T1 세대를 만들고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) 형질전환벼의 발현 확인 방법

AQP 유전자인 애기장대의 AtTip4;1유전자와 RBP 유전자인 애기장대의 AY84 유전자를 pCAM3301 벡터에 도입하여 형질전환 벡터를 제조하고

Agrobacterium GV3101 균주와 벼의 캘러스와의 공조배양에 의해 형성된 신초는 항생제가 첨가된 신초 신장배지에 옮겨 약 2주간 배양하여 항생제 저항성을 보이는 신초를 선택적으로 신장 및 발근을 유도하였다. 신초의 신장 및 뿌리가 잘 이루어진 재분화식물체는 배양용기 밖으로 꺼내어 배지를 멸균수에 수세한 후 순화용 토양(vermiculrite: perlite=1:3)이 담긴 용기로 옮겨 심었다. 이때 용기는 수분 증발을 억제하기 비닐로 씌워 2 주간 배양실 조건에서 순화시킨 후 벼 못자리용 상토에 옮겨 재배하였다. 확보된 재분화식물체에서 AtTIP4:1 및 AY84 유전자의 삽입여부는 genomic DNA PCR에 의해 확인하였으며, 이상의 방법으로 형질전환이 확인된 재분화식물체를 온실에서 재배하여 종자를 채종한 후 T1 식물을 생산하였다.

2) AY84 형질전환체 T1세대 중 항생제에 저항성을 갖는 개체의 선발

AY84 유전자가 도입된 형질전환체 T0 세대의 온실 재배를 통하여 AY84-41, AY84-45 그리고 AY84-56의 3가지 line의 T0 seed를 확보하였다. 이후, 각각의 T0 종자를 hygromycin 50mg/L가 첨가된 형질전환체 선발배지에서 재확인하였다.

3) AY84 형질전환체 T1세대 중 저온 저항성을 갖는 개체의 선발

T0 세대의 온실 재배를 통하여 AY84-41, AY84-45 그리고 AY84-56의 3가지 line의 T0 seed 중 항생제 저항성을 갖는 개체를 대상으로 다시 저온 저항성을 테스트 하여 형질전환된 유전자의 발현 유무를 확인하였다.

4) AY84 형질전환체 T1세대의 순화 및 재배

AY84-41, AY84-45 그리고 AY84-56의 3가지 line의 T0 seed 중 항생제 저항성 및 내한성을 갖는 개체를 온실에서 재배하여 최종 T1의 종자를 확보하기 위한 작업을 실시하였다.

5) AtTIP4:1 형질전환체 T1세대 중 항생제에 저항성을 갖는 개체의 선발

AtTIP4:1 유전자가 도입된 형질전환체 T0 세대의 온실 재배를 통하여 AtTIP4:1 -13-1, AtTIP4:1 -13-3 그리고 AtTIP4:1 -16의 3가지 line의 T0 seed를 확보하였다. 이 후, 각각의 T0 종자를 hygromycin 50mg/L가 첨가된 형질전환체 선발배지에서 재확인하였다.

6) AtTIP4:1 형질전환체 T1세대 중 저온 저항성을 갖는 개체의 선발

T0 세대의 온실 재배를 통하여 AtTIP4:1 -13-1, AtTIP4:1 -13-3 그리고 AtTIP4:1 -16의 3가지 line의 T0 seed 중 항생제 저항성을 갖는 개체를 대상으로 다시 저온 저항성을 테스트 하여 형질전환된 유전자의 발현 유무를 확인하였다.

7) AtTIP4:1 형질전환체 T1세대의 순화

AtTIP4:1 -13-1, AtTIP4:1 -13-3 그리고 AtTIP4:1 -16의 3가지 line의 T0 seed 중 항생제 저항성 및 내한성을 갖는 개체를 온실에서 재배하여 최종 T1의 종자를 확보하기 위한 작업을 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

1) AY84 형질전환체 T1세대 검정

AY84 유전자가 도입된 형질전환체인 AY84-41, AY84-45 그리고 AY84-56의 3가지 line의 T0 seed를 대상으로 항생제에 대한 저항성을 보이는지 알아보는 발아검정을 한 결과 hygromycin 50mg/L가 첨가된 형질전환체 선발배지에서 발아를 유도한 결과 약 43.6%의 종자에서 발아가 유도되었으며(표 3-8-4) 항생제 저항성을 갖는 개체를 대상으로 저온 저항성을 테스트 한 결과 약 88.2%가 저온내성을 보였다(표 3-8-5).

표 3-8-4. T0 seed 세대의 항생제 저항성 발아검정

형질전환체	시험수	발아수	항생제저항성 (%)
AY84-41	19	4	21.1
AY84-45	30	13	43.3
AY84-56	29	17	58.6

표 3-8-5. T0 seed 세대의 저온저항성 검정

형질전환체	시험수	저항성(+)	저온 스트레스저항성(%)
AY84-41	4	4	100
AY84-45	13	11	84.6
AY84-56	17	15	88.2

2) AY84 형질전환체 온실재배

AY84 유전자가 도입된 형질전환체인 AY84-41, AY84-45 그리고 AY84-56의 3가지 line T0 seed로부터 항생제 저항성 및 내한성을 갖는 개체를 선발하여 온

실에서 재배하여 총 11 개체의 완전한 형질전환체를 확보할 수 있었다(표 3-8-6, 그림 3-9-5). 이들 AY84 형질전환체 T1세대의 genomic DNA PCR 검정 결과 7개의 개체 즉, AY84-41-1, AY84-41-2, AY84-41-3, AY84-41-4, AY84-45-7 그리고 AY84-45-11에서 Positive control과 같은 위치의 밴드를 확인할 수 있었다(그림 3-8-8).

표 3-8-6. T0 seed 세대의 순화

형질전환체	시험수	경화된 개체	순화(%)
AY84-41	4	4	100
AY84-45	11	3	27.3
AY84-56	15	6	40.0



그림 3-8-7. AY84 형질전환체 T1세대 온실 재배

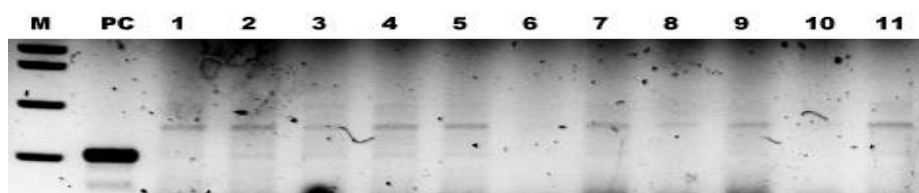


그림 3-8-8. AY84 형질전환체 T1세대 genomic DNA PCR 검정

3) AtTIP4:1 형질전환체 T1세대 검정

AtTIP4:1 유전자가 도입된 형질전환체 T0 세대의 온실 재배를 통하여 AtTIP4:1 -13-1, AtTIP4:1 -13-3 그리고 AtTIP4:1 -16의 3가지 line의 T0 seed를 확보하였다. 이 후, 각각의 T0 종자를 대상으로 항생제에 대한 저항성을 보이는지 알아보는 발아검정을 한 결과 hygromycin 50mg/L가 첨가된 형질전환체 선발배지에서 발아를 유도한 결과 약 67.8%의 종자에서 발아가 유도되었으며(표 3-8-7) 항

생제 저항성을 갖는 개체를 대상을 저온 저항성을 테스트 한 결과 약 80.3%가 저온 내성을 보였다(표 3-8-8).

표 3-8-7. T0 seed 세대의 항생제 저항성 발아검정

형질전환체	시험수	발아수	항생제저항성(%)
AtTIP4:1 -13-1	30	27	90.0
AtTIP4:1 -13-3	30	8	26.7
AtTIP4:1 -16	30	26	93.3

표 3-8-8. T0 seed 세대의 저온저항성 검정

형질전환체	시험수	저항성(+)	저온 스트레스저항성(%)
AtTIP4:1 -13-1	27	19	70.4
AtTIP4:1 -13-3	8	8	100
AtTIP4:1 -16	26	22	78.6

4) AtTIP4:1 형질전환체 온실재배

AtTIP4:1 유전자가 도입된 형질전환체인 AtTIP4:1-13-1, AtTIP4:1-13-3 그리고 AtTIP4:1 -16의 3가지 line의 T0 seed로부터 항생제 저항성 및 내한성을 갖는 개체를 선발하여 온실에서 재배하여 총 33 개체의 완전한 형질전환체를 확보할 수 있었다(표 3-8-9, 그림 3-8-9). 이들 AtTIP4:1 형질전환체 T1세대의 genomic DNA PCR 검정 결과 AtTIP4:1의 positive control과 동일한 위치의 밴드를 확인할 수 있었다(그림 3-8-10).

표 3-8-9. T0 seed 세대의 순화

형질전환체	시험수	경화된 개체	순화(%)
AtTIP4:1 -13-1	19	11	57.9
AtTIP4:1 -13-3	8	6	75.0
AtTIP4:1 -16	22	16	72.7

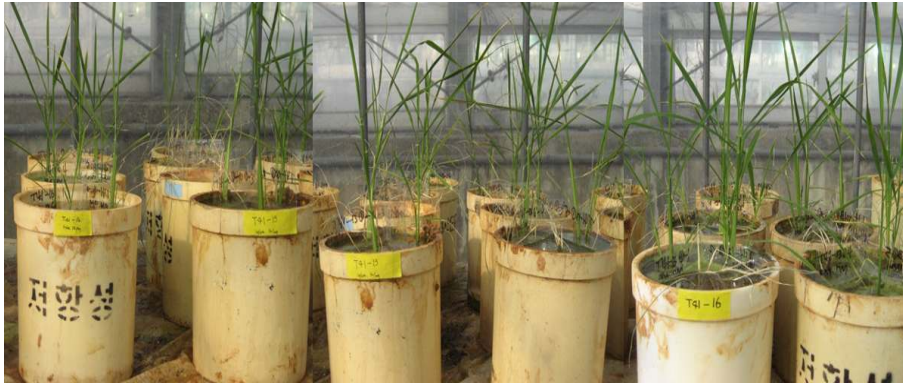


그림 3-8-9. AtTIP4:1 형질전환체 T1세대 온실 재배

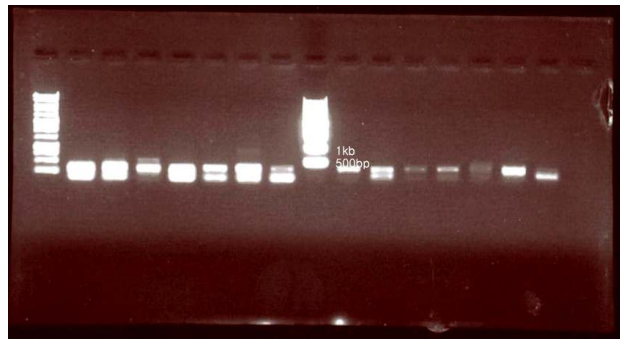


그림 3-8-10. AtTIP4:1 형질전환체의 T1세대에서 PCR 검정

제 9 절 온실 포장에서 형질전환 벼의 내병성 평가

1. 형질전환 벼의 도열병 저항성 검정

가. 서언

리폭시나아제(LOX)는 자스몬산 생합성의 초기 단계에 위치하면서 이들 효소의 과대 발현은 식물체내에서 자스몬산 및 중간체의 생합성의 증가에 관여할 것으로 예상 할 수 있으며 이에 따라 식물은 자신을 가해하는 식물병에 대한 저항성의 증진이 유도될 것으로 예상할 수 있다. 본 연구팀에서는 LOX를 기반으로 하는 형질 전환 벼에 AQP 유전자인 애기장대의 AtTip4;1 유전자와 RBP 유전자인 애기장대의 AY84 유전자를 형질전환 시켜 벼에 있어 가장 심각한 수확량 손실을 가져오는 도열병에 대한 온실 실험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 시험품종

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수 리폭시나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 및 LOX를 기반으로 하는 형질 전환 벼에 AQP 유전자인 애기장대의 AtTip4;1 유전자와 RBP 유전자인 애기장대의 AY84 유전자를 형질 전환시킨 벼 T1 종자 20개체씩을 상토에 파종하여 2주간 28 ~ 30°C 인 배양실에 발아시킨다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시키며 2 주짜리 유묘를 온실로 옮겨 재배하였다. 형질전환벼는 최초 전남대학교 야외 포장을 이용하여 포장 검정을 실시하려고 하였으나 2008년도부터 포트실험외의 포장시험은 허가된 지역에서만 재배가 가능하다고 규정하였는데 현재 전남대학교는 GMO 시험 재배 인가를 신청하였으나 아직까지 허가가 나지 않은 상태여서 포장시험 재배 자체가 불가능하여 부득히 온실내 포장을 만들어 실험을 실시하였다. 벼의 재배는 농촌진흥청 표준 재배법에 준하여 재배한다.

2) 도열병의 접종

12월 8일 상토에 파종한 낙동벼와 형질전환 벼를 대상으로 온실내에서 3개월간 생장한 벼를 대상으로 도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*의 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C 배양기에서 일주일간 배양하였다. 배지에 자란 균주에서 포자를 형성하기 위하여 배지를 햇빛에 다시 일주일간 노출시킨 후 멸균수를 이용하여 배지내 포자를 회수하여 최종 포자가 1×10^5 로 준비하였다. 준비된 포자를 대상 벼에 충분히 젖을 수 있도록 스프레이 하였으며 스프레이 후 잎이 바로 마르는 것을 방지하기 위하여 병이 접종된 벼를 비닐로 2일간 씌워 병발생율을 증진시켰다

(그림 3-9-1).

3) 조사항목

시험 온실에서 낙동벼와 형질전환 line의 도열병 발생 정도는 19-20포기를 대상으로 조사하였다. 잎 도열병 병반 면적율을 병원균 접종후 최초 병반이 보이기 시작한 시점에서 2주가 지난뒤 1회 조사하였으며 포기당 평균 병반면적율은 병에 걸린 포기당 병반면적율 합계/조사포기수로 하여 조사하였다. 포기당 조사기준은 표 3-9-1의 기준에 준하여 조사하였으며 도열병이 발생한 이병율은 각 포기에서 병반이 존재하는 포기의 비율을 조사하여 이병율을 조사하였다.



그림 3-9-1. 벼 도열병 접종후 병해 발생을 유도하기 위한 비닐포장

다. 결과 및 고찰

낙동벼와 각각의 형질전환체에 도열병균을 접종한 후 발생한 도열병의 병발생율을 조사한 결과 wild type인 낙동벼의 경우는 병반 면적율이 약 0.31%가 나왔으며 RBP 유전자가 형질전환된 AY84-41 T1과 AY84-56 T1의 경우 각각 0.26% 및 0.29%의 병반면적율을 보여주었다. 특히 AY84-41 T1의 경우는 control인 낙동벼와 비교하여 유의성 있는 수준에서 병발생이 경감한 것을 확인하였다. LOX 단일 형질전환된 T4 seed LOX의 경우는 wild type 보다는 병반면적이 낮았지만 결과의 유의성은 없었다. AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1-13-1 T1과 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 각각 0.32%와 0.26%의 병반 면적율을 보여주었으나 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 유의성 있는 수준에서 병발생이 경감하였으나 AtT1p4:1-13-1 T1 경우는 오히려 wild type과 비슷한 수준에서 병이 발생함을 확인하였다. 이병율에 있어서도 낙동벼가 가장 높은 이병율을 보여주었고 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 T4 seed LOX와 AtT1p4:1-16 T1는 wild type과 비교하여 낮은 이병율을 나타내었다. 반면에 AtT1p4:1-13-1 T1의 경우에는 이병율에 있어 wild type 별차이를 보이지 않았다. 이러한 사실은 RBP 유전자가 형질전환된

AY84와 AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1의 경우는 도열병에 대한 어느 정도의 병저항성을 나타내지만 각각의 형질전환 라인에 따라 병저항성 유도 능력이 나타나지 않을 수도 있음을 의미한다(표 3-9-2, 그림 3-9-2).

표 3-9-1. 병반면적율의 정의

병반면적율	병에 걸린 정도
0.2%	밑부위 잎에 대형 병무늬 1개와 소형 병무늬 1-2개 또는 소형 병무늬만 10개 이내
0.5%	밑부위 잎에 대형 병무늬 2-3개와 또는 소형 병무늬 20개 정도가 포기 전체에 고르게 퍼져 있음
1%	대형 병무늬 4-5개와 주위에 약간의 소형 병무늬가 퍼져있거나 또는 소형 병무늬만 30-40개 정도 퍼져 있음
2%	밑부위 1-2잎이 병무늬로 거의 덮이거나 또는 대형 병무늬 10-15개가 밑위에 퍼져있음
5%	밑부위 2-3매 잎이 반 정도 말라죽거나 또는 대형 병무늬 30-40개가 퍼져 있음
11%	밑부위 2-3매 잎이 완전히 말라죽고 밑에 5-6개 잎에 대형 병무늬가 퍼져 있음
25%	윗부위 잎을 포함하여 7-8매 잎이 완전 또는 부분적으로 말라죽고 모든 잎에 각각 10개 정도의 병무늬가 고루 퍼져 있음
55%	전체 잎 수의 반 이상이 완전히 또는 부분적으로 말라 죽거나 죽지 않은 잎에는 무수한 병무늬가 있음
100%	포기 전체가 주저앉으며 말라 죽음

표 3-9-2. AtTip4:1와 AY84의 도열병에 대한 병저항성 유도 능력

형질 전환체	공시 종자수(개)	병반면적율(%)	잎도열병 이병율(%)
WT (Nakdong)	18	0.31	33.3
AY84-41	18	0.26	22.2
AY84-56	19	0.29	21.1
T4 seed LOX	19	0.29	26.3
AtT1p4:1-13-1	19	0.32	31.58
AtT1p4:1-16	18	0.26	27.8

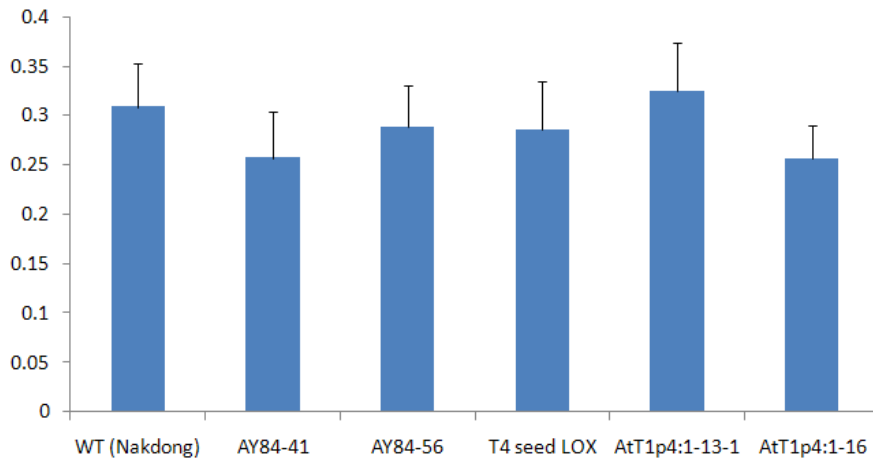


그림 3-9-2. AtTip4;1와 AY84의 도열병에 대한 병저항성 유도 능력

2. 도열병 발못자리 검정

가. 서언

식물이 일으키는 병저항성은 식물이 자라는 외부환경이나 작물의 생육상태에 따라 많이 달라질 가능성이 높다. 벼의 경우는 일반적인 못자리를 이용한 수도작이 대부분이나 다른 지역에서는 경우에 따라 발못자리를 이용하여 건답재배를 하는 곳도 일부 존재하고 있으며 일반재배와 발못자리 재배는 벼의 뿌리 활착이나 초기 생육의 모습이 많이 달라 외부의 식물병에 대한 저항성 양상도 다를 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 이들 형질전환된 벼가 발못자리 상태에서도 도열병에 대한 저항성을 발현하는지의 여부를 알아보하고자 발못자리 검정을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 시험품종

시험품종은 벼 도열병 온실검정에 사용한 품종과 동일하며 낙동벼와 각각의 형질전환벼 T1 종자 20개체씩을 상토에 파종하여 2주간 28 ~ 30°C인 배양실에 발아시켰다. 발아하는 동안 기존 벼발아 처럼 물을 채워주지 않고 적당량 함유하도록 유지하며 2주간 성장시켜 온실에 옮겨 재배하였다. 온실내 재배에서도 물을 채워주지 않고 상토가 마르면 중간 중간 물을 주는 형태로 최대한 건답 형태와 비슷한 환경을 유지하면서 벼를 30일간 재배한 후 발못자리 검정을 실시하였다(그림 3-9-3).

2) 도열병의 접종

12월 8일 상토에 파종한 낙동벼와 형질전환 벼를 대상으로 온실내에서 1개

월간 성장한 벼를 대상으로 도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*의 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C 배양기에서 일주일간 배양하였다. 배지에 자란 균주에서 포자를 형성하기 위하여 배지를 햇빛에 다시 일주일간 노출시킨 후 멸균수를 이용하여 배지내 포자를 회수하여 최종 포자가 1×10^5 로 준비하였다. 준비된 포자를 대상 벼에 충분히 젖을 수 있도록 스프레이 하였으며 스프레이 후 잎이 바로 마르는 것을 방지하기 위하여 병이 접종된 벼를 비닐로 2일간 씌워 병발생율을 증진시켰다.

3) 조사항목

시험 온실에서 낙동벼와 형질전환 line의 도열병 발생 정도는 19-20포기를 대상으로 조사하였다. 잎 도열병 병반 면적율을 병원균 접종후 최초 병반이 보이기 시작한 시점에서 2주가 지난뒤 1회 조사하였으며 포기당 평균 병반면적율은 병에 걸린 포기당 병반면적율 합계/조사포기수로 하여 조사하였다. 포기당 조사기준은 표 3-9-1의 기준에 준하여 조사하였으며 도열병이 발생한 이병율은 각 포기에서 병반이 존재하는 포기의 비율을 조사하여 이병율을 조사하였다(그림 3-9-1).



그림 3-9-3. 밭못자리 검정과 비슷한 환경을 유지하기 위한 상토내 수분 최소화

다. 결과 및 고찰

낙동벼와 각각의 형질전환체에 도열병균을 접종한 후 발생한 도열병의 병발생율을 조사한 결과 wild type인 낙동벼의 경우는 병반 면적율이 약 0.34%가 나왔으며 RBP 유전자가 형질전환된 AY84-41 T1과 AY84-56 T1의 경우 각각 0.28% 및 0.27%의 병반면적율을 보여주었다. 두 형질전환체 모두 control인 낙동벼와 비교하여 유의성 있는 수준에서 병발생이 경감한 것을 확인하였다. LOX 단일 형질전환된 T4 seed LOX의 경우는 병반면적율이 0.27%로 wild type과 비교하여 가장 낮은 병발생 경감효과를 보여주었다. AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1-13-1 T1과 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 각각 0.29%와 0.3%의 병반 면적율을 보여주었으며 wild

type과 비교해서도 유의성 있는 수준에서 병저항성을 보여주었지만 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 T4 seed LOX 보다는 병경감 수준이 낮았다. 이병율에 있어서는 낙동벼와 AtT1p4:1-16 T1 가장 높은 이병율을 보여주었고 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 T4 seed LOX와 AtT1p4:1-16 T1는 wild type과 비교하여 낮은 이병율을 나타내었다. RBP 유전자가 형질전환된 AY84와 AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1의 경우 발못자리 검정을 통한 도열병에 대한 저항성 유도 능력은 어느 정도 효과가 있음을 확인하였으며 특히 AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1 보다는 RBP 유전자가 형질전환된 AY84-41 T1과 AY84-56 T1 및 LOX 단일 형질전환된 T4 seed LOX에서 도열병에 대한 저항성 유도 능력이 우수하다고 판단되어진다. (표 3-9-3, 그림 3-9-4).

표 3-9-3. AtTip4:1와 AY84의 발못자리내 도열병에 대한 병저항성 유도 능력

형질 전환체	공시 종자수(개)	병반면적율(%)	일도열병 이병율(%)
WT (Nakdong)	20	0.34	20
AY84-41	20	0.28	15
AY84-56	20	0.27	15
T4 seed LOX	19	0.27	15.8
AtT1p4:1-13-1	20	0.29	15
AtT1p4:1-16	20	0.3	20

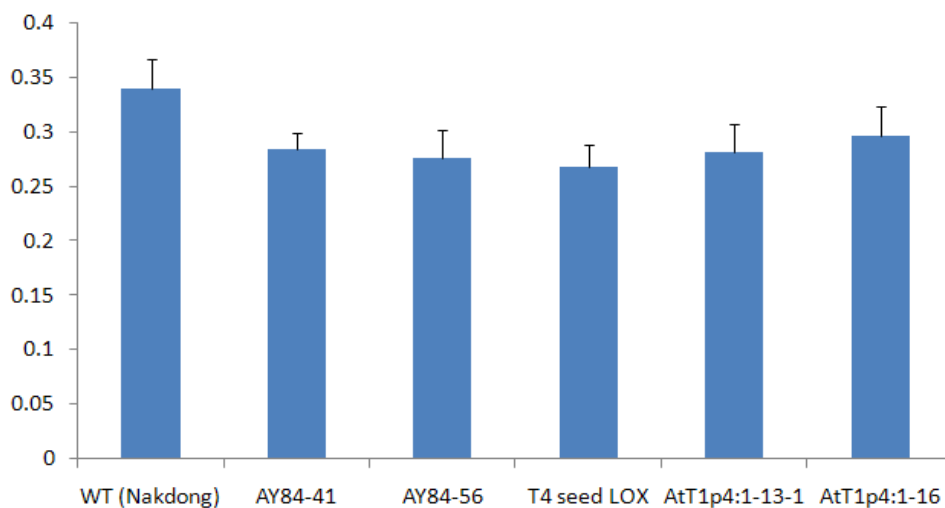


그림 3-9-4. AtTip4:1와 AY84의 발못자리내 도열병에 대한 병저항성 유도 능력

3. 벼 흰잎마름병 저항성 검정

가. 서언

리폭시나제(LOX)가 벼에 있어 식물병에 대한 저항성의 증진에 관여할 것으로 예상되는 가운데 LOX를 기반으로 하는 형질 전환 벼에 AQP 유전자인 애기장대의 AtTip4;1 유전자와 RBP 유전자인 애기장대의 AY84 유전자를 형질전환 시킨 형질전환체의 경우 병원성 곰팡이에 의한 도열병에 대한 저항성 뿐만 아니라 포괄적인 저항성으로 세균성 병인 벼의 흰잎마름병에 대한 저항성도 유도될 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 도열병 검정에서 사용한 형질전환된 벼를 대상으로 벼흰잎마름병을 일으키는 균주를 온실수준에서 가위접종하여 발생하는 저항성 유도 능력을 조사하고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) 시험품종

시험품종과 재배법은 벼 도열병 저항성 검정에서와 같은 품종 및 동일한 방법으로 수행하였으며 공시병원균은 전남대학교 농업생명과학대학 식물병리학 실험실에서 분양 받은 벼흰잎마름병원균 K3 균계를 사용하여 실험을 실시하였다. 병원균의 배양은 Nutrient Broth (NB)에 접종한 균주를 30℃ 진탕배양기에서 3일 동안 키워 최종 접종 농도를 1×10^9 까지 배양하였다. 충분히 배양된 균주 현탁액에 멸균된 가위를 담궈다가 포장에서 재배되고 있는 수잉기의 완전 전개한 잎 끝에서부터 약 3cm 정도 부위를 가위로 절엽 하여 균주를 접종하였다. 약 2주간 지난 시점에서 병반의 발생정도를 절엽 부위부터 하위 잎까지 병반이 퍼진 길이를 측정하여 발병도를 나타내었다.

2) 병반내 균수 측정

Wild type인 낙동벼와 각각의 형질전환 벼의 병반으로부터 함유되어 있는 벼흰잎마름병원균의 밀도를 조사하고자 병반이 발생한 부위를 상위 절엽 부위부터 아래도 6cm가 되는 지점을 잘라내어 잘라낸 전체를 다시 미세하게 자른 후 멸균수 10ml에 넣고 1시간가량 충분히 vortex 하여 이들 현탁액을 일정량 취하여 다시 멸균수에 재 희석하고 평판 도말법을 이용하여 최종 함유하고 있는 생균수를 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

온실에서 재배되고 있는 수잉기의 형질전환 벼에 가위를 이용한 절엽접종 시험한 결과 wild type인 낙동벼의 경우는 절엽부위부터 하위엽으로 병이 진전되어 나간 병반장의 길이가 약 6.69cm가 되었으며 RBP 유전자가 형질전환된 AY84-41 T1과 AY84-56 T1의 경우 각각 6.25cm 및 6.19cm의 병진전 길이를 보여주었다. 두 형질전환체 모두 control인 낙동벼와 비교하여 병발생이 경감한 것처럼 보이지만 결과에 유의성이 없었다. LOX가 단일 형질전환된 T4 seed LOX의 경우는 병반장이 약 6.57cm로 wild type과 거의 동일한 병진전 형태를 보여주었으며 AQP 유전자가 형질전환된 AtT1p4:1-13-1 T1과 AtT1p4:1-16 T1의 경우는 각각 6.43cm 및 6.25cm의 병진전 길이가 약간 감소한 것처럼 보이지만 wild type과 비교해서 이 역시 유의성은 없었다(표 3-8-4, 그림 3-8-7, 3-8-8). 병이 진전된 병반을 채집하여 병반내에 함유되어 있는 병원성 세균의 함량을 조사하기 위하여 각각의 처리구의 생균수를 측정된 결과 wild type인 낙동벼가 5.57×10^7 cfu/g으로 가장 많았고 AY84-41 T1는 1.79×10^7 cfu/g으로 가장 낮았다. AY84-56 T1의 경우도 2.57×10^7 cfu/g로 낙동벼와 비교하여 낮은 수준의 균수를 보여주었고 AtT1p4:1-16 T1의 경우도 3.5×10^7 cfu/g으로 낙동벼와 비교하여 유의성 있는 수준에서 감소됨을 확인하였다. 반면에 T4 seed LOX와 AtT1p4:1-13-1의 경우에는 wild type인 낙동벼에 비해 균수는 적었지만 유의성 있는 수준에서 차이를 나타내지는 못하였다.

표 3-9-4. AtTip4:1와 AY84의 흰잎마름병에 대한 병저항성 유도 능력

형질 전환체	공시 종자수(개)	병반장(cm)
WT (Nakdong)	17	6.69
AY84-41	17	6.25
AY84-56	18	6.19
T4 seed LOX	18	6.57
AtT1p4:1-13-1	17	6.43
AtT1p4:1-16	17	6.25

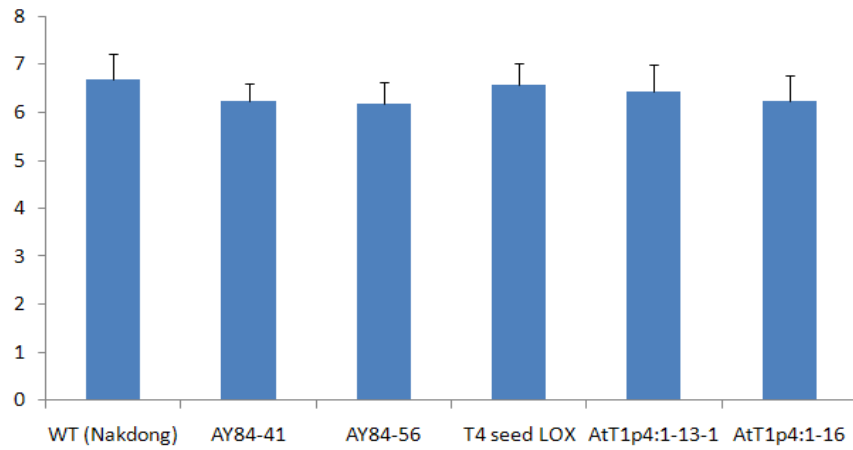


그림 3-9-5. AtTip4:1와 AY84의 흰잎마름병에 대한 병저항성 유도 능력

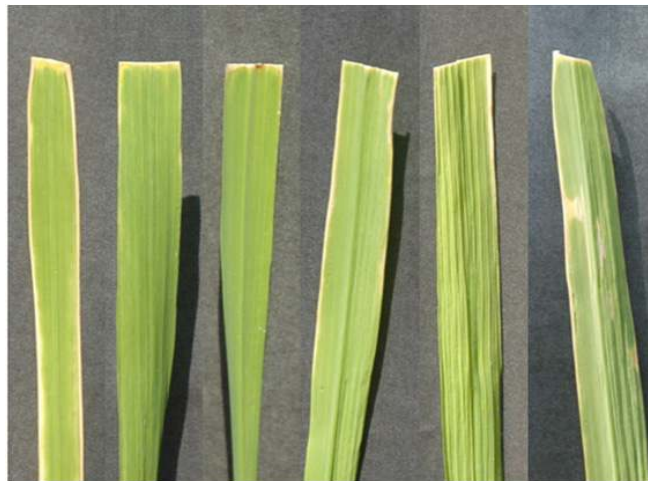


그림 3-9-6. 흰잎마름병을 처리한 처리구에서 발생한 병반모습

표 3-9-5. 처리구별 발생한 병반에 함유되어 있는 균주의 생균수

형질 전환체	병반내 생균수
WT (Nakdong)	5.57×10^7 cfu/g
AY84-41	1.79×10^7 cfu/g
AY84-56	2.57×10^7 cfu/g
T4 seed LOX	4.57×10^7 cfu/g
AtT1p4:1-13-1	4.9×10^7 cfu/g
AtT1p4:1-16	3.5×10^7 cfu/g

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 1항, 2 항, 3항에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하게 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 4항에 나타낸 바와 같이 계획서의 최종목표를 대체로 달성하였다고 사료된다.

1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
형질전환 LOX의 내냉성, 내건성, 내염성 분석 및 microarray 분석	-내건성, 내염성 분석 여부 -microarray 분석 완성 여부	38	100	제 1 절 제 2 절
저온 내성 유전자 확보	-유전자의 내냉성 기능 확인 여부	20	100	제 5 절 제 7 절
aquaporin 유전자를 이용한 형질전환 벼 확보	-aquaporin 유전자 도입 여부 -유전자 발현과 내성 관계 분석 여부	20	100	제 4 절
효율적 벼의 재분화 조건개발 병 및 저온 내성 유전자의 형질전환	-조직 재분화율 분석 여부 -형질전환 효율 비교 여부	22	95	제 8 절

2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
LOX/zRBP 동시 발현 형질전환 벼의 생산	<ul style="list-style-type: none"> - LOX/zRBP 동시발현 여부 - LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 생산 여부 	30	100	제 3 절
저온 내성 RNA-결합 단백질 유전자를 이용한 형질전환 벼 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환용 벡터 제작 여부 - 벼 형질전환체 확인 및 분석 여부 	20	100	제 3 절 제 4 절
벼에서 유사 유전자 분리	<ul style="list-style-type: none"> - 벼에서 유사 유전자 분리 여부 - 유사 유전자 발현 분석 여부 	20	95	제 7 절
유전자 형질전환을 향상, 병 및 저온 복합내성 유전자 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - 재분화 향상 여부 - 자체 개발된 promoter 의 효율 분석 여부 	20	95	제 3 절 제 8 절
병해 저항성 검정체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 도열병, 흰잎마름병 저항성 분석 여부 - 실내유묘검정 여부 - 포장검정 체계 확립 여부 	10	100	제 9 절

3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
LOX/zRBP 동시 발현 형질전환 벼의 종자 확보 및 유전적 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - LOX/zRBP 형질전환 벼의 종자 확보 여부 - LOX/zRBP 동시발현 형질전환 벼의 유전적 안정성 평가 여부 	30	95	제 3 절
RNA-결합 단백질 유전자를 이용한 내냉성 벼 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 동결 내성 관련 유전자 기능 규명 여부 - 복합 재해 내성 형질전환체 선별 여부 - 형질전환 벼의 저온 내성 분석 여부 	20	100	제 3 절 제 4 절
내한성과 회복 과정에서 aquaporin의 기능 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 애기장대에서 돌연변이 유전자의 기능 분석 여부 - 가뭄 내성 유전자 기능 규명 	20	100	제 5 절 제 6 절
형질전환체 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 확인 여부 - 형질전환된 유전자의 발현조사 여부 - 생산성 등의 기타 형질조사 여부 	20	100	제 3 절 제 4 절 제 8 절
내병성 및 내냉성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 실내유묘검정 및 포장검정 여부 - 생육 및 수량조사 여부 	10	100	제 9 절

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

평가		목표 달성도 (%)
평가의 착안점	평가의 척도 (%)	
LOX/zRBP 이중형질전환 벼를 생산하였는가? LOX/zRBP 이중형질전환 벼가 복합재해 내성을 갖는가? LOX/zRBP 이중형질전환 벼의 복합재해 내성 기작이 규명되었는가?	30	100
zinc finger RNA-결합 단백질 유전자를 이용한 형질전환 벼가 내병성을 보이는가? 내병성 기작에서 zinc finger RNA-결합 단백질의 기능을 규명하였는가?	25	100
벼에서 aquaporin 유전자를 분리, 기능 분석에 성공하였는가? 형질전환 체에서 aquaporin 유전자의 발현과 복합재해 내성의 상관관계를 규명하였는가?	25	100
벼 형질전환 효율을 크게 증가시켰는가? 내병성, 내냉성의 포장 실험에 성공하였는가?	20	95

제 2 절 관련 분야에의 기여도

작물의 생산량에 약 50% 이상이 환경스트레스에 의해 억제된다고 알려졌다. 그 가운데 특히 온도, 수분, 염은 식물의 성장을 결정하는 가장 중요한 스트레스요인이다. 따라서 본 연구과제를 통해 온도 및 식물의 수분 흡수와 분배에 관여한다고 알려진 glycine-rich RNA binding protein과 aquaporin의 특성 및 과다발현이 식물에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 본 연구의 관련 분야에의 기여도는 “제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획”에 기술한 바와 같다.

제 5 장 연구개발성과 및 성과 활용계획

제 1 절 기술적 측면에서의 성과

1. 기술적 성과

본 연구를 통하여 1) 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환 벼에 glycine을 다량으로 함유한 RNA결합단백질을 encode 하는 AtRZ1a (AY76) 유전자 또는 aquaporin의 한 종류인 AtTip4:1 유전자를 도입시켜 생산한 생산된 LOX/zRBP 및 LOX/AQP 동시발현 형질전환 벼의 염스트레스, mannitol 스트레스, 건조스트레스에 대한 저항성을 분석하고 두 유전자 역할 간의 상호작용 가능성을 분석하였다. 2) 작물에서 aquaporin 단백질의 과다발현을 통해 작물의 가뭄 스트레스 증가함을 증명하였다. 이러한 사실을 바탕으로 벼를 포함하는 많은 작물에서 수분 스트레스 증가를 인위적으로 유도할 수 있음을 증명하였다. 또한 Urea 흡수 역시 AtTIP4-1 유전자 과다발현에 의해 증가함을 증명하였다. 이는 현재 가장 많이 사용되는 질소계 비료의 대부분을 차지하는 Urea의 흡수를 촉진하는데도 aquaporin을 활용할 수 있음을 증명하였다. 따라서 이러한 현실적 필요에 AtTIP4-1 유전자를 활용할 수 있다고 생각된다. 3) 벼를 대상으로 형질전환을 시도할 경우 가장 효율이 높으면서 안정적으로 형질전환 할 수 있는 방법을 확립하여 이 후에 벼를 대상으로 다양한 유전자를 삽입할 경우 빠른 시간 내에 원하는 형질을 만들어 낼 수 있는 이점을 가질 수 있게 되었다. 또한 AQP 유전자인 애기장대의 AtTip4:1 유전자와 RBP 유전자인 애기장대의 AY84 유전자를 형질전환한 벼품종의 경우 제 3 장 9 절에 기술한 것과 같이 벼의 도열병에 대하여 병저항성 유도 능력이 있음이 확인되는바 우리 농업에서 심각한 문제를 일으키는 도열병에 대한 근본적인 방제 방법을 기대할 수 있는 가능성을 열었다고 판단된다.

2. 추가 연구의 필요성 및 기업화 방안

환경 스트레스는 작물의 생산량에 가장 커다란 영향을 미치는 요인으로 알려졌다. 특히 수분은 식물의 성장을 결정하는 가장 중요한 요인이다. 본 연구과제는 식물의 수분 흡수 및 분배에 관여한다고 알려진 aquaporin의 특성 및 과다발현이 식물에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 본 연구를 통해 AtTIP4-1 과다발현이 식물의 성장과 발달에는 거의 영향을 주지 않으나 가뭄 조건에서 정상개체보다 높은 저항성을 보였다. 또한 최근 식물 aquaporin 단백질들이 Urea와 같은 전하를 가지지 않는 작은 유기물의 세포막 통관을 촉진한다고 보고되었다. 본 연구팀도 AtTIP4-1 과다발현 애기장대에서 정상개체에 비해 Urea 흡수 속도가 증가됨을 증명하였다. 벼에서 AtTIP4-1과 아미노산 구조가 매우 유사한 OsAQP1 단백질은 조절 면에서 크게 차이가 있음을 확인하였다. 이러한 사실은 aquaporin이 새로운 기능을 밝힌 것으로 수분 스트레스를 넘어 질소계 비료의 흡수 효율을 높여 친환경적

작물 개발에 응용을 위한 추가 연구에 대한 지원이 필요하다고 생각된다. 또한, 본 연구의 결과로 볼 때 RBP 유전자가 형질 전환된 AY84-41과 AQP 유전자가 형질 전환된 AtT1p4:1를 벼에 형질 전환한 결과 도열병에 대한 저항성 유도 능력을 어느 정도 효과가 있음을 확인하였으나 흰잎마름병에 대한 효과는 미비한 것으로 나타났다. 하지만 병반내 흰잎마름병을 일으키는 세균의 밀도에서는 wild-type의 낙동벼와 비교해서 현저하게 감소됨이 확인되었다. 따라서 흰잎마름병에 대한 직접적인 병방제 효과 외에 포장내 이병속도나 다른 인접 포장으로의 이병속도 등은 추가로 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

채종된 LOX/zRBP 유전자 및 LOX/AQP 유전자가 도입된 형질전환 벼 종자는 특허권이 인정되는대로 기업화가 가능할 것으로 판단된다. 그러나, 2008년도부터 포트실험외의 포장시험은 허가된 지역에서만 재배가 가능하도록 하는 LMO 관련 법령이 시행됨에 따라 GMO 작물의 시험재배가 규제되고 있어서 기업화를 위한 기술적 문제가 수반되고 있다. 이에 대한 적절한 해결 방안이 모색되어야 하리라고 판단된다.

제 2 절 학문적 측면에서의 성과

본 연구에서는 온도, 수분, 염 등의 복합 스트레스의 극복에 있어서 lipoxygenase, glycine-rich RNA binding protein, aquaporin의 역할을 규명하고, 형질전환 방법을 통하여 복합재해 내성을 지닌 벼를 생산하고자 하였다. 이러한 유전자 기능은 지속적인 연구를 통해 우수한 작물 개발에 응용되어야 한다고 생각한다. 관련 연구들을 전문 연구 잡지와 학회에 보고하였다.

1. 학술지

1) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Thavrak Huon, Sangwook Park, Oksoo Han, Biochemical Characterization of the Dual Positional Specific Maize Lipoxygenase and the Dependence of Lagging and Initial Burst Phenomenon on pH, Substrate, and Detergent during Pre-steady State Kinetics. *J Biochem Mol Biol* 40: 100-106, 2007, IF=1.56.

2) Sungkuk Jang, Thavrak Huon, Keumhwa Kim, Eunji Um, and Oksoo Han, Regiochemical and Stereochemical Evidence for Enzyme-Initiated Catalysis in Dual Positional Specific Maize Lipoxygenase-1. *Org. Lett.* 9, 3113-3116. IF=4.659, ISSN=1523-7060.

3) Kyoungwon Cho, Ganesh Kumar Agrawal, Junko Shibato, Young-Ho Jung, Yeon-Ki Kim, Baek Hie Nahm, Nam-Soo Jwa, Shigeru Tamogami, Oksoo Han, Kimiyoshi Kohda, Hitoshi Iwahashi, and Randeep Rakwal, Survey of Differentially Expressed Proteins and Genes in Jasmonic Acid Treated Rice Seedling Shoot and Root at the Proteomics and Transcriptomics Levels, *J. Proteome Res.* 6:3581-3603 IF= 5.151, ISSN=1535-3893.

4) Thavrak Huon, Sungkuk Jang, Kyoungwon Cho, Randeep Rakwal, Je Chang Woo, Ilchul Kim, Seung-Wook Chi and Oksoo Han, A substrate serves as a hydrogen atom donor in the enzyme-initiated catalytic mechanism of dual positional specific maize lipoxygenase-1. *Bull Korean Chem. Soc.*, accepted, 2009. ISSN=1229-5949. IF=1.156.

5) Ju HW, Koh EJ, Kim SH, Kim KI, Lee H, Hong SW Glucosamine causes overproduction of reactive oxygen species, leading to repression of hypocotyl elongation through a hexokinase-mediated mechanism in Arabidopsis, 2009 *J*

Plant Physiol. 166: 203–212. IF = 2.17.

2. 특허

1) Oksoo Han, Sungkuk Jang, Kyoungwon Cho, Keumhwa Kim, Eunji Um, Method for preparing hydroxylinoleic acid using lipoxygenase from *Zea mays* and the hydroxylinoleic acid prepared by the same, PCT, 2008.02.22, KR2008001049.

2) 한옥수, 장성국, 조경원, 김금화, 엄은지, 옥수수 리폭시지나아제 효소를 이용한 다양한 히드로퍼옥시리놀레산 반응산물의 제조 방법, 대한민국 특허청, 2007. 4. 30, 출원번호: 10-2007-0041982.

3. 학술회의 발표

1) Sungkuk Jang, Gumhwa Kim, Eunji Um, Oksoo Han, Heterologous expression of rice 12-oxophytodienoic acid reductase (OsOPRI) and measurement of the activity by 2-cyclohexen-1-one (2-CyHE) as a substrate analogue, 63rd KSBMB, p. 320, May 25–26, 2006, Seoul, Korea.

2) Sungkuk Jang, Oksoo Han, Spectral shift of CYP74A (Allene oxide synthase) by binding with imidazole derivatives, 63rd KSBMB, p. 321, May 25–26, 2006, Seoul, Korea.

3) S. Jang, K. Cho, J. Han and O. Han, Stereochemical analysis of dual positional specific lipoxygenase from maize, Chirality 2006, June 25–28, 2006, Busan, Korea.

4) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Oksoo Han, Calcium-dependent activation and membrane association of the nontraditional maize lipoxygenase in transgenic rice plants, Seventh ICSB, October 8–13, 2006, Yokohama, Japan.

5) Sungkuk Jang, Kyoungwon Cho, Thavrak Huon, Sangwook Park, and Oksoo Han, Enzyme triggered mechanism and activation by calcium of the maize lipoxygenase. The 3rd AOCP, November 17–20, 2006, Beijing, China.

6) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Thavrak Huon, Sereyvath Yoeun, Sopheak

Makara Chea, Nguyen Thi Thuy Hanh, Sangwook Park, Eunsun Kim, and Oksoo Han, Calcium-Mediated Translocation and Activation of Antioxidant Enzymes in Transgenic Rice Overexpressing the Dual Positional Specific Lipoxygenase. The 3rd AOCP, November 17–20, 2006, Beijing, China.

7) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Sangwook Park, Eunji Um, Keumwha Kim, Seryvath Youn, Thavrak Huon, Nguyen Thi Thuy Hahn, Sopheak Makara Chea, Oksoo Han, Calcium-dependent activation and membrane association of the nontraditional maize lipoxygenase in transgenic rice plants, Keystone symposia, March 23–28, 2007, Idaho, USA

8) Sungkuk Jang, Sangwook Park, Eunji Um, Keumwha Kim, Seryvath Youn, Thavrak Huon, Nguyen Thi Thuy Hahn, Sopheak Makara Chea, Oksoo Han, Proposed mechanism for the enzyme-initiated catalysis in the dual positional specific maize lipoxygenase, ICPMB, June 25–29, 2007, Nara, Japan.

9) Sungkuk Jang, Sangwook Park, Eunji Um, Keumwha Kim, Seryvath Youn, Thavrak Huon, Nguyen Thi Thuy Hahn, Sopheak Makara Chea, Oksoo Han, Regiochemical and stereochemical evidences for the enzyme-triggered catalytic mechanism of the dual positional specific maize lipoxygenase, 19th FAOBMB, May 27–30, 2007, Seoul, Korea.

10) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Jihoon Han, Thavrak Houn, Keumhwa Kim, Oksoo Han, Functional assessment of dual positional specific maize lipoxygenase-1 by transgenic expression in rice plant, 2nd ASPL, p.22–22, Nov. 30–Dec.02, 2007, Tokyo, Japan

11) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Keumhwa Kim, Eunji Um, Thavrak Houn, Seryvath Yoeun, Oksoo Han, Calcium-dependent membrane association of dual positional specific maize lipoxygenase-1, 2nd ASPL, p.74–74, Nov. 30–Dec.02, 2007, Tokyo, Japan

12) Eunji Um, Keumhwa Kim, Yeonok Kim, Oksoo Han, Constitutive expression of aquaporin and lipoxygenase genes leads to the enhancement of salt, heat, and mannitol stress resistance in transgenic rice plants. APGC, Dec. 7–11, 2008. Victoria, Australia.

13) Keumhwa Kim, Eunji Um, Yeonok Kim, Oksoo Han, Salt resistance and change of antioxidative enzyme activity in transgenic rice plants overexpressing glycine-rich RNA-binding protein (AtRZ1a) and dual positional specific lipoxygenase genes. APGC, Dec. 7-11, 2008. Victoria, Australia.

14) Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Thavrak Huon, Keumhwa Kim, Eunji Um, Youn Sereyvath, OksooHan, Constitutive expression of dual positional specific maize lipoxygenase-1 leads to the activation of antioxidative enzymes in transgenic rice, Keystone symposia, Jan 11-16, Big Sky, MO, USA.

15) Kim SH, Ju HW, Hong SW Overexpression of gene encoding tonoplast intrinsic aquaporin promotes urea transport in Arabidopsis. KSBMB Annual Meeting 2008, 10, Seoul, Korea

16) Kim SH, Ju HW, Hong SW Isolation and characterization of OsAQP1 from rice. 한국응용식물학회, 2008, 10, Daegu, Korea.

4. 본 연구 팀에서 발표된 논문의 인용 정도

본 연구의 주제와 관련되어 발표된 논문을 타 연구자들이 인용한 예를 들면 다음과 같다.

1) Title: Regiochemical and stereochemical evidence for enzyme-initiated catalysis in dual positional specific maize lipoxygenase-1

Author(s): Jang, S; Huon, T; Kim, K, et al.

Source: ORGANIC LETTERS Volume: 9 Issue: 16 Pages: 3113-3116

Published: AUG 2 2007

Times Cited: 1

2) Title: Biochemical characterization of the dual positional specific maize lipoxygenase and the dependence of lagging and initial burst phenomenon on pH, substrate, and detergent during pre-steady state kinetics

Author(s): Cho, K; Jang, S; Huon, T, et al.

Source: JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Volume: 40 Issue: 1 Pages: 100-106 Published: JAN 31 2007

Times Cited: 1

3) Title: Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and

lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots

Author(s): Lee, SH; Ahn, SJ; Im, YJ, et al.

Source: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

Volume: 330 Issue: 4 Pages: 1194–1198 Published: MAY 20 2005

Times Cited: 11

4) Title: Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice

Author(s): Lee, A; Cho, K; Jang, S, et al.

Source: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

Volume: 318 Issue: 3 Pages: 734–738 Published: JUN 4 2004

Times Cited: 14

5) Title: Rice octadecanoid pathway

Author(s): Agrawal, GK; Tamogami, S; Han, O, et al.

Source: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

Volume: 317 Issue: 1 Pages: 1–15 Published: APR 23 2004

Times Cited: 28

6) Title: Molecular characterization of the gene encoding rice allene oxide synthase and its expression

Author(s): Ha, SB; Lee, BC; Lee, DE, et al.

Source: BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY Volume: 66

Issue: 12 Pages: 2719–2722 Published: DEC 2002

Times Cited: 10

7) Title: Dual positional specificity of wound-responsive lipoxygenase from maize seedlings

Author(s): Kim, ES; Kim, H; Park, RD, et al.

Source: JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY Volume: 159 Issue: 11

Pages: 1263–1265 Published: NOV 2002

Times Cited: 4

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 lipoxygenase 와 저온 저항성

1. 세포막의 불포화도 와 lipoxygenase

복숭아에서 Chilling injury (CI)와 membrane의 불포화도의 관계를 분석한 결과 온도가 내려감에 따라 지질막의 불포화도와 membrane의 유동성이 증가하였다. 또한 저온에서 저장된 복숭아에서는 fatty acid desaturase의 활성이 증가하고 linolenic acid 같은 18:3 fatty acid의 함량이 증가하였다. 이러한 결과는 식물체의 저온 저항성 기작에서 불포화 지방산의 함량과 불포화 지방산을 기질로 사용하는 lipoxygenase의 역할이 중요함을 시사하고 있다(참고: Zhang C. and Tian S. (2009) Crucial contribution of membrane lipid's unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0 °C, Food Chemistry 115 405-411).

2. 스트레스조건에서 lipoxygenase와 Ca²⁺의 조절

식물체의 방어기작에서 활성 산소와 free Ca²⁺의 조절은 중요한 요소이다. annexin은 Ca²⁺-dependent membrane binding이나 membrane insertion에 관여하는 단백질로 알려져 있다. 스트레스 조건에서 옥수수의 annexin은 Ca²⁺의 influx를 조절할 수 있었으며, Ca²⁺-permeable transport pathway를 생성하였다. 이러한 결과는 lipoxygenase의 chloroplast binding이 Ca²⁺의 농도에 의존한다는 본 연구 결과에 중요한 시사점을 갖는다(참고: Laohavist A, Mortimer JC, Demidchik V, Coxon KM, Stanconbr MA, Macpherson N, Brownlee C, Hofman A, Webb ARR, Miedema H, Battey NH, Davies JM (2009) Zea mays Annexins modulate cytosolic free Ca²⁺ and generate a Ca²⁺-permeable conductance, Plant Cell 21: 479-493).

제 2 절 수분 스트레스와 lipoxygenase

1. 수분 스트레스 조건에서 유도되는 lipoxygenase 유전자

수분 스트레스 조건에서 유도되는 다양한 종류의 유전자들은 lipoxygenase 유전자를 포함하고 있다. 여러 종류의 genotype을 가진 땅콩 가운데 건조 스트레스 저항성 genotype에서는 LOX 단백질의 발현 수준이 높았다. 이는 LOX에 의하여 생성된 자스몬산이 건조 스트레스 저항성 기작에 관여함 시사하고 있다(참고: Kottapalli KR, Rakwal R, Shibato J, Burow G, Tissue D, Burke J, Puppala N, Burrow M, Payton P (2009) Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes, *Plant Cell Environ.* 32: 380-407).

제 7 장 참고문헌

- Abbasi FM, Komatsu S (2004) *Proteomics*. 4:2072–2081.
- Agrawal GK, Jwa N, Shibato J, Han O, Iwahashi H, Rakwal R (2003) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 310: 1081–1090.
- Agrawal GK, Tamogami S, Han O, Iwahashi H, Rakwal R (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317:1–15,
- Alba MM, Pages M (1998). Plant proteins containing the RNA–recognition motif. *Trends in Plant Sci.* 3: 15–21.
- Bienert GP, Moller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK, Jahn TP, 2007, *J. Biol. Chem* 282: 1183–1192.
- Carpenter CD, Kreps JA, Simon AE (1994). *Plant Physiol.* **104**, 1015–1025.
- Chandru HK, Kim E, Kuk Y, Cho K, Han O (2003) *Plant Sci.*164, 935–941.
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005) *Biol. Cell* 97: 749–764
- Cho K, Agrawal GK, Shibato J, Jung Y, Kim Y, Nahm BH, Jwa N, Tamogami S, Han O, Kohda K, Iwahashi H, and Rakwal R (2007) *J. Proteome Res.* 6:3581–3603.
- Cho K, Jang S, Huon T, Park S, Han O (2007) *J Biochem Mol Biol* 40: 100–106.
- Clough SJ and Bent AF, 1998, *Plant J.* 16: 735–743
- Cooper TG, Sumrada R, 1975, *J. Bacteriol.* 121:571–576
- Das S, Rafter JD, Kim KP, Gygi SP, Cho W. (2003) *J Biol Chem.* 278:41431–42.
- Eckert M, Biela A, Siefritz F, Kaldenhoff R (1999) *J Exp Bot* 50:1541–1545
- ElBerry HM, Majumdar ML, Cunningham TS, Sumrada RA, Cooper TG (1993) *J Bacteriol.* 175:4688–4698
- Ferullo JM, Vezina LP, Rail J, Laberge S, Nadeau P, Castonguay Y (1997). *Plant Mol. Biol.* **33**, 625–633.
- Futcher B, Latter GI, Monardo P, McLaughlin CS, Garrels JI (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 7357–7368 .
- Galluci E, Micelli C, Lippe C (1971) *Arch. Intl. Physiol. Biochem.* 79:881–887
- Gerbeau P, Guclu J, Ripoché P, Maurel C (1999) *Plant J* 18:577–587
- Ghosh S, Hepstein S, Heikkila J, Dumbroff E (1988) *Anal. Biochem.* 169:227–233
- Graumann PL Marahiel MA (1998) *Trend in Biol. Sci.* 23: 286–290.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 1720–1730 .
- Heymann JB & Engel A (1999) *News Physiol Sci* 14:187–193
- Hong SW and Vierling E (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4392–4397
- Hong SW, Lee U, Vierling E (2003) *Plant Physiol.* 132:757–67
- Huon T, Jang S, Cho K, Rakwal R, Woo JC, Kim I, Chi S and Han O (2009)

Bull Korean Chem. Soc., accepted.

- Imin N, Kerim T, Rolfe BG, Weinman J (2004) *J. Proteomics*. 4:1873–1882.
- Islam N, Lonsdale M, Upadhyaya NM, Higgins TJ, Hirano H, Akhurst R (2004) *J Proteomics*. 4:1903–8.
- Jang S, Huon T, Kim K, Um E, and Han O (2007) *Org. Lett.* 9: 3113–3116.
- Johanson U, Karlsson M, Johanson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001) *Plant Physiol* 126:1358–1369
- Jones RGW (1981) *The Physiological Processes Limiting Plant Productivity*, CB Johnson, Ed (Butterworths, London), pp271–292.
- Ju HW, Koh EJ, Kim SH, Kim KI, Lee H, Hong SW (2009) *J Plant Physiol*. 166: 203–212.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 14648–14654
- Kim E, Choi E, Kim Y, Cho K, Lee A, Shim J, Rakwal R, Agrawal GK, and Han O (2003) *Plant Mol. Biol.* 52: 1203–1213.
- Kim ST, Cho KS, Yu S, Kim SG, Hong JC, Han CD, Bae DW, Nam MH, Kang KY (2003) *J Proteomics*. 3:2368–78.
- Kim ST, Kim HS, Kim HJ, Kim SG, Kang SY, Lim DB, Kang KY (2003) *Mol Cells*. 16:316–22.
- Kojima S, Bohner A, von Wiren N (2006) *J. Membrane Biol.* 212: 83–91.
- Kottapalli KR, Rakwal R, Shibato J, Burrow G, Tissue D, Burke J, Puppala N, Burrow M, Payton P (2009) *Plant Cell Environ.* 32: 380–407.
- Kwon Y, Kim SH, Jung MS, Kim MS, Oh JE, Ju HW, Kim KI, Vierling E, Lee H, Hong SW. 2007, *Plant J.* 49:184–193
- Laohavist A, Mortimer JC, Demidchik V, Coxon KM, Stanconbr MA, Macpherson N, Brownlee C, Hofman A, Webb ARR, Miedema H, Battey NH, Davies JM (2009) *Plant Cell* 21: 479–493.
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13057–13062.
- Lee A, Cho K, Jang S, Rakwal R, Iwahashi H, Agrawal GK, Shim J, Han O (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 734–738.
- Lee EK, Kwon M, Ko JH, Yi H, Hwang MG, Chang S, Cho MH (2004) *Plant Physiol*. 134:528–38.
- Lee H, Xiong L, Ishitani M, Zhu JK (1999). *Plant J.* 17:301–308.
- Lee SH, Ahn SJ, Im YJ, Cho K, Chung GC, Cho BH, Han O (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 1194–1198.
- Lee U, Wie C, Escobar M, Williams B, Hong SW, Vierling E (2005) *Plant Cell*. 17: 559–71.
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, von Wiren N, (2003) *Plant*

- Physiol.* 133:1220–1228.
- Liu Z, Hong SW, Escobar M, Vierling E, Mitchell DL, Mount DW, Hall JD (2003) *Plant Physiol.* 132:1405–14
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M (2006) *Nature* 440:688–691.
- Mitamura O, Seike Y, Kondo K, Ishida N, Okumura M (2000) *Limnology* 1:19–26
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo JM (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:9061–9066.
- Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr (1994) *Biochem. Biophys. Acta* 1197: 133–166
- Sachetto–Martins G, Franco LO, de Oliveira DE (2000). *Biochim. Biophys. Acta* :1492, 1–14.
- Saier MH (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354–411
- Schaffner AR (1998) *Planta* 204:131–139
- Shinozaki K, Yamaguchi–Shinozaki K (2000). *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217–223.
- Song J, Lee DE, Jung S, Kim , Han O, Cho, BH, Lee IJ, Back K (2004) *Biologia Plantarum* 48: 361–366.
- Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y (2003) *Nature Biotechnology* 21:914–91.
- Stuedle E, Peterson C, (1998) *J Exp. Botany* 49: 775–788
- Sumrada R, Gorski M, Cooper TG (1976) *J. Bacteriol.* 125:1048–1053
- Trisiriroj A, Jeyachok N, Chen ST (2004) *J. Proteomics.* 4:2047–2057.
- Turk E. and Wright EM (1997) *J Membr. Biol.* 159: 1–20
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003) *Nature* 425:734–737
- Varshavsky A (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12142–12149.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). *Science* 270, 484–487.
- Vera–Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O (2004) *Plant Physiol.* 135:2318–2329
- Watson CJ, Miller H, Poland P, Kilpatrick DJ, Allen MDB, Garret MK, Christianson CB (1994) *Soil Biol. Biochem.* 26:1165–1171
- Wilson MR, O'Donogue SI, Walker NA (1988) *J. Exp. Bot.* 39:763–774
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) *Plant Cell* S165–S183.
- Yamada S, Katsuhara M, Kelly W, Micjalowski C, Bohnert H (1995) *Plant Cell* 7:1129–1142.
- Zhang C. and Tian S (2009) *Food Chemistry* 115 405–411.
- Zonia LE, Stebbins NE, Polacco JC (1995) *Plant Physiol.* 107:1097–1103.

주 의

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