

# 최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <p>폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 항산화능 향상에 관한 연구</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p>	<p>농림축산식품부</p>	<p>(앞면)</p> <table border="1"><tr><td>발간등록번호</td></tr><tr><td>11-1543000-001016-01</td></tr></table> <p>폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 항산화능 향상에 관한 연구 (Studies on the development of <i>Brassica napus</i> transgenic lines for the enhanced antioxidation activity)</p> <p>고려대학교</p> <p>농림축산식품부</p>	발간등록번호	11-1543000-001016-01
발간등록번호				
11-1543000-001016-01				

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 향산화능 향상에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 9 월 16 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 이 호 정

세부연구책임자 : 홍 석 환

연 구 원 : 김 준 혁

연 구 원 : 정 찬 영

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 홍 석 환

협동연구기관명 : (주) 현 농

협동연구책임자 : 김 철 홍

# 요 약 문

I. 제 목: 폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 향산화능 향상에 관한 연구

II. 연구성과 목표 대비 실적

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭 등록	품종 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	0						0	0		
	달성	4						2	0		
2차 년도	목표	1						1	1		
	달성	0						3	0		
3차 년도	목표	1	1					2	0		
	달성	2	2					1	0		
4차 년도	목표										
	달성										
5차 년도	목표										
	달성										
계	목표	2	1					3	1		
	달성	<b>6</b>	<b>2</b>					<b>7</b>	<b>0</b>		

III. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 본 연구의 궁극적 목표는 식물이차대사 조절유전자를 유채에 형질전환시켜 향산화능이 향상된 유채유를 개발하는 원천 기술 및 적용에 있음.
- 유채유는 추출 과정에 따라 폴리페놀 등의 micronutrient 함량이 달라진다. 향산화능이 높은 micronutrient의 함성량 자체가 증가된 유채 작물을 생산함으로써 고부가가치의 유채유 생산을 목표로 함.
- 본 연구팀은 식물의 유전자 발굴 및 유채 형질전환 식물체의 생산 기술을 확보하였으며 모델식물에서 식물이차대사 조절 관련 유전자들을 이용하여 유채유의 향산화능이 향상된 작물개발 및 유채유 생산을 목표로 함.

IV. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 제1세부과제: 식물이차대사 조절유전자 선별 및 조작
  - 모델식물을 이용하여 확보된 식물이차대사 조절유전자 활성 검정
  - 딥 유전자 도메인 치환을 통한 활성 기능 증진
  - 타겟유전자 프로모터 클로닝 및 유체에서의 유사유전자 확보 및 기능 검정
- 제1협동과제: 유채 형질전환체 생산
  - 유채 형질전환 기술 간편화 방안 연구
  - 유채 형질전환체의 플라보노이드 프로파일링
  - 유채 작물에서 새로운 분자유종 선별 마커유전자 개발
- 제2협동과제: 유채유 향산화능 향상을 위한 폴리페놀 대사조절 유채품종 재배 연구
  - 야생형 유채 재배 조건 다각화에 따른 유채유 향산화능 증진 재배법 연구
  - 노지 재배시 유채 형질전환체의 품종 고정 및 재배 특성 분석
  - 폴리페놀 대사조절유채품종 향산화능 증진 재배법 연구 및 유채유 산업화 방안 구축

## V. 연구개발결과

- 식물이차대사산물 합성 조절과정에서 플라보노이드 합성에 관여하는 딥 유전자 및 플라보노이드 합성 유전자를 확보하고 그 기능성을 모델식물에서 조사함.
- 대표결과로는 애기장대에서 플라보노이드 합성을 촉진하는 *AtMybD* 전사조절자를 발굴하여 플라보노이드 증진 기능을 검정하였고, 유채에서는 *flavonol synthase* 유전자를 새로이 클로닝하여 플라보놀을 선택적으로 증진시킬 수 있는 결과를 얻었음.
- 유채 형질전환 기술 간편화 방안을 확립함. 이 기술을 이용하여 *AtDFR*, *BnFLS1*, *AtMybD* 등의 유전자를 국내 추파 품종인 한라 품종에 형질전환시켰으며, 바스타 저항성 라인을 얻어 확인한 결과 안토시아닌 혹은 플라보놀의 함량이 2 배 이상 증가된 것으로 나타나는 결과를 얻었음.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 유채 형질전환 기술 간편화 방안을 확립함. 이 기술을 이용하여 *AtDFR*, *BnFLS1*, *AtMybD* 등의 유전자를 국내 추파 품종인 한라 품종에 형질전환시켰으며, 바스타 저항성 라인을 얻어 확인한 결과 안토시아닌 혹은 플라보놀의 함량이 2 배 이상 증가된 것으로 나타나는 결과를 얻었음.
- 2000년 기록에 의하면 세계 GMO 종자 시장 규모는 전체의 약 10%에 해당하는 25억 달러이며 2010년 세계 종자 시장 규모는 300억 달러로 추정된다고 하며 그 중 형질전환 작물 종자의 시장 규모 또한 약 250억 달러로 추정된다고 한다. 아직까지는 시장에 나와 있는 GMO

의 품목이 제한적이지만 앞으로 이쪽 분야의 발전 및 생산은 놀라운 수준이 될 것으로 예상된다. 이 연구에서 생산한 유채 종자는 추후 기능성이 강화된 유채유 및 유채박으로 사용이 가능함. 또한, 동일 유전자를 타 경제작물로 도입하여 유사한 성과를 기대할 수 있음.

## 1) 기술적 측면

- 향산화능 향상 유채유 생산 작물 개발: 기존의 식물이차대사 산물 합성 증가를 위해 사용되지 않았던 대사작용에 관여하는 유전자를 사용하였음. 이차대사 반응이 잘 보존되어 있는 다른 작물에서도 동일한 결과를 얻을 수 있다고 생각됨.
- 십자화과 품종은 식물 이차대사 반응이 잘 보존되어있으므로 커다란 파급효과 기대: 식물 이차대사 반응은 십자화과 식물에서 잘 보존되어있다고 보고되어 있음. 따라서 모델식물에서 확인된 향산화능 증가는 십자화과 식물에서 동일하게 기대됨.
- 내재해성 작물 개발: 식물 유용물질 강화 식물체의 육성으로 기능성 물질의 대량 생산 이 가능하며, 내재해성 식물 개발로 새로운 교배 모본으로의 활용 또한 가능하다고 사료됨. 식물 특이적 발현 유전자 발굴로 새로운 유전자원 pool을 확보하여 특허 등의 지적재산권도 확보 가능함. 이미 이 과제로 여러 건의 특허를 출원하였고 등록 완료하였음.
- 고향산화능 유채유 산업화 방안: 미국, 캐나다 등지에서는 GMO를 대규모로 경작하고 있는 실정임. 현재 GMO 사용에 대한 소비자의 부정적 반응으로 그 제품화가 주춤한 상태임. 그나 GMO 콩을 원료로 하는 두부와 같은 식품이 아니라 식용유는 최종생산물에서 유전자 재조합 DNA나 외래 단백질이 전혀 검출되지 않으므로 GMO 식품과 관련된 우려 및 거부감은 거의 없는 것으로 나타나기에 이러한 점을 부각한다면 본 형질전환 유채의 종자에서 식용유를 추출하여 생산할 경우 시장성에 있어 경쟁력을 확보할 것으로 생각됨.

## 2) 경제·산업적 측면

- 작물의 향산화능 증대를 위한 새로운 원천기술 개발이 가능하며 유용 유전자원 확보에 따른 지적재산권확보로 경제적 부가가치 창출이 가능함.
- 향산화능과 연계된 유용 내재해성 유전자의 개발로 실용화 가능한 내재해 형질전환 작물 개발에 활용이 가능함.
- 고향산화능 유채유를 확보한 뒤 현재 카놀라유를 판매하는 동원, 사조해표 등과 같은 식용유 생산 및 유통업체와 협력이 가능한 방안을 모색 가능. 현재 CJ 등에서는 기존의 유채유에 비타민 E만을 따로 첨가하여 판매중임.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

*Brassica napus* is one of main crops for oil sources, which is grown widely over the world. Belong to flavonoids group in plant, flavonols are known as high antioxidants and most important step of flavonols biosynthesis is catalyzed by FLAVONOL SYNTHASE (FLS). Until now, there is no any research about this enzyme in *Brassica napus*. In *Arabidopsis thaliana*, the flavonoids biosynthesis pathway was well characterized. From phenylalanine, flavonoids are biosynthesized throughout some common key enzymes such as AMMONIA-LYASE (PAL), CHALCONE SYNTHASE (CHS), CHALCONE ISOMERASE (CHI), FLAVANONE 3-HYDROXYLASE (F3H), FLAVONOID 3'-HYDROXYLASE (F3'H), FLAVONOL SYNTHASE (FLS), DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE (DFR), and LEUCOANTHOCYANIDIN DIOXYGENASE (LDOX). Flavonols, anthocyanin and proanthocyanidin share a same pathway before separating at the point of dihydroflavonol. From here, the dihydroflavonol is catalyzed by DFR or FLS to produce anthocyanin or flavonols, respectively. In *Arabidopsis*, AtMYB11, AtMYB12, and AtMYB111 activate expressions of *CHS*, *CHI*, *F3H*, and *FLS1* without having a bHLH partner. To obtain transgenic *Brassica napus* with enhanced flavonoid contents, we identified several genes including arabidopsis *AtMybD*, *AtFLS1*, *AtDFR*, and *Brassica napus* FLAVONOL SYNTHASE (*BnFLS*). These genes were cloned and transformed into wild type *Brassica napus* (Hanla cultivar) to generate overexpression transgenic plants. Among the transgenic lines, here we describe the results of *BnFLS1-ox*. In response to sucrose treatment, the anthocyanin content of wild type were increased while the *BnFLS-OX in vitro* shoots did not show any difference between treatment and non-treatment samples. In addition, the *BnFLS-OX in vitro* shoot extracts also reflected higher antioxidant activity than that of non-transgenic shoots. The BnFLS amino acid sequence has high homology with *Arabidopsis thaliana* FLS1 (AtFLS1) and this BnFLS can complement the lacking of AtFLS1 in *Arabidopsis thaliana fls1-3* mutant (*atfls1-ko*). Although the full-length genomic DNA of *BnFLS* is still not be cloned as well as the bioactivity of *BnFLS* is unknown, our results suggest a potential method to increase the flavonols content in this crop for further applications.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	12
Section 1. The goal of research .....	12
Section 2. The need of research .....	13
1. Technical aspects .....	13
2. Economic and industrial aspects .....	14
Chapter 2. Current developmental status and progress .....	16
Chapter 3. Contents and results of the research .....	18
Section 1. Research materials and methods .....	18
1. Cloning of the genes involved in flavonoid biosynthesis regulation .....	18
2. Vector construction of useful gene expression .....	19
3. Gene transformation of model plants .....	19
4. Tissue culture of <i>Brassica napus</i> .....	19
5. Assay of basta strip test .....	20
6. <i>RT-PCR</i> analysis .....	20
7. <i>qRT-PCR</i> analysis .....	20
8. Northern analysis .....	21
9. HPLC analysis .....	21
10. MS analysis .....	21
11. Determination of anthocyanins level .....	22
12. Determination of chlorophyll level .....	22
13. DPPH assay .....	23
14. GUS staining .....	23
15. ROS staining .....	23
16. Flavonol staining .....	23
Section 2. Cloning of the genes involved in flavonoid biosynthesis regulation and characterization of transgenic model plants .....	25
1. Cloning of the genes involved in flavonoid biosynthesis regulation .....	25

2. Characterization of transgenic model plants ( <i>AtTTG1-ox</i> , <i>AtPAP1-ox</i> , <i>AtMybD-ox</i> , <i>AtFLS1-ox</i> ) .....	26
Section 3. Characterization of <i>AtMyb7</i> promoter expressed in seed .....	49
Section 4. Gene transformation of <i>Brassica napus</i> .....	50
Section 5. Characterization of transgenic Brassica plants .....	55
1. Characterization of Brassica in terms of flavonoid biosynthesis .....	55
2. Characterization of Brassica <i>BnFLS1-ox</i> plants .....	62
3. Characterization of Brassica <i>AtDFR-ox</i> plants .....	71
Chapter 4. Accomplishment of research goals and contribution .....	76
Section 1. Achievement of research goals .....	76
Section 2. Quantitative achievement .....	76
1. Article publication .....	76
2. Patent registration .....	77
3. Proceedings .....	78
4. Others .....	78
Chapter 5. Application of expansion of research results .....	80
Chapter 6. Science technology knowledge in study course .....	82
Chapter 7. Status of research equipments .....	83
Chapter 8. Laboratory safety execution performances .....	84
Chapter 9. References .....	86



# 목 차

제 1 장 서론 .....	12
제 1 절 연구 개발의 목적 .....	12
제 2 절 연구 개발의 필요성 .....	13
1. 기술적 측면 .....	13
2. 경제, 산업적 측면 .....	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	18
제 1 절 연구 재료 및 방법 .....	18
1. 플라보노이드 합성 조절 유전자 클로닝 .....	18
2. 유용 유전자 식물 발현 벡터 제작 .....	19
3. 모델식물 형질전환 방법 .....	19
4. 유체 조직배양 .....	19
5. 바스타 스트립 테스트 방법 .....	20
6. RT-PCR 분석 방법 .....	20
7. qRT-PCR 분석 방법 .....	20
8. Northern 분석 방법 .....	21
9. HPLC 분석 방법 .....	21
10. MS 분석 방법 .....	21
11. 안토시아닌 추출 및 측정 방법 .....	22
12. 클로로필 함량 측정 방법 .....	22
13. DPPH assay 분석 방법 .....	23
14. GUS 염색 방법 .....	23
15. ROS 염색 방법 .....	23
16. Flavonol 염색 방법 .....	23
제 2 절 플라보노이드 합성 조절 관련 유전자의 클로닝 (cloning)과 모델 식물(에기장대) 형질전환체 특성 규명 .....	25
1. 플라보놀 합성 관련 유전자 클로닝 .....	25
2. 플라보놀 합성 유전자 에기장대 <i>AtTTG1</i> , <i>AtPAP1</i> 및 <i>AtFLS1</i> 에기장대 형질전환	

체 특성 규명 .....	26
제 3 절 종자 발현 프로모터 확보와 특성 규명 .....	49
제 4 절 유체 형질전환 간편화 방법 확립 .....	50
제 5 절 유체 형질전환체 생산 및 특성 규명 .....	55
1. 국내 유체 품종 플라보노이드 합성 특성 규명 .....	55
2. 플라보놀 합성 유전자 유체 BnFLS1 유체 형질전환체 특성 규명 .....	62
3. 안토시아닌 합성 유전자 AtDFR 유체 형질전환체 특성 규명 .....	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	76
제 1 절 연구개발 목표달성도 .....	76
제 2 절 관련분야에의 기여도 .....	76
1. 전문학술지 논문 게재 .....	76
2. 특허 출원/등록 .....	77
3. 학술발표 .....	78
4. 기타(유용유전자, 형질전환체, 품종 등 실적) .....	78
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	80
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	82
제 7 장 연구시설·장비 현황 .....	83
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 .....	84
제 9 장 참고문헌 .....	86

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

- \* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술
- \* 연구성과 목표 대비 실적

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- \* 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- \* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- \* 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- \* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- \* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- \* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- \* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

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

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- \* 연구수행 기간 중 소속 기관의 연구실 안전관리 관련 규정에 따른 이행실적(자체양식)

## 제 9 장 참고문헌

- \* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

## 본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.
- 차. <첨부>자료는 협약 시 연구계획서 별첨으로 제출한 특허, 논문 및 시장분석보고서를 기준으로 연구 완료 후 변동 내용을 작성하시기 바랍니다.

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구 개발의 목적

• 유채의 건강기능성은 여러 문헌에 잘 나와 있으며 특히 그 주된 물질은 폴리페놀로 유채 건조중량 100 그램당 1745.74 mg 정도를 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다 (아래 문헌; Batista et al., 2011). 아래 문헌에서는 유채는 양배추 등과 같은 십자화과의 채소보다 그 항산화능이 높게 나타나는 것으로 보고하고 있다. 이는 우리가 흔히 섭취하는 일상의 채소 및 유제품에서 항산화능이 증가된 품종으로 개량할 경우 더욱 우수한 고부가가치 식품원으로 자리매김이 가능하게 될 것임을 의미한다. 유채유(카놀라유)의 국내 시장규모는 20 억원 규모로 식용유, 올리브유, 포도씨유 등 타 유종에 비해 미미한 수준이나, 건강유로서 기능과 용도적 측면에서 대두유와 옥수수유를 대체하는 제품으로 최근 큰 인기를 모으고 있다. 현재, 카놀라유 시장은 CJ와 동원F&B 등이 경쟁을 벌이고 있으며, 2004 년 이후 시장이 큰 폭으로 성장하고 있다.



• 본 연구는 문헌 조사를 하던 중 아래와 같은 문헌을 보고 기획하게 되었다. 아래 보고와 같이 유채유에는 미량의 플라보노이드가 들어가게 되는데 이러한 유채유를 섭취한 쥐에서 심장 관련 발병의 위험이 줄었다는 내용이다. 따라서, 우리는 유채 작물 자체의 플라보노이드 함량을 높여서 그 결과 추출하게 되는 유채유에 보다 많은 플라보노이드가 함유되게 하고자 하는 목적을 가지고 본 과제를 기획하였다.

[Atherosclerosis](#), 2010 Dec;213(2):422-8. Epub 2010 Jul 15.

**Micronutrient-enriched rapeseed oils reduce cardiovascular disease risk factors in rats fed a high-fat diet.**

[Attorri L](#), [Di Biase A](#), [Di Benedetto R](#), [Rigato P](#), [Di Virgilio A](#), [Salvati S](#).

Department of Public Veterinary Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanit, V. Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy.

[Contemp Clin Trials](#), 2011 Mar;32(2):233-9. Epub 2010 Nov 10.

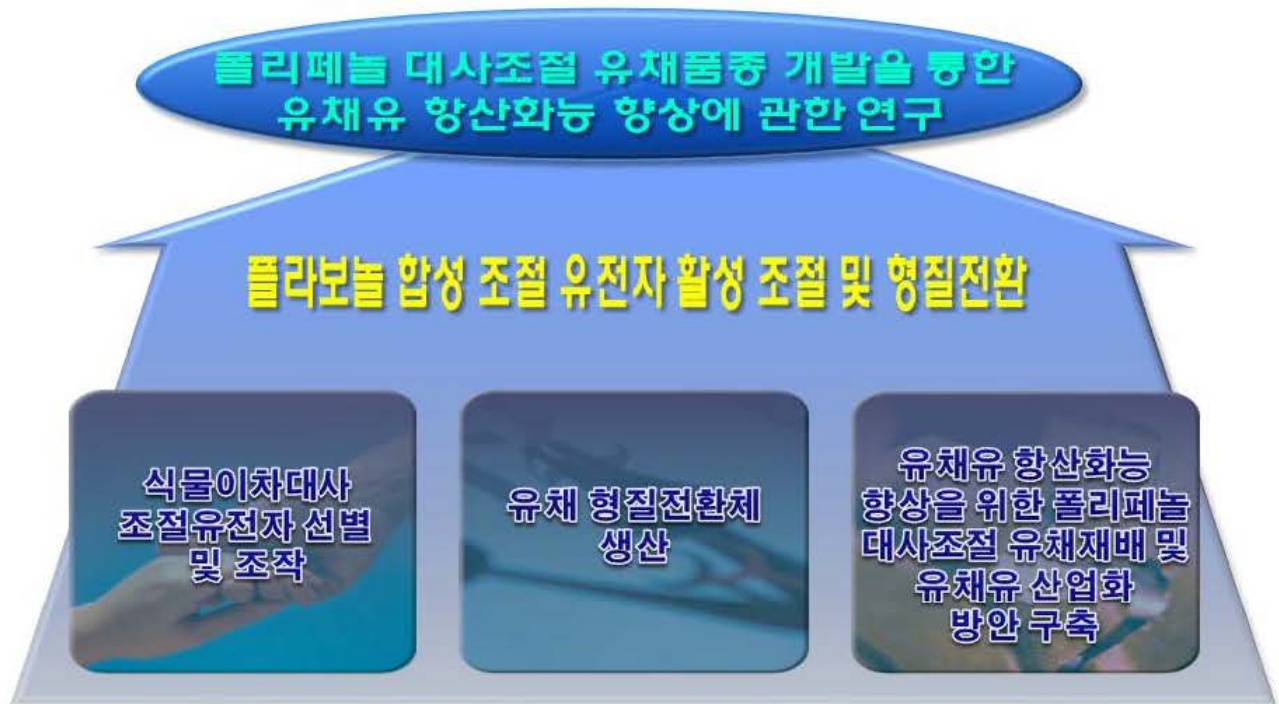
**Preservation of micronutrients during rapeseed oil refining: a tool to optimize the health value of edible vegetable oils? Rationale and design of the Optim'Oils randomized clinical trial.**

[Gladine C](#), [Meunier N](#), [Blot A](#), [Bruchet L](#), [Paqes X](#), [Gaud M](#), [Floter E](#), [Metin Z](#), [Rossignol A](#), [Cano N](#), [Chardigny JM](#).

Clermont Universit, Universit d'Auvergne, Unit de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. cecile.gladine@clermont.inra.fr

• 본 연구의 구체적 목표는 다음과 같다.

1. 식물이차대사 조절유전자의 발굴 및 분자적 기능 규명
2. 식물이차대사 조절유전자의 유채 형질전환체 생산
3. 형질전환 유채의 특성분석을 통한 유채유 향산화능 향상 연구
4. 향산화능 조절을 통한 환경내성 증가 작물로 적용 평가
5. 폴리페놀 대사조절유채품종 향산화능 증진 유채유 산업화 방안 구축



## 제 2 절 연구 개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

• 대부분의 많은 이차대사산물들은 독특한 화학구조를 가지고 있고 상당히 큰 물질들도 있어 유기화학적 방법을 이용하여 합성해내기에는 그 비용 및 기술력에 있어 상당한 애로가 있다. 현재까지 알려진 바로는 약 100,000 종의 이차대사산물이 식물에서 분리되었으나 단지 그 의 50 % 정도만이 구조가 밝혀진 상태임. 화학적 구조의 다양성으로 인해 뚜렷이 이차대사산물을 구분하기는 어려우나 그 합성의 모본 구조에 따라 분리하면 대략 다음의 다섯 가지로 나눌 수 있다; polyketides, isoprenoids (e.g., terpenoids), alkaloids, phenylpropanoids, flavonoids. 지구상에는 대략 400,000 종의 식물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으나 그 중 약 10 % 만이 연구 대상이 되고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 매우 중요한 약리성분의 대부분은 식물에서 추출되어 이용되어 왔으며 어떤 것은 200년 전부터 연구되어 온 것도 있

다. 현재 시중의 일반인에 의해 소비되는 약들 중 약 25 %가 식물 유래인 것으로 알려져 있다. 약 처방전에 따른 식물유래 이차대사산물의 가치는 미화로 3 백억 달러에 이르는 것으로 추정됨 (2002년). 따라서, 이러한 유용 물질의 합성을 증진시키기 위한 생명공학적인 노력이 필요하다.

- 본 연구실에서는 특정 전사조절자의 발현이 환경스트레스에 의해 촉진되며 식물의 플라보노이드 대사에 관여함을 확인하였다. 이러한 유전자들의 식물 이차대사 조절 기전의 분자적 이해는 유용 물질 생산의 원천기술로 개발될 수 있으며 고기능성 작물의 육종에도 이용될 수 있다. 2000년 기록에 의하면 세계 GMO 종자 시장 규모는 전체의 약 10 %에 해당하는 25억 달러이며 2010년 세계 종자 시장 규모는 300억 달러로 추정된다고 하며 그 중 형질전환 작물 종자의 시장 규모 또한 약 250억 달러로 추정된다고 한다. 콩 등의 경우 재배 면적의 거의 90 % 이상이 형질전환종자로 파종되고 있는 실정임. 현재 시장에 나와 있는 GMO의 품목이 제한적이지만 앞으로 그 종자가 다양화 될 것이며 그 개발 속도 및 기술력은 놀라운 수준으로 발전하게 될 것으로 예상된다.

## 2. 경제, 산업적 측면

- 유채는 현재 바이오디젤의 사용으로 인해 각광을 받고 있는 작물 중의 하나임. 유채는 또한 유채유의 식용으로 인해 널리 사용되고 있음. 유채유는 추출과정에 따라 폴리페놀 등의 micronutrient 함량이 달라짐. 항산화능이 높은 micronutrient의 함성량 자체가 증가된 유채 작물을 생산함으로써 고부가가치의 유채유 생산을 목표로 하는 것이 본 과제의 기획의도이다. 유럽 등지에서는 이러한 micronutrient의 함량이 증가된 오일 추출법을 개발하기 위한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 추출법의 개발과 함께 항산화능 자체가 증가된 작물을 개발하는 것 또한 아주 중요한 연구라고 하겠다. 유채는 유채유 추출 후에 그 나머지 조직을 동물의 사료로도 사용이 가능하다. 따라서 유채의 항산화능 향상은 식용으로의 기능성 향상과 함께 동물 사료로서의 사용에도 우수한 자원이 될 수 있다고 하겠다.

- 유채의 건강기능성은 여러 문헌에 잘 나와 있으며 특히 그 주된 물질은 폴리페놀로 유채 건조중량 100 그램당 1745.74 mg 정도를 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다 (아래 문헌; Batista et al., 2011). 이 문헌에서는 유채는 양배추 등의 같은 십자화과의 채소보다 그 항산화능이 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다. 이는 우리가 흔히 섭취하는 일상의 채소 및 유지류에서 항산화능이 증가된 품종으로 개량할 경우 더욱 우수한 고부가가치 식품원으로 자리매김이 가능하게 될 것이다. 유채유(카놀라유)의 국내 시장규모는 20 억원 규모로 식용유, 올리브유, 포도씨유 등 타유종에 비해 미미한 수준이나, 건강유로서 기능과 용도적 측면에서 대두유와 옥수수유를 대체하는 제품으로 최근 큰 인기를 모으고 있다. 현재, 카놀라유 시장은 CJ와 동원F&B 등이 경쟁을 벌이고 있으며, 2004 년 이후 시장이 큰 폭으로 성장하고 있다.

- 화석연료 이용이 폭발적으로 증가함에 따라 지구 온난화 현상이 매우 빠르게 진행되고 있다. 이러한 지구 온난화 현상은 전 세계적인 기상이변을 야기하여 농업생산에 막대한 피해를

입히고 있다. 전 세계적인 식량 생산 증가율보다 인구 증가율이 훨씬 빠르게 증가하고 있다. 국제곡물위원회(IGC)는 2009~2010년 세계 곡물생산량이 2008~2009년(17억 8200 만t)보다 3.4% 줄어든 17억 2100 만t에 그칠 것으로 내다봤다. 육류 소비 증가로 사료용 곡물 수요가 늘어난 중국과 세계적인 곡창지역인 중남미의 자연 재해 등이 주요 원인이다. 현재의 농지면적으로 지구의 인구 포용능력 한계는 70-80 억으로 보고 있는데 이 같은 가정이라면 이미 한계에 달한 수준이다. 세계 육지면적은 약 130 억 ha, 그중 경지면적은 약 14 억 ha인데 근래 거주 시설 수요의 증가와 고급화에 따라 수확면적은 감소 추세에 있으며 단위수확량 증대로 식량 수요증대에 대응해 왔다. 그러나 앞으로 단위수확량은 이처럼 늘어나는 것을 기대 할 수 없어 심각한 문제이다. 또한 아래 기사에서 보는 바와 국외 시장도 국내 시장을 공략하고 있는 실정이다. 캐나다는 전체 생산량의 40 %를 수출해 세계 1위의 카놀라유 수출국으로 전 세계적으로 카놀라유 소비가 증가함에 따라 2015년까지 연간 1500만 톤을 생산할 계획이다. 이러한 점을 감안할 때 보다 고기능성이 아닌 식품들은 추후 자유 경쟁체제에서 국내시장에서조차 그 자리를 유지하기가 힘들 것으로 보인다. 그러나 이러한 내용들을 들여다보면 국내에서 항산화 능이 증가된 새로운 식용유를 생산할 경우 점점 카놀라유에 대한 수요가 급증하고 있는 해외 시장을 대상으로 하여 수출이 가능해지고 그에 따른 산업경쟁력 확보도 가능할 것으로 생각된다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

• 지금까지의 국내외 연구를 살펴보면 식물의 플라보노이드 합성 관련 유전자 자체의 이해를 통한 관련 유전자원 확보와 그의 기능 규명에 초점이 맞추어져 왔다(그림 1). 최근에는 모델식물에서 확보된 유전자의 경제작물로의 도입 연구도 진행되고 있는 단계이다. 그러나 이들 유전자들의 확보는 현재에도 아주 미비한 단계에 있는 실정이며 특히 그 유전자원은 모델식물에서도 아직도 확실히 규명되지 않은 상태로 존재하는 것이 현실이라고 하겠다. 궁극적으로 본 연구실의 선행 연구에서 밝혀진 플라보노이드 생성 경로에 관여하는 밭 유전자들 및 합성 효소의 기능을 보다 다각적으로 규명하고자 하였다. 이를 통하여, 플라보노이드의 합성량을 능동적으로 조절하여 경제적인 부가가치를 확보할 수 있는 작물 개량에 기여하고자 한다.

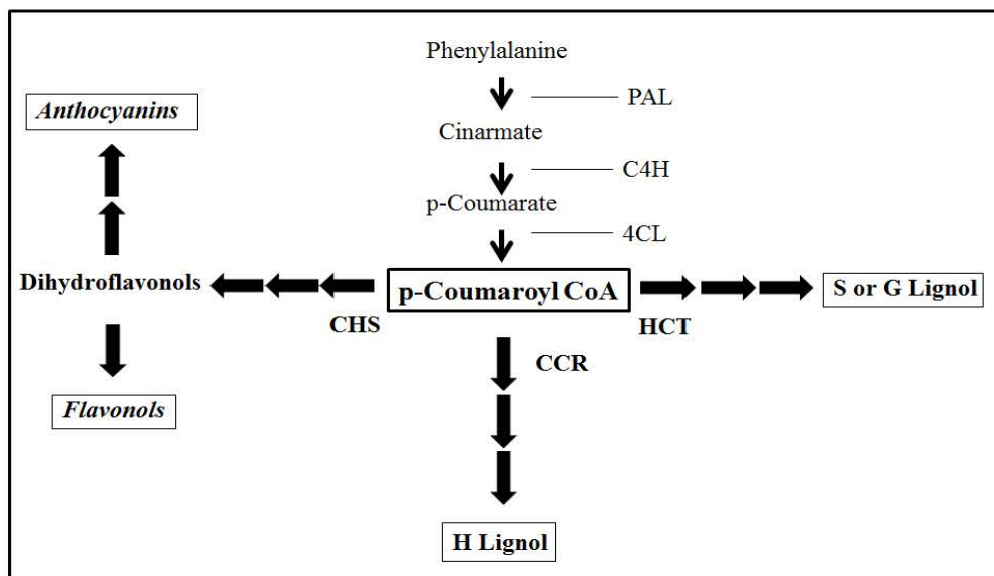


그림 1. 식물의 플라보노이드 생합성 경로

• 유채는 현재 바이오디젤의 사용으로 인해 각광을 받고 있는 작물 중의 하나이다. 유채는 또한 유채유의 식용으로 인해 널리 사용되고 있다. 유채유는 추출과정에 따라 폴리페놀 등의 micronutrient 함량이 달라진다. 항산화능이 높은 micronutrient의 합성량 자체가 증가된 유채 작물을 생산함으로써 고부가가치의 유채유 생산을 목표로 하는 것이 본 과제의 기획의도이다. 유럽 등지에서는 이러한 micronutrient의 함량이 증가된 오일 추출법을 개발하기 위한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 추출법의 개발과 함께 항산화능 자체가 증가된 작물을 개발하는 것 또한 아주 중요한 연구라고 하겠다. 유채유 추출 후에 그 나머지 조직은 유채박이라고 불리는데 이는 동물의 사료로도 사용이 가능하다. 따라서 유채의 항산화능 향상은 식용으로의 기능성 향상과 함께 동물 사료로서의 사용에도 우수한 자원이 될 수 있다고 하겠다.

• 유채의 건강기능성은 여러 문헌에 잘 나와 있으며 특히 그 주된 물질은 폴리페놀로 유채 건조중량 100 그램당 1745.74 mg 정도를 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다 (아래 문헌; Batista et al., 2011). 이 문헌에서는 유채는 양배추 등의 같은 십자화과의 채소보다 그 항산화

능이 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다. 이는 우리가 흔히 섭취하는 일상의 채소 및 유지류에서 항산화능이 증가된 품종으로 개량할 경우 더욱 우수한 고부가가치 식품원으로 자리매김이 가능하게 될 것이다. 유채유(카놀라유)의 국내 시장규모는 20 억원 규모로 식용유, 올리브유, 포도씨유 등 타유종에 비해 미미한 수준이나, 건강유로서 기능과 용도적 측면에서 대두유와 옥수수유를 대체하는 제품으로 최근 큰 인기를 모으고 있다. 현재, 카놀라유 시장은 CJ와 동원F&B 등이 경쟁을 벌이고 있으며, 2004 년 이후 시장이 큰 폭으로 성장하고 있다.

- 캐나다는 전체 생산량의 40%를 수출해 세계 1위의 카놀라유 수출국으로 전 세계적으로 카놀라유 소비가 증가함에 따라 2015년까지 연간 1500만 톤을 생산할 계획이다. 이러한 점을 감안할 때 보다 고기능성이 아닌 식품들은 추후 자유 경쟁체제에서 국내시장에서조차 그 자리를 유지하기가 힘들 것으로 보인다. 그러나 이러한 내용들을 들여다보면 국내에서 항산화능이 증가된 새로운 식용유를 생산할 경우 점점 카놀라유에 대한 수요가 급증하고 있는 해외 시장을 대상으로 하여 수출이 가능해지고 그에 따른 산업경쟁력도 확보가 가능할 것으로 생각된다.

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구 재료 및 방법

### 1. 플라보노이드 합성 조절 유전자 클로닝

플라보노이드 합성에 관여하는 정확한 DNA염기서열을 파악하기 위하여 <https://www.arabidopsis.org/>에서 염기서열과 단백질에 관한 정보를 조사하였다. 얻어진 정보를 근거로 하여 타겟 유전자와 가장 최적의 조건으로 결합을 하는 primer를 제작하였다. primer의 양쪽 말단에는 앞으로 cloning에 사용하고자 하는 vector에 존재하는 enzyme site를 고려하여, 그에 따른 염기서열을 첨가함으로써 digestion 및 ligation에 용이하도록 하였다. 이때, 중복되는 enzyme site가 타겟 유전자의 염기서열 내부에 존재 하는지 여부를 확인하여 원하는 서열 외에 다른 곳에서 유전자가 절단되지 않도록 한다. 이렇게 완성된 primer를 이용하여 PCR(4배)실시 하였고, 얻어진 PCR 산물을 agarose gel elution하여 선형의 entry vector 와 ligation을 진행하고 4도, o/n을 하였다. ligation이 완료되면 vector를 E-coli hitcell에 넣는 hit shock transformation 방법을 사용하였다. 형질전환 후, 사용한 entry vector에 존재하는 항생제가 포함된 bacto agar배지에 vector를 spreading하여 37도, o/n한다. 타겟유전자를 포함한 vector들이 성장하여 colony가 형성되고, 각각의 colony에 번호를 붙여 항생제 LB 배지에 접종하여 37 도, shaker에 넣고 colony를 증폭시킨다(o/n). PCR 과정에서 발생할 수 있는 염기서열의 돌연변이 유/무를 파악하기 위해 ‘코스모진텍’ 회사에 염기서열 시퀀싱을 의뢰하여 100% 올바른 colony만을 선별하여 -80도 냉동고에 영구 보관이 가능하도록 50%글리세롤과 1:1비율로 섞어 cell stock을 저장해 둔다.

이렇게 확인된 entry vector colony와 destination vector를 각각 항생제 LB액체 배지에 키운 후(37도, o/n), miniperb방법을 이용하여 각각 cell에서 vector를 빼낸다. 이전에 선별한 enzyme site를 제한 효소로 각각 절단하고, gel에 loading하여 electrophoresis를 진행한다. digestion결과에 합당한 위치에 존재하는 타겟유전자와 vector를 molecularporous membrane tubing(SPECTAR/POR)이라는 합성비닐을 이용하여 gel에서 분리해 낸다.

분리해낸 타겟 유전자와 destination vector를 T4-ligation(16도,o/n)한다. ligation된 destination vector를 E-coli hitcell에 넣는데 20분 ice, 1분 42도, 다시 20분 ice에 반응을 진행하는 정석방식을 따른다. destination vector에 존재하는 항생제 배지에 spreading 하여 살아남아 성장한 colony에 각각 번호를 붙이고 다시 액체 LB 배지에 증폭시킨다. 이 후, 각각의 colony에서 vector를 꺼내어 PCR과 digestion을 통해 타겟 유전자가 실제로 vector에 올바르게 클로닝이 되었는지 최종적으로 확인한다. 확인된 destination vector cell을 electroporation방식을 통하여 agrobacterium tumefaciens내로 형질전환 한다. 이 agro를 500 ml LB배지에 키운 후, silwet을 이용하여 정상 Col-0에 floral dropping을 진행한다. 암실에서 하루를 키운 후 빛 조건에서 종자를 맺을 때까지 성장시킨다. 이렇게 3세대의 종자를 얻으면 비로소 원하는 homo 타겟 유전

자가 존재하는 종자를 얻을 수 있다. 이 때 여러 selection 단계를 거쳐 실제로 타겟 유전자가 형질전환 되었는지 확인한다.

## 2. 유용 유전자 식물 발현 벡터 제작

유용 단백질 유전자에 대한 정확한 DNA 염기서열 정보를 얻기 위하여, 'NCBI', 'TAIR'의 DNA와 단백질의 서열 정보를 조사한다. 얻어진 단백질 정보와 DNA 염기서열을 토대로 primer를 제작한다. primer 양쪽 말단에 앞으로 실험에 사용하고자 하는 벡터 내에 존재하는 enzyme site에 맞는 염기서열을 첨가한다. 완성된 primer를 이용하여 PCR을 실시하고, 각각의 PCR 산물과 vector를 제한효소로 절단한다. 이후에 agarose gel elution을 통하여 원하는 유전자와 vector를 gel로부터 분리해 빼낸다. 정제 산물은 T4 DNA ligase를 이용하여 4도, o/n을 진행한다. ligation 산물 중 일부를 E-Coli hitcell에 형질전환 한 후, 항생제 배지에 spreading하여 생성된 colony에 각각 번호를 붙인다. colony를 항생제 LB배지에 하루를 다시 키워 증폭시킨 후, PCR과정에서 발생할 수 있는 돌연변이 여부를 정확히 파악하기 위해 '코스모진텍'에 시퀀싱을 의뢰한다. 100% 염기서열이 일치하는 colony만을 선별하여 vector를 miniperb하여 추출한 후 destination vector에 subcloning한다. 완성된 vector를 agrobacterium tumefaciens 내로 형질전환 한다. 형질전환시 전기 충격에 의한 electroporation 방식을 이용한다.

## 3. 모델식물 형질전환 방법

유전자 클로닝을 통해 완성된 vector를 포함하는 agrobacterium tumefaciens를 5ml 항생제 LB배지에 접종하여 하루 동안 30도 shaker에서 증폭시킨다. 다음 날 500ml LB배지에 이전에 접종하였던 5ml의 배지를 붓고, 다시 하루를 같은 조건에서 더 키운다. 500ml bottle에 모두 옮겨 담은 후, 'HITACH CENTRIFUGE'를 5000rpm, 10분 이용하여 cell down시킨다. centrifuge가 끝난 후 상등액을 버리면 밑에 cell이 병 내부에 부착되어 있는 것을 확인할 수 있다. 여기에 silwet이 포함된 MS배지를 담아 cell을 풀어준다. 완성된 용액에 식물의 봉우리 1분 동안 담근다. 식물을 암실에 하루 동안 화분을 놓아서 보관한다. 다음날 다시 보통조건에서 식물을 키워 종자를 획득한다. 획득한 종자를 다시 심어 3세대까지 여러 selection 단계를 거쳐 homo인 종자를 선별해 낸다.

## 4. 유체 조직배양

종자를 소독하기 위해 70% EtOH에 넣고 3분 동안 흔들여 준 후 1분 동안 sodium hypochlorite 용액에 넣어 흔들여준다. 이러한 용액을 씻어내기 위해 증류수를 넣고 3분 동안 6번 씻어준다. 설탕 20g/L, phytigel 4g/L, pH5.8의 Murashige and Skoog(MS) 배지에서 발아를 시킨다. 이때, 성장조건은 23℃이며 16h 빛 조건 / 8h 암 조건의 주기에서 자란다. 떡잎과 배축은 4~5일차의 식물에서로부터 잘라서 얻는다. 이렇게 잘려진 식물은 설탕 2%, 0.4%(w/v) phytigel, pH5.8, BAP 4.0mg/L, NAA 0.05mg/L의 MS 배지에 조직배양을 한다. 새로 잘라서 넣은 식물로부터 7-10일 안에 callus 발생이 일어나고 2-3주 안에 줄기를 얻을 수 있다. 증식된 adventitious shoots는 30일 후에 캘러스로부터 조심스럽게 잘라서 설탕 0g/L, phytigel

4g/L, pH5.8, 4.0mg/L, NAA 0.05mg/L의 MS 배지로 옮겨서 키운다. 그리고 식물의 뿌리를 얻기 위해서 NAA 0.1mg/L, sucrose 10g/L, pH5.8을 포함한 MS배지에서 키운다.

### 5. 바스타 스트립 테스트 방법

Basta strip test는 빠르게 형질 전환 식물과 Basta 저항성 유전자를 확인할 수 있는 방법이다. 어리고 green 조직을 가진 형질 전환 식물(50mg)을 채취해 e-tube에 넣고 막자를 넣어서 갈아준다. basta strip에 증류수에 5-15 분 동안 처리 후 결과를 읽는다. 형질전환체는 2 밴드가 나타나고 비형질전환체는 1 밴드가 나타난다.

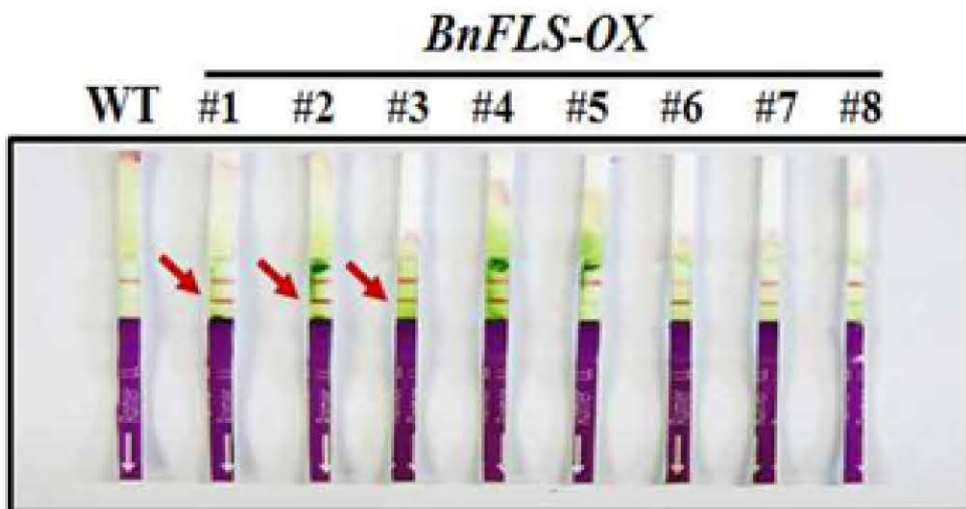


그림 2. Basta strip 분석 결과

### 6. RT-PCR 분석 방법

HEAT BLOCK을 70도에 맞추고 ice를 준비한다. RNA: 5 $\mu$ , 10mM oligo dT:1 $\mu$ 를 DEPC처리한 튜브에 넣는다. 70도에서 10분 동안 heating하면 RNA가 denaturation된다. 5배 first strand buffer: 4 $\mu$ , 10 mM 우세(RNA용): 2  $\mu$ , Rnase inhibitor: 1 $\mu$ , Reverse transcriptase: 1 $\mu$ , DW: 6  $\mu$ 를 Mixture로 만들어 14 $\mu$ 를 넣어준다. 이 때 Housekeeping gene으로 Actin8의 PCR도 함께 진행한다. 42도에서 1시간동안 incubation한다. 200 $\mu$ 의 DW를 넣고 RT-PCR시 소량을 덜어 사용하게 된다. RT-PCR시에는 SP-Buffer: 1 $\mu$ , DW: 4.8 $\mu$ , dNTP: 1 $\mu$ , primer F: 1 $\mu$ , primer R: 1  $\mu$ , SP tag: 0.2 $\mu$ 넣고, cDNA template: 1 $\mu$ 넣는다. 94도에서 15초, 57도에서 30초, 72도에서 30초를 25cycle반복 반응 시킨다.

### 7. qRT-PCR 분석 방법

에바그린: 10 $\mu$ , DW: 3 $\mu$ , primer F: 1 $\mu$ , primer R: 1 $\mu$ , cDNA: 5 $\mu$ 를 'BIO-RAD'의 qRT용 PCR tube에 넣는다. 이 때 Housekeeping gene으로 Actin2의 PCR도 함께 진행한다. 'BIO-RAD'의

qRT기계에 tube를 꽂고 컴퓨터에서 프로그램을 실행 시킨다. 'QUIK PLATE-96 WELLS-SYBR ONLY PLTD'파일을 실행하고 기계를 작동시킨다. PCR이 완료되면 정량화된 데이터를 엑셀파일을 이용하여 그래프화 시킨다.

## 8. Northern 분석 방법

형질 전환된 식물로부터 생성되는 RNA를 모두 추출하기 위하여, 식물을 50mg sampling하여 액체 질소에 급속 동결 시킨 후, 막자와 막자사발을 이용하여 가루상태로 마쇄해준다. Trizol을 1000 $\mu$ 넣고, 강하게 10분 동안 vortexing시킨 후, 실온에서 20분 동안 보관한다. 원심분리를 하여 상등액의 60%만을 추출하여 gDNA의 오염을 최소화한다. 추출한 상등액과 동일한 양의 isopropanol을 첨가하여 RNA의 침전을 실시하였다. 얻어진 10 $\mu$ g의 RNA를 denaturing formaldehyde gel 상에서 분리하고, nitrocellulose membrane 상으로 blotting을 한다. UV를 조사하여 cross linking을 실시하고, 각각의 유전자에 특이적인 probe를 사용하여 65도에서 16시간 동안 hybridization을 수행한다. 2회의 washing과정을 거친 후, membrane을 X-ray에 노출한다. Blocking buffer를 처리한 후 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin을 membrane상의 probe에 link되어 있는 biotin에 결합시킨다. 끝으로 CDP-Star Ready to Use substrate용액과 반응 시키고 결과를 확인 한다.

## 9. HPLC 분석방법

컴퓨터와 HPLC의 전원을 켜다. (사용하는 Coulomb : 4.6 × 150mm C<sub>18</sub> 5 $\mu$ m column) Autochro 프로그램을 실행시킨다. Acetonitrile과 water의 6:4 혼합 이동상을 0.2mL/min씩 올리면서 1.8mL/min으로 만들어 준다. 이때 flow rate를 올린 후 압력이 안정화 되는 것을 확인한다. 1.8mL/min에서 40분 정도 이동상을 흘려보내 장비 안에 남아있을 수 있는 불순물 및 bubble을 제거한다. 분석하고자 하는 시료(Benzene, Toluene, p-Xylene)의 표준용액을 적어도 3가지 이상 만든다(ex. 200ppm, 400ppm, 600ppm). 측정하고자 하는 sample을 injection하기 전에 flow line에 Bubble을 확인한 후 injection한다. (Dead time 측정 : Acetone을 이동상에 희석하여 측정한다.) Data를 수집해서 결과를 얻는다. Flow rate를 처음과 반대로 단계적으로 0까지 내린 다음 HPLC와 컴퓨터의 전원을 끈다.

## 10. MS 분석방법

대략 20mg의 arabidopsis thaliana wild type(col-0)와 FLS1-OX #5 samples를 작은 조각으로 자른 후 10ml 메탄올을 처리하여 30분동안 ultrasonic extraction을 처리해 준다. 추출 후에 그 샘플들의 0.2  $\mu$ m을 취하여 membrane filter로 정제 해 준다. 정제 된 샘플들을 Acquity ultra-performance liquid chromatography system (Waters, Millford, MA, USA) 와 Micromass Q-ToF Micro mass spectrometer (Waters, Manchester, UK)를 사용하여 분석한다. Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 × 100 mm, 1.7  $\mu$ m)은 크로마토그래피 분리를 할 때 사용한다. 유동상은 용매A (0.1% formic acid in water) 와 용매B (0.1% formic acid in

acetonitrile)로 구성되어 있다. 용리의 시작은 10%의 용매B로 진행 한다. 용매 B의 비율은 3분 동안 0부터 13 %까지 직선적으로 증가시키고, 12분 동안 13%로 유지하고, 12분~17분 동안 다시 직선적으로 100 %까지 증가시키고, 19분 30초 동안 100%의 비율을 유지한다. 바로 초기 비율(10 % B)로 돌아가고 2분 50초 동안 유지시켜 컬럼이 재평형을 이루도록 한다.

흐름 속도는 0.3 ml/min, 샘플 주입은 2  $\mu$ l로 한다. 컬럼과 샘플 관리는 각각 35°C and 15°C로 유지된다. mass spectrometer는 음전하 모드에서 작동 되고, 최적의 MS조건은 다음과 같다. 모세관 전압: 2800V, cone전압: 70V, source 온도: 100 °C, 용해 온도: 300°C, cone 기체 흐름 속도: 20 l/h, 용해 기체 흐름 속도: 800 l/h. 정확한 질량측정과 재생력을 확인하기 위해, 농도: 500 pg/ $\mu$ l, 흐름 속도: 3  $\mu$ l/min의 참조 lock-mass화합물인 류신-엔케팔린을 사용한다. flavonol glycosides의 확인은 용출 시간과 질량 분석계의 조각 패턴을 Besseau et al. (2007)22의 자료와 비교하여 진행한다. flavonol glycosides의 양적인 측정은 추출액의 3배를 하여 분석하고, 345 nm에서 흡광도를 측정한다. 캄페롤과 케르세틴은 각각 kaempferol glycosides과 quercetin glycosides의 표준물질로 사용된다.

## 11. 안토시아닌 추출 및 측정 방법

유채 종자 200 mg에 1 % 염산 함유 증류수 1 $\ell$ 를 첨가한 후 저온 (4°C) 압조건 하에서 24시간 추출하여 추출물을 획득한다. 이때 추출방법은 종자 유채 종자 200 mg을 액체 질소로 얼려 잘게 분쇄하여 샘플링한 후, (45 ml methanol/450  $\mu$ M HCl)을 300  $\mu$ l 처리하여 4°C 압조건에서 overnight시킨다. 그 후 (200  $\mu$ l water/ 500  $\mu$ l chloroform)를 넣고 원심분리하여 종자의 안토시아닌을 추출한다. 추출물로부터 안토시아닌 분획을 얻기 위하여 6cc C18 Sep-Pak SPE 카트릿지 (Waters Co. USA)를 사용한다. C18 Sep-Pak SPE 카트릿지에 30ml의 추출용액을 흡착시킨 후 증류수 및 10 % 메탄올 용액 각 10ml로 세척하고, 다시 메탄올 10ml로 용출 분획하여 유채 종자 안토시아닌 분획을 회수한다. 분획 회수된 안토시아닌 분획을 감압 농축하고 질소충전 하에 -4°C에 보관하고 증류수로 희석하여 RP-HPLC/DAD/MS를 이용한 분석과 생리 활성 검정에 사용한다.

안토시아닌 분획에서의 안토시아닌 종류를 확인하고 정성적 평가를 위하여 RP-HPLC/DAD/MS를 이용한다. LC/MS 기기는 Agilent 1200 HPLC 및 6110 Quadrupole LC/MS system (Agilent, Waldbronn, Germany)를 사용하며, 고정상은 YMC-Pack pro C18 RS (150  $\times$  2.0 mm I.D., S-3  $\mu$ m, 8 nm, Japan), 이동상은 1% formate-H<sub>2</sub>O와 1% formate-CAN을 80 : 20 (isocratic)의 비율로 조합하여 사용하고 컬럼 온도는 30°C, 유속은 0.3 ml/min로 일정하게 조정한다. DAD wavelength는 530nm로 하여 검출하였으며 시료 도입량은 5  $\mu$ l, 이온화 는 ESI positive-ion mode를 사용하고 mass range는 50-1,000 m/z, gas temperature는 350°C, Drying gas는 분당 10 ml로 한다.

## 12. 클로로필 함량 측정 방법

식물 샘플을 유리 tube에 넣고 아세톤을 800  $\mu$ l를 넣는다. 암실에서 약 2시간 동안 보관하거

나 4도에서 하루 동안 보관한다. Spectrophotometer로 647 nm, 664 nm에서 흡광도를 측정한다. [www.csulb.edu/~bruss](http://www.csulb.edu/~bruss) 사이트에 들어가서 template를 다운 받아 chlorophyll의 양을 계산한다. 결과는 Chl/mg fresh weight으로 계산 되고, 모든 값은 1 ml을 기준으로 입력한다.

### 13. DPPH assay 분석 방법

Test tube를 12개 준비한다. Test tube에 샘플을 넣는다. 실온에서 10 분간 방치한다. 증류수를 대조로, 517 nm에서 흡광도를 측정한다. Control의 흡광도에 대하여 저해율(%)을 계산한다. (최대 저해율이 60~70 %가 되도록 희석 또는 증량해서 다시 측정한다). IC50에 해당하는 시료의 농도를 계산한다. 항산화제인 ascorbic acid 및 BHT를 이용하여 동일하게 측정한 후 IC50을 비교한다.

※ 저해율 계산법

저해율 (%) =

$$\left[ \frac{\text{Abs}(\text{control}) - \text{Abs}(\text{sample})}{\text{Abs}(\text{control})} \right] \times 100$$

( Abs<sub>sample</sub> = Abs<sub>test</sub> - Abs<sub>color</sub> )

### 14. GUS 염색 방법

0.1 M NaPO<sub>4</sub> (pH7), 10 mM EDTA (pH8), 0.5 mM K Ferricyanide (pH7), 0.5 mM K Ferrocyanide (pH7), 1.0 mM X-Glucuronide, 0.1 % Triton X-100로 구성된 GUS Solution을 만든다. GUS Solution에 염색할 식물을 담고 37도에서 30분~1시간정도 보관한다. 이 때 잎이 끝까지 잠기도록 용액에 잘 넣는다. solution에서 식물을 꺼내서 70% ethanol에 담가 72도에 1 시간정도 heating한다. 이 때 30분마다 튜브를 inverting해준다. 식물의 초록색이 모두 빠져 나갈 때까지 ethanol을 교환해 준다. GUS staining의 색만 남은 식물을 2% agar배지에 펴서 관찰 한다. 쓰고 남은 GUS 용액은 -20도에 보관하여 다시 재활용할 수 있다.

### 15. ROS 염색 방법

Seedlings을 PBT에 잘 씻는다. 이 때 plate와 rotary shaker를 사용한다. Seedlings을 0.3mg DAB/1ml PBT에 10분간 incubation한다. color reaction을 각 튜브에 1 $\mu$ l씩 넣고 약하게 shaking한다. 반응을 정지시키기 위해 DAB가 들어 있는 PBT로 용액을 갈아준다. PBT에서 5 분 동안 2번씩 샘플을 washing한다. 100 % MeOH에 샘플을 넣어 Chlorophyll을 빼서 보관한다. 2 % Agar 배지에 샘플을 잘 펴서 관찰한다.

### 16. Flavonol 염색 방법

사용 전에 48시간 동안 잘 섞어 주면서 준비한다. 5일차 정도의 seedling에 solution을 처리 한 후 실온에서 5분 동안 centrifuge를 실행한다. solution을 제거하고 DW를 넣어 2분 동안 둔다. 3번 반복하여 완벽히 washing해 준다. 형광현미경으로 뿌리 부근에 flavonol의 축적을 관찰 한다. 이때, FITC Filter (excitation 450~490 nm, suppression LP 515 nm)을 사용하면



fluorescent flavonoids, autofluorescent chlorophyll은 적색 sinapate ester는 파란-초록색으로 나타난다. DAPI Filter (excitation 340~380 nm, suppression LP 430 nm)를 사용하면 flavonoid, sinapate ester autofluorescence는 파란색으로 관찰된다.

## 제 2 절 플라보노이드 합성 조절 관련 유전자의 클로닝 (cloning)과 모델 식물(에기장대) 형질전환체 특성 규명

### 1. 플라보놀 합성 관련 유전자 클로닝

• 유채는 현재 전 세계적으로 형질전환체가 매년 급속도로 증가하고 있는 추세이다. 우리는 본 과제에서 기능을 규명한 다양한 유전자를 유채 작물에 형질전환하고자 하였는데 그 성공율을 극대화하기 위하여 아래와 같은 여러 가지의 유전자 발현 벡터를 사용하였다. 아래에 나타낸 벡터 이외에도 *pBII21* 벡터도 함께 사용하였다. *pBII21*의 경우는 카나마이신 항생제에 저항성을 가진 벡터로 유채에서 사용하였을 경우 형질전환체 분리에 많은 애로 사항이 있었다. 따라서, 바스타 제초제 저항성을 가지는 벡터를 이용하여 형질전환을 실시한 결과 훨씬 효율적으로 이루어짐을 알게 되었고 추후 모든 유채의 형질전환체는 바스타 저항성 벡터를 이용하여 수행하게 되었다.

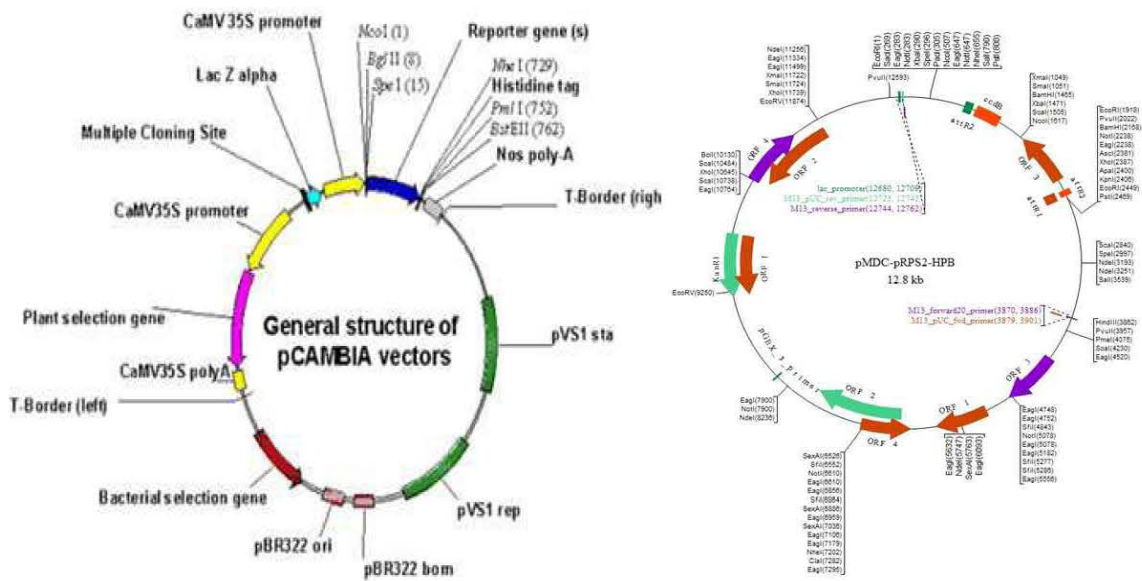


그림 3 . 초기 유채 형질전환에 사용한 벡터의 종류

• 유채 형질전환에 사용한 대표적인 2개의 유전자인 유채 *Flavonol synthase (BnFLS1)*와 에기장대 유전자 *Dihydroflavonol reductase (AtDFR)*의 클로닝 벡터 지도이다. 지도에서 보이는 바와 같이 이들 유전자의 형질전환체는 바스타를 이용하여 성공적으로 분리되었다.

## *BnFLS-pFLAG* and *AtDFR-pHA* construct for *Brassica* transformation

(A)

*BnFLS-pFLAG* for generation of *BnFLS-ox* transgenic plants



(B)

*AtDFR-pHA* for generation of *Brassica napus AtDFR-ox* transgenic plants



LB: left border; RB: right border sequences for *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer.

Bar: the Basta herbicide resistance gene for selection of transgenic plants.

35S: the cauliflower mosaic virus 35S promoter.

HA; FLAG: sequence tags for target proteins.

attR1; attR2: gateway sites for LR reaction.

*BnFLS*: *Brassica napus flavonol synthase* cDNA sequence.

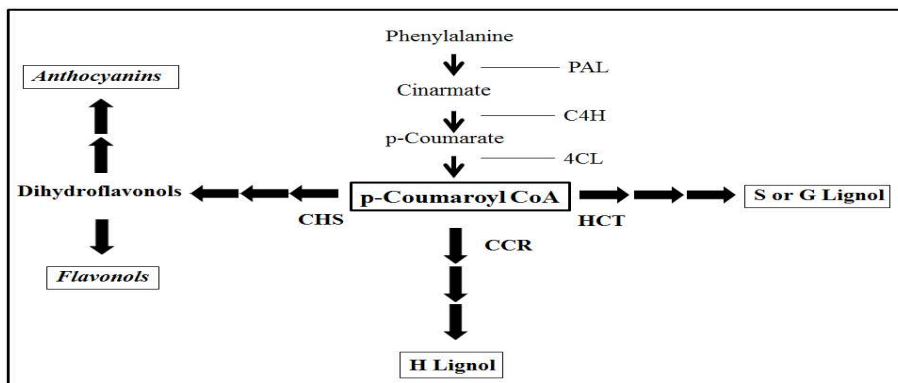
*AtDFR*: *Arabidopsis thaliana dihydroflavonol reductase* cDNA sequence.

OCS: the 3' sequences of the octopine synthase gene, including polyadenylation and presumptive transcription termination sequences.

그림 4. 유체 형질전환에 사용한 유전자의 클로닝 벡터 지도

### 2. 플라보놀 합성 유전자 예기장대 *AtTTG1*, *AtPAP1* 및 *AtFLS1* 예기장대 형질전환체 특성 규명

- 본 연구에서는 아래(그림 5)와 같은 식물의 플라보노이드 합성 경로에 관여하는 다양한 유전자들을 클로닝하고 그 기능을 검증한 다음 유체에 형질전환을 시키고자 하였다. 따라서, 우선적으로 우리가 본 과제에서 기능을 검증한 유전자들에 대한 내용을 먼저 아래에 기술하였다.



## 그림 5. 식물의 플라보노이드 생합성 경로

### (1) *AtTTG1* 예기장대 형질전환체 특성 규명

• 아래 그림과 같이 예기 장대의 TTG1 단백질은 WD 도메인을 가지고 있으며, 원래 이 단백질은 Myb, bHLH 두 단백질과 함께 complex를 형성하여 식물의 플라보노이드 합성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 우리는 이 complex에서 TTG1이라는 유전자만 단독으로 과발현이 될 경우에 플라보노이드 중에서도 특히 플라보놀만 합성하며 안토시아닌의 합성은 감소시킨다는 새로운 결과를 얻게 되었다 (아래 기술). 우리는 본 연구에서 TTG1을 과발현시킬 경우 생겨나는 현상을 식물생리학적 및 분자생물학적 방법을 통하여 상세하게 연구하였다.

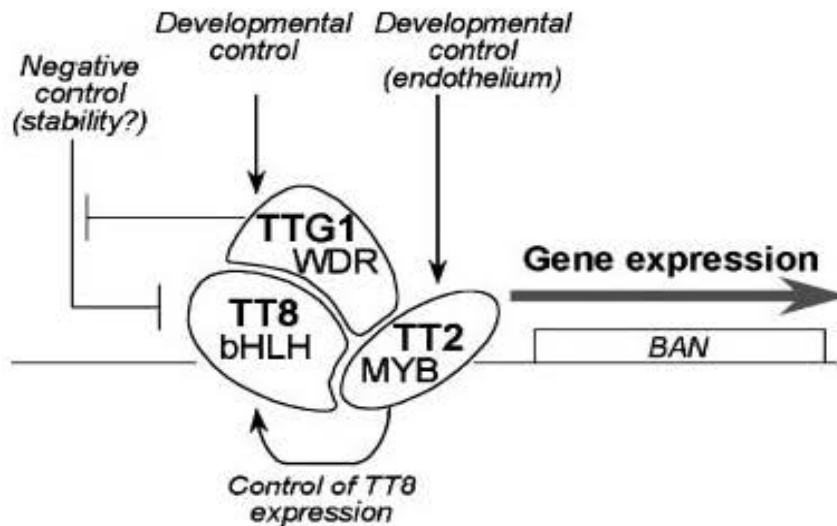


그림 6. 식물의 플라보노이드 합성에 필요한 3 유전자의 컴플렉스 형성 모식도

• 우선 TTG1 유전자를 예기장대에 과발현시켜 플라보노이드의 대사조절이 가능한지를 조사하였다. 이 실험에서 우리가 획득한 과발현체는 10 개 이상으로 그 중에서 TTG1 발현이 현저히 높은 4, 5 번 라인을 선택하여 추후 실험을 진행하였다. 아래 그림 (A)는 RT-PCR (reverse transcription PCR)을 이용하여 TTG1의 transcript양을 측정한 결과이다. 아래 그림 (B)는 10일 *TTG1-OX* (TTG1 과발현체)에서 종피(종자 껍질) 색깔이 변화하는지를 조사한 것이다. 종피에는 주로 proanthocyanin이 많이 축적되는 것으로 알려져 있는데 플라보노이드의 함량 변화 중 제일 먼저 손쉽게 관찰이 가능한 관계로 종피의 색깔을 조사하였다. 그러나 아래 그림 (B)에서 보는 바와 같이 TTG1 과발현은 종피의 색깔에는 그다지 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 더 나아가서, 이번에는 플라보노이드의 또 다른 일종인 안토시아닌의 함량을 조사하기 위하여 안토시아닌을 염색하여 보았다. 이를 위하여 종자에 50  $\mu$ M norflurazon (chlorophyll inhibitor)을 처리하고 엽록소 생성을 억제한 다음에 보라색으로 표현되는 안토시아닌의 염색상을 살펴보았다. 그 결과 아래 (B)와 같이 안토시아닌의 함량은 약간 감소하는 것처럼 나타났다.

•아래 그림 (C)에서는 안토시아닌의 함량을 정량적으로 측정된 결과 정상 개체보다 TTG1-OX 식물에서 안토시아닌의 함량이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이 실험을 위하여 우리는 종자 발아 후 MS 배지에서 4 일간 자란 어린 식물을 사용하였다. *ttg1* 돌연변이보다도 더 적은 함량의 안토시아닌을 합성하는 것으로 보아 TTG1 단백질 하나만 과발현 되고 나머지 TT8, TT2가 정상 양으로 존재할 경우에는 안토시아닌의 합성에는 억제 작용을 초래하는 것으로 결론지을 수 있다.

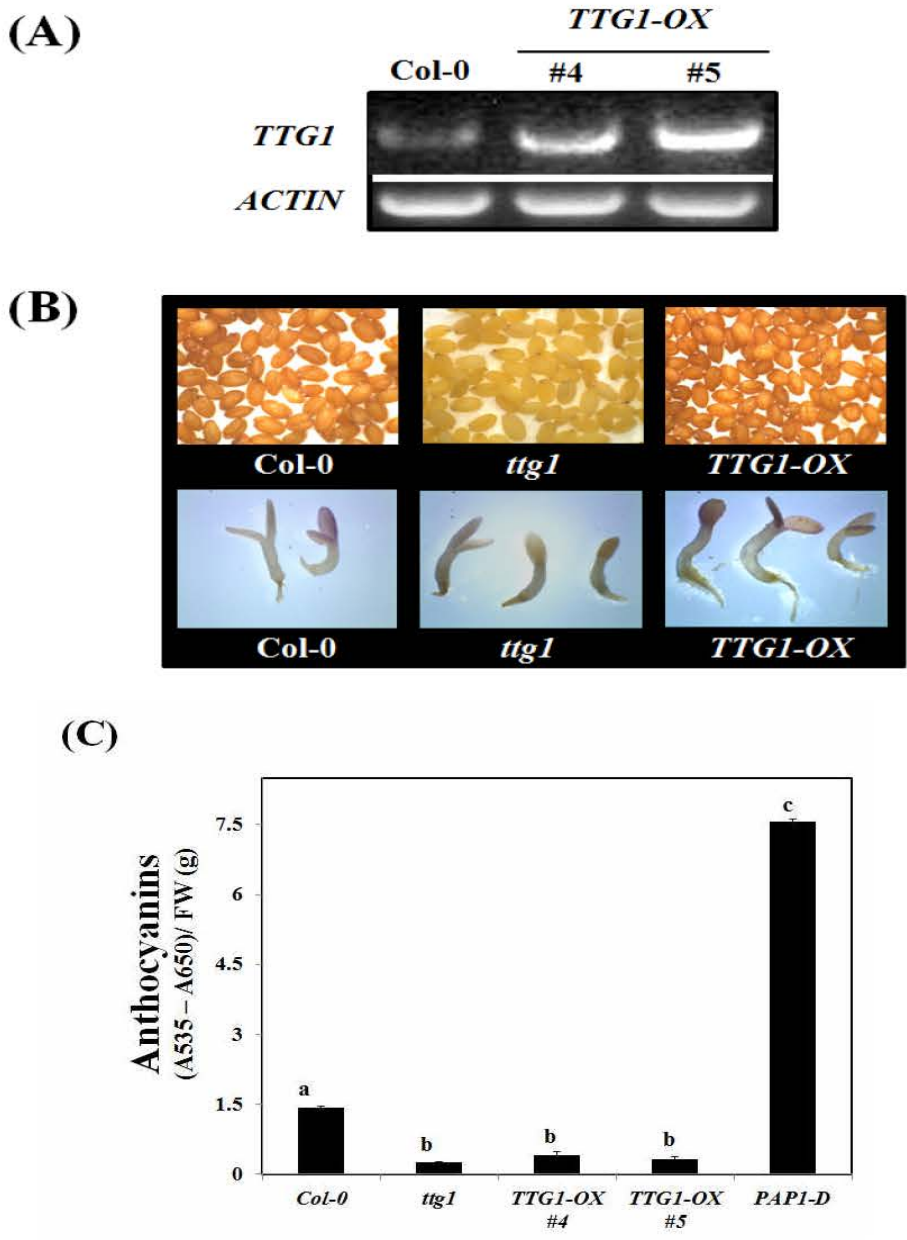


그림 7. AtTTG1의 과발현체 제작과 안토시아닌 함량 분석

• 다음으로 우리는 *TTG1-OX* 식물의 이차대사 관련 유전자들의 발현에는 어떤 변화가 있기에 안토시아닌의 합성이 줄어드는 지를 조사하고자 하였다. 이 실험을 위하여 우리는 종자 발아 후 MS 배지에서 7 일간 자란 어린 식물을 사용하였다. 이를 위하여 RT-PCR을 수행하였

고 아래 그림에서 보는 바와 같이 안토시아닌의 합성으로 진행되는 방향의 유전자는 발현이 줄어든 반면, 플라보놀의 합성 방향으로 가는 유전자의 발현은 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, 우리는 아래 그림 (B)와 같은 가설을 만들게 되었다. 즉, TTG1은 TT2, TT8과 동등한 양으로 존재할 경우 안토시아닌의 합성을 촉진할 수 있지만 TTG1만 존재할 경우에는 TTG1이 TT2, 혹은 TT8과 결합하여 전체 ternary complex를 형성하는 데 문제를 일으킬 수도 있을 것으로 생각된다.

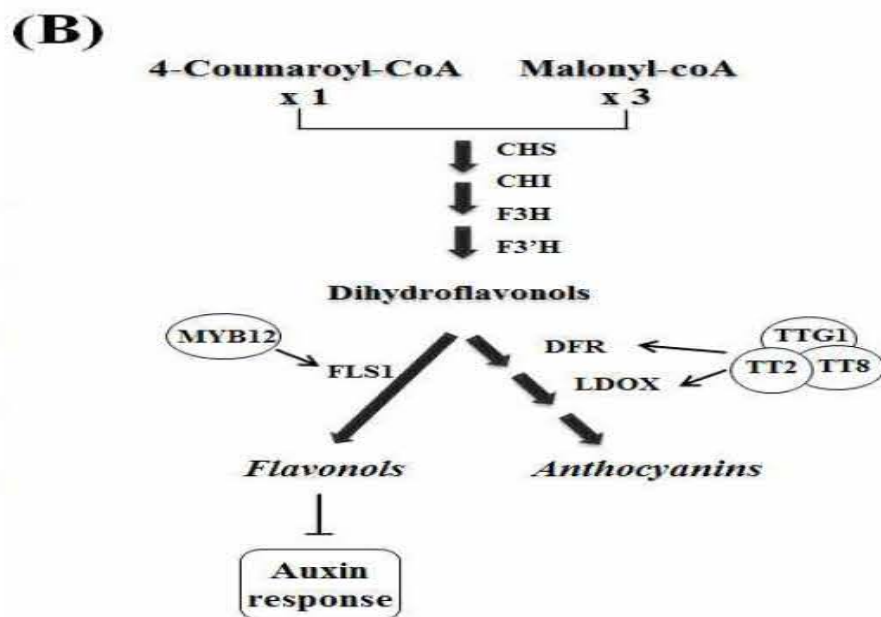
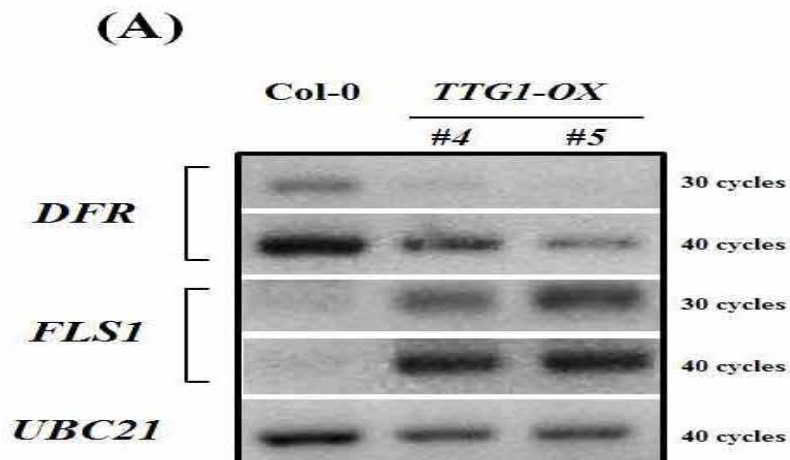


그림 8. TTG1 유전자 과발현에 따른 다른 플라보노이드 합성 유전자들의 발현변화 분석

• 위의 가설을 검증하기 위하여 우리는 이번에는 안토시아닌 대신에 플라보놀의 일종인 kaempferol과 quercetin의 양을 형광현미경을 이용하여 조사하기로 하였다. 플라보놀을 염색하

는 것으로 알려진 DPBA를 처리한 다음에 형광현미경으로 kaempferol과 quercetin의 상대적인 양을 조사하였다. 아래 그림에 보이는 바와 같이 *TTG1-OX* 식물은 뿌리 조직에 상당한 양의 kaempferol과 quercetin을 정상 개체보다 많이 축적하는 것으로 관찰되었다. 이는 우리의 결론이 옳다는 사실을 입증하는 결과라고 하겠다. 아래 실험에서는 플라보노이드를 많이 축적하는 것으로 알려진 *PAP1-D* 식물을 positive control로 사용하였고 *ttg1*과 *tt2* 돌연변이는 negative control로 사용하였다. Col-0 및 Ler은 WT이다.

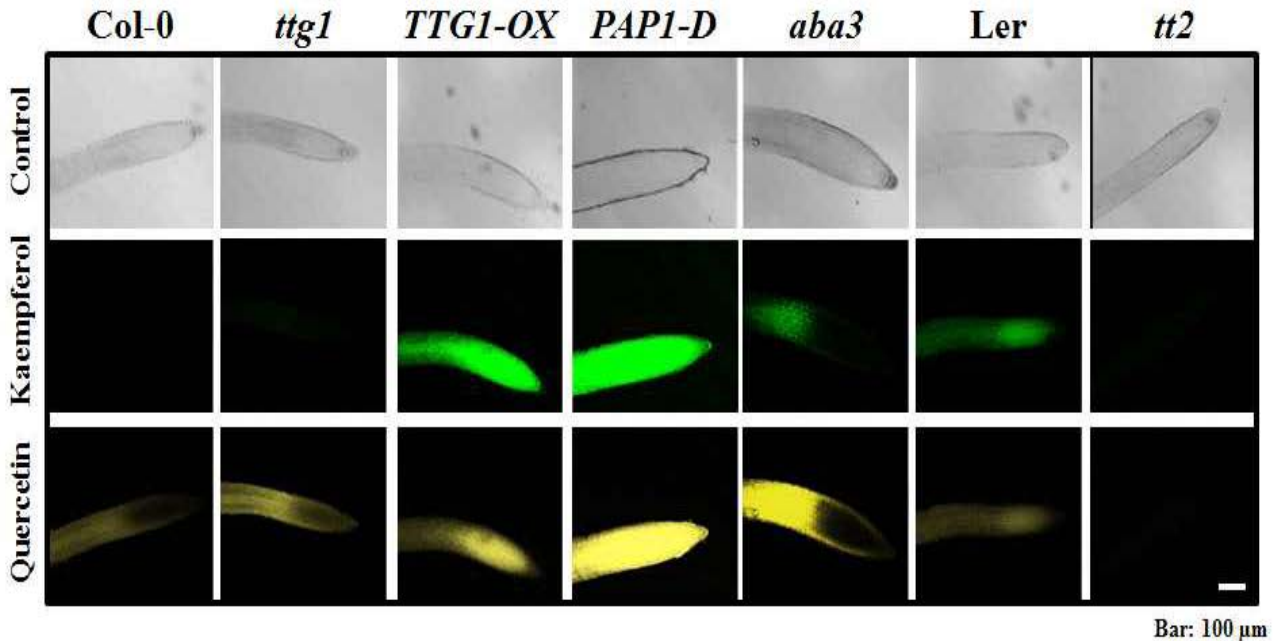


그림 9. *TTG1* 과발현체 뿌리 조직에서의 플라보놀 함량 분석

- 플라보놀은 식물의 뿌리에서 만들어질 경우 옥신의 극성 수송 (polar transport)에 영향을 끼치는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 우리는 *TTG1-OX* 식물에 플라보놀이 많이 축적될 경우 모델식물의 뿌리 발달에 영향을 끼칠 것으로 생각하여 Col-0와 *TTG1-OX* 식물의 뿌리 발달을 관찰하였다. 또한 환경스트레스에 대한 이들의 뿌리 발달을 보기 위하여 ABA와 mannitol (가뭄 스트레스 조건)을 처리하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 *TTG1-OX* 식물에서는 정상 조건뿐만 아니라 ABA 및 mannitol 처리 시에도 정상 개체보다 뿌리가 더 잘 발달되는 것을 볼 수 있었다.

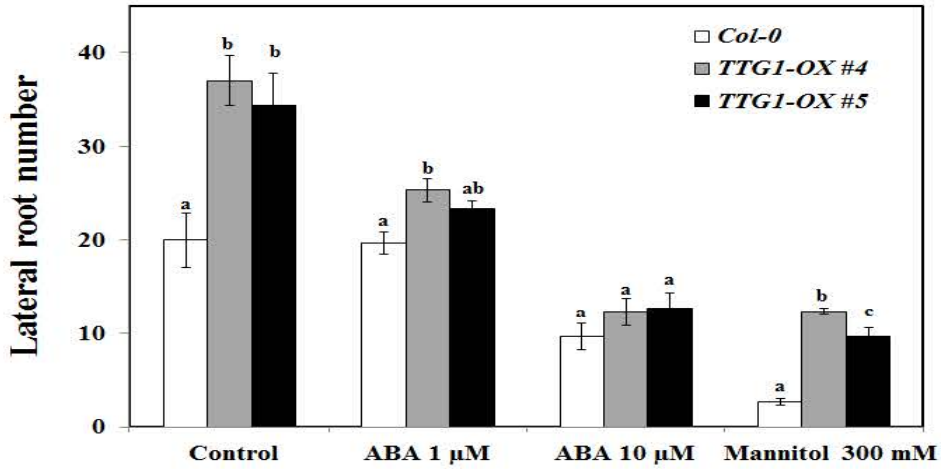
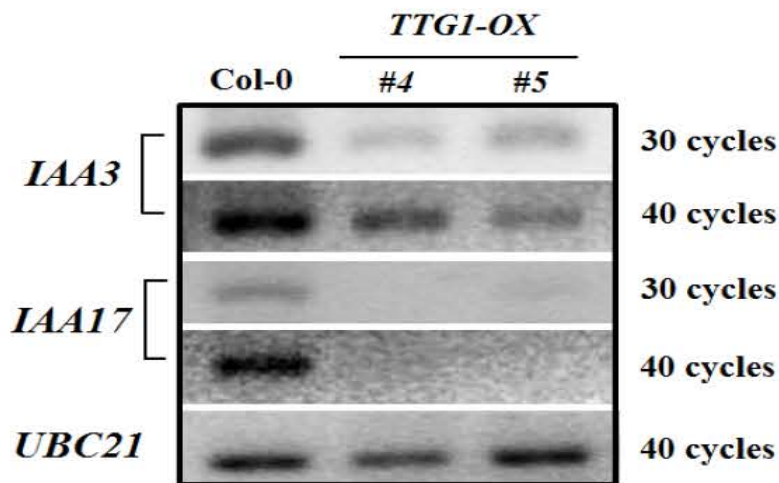


그림 10. TTGI 과발현체의 스트레스 조건하에서의 뿌리 발달 분석

• *TTGI-OX* 식물의 뿌리 발달 향상이 환경스트레스 신호전달에 관여하는 유전자들의 과발현에 의한 것인지를 조사하기 위하여 환경스트레스 신호전달 마커 유전자인 *COR15A* 및 *KIN1* 유전자를 프로브로 하여 RT-PCR을 수행한 결과 아래 그림과 같은 결과를 얻었다. 즉, *COR15A* 및 *KIN1* 유전자는 *TTGI-OX* 식물에서는 거의 발현되지 않는 것으로 볼 때 *TTGI-OX* 식물의 뿌리 발달 향상은 환경스트레스 신호전달과는 무관함을 증명해주는 결과로 보인다.

• 다음으로 우리는 *TTGI-OX* 식물의 뿌리 발달 향상의 원인을 살펴보기 위하여 옥신 신호전달 마커 유전자인 *IAA3* 및 *IAA17* 유전자를 프로브로 하여 RT-PCR을 수행한 결과 아래 그림과 같은 결과를 얻었다. *IAA3* 및 *IAA17* 유전자의 발현이 *TTGI-OX* 식물에서 감소한 것으로 미루어 볼 때 이 식물에서의 플라보놀 과다축적으로 인해 옥신 수송에 문제가 생기게 되고 그 결과 옥신 신호전달에 관여하는 유전자의 발현 이상을 초래하여 뿌리 발달이 향상된 것으로 보인다.





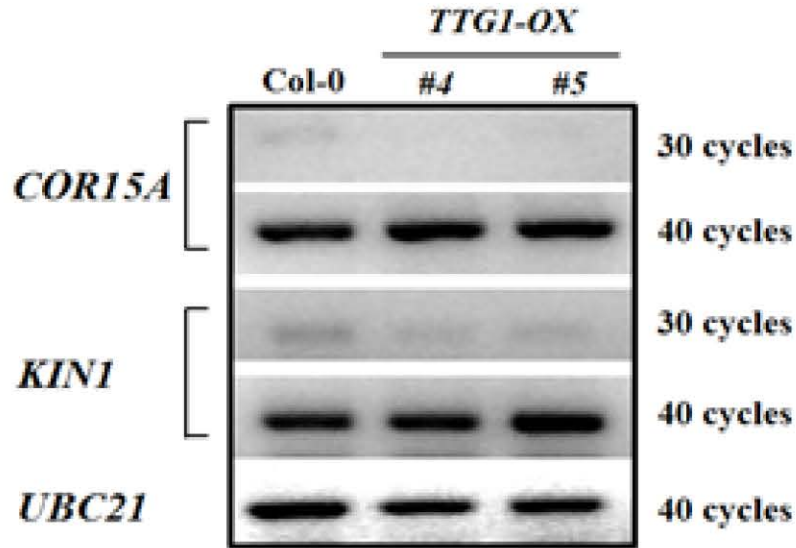


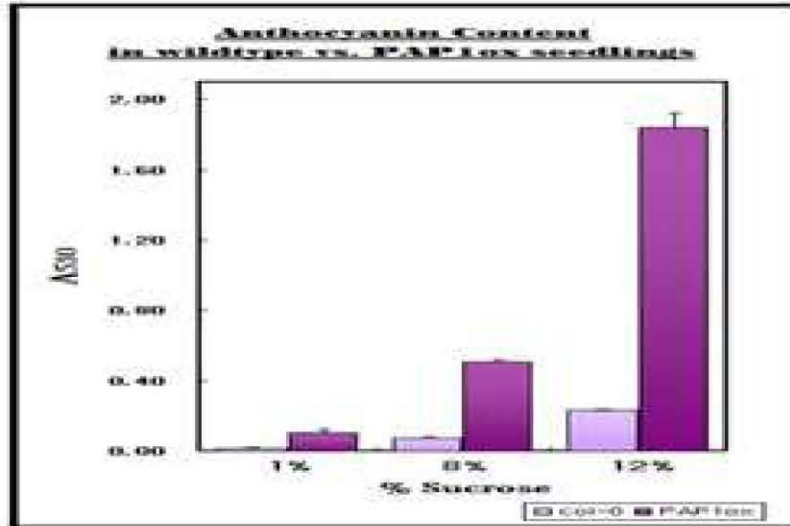
그림 11. TTG1 과발현체의 환경스트레스 신호전달 마커 및 옥신 반응 유전자 발현 분석

- TTG1-OX를 이용한 실험을 통하여 우리는 플라보노이드의 발현에 관여하는 전사조절자의 적절한 발현 조절을 통하여 식물의 이차대사산물 합성경로를 조절가능하다는 것을 증명하였다. 더불어, 식물이 살아가면서 겪게 되는 다양한 환경스트레스에도 그 뿌리 발달이 잘 일어나는 것으로 보아 이러한 유전자들의 효용가치는 식물의 이차대사산물 합성 조절뿐만 아니라 식물의 환경스트레스 저항성 획득에도 일부 기여할 수 있음을 보여주는 사례가 되겠다.

- 따라서 우리는 이러한 연구 결과를 바탕으로 먼저 TTG1 유전자를 유체에 형질전환하기로 결정하였다. 위 유전자의 기능은 특허를 신청하여 등록되었다.

(2) 플라보노이드 고 함유 유전자 P<sub>AP1</sub>의 스트레스 내성 효과 검증

- P<sub>AP1</sub> 유전자는 플라보노이드 합성에 중요한 역할을 하는 전사조절자이다. 이 유전자를 과발현시킨 P<sub>AP1ox</sub> 라인에 수크로스를 전처리한 결과 안토시아닌의 함량이 약 8 배 이상 증가하는 결과를 아래와 같이 얻었다. 이 결과는 수크로스에 의해 플라보노이드의 함량이 상당히 많이 증가할 수 있음을 나타내며, 또한 P<sub>AP1</sub> 이외에도 다수의 인자들이 이 반응에 관여할 것임을 보여준다. 이는 플라보노이드의 함량 변화가 수크로스에 의해 획기적으로 증가할 수 있음을 보여주는 연구결과이다. 또한, 현재까지 알려진 가장 강력한 P<sub>AP1</sub> 유전자가 상시로 과발현되어 있다할지라도 수크로스에 의한 추가 증가가 가능한 나타났기에 P<sub>AP1</sub>이외의 유전자가 이러한 현상에 관여할 것으로 판단되며 본 과제의 결과로 이들 인자의 발굴이 가능할 것으로 판단된다.



% Sucrose Media	col-0		PAP1ox	
	Avg	SD	Avg	SD
1%	0.018	0.002	0.101	0.025
8%	0.073	0.008	0.508	0.016
12%	0.235	0.002	1.841	0.083

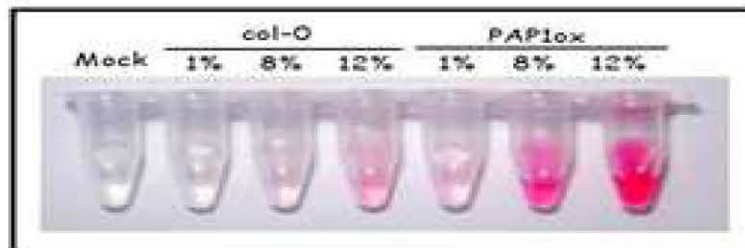


그림 12. *PAP1ox* 개체에서의 수크로스 처리시 안토시아닌 함량 변화 분석

• 플라보노이드에 의한 식물의 스트레스 저항성이 증가하는 지를 검증하기 위하여 우리는 *PAP1ox* 라인을 고염 배지에서 배양해 본 결과 이 라인이 여전히 고염배지에서도 플라보노이드를 많이 합성해낸다는 것을 아래와 같이 확인하였다. *PAP1ox* 라인의 고염 배지에서의 생존율을 조사한 결과 정상 개체에 비하여 2 배나 증가하는 것을 발견하게 되었다. 이러한 결과는 플라보노이드의 적절한 증산은 작물의 항산화능을 증가시켜 각종 스트레스에 대한 내성도 증진시킬 수 있음을 나타내는 중요한 결과라고 볼 수 있다.

## The *PAP1-OX* plants are tolerant to salt stress

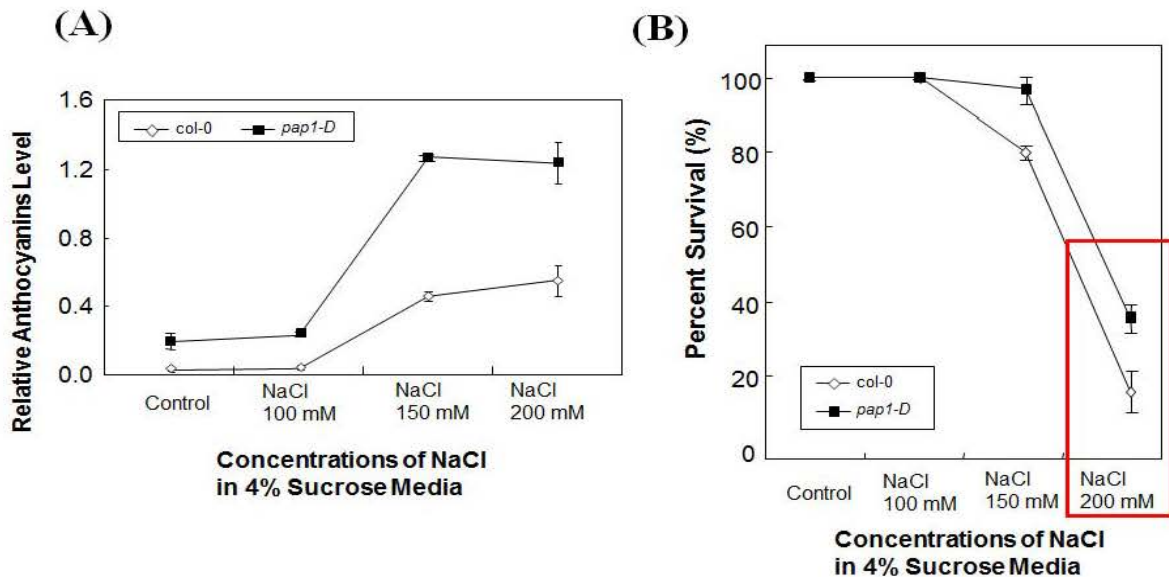


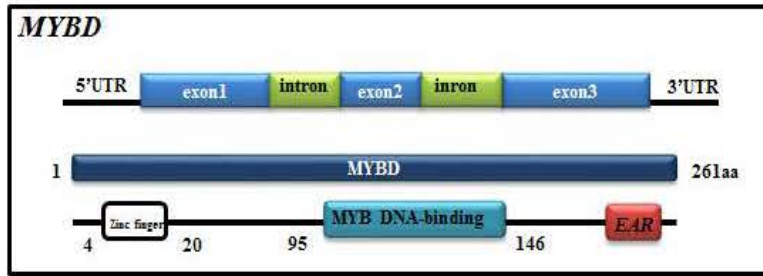
그림 13. *PAP1ox* 개체에서의 고염 내성 분석

### (3) 플라보놀 합성 조절 유전자 *AtMybD* 예기장대 형질전환체 특성 규명

• 우리는 아래와 같이 플라보노이드 합성에 관여하는 새로운 예기장대 밭 유전자를 발굴하게 되었다. 이 유전자의 과발현체에서 아래와 같이 플라보노이드가 콜체로에 비해 훨씬 더 많이 합성됨을 확인하였다. 아래에 보이는 *AtMybD* 유전자는 현재 본 랩에서 연구되는 다른 밭 유전자와 상호작용하는 것으로 밝혀졌는데 그 과발현체의 형질을 조사하던 중 우리는 이 유전자가 플라보노이드 합성의 **positive regulator**임을 알게 되었다. 또한, 이들 과발현체를 토양에서 키울 경우에도 콜체로에 비하여 더 많은 안토시아닌이 축적됨을 육안으로 확인하였다.

• *AtMybD* 유전자는 Myb 도메인이 하나만 존재하며 전사조절자에 존재할 경우 타겟 유전자 발현의 **negative regulator**로 존재하는 **EAR motif**를 가지고 있는 것으로 나타났다. 이는 추후의 실험 결과에도 나타나듯이 *AtMybD*가 플라보노이드 합성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 드러났다. 아래 그림 B에서는 *AtMybD*의 세포 내 존재 기관을 조사하기 위하여 이 유전자에 리포터 유전자인 GFP를 융합하여 만든 construct로 형질전환된 식물의 뿌리털 세포를 보여주고 있다. 선명한 초록색의 형광이 핵에 존재하는 것으로 미루어 *AtMybD*는 핵에 존재하는 단백질이며 전사조절자로 작동하기에 충분하다는 결론을 얻게 되었다.

(A)



(B)

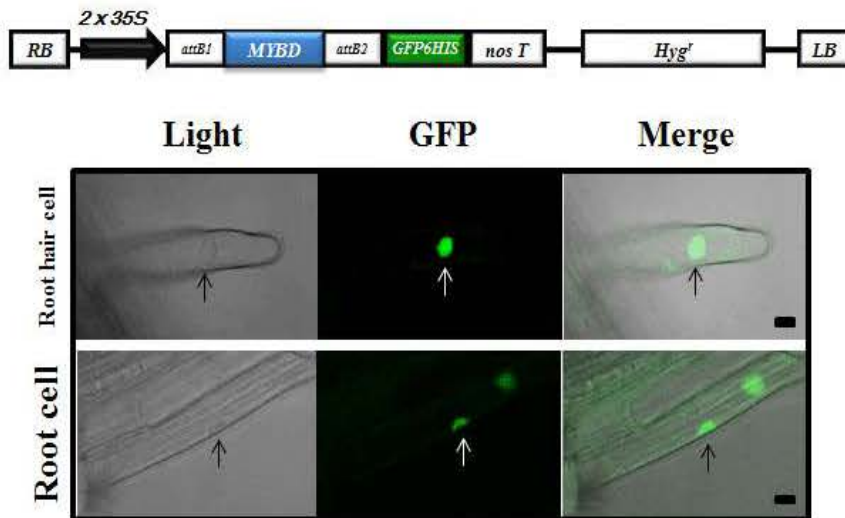


그림 14. AtMybD 유전자의 클로닝과 그 단백질의 핵내 존재 확인

- 아래 그림은 AtMybD 유전자의 과발현을 노던으로 확인한 것이다. 1번과 4번 라인에서 그 발현이 현저히 증가하였기에 이 두 라인을 이용하여 우리는 다양한 형질을 검정하였다. AtMybD 과발현체에서는 전형적인 하배측의 길이가 약간 감소함을 관찰하였다.

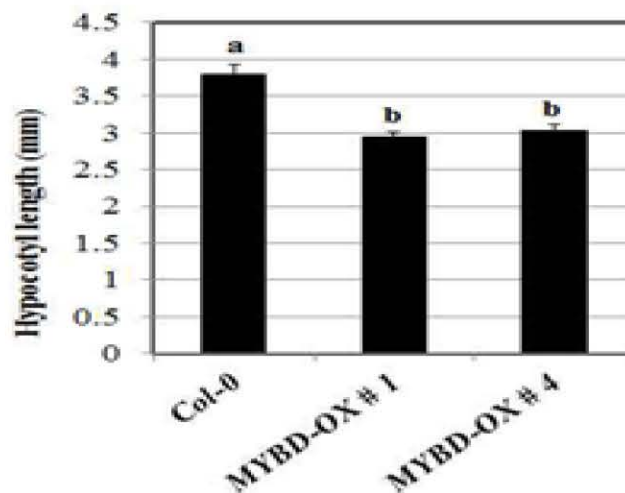
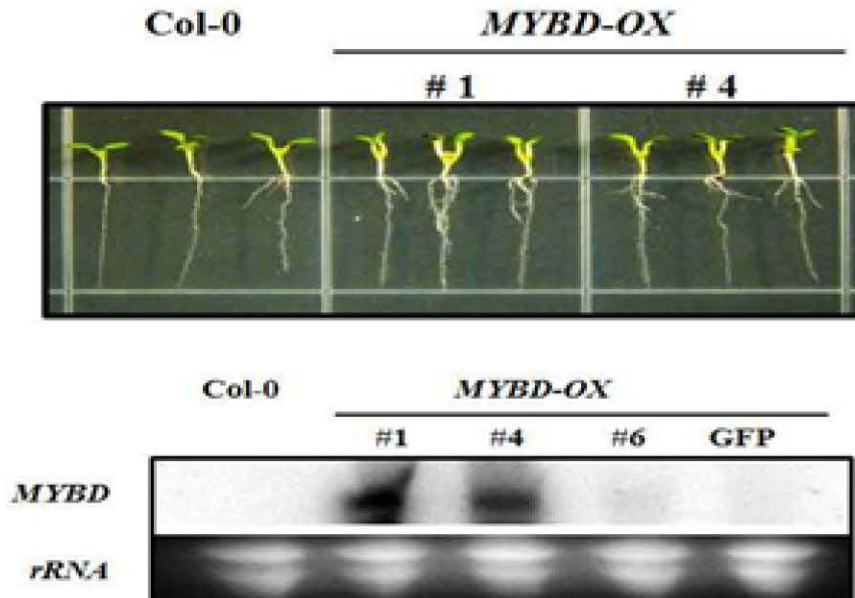


그림 15. MybD 과발현체의 과발현 분석

• AtMybD 과발현체를 정상 배지에서 키운 결과 우리는 하이포코틸의 상층부에서 아래 그림에서 보는 바와 같이 안토시아닌의 축적이 높은 것을 확인하였다. 반면 이 유전자가 결여된 *atmybd* 돌연변이에서는 안토시아닌의 축적이 감소하였다. 이 결과를 근거로 하여 우리는 AtMybD가 애기장대에서 식물의 플라보노이드 축적에 관여할 것이라는 아이디어를 얻게 되었고 관련 기능을 심도 있게 공부하게 되었다. 아래 그림은 AtMybD 과발현체인 1번과 4번 라인에서 정말로 안토시아닌의 축적이 증가하였는지를 검정한 결과이다. 그 결과 우리는 1번과 4번 라인이 정상 개체에 비하여 안토시아닌을 2 배 이상 축적함을 확인하였다.

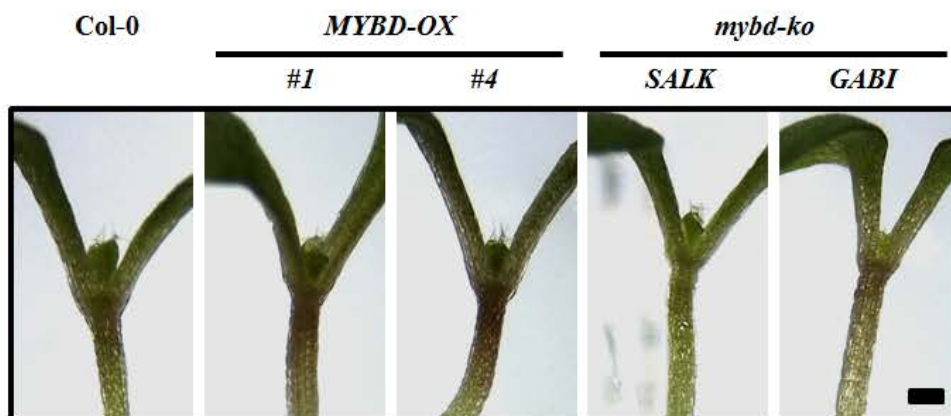
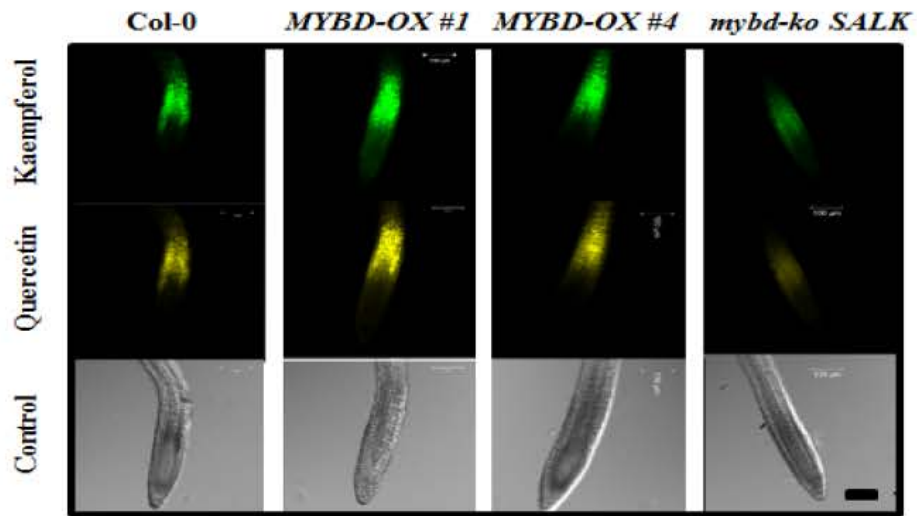
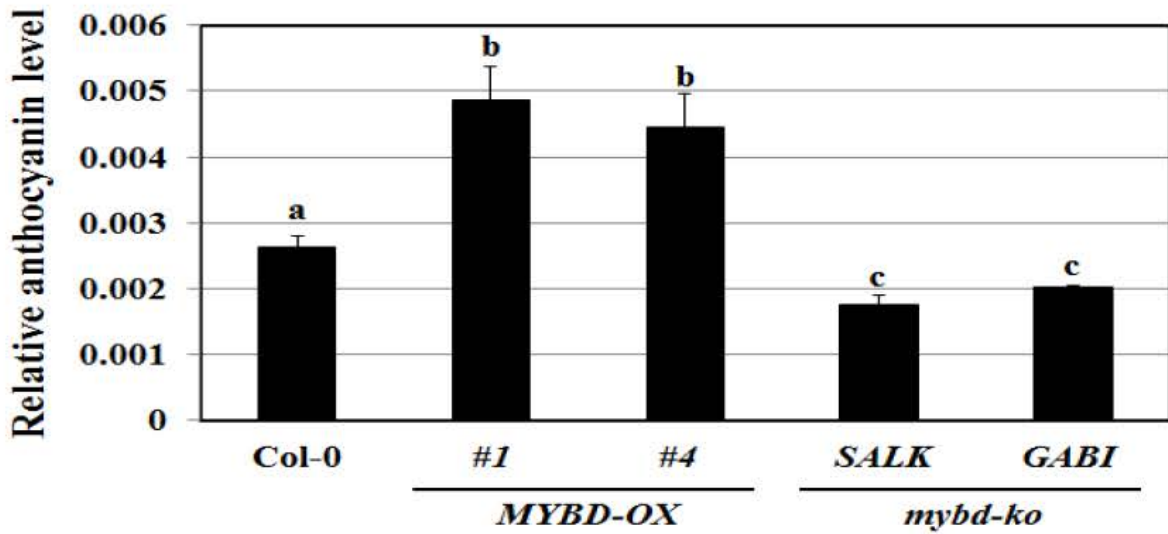


그림 16. AtMybD 과발현체 및 *atmybd* 돌연변이의 하이포코틸에서의 안토시아닌 축적

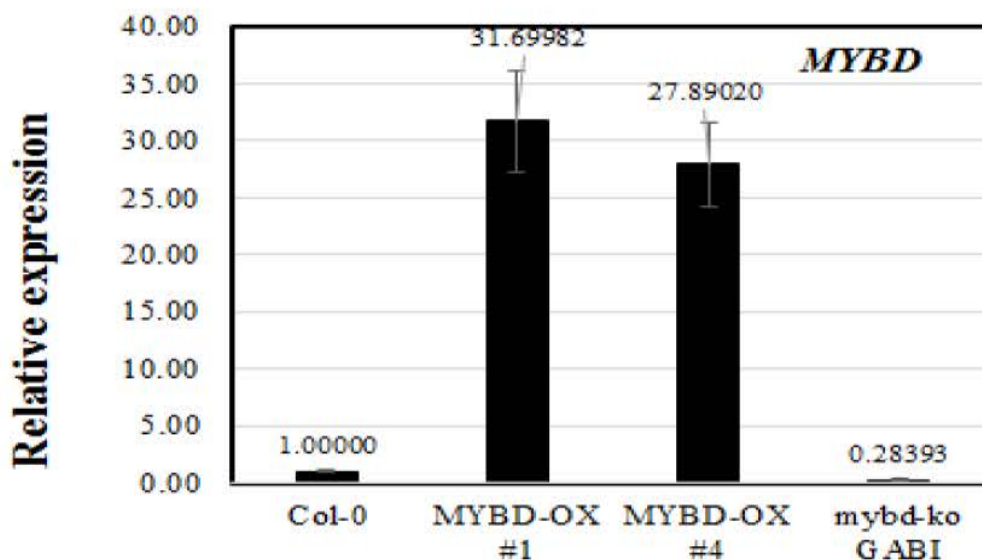
- 이들 식물이 화분에서 키울 경우 생장에 문제를 일으키지는 않는 지를 조사한 결과 생장이 아주 약간 더딘 것을 제외하고는 별 다른 차이가 없음을 확인하였다. 그러나 안토시아닌의 축

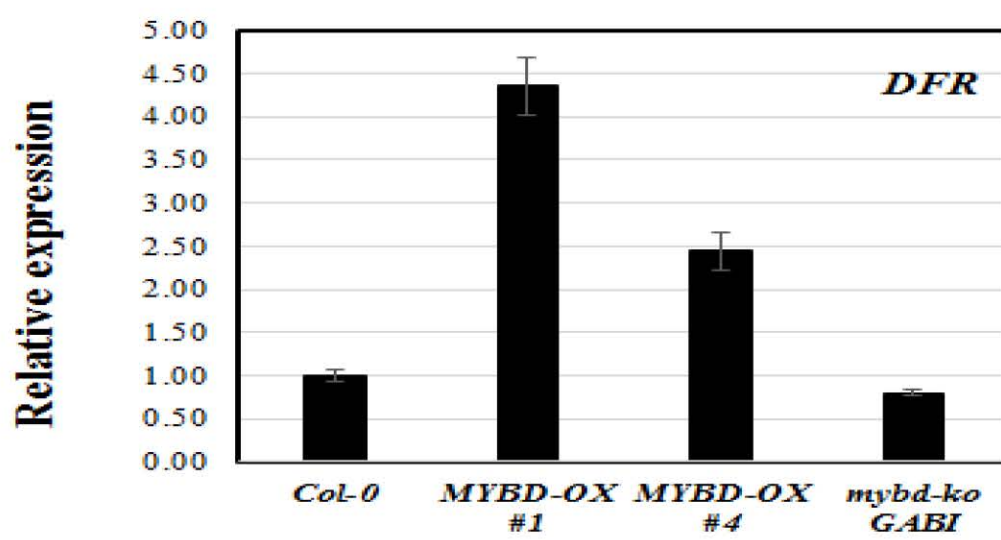
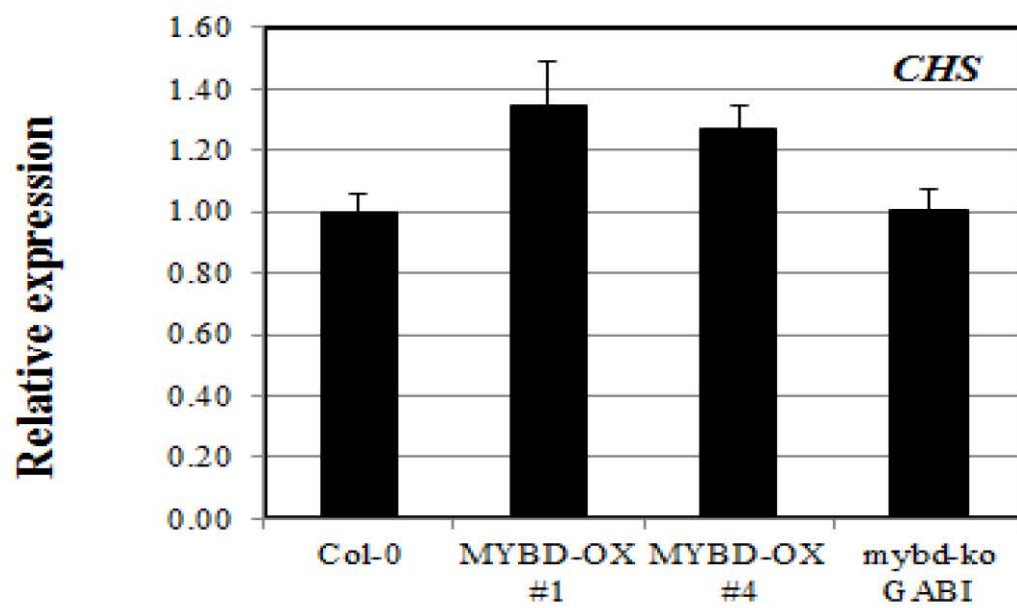
적으로 정상 개체에 비하여 AtMybD 과발현체가 보라색을 살짝 띄는 것으로 확인되었다.



그림 17. MybD 과발현체의 안토시아닌 함량과 성장 분석

• 다음으로 우리는 MybD 과발현체 라인들에서 플라보노이드 합성 유전자들의 발현에는 어떠한 변화가 있는지를 조사하고자 큐알티 피시알 실험을 진행하였다. CHS, DFR, LDOX는 플라보노이드 합성에 있어 필수적인 플라보노이드 합성효소를 지정하는 유전자들로 이들의 발현 증가는 보통 플라보노이드 합성의 증가로 연결된다는 것이 잘 보고되어 있다. 아래 그림의 결과에서 우리는 CHS에서의 발현 변화는 미미하지만 DFR, LDOX와 같은 유전자들의 발현은 현저한 차이가 있는 것으로 나타났다. 이는 MybD 유전자가 이들의 발현 증가에 positive regulator로 기능한다는 것을 나타낸다.







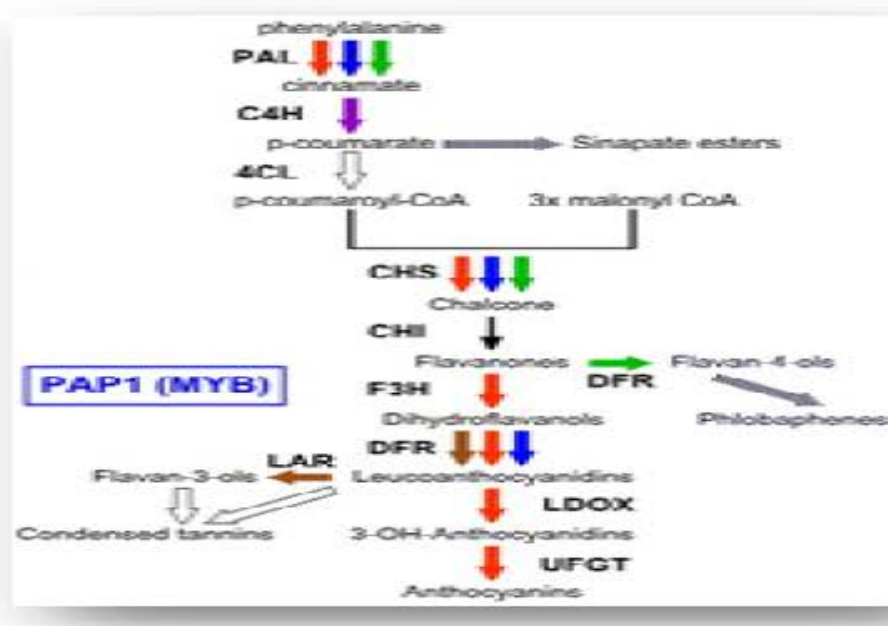
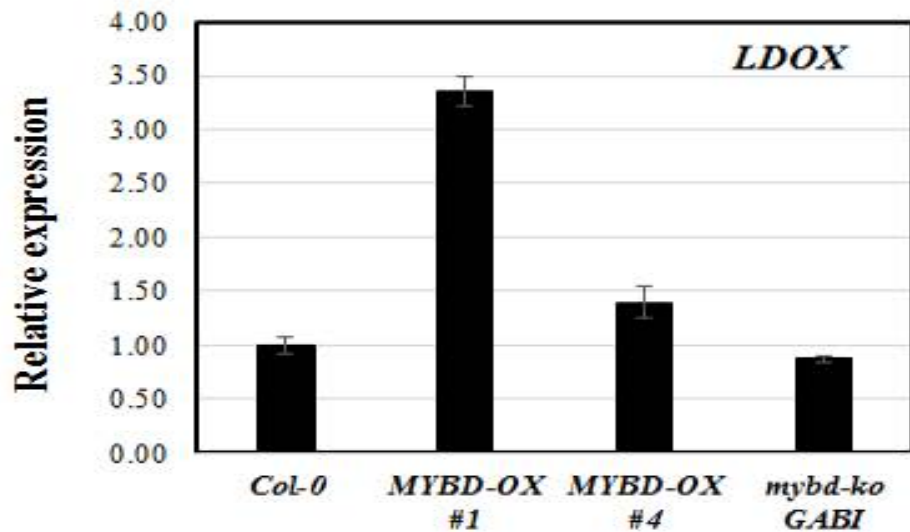


그림 18. AtMybD 과발현체에서의 플라보노이드 합성 관련 유전자 발현 분석

• 다음으로 우리는 MybD가 작용하는 유전자들을 더 살펴보기 위하여 플라보노이드 합성효소의 전사조절자로 기능하는 PAP1과 MybL2의 발현을 아래와 같이 큐알티 피시알 방법을 이용하여 조사하였다. 과발현체 라인들에서 PAP1 유전자의 발현에는 신빙성 있는 변화가 보이지 않은 반면, MybL2의 발현에는 신뢰성이 있는 결과가 나타났다. 즉, 과발현체에서는 MybL2의 발현이 감소한 반면, ko 들연변이에서는 MybL2의 발현이 증가하는 것으로 아래와 같이 나타났다. MybL2는 플라보노이드 합성의 negative regulator로 이미 보고되어 있는 유전자로 CHS, DFR, LDOX 발현을 억제하는 기능이 있다. 아래 그림의 결과에서 우리는 AtMybD가 MybL2의 negative regulator로 기능함으로써 플라보노이드 합성에는 positive regulator로 기능한다는 사실을 세로이 밝혀내게 되었다.

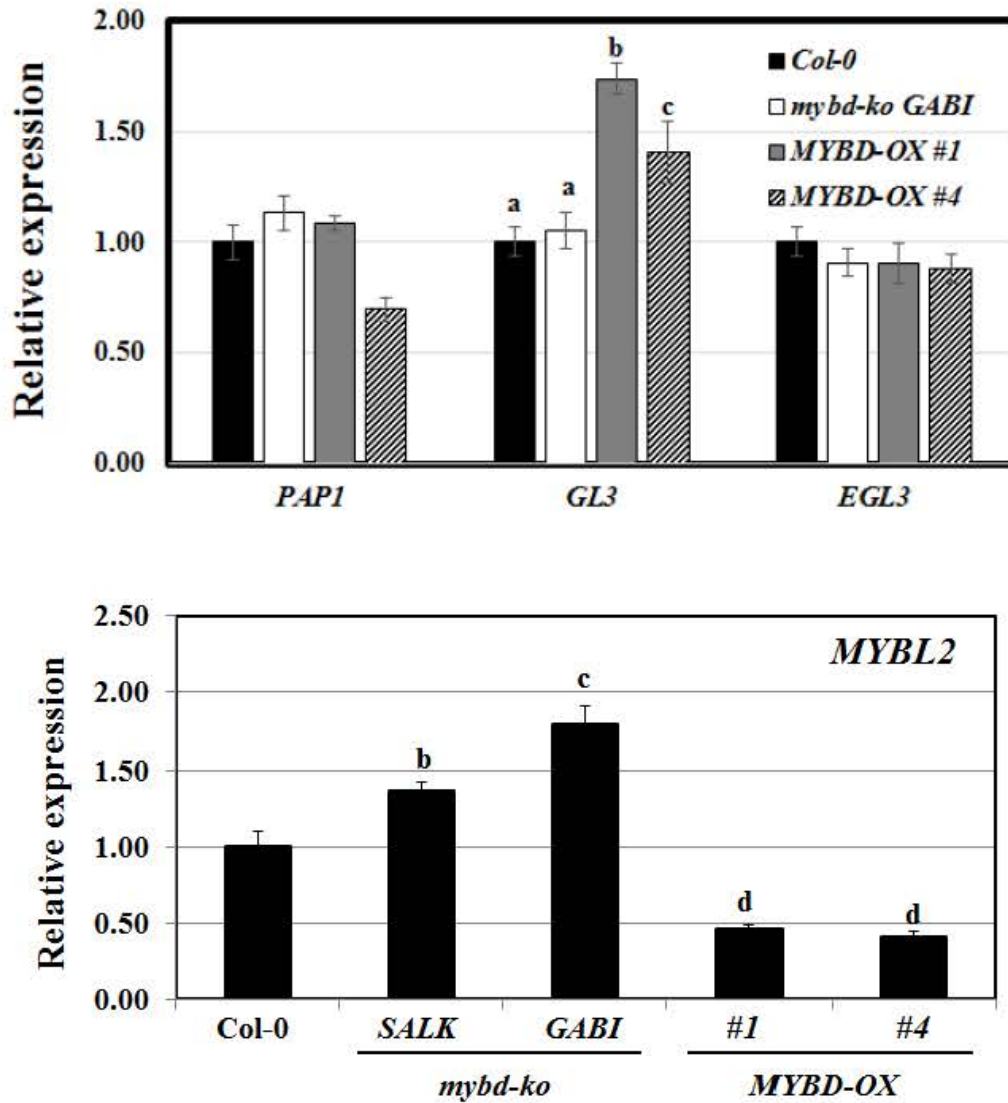
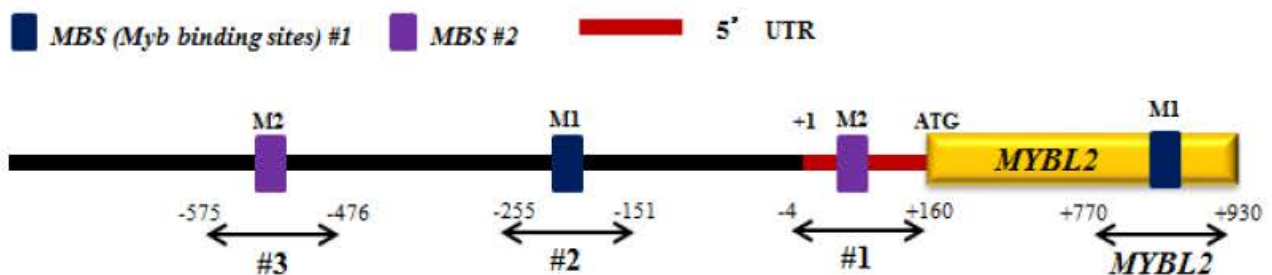


그림 19. *AtMybD* 과발현체에서의 플라보노이드 합성 관련 전사인자 발현 분석

• 다음으로 우리는 MybD가 정말로 *MybL2*의 프로모터에 결합하는 지를 조사하기 위하여 Chromatin immunoprecipitation을 실시하였다. 아래 그림에서 보이는 바와 같이 *MybL2* 유전자의 프로모터 2, 3 번 영역에 결합하는 것으로 나타났다. 이는 MybD가 플라보노이드 합성의 negative regulator인 *MybL2*의 프로모터에 직접 결합하여 결과적으로는 안토시아닌 합성 증진 효과를 초래한 것으로 볼 수 있다.



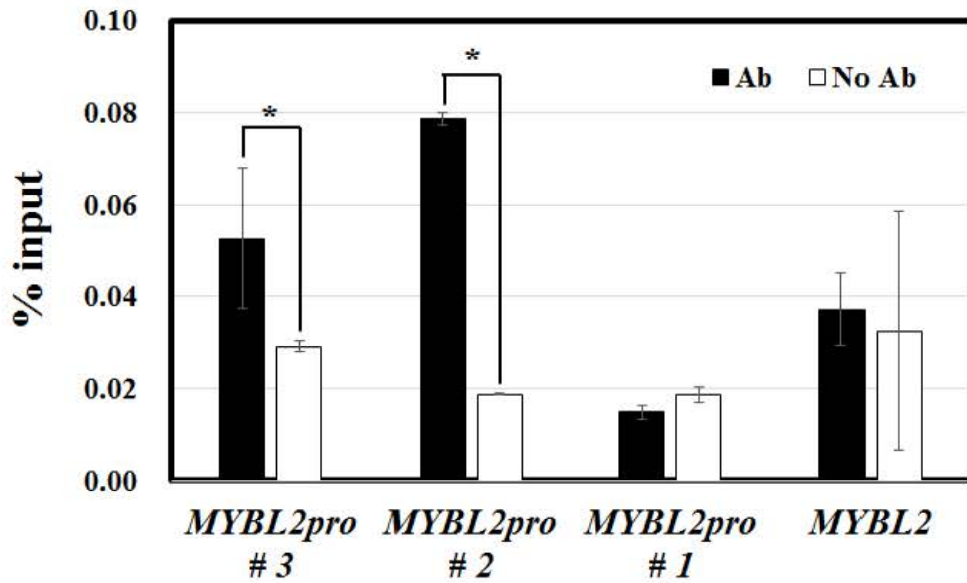


그림 20. AtMybD 단백질의 *Mybl2* promoter 결합 분석 에세이 (CHIP assay)

• 다음으로 우리는 MybD가 *Mybl2*의 프로모터에 결합하는 지를 다른 방법으로 한번 더 조사하기 위하여 이번에는 transient gene expression assay를 실시하였다. 이 방법을 통해서 우리는 MybD가 플라보노이드 합성의 negative regulator인 *Mybl2*의 프로모터에 반응하여 이의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

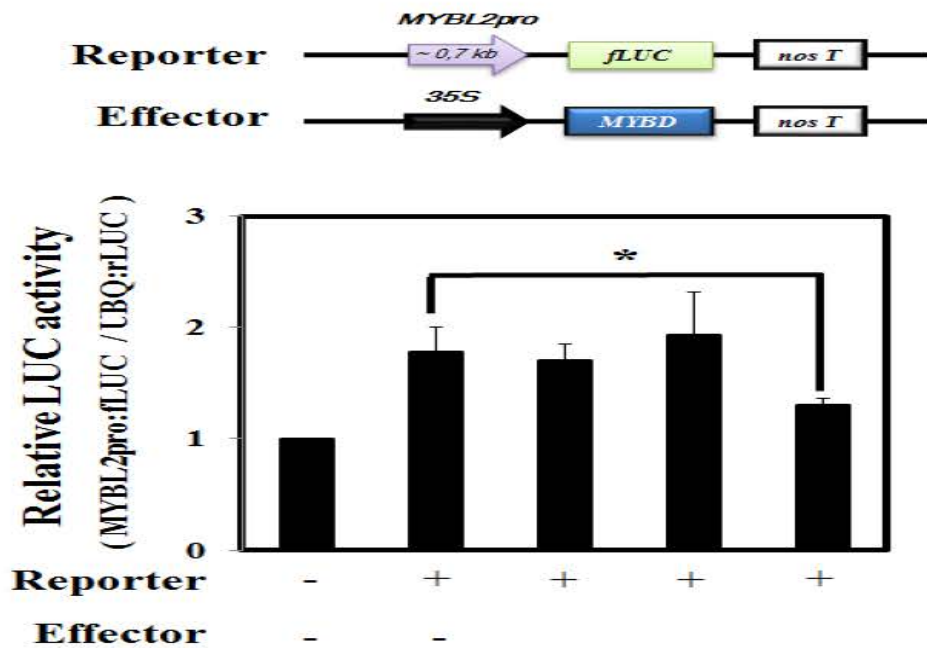


그림 21. AtMybD 단백질의 *Mybl2* promoter 활성 억제 에세이 (protoplast assay)

• 상기에서 얻은 결과를 바탕으로 우리는 *AtMybD* 유전자의 기능에 대하여 다음과 같은 모델을 작성하게 되었다. 플라보노이드 합성에는 BMW라고 전사인자의 삼중 복합체가 필요한데 WD protein, bHLH protein, Myb protein이 그것이다. 이들의 삼중결합은 종종 MybL2에 의해 저해되는 데, 이는 bHLH가 삼중결합에 포함되지 않고 대신 MybL2와 결합하기 때문이다. 따라서, 우리는 우리의 MybD가 *MybL2*의 발현을 억제시키는 기능을 함으로써 플라보노이드 합성에는 positive regulator로 기능한다는 모델을 아래와 같이 구축하게 되었다. 현재까지 *MybL2*의 발현 조절에 기여하는 것으로는 밝혀진 유전자가 없기에 우리의 발견은 특허화가 가능하며 또한 플라보노이드의 positive regulator를 새로이 발견했다는 데에 큰 의의가 있다고 판단된다.

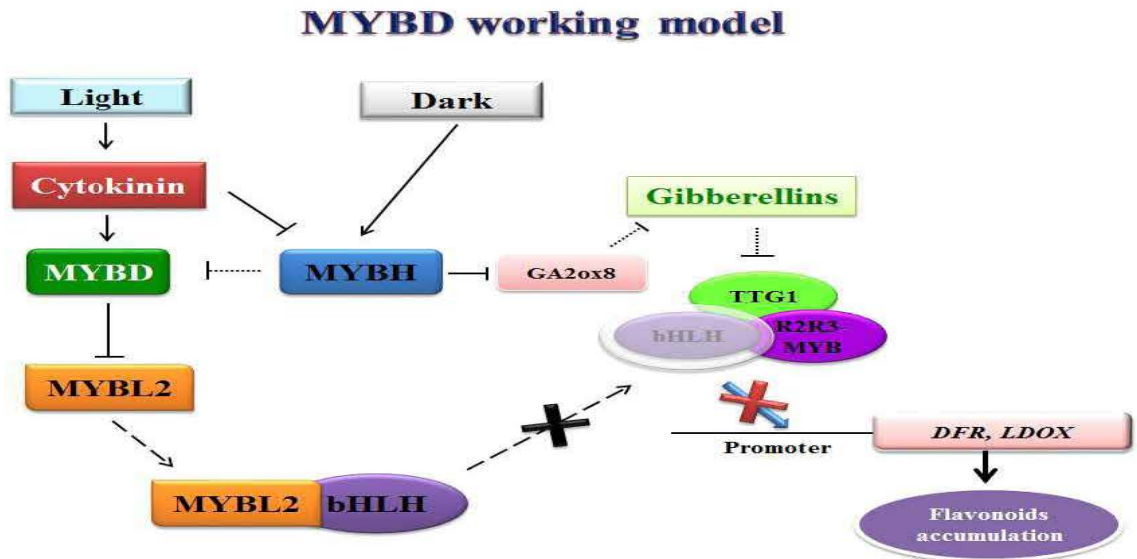


그림 22. *AtMybD* 단백질의 식물 플라보노이드 합성 조절작용 기전 모델

#### (4) 플라보놀 합성 유전자 예기장대 *AtFLS1* 형질전환체(예기장대) 특성 규명

• 우리는 위에서 플라보노이드 합성 조절에 관여하는 전사조절자의 발굴과 그 기능에 대하여 알아보았다. 이외에도 우리는 식물의 플라보노이드인 안토시아닌과 플라보놀의 합성을 특이적으로 조절하기 위하여 2 개의 유전자를 공부하기로 하였다. 하나는 Quercetin, kaempferol과 같은 플라보놀의 축적을 도모하기 위하여 이 반응에 관여하는 효소인 flavonol synthase (FLS)과 다른 하나는 안토시아닌의 합성을 촉진하는 Dihydroflavonol reductase (DFR)이다. 이 두 유전자의 독립적 과발현을 통하여 우리는 플라보놀 혹은 안토시아닌만을 각각 증가시킬 수 있는 지에 대한 답을 얻고자 실험을 진행하였다.

• 우선 플라보놀의 축적을 증가시키기 위하여 예기장대의 flavonol synthase를 과발현시킨 예기장대 형질전환체를 얻었다. 이 유전자는 그 과발현체에 대한 연구가 진행되어 있지 않은 상태였기에 우리는 비교군으로 이 유전자가 결여된 *fls1ko* 돌연변이도 함께 확보하여 실험을 진행하였다. 우선 *AtFLS1* 유전자가 플라보노이드 합성을 촉진하는 것으로 알려진 다양한 비생

물적 환경스트레스에 의해 유도되는 지를 보기 위하여 아래와 같이 환경 스트레스 호르몬인 ABA를 처리한 후에 노던 분석을 실시하였다. 스트레스 마커 유전자인 *KINI*, *COR15A*가 제대로 발현되는 것에서 보이는 것처럼 *FLS1*도 ABA에 의해 그 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 플라보놀의 합성 촉진이 식물의 환경스트레스에 긍정적으로 작용함을 보여준 문헌의 결과와도 일치하는 것으로 보인다. 이뿐만 아니라 다른 플라보노이드 합성 유전자인 *CHS*, *DFR*도 ABA 호르몬에 반응하는 것으로 나타났다.

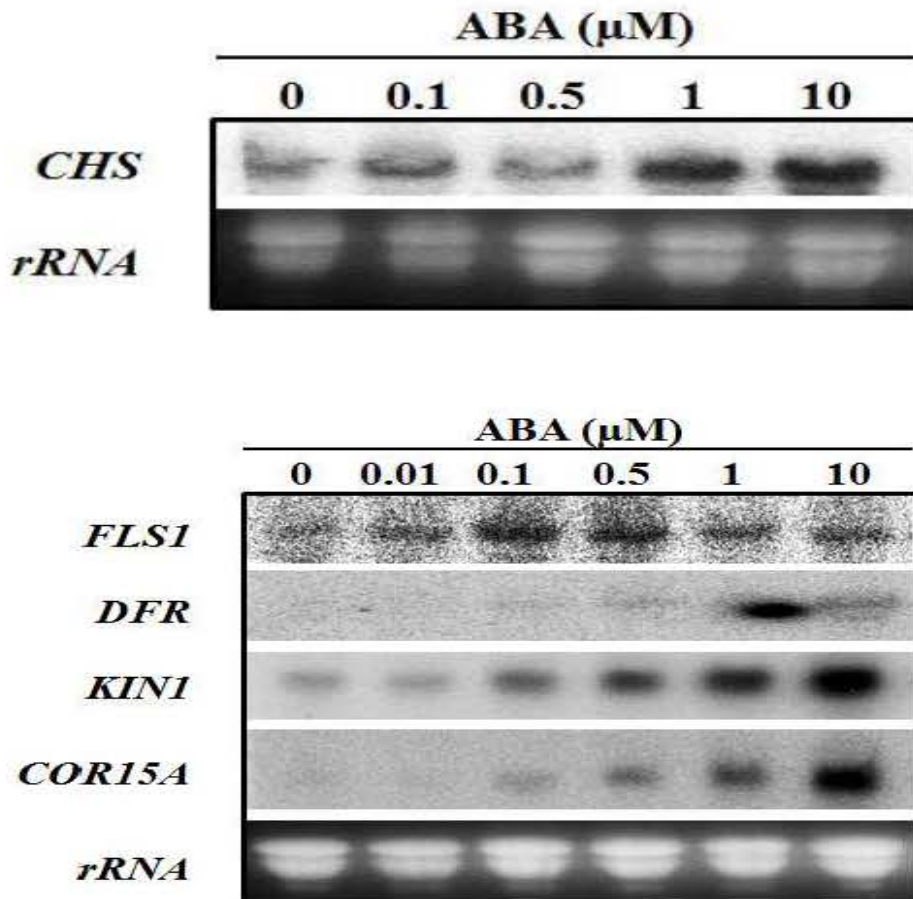


그림 23. 플라보노이드 합성 유전자, *FLS1*, *DFR*, *CHS*의 ABA 반응성 분석

• 위 과발현체에서 어떤 라인이 *FLS1*을 과다 발현하는 지를 조사하기 위하여 우리는 먼저 여러 개의 라인을 확보한 다음 그 발현을 qRT-PCR을 통하여 조사하였다. 아래에 보이는 바와 같이 5, 6 번 라인이 *FLS1*을 과다 발현하는 것으로 확인하는 것으로 확인되어 추후 이 라인들을 실험에 사용하였다. 이 라인들의 뿌리털에 얼마나 많은 플라보놀이 축적되는 지를 보기 위하여 quercetin, kaempferol을 염색한 결과 두 라인에서 정상 개체보다 약간 많은 플라보놀이 축적되는 것으로 나타났다.

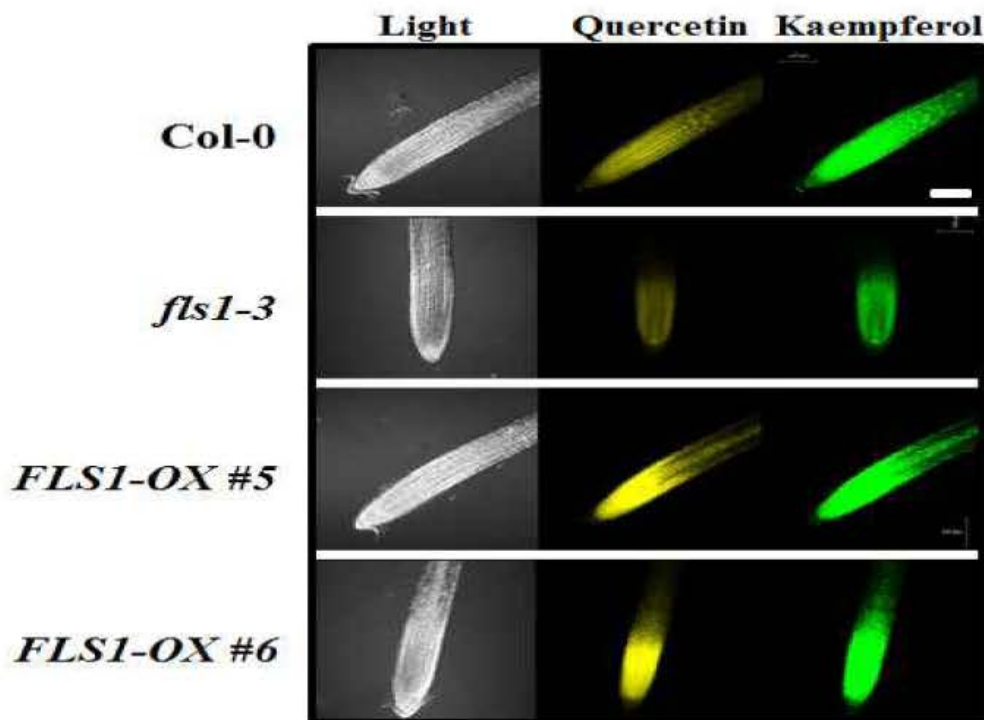
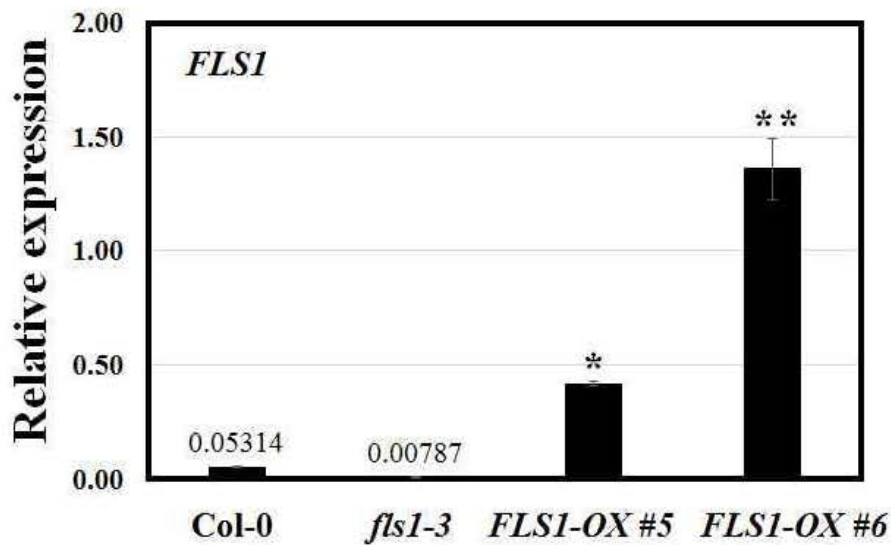


그림 2A. *FLS1* 과다발현 기계 확보와 뿌리에서의 플라보놀 축적 분석

• *FLS1* 과발현체에서 우선 안토시아닌의 함량이 어떻게 변화하는 지를 조사하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이, 안토시아닌의 함량이 *FLS1* 과발현체에서 현저히 줄어드는 것으로 나타났다. 이는 플라보노이드 합성 경로에서 보는 바와 같이 *FLS1*에 의해 플라보놀 합성 방향으로 진행이 많이 되어 안토시아닌이 줄어든 것으로 생각하였다.

• 이를 증명하기 위하여, 플라보놀의 함량을 정량적으로 알아보기 위하여 HPLC를 이용하여 quercetin과 kaempferol의 함량을 측정하였다. HPLC를 이용한 결과에서 우리의 예상과는 반대

로 *FLS1* 과발현체에서 플라보놀의 함량, 특히 kaempferol이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 이 HPLC에서는 플라보놀에 붙은 당을 전부 다 제거한 다음에 quercetin과 kaempferol의 함량을 측정하는 것이다.

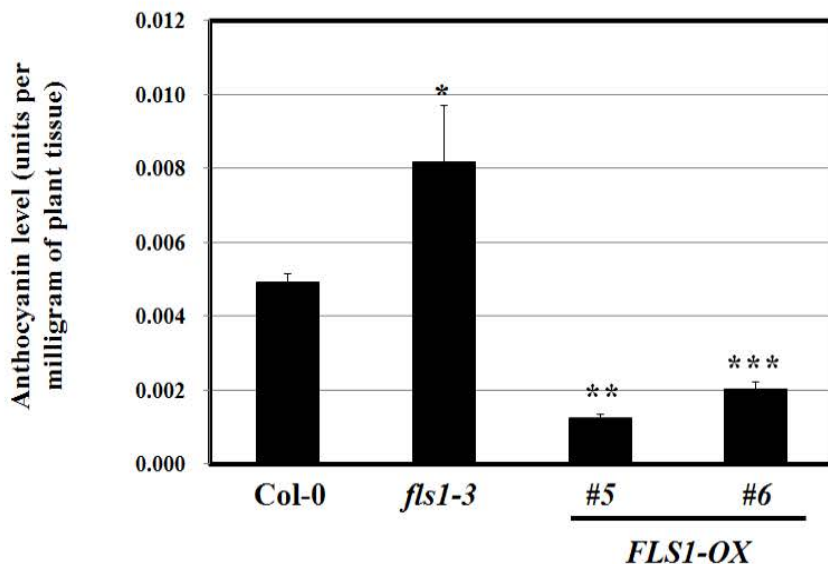
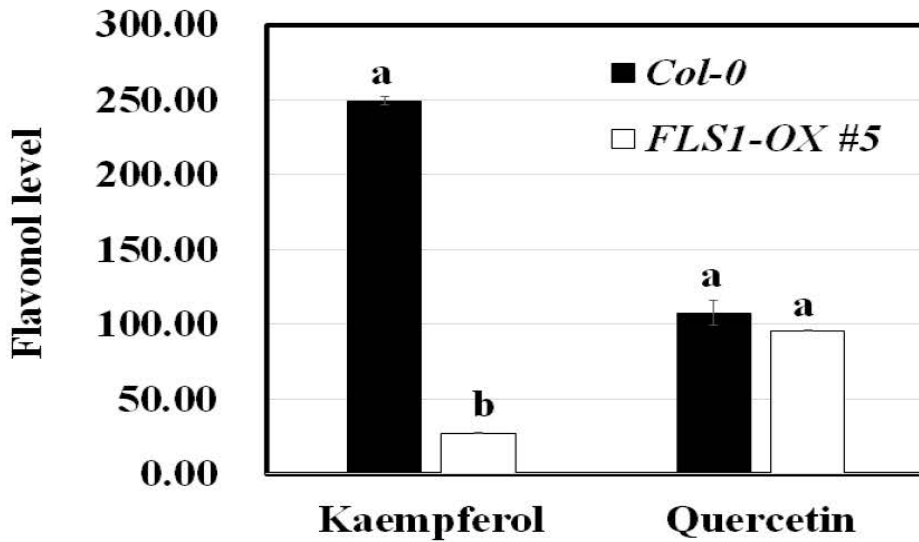


그림 25. *FLS1* 과다발현 개체에서의 안토시아닌 함량과 플라보놀 함량 분석

• 위 결과는 우리가 예측한 바와 정반대로 나왔기에 우리는 다시 당이 붙은 원래 상태에서 플라보놀의 함량을 측정하기로 하였고 이를 위하여 UPLC-Q-Tof MS 방법을 이용하였다. 아래 그림의 peak은 각각 아래와 같은 물질을 나타낸다. (1) Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1->2)- $\beta$ -D-glucopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside; (2) Quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside; (3) Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside; (4) Quercetin 3, 7-di-O- $\alpha$

-L-rhamnopyranoside; (5) Kaempferol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside; (6) Quercetin 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside and Quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside. 그러나 아래 결과에서 보는 바와 같이 그 결론은 동일한 것으로 나타났다. 즉, FLS1의 과발현은 애기장대에서 특히 kaempferol의 합성을 억제하는 것으로 나타났다.

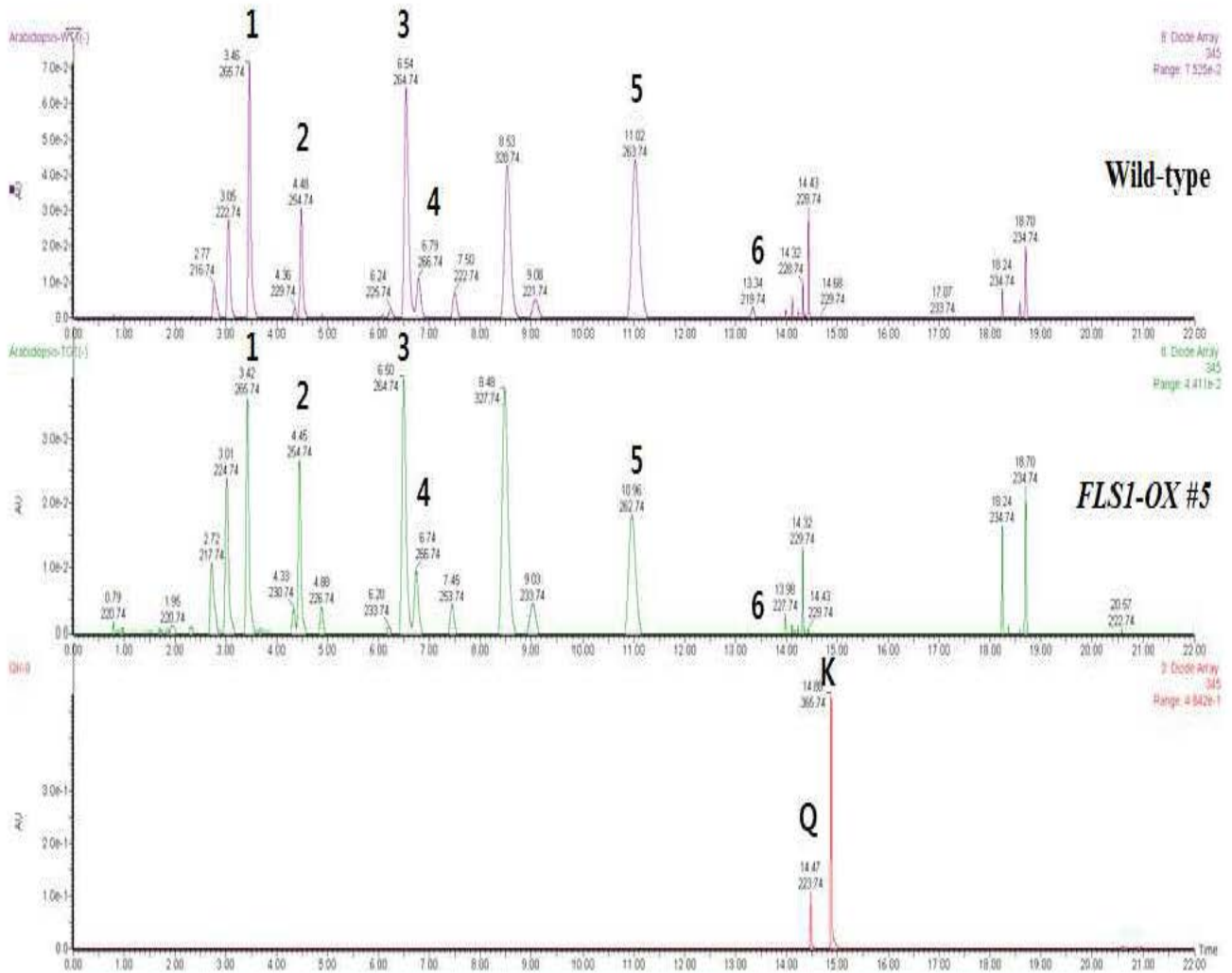


그림 26. FLS1 과발현 개체의 당화 플라보놀 합량 분석 그래프



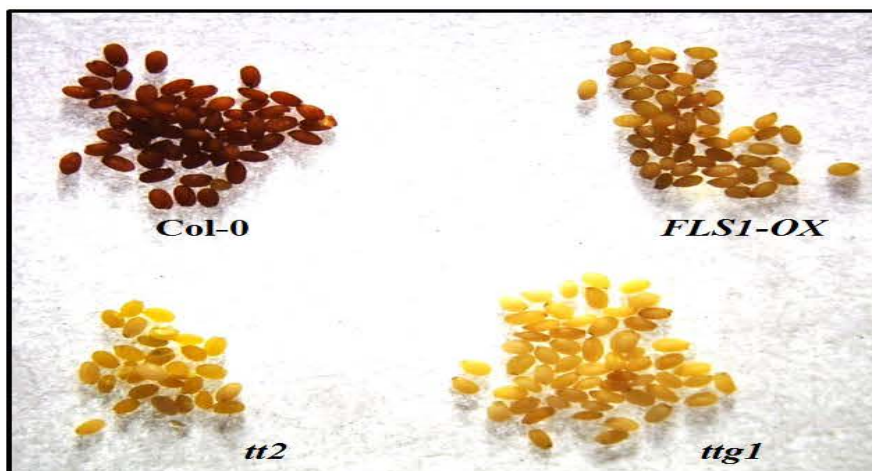
	Wild-type			<i>FLS1-OX</i> #5		
	Average (%)	SD	RSD (%)	Average (%)	SD	RSD (%)
1 (K)	0.117	0.000	0.215	0.057	0.001	1.181
2 (Q)	0.044	0.001	1.348	0.035	0.001	1.672
3 (K)	0.156	0.002	1.425	0.093	0.001	1.419
4 (Q)	0.020	0.000	0.707	0.017	0.000	1.049
5 (K)	0.204	0.001	0.527	0.085	0.001	1.600
6 (Q)	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

n=3  
K = Kaempferol Q = Quercetin

그림 27. *FLS1* 과발현 개체의 당화 플라보놀 함량 분석 그래프의 정량화

• *FLS1* 과발현체에서 우리는 또 다른 흥미로운 결과를 확인하였다. 즉, 아래 그림에서 보이는 바와 같이 *FLS1* 과발현에 의해 종자의 외피 색깔이 정상 개체에 비해 흐려지는 것으로 나타났다. 이는 안토시아닌의 함량이 *FLS1* 과발현체에서 현저히 줄어드는 것으로 나타났기에 그와 관련된 프로안토시아니딘의 합성도 줄어드는 것으로 생각해볼 수 있다.

• *FLS1* 과발현체에서는 플라보노이드 합성 효소들의 negative regulator인 *MybL2*의 발현이 증가된 것으로 나타났다. 이는 *FLS1* 과발현체에서 왜 플라보놀의 함량이 증가하지 않고 반대로 감소했는가를 설명할 수 있는 한 가지의 원인을 제공한다고 보인다. 즉, 플라보놀을 원래 정상보다 훨씬 더 많이 발현되는 것을 억제하기 위하여 Flavonol synthase와 같은 유전자의 발현이 증가할 경우 이를 미리 감지하여 플라보놀 합성을 억제하는 기전으로 *MybL2*의 발현을 증가시키는 것이다. 이와는 별개로 후성유전학적인 기전을 이용하여 특정 유전자의 과발현 효과를 억제하는 기전도 가능할 것으로 생각된다, 즉, 비정상적으로 증가한 mRNA가 존재할 경우 이의 분해산물을 이용하여 RNAi-dependent translation inhibition이 가능하게 되는 것이다.



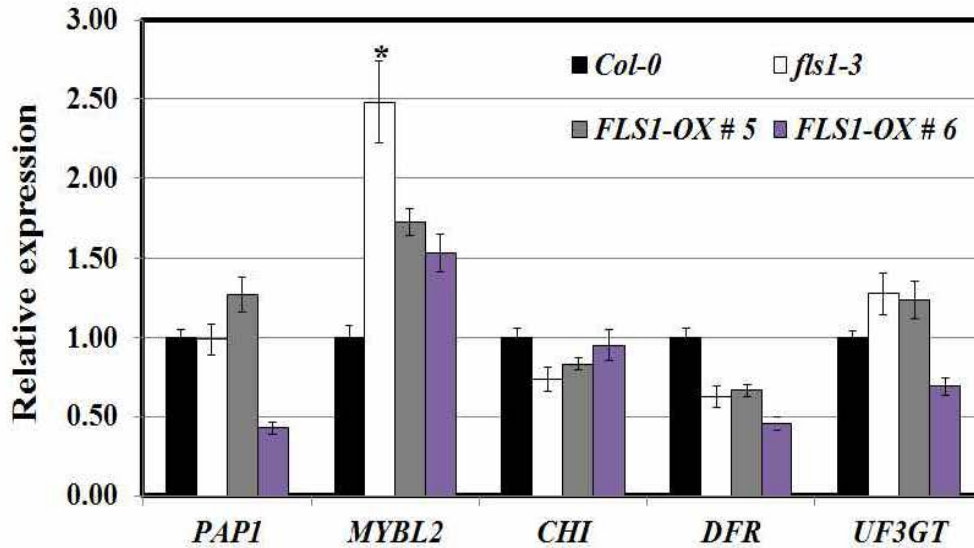


그림 28. FLS1 과다발현 개체의 종자 외피 색깔 분석과 플라보노이드 합성 관련 유전자 발현 양상 분석

### 제 3 절 종자 발현 프로모터 확보와 특성 규명

- 우리가 목적으로 하고 있는 식물의 조직은 유채 종자이다. 따라서, 유채 종자에 함유되는 플라보노이드의 함량을 종자 특이적으로 조절하기 위하여 우리는 애기장대의 밑 유전자의 프로모터를 다수 연구하였다. 그 중 *Myb7* 유전자의 프로모터는 종자에 특이적으로 발현됨을 아래와 같이 확인하였다. 우선 *Myb7* 유전자의 프로모터 부위 (ATG에서 1 kb upstream)를 클로닝하고 *GUS* 리포터 유전자에 삽입시켜 거스 염색을 아래의 조건으로 실시하였다. 이 프로모터는 종자에 특이적으로 발현이 되는데 발아를 위하여 침윤시킬 경우 24 시간 이후에는 그 발현이 점점 줄어드는 것을 관찰하였다. 그러나 아래 패널에서 보는 바와 같이 ABA나 고염을 처리할 경우 침윤 후에도 그 발현이 상당부분 지속되는 것으로 나타났다. 현재 이 유전자의 기능을 검증 중에 있으나 우선 우리는 이 프로모터를 사용할 경우 유채의 종자에 특이적으로 발현되는 형질전환 시스템을 구축할 수 있을 것으로 사료되어 현재 이 프로모터의 염기서열도 특허를 신청 중에 있다.

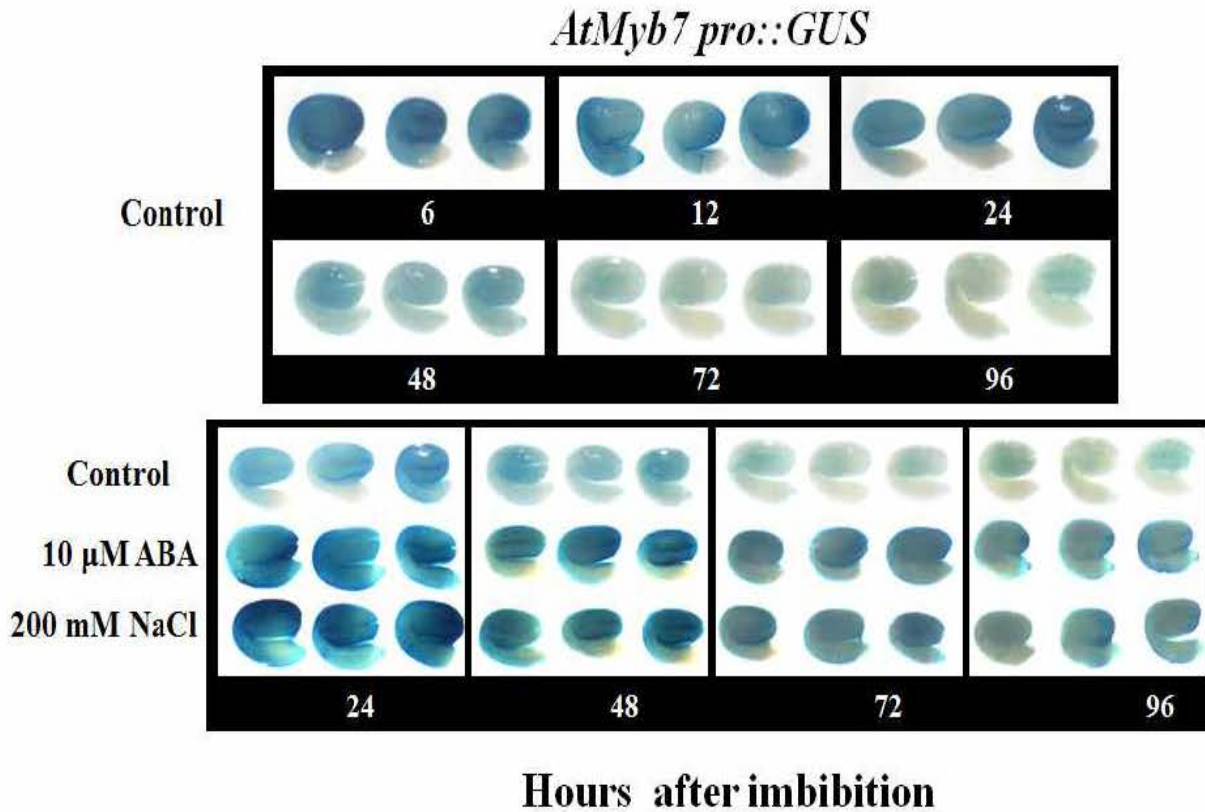


그림 29. 종자 발현 *AtMyb7* 프로모터의 확보

#### 제 4 절 유채 형질전환 간편화 방법 확립

##### 1. 유채 간편 형질전환 방법 확립

- 유채 형질전환 기술 간편화 방안 연구: 유채는 애기장대와 동일한 십자화과 식물로 현재까지 많은 형질전환체들이 학계에 보고되어 왔다. 또한 현재 농지에서 재배되고 있는 품종들도 상당수가 GMO인 것으로 보고되고 있다. 우리는 외국의 연구소와 연계된 프로그램을 통하여 보다 더 간편하고 효율적인 유채 형질전환법을 확립하였다.

- 유채 형질전환체를 만들기 위하여 우리는 그 효율이 상당히 낮은 것으로 파악되어 호주에 있는 Dr. Prem 박사 실험실로 일주일간 연수를 다녀왔다. 아래 그림은 호주에서 우리가 배워 온 기술들에 대한 간략한 모식도이다.

- 유채 형질전환은 다른 식물들과는 달리 그 형질전환법이 간편하다면 간편하다. 즉, 조직을 캘러스로 먼저 만들 필요가 없이 어린 떡잎을 잘라내어 그 끝부분을 아그로 박테리아에 감염을 시키면 바로 형질전환이 야기될 수 있다. 이 때 암소에서 종자를 발아시켜 떡잎의 엽병 부분을 잘라낸 다음 그 끝에 아주 소량의 아그로 박테리아를 감염시켜서 co-cultivation media에

서 이틀간 배양을 한다.

## Infection and co-cultivation

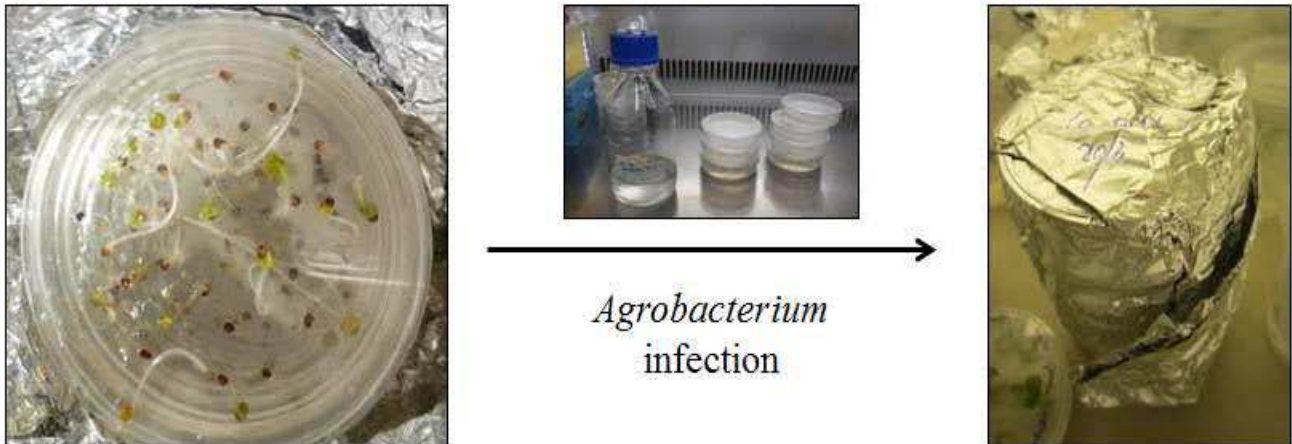


그림 30. 아그로박테리움을 접종하기 위한 유체 어린 식물 준비 과정

- 아그로박테리아를 감염시킨 후 co-cultivation media에서 이틀간 배양을 한 다음 항생제가 들어 있는 배지로 옮겨서 점차 식물을 키워나가면 엽병의 아래 그림과 같이 아래 쪽에 캘러스가 형성되는 것을 관찰할 수 있다.

## Callus induction

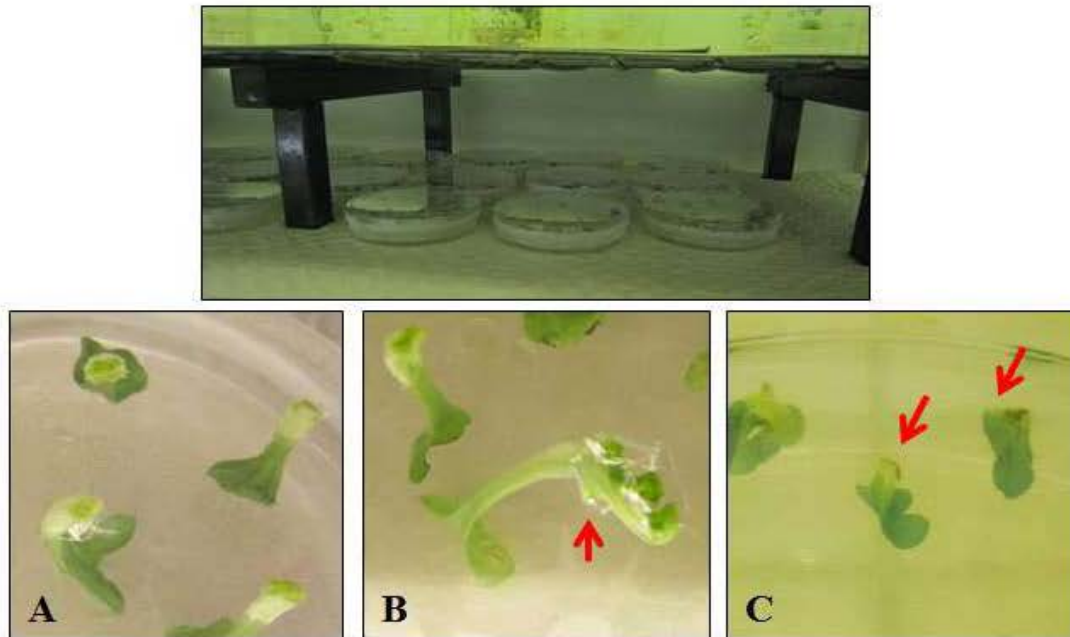


그림 31. 아그로박테리움 접종 후 생겨난 유채 떡잎 아래 부분의 캘러스 형성 과정

• 아그로박테리아가 제대로 감염이 될 경우에는 캘러스 조직에서 파랗게 생긴 shoot가 올라오지만 그렇지 않을 경우에는 떡잎을 포함한 캘러스 조직 전체가 까맣게 타서 죽는 것을 관찰할 수 있다. 이 단계를 shoot initiation 및 selection step이라고 하며 이 때 대부분의 떡잎이 죽어 나가며 아주 일부분에서 shoot가 올라오게 된다. 항생제로서 우리는 카나마이신 및 하이그로마이클을 다 사용하여 보았으나 형질전환체 선별이 쉽지 않음을 알게 되었다. 그러나 바스타를 이용한 형질전환체 선별은 그 결과가 아주 명확하고 깔끔하여 추후 모든 유전자의 유채 형질전환은 바스타를 이용하여 진행되었다.

## Shoot initiation and selection

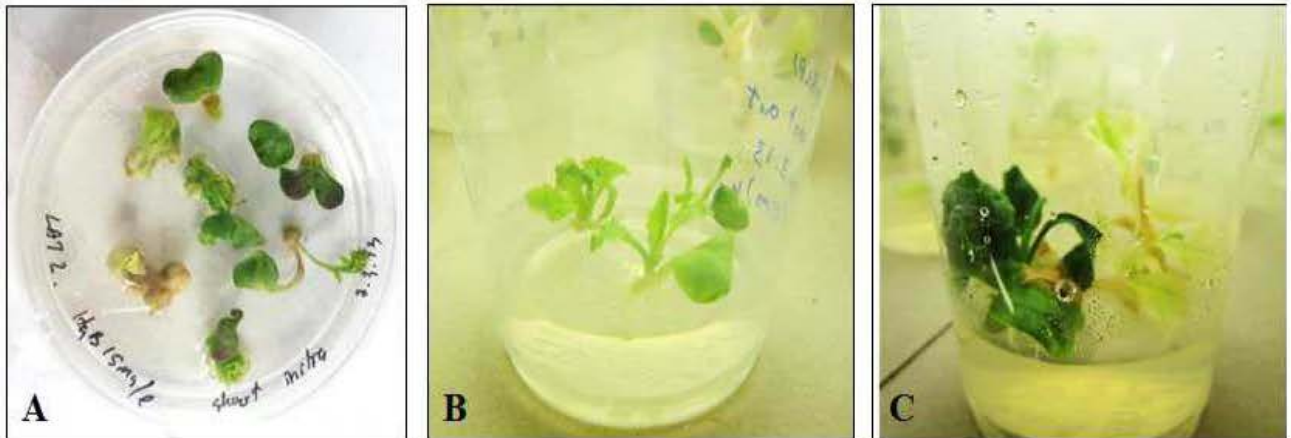


그림 32. 특정 유전자 유체 형질전환체의 시기별 선별 과정

- Shoot가 잘 생겨났을 경우에는 뿌리 생성을 위한 배지로 옮겨서 아래 그림과 같이 뿌리를 내리게 하고 2-3 주 후에는 화분으로 옮겨서 종자를 수확할 수 있는 단계로 나아간다. 유체의 경우에는 춘파와 추파로 나누는데 우리는 국내용과 수출용 둘 다를 목적으로 하여 추파인 한라 및 영산 품종과 추파인 westar 품종에 형질전환을 시도하고 있다.

## Rooting and growing in green-house



그림 33. 특정 유전자 유체 형질전환체의 온실에서 생육 과정

- 위의 프로토콜을 사용하여 우리도 독자적으로 유체 형질전환을 실시하였고 여러 개의 유전

자가 도입된 유채형질전환체를 확보하였다. 위에서 언급한 바와 같이 우리는 국내용과 수출용 들 다를 목적으로 하여 추파인 한라 및 영산 품종과 춘파인 westar 품종에 형질전환을 시도하였으나, 현재는 한라 품종에서 제일 먼저 형질전환을 시도한 관계로 한라에서 여러 라인을 확보한 상태이다. 아래 빨간색의 화살표에서 보는 바와 같이 우리는 형질전환이 제대로 일어나지 않을 경우 식물이 하얗게 탈색되어 가다가 죽는 것을 확인할 수 있었다.



그림 34. 특정 유전자 유채 형질전환체의 항생제 저항성 라인 선별 작업 과정

• 확보된 유채 형질전환체들은 다음 세대를 확보하기 위하여 온실에서 재배하였다. 그러나 재배 기간이 논문 작성을 위한 라인은 T1 세대에서 실시되었고, 순계 종자를 얻기 위해 현재 T2 세대까지 와있는 단계이다.

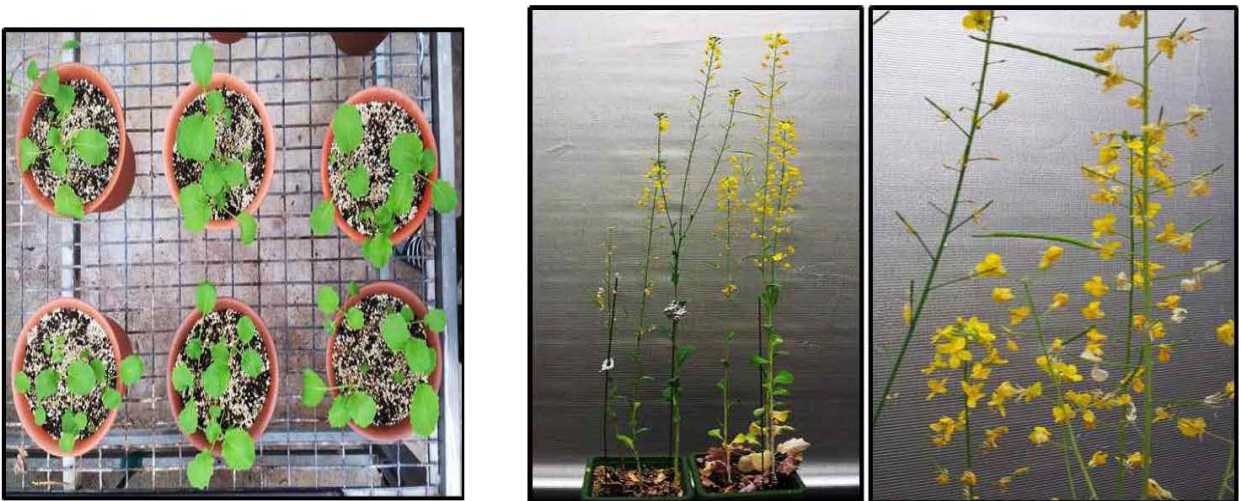


그림 35. 유채 형질전환체의 온실재배 사진

## 제 5 절 유채 형질전환체 생산 및 특성 규명

### 1. 국내 유채 품종 플라보노이드 합성 특성 규명

• 우리는 유채 품종 중 한라와 영산 종자를 구입하여 건조 종자 (200 mg)에서 다음과 같은 결과를 얻었다. 종자에도 플라보노이드가 존재하나 그 양은 아주 미미하여 본 연구에서 플라보노이드를 과다 합성하는 유채를 생산할 경우 종자에서도 그 양이 획기적으로 증진될 것으로 판단된다. 현재 확보한 라인들을 대상으로 차년도에는 종자에서의 플라보노이드의 함량 증진을 위한 연구가 수행될 것이다.

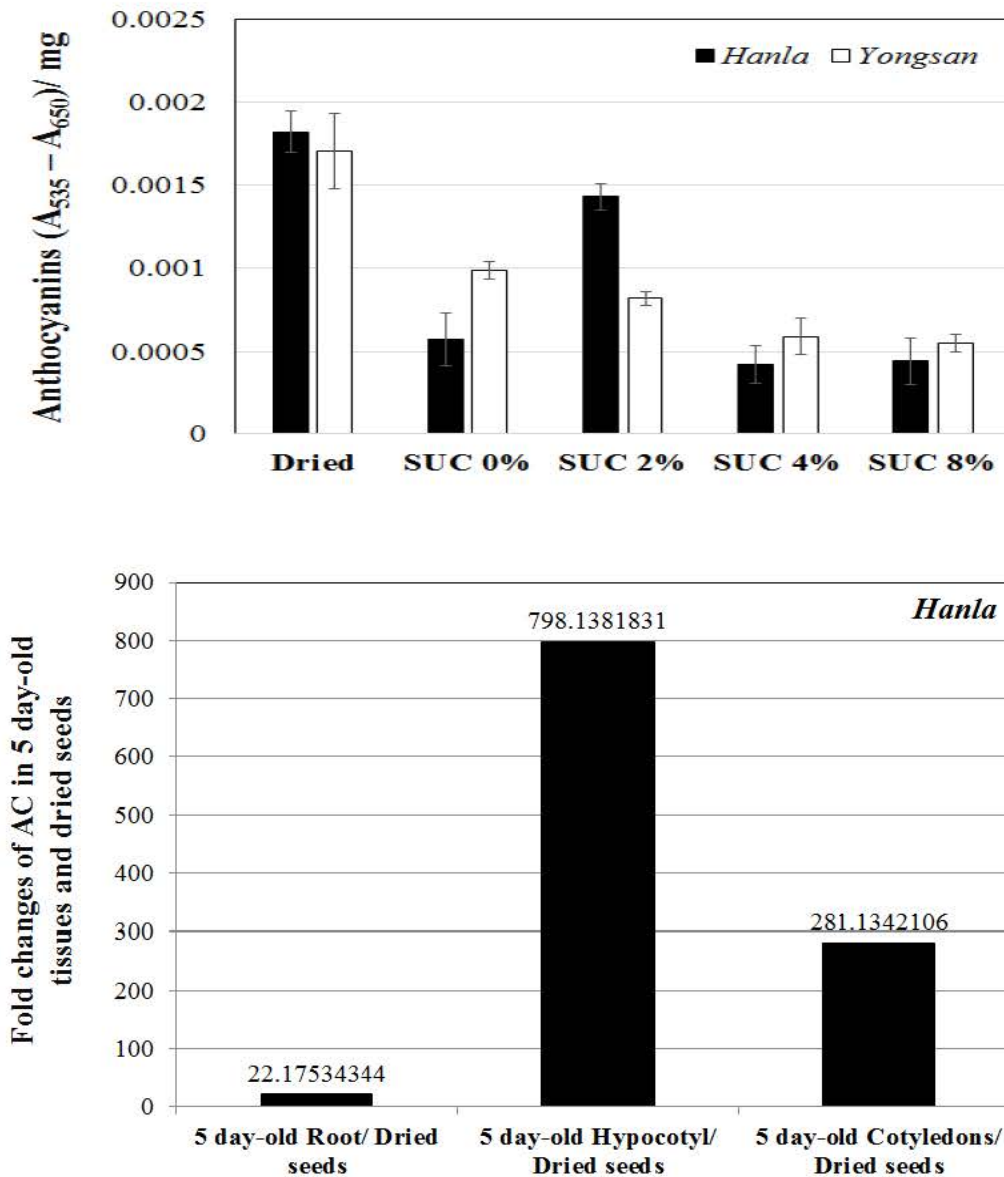


그림 36. 유채 품종 (한라, 영산)의 안토시아닌 함량 조사 (어린 식물 및 종자)



• 우리는 또한 유채 품종 중 한라와 영산에서 수크로스 농도를 달리 처리하여 플라보노이드의 함량 변화를 조사하였는데 품종 간의 큰 차이는 보이지 않았다. 이 두 종류의 품종 중 한라 라인에서 형질전환이 훨씬 수월하게 진행되었기에 우리는 본 과제에서 한라 품종으로 형질전환을 진행하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 4일 제에 가장 많은 플라보노이드가 관측되었으며, 조직별로는 하배축에서 가장 많이 나타났다. 이러한 현상은 모델식물인 예기장대에서도 동일하게 나타났는데 이는 대부분의 식물에 공통되는 현상으로 판단된다. 아주 어린 시기에 플라보노이드가 다량 축적되는 이유는 스트레스에 민감한 시기라 이의 선제적 대처 방법으로 미리 플라보노이드를 다량 축적하는 것으로 알려져 있다.

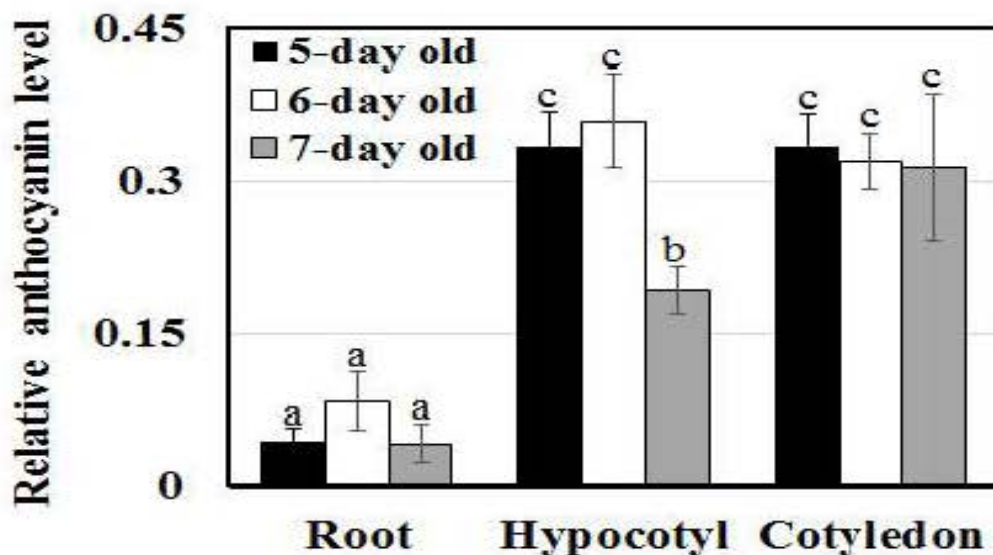
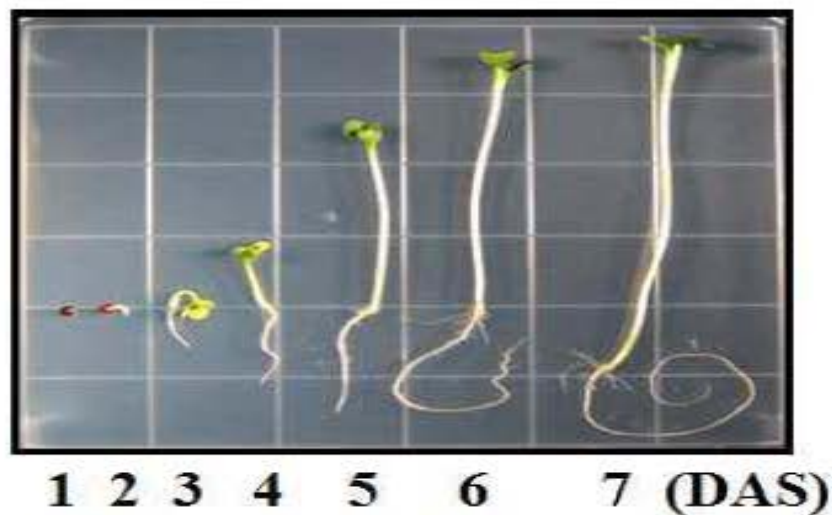
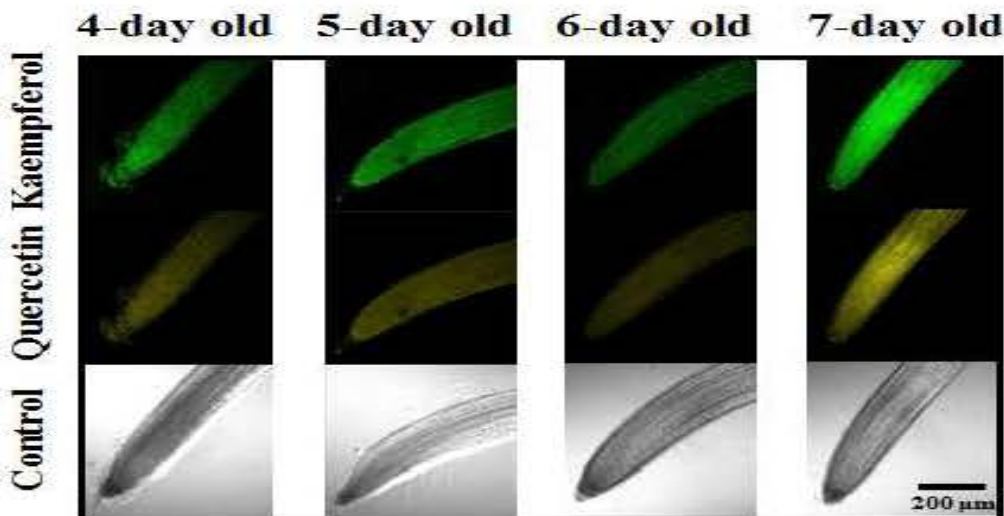


그림 37. 유채 (한라 품종)의 생장 시기별 안토시아닌 함량 조사

• 유채 품종에서 어린 식물에서 생장 시기별 안토시아닌 함량을 분석하였기에 다음으로는 플라보놀의 함량을 분석하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 7일째 식물에서 플라보놀의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나 이 경우에는 뿌리 끝 플라보놀의 함량만 조사 가능하기 때문에 전체 식물에서는 차이를 보일 수도 있다. 이 점을 개선하기 위하여 우리는 아래에서 유채 형질전환체에서 플라보놀을 분석할 경우에는 HPLC 방법 등의 정량적 방법을 이용하였다. 한라와 영산에서 큰 차이가 발견되지 않았고 형질전환은 한라 품종을 이용하여 이루어졌기에 한라를 주된 품종으로 하여 추후의 모든 분석 실험이 진행되었다. 이와 더불어 ABA, GA3와 같은 호르몬 혹은 NaCl, mannitol과 비생물적 스트레스를 처리할 경우 유채에서 플라보놀의 함량이 어떻게 변화하는 지를 조사하고자 분석을 실시하였다. 수크로스도 함께 처리하였는데 그 이유는 수크로스가 식물의 플라보노이드 합성 촉진에 가장 효과적인 신호 물질 중의 하나이기 때문이다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 처리한 각종 시그널에 의해 플라보놀이 상당히 많이 축적됨을 확인할 수 있었다(그러나 특이하게도 ABA는 플라보놀을 그렇게 많이 증진시키지는 않는 것으로 나타났다. ABA와 같은 경우는 그러나 안토시아닌의 합성은 촉진하는 호르몬으로 보고되어 있기에 이 결과는 흥미로운 것으로 판단된다). 이러한 결과는 플라보놀이 식물의 호르몬 반응 및 스트레스 저항성에도 중요한 인자로 작용할 수 있음을 나타낸다고 할 수 있겠다. 그 작용 기전은 기존에 보고가 된 안토시아닌의 효능과 비슷할 것으로 추측된다. 즉, 플라보놀 또한 식물에서 자외선 차단 효과와 항산화능을 발휘하여 식물의 스트레스 저항성에 일조할 것으로 여겨진다.



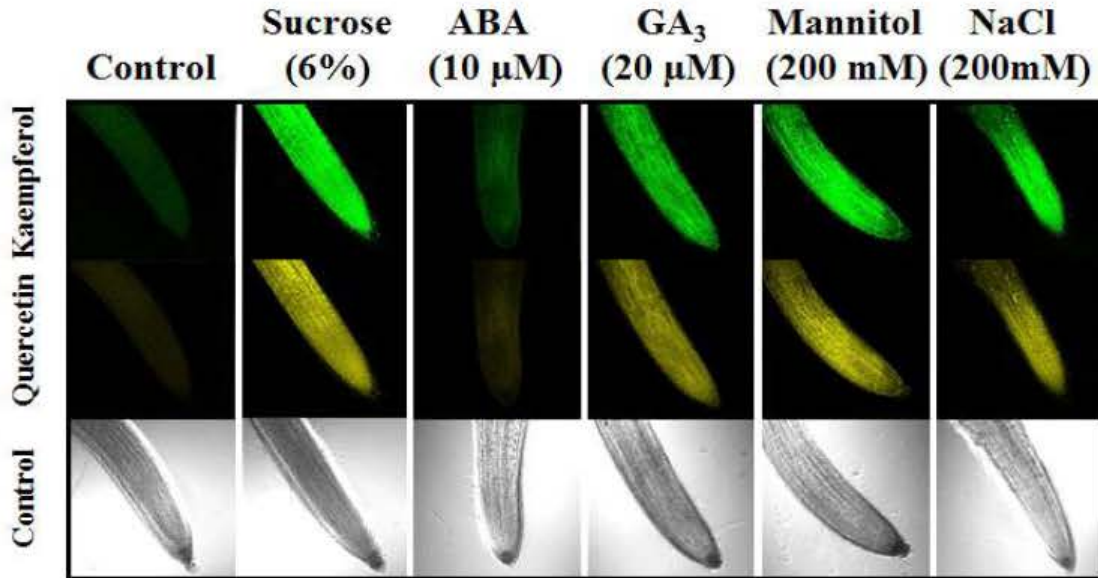


그림 38. 유채 (한라 품종)의 비생물적 스트레스 처리 후 quercetin 및 kaempferol 함량 분석

이번에는 ABA, GA<sub>3</sub>와 같은 호르몬 혹은 NaCl, mannitol과 비생물적 스트레스를 처리할 경우 유채에서 안토시아닌의 함량이 어떻게 변화하는지를 조사하고자 분석을 실시하였다. 수크로스도 함께 처리하였는데 그 이유는 수크로스가 식물의 플라보노이드, 특히 안토시아닌 합성 촉진에 가장 효과적인 신호 물질 중의 하나이기 때문이다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 처리한 각종 시그널에 의해 안토시아닌 상당히 많이 축적됨을 확인할 수 있었다. 그러나 플라보놀의 경우와는 달리 이번에는 ABA에 의해서 안토시아닌의 함량이 증가하였고, 반면 GA 호르몬에 의해서는 감소하는 것을 발견하였다. 이는 안토시아닌 합성과 플라보놀의 합성이 서로 다른 호르몬 및 작용 기전에 의하여 그 합성이 조절되고 있다는 증거라고 생각된다.

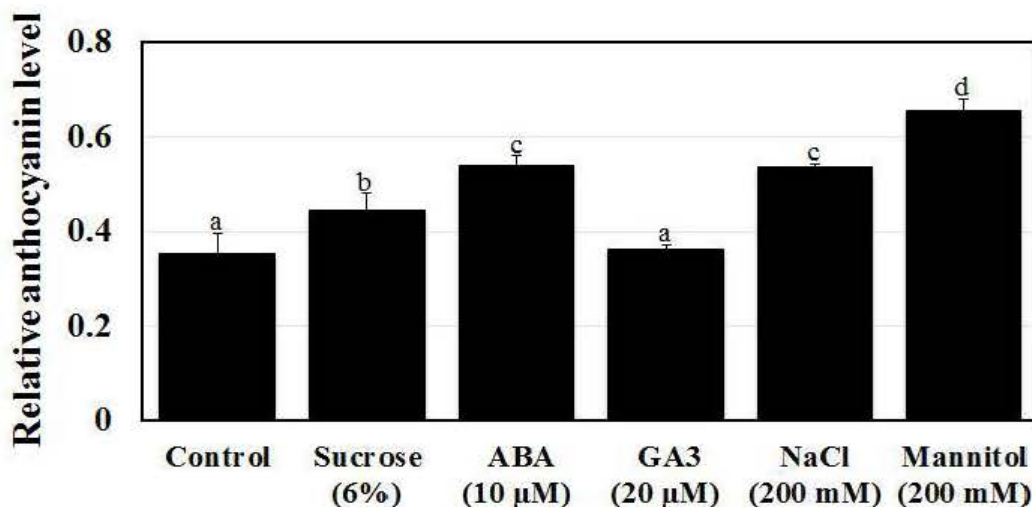
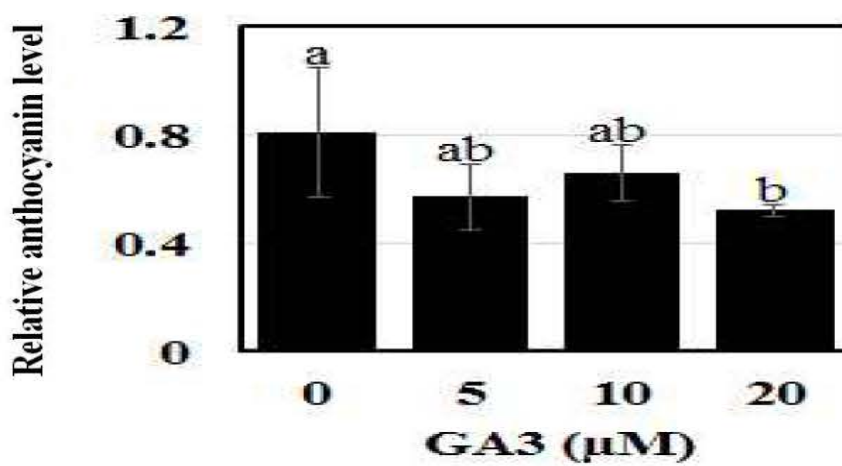
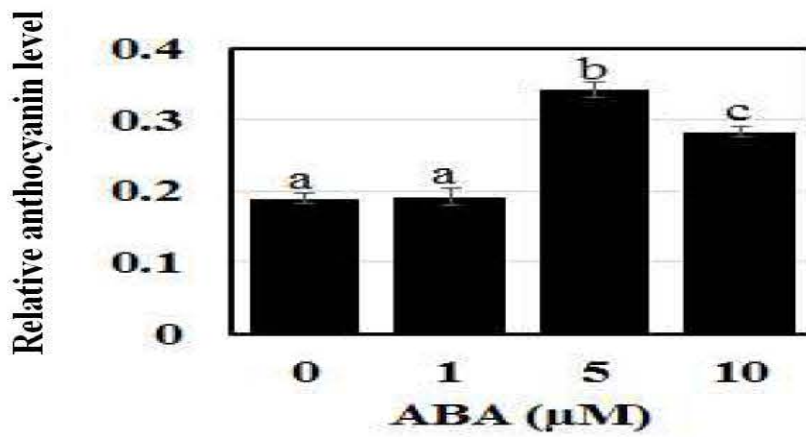
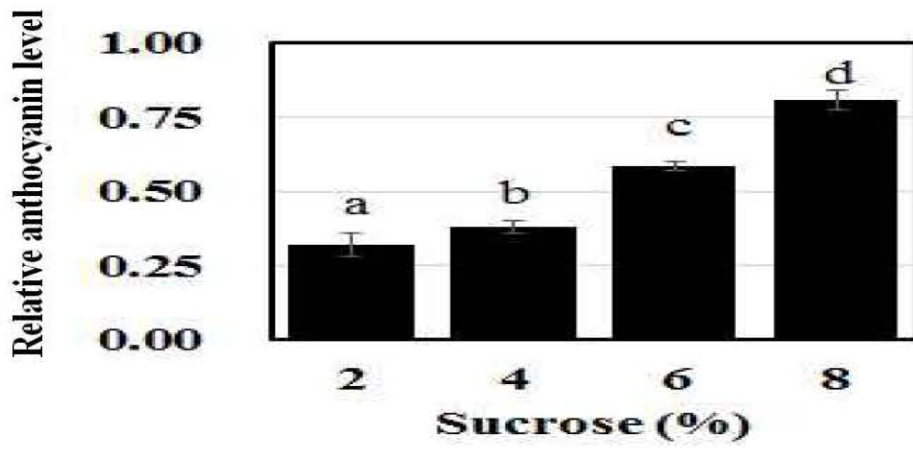


그림 39. 유채 (한라 품종)의 성장 시기별 플라보노이드 및 비생물적 스트레스 처리 후 안

토시아닌 함량 분석



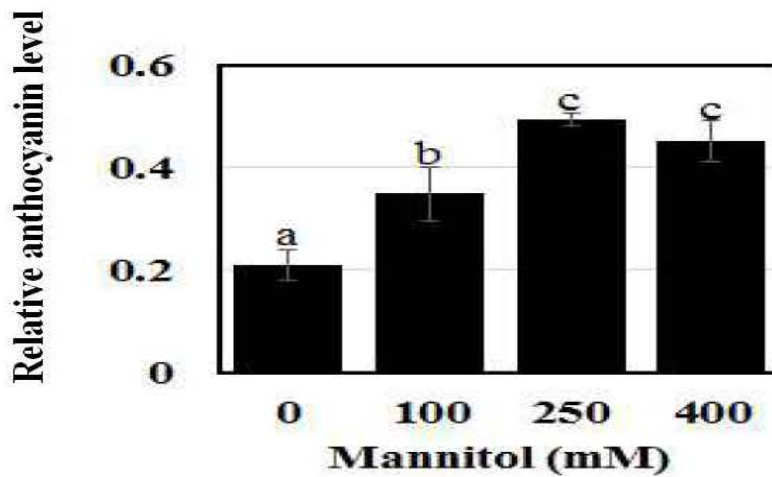
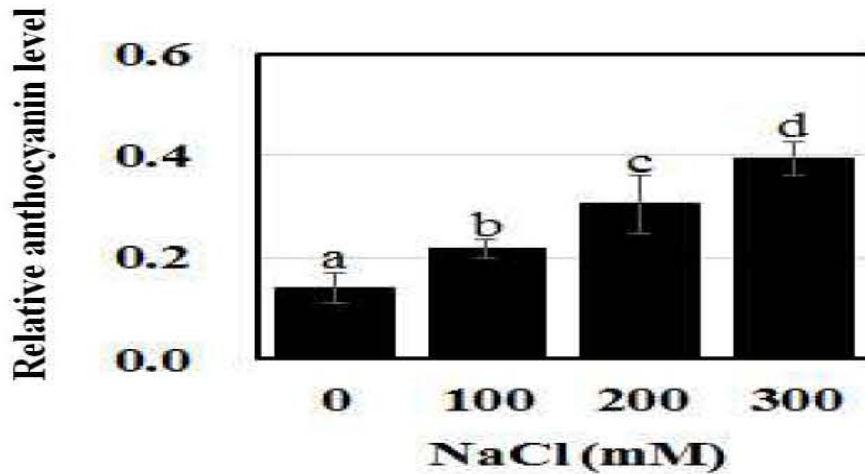


그림 40. 유채 (한라 품종)의 비생물적 스트레스 농도별 처리 후 안토시아닌 함량 분석

• 이번에는 ABA, GA3와 같은 호르몬 혹은 NaCl, mannitol과 비생물적 스트레스 및 수크로스를 처리할 경우 유채에서 산화억제력이 어떻게 변화하는 지를 조사하고자 분석을 실시하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 처리한 각종 시그널에 의해 유채에서 항산화능을 가지는 물질의 축적이 증가하는 것으로 보인다. 앞선 결과에서 안토시아닌 및 플라보놀의 축적 양상과는 살짝 다른 경향을 보였는데 특히, 고염에 대한 반응에서 유채가 가장 많은 항산화 물질을 축적하는 것으로 나타났다. 이는 안토시아닌 합성과 플라보놀의 합성이외에도 다른 종류의 항산화 물질이 고염에 의하여 합성되었음을 시사한다. 아마도 식물이 처하는 가장 열악한 스트레스 환경 중의 하나가 고염 스트레스일 것으로 판단되기도 한다.

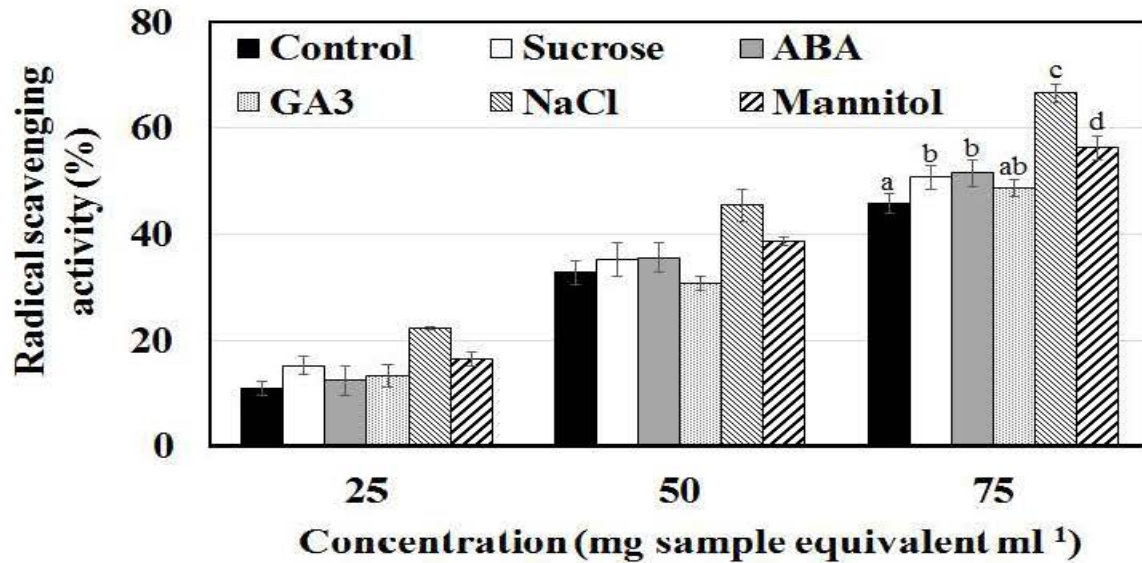


그림 41. 유채 (한라 품종)의 비생물적 스트레스 등 처리 후 항산화능 분석

• 유채의 이차대사산물 분석을 위하여 아래와 같이 문헌을 조사하였다(2013 년 JEB, May 22 by Qu C et al.). 유채는 애기장대와 같은 십자화과 식물이라 그 이차대사경로는 애기장대와 아주 유사한 것으로 보여진다. 페닐알라닌을 최초 전구체로 하여 나린제닌 등이 합성되고 여기에서 프로안토시아니딘이 합성되며 또한 kaemferol등의 플라보놀이 합성되어 나온다.

## 유체의 플라보노이드 함량과 항산화능

Organ	DPPH inhibition IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Total flavonoids μg/mg dry wt
Inflorescences	13.7 ± 0.2	48.7 ± 0.9
Leaves	25.3 ± 1.0	25.0 ± 1.5
Roots	30.1 ± 1.6	0.9 ± 0.9
Stems	13.9 ± 0.5	6.4 ± 0.2
Seeds	10.2 ± 0.4	11.9 ± 0.5

## 유체의 플라보노이드 성분분석

Peak	Metabolites	Stem	Leaf	Inflorescence
8	Quercetin trihexoside	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.12 ± 0.41 <sup>b</sup>
12	Isorhamnetin dihexoside	-	-	1.55 ± 0.28
13	Kampferol hydroxyferuloyl dihexoside	-	0.06 ± 0.00	-
17	Quercetin sinapoyl trihexoside	-	1.24 ± 1.42 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.10 <sup>b</sup>
20	Kaempferol sinapoyl dihexoside	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.82 ± 0.12 <sup>b</sup>	-
21	Kaempferol feruloyl dihexoside	-	3.8 ± 0.27	-
22	Isorhamnetin 3,7-O-β-D-diglucoside	1.08 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.18 <sup>a</sup>	8.8 ± 1.70 <sup>b</sup>
24	Kaempferol-3-O-sophoroside	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.31 ± 0.51 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.37 <sup>c</sup>
26	Quercetin dihexoside	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.98 ± 0.08 <sup>b</sup>
29	Rutin	-	5.37 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.00 ± 0.29 <sup>a</sup>
34	Isoquercetrin	-	-	0.57 ± 0.00
40	Isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside	0.99 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.44 <sup>a</sup>	26.49 ± 0.35 <sup>b</sup>

- indicates absence of flavonoid. Letters depict the significance ( $P < 0.05$ ) of differences in mean values when analysed by one-way analysis of variance (ANOVA). In each row different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

그림 42. 유체의 플라보노이드 성분 분석

### 2. 플라보놀 합성 유전자 유체 *BnFLS1* 유체 형질전환체 특성 규명

- 유체에서 플라보놀의 축적을 증가시키기 위하여 우리는 애기장대에서 알려진 *Flavonol synthase* 유전자의 염기 서열을 이용하여 유체에서 *FLS1* 유체 유전자를 클로닝하고 *BnFLS1* 이라 명명하였다. 아미노산 서열을 분석하여 보면 유체의 *FLS1*은 애기장대의 *FLS1*과 아주 비슷하나 약간의 변이가 있는 것으로 확인되었다.





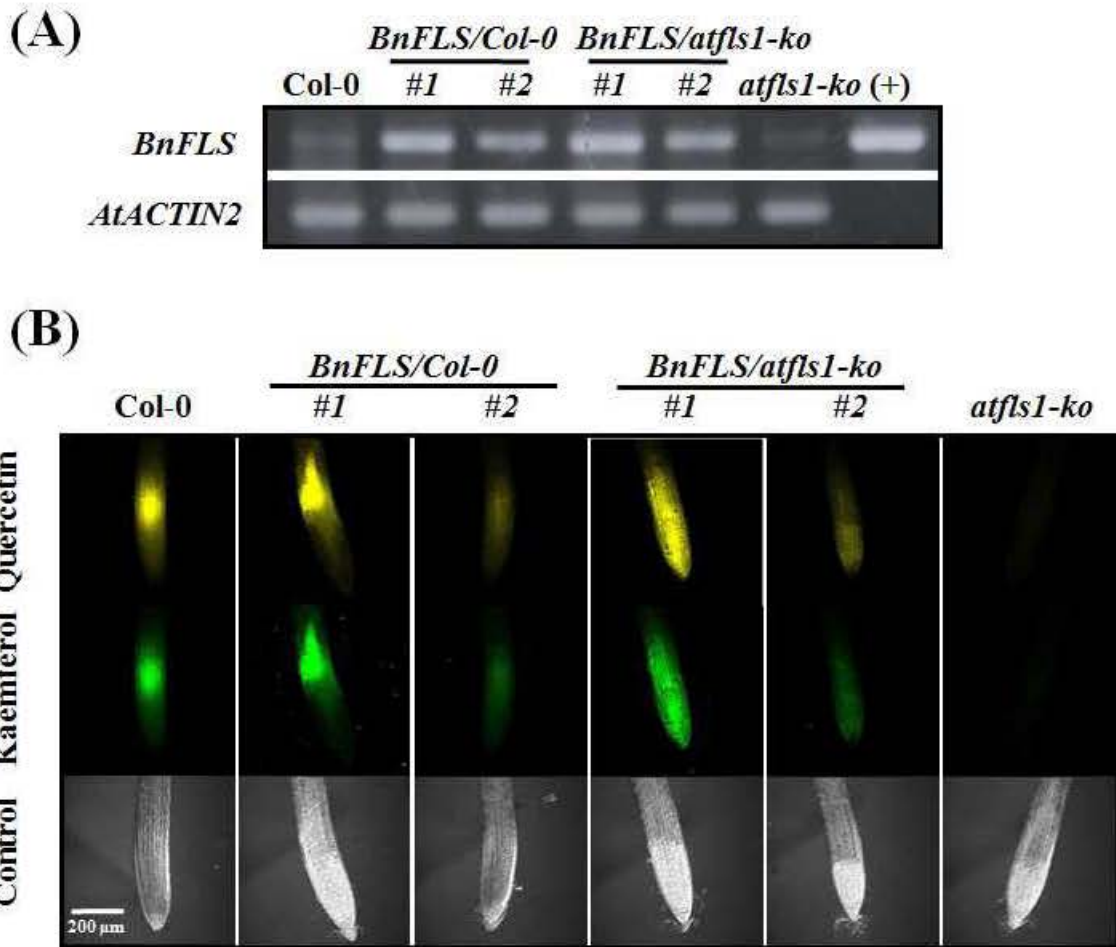


그림 44. 유제 *BnFLS1*의 기능 검정을 위한 **complementation** 분석

• 이번에는 ABA, GA3와 같은 호르몬 혹은 NaCl, mannitol과 비생물적 스트레스를 처리할 경우 유체에서 *BnFLS1* 유전자의 발현이 어떻게 변화하는 지를 조사하고자 큐알티 피시알 분석을 실시하였다. 수크로스도 함께 처리하였는데 그 이유는 수크로스가 식물의 플라보노이드, 특히 안토시아닌 합성 촉진에 가장 효과적인 신호 물질 중의 하나이기 때문이다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 처리한 ABA와 만니톨에 의해 *BnFLS1*의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *BnFLS1* 유전자가 식물의 스트레스 저항성에도 일정 부분 기여할 가능성이 크다는 사실을 제시하는 결과라고 생각된다.

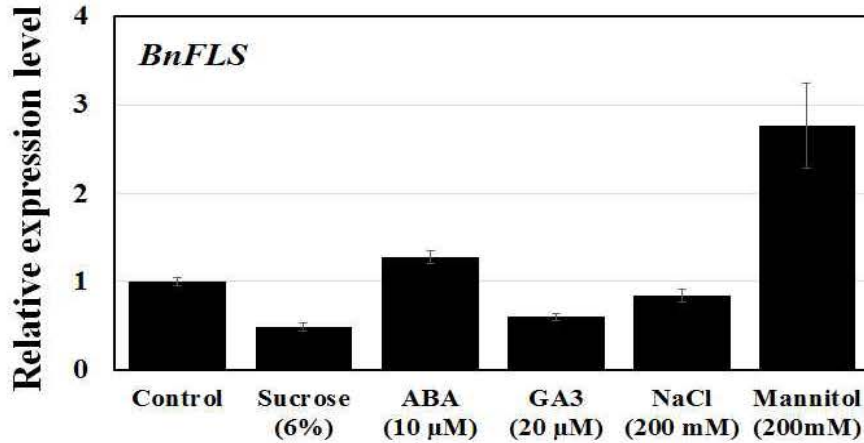


그림 45. 유채 BnFLS1의 발현 유도 인자 분석

• 유채의 *BnFLS*은 아래와 같이 바스타 저항성 벡터에 클로닝을 하였고, 35S CaMV 프로모터를 사용하였다. 수십 개의 유채 (한라 품종) 형질전환체를 얻었으며 그 중에서 바스타 스트립 테스트를 이용하여 형질전환체를 선별하였다. 또한, 우리가 도입한 *BnFLS* 유전자가 잘 발현되는 지를 알아보기 위하여 유채 형질전환체를 항생제가 들어있지 않은 배지에서 일정 기간 증식하여 얻은 조직들을 확보하여 total RNA를 추출하였다. 이 RNA에서 cDNA를 합성하였고 도입유전자 construct에만 존재하는 염기 서열을 이용하여 프라이머를 제작하고 피시알을 수행하였다. 아래에 보이는 바와 같이 *BnFLS1* 유전자가 잘 발현되고 있음을 확인하였다.

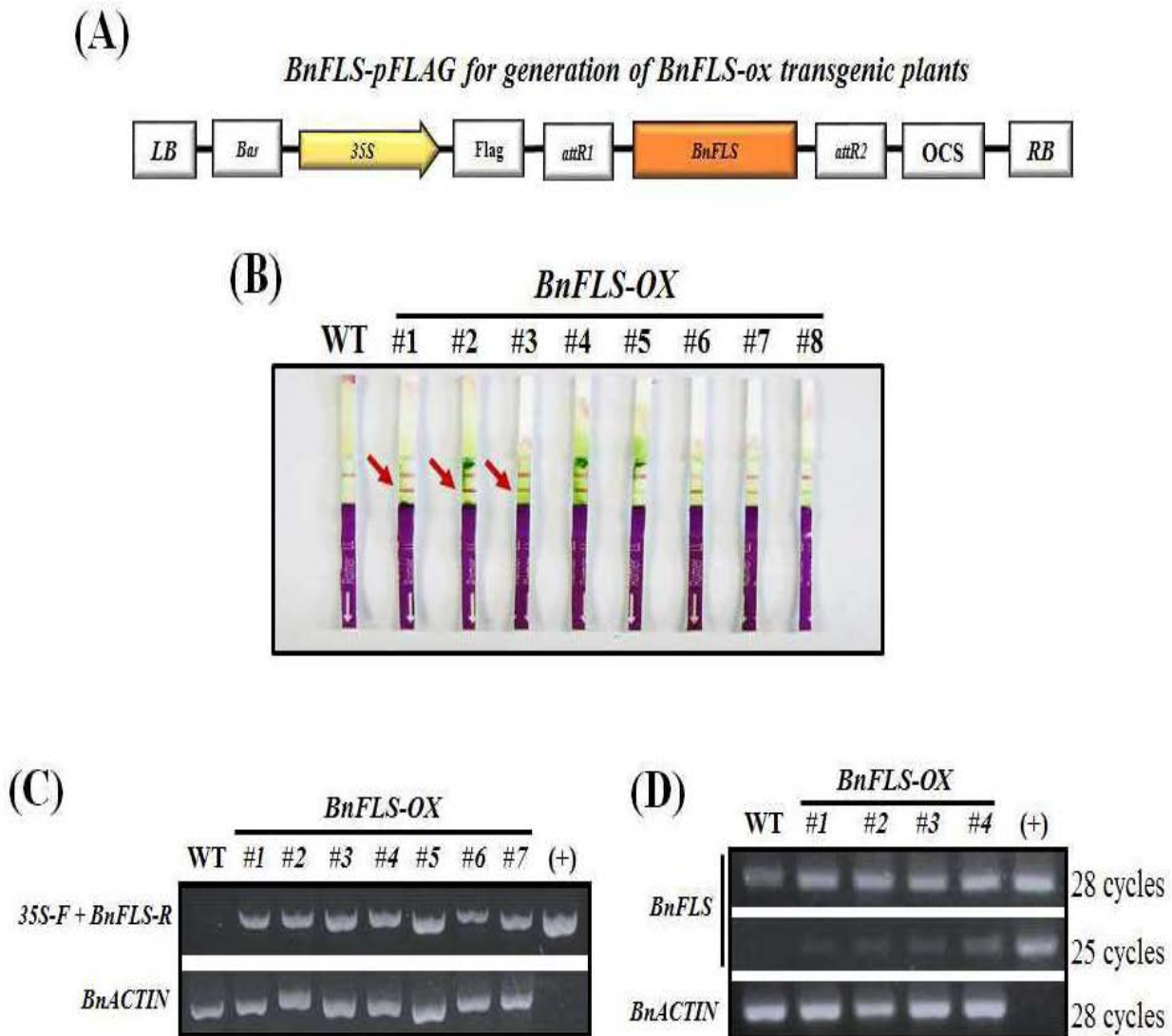
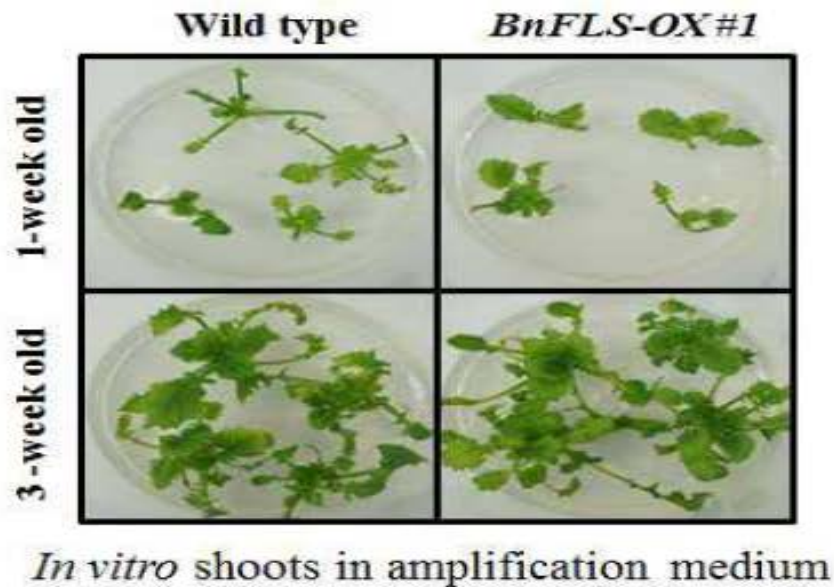


그림 46. 유채 유전자 *BnFLS1*의 확보와 *BnFLS1* 유전자 과발현 라인 분석

• 유채의 *BnFLS1* 형질전환체의 생육을 조사한 결과 아래와 같이 정상 배지에서 다른 차이 없이 잘 자라는 것을 확인하였다. 특정 스트레스 저항 물질의 과다발현은 종종 정상조건에서 작물의 성장 자체를 억제하는 경우가 있어 이와 같은 관찰을 실시하였다. 합생체가 들어있지 않은 정상 배지에서 증식한 유채 조직을 이용하여 안토시아닌의 함량을 조사하였다. 이 실험을 한 이유는 *BnFLS1* 유전자의 과발현은 플라보놀 함량 증가를 기대하게 하기 때문이다. 한정된 대사전구체로 인해 플라보놀 방향으로 합성이 주로 일어날 경우 안토시아닌의 함량은 줄어들 수도 있다. 우리가 예측한 바와 같이 정상조건에서는 *BnFLS1* 형질전환체에서 안토시아닌의 함량이 다소 적은 것으로 나타났다. 어떤 라인의 경우에는 안토시아닌의 함량이 높게도 나타났다. 그러나, 플라보놀 합성의 가장 강력한 신호 물질의 하나인 수크로스를 처리했을 경우에는 정상 개체에서는 안토시아닌의 합성이 대폭 증가하였으나, *BnFLS1* 형질전환체에서는 거의 증가가 없는 것으로 나타났다. 이는 Flavonol synthase의 과발현으로 말미암아 안토시아닌의 합성으로 가는 대사 방향이 순조롭게 이루어지지 않았음을 나타내는 것으로 보인다.

(A)



(B)

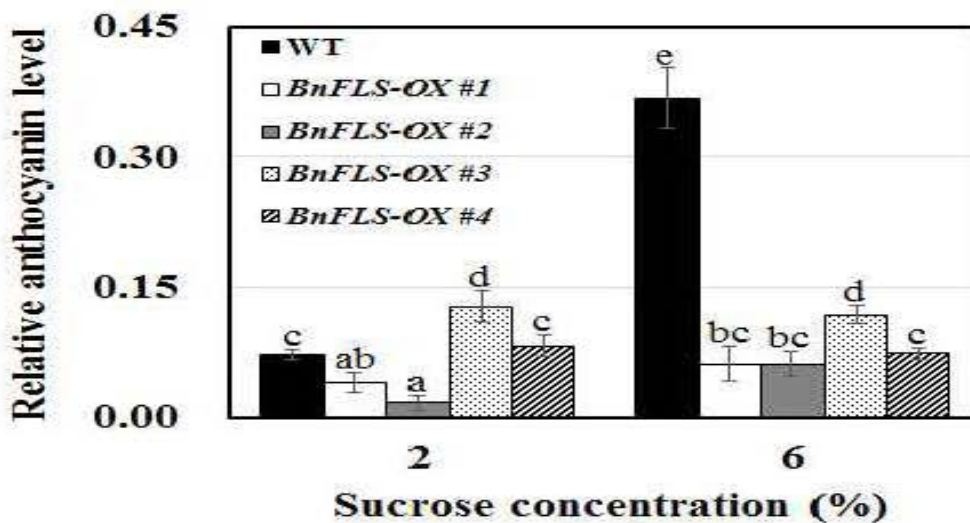


그림 47. 유체 *BnFLS1* 형질전환체의 성장 및 안토시아닌 함량 분석

• 유체의 *BnFLS1* 형질전환체에서 안토시아닌은 감소하는 결과를 얻었기 때문에 우리는 다음으로 우리가 목적하던 플라보놀의 함량은 어떻게 변화했는지를 보았다. 항생제가 들어있지 않은 정상 배지에서 증식한 유체 조직을 이용하여 플라보놀의 함량을 뿌리 조직의 끝을 염색하

는 방법을 통하여 조사하였다. 이 실험을 한 이유는 *BnFLS1* 유전자의 과발현은 플라보놀 함량 증가를 기대하게 하기 때문이다. 정상 개체에 비하여, *BnFLS1* 형질전환체에서 플라보놀의 함량이 상당히 증가한 것으로 나타났다. 이는 Flavonol synthase의 과발현으로 말미암아 플라보놀의 합성으로 가는 대사 방향이 순조롭게 이루어졌음을 나타내는 것으로 보인다.

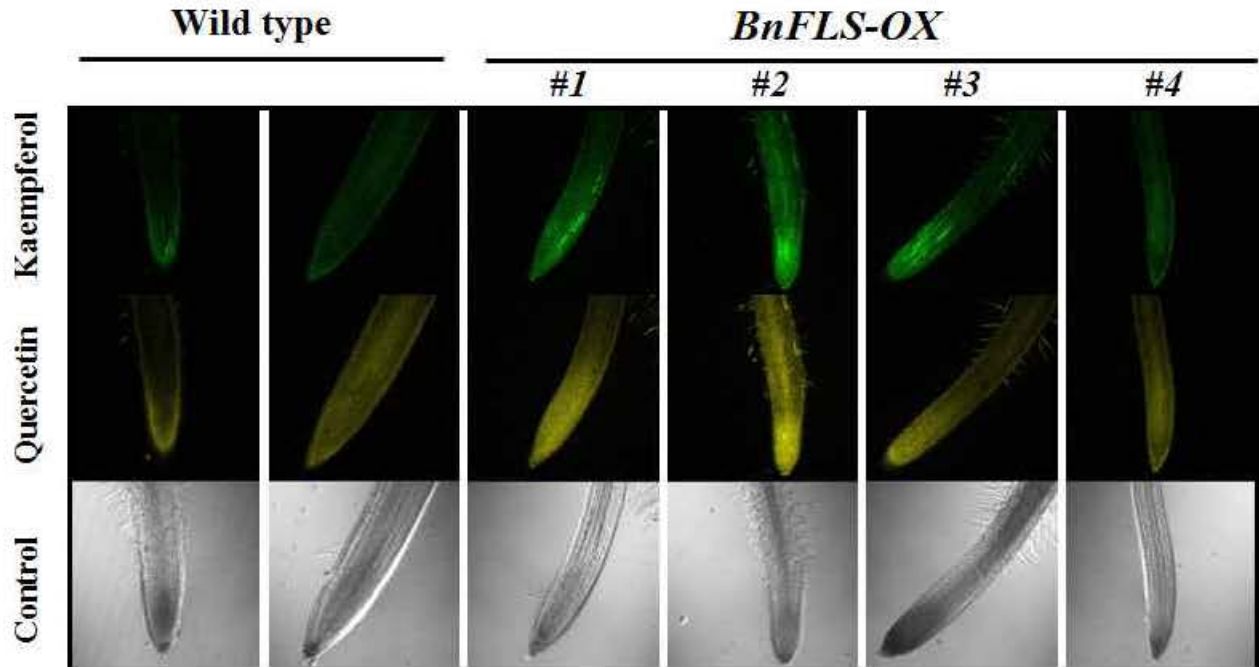


그림 48. 유체 *BnFLS1* 형질전환체의 플라보놀 함량 분석 (염색법 이용)

• 위의 실험에서는 플라보놀 염색법을 사용한 관계로 우리는 다음으로 정량적인 방법을 이용하여 플라보놀의 함량을 다시 조사하기로 하였다. 항생제가 들어있지 않은 정상 배지에서 증식한 유체 조직을 건조시켜 HPLC 방법을 이용하여 이번에는 전체 조직에서 플라보놀의 함량을 조사하였다. 이 실험을 한 이유는 뿌리 조직과 전체 조직에서의 플라보놀 함량이 다를 수도 있기 때문이다. 정상 개체에 비하여, *BnFLS1* 형질전환체에서 플라보놀의 함량이 상당히 증가한 것으로 나타났다. 이는 Flavonol synthase의 과발현으로 말미암아 플라보놀의 합성으로 가는 대사 방향이 순조롭게 이루어졌음을 나타내는 것으로 보인다. 이 방법은 플라보놀에서 당을 제거하고 HPLC를 이용하여 전체 플라보놀의 함량을 분석한 것이다.

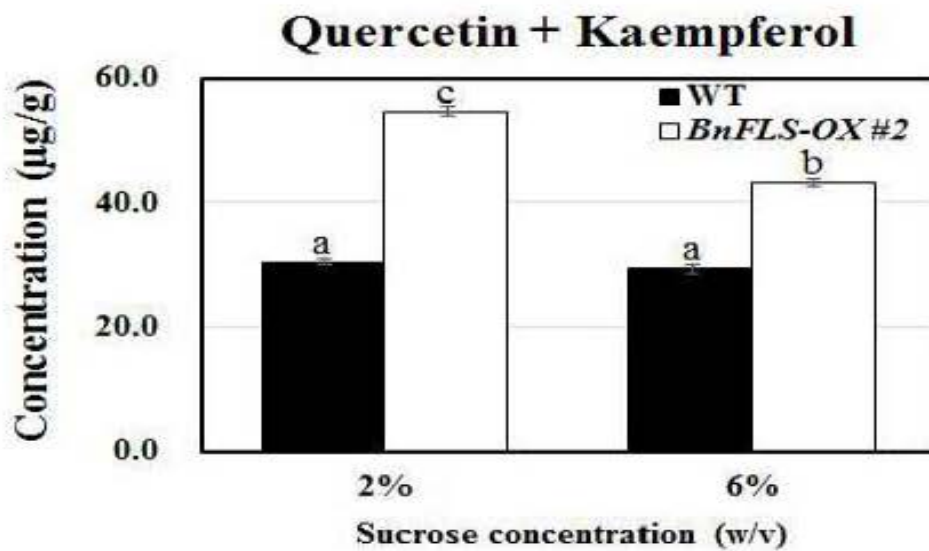
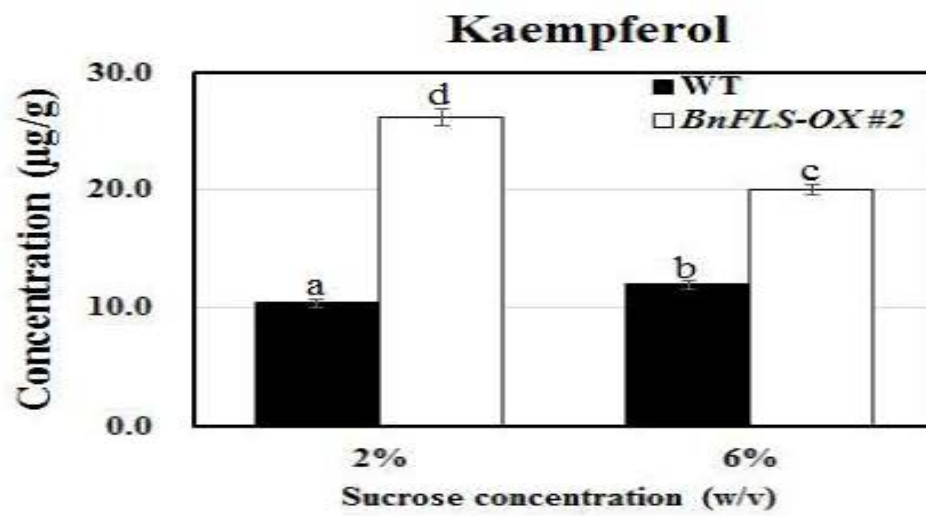
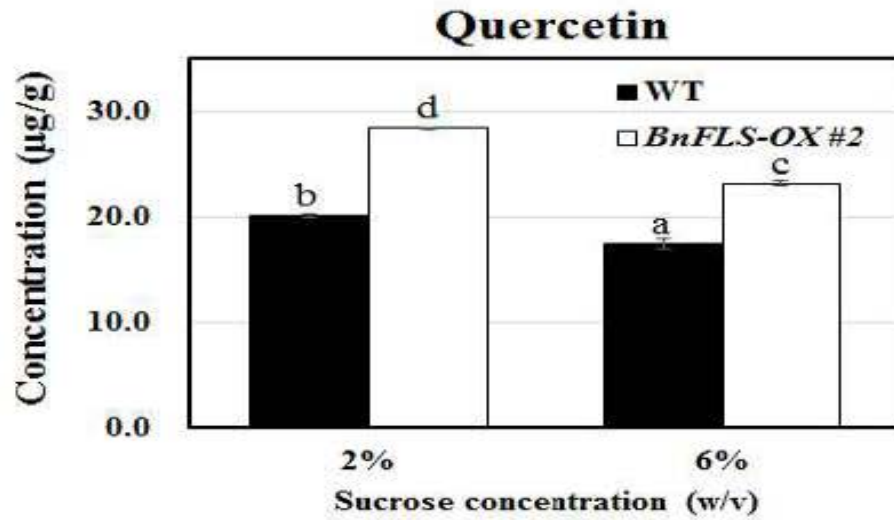


그림 49. 유체 *BnFLS1* 형질전환체의 플라보논 함량 분석 (염색법 이용)

• *BnFLS1* 형질전환체에서 증가된 플라보논이 항산화능을 가지는지를 알아보기 위하여 DAB 염색을 실시하였다. 이 염색법에 의하면 식물 조직이 산화 물질을 많이 함유하게 되면 처리한 염색약을 갈색으로 변환시키게 된다. 즉, 갈색이 진할수록 식물 조직에는 산화물질이 많이 존재한다는 뜻이다. 항생제가 들어있지 않은 정상 배지에서 증식한 유체 조직에 DAB을 처리한 결과 정상개체에 비하여 *BnFLS1* 형질전환체에서 갈색이 어느 정도 감소되는 현상을 관찰하였다. 이는 플라보논의 증가로 말미암아 정상 개체와 비교하여 형질전환체에서 항산화능 물질이 어느 정도 증가하였음을 증명한다. 이 결과를 정량화하기 위하여 DPPH를 이용한 항산화능 조사 실험을 실시한 결과 *BnFLS1* 형질전환체 일부에서 항산화능이 어느 정도 증가한 것으로 나타났다. 그러나 그 양이 그렇게 많지는 않은 것으로 나타났으며 추후 호모 개체를 확보한 후 보다 더 많은 실험을 진행할 필요가 있다고 보인다.

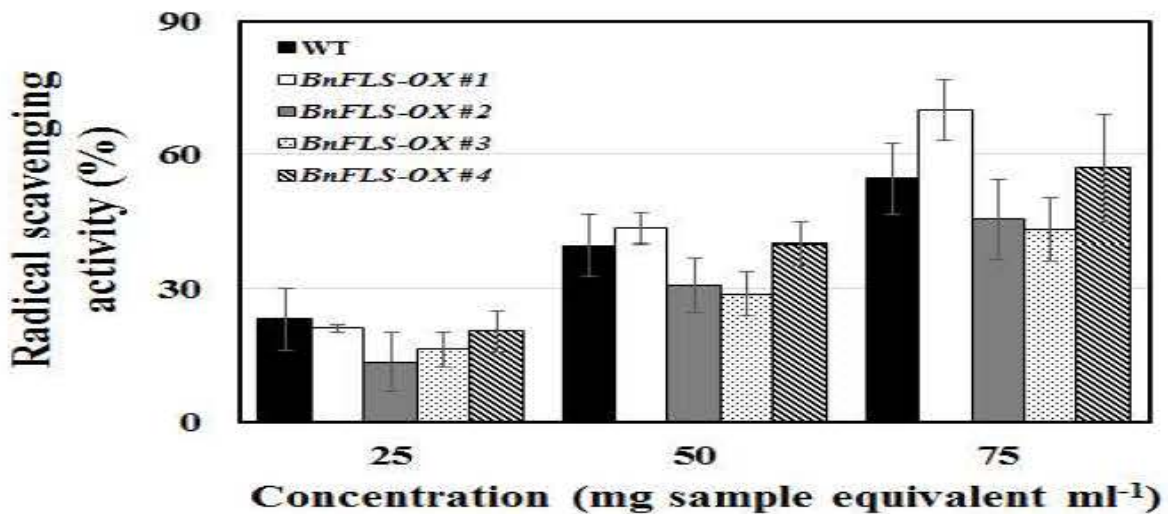
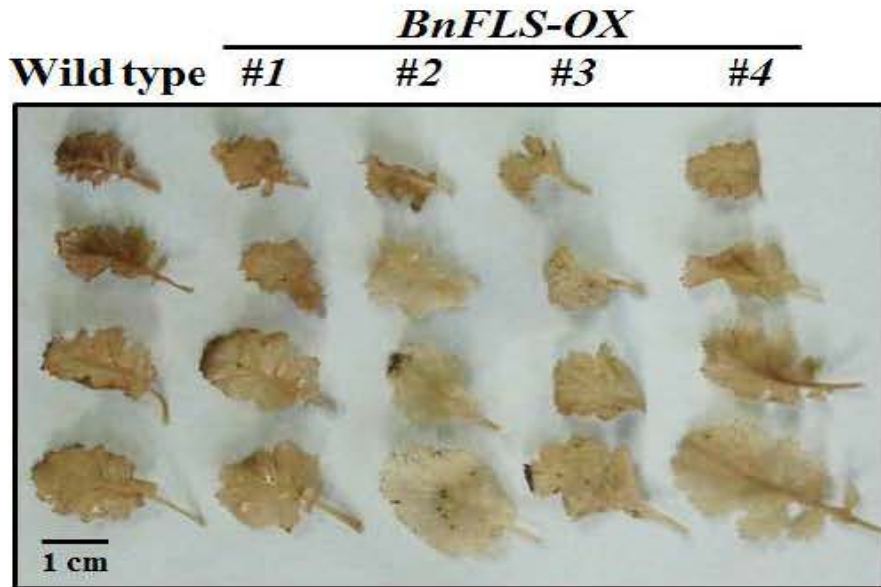


그림 50. 유채 *BnFLS1* 형질전환체의 항산화능 조사

• 유채의 *BnFLS1* 형질전환체의 경우 플라보놀로 합성을 증가시키는 것으로 나타났기 때문에 우리는 다음으로 다른 플라보노이드 합성 유전자들의 발현에는 어떤 영향이 있는지를 조사하고자 하였다. 이를 위하여 항생제가 들어있지 않은 정상 배지에서 증식한 유채 조직을 이용하여 아무 처리도 하지 않은 상태에서 플라보노이드 합성에 관여하는 *CAH*, *CHS*, *DFR*, *UFGT* 등의 유채 유전자를 선별하여 프라이머를 제작하고 알티 피시알을 수행하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 *BnFLS1* 유전자의 과발현은 이들 유전자의 발현에는 그다지 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

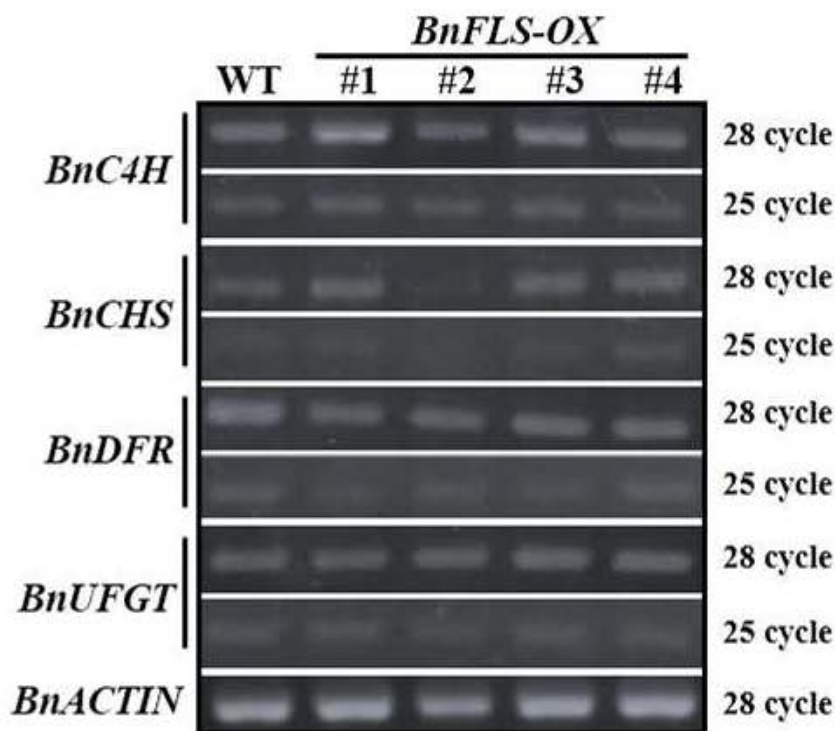


그림 51. 유채 *BnFLS1* 형질전환체에서의 플라보노이드 합성 관련 유전자의 발현 분석

### 3. 안토시아닌 합성 유전자 *AtDFR* 유채 형질전환체 특성 규명

• 유채의 *BnFLS*를 과발현시켜 플라보놀의 증진을 꾀하였기에 우리는 이번에는 안토시아닌의 증진을 유도할 수 있는 *DFR* 유전자를 유채에 형질전환시켰다. 역시 위에서 언급한 *BnFLS1* 유전자와 같이 바스타 저항성 벡터에 클로닝을 하였고, 35S CaMV 프로모터를 사용하였다. 수십 개의 유채 (한라 품종) 형질전환체를 얻었으며 그 중에서 바스타 스트립 테스트를 이용하여 형질전환체를 선별하였다. 또한, 우리가 도입한 *AtDFR* 유전자가 잘 발현되는지를 알아보기 위하여 유채 형질전환체를 항생제가 들어있지 않은 배지에서 일정 기간 증식하여 얻은 조직들



을 확보하여 total RNA를 추출하였다. 이 RNA에서 cDNA를 합성하였고 도입유전자 construct에 만 존재하는 염기 서열을 이용하여 프라이머를 제작하고 피시알을 수행하였다. 아래에 보이는 바와 같이 *AtDFR* 유전자가 잘 발현되고 있음을 확인하였다.

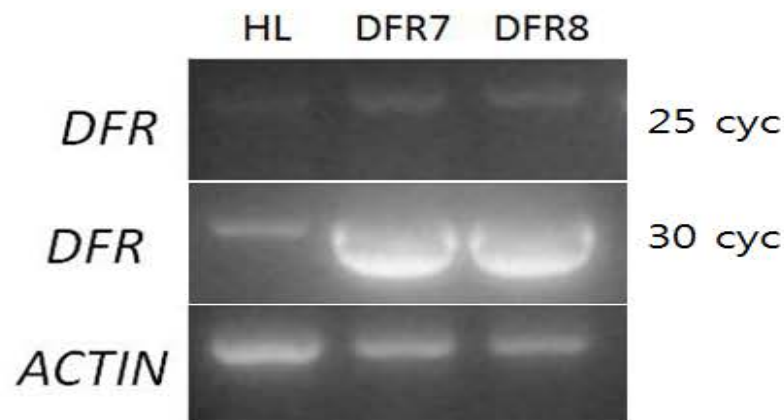
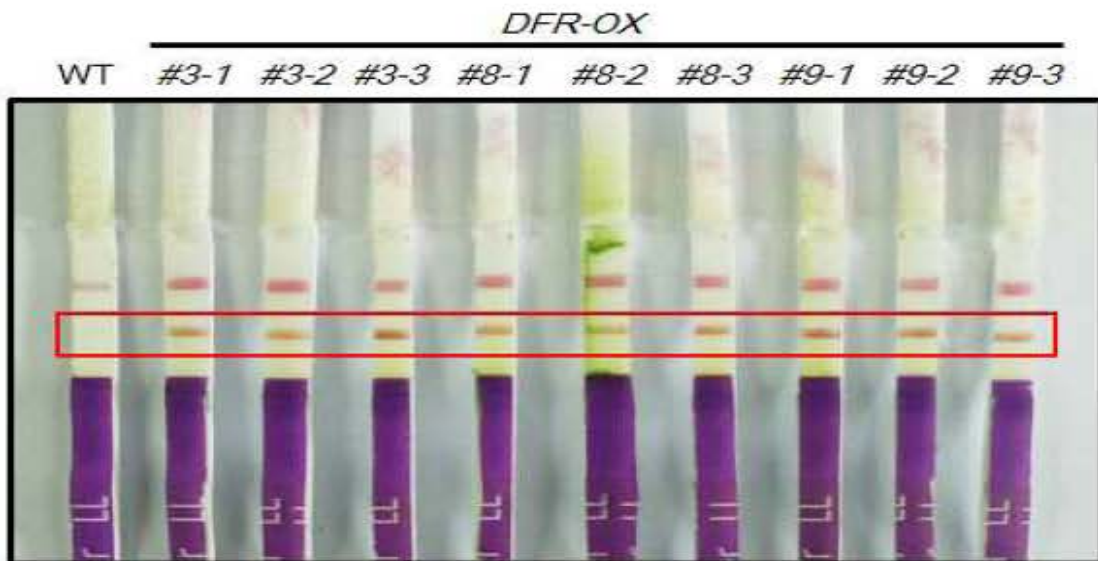


그림 52. 예기장대 유전자 *AtDFR* 과발현 유체 라인 분석

• 유체에 *AtDFR*이 들어간 T2 개체를 얻기 위하여 T1 세대에서 얻은 종자를 화분에 뿌려서 다음과 같이 키웠다. 각 라인별로 수십 개의 종자를 뿌렸고 바스타를 분사하여 살아남는 개체를 사진과 같이 확보하였다. 이 처리에서 살아남은 개체들은 따로 큰 화분에 옮겨 다음 세대 종자를 받기 위하여 증식 중에 있다.

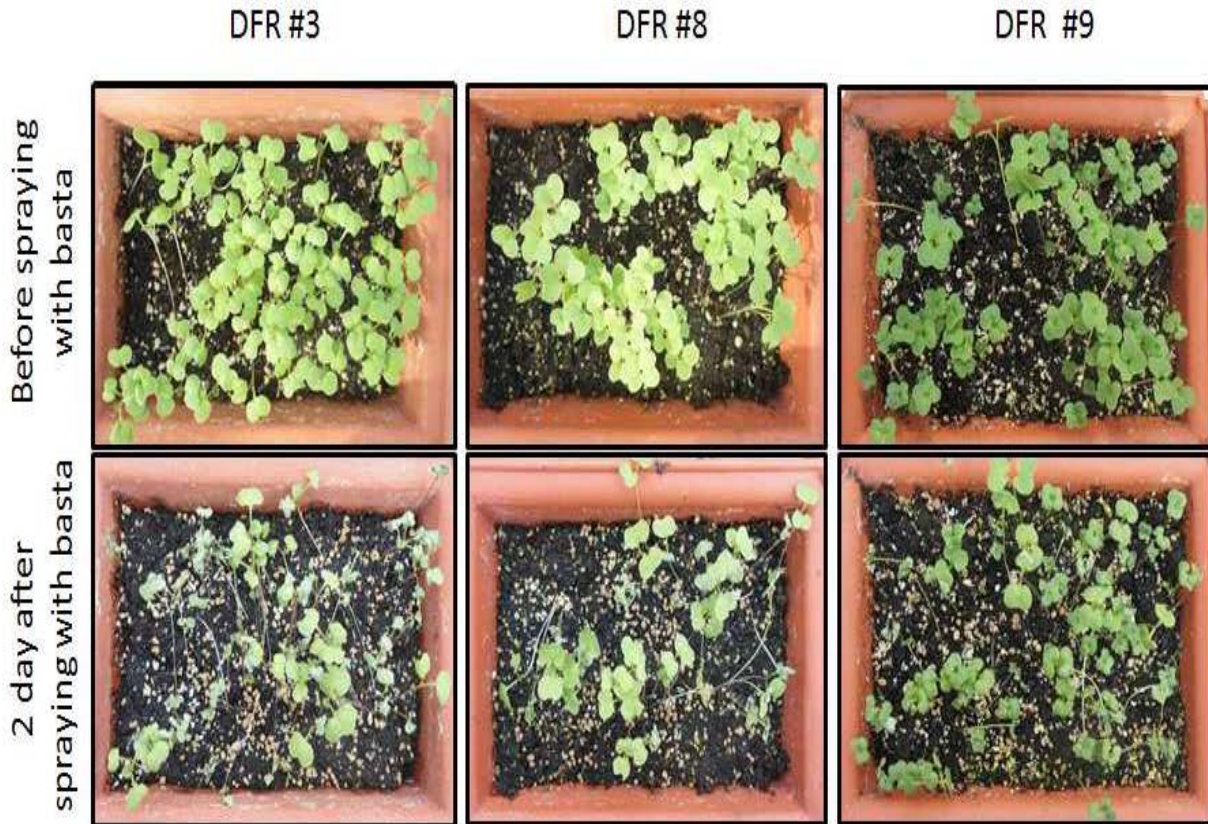


그림 53. 예기장대 유전자 *AtDFR* 과발현 유체 라인 (T2) 바스타 저항성 확인

- *AtDFR*이 과발현 유체에서 우리의 예상대로 안토시아닌의 함량이 증가하였는 지를 조사하였다. 수크로스도 함께 처리하였는데 그 이유는 수크로스가 식물의 플라보노이드, 특히 안토시아닌 합성 촉진에 가장 효과적인 신호 물질 중의 하나이기 때문이다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 안토시아닌이 유체 형질전환체에서 상당히 많이 축적됨을 확인할 수 있었다. 이는 예기장대의 *DFR*이 유체에서도 제대로 잘 작용함을 증명하는 결과라고 할 수 있겠다.

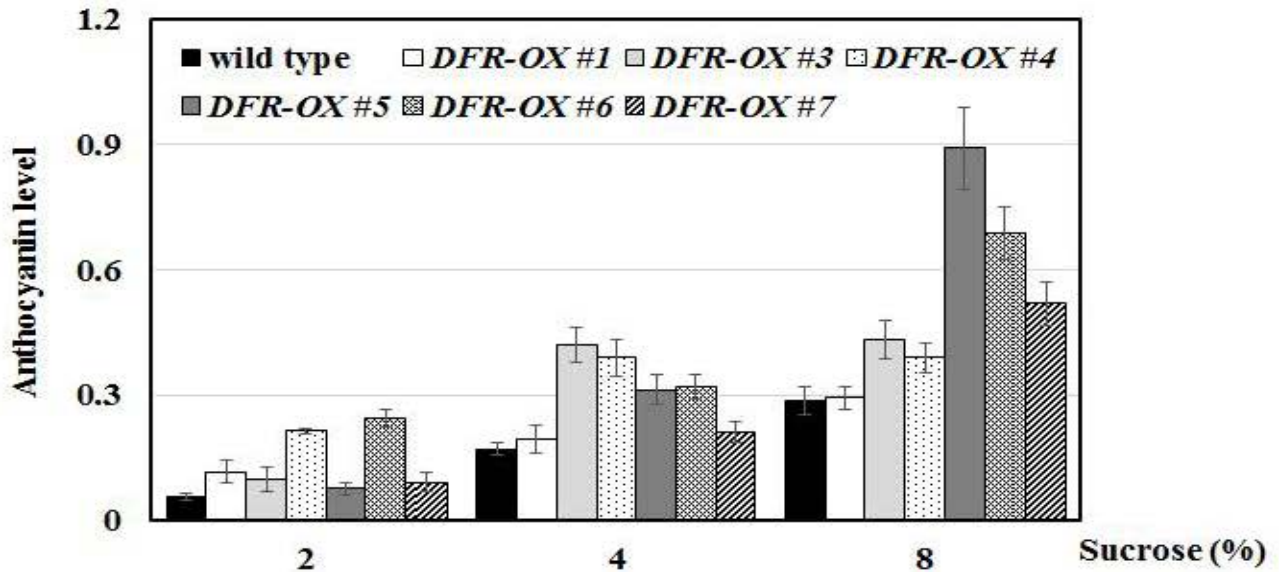
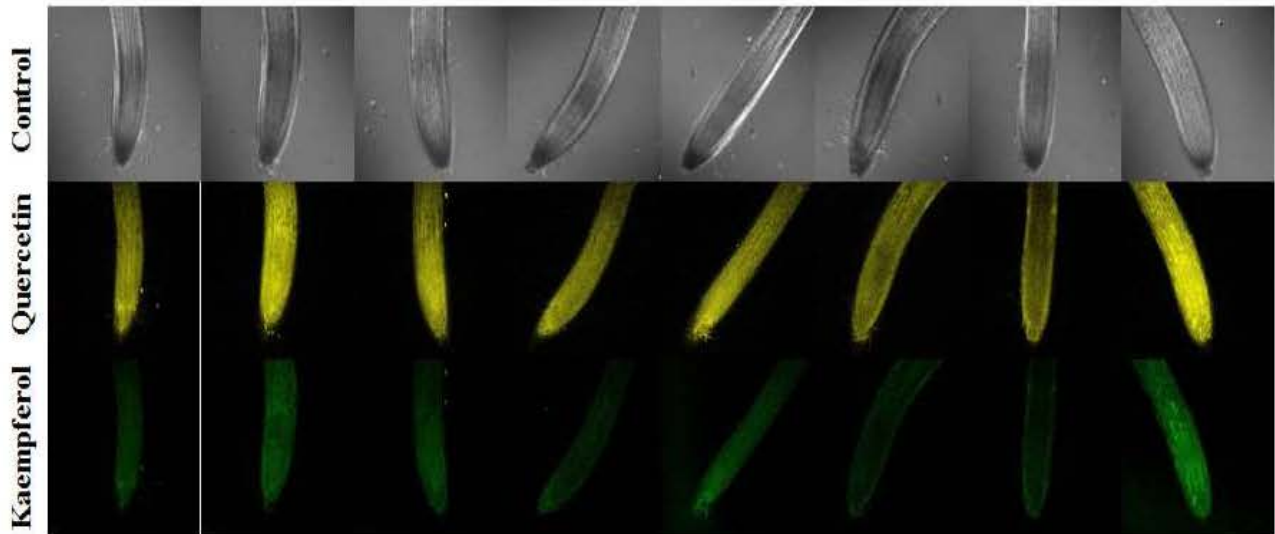


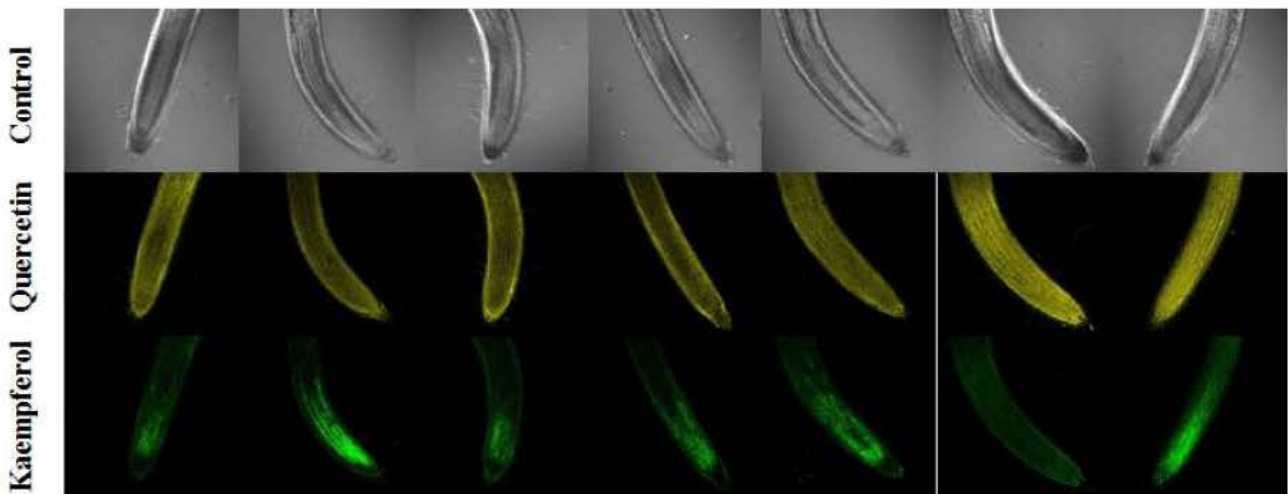
그림 54. AtDFR 유체 형질전환체의 수크로스 처리에 따른 안토시아닌 함량 분석

• 유체의 *AtDFR* 형질전환체에서 우리가 목적했던 안토시아닌은 증가하는 결과를 얻었기 때문에 다음으로 플라보놀의 함량은 어떻게 변화했는지를 보았다. 항생제가 들어있지 않은 정상 배지에서 증식한 유체 조직을 이용하여 플라보놀의 함량을 뿌리 조직의 끝을 염색하는 방법을 통하여 조사하였다. 이 실험을 한 이유는 *AtDFR* 유전자의 과발현은 안토시아닌 함량 증가를 유도하기 때문에 공통으로 전구체를 사용하는 플라보놀의 함량은 감소하는 결과를 초래할 수 있기 때문이다. 정상 개체에 비하여, *AtDFR* 형질전환체에서 플라보놀의 함량이 살짝 감소한 것으로 나타났다. 이는 *AtDFR*의 과발현에도 불구하고 플라보놀의 합성으로 가는 대사 방향에는 그다지 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각해볼 수 있다.

DPBA staining of nontransgenic seedlings.



DPBA staining of DFR #6 T2 transgenic seedlings.



DPBA staining of DFR #8 T2 transgenic seedlings.

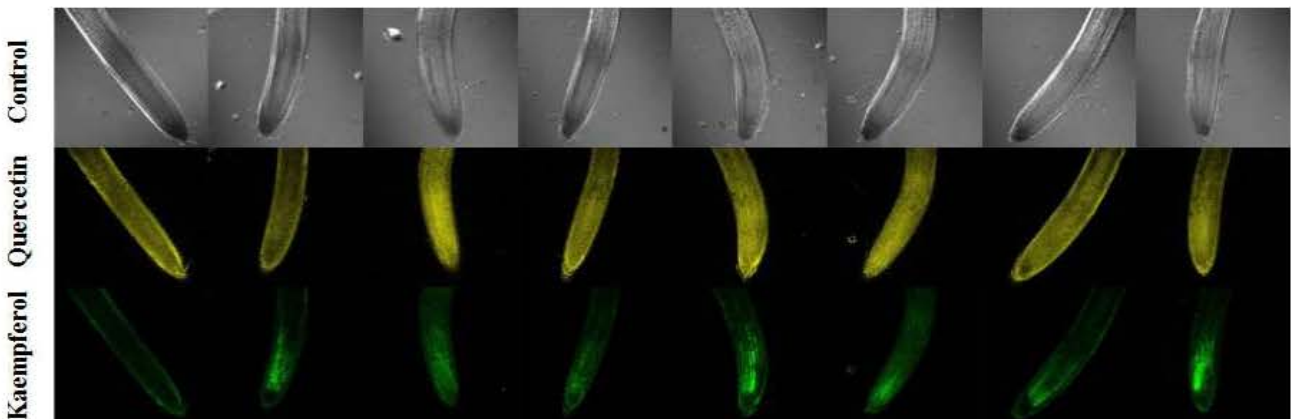


그림 55. AtDFR 유체 형질전환체의 플라보놀 함량 분석 (염색법 이용)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표달성도

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 중생산 입관매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	0						0	0	
	달성	4						2	0	
2차 년도	목표	1						1	1	
	달성	0						3	0	
3차 년도	목표	1	1					2	0	
	달성	2	2					1	0	
4차 년도	목표									
	달성									
5차 년도	목표									
	달성									
계	목표	2	1					3	1	
	달성	6	2					6	0	

### 제 2 절 관련분야에의 기여도

#### 1. 전문학술지 논문 게재

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저 자	공동저자				
2013	A Novel Arabidopsis MYB-like Transcription Factor MYBH Regulates Hypocotyl Elongation by Enhancing Auxin Accumulation.	김준혁	이호정	Nguyen NH, Nguyen NT, Hong SW	Journal of Experimental Botany	64: 3911-3922	국외	SCI
2013	Loss of the R2R3 MYB, AtMyb73, causes hyper-induction of	김준혁	이호정	Nguyen NH, Jeong CY, Nguyen	Journal of Plant Physiology	170: 1461-1465	국외	SCI

	the SOS1 and SOS3 genes in response to high salinity in Arabidopsis.			NT, Hong SW				
2013	TTG1-mediated flavonols biosynthesis alleviates root growth inhibition in response to ABA.	Nguyen HN	이호정	Kim JH, Hyun WY, Nguyen NT, Hong SW	Plant Cell Rep	32: 503-514	국외	SCI
2013	Loss of all three calreticulins, CRT1, CRT2 and CRT3, causes enhanced sensitivity to water stress in Arabidopsis.	김준혁	이호정	Nguyen NH, Nguyen NT, Hong SW	Plant Cell Rep	32: 1843-1853	국외	SCI
2013	Inhibition of histone deacetylation alters Arabidopsis root growth in response to auxin via PIN1 degradation	Nguyen HN	이호정	Kim JH, Jeong CY, Hong SW	Plant Cell Rep	32: 1625-1636	국외	SCI
2015	AtMyb7, a subgroup 4 R2R3 Myb, negatively regulates ABA-induced inhibition of seed germination by blocking the expression of the bZIP transcription factor ABI5.	김준혁	이호정	Hyun WY, Nguyen NH, Jeong CY, Xiong L, Hong SW	Plant Cell & Environment	38: 559-571	국외	SCI
2015	Characterization of Brassica napus Flavonol Synthase Involved in Flavonol Biosynthesis in Brassica napus L.	Vu TT	이호정	Jeong CY, Nguyen HN, Lee D, Lee SA, Kim JH, Hong SW	J Agric Food Chem	35: 7819-29	국외	SCI

## 2. 특허 출원/등록

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	종자 특이적 발현 프로모터	이호정 현우영	대한민국	10-2012-0122825					
2012	TTG1을 이용한 식물 생장이 촉진되고 가뭄 스트레	이호정	대한민국	10-2012-0116968					

	스 내성이 증가된 형질전환 식물체								
2013	식물체의 종자 발아를 조절하는 MYB7 유전자 및 이의 용도	이호정 현우영	대한 민국	10-2013-0005599	2014	식물체의 종자 발아를 조절하는 MYB7 유전자 및 이의 용도	이호정 현우영	대한 민국	10-1438526
2013	식물체의 염분 스트레스를 조절하는 애기장대 MYB73 유전자 및 이 유전자의 프로모터	이호정 김준혁	대한 민국	10-2013-0048219	2015	식물체의 염분 스트레스를 조절하는 애기장대 MYB73 유전자 및 이 유전자의 프로모터	이호정 김준혁	대한 민국	10-1499140
2015	AT1G70000을 포함하는 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물 및 그의 이용	이호정 정찬영 Nguyen Hoai Nguyen	대한 민국	10-2015-0014572					
2015	플라보놀 합성 유전자 및 이로 형질전환된 형질전환 식물	이호정 정찬영	대한 민국	10-2015-0104155					

### 3. 학술발표

- 국제학술대회 12 건 이상

### 4. 기타(유용유전자, 형질전환체, 품종 등 실적)

- 형질전환체 3 종 유전자 각 10 라인 씩
- 농림수산식품부에서 지원하는 과제를 통하여 연구를 수행한 결과 전세계 우수 연구진 1000 명이 선정하는 F1000 prime (2014년)에 선정되었고, 이 결과로 BRIC의 한빛사에도 추천된 바 있음.
- 농림수산식품부에서 지원하는 과제 중 2014년도 최우수 업적도 배출하였음.

<표> 농림수산식품부 연구과제 2014 최우수 논문 업적 선정 내용

과제명	폴리페놀 대사조절 유제품종 개발을 통한 유채유 항산화능 향상에 관한 연구		
주관기관명	고려대학교 산학협력단	연구책임자	이호정
성과구분	논문	성과년도	2014
성과명	AtMyb7, a subgroup 4 R2R3 Myb, negatively regulates ABA-induced inhibition of seed germination by blocking the expression of the bZIP transcription factor ABI5		
R&D를 통한 이슈관련 기여내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ plant, cell and environment저널에 게재된 SCI급 논문으로 IF 5.9, mrnIF 95.45로 우수한 논문 성과가 발생함.</li> <li>▪ 본 과제는 GMO작물을 만드는 과제로, 사람에게 좋은 건강기능성 유체를 만들고자 함.</li> <li>▪ 세계 재배면적의 10%에서 GMO작물이 재배되고 있으며, 제초제 저항성, 해충 저항성 등 기능성 작물을 재배하고 있음.</li> <li>▪ 미국의 다국적 농업생물공학 종자기업인 몬산토가 독자적으로 생산하고 있음에 따라 로열티 문제가 발생할 가능성이 있으며, 이에 따라 기술제고를 통한 기술선점이 필요함.</li> <li>▪ 플라보노이드라는 성분은 항암기능과 항산화 기능이 있음에 따라 GMO작물을 통해 유채에서 많이 생산되게 하는 기술임.</li> </ul>		
적용/활용분야 및 파급효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 본 기술을 통해 유채에만 제한이 된 것이 아니라, 배추 등 다른 작물을 활용하여 항산화능이 높은 작물을 재배할 수 있음.</li> <li>▪ 그러나, 항암기능과 항산화 기능의 효과를 약제가 아닌 작물을 통해 섭취할 수 있음에 따라 사회적 및 경제적 성과가 발생할 수 있다 판단됨.</li> </ul>		



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 식물은 우리가 일상생활에서 필요로 하는 영양소를 섭취할 수 있는 중요한 자원이다. 이러한 영양소 및 기타 풍부한 미네랄은 식물에 존재하는 이차대사산물의 다양한 합성 경로를 통하여 이루어지는데 이와 관련된 합성 효소들은 또한 천연 자원 식물에서 많이 발견되는 항생제 및 다른 의약소재의 합성에도 긴밀하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 미국의 경우는 이러한 인류의 건강 및 생활에 유용한 이차대사산물을 함유한 식물 자원을 찾기 위해 여러 가지 방법이 강구되고 있는 실정이다. 최근에는 기존의 유용 식물을 이용하여 그의 대사과정 경로를 조절하여 기존의 유용 이차대사산물의 합성을 증가시키거나, 혹은 새로운 물질을 합성해내는 방향으로도 그 연구가 활발하게 진행되고 있다.

- 환경 스트레스는 농작물 생산에 있어 매우 중요한 성장 저해 인자 중의 하나로 여겨진다. 현재 실제적인 농업 현장의 문제점을 살펴보면 저온, 가뭄, 홍수 및 높은 염도 등의 환경 스트레스로 인하여 농작물의 생산량 증가에 큰 피해를 끼치고 있으며 이러한 문제는 특히 농작물의 재배 지역에 한계를 둔다는 것으로 집약될 수 있다. 우리나라는 특히 온대 기후이면서 강수량의 변화가 심하고 많은 간척지를 보유한 관계로 저온, 가뭄 및 높은 염도가 농업 활동의 큰 장애요인이 되어온 실정에 있다. 최근의 모델식물을 주제로 하여 이루어진 많은 연구 또한 이런 실정들을 주제로 한 경우가 많았다.

- 실제로 식물의 무생물적 스트레스에 대한 생리학적, 생화학적 및 유전적 기작들이 많이 밝혀지고 있지만, 이러한 무생물적 스트레스에 대해 저항성을 부여할 수 있는 factor들은 많이 확보되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구 과제의 결과로 획득될 수 있는 유전 물질에 대한 직접적인 정보들은 무생물적 스트레스에 저항성을 갖는 새로운 형질의 작물을 생산해낼 수 있다는 점에서 매우 높은 경제적인 부가가치를 창출할 것으로 전망된다.

- 또한 작물의 직접적인 재배 단가를 낮추는 데도 기여할 뿐 아니라,환경적 제약으로 재배가 불가능하던 농지에서의 재배 가능성도 크게 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 2000년 기록에 의하면 세계 GMO 종자 시장 규모는 전체의 약 10 %에 해당하는 25억 달러이며 2010년 세계 종자 시장 규모는 300억 달러로 추정된다고 하며 그 중 형질전환 작물 종자의 시장 규모 또한 약 250억 달러로 추정된다고 한다. 아직까지는 시장에 나와 있는 GMO의 품목이 제한적이지만 앞으로 이쪽 분야의 발전 및 생산은 놀라운 수준이 될 것으로 예상된다.

- 식물체를 이용한 연구의 활성화로 식물 시스템에서만 발견되는 다양한 유전자 및 그 잠재력을 이용한 GM plant의 생산이 활발하게 진행되고 있다. 이러한 유전공학 기술의 적극적인 연구 및 개발로 부가가치가 높은 신물질의 발굴이 조만간 가능해질 것으로 전망된다. 최근 가격과 소비량의 급속한 하락으로 인해 고전하고 있는 기존 주요 작물을 재배하고 있는 농가의 새로운 수입원이 될 수 있는 경제성 높은 작물의 형질전환용 유전자 발굴이 절실하다. 식물 유용물질 강화 식물체의 육성으로 기능성 물질의 대량 생산 이 가능하며, 내재해성 식물 개발로 새로운 교배 모본으로의 활용 또한 가능하다고 사료된다. 유용 유전자의 작물에의 활

용으로 내재해성/고기능성 원예작물의 형질전환 육종에 활용이 가능하며 히스톤 코드 변형에 식물 특이적 발현 유전자 발굴로 새로운 유전자원 pool을 확보하여 특허 등의 지적재산권도 확보 가능하다.

- 식물체를 이용한 연구가 활성화로 식물이 가지고 있는 다양한 유전자 및 잠재력을 이용한 GM plant의 보다 적극적인 연구 및 생산이 가능해지게 되어 부가가치가 높은 신물질의 발굴이 가능해질 것으로 전망된다. 최근 가격과 소비량의 급속한 하락으로 인한 주요 작물을 대체할 수 있고 농가의 새로운 수입원이 될 수 있는 경제성 높은 식물의 발굴이 필요한 시점이다. 식물 이차대사 조절 반응 유전자의 발굴이 중요한 이유이다. 유용 유전자의 작물에서의 활용으로 내재해성/고기능성 원예작물의 형질전환 육종에 활용이 가능하며 향산화능 강화 식물 특이적 발현 유전자 발굴로 새로운 유전자원 pool을 확보하여 특허 등의 지적재산권도 가질 수 있을 것으로 사료된다.

- 추후의 새로운 고기능성 식물 형질전환체 개발 및 보급으로 농업 생산성 및 농업의 국제경쟁력 증가 고부가 가치 식물 개발로 농가 소득 증대와 새로운 유전자원 창출로 국내 종자/유전자원 지적 재산 증대가 기대되며, 기능성 식물 개발로 가공식품의 원료로 사용함으로써 관련 식품 시장의 확대 및 활성화에도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

- 생명유전공학적인 측면에서의 식물이차대사산물의 합성 및 생산은 식물이라는 특성 때문에 미비한 단계이나 식물의 유전자 활용과 효모라는 매개체를 사용함으로써 한 단계 진보할 수 있는 분야로 인식되고 있으며 전 세계적으로 다양하고도 독창적인 기술들이 개발되고 있는 실정임. 식물의 이차대사산물의 다양성은 인간에 의해 만들어진 chemical library 보다도 훨씬 더 많은 다양성을 가지고 있으며 이는 앞으로도 새로운 식물의 이차대사산물이 발견되어질 가능성이 커, 최근의 "omics" 관련 기술과 접목될 때 새로운 기술력이 창출될 수 있음을 시사함. 즉, "omics" 기술을 아직까지 연구되어 있지 않은 새로운 식물체에 연루시켜 연구할 경우 새로운 이차대사산물의 창출까지도 생각할 수 있는 분야임.

- 현재 정부의 정책적인 문제로 GM작물의 실용화 허가가 나지 않는 상황임. 그러나 추후 개방될 GM 종자 시장에 대응하기 위해서는 국내의 GM작물에 대한 연구 지원과 실용화 허가가 시급한 실정임. 이를 위하여 관련 부처에 지속적으로 의견을 제시하고 이와 더불어 산업화 가능한 과제로 구성하여 추후 고기능성 유82채유 산업화를 위한 방안을 모색하겠음.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 십자화과인 Brassica에는 다양한 경제 식물이 있다. 최근 (2014)년도 Gene이라는 저널에 순무인 *Brassica rapa*에서 dihydroflavonol 4-reductase 유전자가 분리되었다(Gene. 2014 Oct 15;550(1):46-55. doi: 10.1016/j.gene.2014.08.013. Epub 2014 Aug 7). 우리가 본 연구에서 얻은 결과들과 마찬가지로 이 유전자 또한 기존에 알려진 다른 작물에서의 dihydroflavonol 4-reductase 와 그 염기서열이 아주 유사한 것으로 나타났다. 이는 유체에서 얻은 유용유전자, 더 나아가 모델식물인 애기장대에서 얻은 유용 유전자들도 경제작물에 도입이 될 경우 유사한 기능을 수행할 것임을 증명하는 결과라고 생각해볼 수 있다.

- *Brassica rapa*에서 위와 같은 dihydroflavonol 4-reductase 이외에도 안토시아닌 (플라보노이드의 일종) 합성에 관여하는 유전자가 새로이 73개나 발굴되었다(BMC Genomics. 2014 Jun 4;15:426. doi: 10.1186/1471-2164-15-426). 이는 플라보노이드와 같은 유용 물질의 증가를 위하여 이의 합성 및 조절에 관여하는 유용유전자를 많은 연구기관에서 연구가 진행되어오고 있음을 시사한다.

- 문헌조사를 통하여 경제작물에서의 유용 유전자 발굴은 아주 빠른 속도로 진행이 되고 있음을 알 수 있었던 반면에 이들 유전자들의 도입에 따른 작물형질전환체의 개발은 그 속도가 더디게 이루어지고 있음을 알게 되었다. 현재 작물의 GMO 개발 연구는 국내에서 그 연구비를 지원받기가 쉽지 않은 실정이다. 당장 우리가 이 기술의 개발로 경제적 이익을 창출할 수는 없으나 미래기반 기술로서의 투자는 지금부터 이루어져야한다고 생각한다.

- 광합성 효율 증진은 주로 탄소 고정에 직접 관여하는 효소의 양 혹은 활성을 높이려는 많은 연구들의 일환으로 광합성의 암반응에서 CO<sub>2</sub>를 고정하는 효소인 Rubisco의 기능 개선에 많은 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 문제를 개선하기 위하여 rubisco의 산소 결합능을 떨어뜨리고 이산화탄소 결합능을 높이기 위한 연구가 꾸준히 지속되어 왔지만 산소와 이산화탄소의 유사구조로 인해 현재는 이것이 여전히 쉽지 않은 과제인 것으로 간주되고 있는 실정이다. 당은 본 연구에서도 확인한 바와 같이 플라보노이드의 합성을 자극하는 가장 효과적인 신호 중의 하나로 보고되어 있다. 최근의 연구결과들을 보면 당이 신호전달 물질로서 기능함을 여러 모로 증명하고 있다. 식물에서 환경 변화 및 발달과 같은 세포 내 다양한 정보들이 당 대사 및 신호전달 체계를 통해 통합적으로 인지, 처리됨을 알게 되었다. 이에 근거하여 최근에는 보다 많은 분자 유전학과 기능유전체학적인 접근 방법으로 식물의 특이적인 당 대사 및 신호전달 기작을 한 차원 더 깊은 수준에서 이해하고자 노력하는 방향으로 연구가 진행되고 있는 실정이다. 식물의 당대사가 플라보노이드와 어떤 상관관계를 가질 것으로 생각이 되는 여러 연구결과들이 보고되고 있다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

연구기자재 및 연구시설	수량	활용용도	보유기관	확보유무	비고
1차 증류수 장치	1	증류수의 제조	고려대학교	확보	
2차 증류수 장치	1	증류수의 제조	고려대학교	확보	
사진촬영장치	2	실험의 기록	고려대학교	확보	
Autoclave	2	실험기구 살균	고려대학교	확보	
Centrifuge	3	원심분리	고려대학교	확보	
Chemical balance	3	시료의 무게 측정	고려대학교	확보	
Clean bench	3	무균실 대응	고려대학교	확보	
Deep freezer	1	시약/시료 냉동보관	고려대학교	확보	
Freeze drier	1	시료 냉동건조	고려대학교	확보	
Gas cylinder	4	Gas 공급	고려대학교	확보	
Pipette	15	시약/시료 pipetting	고려대학교	확보	
Image analyser	1	미세조직 분석	고려대학교	확보	
Micro centrifuge	5	소량의 원심분리	고려대학교	확보	
Microtomb	3	시료의 section 준비	고려대학교	확보	
pH meter	3	pH 측정	고려대학교	확보	
Shaking incubator	2	시약/시료 증탕	고려대학교	확보	
Slab gel drier	1	Gel의 건조	고려대학교	확보	
Spectrophotometer	1	OD 측정	고려대학교	확보	
Ultracentrifuge	3	고속의 원심분리	고려대학교	확보	
Water bath	1	시약/시료 증탕	고려대학교	확보	
Supercritical fluid extractor	1	초임계유체 추출장치	고려대학교	확보	
HPLC	1	비휘발성분 분석	고려대학교	확보	

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

### 제 1 절 연구실 안전 점검 체계 및 실시

1) 실험실 안전 점검 체계 : 실험실별 안전점검 후 관리처에서 정기적 방문 점검 실시

※ 관리위험등급의 지정

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물,

방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실

- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실

- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실 (실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고)

### 제 2 절 교육 훈련

1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

3) 단계별 교육 이수과정 :

- 1단계 : 공통이수과목(등록실험실전체)

- 2단계 : 특수실험실

### 제 3 절 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부 서
재산종합보험 (종합패키지 보험)	재산종합위험담보 :2조 5천 6백억원 (신체배상책임보험 특별약관포함)	피보험자	설비안 전팀
	대인대물일괄 : 20억원-사고당	전체	“
	제3자 치료비 보상:1천만원/인당, 8천만원/사고당	제3자 보상	“
	학생교내외치료비:1천5백만원/인당, 8천만원/사고당	학생	“
학생단체 상해보험	상해사망, 후유장해 : 2억원 의사상자 상해위험 : 1억원 상해, 후유정도에 따른 보상 : 약관보상 연구활동중사자보험 포함(특별약관)	학부생, 대학원생	학생복 지처
교직원 단체안심보험	사망, 후유장해, 질병사망 : 1억원/인 의료비지원 - 암치료비 : 1천만원/인당 - 입원의료비지원 : 3천만원/인당 - 상해의료실비 : 2백만원/인당	교직원	인사팀

## 제 9 장 참고문헌

**Avice J-C, Etienne P.** 2014. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of experimental botany* **65**, 3813-3824

**Bhalla PL, Singh MB.** 2008. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature protocols* **3**, 181-189

**Bieza K, Lois R.** 2001. An Arabidopsis Mutant Tolerant to Lethal Ultraviolet-B Levels Shows Constitutively Elevated Accumulation of Flavonoids and Other Phenolics. *Plant Physiol* **126**, 1105-1115

**Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR.** 2006. Peroxidase dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal* **47**, 851-863

**Blois MS.** 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.

**Boccalandro HE, Mazza CA, Mazzella MA, Casal JJ, Ballare CL.** 2001. Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**, 780-788

**Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK.** 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in Arabidopsis. *Plant physiology* **126**, 524-535

**Burbulis IE, Winkel-Shirley B.** 1999. Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 12929-12934

**Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P.** 2010. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* **16**, 251-280

**Charest P, Holbrook L, Gabard J, Iyer V, Miki B.** 1988. Agrobacterium-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. *Theoretical and applied genetics* **75**, 438-445

- Chen G, Deng W, Peng F, Truksa M, Singer S, Snyder CL, Mietkiewska E, Weselake RJ.** 2013. Brassica napus TT16 homologs with different genomic origins and expression levels encode proteins that regulate a broad range of endothelium associated genes at the transcriptional level. *The Plant Journal* **74**, 663–677
- Clough, S. J.; Bent, A. F.** 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735 - 473
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN.** 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. Blackwell: Oxford, UK
- Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris NN, Walker AR, Robinson SP, Bogs J.** 2009. The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant physiology* **151**, 1513–1530
- Dangles O, Fargeix G, Dufour C.** 1999. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, 1387–1396
- Dixon RA, Steele CL.** 1999. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science* **4**, 394–400
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS.** 2006. Gateway compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* **45**, 616–629
- Eisinger WR, Bogomolni RA, Taiz L.** 2003. Interactions between a blue-green reversible photoreceptor and a separate UV-B receptor in stomatal guard cells. *American journal of botany* **90**, 1560–1566.
- Falcone Ferreyra ML, Rius S, Emiliani J, Pourcel L, Feller A, Morohashi K, Casati P, Grotewold E.** 2010. Cloning and characterization of a UV B inducible maize flavonol synthase. *The Plant Journal* **62**, 77–91
- Fang J, Reichelt M, Hidalgo W, Agnolet S, Schneider B.** 2012. Tissue-specific distribution of secondary metabolites in rapeseed (*Brassica napus* L.). *PloS one* **7**, e48006



**Forkmann G.** 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding* **106**, 1-26

**Stobiecki M and Kachlicki P.** 2006. Isolation and Identification of Flavonoids. In: Erich G (ed) *The science of flavonoids*, Springer, New York, pp 97-122

**Fujita A, Goto-Yamamoto N, Aramaki I, Hashizume K.** 2006. Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **70**, 632-638

**Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S.** 2006. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *The Journal of nutrition* **136**, 2715-2721

**Grotewold E.** 2006. *The science of flavonoids*. Springer,

**Harborne JB, Williams CA.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504

**Holton TA, Cornish EC.** 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1071

**Huits HS, Gerats AG, Kreike MM, Mol JN, Koes RE.** 1994. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **6**, 295-310

**Kim J-D, Liu L, Guo W, Meydani M.** 2006. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *The Journal of nutritional biochemistry* **17**, 165-176

**Kim YB, Kim K, Kim Y, Tuan PA, Kim HH, Cho JW, Park SU.** 2014. Cloning and characterization of a flavonol synthase gene from *Scutellaria baicalensis*. *The Scientific World Journal* 2014

**Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C.** 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 225, 1245-1253

**Lee B-H, Jeong S, Jung S, Lee J, Kim J, Yoon I, Choi S-H, Lee S-M, Chang C-G, Kim H-C.** 2005. Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain I. *Molecules and cells* 20, 69-73

**Li J, Tan X, Zhu F, Guo J.** 2010. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets. *International Journal of Biology* 2, p127

**Li X, Gao M-J, Pan H-Y, Cui D-J, Gruber MY.** 2010. Purple canola: *Arabidopsis* PAP1 increases antioxidants and phenolics in *Brassica napus* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 1639-1645

**Li X, Qin J-C, Wang Q-Y, Wu X, Lang C-Y, Pan H-Y, Gruber MY, Gao M-J.** 2011. Metabolic engineering of isoflavone genistein in *Brassica napus* with soybean isoflavone synthase. *Plant cell reports* 30, 1435-1442

**Mancinelli AL.** 1984. Photoregulation of anthocyanin synthesis VIII. Effect of light pretreatments. *Plant Physiology* 75, 447-453

**Mol J, Stuitje A, Gerats A, van der Krol A, Jorgensen R.** 1989. Saying it with genes: molecular flower breeding. *Trends in Biotechnology* 7, 148-153

**Moloney MM, Walker JM, Sharma KK.** 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports* 8, 238-242

**Nakabayashi R, Yonekura Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K.** 2014. Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal* 77, 367-379

**Nicholson RL, Hammerschmidt R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual review of phytopathology **30**, 369-389

**Oñate-Sánchez L, Vicente-Carbajosa J.** 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. BMC Research Notes **1**, 93

**Owens DK, Alerding AB, Crosby KC, Bandara AB, Westwood JH, Winkel BS.** 2008. Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. Plant physiology **147**, 1046-1061

**Parkin I, Sharpe A, Keith D, Lydiate D.** 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). Genome **38**, 1122-1131

**Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS.** 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiology **126**, 536-548

**Pelletier MK, Burbulis IE, Winkel-Shirley B.** 1999. Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings. Plant molecular biology **40**, 45-54

**Pelletier MK, Murrell JR, Shirley BW.** 1997. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis* (further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes). Plant Physiology **113**, 1437-1445

**Pelletier MK, Shirley BW.** 1996. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings (Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase). Plant physiology **111**, 339-345

**Piazza P, Procissi A, Jenkins GI, Tonelli C.** 2002. Members of the *c1/pl1* regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins. Plant Physiology **128**, 1077-1086

**Routaboul J-M, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J, Lepiniec L.** 2006. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**, 96-107

**Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C.** 2002. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* **59**, 23-32

**Snowdon R, Friedrich T, Friedt W, Köhler W.** 2002. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 533-538

**Stracke R, De Vos RC, Bartelniewoehner L, Ishihara H, Sagasser M, Martens S, Weisshaar B.** 2009. Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the in vivo involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase. *Planta* **229**, 427-445

**Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weisshaar B.** 2007. Differential regulation of closely related R2R3 MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal* **50**, 660-677

**Suesslin C, Frohnmeyer H.** 2003. An *Arabidopsis* mutant defective in UV B light mediated responses. *The Plant Journal* **33**, 591-601

**Takahashi R, Githiri SM, Hatayama K, Dubouzet EG, Shimada N, Aoki T, Ayabe S-i, Iwashina T, Toda K, Matsumura H.** 2007. A single-base deletion in soybean flavonol synthase gene is associated with magenta flower color. *Plant molecular biology* **63**, 125-135

**Thordal Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB.** 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**, 1187-1194

**Tohge T, Matsui K, Ohme-Takagi M, Yamazaki M, Saito K.** 2005. Enhanced radical scavenging activity of genetically modified *Arabidopsis* seeds. *Biotechnology letters* **27**, 297-303

**Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima Ji, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M.** 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal* **42**, 218-235

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

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