

1. 표지

<p>115076 -2</p> <p>주요작물의 생산성에 관여하는 골지체표적단 백질의 기능분석 및 활용</p> <p>최 종 보 고 서</p> <p>20028</p> <p>농림축산식품부</p> <p>3 (견고덕 17p)</p>	<p>4cm</p> <p>Improvement of productivity using a novel Golgi-resident cyclophilin in rice and potato R&D Report(연구보고서)</p> <p>(견고덕 25p)</p>	<p>농생명산업기술개발사업</p> <p>11-1543000-002249-01</p> <p>주요작물의 생산성에 관여하는 골지체표적단백질의 기능분석 및 활용 최종보고서</p> <p>2018. 02. 07.</p> <p>주관연구기관 / 한국생명공학연구원</p> <p>농림축산식품부</p>
--	--	---

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “주요작물의 생산성에 관여하는 골지체표적단백질의 기능분석 및 활용”(개발기간 : 2015.12.18 ~ 2017.12.17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 02. 07.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 원장직무대행 김 장 성 (인)

주관연구책임자 : 조 혜 선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

과제고유번호	115076-2	해 당 단 계 연 구 기 간	512181217	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농생명산업기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	주요작물의 생산성에 관여하는 골지체표적단백질의 기능분석 및 활용			
연구책임자	조 혜 선	해당단계 참 여 연구원 수	총: 6명 내부: 1명 외부: 5명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 200,000 천원 민간: 천원 계: 200,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 8명 내부: 1명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 200,000천 원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자: 조혜선	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수:	
<p>신규성 골지체표적 CYP21-4가 과 발현된 주요작물 벼/감자형질전환체는 대조구에 비해 생산성이 증대됨을 유리온실 조건에서 확인하였음</p> <p>·골지체단백질 CYP21-4의 발현조절은 당단백질의 함량 및 글리코실레이션 패턴에 영향을 주고 있음을 확인하였음</p> <p>CYP21-4 과 발현 형질전환체는 고농도의 염, 산화스트레스에 내성을 보여주었음 스트레스 조건에서 CYP21-4 과발현은 주요 항산화 효소 POD와 APX 효소활성을 증가시키는 기작을 규명함</p> <p>·기내 소피경 형성과정에 CYP21-4 유전자가 기능함을 규명함 신규성 유전자의 생산성증대 및 환경스트레스 내성 표현형과 유전자의 기능을 규명하여 연구 유용 육종소재 발굴을 위한 원천기술을 제공할 수 있으며, 식물 골지체 연구 분야 의 기초적 이해증진에도 기여하였음.</p>					

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>본 연구는 골지체 내 미세조절 기작에 관여하는 신규성 이뮤노필린유전자의 기능 분석을 통해 과 발현 시 식물생장 발달 및 최종 생산성을 증가시키는 유용 유전 자원을 주요작물에 활용하고자 한다. 또한 고농도의 염/산화스트레스 조건에서 항산화 효소 활성을 조절하여 환경스트레스에 대한 내성을 증진시키는 기능을 확인함으로써 작물의 생산성 및 환경스트레스 내성을 동시에 증진시킬 수 있는 신규성 유전자원을 활용하여 주요 작물의 생산성 향상에 기여하고자 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ CYP21-4 유전자과 발현된 작물의 생산성 분석 (벼, 낫알; 감자, 괴경) ○ CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 농업형질 분석 (벼, 감자) ○ CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 환경스트레스 내성 분석 (벼, 감자) ○ CYP21-4 유전자에 의한 생산성 증가 및 스트레스 내성 기작 규명 ○ CYP21-4 유용 유전자 활용성 검증 					
연구개발성과	<p>벼/감자 과 발현체의 발달시기에 따른 생장 비교시 대조구에 비해 생산성이 증가 됨을 확인하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> ·조직학적 관찰을 통해 감자 형질전환체에서 stem의 리그닌 함량 및 두께가 크게 증가함을 확인하였고 잎의 두께도 형질전환체가 두꺼워졌음을 확인함 ·CYP21-4 발현에 의한 당단백질 함량이 증가되었음을 확인함 ·CYP21-4 발현에 의한 환경스트레스 내성이 증가됨을 확인함 ·CYP21-4 과발현 시 항산화 효소활성이 증가됨으로써 산화스트레스에 대한 내성이 증가되는 기작을 증명함 ·<i>In vitro</i> 조건에서 CYP21-4 과발현이 감자 소피경 형성과정에 관여함을 규명함 <p>신규성 골지체표적 이뮤노필린유전자의 식물체내 기능분석을 수행하고 과발현식 물체의 생산성증대 표현형을 검증함으로써 주요작물의 유용 육소재로서의 가치를 제고하고 활용가능성을 제시하였다.</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>생산성증대에 기능하는 신규성 유용 유전자발굴을 통한 원천기술 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> ·신규성 유전자의 기능분석에 의한 지적재산권 선점 <p>작물의 생산성 및 환경스트레스 내성을 동시에 증진시킬 수 있는 “유용 분자육 종 소재” 유전자 발굴</p> <p>고부가 농업생명공학 기술력 강화</p>					
중심어 (5개 이내)	벼/감자	골지체표적	이뮤노필린	생산성증대	스트레스 내성	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>The purpose of this study is to utilize useful genetic resources for the major crops to increase plant development and final productivity through the functional analysis of a novel immunophilin gene involved in the fine-tuning regulation mechanism in Golgi organelle. In addition, by confirming the function of enhancing the tolerance to environmental stress mediated by controlling antioxidant enzymes activities under high salt/oxidative stress conditions, it is possible to utilize a novel genetic resource which can simultaneously enhance crop productivity and environmental stress tolerance to improve crop productivity.</p> <p>○Analysis of productivity in CYP21-4 overexpressing crops (rice; grain, potato; tuber) ○Analysis of agricultural traits of CYP21-4 overexpressing crops (Rice, potato) ○Analysis of environmental stress tolerance in CYP21-4 overexpressing crops (rice, potato) ○Identification of stress tolerance mechanism mediated by CYP21-4 overexpression ○Validation of CYP21-4 utility as useful gene</p>					
Results	<p>·Confirmation of increased productivity in CYP21-4 overexpressing rice/potato transgenic plants compared to that of control.</p> <p>·Histological observations showed that the lignin content and thickness of the stem were significantly increased in the potato transgenic plants, and the thickness of the leaves also was thickened.</p> <p>·CYP21-4 expression affects glycoprotein content in the transgenic plants</p> <p>·CYP21-4 overexpression confers enhanced environmental stress tolerance</p> <p>·Identification of mechanism that CYP21-4 regulates antioxidant enzyme activities against oxidative stress to adapt stress conditions.</p> <p>·CYP21-4 is involved in the process of potato tuber formation <i>in vitro</i> culture.</p> <p>·Functional analysis of a novel Golgi-resident immunophilin gene, CYP21-4, and verification of the function in increasing crop productivity.</p>					
Expected Contribution	<p>·Establishment of fundamental technology through finding novel genes for increasing productivity</p> <p>·Precedence of intellectual property rights by functional analysis of novel gene</p> <p>·Discovery of "useful molecular breeding materials" that can simultaneously enhance crop productivity and environmental stress tolerance</p> <p>·Strengthening high-value agricultural biotechnology</p>					
Keywords	rice/potato	Golgi-resident	immunophilin	increasing productivity	stress tolerance	

6. 영문목차

Chapter 1. Introduction and overview of the project	5
Section 1. Purpose	5
Section 2. Necessity	5
Chapter 2. Current technology development at home and abroad	8
Section 1. Comparison of research and technology	8
Section 2. Product and market analysis	8
Chapter 3. The research performance content and results	11
Section 1. Methods	11
Section 2. Objectives of research	14
Section 3. The research contents and results	15
Section 4. Research promotion strategy and method	74
Section 5. Research achievement	77
Chapter 4. Achievement of goal and contribution to relevant field	79
Section 1. Achievement goal	82
Section 2. Contribution to relevant field	88
Chapter 5. Plan to use research results	89
Chapter 6. Overseas science and technology information collected during the research process	90
Section 1. Analysis of patent	90
Section 2. Analysis of paper	91
Chapter 7. Security rating of R & D results	92
Chapter 8. NTIS registered research facility equipment	93
Chapter 9. Implement safety measures in accordance with R & D performance	94
Chapter 10. Representative research achievement in R & D	95
Chapter 11. References	96

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	5
2. 국내외 기술개발 현황	8
3. 연구수행 내용 및 결과	20
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	82
5. 연구결과의 활용계획 등	89
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	90
7. 연구개발성과의 보안등급	92
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	93
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	94
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	95
11. 참고문헌	96

<별첨> 자체평가의견서

8. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 골지체 내 미세조절 기작에 관여하는 신규성 이뮤노필린유전자의 기능분석을 통해 과발현 시 식물생장 발달 및 최종 생산성을 증가시키는 유용 유전자원을 주요작물에 활용하고자 한다. 또한 고농도의 염/산화스트레스 조건에서 항산화 효소 활성을 조절하여 환경스트레스에 대한 내성을 증진시키는 기능을 확인함으로써 작물의 생산성 및 환경스트레스 내성을 동시에 증진시킬 수 있는 신규성 유전자원을 활용하여 주요 작물의 생산성 향상에 기여하고자 한다.

- CYP21-4 유전자과 발현된 작물의 생산성 분석 (벼, 낫알; 감자, 괴경)
- CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 농업형질 분석 (벼, 감자)
- CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 환경스트레스 내성 분석 (벼, 감자)
- CYP21-4 유전자에 의한 생산성 증가 및 스트레스 내성 기작 규명
- CYP21-4 유용 유전자 활용성 검증

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 인구 증가 및 노령화, 산업의 가속화에 의한 경지면적 축소 등 농업 환경은 계속 피폐해지고 있으며, 식량 및 대체 에너지원의 공급을 증대시키고 환경을 보존 할 수 있는 생명공학적인 접근이 필요함.
 - 선진 국가는 이미 농업 관련 유전체 연구에 대규모 투자를 하고 있으며 BT를 이용한 작물 육종소재 개발을 가속화하고 있음.
 - 국가 간 주요 작물의 기능유전체 연구를 통해 우수 농업 형질, 스트레스 내성, 유전자 발현조절 요소 등의 BT 기반 분자유종을 위한 소재를 경쟁적으로 발굴하고 특허권, 지적재산권을 확보하고 있음.
 - 기초 연구 성과의 산업화 촉진을 위한 지식재산권 관리가 강화 되고 있으며 지식재산의 기술이전 및 사업화를 통해 활용화 될 수 있는 전문 관리체계를 구축하고 있음.
 - 세계 미래회의 (World Future Society): 2025년 유전자기술은 20세기 미국·소련의 우주전쟁에 비견될 정도로 성장할 것으로 예견하고 있음.
 - 2050년까지 세계 종자 시장의 대부분이 형질전환 작물로 대체 될 것으로 예상하고 있음 (약 80%).
2. 국토가 좁고 대부분의 작물을 수입하는 우리나라는 우수 유전자원을 발굴하고 이를 이용한 생산성증대 및 작물 생명공학을 위한 핵심소재 개발로 미래 농업성장 동력을 확보해야 함.

- 최근 우리나라에서도 농업 분야의 NGS 기반 유전체 연구가 폭발적으로 증가하고 있으며 국내 주요작물의 유전정보는 기하급수적으로 증가하고 있음.
- 유전체 정보를 활용하기 위해서는 유용 유전자의 기능분석 연구가 필수적으로 수반되어야 함.
- 유용 유전자의 기능분석 연구는 유전자가 단백질 생성을 통해 세포와 유기체 안에서 표현형질을 나타내는 생물학적 기능을 밝혀내는 과정으로 대상 유전자의 생물학적, 산업적 가치를 부여하고 활용가능성을 결정하는 매우 중요한 연구분야 임.
- 전통 육종에만 의존하던 형질개선 프로그램이 marker-associated selection으로 효율화되기 위해서는 기능유전체학이 필수적 임.
- 기능유전체학의 발전으로 신규 유전자를 직접 작물에 형질전환하여 우수형질을 갖는 작물을 개발 할 수 있게 되었음.
- 따라서 식물 기능유전체 연구는 미래의 식물형질 개선 및 우수형질을 갖는 작물 개발을 주도할 것임.

3. 기후변화로 인한 가뭄은 벼 작물 생산량 증대에 중요한 제한 요인이나 주요 식량원인 아시아지역 국가들은 아직까지 이 문제를 해결하지 못하고 있음.

- 아시아 시장은 전 세계 벼 종자 시장의 94%를 그 중 중국은 86%를 차지하는 최대 시장으로 지속적 성장이 예상 됨.
- 따라서, 중국의 동북지역을 고려한 환경 적응 품종 개발이나 동남아시아를 대상으로 하는 열대 및 아열대지역 적응형 고 수량성 품종개발이 요구되고 있음.
- 국내 벼 전통 육종기술은 세계적 수준에 있으나, 주로 내수용 품종개발에 주력해 왔음.
- 최대 생산국인 중국 종자시장 진출을 위해 경쟁품종 대비 고 수량, 종자생산 효율 증대를 제고한 품종개발이 시급함.
- 벼 작물에서도 수량성 증대, 병해충 저항성 증강, 불량 환경 적응력 증가 및 신기능성 물질 생산 등에 형질전환 기술이 활용되고 있음.
- 아직은 GM 작물재배에 대한 안정성 등 극복해야 할 많은 문제점이 있지만 생명공학 적 방법은 전통적인 육종방법으로는 불가능한 다양한 생물종으로부터 유전자도입이 가능하여 종간 교잡장벽을 극복할 수 있으며 도입유전자에 대한 지적소유권 관리가 용이함.
- 따라서, 벼 작물의 수량성 증대 또는 환경스트레스 내성 유용유전자를 발굴하고 그 기능을 주요 품종에서 분석 입증한다면 미래 작물분자유종을 위한 유용소재를 선도적으로 확보하여 경쟁력 있는 농업기반 구축이 가능할 것임.

4. 감자는 벼, 밀, 옥수수과 함께 세계 4대 작물로서 조건 불리 지역에서도 재배가 용이하여 중요 식량원이자 영양공급원 임.

- 단위면적당 탄수화물 생산성이 가장 높은 작물임.
- 전분 작물 중 비타민 C를 고 농도로 함유하고 있음: 20 ~ 40 mg/100 g FW
- 선진국 중심의 소비량을 나타내었던 과거와는 달리 최근에는 개발도상국에서 꾸준히

소비가 늘어나고 있어 기아를 해결하기 위한 최우선 작물 중 하나임.

5. 감자의 생산량은 냉장 시설 및 관개 시설, 가공 공장 및 패스트푸드 산업의 성장 등으로 증가하였으나 기후변화로 인한 생산성 증대 기술이 요구되고 있음.
- 감자 재배의 가장 중요한 요인은 무병 씨감자를 공급하는 것으로 병, 바이러스 해충에 대한 저항성을 갖는 씨감자 개발이 요구되고 있음.
 - 세계 평균 무병 씨감자 보급률은 10% 미만 임.
 - 우리나라 감자의 경우, 품종 다양성은 낮고, 외국 품종 점유율은 높아서 감자의 소비가 증가하는 추세를 고려할 때 로열티 지급 문제를 해결 할 수 있는 신품종 개발이 시급한 실정 임.
 - 우리나라 감자 생산성은 선진국의 56% 임.
 - GM 품종의 경우 독일과 스웨덴에서 재식되고 있으며, 향후 전분가공용 품종과 병 저항성 품종 등이 개발도상국과 동 유럽 국가 등에서 지속적으로 재배가 확대 될 것임.
 - 따라서, 감자 작물의 수량성 증대 또는 환경 스트레스 내성 유용 유전자를 발굴하고 그 기능을 감자 작물에서 분석 입증한다면 미래 감자 분자유종을 위한 유용 소재를 선도적으로 확보하여 경쟁력 있는 농업 기반 구축이 가능할 것임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절 본 연구 관련 국내 기술 수준 비교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
<u>작물 기능 유전체</u> ○ 유전자의 기능 분석 ○ 작용기작 규명	미국	80%	90%	100%	
<u>유용유전자의 작물활용</u> ○ 환경 스트레스 내성 ○ 생산성 증대	미국	10%	5%	20%	

2. 특허분석

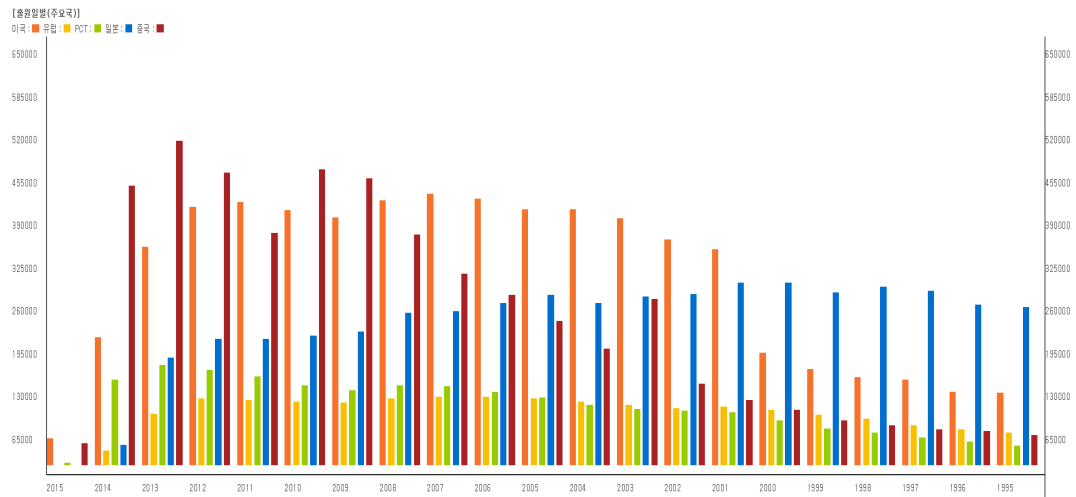
가. 특허분석범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽, WO, 중국, 영국, 독일)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	1995-현재
검색범위	제목, 초록, 청구항

나. 기술개발 keywords: 골지체 관련 식물생장발달 관련 연구 부재로 핵심어를 분류

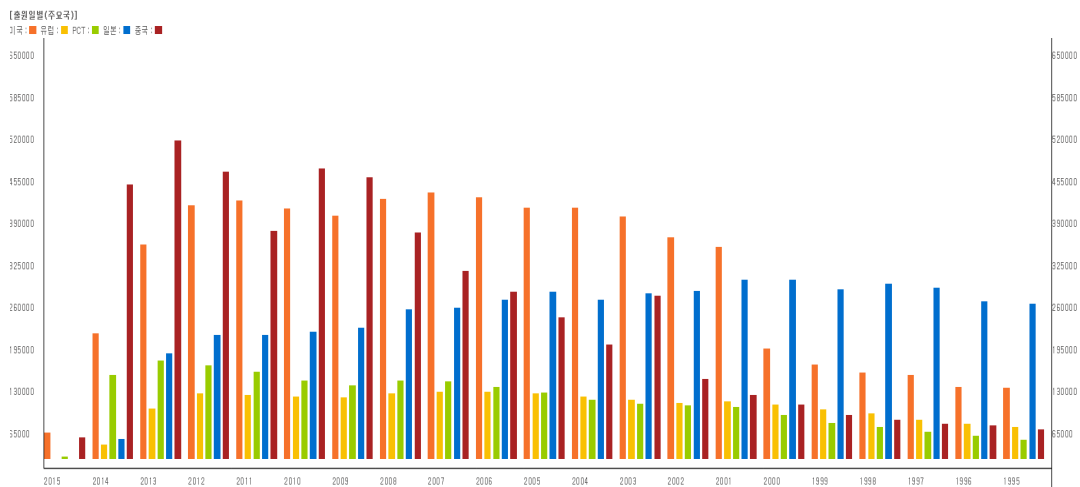
“작물기능유전체: functional genomics and crop”, “작물분자유종: crop and molecular breeding and biotechnology”, “골지체단백질: Golgi protein and plant”

(1) 작물기능유전체



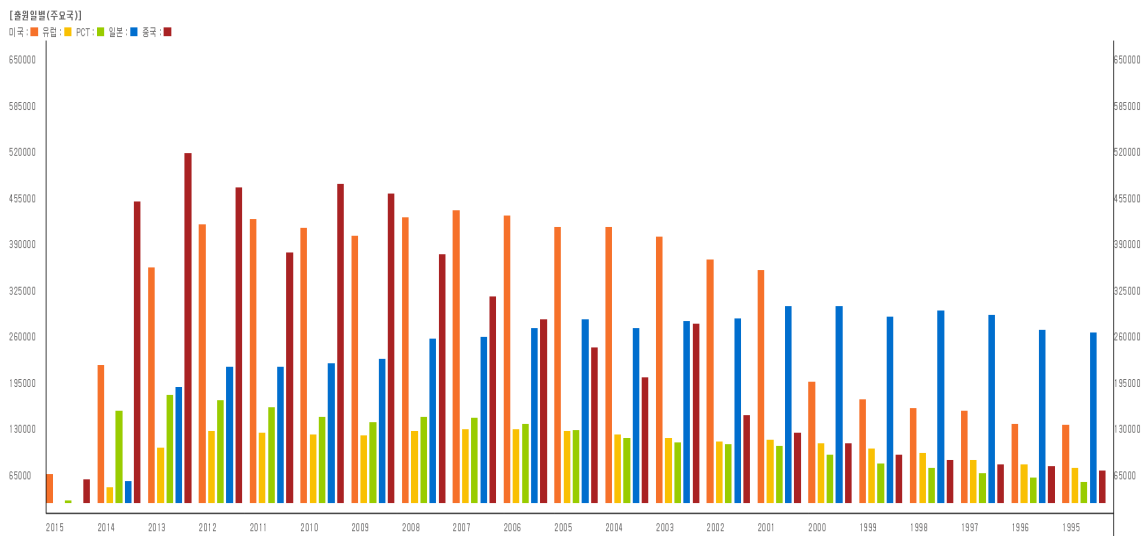
- ① 작물유전체 관련 특허는 전체 66%가 미국에서 등록 되었고 23%가 PCT출원, 10%가 유럽으로 아시아 국가에서는 중국에서 소수의 (1.2%) 특허가 등록된 상태이다. 연도별 분포에서는 1990년대 후반부터 시작되어 2000년도 후반부터 현재까지 증가되고 있다.
- ② 작물유전체 관련특허는 일본의 경우 1990년대 가장 많은 특허가 출원 되었으나 2000년대 부터는 감소하기 시작해 최근에는 급격히 줄어든 반면, 중국의 경우는 2000년대부터 크게 증가하기 시작해 최근에는 미국, 유럽을 제치고 가장 많은 특허를 출원하고 있다. 미국은 특허 수는 가장 많으나 최근 중국에 비해 감소하는 경향을 보여 준다.
- ③ 미국연구진은 NEMTOP6-enncoding 유전자가 식물 생산성 형질에 관여함을 2011년 보고 하였다.
- ④ KRP 유전자가 돌연변이 된 식물체의 무게, 크기의 증가 및 생산성 증대 표현형을 보고 함으로써 생산성증대에 repressor 유전자임을 보고하였다.
- ⑤ Yield-related 주요 유전자 YEP (yield enhancing polypeptide), class I TCP or CAH3 or Clavatal 유전자의 특허등록이 보고됨.

(2) 작물분자유종



- ① 작물유전체 관련 특허는 전체 66%가 미국에서 등록되었고 23%가 PCT출원, 10%가 유럽으로 아시아 국가에서는 중국에서 소수의 (1.2%) 특허가 등록된 상태이다. 연도별 분포에서는 1990년대 후반부터 시작되어 2000년도 후반부터 현재까지 증가되고 있다.
- ② 작물유전체 관련특허는 일본의 경우 1990년대 가장 많은 특허가 출원 되었으나 2000년대 부터는 감소하기 시작해 최근에는 급격히 줄어든 반면, 중국의 경우는 2000년대부터 크게 증가하기 시작해 최근에는 미국, 유럽을 제치고 가장 많은 특허를 출원하고 있다. 미국은 특허 수는 가장 많으나 최근 중국에 비해 감소하는 경향을 보여준다.
- ③ 식물 형태구조 결정에 관여하는 염색체 리모델링 유전자를 이용한 식물 성장변화 연구를 통한 특허가 유럽에서 등록됨.
- ④ 지방산 대사 과정에 기능하는 cytochrome b5 유전자를 이용한 오메가-3 desaturation 을 모델식물 애기장대와 콩 작물에서 유도하여 특허를 등록함
- ⑤ acetyl-coenzyme A carboxylase enzyme 유전자 발현을 통한 weed 제초제 저항성 식물체를 미국에서 특허 등록함.

(3) 식물골지체단백질



- ① 식물 골지체단백질 관련 특허는 전체 과반수 (58%)가 미국에서 등록되었고 29%가 PCT출원, 11%가 유럽으로 아시아 국가에서는 일본 (2%)과 중국(5건)에서 소수의 특허가 등록된 상태이다. 연도별 분포에서는 1990년대 후반부터 시작되어 2000년도 후반부터 현재까지 증가되고 있다
- ② 식물 골지체단백질 관련 특허는 일본의 경우 1990년대 가장 많은 특허가 출원되었으나 2010년대부터는 감소하기 시작해 최근에는 급격히 줄어든 반면, 중국의 경우는 2010년대 부터 출원되기 시작하고 있다.
- ③ 유럽에서는 골지체 또는 소포체에 존재하는 glycosidic enzyme을 이용해 세포벽 구성성분을 재구성하여 생산성증대 효과를 특허등록 함.

- ④ 골지체 단백질을 이용한 당질화 패턴을 변화시키는 기술을 특허 등록함
- ⑤ Pectin biosynthetic glycosyltransferase, GalAT 유전자의 식물체 내 농업형질 개선 표현형을 확인하여 특허등록함.

3. 논문분석

가. 논문분석의 범위

대상국가	국내, 국외 (미국, 일본, 유럽, WO, 중국, 영국, 독일)
논문 DB	Scopus database
검색기간	1990-현재
검색범위	제목, 초록 및 키워드

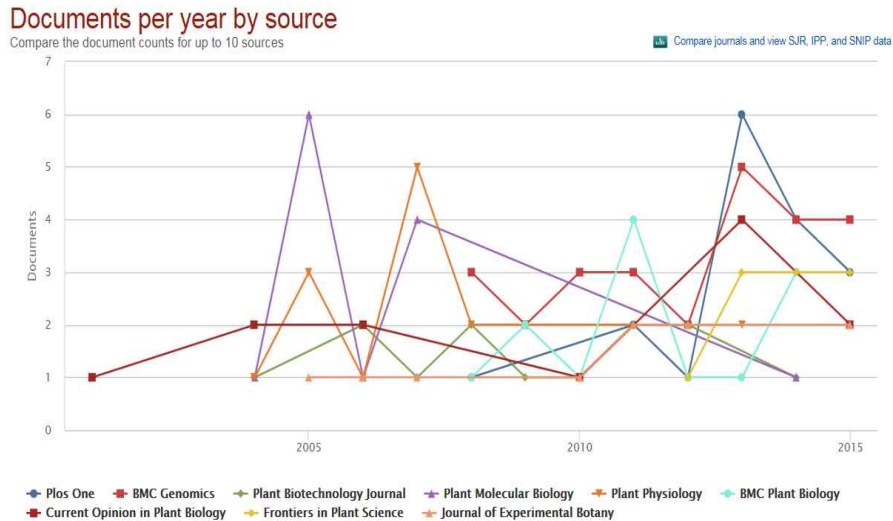
나. 논문분석 keywords; 골지체 관련 식물생장발달 관련 연구 부재로 핵심어를 분류
 “유전체: functional genomics and crop”, “작물분자육종: crop and molecular breeding and biotechnology”, “골지체단백질: Golgi protein and plant”

(1) 작물기능유전체

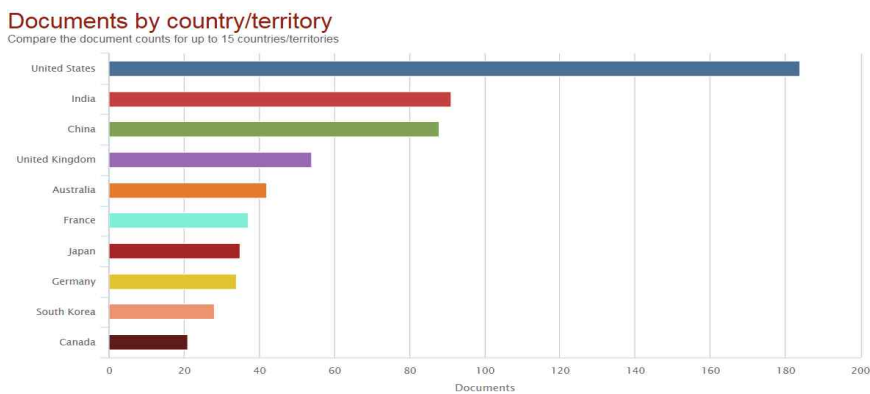
- ① 이스트 유래 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 유전자가 과발현 또는 발현억제된 감자 형질전환체가 건조스트레스에 대한 저항성 또는 민감성을 나타냄이 보고됨 (2015, Plant Cell, Tissue and Organ Culture)
- ② 뿌리 조직에서 Pi macronutrient 결핍시 분비되는 secretory acid phosphatase 효소 AtPAP12, AtPAP26 유전자가 P-use efficiency에 기능함을 확인함 (2012, J. of Experimental Botany).
- ③ 연도별로는 작물기능유전체관련 연구는 1990년대 후반부터 진행되기 시작하여 지구온난화 등의 기후변화 문제가 심각하게 대두되기 시작한 2000년대 중반 이후 급격히 계속 증가하고 있음.



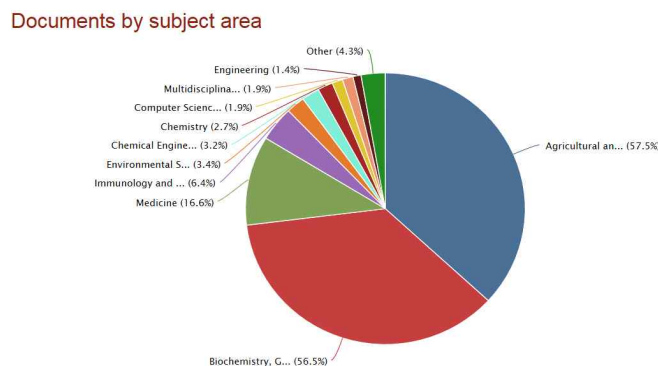
④ 주요 출판 논문은 BMC Genomics, PLOS ONE, Plant Physiology, Plant Molecular Biology 등으로 주로 식물분자생물학 분야의 육종 관련 논문이 주를 이루고 있으며 농업분야 전문지는 상대적으로 소수를 나타내고 있어 분자생물학과 전통 농업 융합 연구가 아직은 시작 단계임을 알 수 있다.



⑤ 국가별로는 대부분이 미국으로 전체의 약 30%, 인도 약 15%, 중국 14%, 영국 약 9% 이며, 오스트리아, 프랑스, 일본, 독일 한국의 순이다. 우리나라는 전체의 약 4.5%를 차지하고 있다.



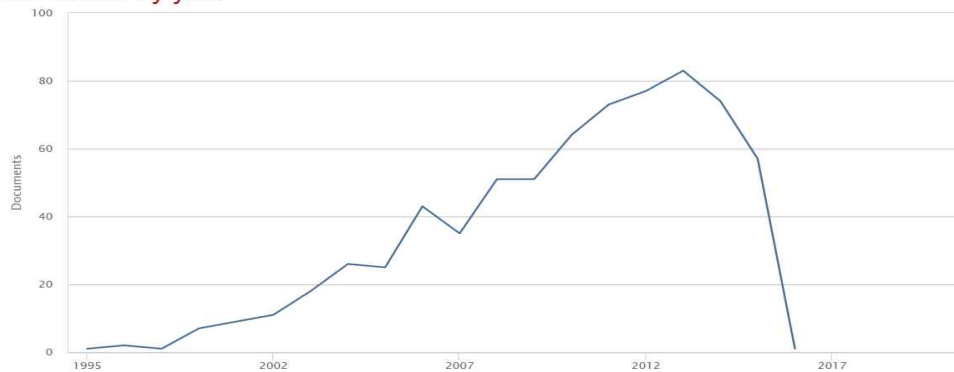
⑥ 연구분야는 대부분 농학 분야에서 주도적으로 진행되고 있으며 (57%) 생화학, 유전학, 분자생물학 연구가 나머지 절반을 (56%) 이루고 있다.



(2) 작물분자유종

- ① 플라보노이드 합성을 증가시키는 R2R3-MYB transcription factor 유전자가 과발현된 페튜니아 형질전환체의 신장, 종자발아 및 성장에 대한 우수 농업형질 분석이 발표되었음 (2012, Frontiers in Plant Science).
- ② Transcription factor 조절에 의한 식물 재설계를 통한 목표하는 작물의 형질을 정확하게 효율적으로 조절하는 시스템 개발이 보고됨 (2012, Plant Biotechnology Journal).
- ③ 작물분자유종 관련 연구는 1990년대 후반부터 진행되기 시작하여 2000년대 중반 이후 계속 증가하고 있으며 특히 2012년부터 급격하게 많은 연구가 진행되고 있다.

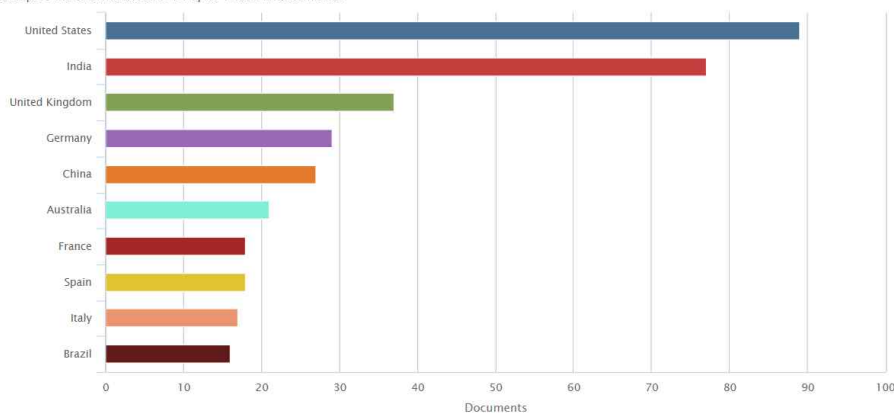
Documents by year



- ④ 국가별로는 대부분이 미국으로 전체의 약 21%, 인도 약 10.5%, 영국 8.4%, 독일 약 7.9%이며, 최근 중국이 6.5%를 차지하고 있다.

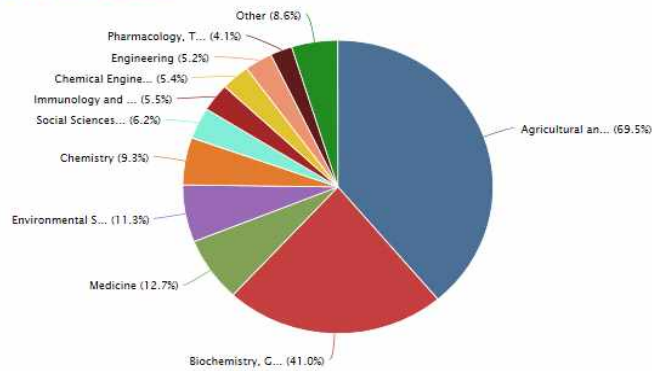
Documents by country/territory

Compare the document counts for up to 15 countries/territories



- ⑤ 연구분야는 대부분 농학 분야에서 주도적으로 진행되고 있으며 (65%) 생화학, 유전학, 분자생물학 연구가 나머지 절반을 (48%) 이루고 있다. 또한 의학 분야 (12.7%) 및 면역학/미생물학 분야 (8.8%) 연구도 활발히 이루어지고 있다.

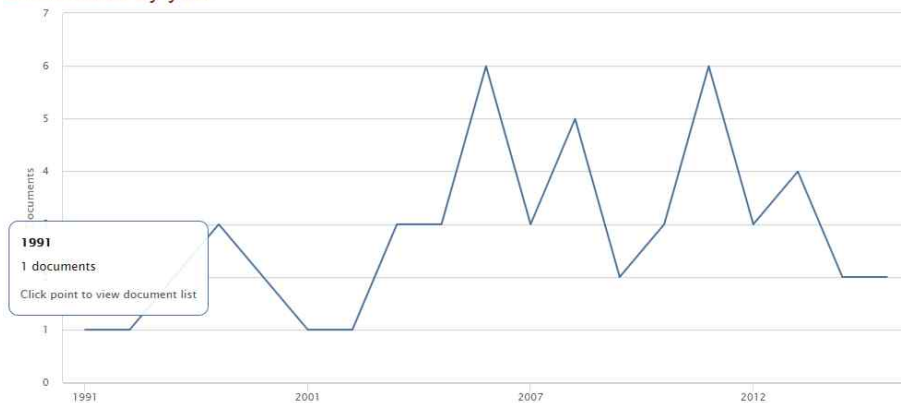
Documents by subject area



(3) 식물골지체단백질

- ① 식물에서 골지체표적단백질 연구는 매우 미미한 실정이다. 골지체로 표적되는 콩 유래 GmWRP1 단백질의 세포학적, 분자구조학 특성분석으로 식물체 내 기능분석은 보고하지 않았음 (2015, J. of Experimental Botany).
- ② 망간이온의 대사과정에 결정적 역할을 하는 골지체표적 P2A-type ATPase, ECA3 유전자에 대한 기능분석 (2008, Plant Physiology).
- ③ 식물의 골지체 단백질 관련 연구는 전체적으로 소수이며 1990년대 후반부터 특정 연도에 논문의 수가 증가하는 경향을 보여 주었다. 1998, 2006, 그리고 2012년도에 각각 3, 6, 6 편으로 이 분야 연구는 매우 소수의 그룹에 의해 진행되고 있음을 알 수 있다.

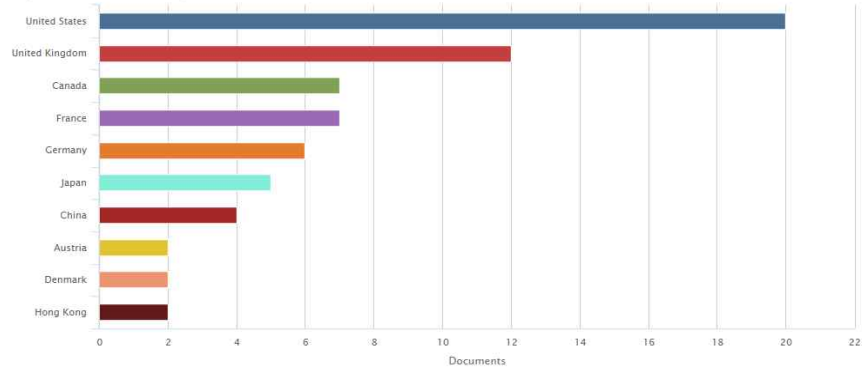
Documents by year



- ④ 국가별로는 대부분이 미국으로 전체의 약 38%, 영국 약 23%, 캐나다와 프랑스가 각각 13%, 독일 약 11%이며, 일본과 중국이 각각 9.4% 와 7.5% 를 차지하고 있다.

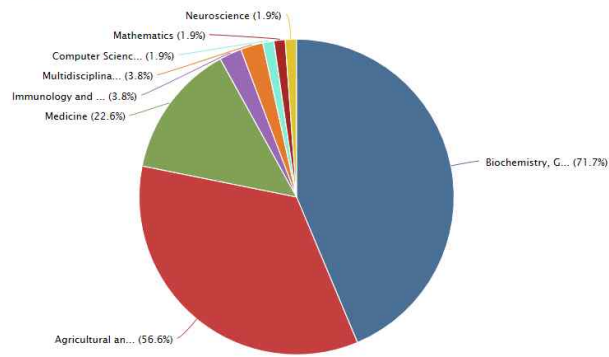
Documents by country/territory

Compare the document counts for up to 15 countries/territories



⑤ 연구 분야별 분석에서는 대부분 생화학, 분자생물학 분야에서 주도적으로 진행되고 있다 (72.7%).

Documents by subject area

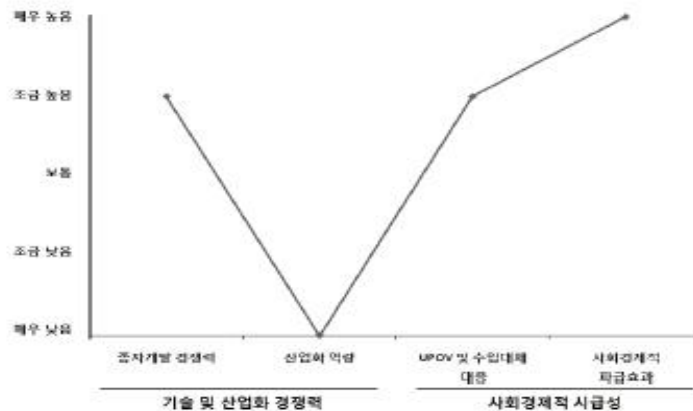


제 2 절 제품 및 시장 분석

1. 생산 및 시장현황

가. 벼 국내 제품생산 및 시장 현황

- 벼는 전체 농업 생산액 중 가장 주요한 농가 소득원 임 (20%)
- 국내 벼 종자기술 경쟁력은 세계적 수준에 도달해 있지만 산업화 측면에서는 전문 기업이 거의 존재하지 않음
- 우리나라의 벼 종자의 교배 육종기술은 세계적 수준이나 상품화를 위한 품종 육종기술은 아직 미흡함
- 벼의 품종 육성이 정부 주도로 이루어지고 있기 때문에 민간 기업의 투자가 거의 이루어지지 않음
- 국내 벼 품종 육성방향은 지속적으로 고품질을 추구하고 있으며, 병해충 및 환경 스트레스 내성 형질에 대한 수요가 증가하고 있음



[벼 종자 국내 현황 평가: 출처 GSP 사업기획보고서]

나. 벼 국외 제품생산 및 시장 현황

- 벼의 재배 면적과 생산량은 매년 증가하고 있으며, 벼의 무역량은 생산량에 비해 절대적으로 낮은 편이지만 국제가격의 변동 폭이 매우 큰 편임.
- 다양한 소비자의 수요를 목적하는 신품종 개발의 필요성이 대두되고 있음.
 - 현재 가장 중요한 벼의 농업 형질은 생산성이며, 이를 위해 병해충 저항성 및 환경 스트레스 내성 등이 반드시 요구되고 있다.
 - 최근에는 기능성 벼 생산을 통한 고부가가치 산업화에도 많은 변화를 보이고 있다.
- GMO 벼 품종은 모든 국가에서 공식적으로 재배 허가가 되지 않은 상황이지만 빠른 시간 내에 중국을 중심으로 실용화될 것으로 예상되고 있다.

<표 1 > 세계 쌀 생산 및 무역 (FAO 통계)

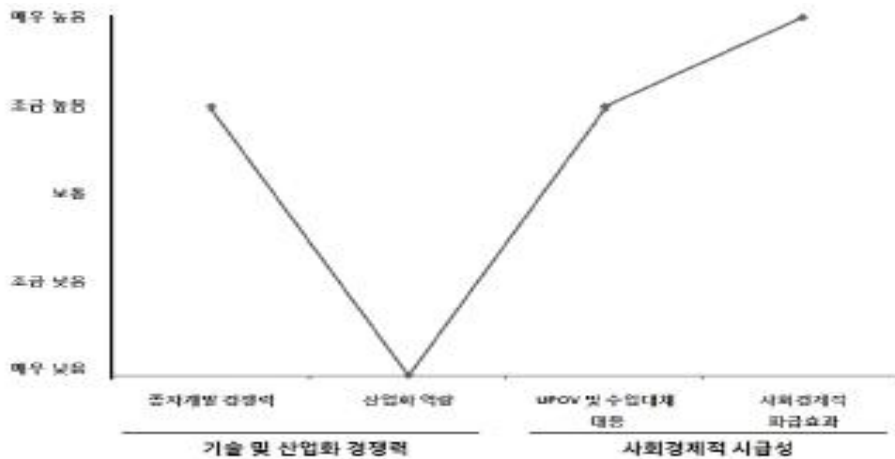
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
생산량* (천 톤)	598,316	569,451	584,630	607,795	634,390	641,095	656,807	685,875	678,688
재배면적 (천 ha)	152,043	147,953	148,537	150,549	155,026	155,744	155,953	159,251	161,421
수출	물량** (천 톤)	21,923	22,697	22,962	24,379	24,312	25,352	28,179	24,131
	금액 (백만 달러)	5,004	5,493	5,732	7,372	7,975	8,751	11,477	16,638

* 청조(rough rice), **백미(rough rice)

출처 : FAO 통계

다. 감자 국내 제품생산 및 시장 현황

- 감자의 경우에도 국내 기술 경쟁력은 세계 최고 수준에 도달해 있지만 산업화 측면에서는 전문기업이 전무한 현실 임.
- 특히 인공 씨감자 기내 대량 배양 생산 시스템은 세계 최고수준 임.
- 정부 주도의 감자종자 보급이 전체 수요의 20% 수준에 머무르고 있어 안정적 인공 씨감자의 공급이 필요한 실정이며 이를 통해 농가 및 소비자를 위한 물가안정에 기여할 것으로 사료 됨.



[감자 종자 국내 현황 평가: 출처 GSP 기획보고서]

라. 감자 국외 제품생산 및 시장 현황

- 전통적인 감자 강국인 유럽 및 북미 국가는 오랜 기간 동안 감자종자 보급사업이 체계적으로 확립되어 왔음.
- 선진국의 경우 주로 기존의 개발 품종 재배 및 병해충 저항성에 의한 생산성 증대에 주력해 오고 있음.
- 감자는 생명공학 기술을 이용한 신품종 개발 체계가 잘 이루어지고 있어 병해충 저항성

을 중심으로 GMO 개발이 진행되고 있음.

- 반면 자국 종자 보급 시스템이 확립 되지 않은 중국, 러시아, 몽골에서는 씨감자를 수입에 의존하고 있으며 상대적으로 바이러스, 박테리아, 곰팡이 등의 병해충에 심하게 누적 감염된 불량종자를 사용하고 있음.

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

- 벼, 감자 작물 모두 생산성 증대를 위한 병해충 저항성 형질과 기후변화에 대응하는 환경 스트레스 내성 품종개발이 종자산업화를 위한 가장 중요한 목적형질이 될 것으로 사료 됨.
- 특히 벼의 경우는 고 수량 품종개발로 다른 국가에 비해 20% 이상 향상된 수량증대 품종을 목표로 하고 있다.

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도* (과제완료 후)	계
직접 경제효과						
경제적 파급효과					10,000	10,000
부가가치 창출액					20,000	20,000
합 계					30,000	30,000

* 벼/감자 세계 종자시장은 약 3조/2조 6,700억원 규모임. 그 중 수량 생산성 품종이 차지하는 비중을 약 5%로 계산하였음. 본 과제를 통해 유용 유전자를 이용한 직접 판매해서 얻어지는 경제효과는 거의 없을 것으로 추정되며 유전자원의 활용을 통한 육종기간 단축으로 비용 절감효과는 상당히 클 것으로 보임. 또한 그로인해 개발된 벼/감자 종자를 판매함으로써 얻어지는 매출증가는 더 클 것이며 수출용 종자에도 적용 가능할 것이므로 시간이 갈수록 그 파급효과는 증대될 것으로 추정됨.

3. 기술개발 현황분석 결과

- (1) 기존 특허는 작물의 기능유전체 기초연구 분야에 치중되어 있어, 본 연구과제의 농업형 질분석 연구를 통한 수량 생산성이 증가된 우수 유전자원 활용 관련 특허는 의미를 갖을 것으로 판단됨.
- (2) 작물분자유종 관련 기존 논문은 NGS를 이용한 유전체 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 기능분석을 통한 기능유전체 방향으로 연구를 추진하여 관련 분야의 상위 10% 우수 논문 게재를 목표로함.
- (3) 국내 및 국외시장 분석결과 벼, 감자 작물의 생산성 증대 유용 유전자 개발을 통해 실제 농업 육종현장에 활용할 수 있는지에 연구방향을 설정하고 신규성 유전자의 세포 내 작용기작 및 역할을 규명함으로써 분자유종을 위한 원천기술을 제공하고자 함.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구방법

1. 과발현 형질전환체의 CYP21-4 분자수준 검증

가. CYP21-4 유전자의 genomic integration 검증

CYP21-4 과발현체의 게놈상 분자수준을 분석하고 선별된 형질전환체를 대상으로 형질분석을 수행한다.

- 35S promotor & gene-specific 프라이머를 이용한 PCR 확인
- Gene-specific & Nos 프라이머를 이용한 PCR 확인
- 삽입 T-DNA 주변의 genomic sequence 확인

나. CYP21-4 유전자발현 정량화

CYP21-4 과발현체의 유전자발현 분자수준을 분석하고 선별된 형질전환체를 대상으로 형질분석을 수행한다.

- Genomic level이 확인된 형질전환체를 대상으로 CYP21-4 특이적 프라이머를 이용하여 RT-qPCR 방법으로 유전자발현 양적수준 비교분석
- 대조구에 비해 유전자발현이 현저히 증가된 형질전환체를 우선 선발하여 형질분석

다. CYP21-4 단백질 발현수준 확인

CYP21-4 과발현체의 단백질발현수준을 분석하고 선별된 형질전환체를 대상으로 형질분석을 수행한다.

- CYP21-4 유전자는 식물체 간 높은 상동성을 나타내고 있어 매우 잘 보존된 아미노산 서열을 중심으로 두 개의 펩타이드를 합성하여 항체를 자체 제작
- 선별된 형질전환체를 대상으로 CYP21-4 고유 항체를 사용하여 과 발현시킨 CYP21-4 유전자의 단백질 발현 수준을 western 분석을 통해 확인
- CYP21-4 발현 단백질 수준과 형질전환체 표현형과의 관련성 분석

2. 과발현 형질전환체의 농업형질 분석

가. 식물체 발달 시기별 영양생장 특성 분석

- 벼: 잎의 수, nod의 길이, 분얼 수 등을 격 주 간격으로 측정
- 감자: 식물체 전체 길이, 줄기 굵기 등을 일정 간격으로 측정

나. 바이오매스 양적 비교분석

- 감자의 경우: 괴경 수확 시 식물체 당 지상부 및 뿌리 조직의 생체량 측정
건중량은 65°C 배양기에서 4~5일 건조 후 무게를 측정

3. 과발현 형질전환체의 field 조건에서의 생산성 분석

가. 벼 형질전환체 분석

- Spike 수: 식물체 당 spike 갯 수
- 낱알 yield: 식물체 당 전체 낱알의 무게를 측정
- 낱알 무게: 100개 낱알에 대한 무게를 측정

나. 감자 형질전환체의 field 조건에서의 생산성 분석

- 식물체 당 괴경 갯 수
- 식물체 당 전체 괴경의 무게 측정

4. 과 발현 형질전환체의 환경 스트레스 표현형 분석

가. 고농도 염 스트레스 내성 분석

- 유식물체 시기: 0, 100, 150, 200 mM NaCl 농도별 MS 배지에 치상하여 shoot, root의 길이 및 생체량을 측정
- 토양 조건에서의 성체 식물체: 0, 100, 150 mM NaCl을 일정 기간 동안 처리한 후 정상조건에서 recovery 한 후 survival rate을 조사

나. 건조 스트레스 내성 분석

- 유식물체 시기: 0, 100, 200, 300 mM Mannitol 농도별 MS 배지에 치상하여 shoot, root의 길이 및 생체량을 측정
- 토양 조건에서의 식물체: 4주 이상 자란 성체 식물체를 대상으로 물 공급을 7일~10일 동안 중단 한 후 정상 조건에서 recovery(re-watering) 한 후 survival rate을 측정.

5. 상호작용 단백질 (골지체 단백질) 탐색

가. CYP21-4 항체를 이용한 상호작용단백질 탐색

- Western 분석을 통해 재조합 또는 과 발현 식물체에서의 항체 특이성을 검증
- CYP21-4 항체를 이용한 *in vivo*-immunoprecipitation: wild-type 또는 과 발현체에서의 [CYP21-4 항체-CYP21-4 단백질-unknown 상호작용단백질]의 결합을 유도하고 SDS-PAGE 분석으로 특정 결합 단백질의 존재를 확인. MS/MS 분석을 통해 결합단백질의 펩타이드 아미노산 서열 정보를 생산하고 결합단백질을 확인
- 대상 예측 상호작용단백질을 Y2H, BiFC 분석을 이용하여 CYP21-4 단백질과의 결합

을 교차 확인 및 검증

나. 상호작용 단백질을 통한 CYP21-4 단백질의 골지체 내 기능 유추

- 상호작용 단백질이 골지체 소기관에서 기능이 밝혀진 경우라면, CYP21-4의 기능 유추 가능: PPlase 효소활성을 통한 상호작용 단백질의 안정화 또는 구조변화 등

6. CYP21-4 과 발현에 의한 glycosylation 변화 분석

가. 고-만노스형 N-glycan 양적 분석

- 일정한 양의 식물체 단백질을 SDS-PAGE 에 전기영동 한 후 ConA 항체를 이용하여 western 분석, ConA의 양적밴드 패턴분석으로 대조구 비교
- N-glycosylation 정도를 확인함으로써 CYP21-4 유전자가 glycosylation에 관여하는지를 검증

나. 식물 특이적 β 1,2-xylose & 1,3-fucose-containing N-glycan 양적분석

- 일정한 양의 식물체 단백질을 SDS-PAGE 에 전기영동 한 후, HRP 항체를 이용하여 western 분석
- HRP의 양적밴드 패턴분석으로 대조구 비교 carbohydrate reactive N-glycosylation 정도를 확인함으로써 CYP21-4 유전자가 특정 glycosylation에 관여하는지를 검증

다. 세포벽 구성에 관여하는 cytokinin-responsive, cell wall synthesizing 유전자의 유전자 발현 양적 비교분석

7. 과 발현 형질전환체의 조직학적 특성 분석

가. 세포벽 2차 비대 성장 관찰: 줄기, 잎 뿌리 조직의 vertical section을 통한 anatomical 분석

- 벼, 감자 형질전환체의 생장 시기별, 조직별 cross-section을 통한 2차 비대성장 관찰
- Transmission electro micrograph (TEM)을 이용한 세포벽 2차 비대 성장 비교분석

나. 세포벽을 이루는 구성 성분을 분석

- 리그닌 함량분석
- 셀룰로오스 함량분석
- 세포벽 당 성분 분석: arabinose, galactose, glucose, xylose 등

8. 과 발현 감자형질전환체의 *in vitro* microtuberization

가. 고농도 sucrose 조건에서 *in vitro* 괴경 형성 유도

- 각 식물체의 single node를 잘라서 괴경 유도배지, 암 조건하에 배양 후 4주간

소피경 형성을 조사함

- 소피경이 형성되는 기간을 일주일 단위로 4주간 분석하였음
- 4주 후 괴경화된 소피경의 수와 무게를 측정하여 평균치를 비교 분석하였음.
- 라인 당 10 개체씩 사용하였고 3반복의 생물학적 실험을 수행하였음.

9. 항산화 효소활성 분석

가. POD, APX, CAT 효소활성 분석

- 대조구와 형질전환체 잎 1g을 액체질소를 이용해 분쇄한 후 ice-cold 추출 용액 (100 mM potassium phosphate pH 6.0 (POD), 50 mM potassium phosphate pH 7.5 (APX), 50 mM sodium phosphate pH 7.5 (APX))에 용출 후 4도에서 12,000 xg 원심분리 20분 후 상등액을 각 효소활성 측정에 사용한다.
- 각 효소의 활성을 스펙트럼 측정기로 420 nm (POD), 290 nm (APX), 240 nm (CAT) 조건에서 측정하여 분석한다.
- 형질전환체당 3개체를 사용하였고 3반복의 생물학적 실험을 수행하였음

나. 산화스트레스 조건에서 H₂O₂ 함량분석

- 벼 식물체로부터 잎을 샘플링한 후 추출용액 (1 mg/mL 3',3' -diamino benzidine (DAB) in Tris-HCl buffer (pH 6.5) containing 0.01% Triton X-100) 에 침수시키고 60 분간 vacuum-infiltration한 후 상온조건에서 암 상태로 20시간 정치시켜 엽록소를 제거한다.
- H₂O₂ 존재를 brown spot으로 현미경하에서 *in vivo* 관찰한다.

제 2 절 연구개발 목표

본 연구의 최종목표는 주요 작물의 생산성을 증대 시킬 수 있는 **신규 유전자원**을 이용하여 **형질전환체**를 생산하고 **수량 생산량** 및 **환경스트레스 내성**에 대한 표현형을 검증함으로써 분자 육종을 위한 우수 소재를 개발하고자 한다. 또한 발굴 유전자가 어떻게 생산성 및 환경 스트레스에 내성을 증가 시키는지에 대한 역할을 규명함으로써 특허권 및 지식재산권에 대한 주도권을 확보하고 이를 활용하여 분자육종을 위한 **유용 소재**를 제공하고자 한다.

- 기초연구 결과를 활용하기 위한 **후속 연구**
- 우수 유전자원의 가치제고를 통한 미래형 **분자육종 소재개발**
- 식물분자육종 강화를 위한 **원천기술 개발** 선도

제 3 절 연구내용 및 결과

1. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 영양생장 시기 표현형

가. AtCYP21-4 형질전환체 제작

감자에 AtCYP21-4가 과발현 되는 형질전환식물체를 제작하기 위해 pCAMBIA1300 플라스미드를 이용하여 35S 프로모터에 의해 AtCYP21-4 유전자가 과발현 되는 T-DNA를 제작하고 감자 야생형 (WT, Desire) 식물체에 도입하였다 (그림 1).

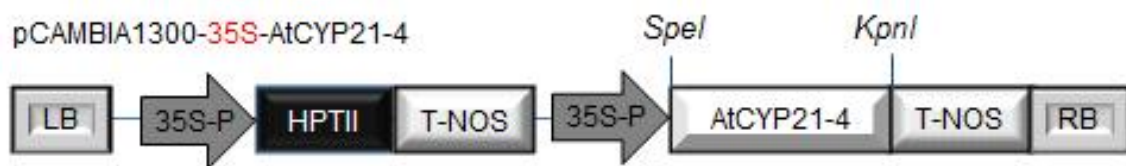


그림 1. AtCYP21-4 과 발현 형질전환을 위한 식물 binary vector construct

나. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 영양생장 시기 표현형 분석

- (1) 형질전환 결과, AtCYP21-4 유전자가 과 발현되는 형질전환 감자 3개의 라인(OE1, OE2, OE3)을 생산하였고, 이의 성장 형질의 차이를 알아보기 위하여 WT과 비슷한 크기의 괴경을 골라 평균한 상태에서 발아시켰다. 각 라인별 10개의 괴경을 대상으로 영양생장 및 생산성 표현형을 분석하였다. 처음 2주는 식물배양실 (23°C, 16h light/ 8h dark) 조건에서 키웠으며, 이후 자연광 상태의 유리온실에서 성장시켜 형질을 비교 하였다. 종자 파종 후 2개월 후 AtCYP21-4 과발현 식물체의 라인들의 생장이 WT 식물체 보다 생장이 빠르게 진행되며 전체적인 바이오매스가 증가되는 표현형을 나타내었다.
- (2) 동일한 사이즈의 괴경으로부터 영양생장 기간 동안 대조구에 비해 AtCYP21-4 과발현체는 식물체의 신장이 증가되고 곁가지가 증가되는 표현형을 나타내었고 줄기 또한 두꺼워지는 형질을 보여주었다 (그림2).
- (3) 개화 관련 형질은 크게 차이가 없었으며 모든 형질전환 라인에서 대조구에 비해 바이오매스가 증대 됨을 확인하였다. 각 개체 당 10개체의 식물을 관찰하였으며, 세 반복의 생물학적 실험을 실시하였다.



그림 2. AtCYP21-4 과발현 형질전환체 3개 라인의 수확된 감자괴경과 감자괴경으로부터 생장이 증가된 형질

다. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 영양생장 시기 형질분석

- (1) AtCYP21-4 과발현 형질전환 감자의 지상부에 대한 바이오매스 증대를 수치화 하고자 대조구와 형질전환체의 생체량을 분석하였다.
- (2) 식물체의 지상부 전체의 무게를 측정 한 결과는 fresh weigh 과 dry weight 으로 나누어 측정하였다. Fresh weight은 평균 WT의 200% dry weight은 150%인 것으로 나타나 두 결과 모두 대조구에 비해 형질전환체의 바이오매스가 크게 증대되었음을 확인하였다.
- (3) 줄기의 두께를 측정 할 때는 메인줄기의 가장 얇은 곳(Min)과 가장 두꺼운 곳(Max)을 선정하여 각 각 비교 하였다. 가장 두꺼운 곳은 과발현 라인이 120-150% 였으며 가장 얇은 곳은 130%로 식물체 줄기의 두께도 전반적으로 WT보다 30% 이상 증가함을 확인하였다(그림 3).

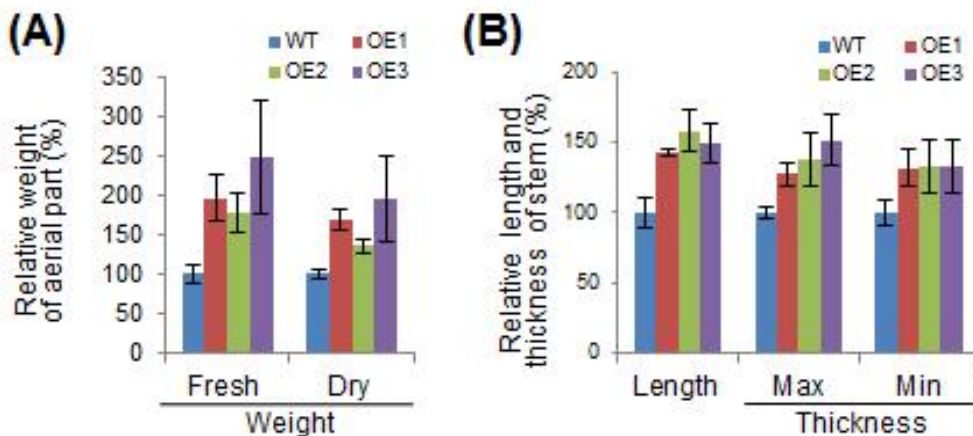


그림 3. AtCYP21-4 과발현 형질전환체의 지상부 생체량 및 건중량 (A), 줄기의 두께 (B)

2. OsCYP21-4 벼 형질전환체의 영양생장 시기 표현형

가. OsCYP21-4 형질전환체 제작

벼 작물을 대상으로 OsCYP21-4가 과발현 되는 형질 전환식물체를 제작하기 위해 앞에서와 같이 pCAMBIA1300 플라스미드를 이용하여 35S 프로모터에 의해 OsCYP21-4 유전자가 과 발현되는 T-DNA를 제작하고 벼 동진 품종 (WT, Dongjin) 식물체에 도입하였다 (그림 4).

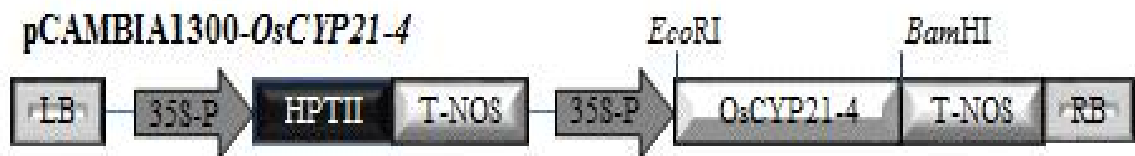


그림 4. OsCYP21-4 과발현 형질전환을 위한 식물 binary vector construct

나. OsCYP21-4 벼 형질전환체의 영양생장 시기 표현형 분석

- (1) OsCYP21-4 과발현 라인 (OE1, OE2, OE3, OE4)을 대상으로 각 라인 별 10개체 식물을 대상으로 생물학적 실험을 3 반복하였다.
- (2) OsCYP21-4 과발현 형질전환 벼를 제작하여 생장 챔버(28°C, 16 h light/8 h dark)에서 2주간 생육하였다.
- (3) WT 식물체와 OsCYP21-4 과발현 라인 (OE1, OE2, OE3, OE4) 식물체의 생육상태를 비교해 보았을 때 과발현 식물체 지상부의 길이가 약 22 cm 로 18.5 cm 인 WT 보다 20% 증가함을 확인하였다 (그림 5).
- (4) 또한 이러한 지상부 길이의 차이는 첫 번째와 두 번째 internode 길이의 차이에 의함을 알 수 있었다. 첫 번째 internode와 (그림 6) 두 번째 internode 길이는 WT 보다 각각 30% 그리고 25% 증가하였다 (그림 7).
- (5) 하지만, 생장이 계속 진행 되는 동안 internode의 길이 증대 표현형은 점차 감소하는 것으로 확인되어 CYP21-4 유전자가 초기 벼 생장에 특이적으로 관여하고 있을 것으로 생각 된다. 6주째의 식물체는 신장에는 큰 변화가 없었다(그림 8).
- (6) 과중 후 6주째부터는 과발현체의 분얼 수가 증가하고 잎의 수도 대조구에 비해 증가됨을 확인할 수 있었다 (그림 8).

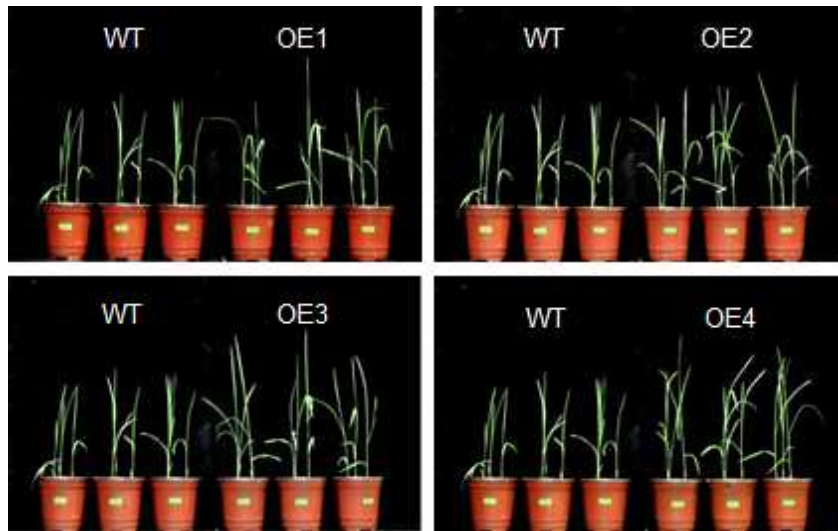


그림 5. OsCYP21-4 과발현 벼의 2주째 성장 표현형

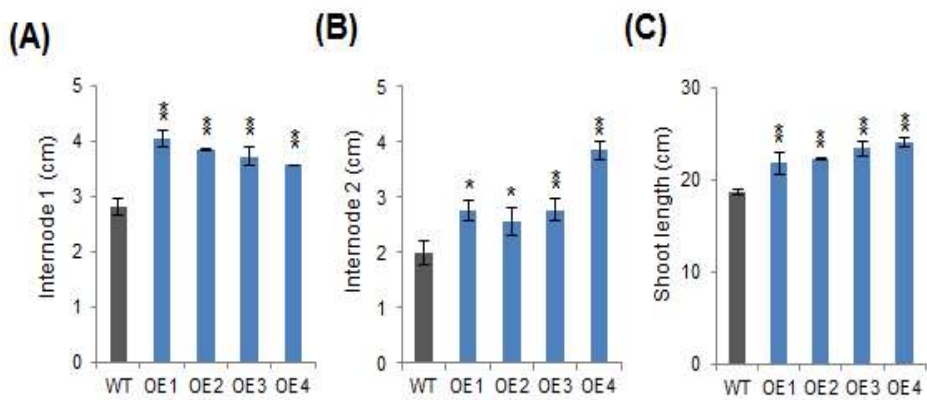


그림 6. OsCYP21-4 과발현 벼의 internode 길이 및 shoot length

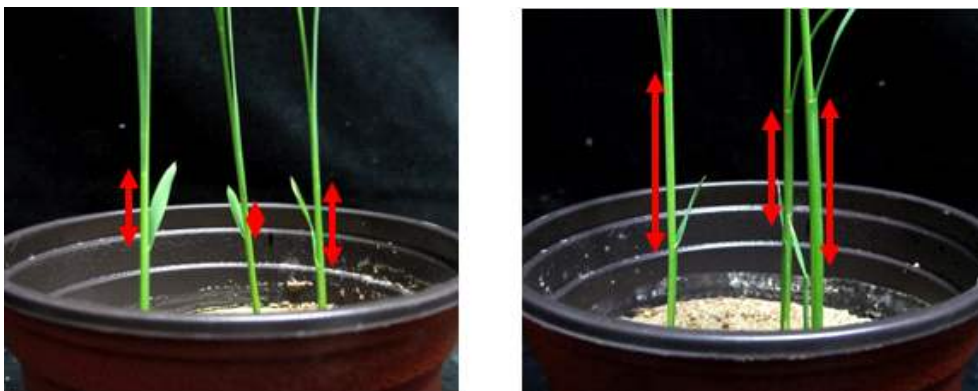
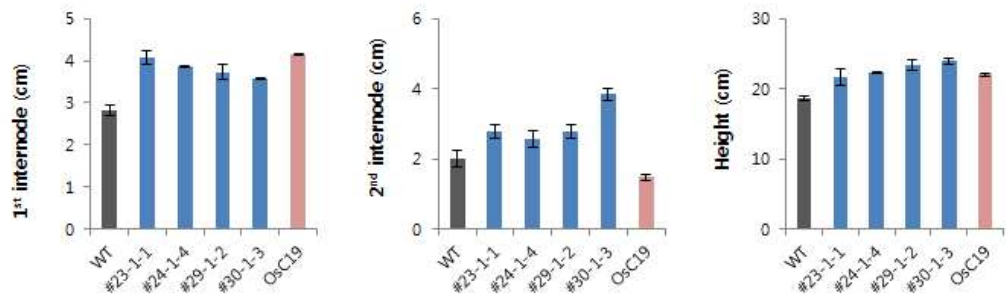
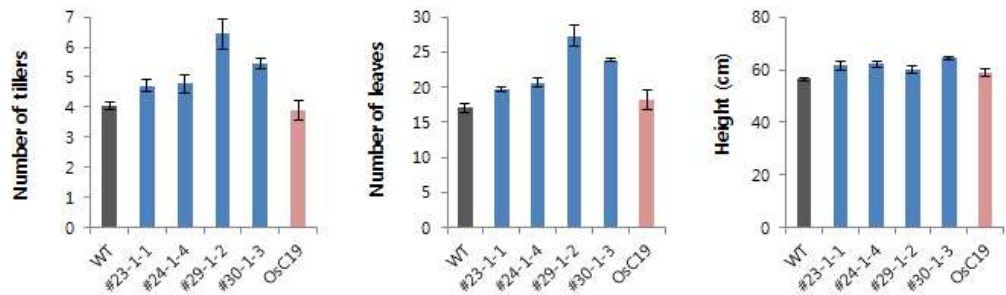


그림 7. OsCYP21-4 과발현 벼의 internode 표현형

▪ 2 weeks



▪ 6 weeks



▪ 12 weeks

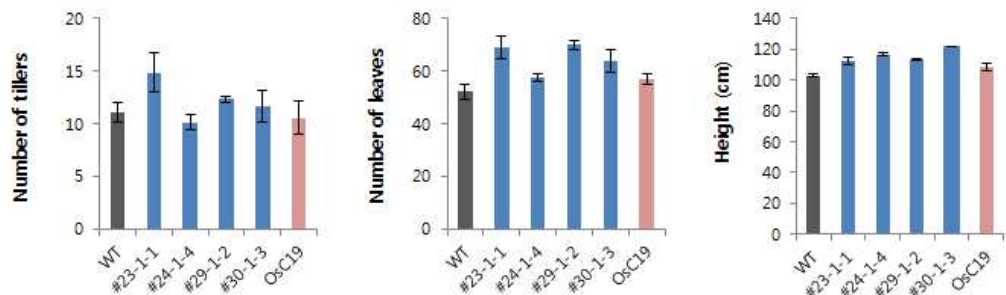


그림 8. OsCYP21-4 과 발현체의 성장시기별 농업형질

3. OsCYP21-4 비 형질전환체의 포장에서의 표현형 분석

가. 2016년도 GMO 포장실험 결과

- (1) OsCYP21-4 과발현 형질전환체의 발달 특성이 자연조건에서 유지되는지 확인해보기 위해 발아 후 3주간 성장 챔버(28°C, 16 h light/8 h dark)에서 생육한 벼를 포장(경북 대 군위 포장)으로 옮겨 심어 성장발달을 확인하였다.
- (2) 포장으로 옮겨 심은 뒤 약 2개월 후 tiller 발달이 최대가 되었을 때 식물체의 사진 (첫번째) 과 약 4개월 뒤 생식생장이 모두 이뤄진 후의 사진 (두번째)을 보면 OsCYP21-4 과발현 형질전환체가 WT에 비해 분얼이 많이 일어나 생육이 잘 된 것을 알 수 있고 식물체의 지상부 크기를 측정한 결과 의미 있는 증가를 나타내었다 (그림 9).

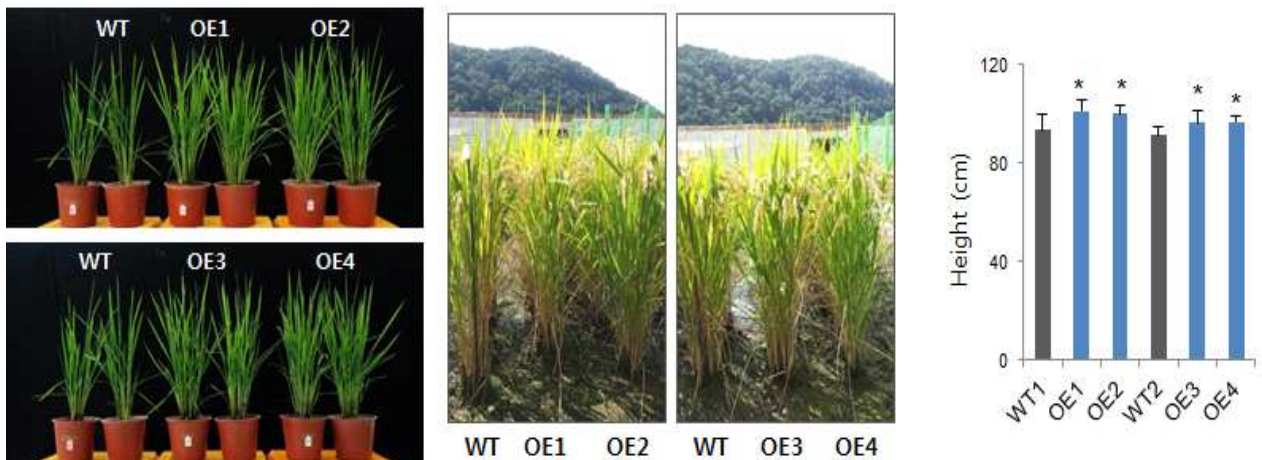


그림 9. 포장조건에서의 OsCYP21-4 과발현 벼의 성장발달 특성

나. 2017년도 GMO 포장실험 결과

- (1) OsCYP21-4 과발현 형질전환체의 성장증대 표현형을 재검증하기 위해 발아 후 3주간 성장 챔버(28℃, 16 h light/8 h dark)에서 생육한 벼를 경북대 군위 GMO 포장으로 옮겨 심어 성장발달을 5월 초 ~ 10 말까지 분석하였다.
- (2) 포장으로 옮겨 심은 뒤 약 3개월 후 tiller 발달이 최대가 되었을 때 식물체를 조사한 결과 OsCYP21-4 과발현 형질전환체가 WT에 비해 식물체 길이 및 생장이 빠르게 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. Tiller의 수도 증가됨을 보여 주었다 (그림 10).

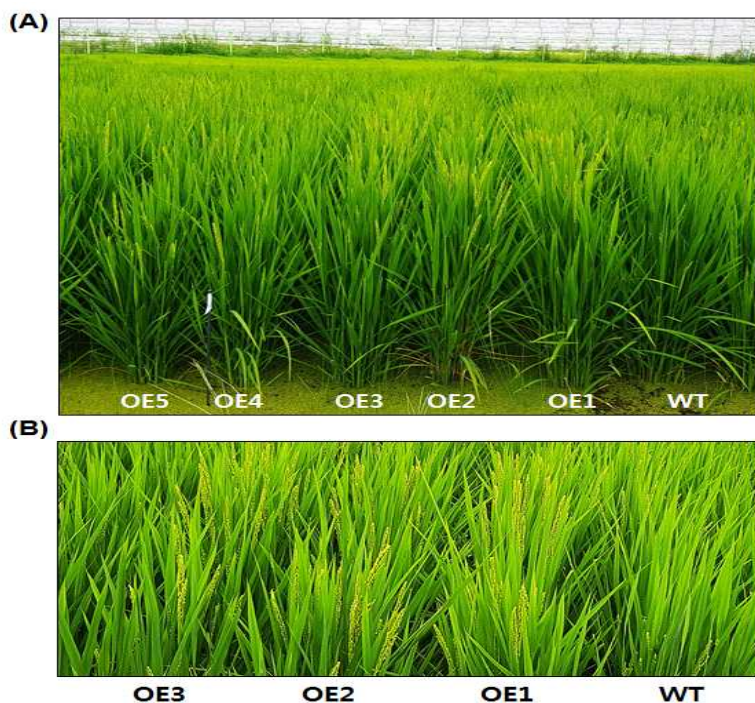


그림 10. OsCYP21-4 과발현체 벼와 WT의 tiller 형성 표현형

4. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 생산성 농업형질 분석

가. 유리 온실 조건에서의 농업형질분석

- (1) AtCYP21-4 유전자가 과발현 되었을 때, 감자의 생산성에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 WT과 AtCYP21-4 과발현 형질전환 라인의 감자를 유리온실에서 동일 조건에서 생육하였다.
- (2) Tuber 가 생산되는 시기까지 생육한 뒤 생산성을 비교해 보았다. WT과 비교해 보았을 때, 과 발현 모든 라인이 식물체의 지상부 길이가 증가한 것을 볼 수 있으며 괴경의 개수와 전체적인 수확량이 증가함을 볼 수 있었다.
- (3) 형질전환체 식물의 root 역시 길이가 증가한 것을 확인하였다 (그림 11).

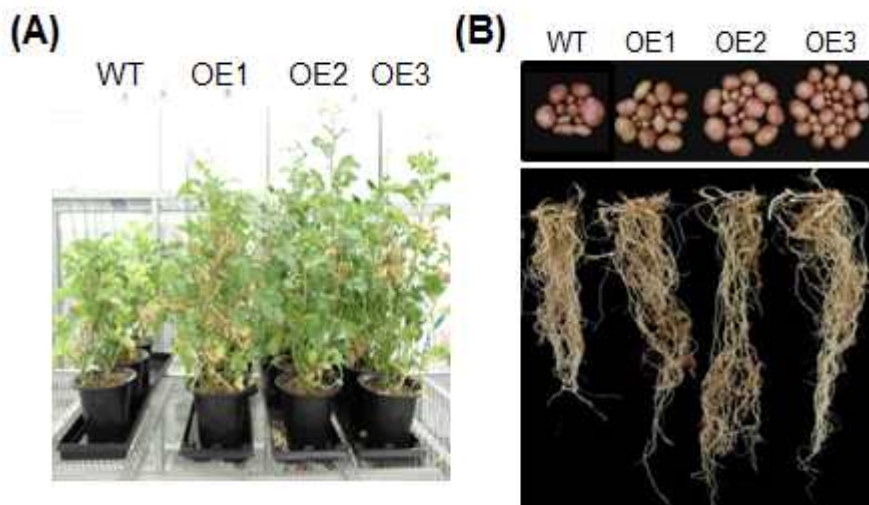


그림 11. AtCYP21-4 과발현 형질전환 감자의 생산 형질 비교

- (4) AtCYP21-4 과발현 형질전환 감자의 생산성 증대를 수치화 하여 분석하였다.
 - (가) 감자에서의 생산성에 가장 중요한 부분인 괴경 생산성을 비교한 결과 라인간의 차이는 있었지만 전체 괴경의 수가 약 20-40% 증가 하였다.
 - (나) 전체적인 괴경 무게 역시 10%에서 최대 45% 정도 증가함을 확인 하였다.
 - (다) AtCYP21-4 과발현 식물체의 뿌리 fresh weight도 지상부와 비슷하게 WT의 150-200% 였으며 뿌리 길이 또한 50% 이상 증가한 것으로 나타났다 (그림 12).
 - (라) 괴경의 숫자와 무게는 감자 생산성 농업형질의 가장 중요한 요인이므로 3회 이상 반복하여 확인하였으나 배양 조건에 따라 괴경의 숫자는 많은 변동이 있음을 알 수 있었다 (그림 13).

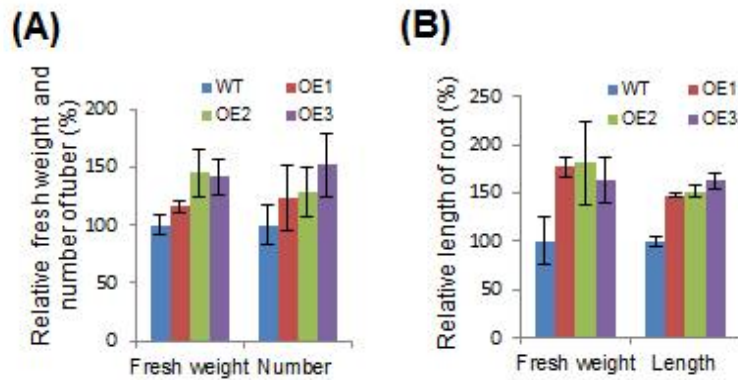


그림 12. AtCYP21-4 과발현 형질전환 감자의 지하부 생산성 형질 분석

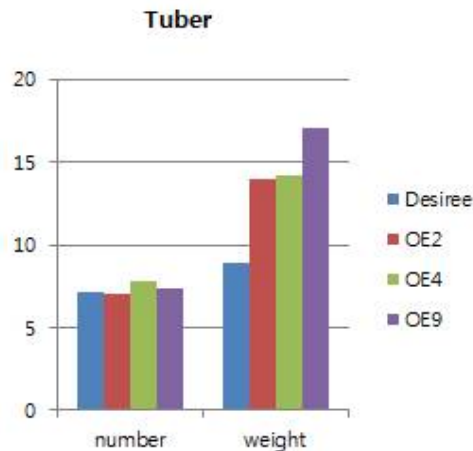


그림 13. AtCYP21-4 과발현 형질전환 감자의 피경 생산성 형질 분석

나. 포장조건에서의 농업형질분석

- (1) AtCYP21-4 과발현 감자 형질전환체를 대상으로 토양조건에서 농업형질 및 생산성을 분석하였다. 비닐온실 조건에서 4월 파종 후 약 4개월간 생육하여 형질 및 생산성을 조사하였다.
- (2) 식물체의 지상부 크기는 AtCYP21-4 과발현 라인 OE2, OE3 의 경우 WT 보다 약 20% 증가하였으나 OE1의 경우 거의 유사하였다.
- (3) 또한 식물체의 건중량 측정결과 OE1 과 OE2 는 WT 보다 감소하였고, OE3 라인의 경우 약 40% 증가하였다 (그림 14).
- (4) 유리온실 조건에서와는 달리, 비닐하우스 토양 조건에서는 대조구의 측정값 편차가 심할 뿐 아니라 형질전환 개체 간 변화가 심하여 포장조건에서의생산성 증대 표현형은 반복 실험이 필요할 것으로 판단된다. 감자는 보통 포장에서 연 1회 실험이 가능하였다.

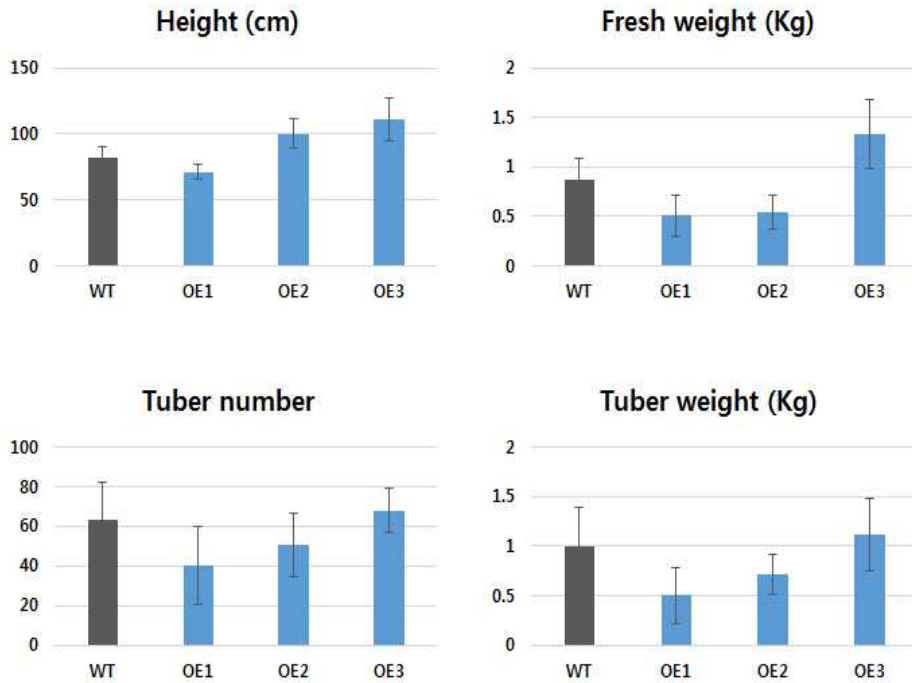


그림 14. AtCYP21-4 과발현 형질전환체(감자)의 비닐하우스 조건에서 생산성 형질 분석

5. OsCYP21-4 벼 형질전환체의 생산성 농업 형질 분석

가. OsCYP21-4 벼 형질전환체의 생식생장 시기 농업형질 분석: 1차 포장실험결과

- (1) OsCYP21-4 유전자가 과 발현된 형질전환 벼의 농업형질 및 생산성관련 특징들을 분석하기 위해 유리온실과 포장에서 종자 수확시기까지 생육하며 관찰 하였다.
- (2) 자연광 조건의 유리온실에서 파종 후 16 주 후에 tiller 수와 잎 수 그리고 spike수와 전반적인 식물체의 크기 (height)를 비교하였다.
- (3) 그 결과 과발현 식물체의 성장발달이 WT 식물체보다 증가함을 확인하였다. 과발현 라인 OE2를 제외하였을 때, tiller, spike 그리고 잎 수 모두 평균 20% 이상 WT 식물체보다 증가된 것으로 분석 되었다.
- (4) 또한 생산성 증대를 나타내는 중요한 특성인 종자의 무게를 측정한 결과, 같은 수의 종자 무게를 측정하였을 때 10-20% 종자 무게가 늘어난 것을 확인 하였다 (그림 15).

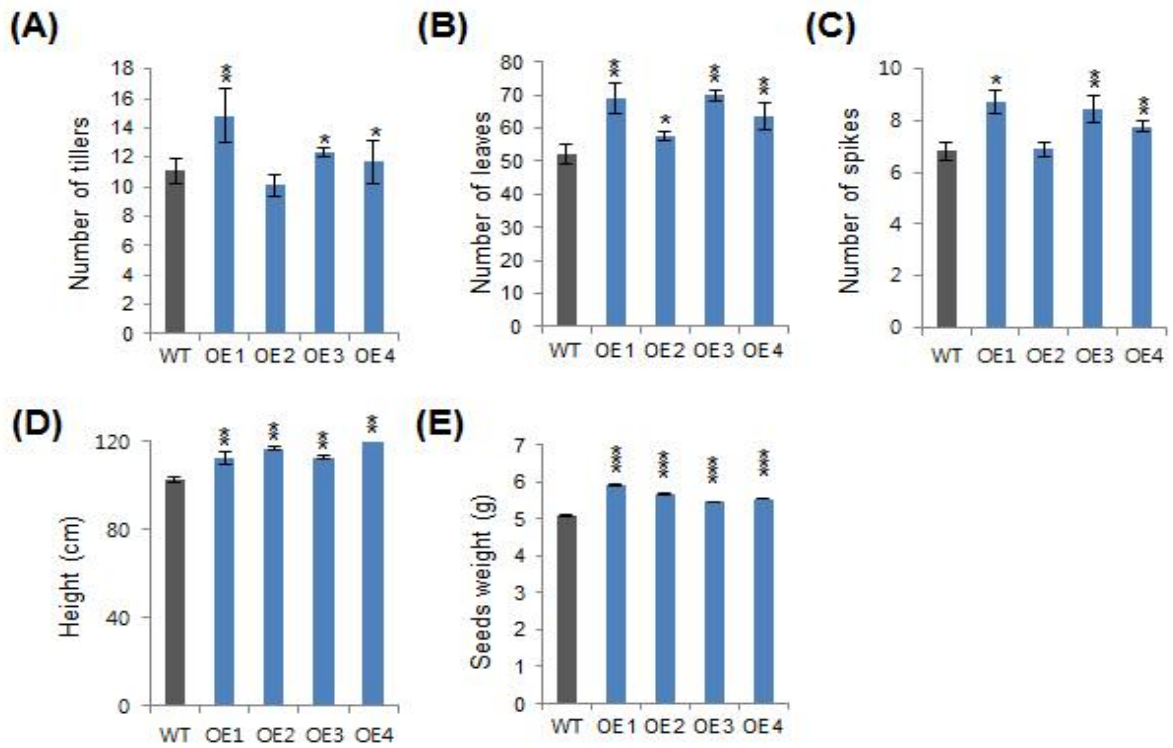


그림 15. OsCYP21-4 과발현 벼의 생식생장 단계 발달 특성 및 종자 수확량 분석

나. OsCYP21-4 벼 형질전환체의 생식생장 시기 농업형질 분석: 2차 포장실험결과 (2017)

- (1) OsCYP21-4 과발현 형질전환 벼의 생산성 관련 형질들의 차이를 보기 위해 자연 조건의 포장에서 생육하여 약 6개월 후 형질을 분석하였다.
- (2) 생육 후 4개월 후 tiller의 형성이 차이를 보였으며 그 후 수확시기에 tiller의 수를 수치화하여 측정 한 결과 OsCYP21-4 과발현 형질체 OE1, OE2, OE3 라인에서 tiller의 수가 증가함을 알 수 있었다. 그러나 OE4, OE5 라인의 경우 WT 과 비슷한 tiller 수를 나타내었다.
- (3) 이는 초기 tiller의 형성이 과발현 식물체에서 빠르게 나타나지만 tiller가 모두 형성된 수확기에는 그 차이가 줄어든 것으로 추측할 수 있다. 이와 유사한 결과로 수확한 spike의 수 역시 tiller 과 비슷한 결과를 나타내었다 (그림 16 A & B).
- (4) 최종 수확시기의 식물체의 크기는 WT과 형질전환체 라인 모두 차이가 없었으며 수확한 종자무게 역시 WT에 비해 약간 감소하거나 차이가 없는 결과를 보였다 (그림 16 C & D).
- (5) 2017년 포장실험 결과는 이전결과에 비해 형질전환체 생산성 증대 표현형을 검증하지 못하여 CYP21-4 유전자가 외부 환경조건에 매우 민감하게 반응하는 것을 보여주었다.

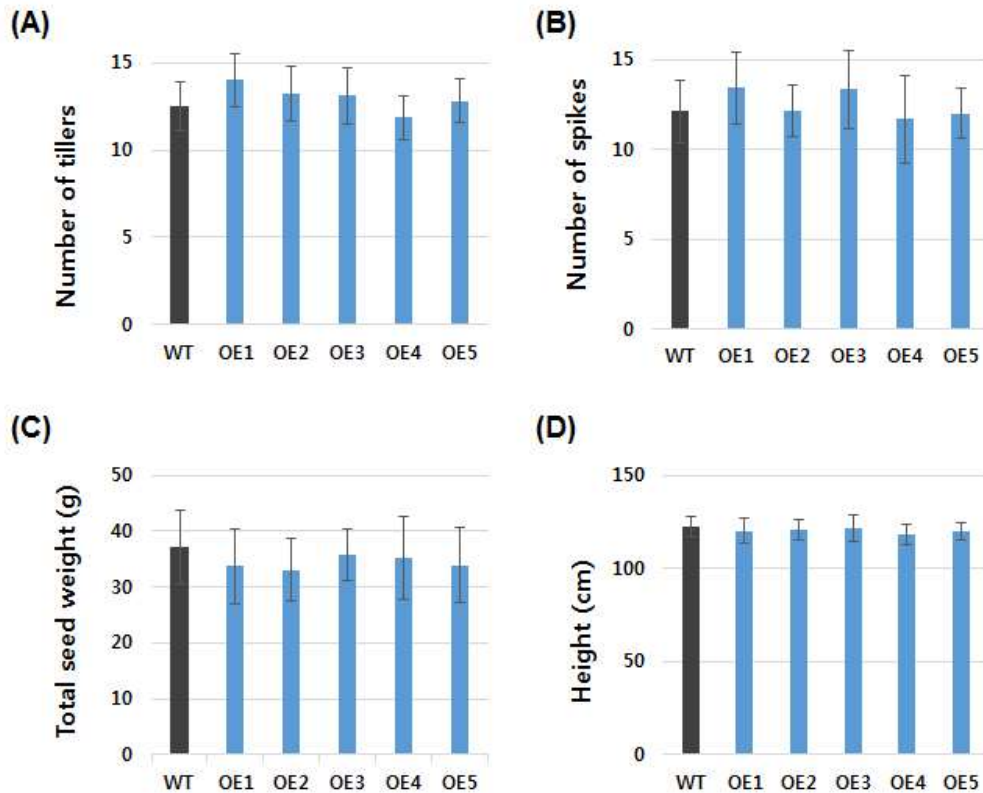


그림 16. 2017년 포장에서의 OsCYP21-4 과발현 벼의 생산성 형질 특성

6. 벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 단백질 수준 검증

가. 벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 유전자의 mRNA 발현 수준 분석

- (1) AtCYP21-4 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위하여, WT과 AtCYP21-4 과발현 형질 전환체 (라인당 각 3 식물체) 에서 total RNA 를 추출하여 Reverse transcriptase 를 이용하여 RT-PCR을 수행 하였다.
- (2) 그 결과 AtCYP21-4가 발현되도록 제작한 T-DNA가 들어간 과발현 라인에서 AtCYP21-4 유전자가 발현되고 있음을 확인하였다. 이 과정에서 감자의 actin (*PtAct1*) 유전자를 normalize control 로 사용하였다 (그림 17).

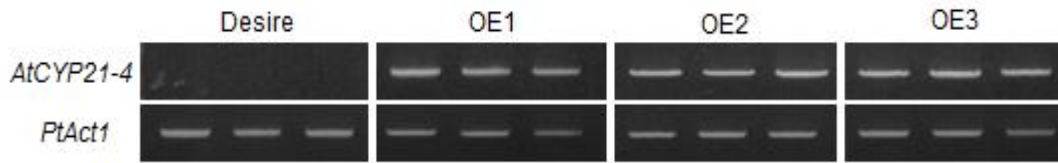


그림 17. 감자 형질전환체의 RT-PCR 분석에 의한 AtCYP21-4 유전자의 mRNA 분자수준

- (3) OsCYP21-4 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위하여, WT과 OsCYP21-4 과발현 형질 전환체 (4개 라인)에서 total RNA 를 추출하여 Reverse transcriptase 를 이용하여 RT-PCR을 수행 하였다.
- (4) 그 결과 OsCYP21-4가 발현되도록 제작한 T-DNA가 들어간 과발현 라인 모두에서 OsCYP21-4 유전자가 과발현 되고 있음을 확인하였다. 이 과정에서 감자의 actin (*OsAct2*) 유전자를 normalize control 로 사용하였다 (그림 18).



그림 18. 벼 형질전환체의 RT-PCR 분석에 의한 OsCYP21-4 유전자의 mRNA 분자수준

나. CYP21-4 특이적 펩타이드 항체 제작

- (1) 형질전환체에서 CYP21-4 유전자에 삽입 및 발현에 의해 대상 단백질이 과발현 되고 있는지를 확인하기 위해 AtCYP21-4 와 OsCYP21-4 단백질을 상동성을 갖는 아미노산 영역을 탐색하고 항원성에 대한 적정성을 조사하였다 (그림 19).
- (2) Inter-class 간 상동성을 갖는 항원 적합성 아미노산 펩타이드 두 개를 결정하였다 (그림 19의 red box).

다. CYP21-4 특이적 펩타이드 생산 항체의 항원 특이성 검증

- (1) CYP21-4 두 개 펩타이드로 부터 생산된 항체에 대한 면역성은 대장균에서 CYP21-4의 재조합 단백질의 유도발현을 통해 일차 확인하였다.
- (2) 형질전환 식물체에서의 항체 면역성을 확인하기 위해 serum 상태의 항체를 이용하여 western 분석한 결과 감자와 벼 형질전환체 모두에서 대조구에 비해 뚜렷한 25 kDa 크기의 특이적 밴드

가 확인되었다 (그림 20).

(3) Serum 상태의 항체를 분리 정제하는 과정을 거쳐 CYP21-4-특이적 항체로 사용하였다.

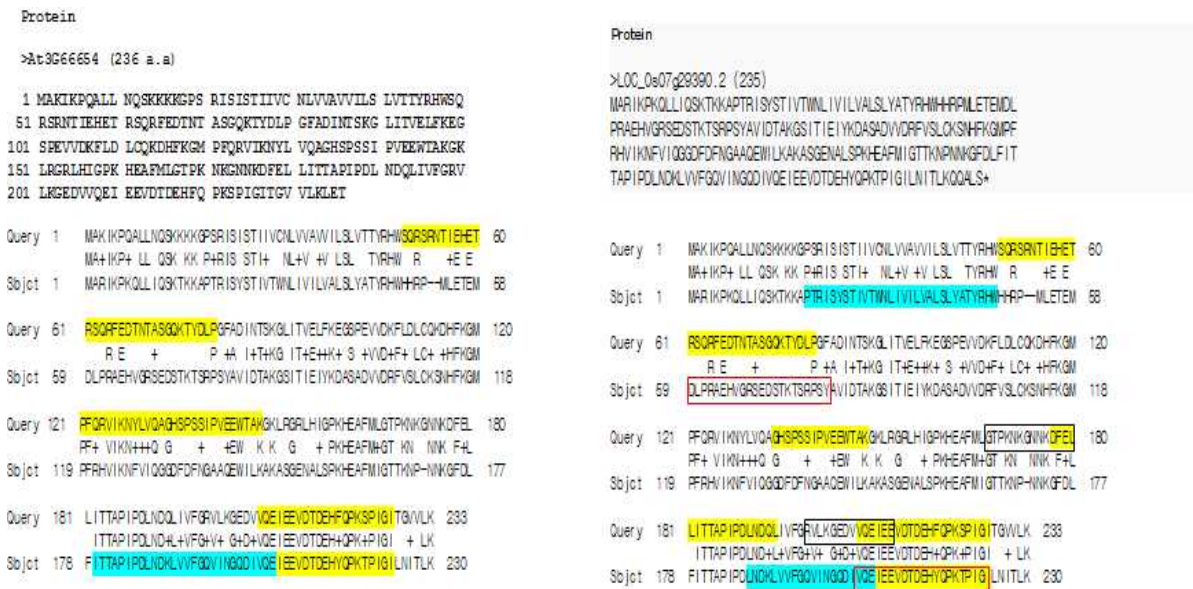


그림 19. OsCYP21-4와 AtCYP21-4의 아미노산 서열 비교 분석 및 항원 펩타이드 선별

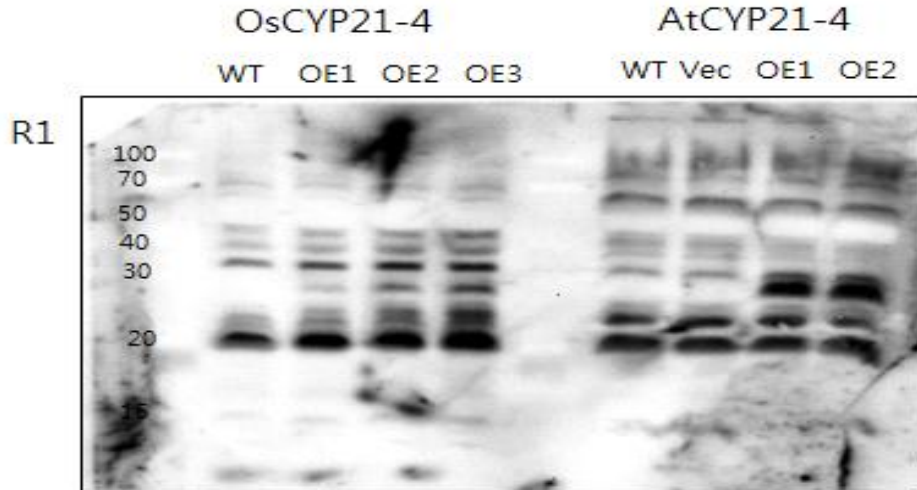


그림 20. CYP21-4 펩타이드 항체의 형질전환 식물체에서의 면역성 검증

라. 벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 단백질 수준 검증

- (1) AtCYP21-4 과발현 감자와 OsCYP21-4 과발현 벼의 잎 조직에서 단백질을 추출하여 CYP21-4 antibody를 이용하여 immunoblot을 수행하였다.
- (2) 그 결과 RT-PCR 에서와 일치하는 결과로 AtCYP21-4와 OsCYP21-4 과발현 라인에서 specific한 25 kDa 크기의 밴드를 확인할 수 있었다.

- (3) 확인에 이용한 total protein의 양은 Ponceau 염색으로 동일함을 확인 하였다.
- (4) 이를 통해서 AtCYP21-4 와 OsCYP21-4 단백질의 과발현에 의해 형질전환 감자/벼 식물체가 WT 보다 영양생장단계에서 생장이 잘 일어나고 있음을 알 수 있었다 (그림 21).

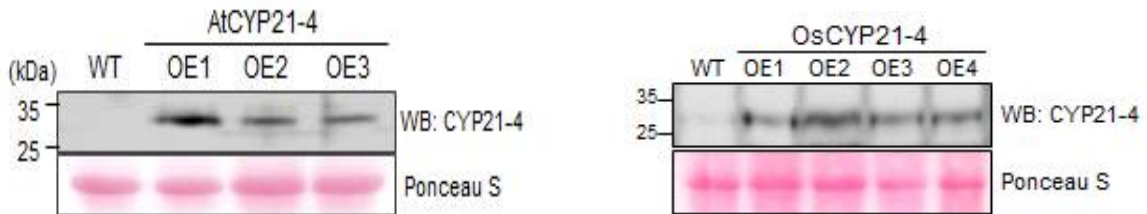


그림 21. 감자/벼 형질전환체의 CYP21-4 단백질 발현 western 분석

7. CYP21-4 과발현 식물체의 조직학적 특이성 분석

가. AtCYP21-4 과발현 감자 petiole의 조직학적 비대 성장 분석

- (1) AtCYP21-4 과발현 형질전환체의 성장 발달과정에서 식물체의 신장뿐 아니라 줄기 및 엽맥의 두께가 두꺼워지는 표현형을 관찰하였다.
- (2) 대조구와의 비교분석을 위해 정단부위에서 10번째 잎의 petioles을 일정 간격으로 cross-section 하여 그 두께를 비교한 결과, 그림 22에서와 같이 과발현 형질전환체는 대조구에 비해 petioles의 지름이 크게 증가되었음을 확인하였다.

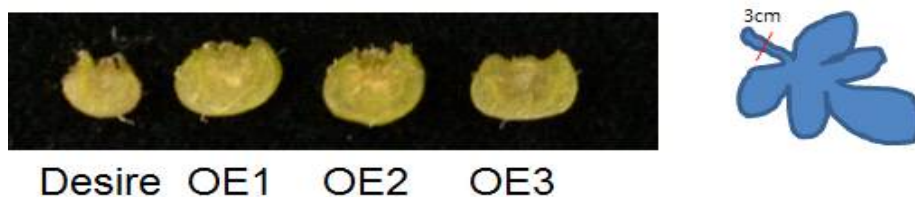


그림 22. 감자 형질전환체의 petiole cross-section

나. AtCYP21-4 과발현 감자 줄기의 조직학적 비대 성장 분석

- (1) AtCYP21-4 과발현 형질전환체는 대조구에 비해 줄기의 굵기가 매우 두꺼운 표현형을 나타낸다.
- (2) AtCYP21-4 과발현 형질전환체의 성장 발달에서 줄기의 두께가 눈에 증가함의 원인을

알아보기 위해 감자의 줄기를 cross section 하여 리그닌을 관찰하였다.

- (3) 리그닌은 식물의 2차 생장에 주요한 물질로서 세포벽을 두껍게 하여 조직을 비후하게 만드는데 관여하는 것으로 알려져 있다.
- (4) 줄기는 아래에서 4번째 internode 부위를 잘라 사용하였으며 1% phloroglucinol을 사용하여 리그닌을 염색하였다.
- (5) 리그닌 염색된 사진을 보면 xylem 부위에서 진하게 염색이 되고 식물체 외벽을 따라서 2차 생장이 일어나는 부위에도 염색이 되는 것을 확인 할 수 있다.
- (6) WT 과 AtCYP21-4 과발현 형질전환체의 가장 큰 차이도 2차 생장을 나타내는 부위의 염색이 다른 것을 볼 수 있었다.
- (7) WT의 경우 줄기 외벽 조직에 염색이 진하게 되지 않지만 AtCYP21-4 과발현 라인에서는 모두 진하게 염색되어 그 부위에 리그닌이 WT 보다 많이 존재함을 확인하였다 (그림 23).

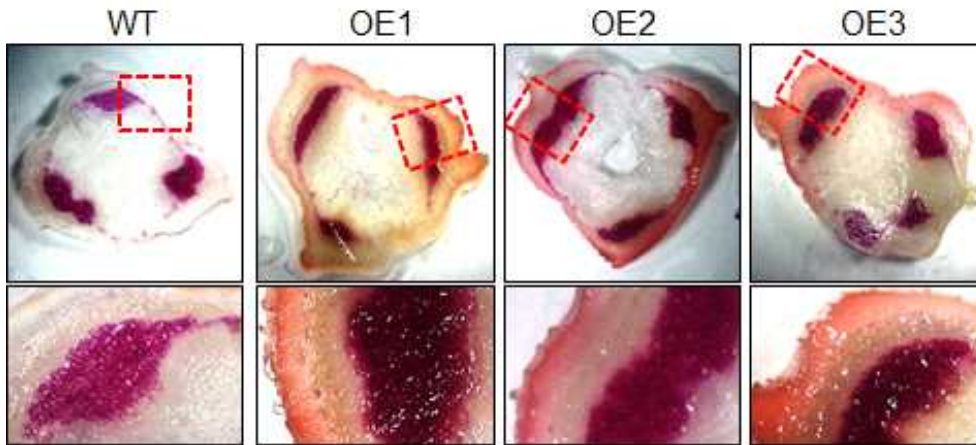


그림 23. AtCYP21-4 과발현 감자 줄기의 리그닌 염색 (Phloroglucinol)

- (8) 확인된 리그닌 함량을 재검증하기 위해 또 다른 리그닌 염색시약 Mäule을 이용하여 염색후 관찰한 결과 앞의 경우와 같이 대조구에 비해 형질전환체에서 염색의 정도가 크게 증가하였다 (그림 24).

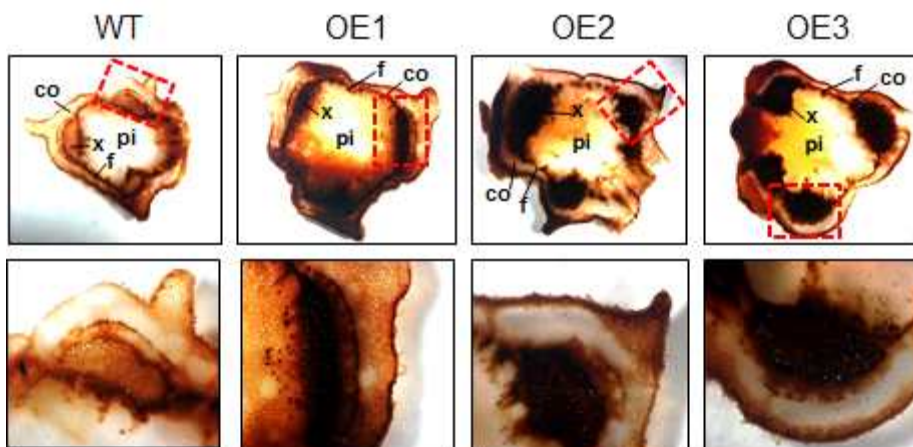


그림 24. AtCYP21-4 과발현 감자 줄기의 리그닌 염색 (Mäule)

다. AtCYP21-4 과발현 감자 잎의 조직학적 비대 성장 분석

- (1) 형질전환체의 잎 조직에서도 비대성장 표현형이 나타나는지를 확인하고자 정단 부위로부터 동일한 위치의 잎을 대상으로 vertical section을 실시하였다 (그림 25).

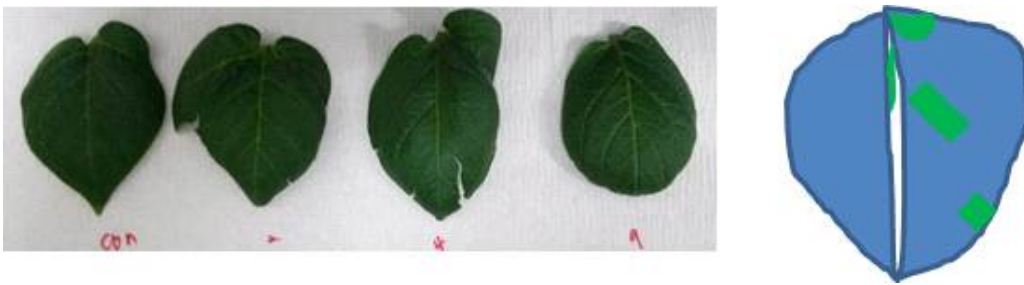


그림 25. 감자 형질전환체의 잎 vertical section

- (2) 잎을 vertical section 후 조직 염색하여 관찰 하였다. 그 결과 잎 조직 내 세포들의 구성 변화들은 보이지 않았지만 잎의 두께에 차이가 있는 것을 확인 하였다 (그림 26 A).
- (3) WT의 잎 두께는 약 225 μm 이었고 과발현 라인들은 242-248 μm 로 약 10% 잎의 두께가 증가함을 확인 하였다 (그림 26B).
- (4) 이를 통해서 AtCYP21-4 유전자의 발현이 형질전환 식물체의 조직들의 비대 성장발달을 유도하는 것을 알 수 있었다.

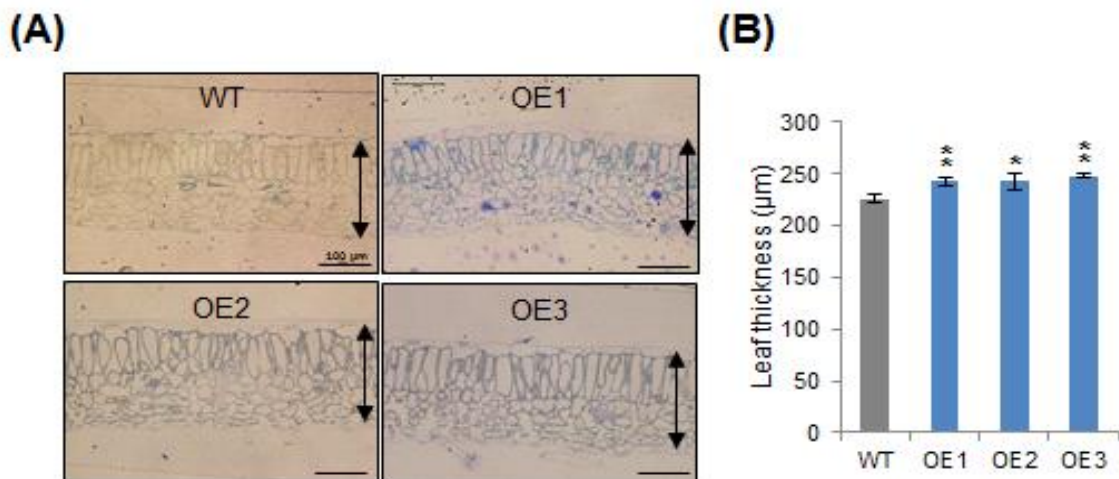


그림 26. AtCYP21-4 과발현 감자 잎의 vertical section 및 잎의 두께 비교

8. 골지체표적 CYP21-4 과발현체의 당단백질 분석

가. CYP21-4 과발현체의 당단백질 함량분석

골지체 소기관은 단백질의 folding, sorting 그리고 당단백질의 구조 형성에 중요한 역할을 하고 있으나 골지체 기관에 존재하는 단백질의 다양한 기능분석의 연구는 아직까지 매우 미흡한 상황이다.

- (1) 본 연구진도 골지체 막에 존재하는 CYP21-4 유전자의 역할 규명 및 생산성 증대 기작을 연구하고자 골지체의 여러 기능 중 먼저 glycosylation 관여 가능성을 타진해 보았다.
- (2) Glycosylation 분석을 위해 당 단백질-특이적 ConA 컬럼을 사용하여 분리된 전체 단백질로부터 당 단백질만을 분리하였다.
- (3) 벼/감자 형질전환체의 영양생장 부위인 잎 또는 지상부와 생산성 관련 감자의 괴경과 벼 종자를 대상으로 분석 하였다.
- (4) 벼/감자의 잎 조직에서 전체 단백질을 분리한 후 동일한 단백질 양을 취한 후 당단백질을 분리한 결과 벼/감자 모두에서 대조구에 비해 높은 당단백질 함량이 측정되었다 (그림 27).
- (5) 감자의 경우, 대조구에 비해 최대 1.5배의 당단백질이 분리 되었으며 벼의 경우는 거의 모든 라인에서 대조구에 비해 1.5배 높은 당단백질이 분리 되었다.

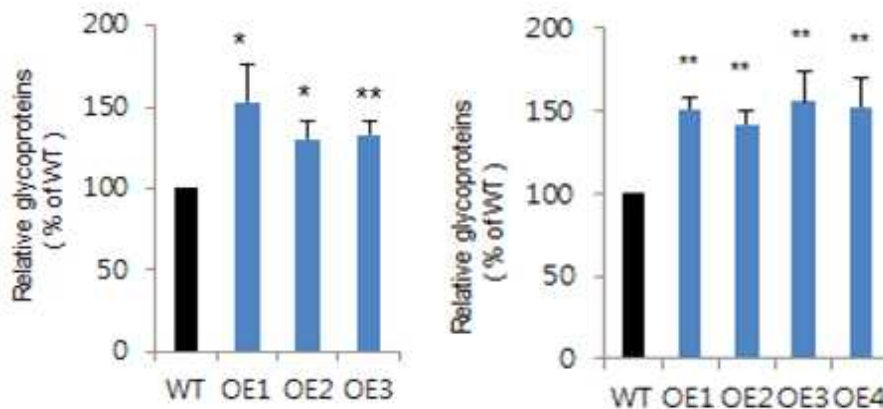


그림 27. 형질전환체의 ConA column을 이용한 지상부 당단백질 분리 및 함량 비교분석

- (6) 벼의 종자, 감자의 괴경을 대상으로 전체 단백질을 분리한 후 동일한 단백질 양을 취한 후 당단백질을 분리한 결과 벼/감자 모두에서 대조구에 비해 높은 당단백질 함량이 측정되었다 (그림 28).
- (7) 감자의 경우, 대조구에 비해 1.2-1.3배의 당단백질이 분리 되었으며 벼의 경우도 거의 모든 라

인에서 대조구에 비해 상대적으로 높은 당 단백질이 분리 되었다.

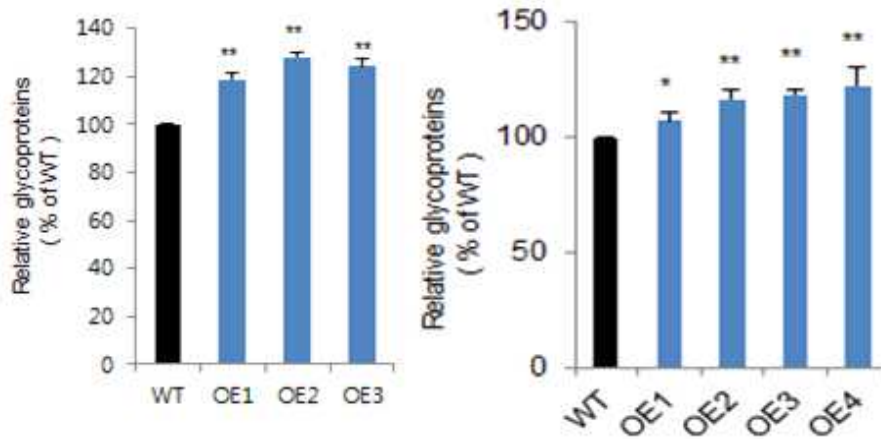


그림 28. 형질전환체의 ConA column을 이용한 벼종자, 감자괴경 조직 당단백질 분리 및 함량 비교분석

나. 벼/감자 형질전환체의 glycosylation 패턴 분석

(1) 벼/감자 형질전환식물체 영양생장 시기 ConA-특이적 glycosylation 패턴 분석

- ① Glycosylation 은 ER 소기관에서 시작되어 골지체로 이동되며 modification 되어 최종 산물을 생산하게 된다.
- ② 골지체-특이적 glycosylation의 maturation에 의해 xylose, fucose 등의 당이 결합된 복잡한 당화 과정을 확인할 수 있는 항체를 통한 western 분석으로 CYP21-4 단백질이 고 발현되는 형질전환식물체의 glycosylation 정도를 확인하고자 한다.
- ③ 벼/감자 형질전환체의 잎 조직에서 분리된 당단백질을 대상으로 골지체 당화과정의 첫 단계인 high mannose glycosylation 정도를 ConA 항체를 이용하여 확인하였다.
- ④ 감자 잎의 경우 ConA 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이의 양적 차이는 크게 나타나지 않았으나 glycosylation 패턴은 상이한 부분이 관찰되었다. * 표시된 위치의 단백질은 형질전환체 특이적임을 나타내고 있다 (그림 29).
- ⑤ Western 분석은 총 3회 이상 반복하여 2회의 대표적인 결과를 제시하고 있으며 대부분의 경우 형질전환체에서 작은 분자량의 단백질(> 30 kDa)이 대조구에 비해 강하게 반응하고 있음이 관찰되었다.
- ⑥ 벼 잎의 경우에도 ConA 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이의 양적 차이는 크게 나타나지 않았으나 특정 glycosylation 밴드가 강하게 반응하였다 (그림 30).
- ⑦ Western 분석은 총 3회 이상 반복하여 2회의 대표적인 결과를 제시하고 있으며 감자와는 달리

작은 분자량의 단백질(> 30 kDa) 패턴에도 큰 변화는 나타나지 않았다.

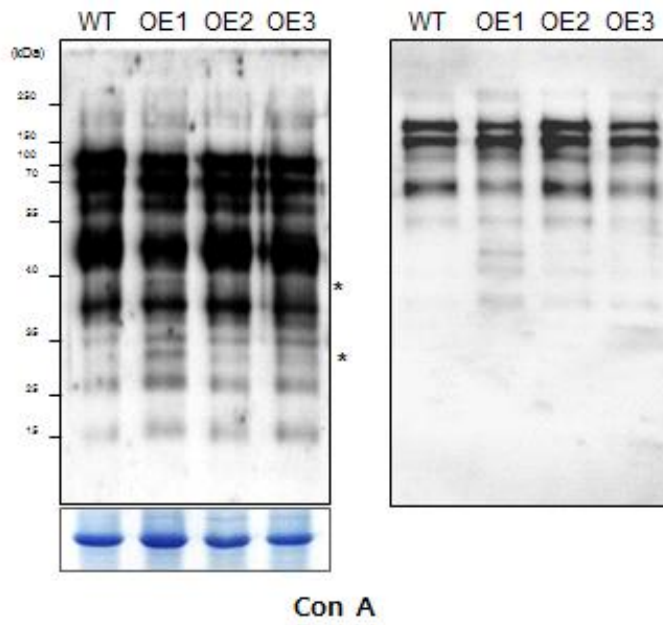


그림 29. 감자 형질전환체 잎 조직의 ConA western

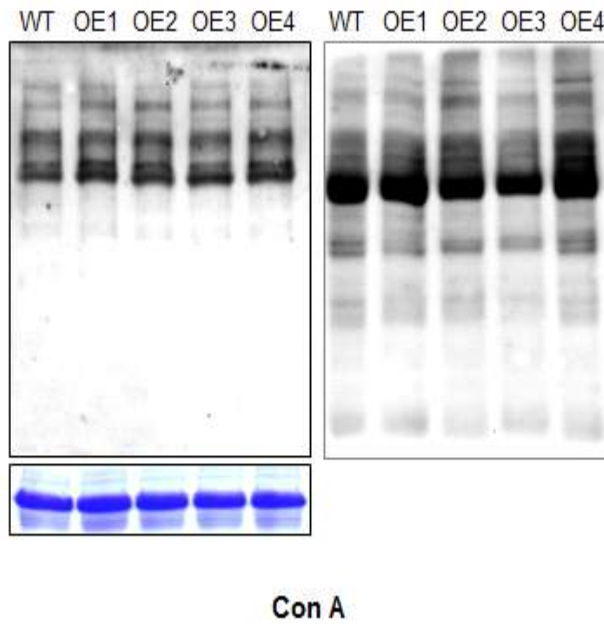


그림 30. 벼 형질전환체 잎 조직의 ConA western

(2) 벼/감자 형질전환식물체 영양생장 시기 HRP-특이적 glycosylation 패턴 분석

- ① 벼/감자 형질전환체의 잎 조직에서 분리된 당단백질을 대상으로 골지체 당화과정의 마지막 단계인 fucose, xylose-특이적 glycosylation 정도를 HRP 항체를 이용하여 확인하였다.
- ② 감자 잎의 경우, HRP항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이의 양적 차이가 확인되었다. CYP21-4 형질전환 감자 잎은 대조구에 비해 많은 양의 HRP 특이적 당 단백질이 존재하고 있으며 glycosylation 패턴 또한 상이한 부분이 존재하였다. * 표시된 위치의 단백질은 형질전환체 특이적임을 나타내고 있다 (그림 31).
- ③ Western 분석은 총 3회 이상 반복하여 2회의 대표적인 결과를 제시하고 있으며 대부분의 경우 전체 밴드에서 형질전환체가 대조구에 비해 강하게 반응하고 있음이 관찰되었다.

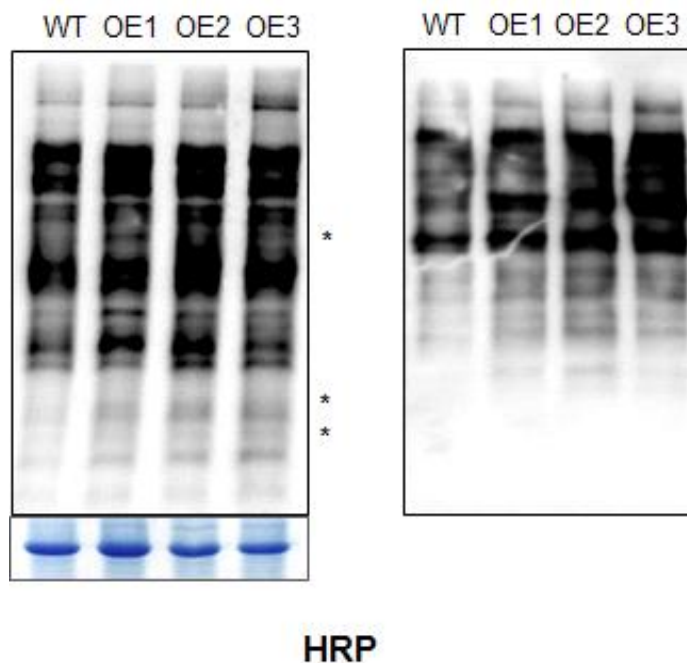
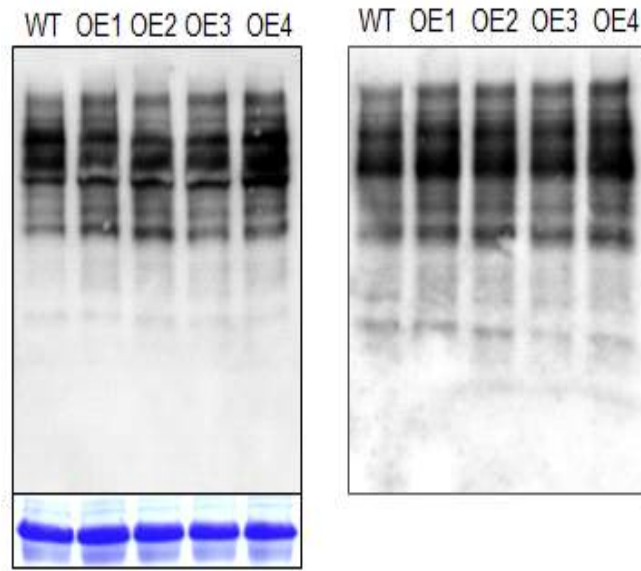


그림 31. 감자 형질전환체 잎 조직의 HRP western

- ④ 벼 잎의 경우에도 HRP 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이의 양적 차이가 확인되었다. CYP21-4 형질전환 벼 잎은 대조구에 비해 많은 양의 HRP 특이적 당 단백질이 존재하고 있었으나 대조구에 비해 특이적 glycosylation 밴드는 관찰되지 않았다 (그림 32). Western 분석은 총 3회 이상 반복하여 2회의 대표적인 결과를 제시하고 있다

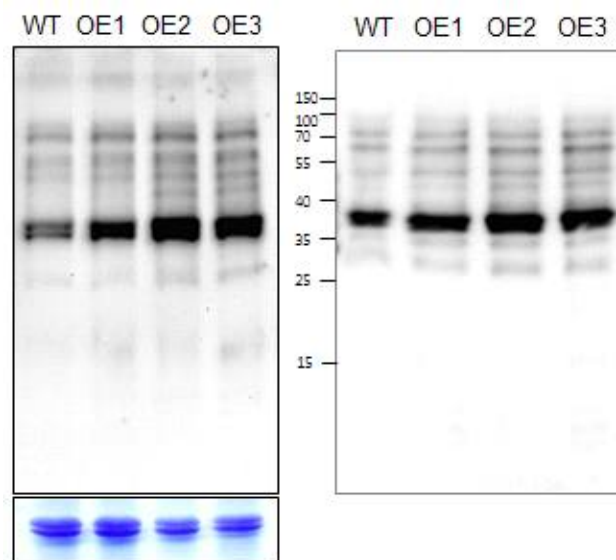


HRP

그림 32. 벼 형질전환체 및 조직의 HRP western

(3) 벼/감자 형질전환식물체 생산성 관련 조직에서의 ConA-특이적 glycosylation 패턴 분석

- ① 벼/감자 형질전환체의 생산성 관련 조직인 벼 종자와 감자 괴경조직에서 분리된 당단백질을 대상으로 글리코실화 과정의 첫 단계인 high mannose glycosylation 정도를 ConA 항체를 이용하여 확인하였다.



ConA

그림 33. 감자형질전환체 괴경조직의 conA western

- ② 감자 괴경의 경우 ConA 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이에 많은 양적 차이를 나타내었으나 특이적 glycosylation 패턴은 나타나지 않았다 (그림 33).
- ③ Western 분석은 총 3회 이상 반복하여 2회의 대표적인 결과를 제시하고 있으며 대부분의 경우 형질전환체에서 저장단백질 patatin으로 추정되는 40 kDa 크기의 당단백질이 형질전환 식물체에서 강하게 반응하였다.
- ④ 반면, 벼 종자의 경우 ConA 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이에 양적 차이가 없었으며 상이한 glycosylation 패턴도 나타나지 않았다 (그림 34).

Western 분석은 총 2회 반복하여 대표적인 결과를 제시하고 있다.

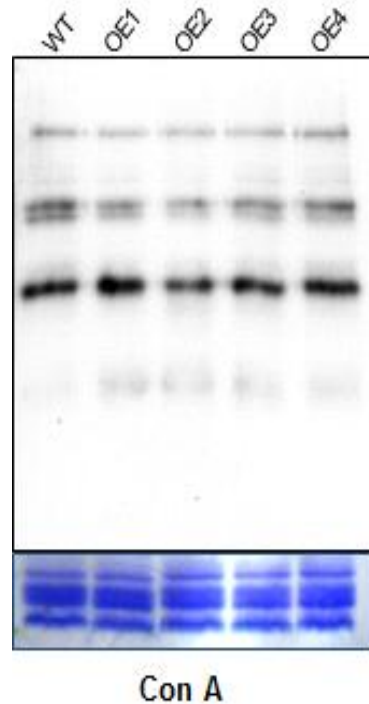


그림 34. 벼 형질전환체 종자 조직의 ConA western

- (4) 벼/감자 형질전환식물체 생산성 관련 조직에서의 HRP-특이적 glycosylation 패턴 분석
 - ① 벼/감자 형질전환체의 생산성 관련 조직인 벼 종자와 감자 괴경조직에서 분리된 당단백질을 대상으로 글리코실화 과정의 마지막 단계인 fucose, xylose glycosylation 정도를 HRP 항체를 이용하여 확인하였다.
 - ② 감자 괴경의 경우 HRP 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이에 양적 차이를 보이지 않아 앞 조직과는 다른 glycosylation 양상을 보여주었다 (그림 35).

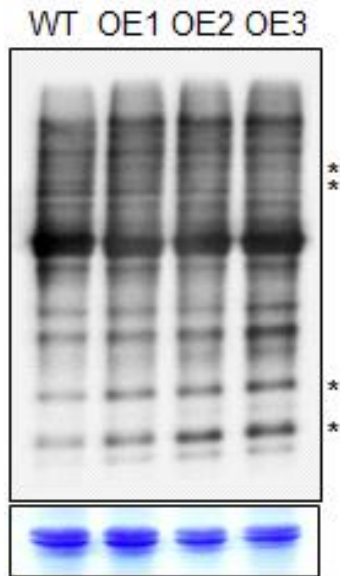


그림 35. 감자 형질전환체 괴경 조직의 HRP western

- ③ 벼 종자의 경우에서도 HRP 항체 면역반응에서 형질전환체와 대조구 사이에 양적 차이를 보이지 않았으나 특정 밴드는 대조구에서 강하지만 형질전환 모든 라인에서는 약하게 나타났으며, 반대로 특정 밴드는 대조구에 비해 모든 라인에서 강하게 반응하여 glycosylation 패턴이 다른 양상을 보여주었다 (그림 36).

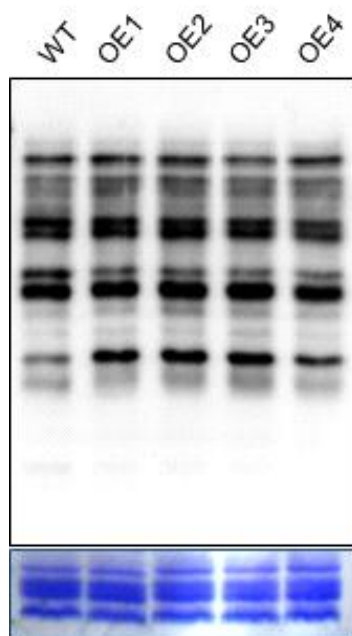


그림 36. 벼 형질전환체 종자 조직의 HRP western

9. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 *in vitro* tuberization 분석

가. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 *in vitro* tuberization 표현형 분석

- (1) AtCYP21-4 유전자에 의한 감자의 괴경형성과정에 영향을 알아보기 위해 *in vitro* 조건에서 형질전환 감자의 tuberization을 관찰하였다. 배양된 감자의 single node를 잘라서 tuberization 배지에서 압조건하에 배양하였다.
- (2) Tuberization을 매주 관찰하여 형성된 소괴경의 수를 조사한 결과, 1주일 후부터 CYP21-4 과발현 형질전환체는 OE3 라인이 가장 빨리 tuberization이 일어났고 세 라인 평균 3개의 소괴경이 형성되었으며, WT 감자의 경우 1주차에는 괴경형성이 진행되지 않았고 2주 차부터 소괴경이 형성됨을 확인하였다 (그림 37).

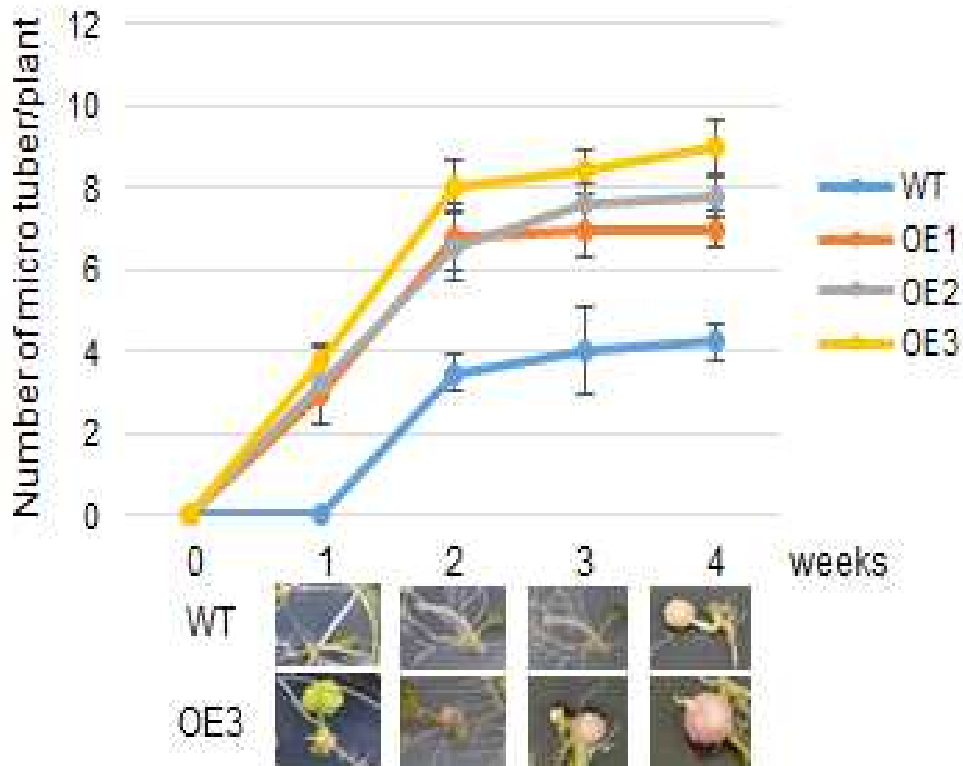


그림 37. AtCYP21-4 과발현 감자 형질전환체의 *in vitro* tuberization 표현형

- (3) WT 감자는 micro tuber가 axillary bud에서 멀리 떨어진 stolon에서 tuber가 형성되기

시작된 반면, CYP21-4 과발현 감자는 세 라인 모두 aillary bud에서 바로 tuber가 형성되었다.

(4) 또한 WT과 과 발현 형질전환체 모두 초기 2주 동안 tuberization이 활발하게 이루어지다 4주차까지는 증가가 미비하게 되는 경향은 일치하였으며, 과발현 형질전환체에서 tuber 형성이 빨리 시작되어 최종적인 micro tuber의 수가 WT의 두 배로 관찰 되었다.

나. AtCYP21-4 감자 형질전환체의 *in vitro* tuberization에 의한 소피경 형성 형질분석

(1) 4주 간의 *in vitro* tuberization 관찰 결과 생성된 소피경의 총량과 무게를 측정하였다.

그 결과 한 개의 single-node에서 생성된 micro tuber의 수는 WT은 평균 4개인 반면 CYP21-4 과발현 형질전환체의 경우 세 라인 (OE1, 2, 3) 모두 유사하게 8개 정도로 약 두 배로 증가하였다.

(2) 최종 형성된 소피경의 각각 무게 역시 형질전환체 라인 이 WT의 두배로 증가 됨을 확인하였다 (그림 38).

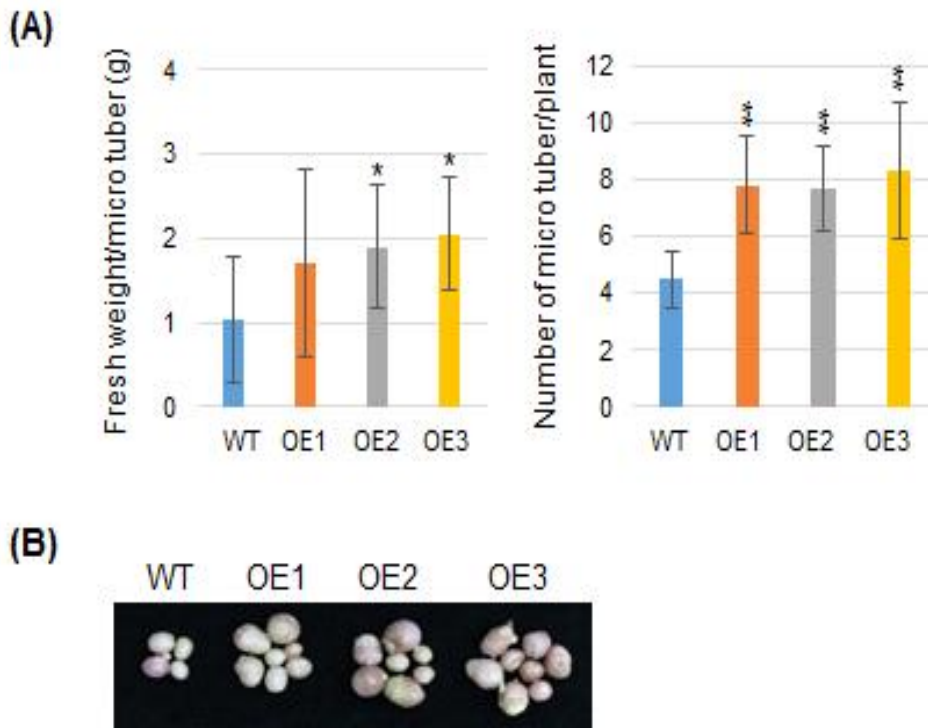


그림 38. AtCYP21-4 과발현 형질전환체 3개 라인의 *in vitro* tuberization에 의한 소피경의 수 및 무게

10. 골지체표적 CYP21-4유전자의 분자특성 분석

가. 최초로 규명된 식물 골지체표적 이뮤노필린

- (1) 현재까지 골지체로 표적되는 이뮤노필린이 보고된 바 없었으나 본 연구를 통해 골지체 표적 이뮤노필린 존재를 최초로 보고함.
- (2) *In silico* 분석에 의해 미토콘드리아로 표적되는 유전자로 분류하였음
- (3) Cis-Golgi 마커 Man1-mCherry 마커를 이용하여 골지체 단백질임을 형광현미경으로 확인함 (그림 39A).
- (4) CYP21-4 단백질의 N-말단 부분의 TM부분의 골지체표적 신호서열을 확인하기 위해 TM을 제외한 CYP21-4유전자와 TM 유전자만을 GFP 형광단백질에 연결하여 담배 잎에서 확인한 결과 CYP21-4 골지체표적은 N-말단의 TM영역에 의한 것으로 확인되었다 (그림 39A, 그림 40).
- (5) 또한 골지체로 표적되기 위해서는 ER 소기관을 통해 이동되는지를 확인하고자 ER에서 골지체로 이동을 차단하는 brefeldinA (BFA)를 처리하여 확인한 결과, BFA 처리조건에서는 CYP21-4 단백질이 ER 소기관에 존재하고 있음을 확인하였다 (그림 39B). BFA 처리시 ER마커 BiP-RFP와 일치되는 형광이 관찰됨.

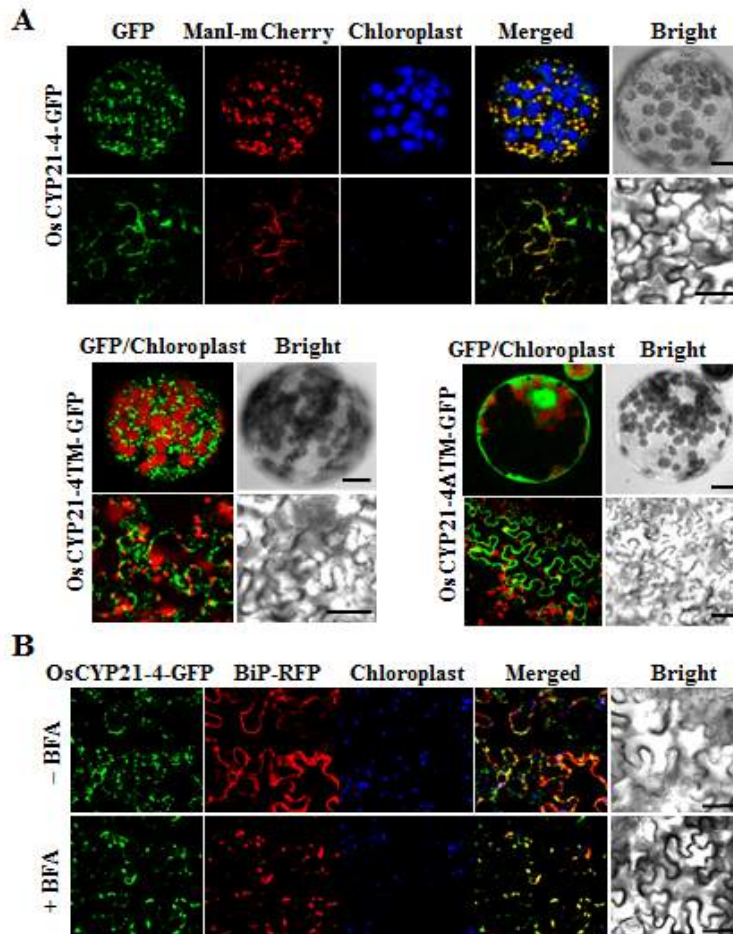


그림 39. CYP21-4 식물세포 내 위치

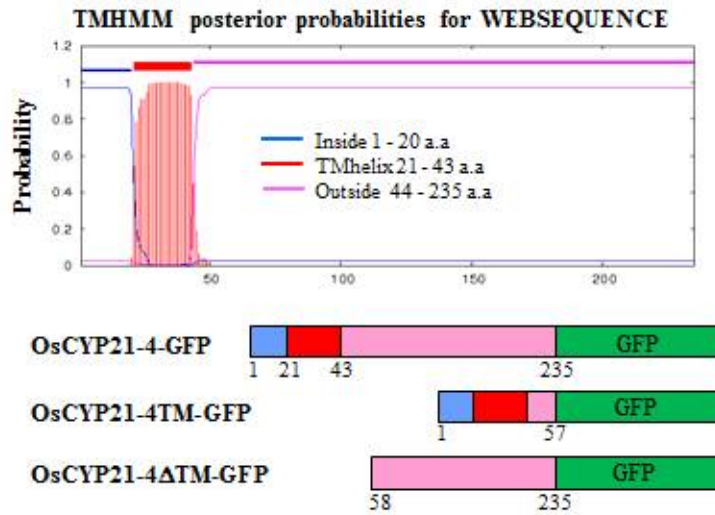


그림 40. CYP21-4단백질 구조 및 TM 영역

나. *In vitro* PPlase 효소활성

CYP21-4 유전자는 아미노산 서열분석 결과 이뮤노필린유전자군이 갖는 PPlase 효소활성 핵심잔기가 대부분 다른 잔기로 치환되어 있어 PPlase 효소활성을 갖지 않을 것으로 예측되었다. *In vitro* PPlase activity 조건에서 재조합 CYP21-4 단백질이 효소활성을 나타내는지 분석하였다. 동물의 CYPD 재조합단백질을 대조구로 사용하였으며 합성기질 조건에서 효소활성이 강하게 측정되었다. CYP21-4 단백질은 여러 농도 조건 모두에서 효소활성 값이 나타나지 않아 CYP21-4는 PPlase 핵심잔기가 변형되어 진화된 유전자로 식물체 내 다른 역할을 수행할 것으로 판단된다 (그림 41).

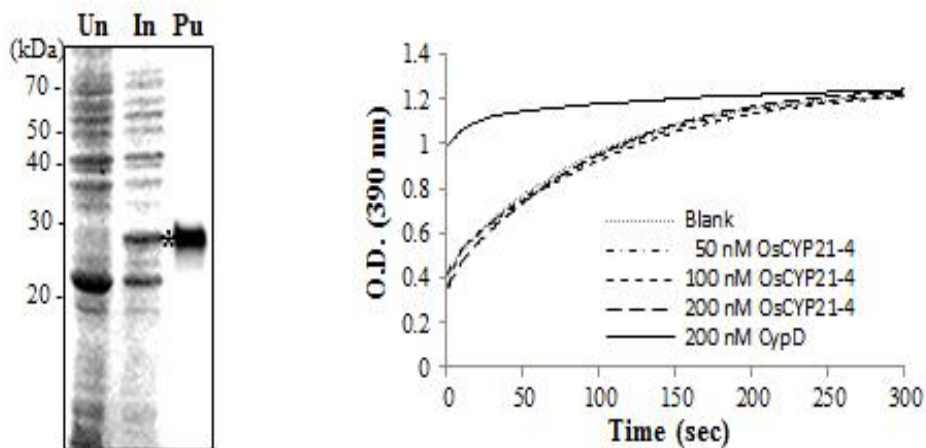


그림 41. 재조합 CYP21-4 단백질의 *in vitro* PPlase 효소활성

Table 1. Gene-specific primers used in this study.

Gene name	Primer Sequences (F, forward; R, reverse[5'-3'])		Applications
<i>OsCYP21-4</i>	F: gaattcatggcggagataaagccgaagcaattg	R: ggatcctcagctcaaaagcttgcgttttagcgtgatg	Transgenic plant (pCAMBIA1300 cloning)
<i>OsCYP21-4</i>	F: cagccatggcgaacgacgataaagccgaagc	R: cagccatggcgtcaaaagcttgcgttttagcgtg	Subcellular localization (pCAMBIA1302 cloning)
<i>OsCYP21-4TM</i>	F: taccatggcggagataaagccgaagc	R: aatccatggcctcagctcgcagcattggcc	Subcellular localization (pCAMBIA1302 cloning)
<i>OsCYP21-4ΔTM</i>	F: tatccatggatcctcctcgtcgtgagca	R: aatccatggcgtcaaaagcttgcgttttagcgtg	Subcellular localization (pCAMBIA1302 cloning)
<i>OsCYP21-4</i>	F: taccatatggcggagataaagccgaagcaa	R: atgcggccgcgtcaaaagcttgcgttttagcgt	Protein expression (pET41b cloning)
<i>OsCYP21-4</i>	F: atggcggagataaagccgaagcaattg	R: tcagctcaaaagcttgcgttttagcgtgatg	RT-PCR or qRT-PCR
<i>OsACT1</i>	F: catgctatcctcgtctcgacct	R: cgcacttcatgatggagttgtat	RT-PCR or qRT-PCR

11. CYP21-4 유전자의 환경스트레스 내성 기능

가. CYP21-4 유전자의 환경스트레스 반응

CYP21-4 유전자 기능분석을 위해 여러 환경스트레스 조건에서 CYP21-4의 유전자발현을 RT-qPCR 방법으로 정량분석 하였다. 고농도 염조건에서 강하게 유전자발현이 증가되었으며, 건조, ABA 호르몬, 다양한 산화스트레스 조건에서도 유전자발현이 9~3배까지 증가되었다 (그림 42). 이 결과로부터 CYP21-4는 환경스트레스에 기능할 수 있는 유전자임을 예측할 수 있었다.

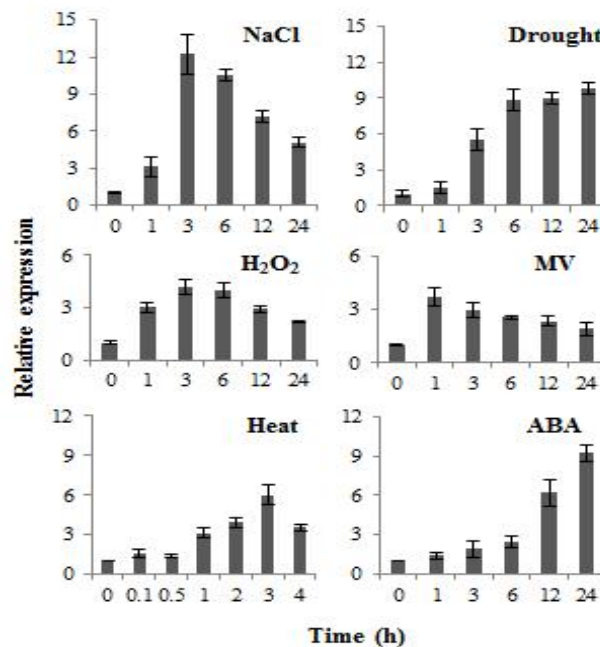


그림 42. CYP21-4 유전자의 환경스트레스 유전자발현 RT-qPCT 분석

나. CYP21-4 과발현식물체의 환경스트레스 내성 표현형

(1) CYP21-4 과발현 감자 식물체의 환경 스트레스 내성 분석

① AtCYP21-4 과발현 감자 잎을 이용한 고농도 염 내성 분석

- CYP21-4 유전자는 여러 환경스트레스 시 유전자발현이 증가되는 특성을 보여 주어, 식물의 성장뿐 아니라 스트레스 조절기작에도 기능을 할 것으로 예측하고 있다.
- AtCYP21-4 과발현 감자 형질전환 식물체가 스트레스에 내성을 나타내는지 확인하기 위하여 잎의 disc를 이용한 스트레스 처리를 실시하였다.
- 정단부위의 7-8th 잎을 대상으로 1cm 지름의 leaf disc를 만들고 고농도 염 용액에 48 시간 처리하였다.
- 고농도 염 처리시 200 mM, 500 mM농도 모두에서 대조구에 비해 내성을 보여 주었다 (그림 43, left).
- 고농도 염 내성에 대한 생리학적 변화 분석을 위해 엽록소의 함량을 측정한 결과, 200 mM 농도에서는 대조구에 비해 2배 정도의 높은 엽록소 함량이 확인되었다 (그림 43, right).
- CYP21-4가 과발현된 감자의 경우에서도, 환경스트레스에 기능하고 있음을 확인할 수 있었다.

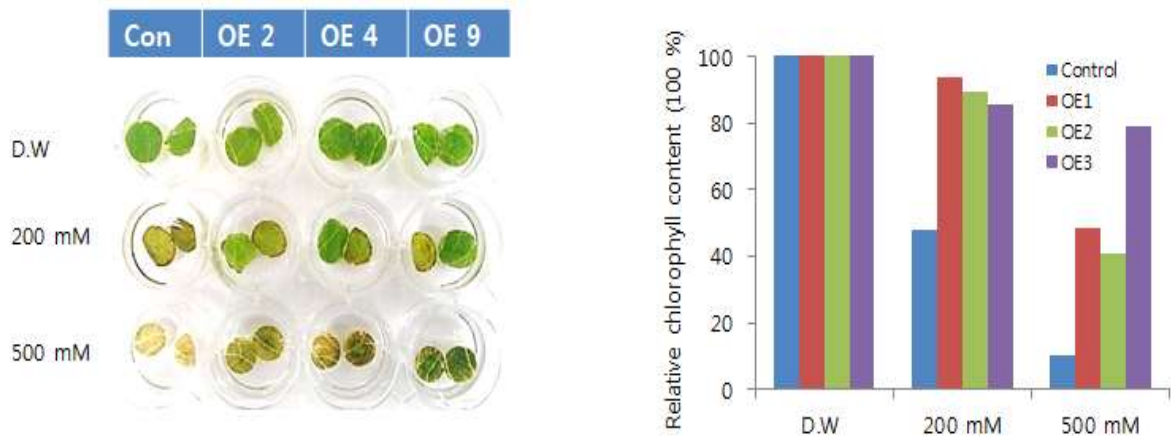


그림 43. AtCYP21-4 과발현 감자 leaf disc의 고농도 염 처리 표현형 및 엽록소 함량 비교분석

② AtCYP21-4 과발현 감자 잎을 이용한 고농도 H₂O₂ 내성 분석

- CYP21-4 유전자는 산화 스트레스를 유발하는 H₂O₂ 처리 시에 유전자발현이 크게 증가되는 특성을 나타낸다.
- AtCYP21-4 과발현 감자 형질전환 식물체가 H₂O₂ 스트레스에 내성을 나타내는지 확인하기 위하여 앞에서와 같은 방법으로 잎의 disc를 이용하여 스트레스 처리를 실시하였다.
- H₂O₂ 처리시 10 mM에서는 대조구나 형질전환체 모두 표현형에 큰 변화가 없으나 20 mM 농도에서는 형질전환체가 대조구에 비해 내성을 보여 주었다 (그림 44, left).
- H₂O₂ 산화스트레스 내성에 대한 생리학적 변화를 알아보기 위해 세포막의 손상 정도를 이해할 수 있는 electrolyte ion leakage 분석을 실시하였다.
- Ion leakage 측정 결과, 10 mM과 20 mM 농도 모두에서 대조구에 비해 낮은 값을 나타내었다 (그림 44, right).
- 이상의 결과로부터 CYP21-4가 산화환경스트레스에 기능하고 있음을 확인할 수 있었다.

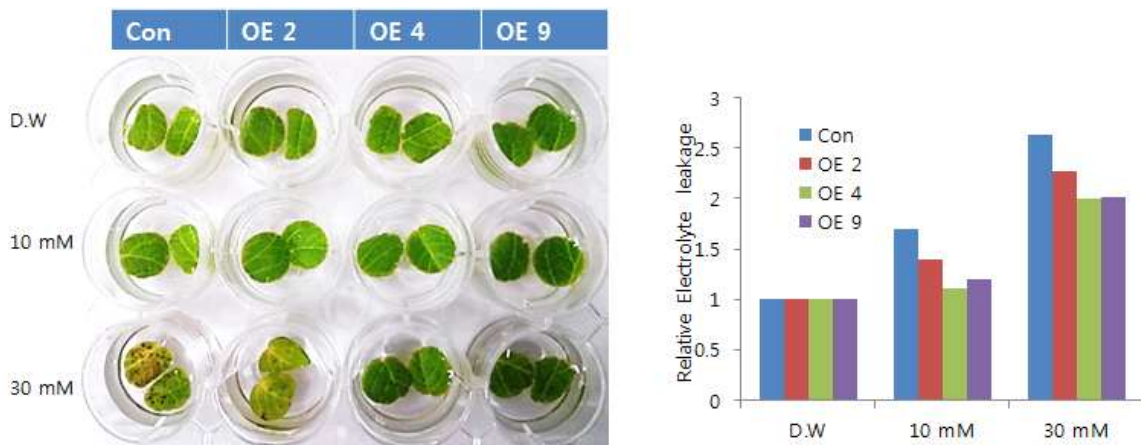


그림 44. AtCYP21-4 과발현 감자 leaf disc의 H₂O₂ 처리 표현형 및 ion leakage 함량 비교분석

(2) CYP21-4 과발현 벼 형질전환체의 환경 스트레스 내성 분석

① 고농도 염 스트레스 내성 표현형 분석

- 유전자발현 분석 시 CYP21-4 유전자가 고농도 염 조건에서 가장 강한 발현 증가를 나타내어 형질전환체를 대상으로 스트레스 내성을 분석한 결과 100 mM, 150 mM 조건 모두에서 대조구에 비해 뿌리 길이 및 생체량이 크게 증가하였다 (그림 45).
- 세 개의 과 발현체는 모두 대조구에 비해 모두 염 스트레스 내성을 갖는 것으로 판단된다.

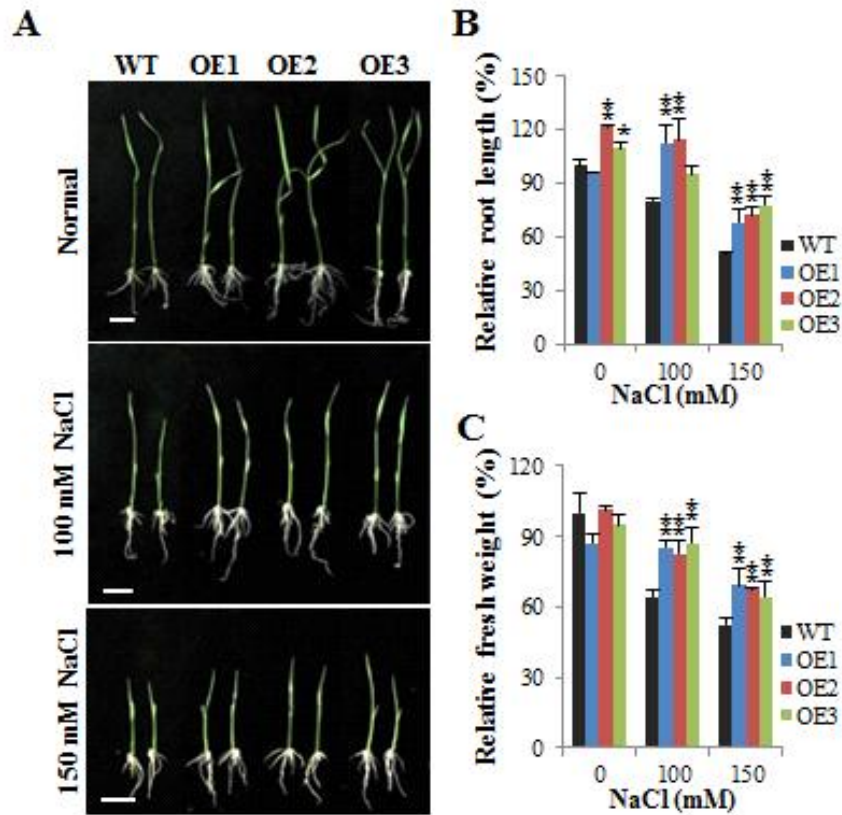


그림 45. OsCYP21-4 과발현 벼 유식물체의 염 농도별 표현형과 뿌리길이 및 생체량 비교분석

② 고농도 염 스트레스 저항성에 대한 생리학적 분석

- CYP21-4 유전자의 과 발현에 의한 고농도 염 스트레스 내성이 스트레스 조건에서 발생하는 활성 산소종을 효율적으로 제거하는 기능에 의한 것인지 생리학적 측면에서 고찰하고자 DAB staining을 통해 H₂O₂ 함량의 양적 표현형을 관찰하였다.
 - 200 mM 염 농도에서도 대조구에 비해 과발현 형질전환체는 스트레스에 강한 내성을 보여주었다 (그림 46 A).
 - 스트레스 처리된 잎의 동일부위를 잘라낸 후 엽록소를 제거하고 DAB (3, 3-diaminobenzidine) 용액에서 정치시킨 후 ROS 활성산소종이 진한 갈색으로 염색됨을 관찰하였다.
 - DAB staining 결과, mock 조건에서는 대조구와 형질전환체 간 큰 차이가 없지만 200 mM 염 조건에서는 대조구의 잎 절편이 형질전환체 절편에 비해 강하게 진한 갈색으로 염색되어 유해한 활성산소종이 많이 생성되었음을 보여 주었다 (그림 46B).
- ※ 이상의 결과로부터 CYP21-4 유전자는 스트레스 시 발생하는 유해 활성산소종을 제거하는 기능이 있는 것으로 판단된다.

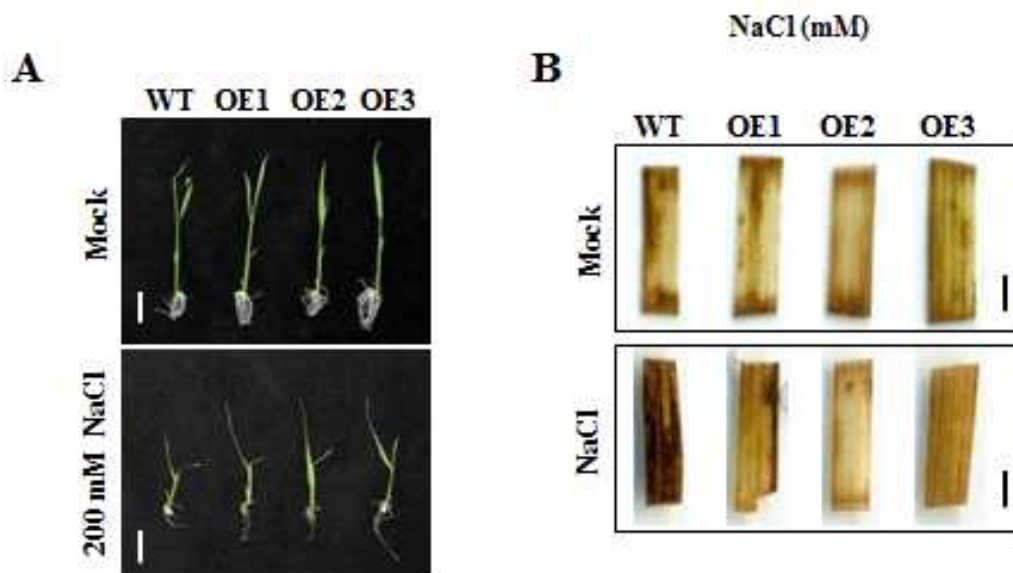


그림 46. 고농도 염 스트레스 조건에서 DAB staining에 의한 ROS 분석

③ H₂O₂ 농도별 스트레스 내성 표현형 분석

- 앞의 실험 결과, CYP21-4유전자는 산화 스트레스 적응 기작에 관여하여 기능을 수행할 것으로 사료됨으로 ROS를 직접적으로 빠르게 유도하는 과산화수소를 식물체에 처리하고 그 반응을 관찰하였다.
- 10 mM과 30 mM 농도의 H₂O₂ 조건 모두에서 형질전환체는 대조구에 비해 강한 내성을 나타내었다 (그림 47).

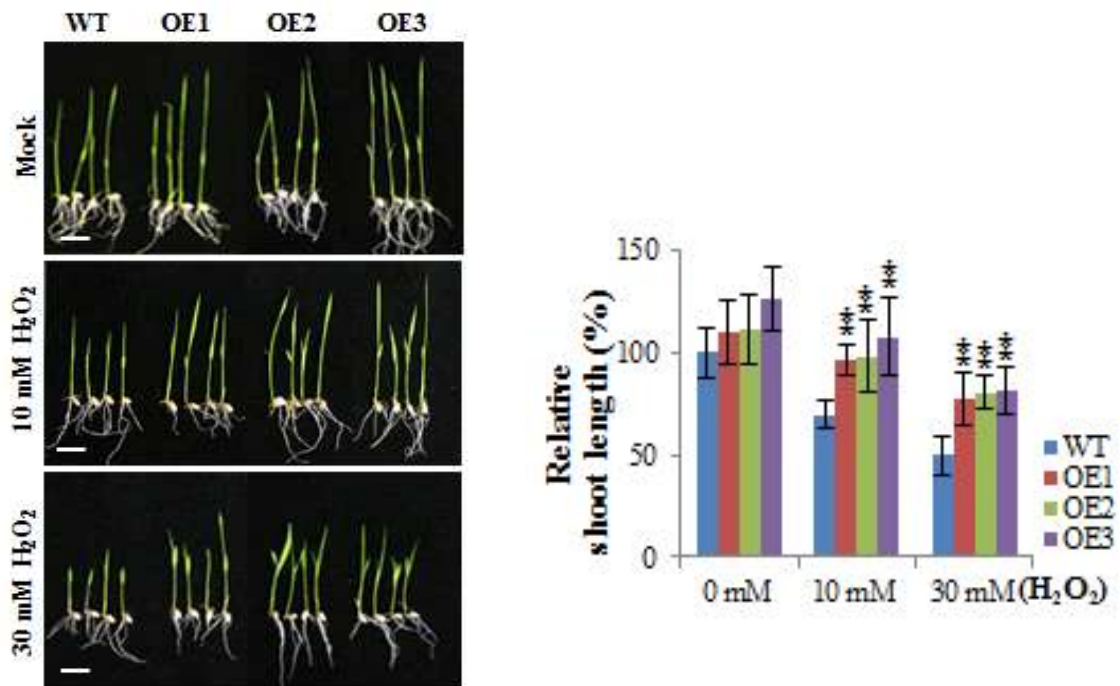


그림 47. OsCYP21-4 과발현 벼 유식물체의 H₂O₂ 농도별 스트레스 내성 표현형

④ 고농도 염 스트레스 조건에서 항산화 효소활성 분석

- 고농도 염 스트레스에 강한 내성을 보이는 CYP21-4 유전자의 역할이 항산화 효소활성 조절에 기인할 가능성이 있는지? 확인을 위해 대표적 항산화 효소의 활성을 스트레스 조건에서 확인하였다.
- 고농도 염스트레스 200 mM 조건에서 APX 와 POD 효소활성을 측정하였다.
- POD 효소활성은 염 농도에 따라 최대 세배까지 증가하였으며 세 개의 모든 형질전환 라인이 대조구에 비해 높은 효소활성을 보여주었다. APX 효소활성도 고농도 염 조건에서 대조구 대비 약 1.5배 증가 하였다 (그림 48A).
- 스트레스가 없는 정상조건에서도 CYP21-4가 과발현된 식물체의 항산화 효소활성이 대조구에 비해 조금 높게 측정되는 경향을 보였으나 염 스트레스 조건에서는 효소 활성 정도 차이가 크게 높아짐을 알 수 있었다.

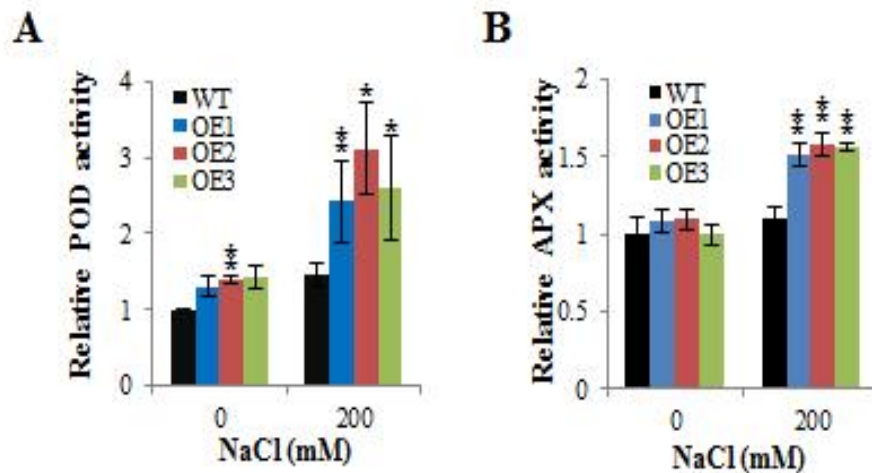


그림 48. 고 농도 염 스트레스 조건에서 항산화 효소 APX와 POD 효소활성

⑤ H₂O₂ 스트레스 조건에서 항산화 효소활성 분석

- H₂O₂ 10 mM 과 30 mM 조건에서 POD 그리고 APX 효소활성을 분석하였다.
- POD 효소활성은 정상조건에서도 대조구에 비해 형질전환체에서 뚜렷한 증가를 나타내 (최대 1.5배까지 증가) 앞의 염 스트레스와 비슷한 경향을 나타내었다 (그림 49 A).
- 10 mM과 30 mM 농도의 H₂O₂ 조건에서 과발현체는 POD효소활성이 최대 두배까지 증가되었다.
- APX 활성은 정상조건에서는 차이가 없었지만 산화스트레스 조건에서는 대조구에 비해 세 개라인 모두에서 효소활성이 증가됨을 확인하였다 (그림 49B).

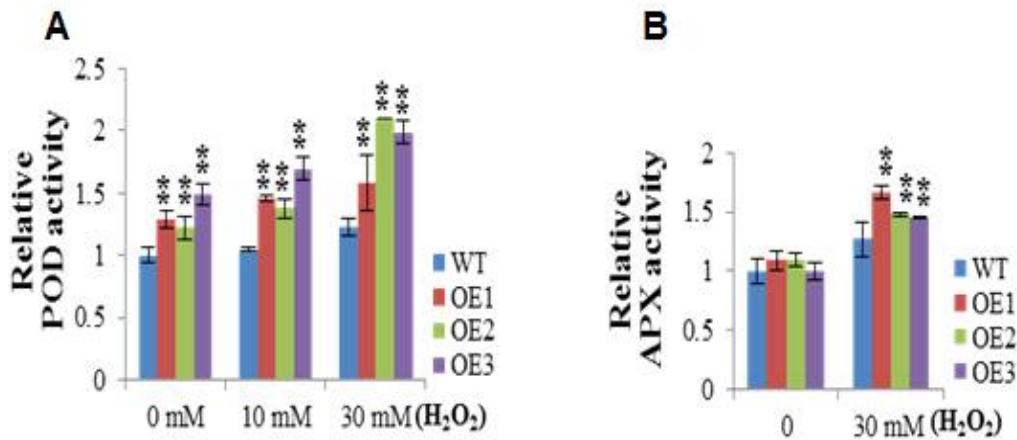


그림 49. H₂O₂ 스트레스 조건에서 항산화 효소 APX와 POD 효소활성

⑥ 항산화 효소 CAT 효소활성

- 대표적 항산화 효소 catalase 활성도 함께 측정하였으나 반복실험 간 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다 (그림 50).
- 정상조건과 고 농도 염 그리고 H₂O₂ 산화 스트레스 모두에서 CAT 효소활성은 CYP21-4 과발현 형질전환체와 대조구 간 차이가 없음을 확인하였다.

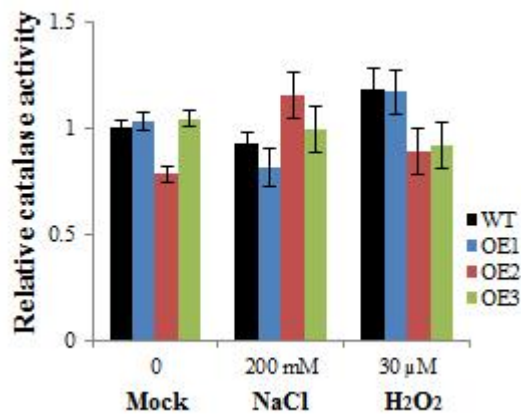


그림 50. 고농도 염과 H₂O₂ 스트레스 조건에서 항산화 효소 CAT 효소활성

※ 이상의 결과로부터 항산화 효소 POD와 APX 활성조절에 CYP21-4 유전자가 기능하고 있음을 확인할 수 있었으며, 환경스트레스 조건 즉 활성산소종이 증가하는 외부 환경변화에 적응하기 위해서는 CYP21-4의 항산화 효소활성 조절 역할이 필요함을 알 수 있었다. Catalase 효소는 퍼옥시좀에서 기능하는 효소로 CYP21-4 기능과는 다른 기작에 의해 조절될 것으로 예측된다.

⑦ ABA 호르몬 반응 표현형분석

- 환경 스트레스 시 조절되는 대표적 호르몬 ABA는 대부분의 스트레스 반응과 신호전달 체계로 연결되어 있어 CYP21-4의 환경스트레스 관여 기작도 이 호르몬에 영향을 받을 것으로 판단되고 있다.
- 각 형질전환체를 ABA 호르몬 조건에서 배양하여 그 반응을 관찰하였다.
- 대조구 대비 CYP21-4 과발현체는 ABA 호르몬에 대해 저항성을 보여 주었고 이러한 표현형은 앞의 고농도 염, 그리고 산화스트레스 내성이 ABA 호르몬 신호전달 기작에 연결될 가능성을 보여준다 (그림 51).

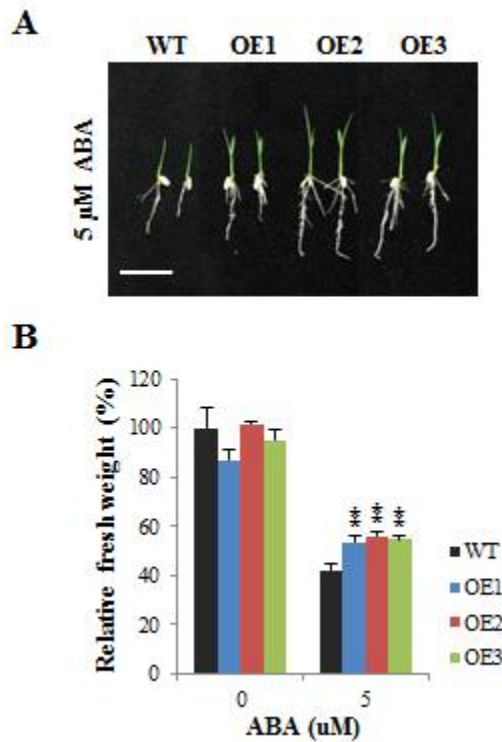


그림 51. CYP21-4 과발현체의 ABA호르몬 저항성 표현형

12. CYP21-4 상호작용단백질 탐색

가. in vivo IP 수행을 위한 단백질 발현 및 IP

세포내 CYP21-4 단백질을 과발현 시키기 위한 construct로서 AtCYP21-4 와 OsCYP21-4 단백질의 c-terminal 말단에 GFP 단백질을 fusion 시키고 GFP 단백질을 대조구로 사용하였다.

- 식물체 발현을 위해 pCAMBIA1302(GFP) vector cloning 한 플라스미드를 agrobacterium 에 형질 전환 시켜 4주 된 담배 잎에 transient expression 유도하였다.

- 48시간 후 단백질이 발현 된 잎 조직에서 soluble protein을 추출 하였다. 총 soluble protein 4 mg 을 GFP trap bead 에 binding 시킨 후 bead binding 되지 않은 상층액 (Sup. after bead binding) 은 따로 보관 하였다.
- 담배에서 추출한 soluble protein / GFP bead binding (IP) / sup. after bead binding 각각의 샘플 을 SDS-PAGE gel 에 running하여 Comassie brilliant blue (CBB) staining 을 진행 하였다.
- 결과, GFP bead 에 binding 후 bead 의 색이 GFP 단백질의 양에 의한 색이 변함을 확인 하였다 (그림 52. 아래쪽 사진). 그리고 CBB staining 이후 결과에서도 IP샘플에서 대조구로 사용한 GFP단백질은 밴드가 진하게 관찰된 반면 AtCYP21-4 와 OsCYP21-4_GFP 의 경우 밴드가 눈으 로 확인되지 않았다 (그림 52, 위쪽 사진).

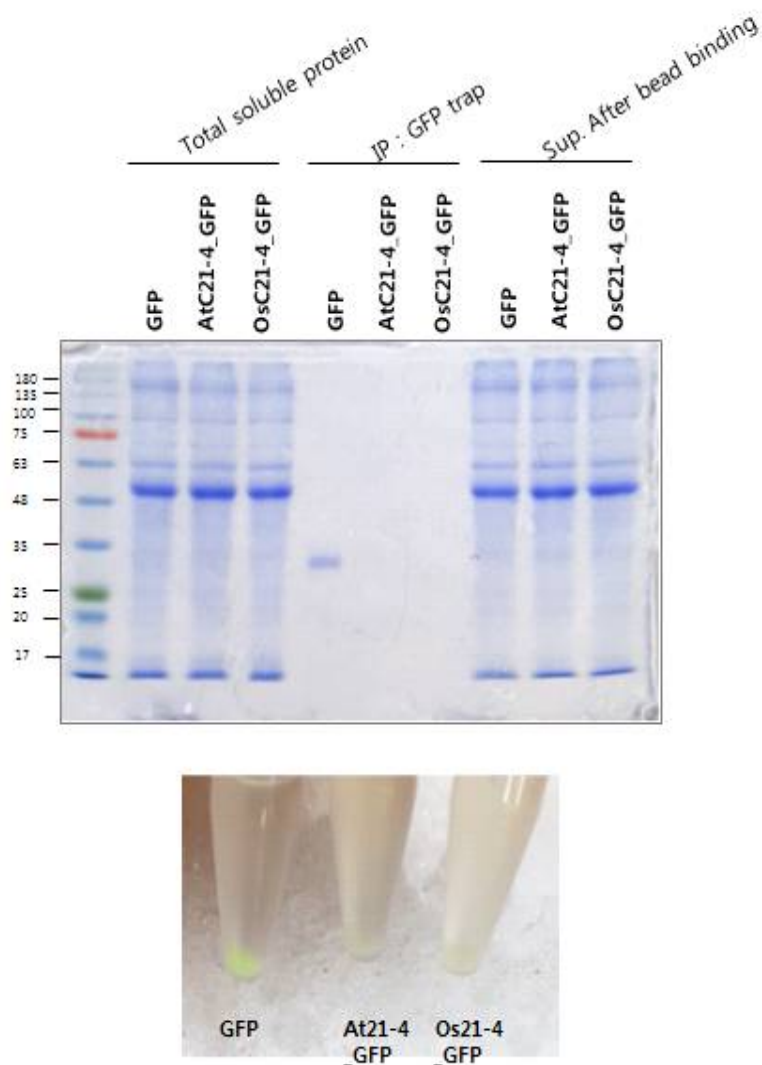


그림 52. CYP21-4s_GFP 단백질의 IP 후 CBB staining 결과

나. IP 수행 후 western blot

- CYP21-4_GFP 단백질의 IP 수행 후 CBB stainig 으로 band 가 보이지 않아 CYP21-4_GFP construct가 발현됨을 확인 하기 위하여 GFP antibody 를 이용하여 western blot을 수행하였다.
- IP 샘플에서는 GFP 27kDa에서 밴드가 확인되었고, CYP21-4s_GFP 단백질은 약 50kDa에서 밴드가 확인 되었다. 따라서 GFP trap bead 에 의해 GFP fusion 단백질의 IP가 되었음을 확인하였다 (그림 53).
- 그러나 total soluble protein 의 경우에 대조구인 GFP 에서만 밴드가 보인 것으로 보아 CYP21-4의 단백질의 발현이 많이 낮음을 추측할 수 있었다.
- CYP21-4_GFP IP 샘플에서 약 130 kDa 정도의 크기에 밴드가 나온 것으로 보아 CYP21-4 단백질이 다른 단백질과 interaction 할 가능성을 확인 하였다 (그림 53).

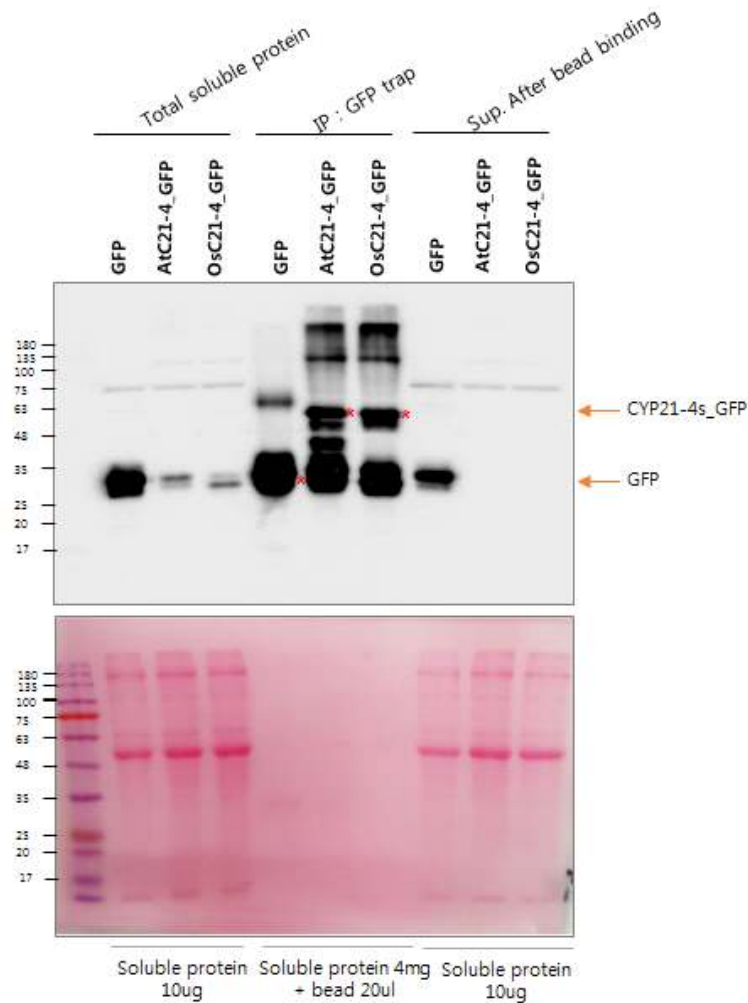


그림 53. CYP21-4s_GFP 단백질의 IP 후 western blot 결과

13. AtCYP21-4과발현체 괴경에서의 당사슬의 정성 및 정량 분석

가. 1차 분석

- (1) 시료에 포함되어 있을 수 있는 염이나 기타 소분자 등을 제거하기 위해 0.05% trifluoroacetic acid를 넣은 3차수에서 24 시간 투석하였다. 특히, Total protein의 경우, 투석 후 침전이 발생하여 15,000 g x 2 min spin down하고 상등액을 분석에 사용하였다.
- (2) Con-A extracted protein 시료에서 검출된 단당류의 대부분이 glucosamine과 mannose였다 (Table 2). 이는 mannose에 주로 결합하는 Con-A의 특성으로 인해, oligomannose type glycan을 가지는 당단백질이 농축되고, glycan processing이 진행되어 mannose가 제거되고 galactose, xylose 등으로 대체되면서 Con-A와의 결합력이 상대적으로 약해진 당단백질들이 걸러졌기 때문인 것으로 추정된다.
- (3) 이와 달리 total protein 시료는 fucose, xylose 등을 포함한 다양한 단당 조성을 가진 것으로 나타났다. Table 2에서 보이듯이 Con-A extracted protein 시료는 mannose를 주로 포함하는 당단백질에 편향된 결과를 나타내기 때문에, 이후 실험은 total protein 시료로 진행하는 것이 바람직하다. Wild type과 OE transformants와의 정량적 차이는 이 결과로 확인하기 어렵고, 반복된 분석을 실시하여 관찰해야 할 것이다. Sialic acid는 검출되지 않았다. 다만, 단당류 간 비율로 유추해 볼 때, 전형적인 식물성 N-glycans를 가지고 있는 것으로 보인다 (Figure 54, 55).
- (4) 모든 시료, 특히 total protein 시료에서 glucose가 매우 높게 나타났는데 (data not shown), 이는 감자 괴경을 갈아서 조제한 시료이기 때문에 전분이나 섬유소 등이 포함되면서 나타난 것으로 추정 된다.
- (5) 분석 결과 대조구와 형질전환체 간 당류의 정성. 정량적 차이를 찾기 어려웠다 (그림 56-59).

Table 5. Monosaccharide composition of the 1st samples.

samples/sugars	(unit; pmol/ μ g protein)							
	cWT	cOE1	cOE2	cOE3	tWT	tOE1	tOE2	tOE3
fuco	34	50	63	47	5	10	6	5
galactose	-	-	-	-	117	66	77	109
xylose	-	-	-	-	22	23	18	29
mannose	6,850	9,370	9,920	7,880	51	64	42	56
galactosamine	-	-	0	2	0.8	0.1	0.4	0.3
glucosamine	22,080	22,370	21,820	23,100	96	43	44	27
N-acetylneuraminic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
N-glycolylneuraminic acid	-	-	-	-	-	-	-	-

-, non-detected

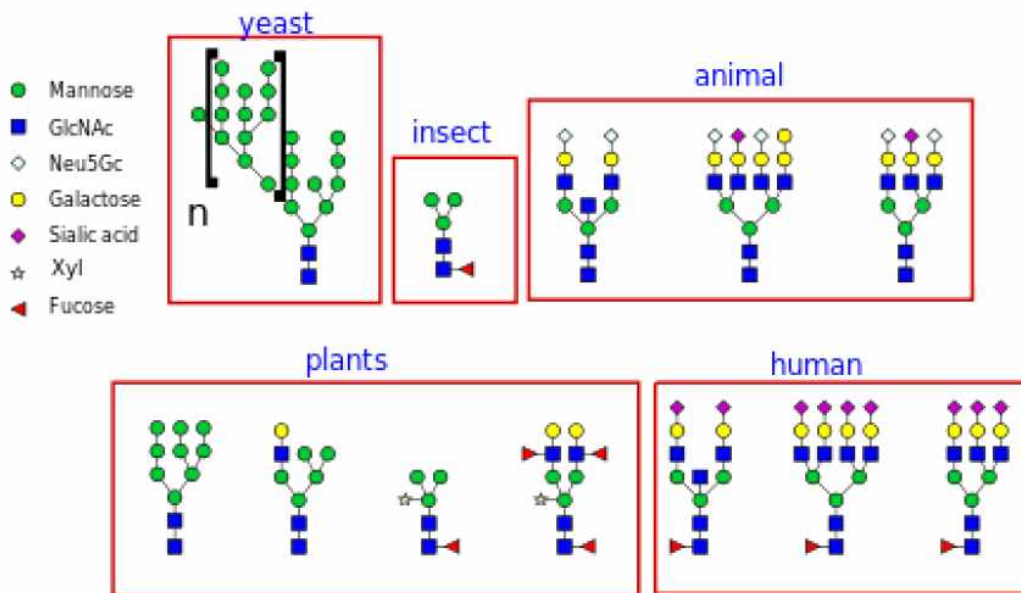


그림 54. 서로 다른 생물체간 N-glycan 구조

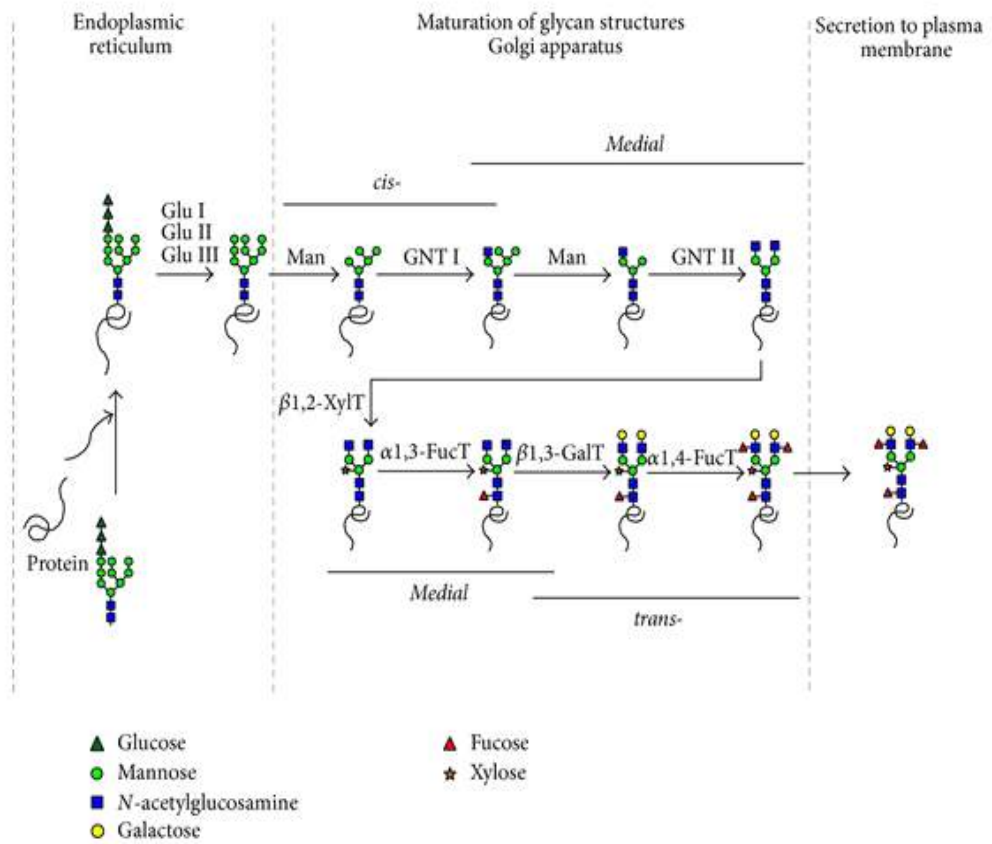
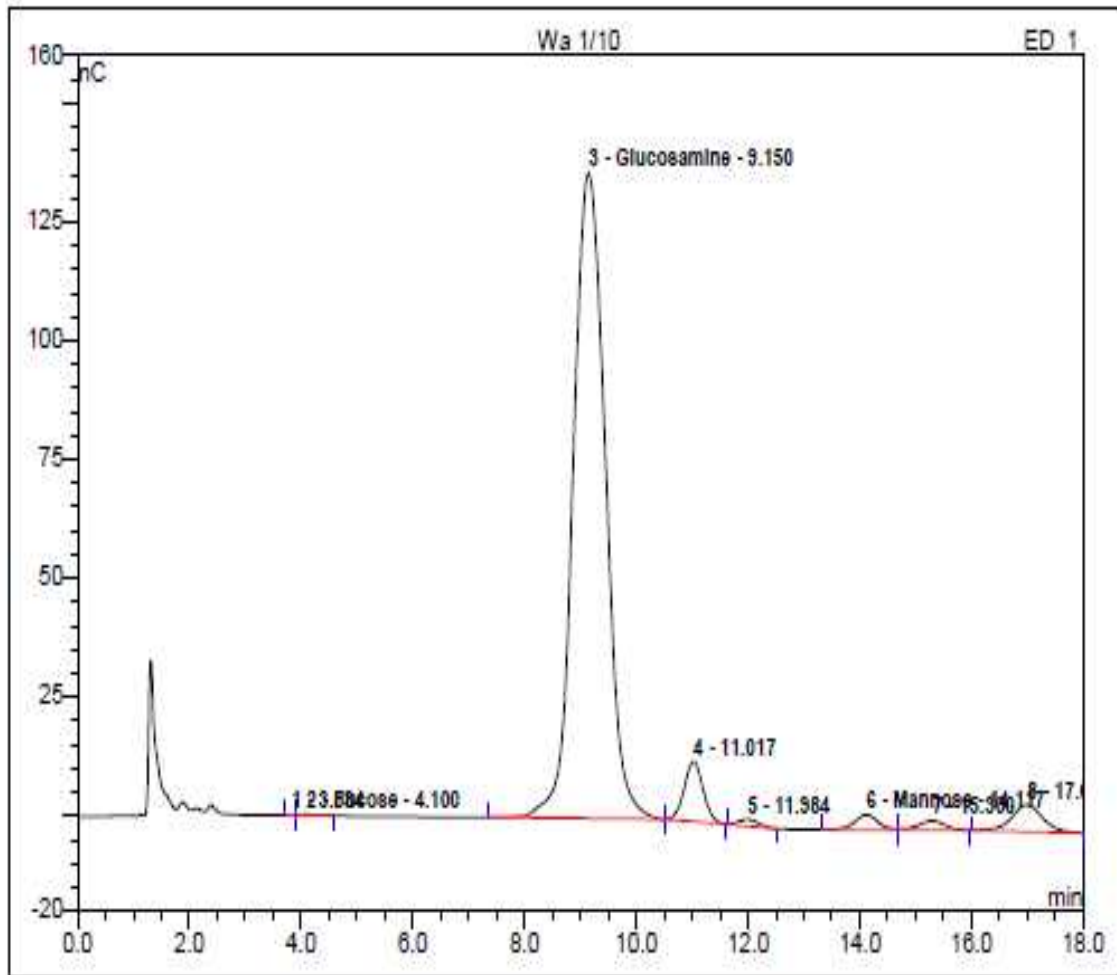


그림 55. 식물 특이적 N-glycosylation pathway

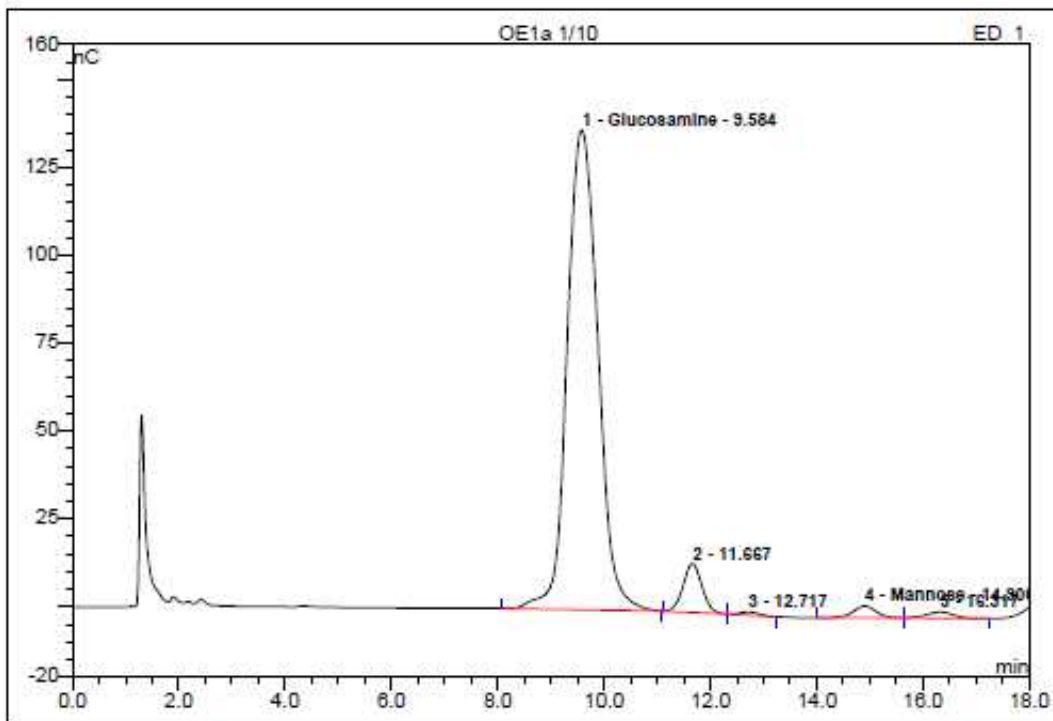


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	3.83	n.a.	0.060	0.007	n.a.	n.a.	n.a.
2	4.10	Fucose	0.316	0.088	n.a.	5.494	7.14
3	9.15	Glucosamine	135.776	90.057	1.07	2208.711	2.23
4	11.02	n.a.	12.646	4.966	1.05	n.a.	1.51
5	11.98	n.a.	1.345	0.543	1.17	n.a.	3.06
6	14.12	Mannose	3.218	1.551	n.a.	102.968	1.51
7	15.30	n.a.	1.977	1.050	n.a.	n.a.	1.89
8	17.00	n.a.	5.600	3.542	1.02	n.a.	n.a.
Total:			160.937	101.805	4.30	2317.173	

그림 56. 대조구의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

16 OE1a 1/10

Sample Name:	OE1a 1/10	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	6	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	FGXM1	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	18.00	Sample Amount:	1.0000

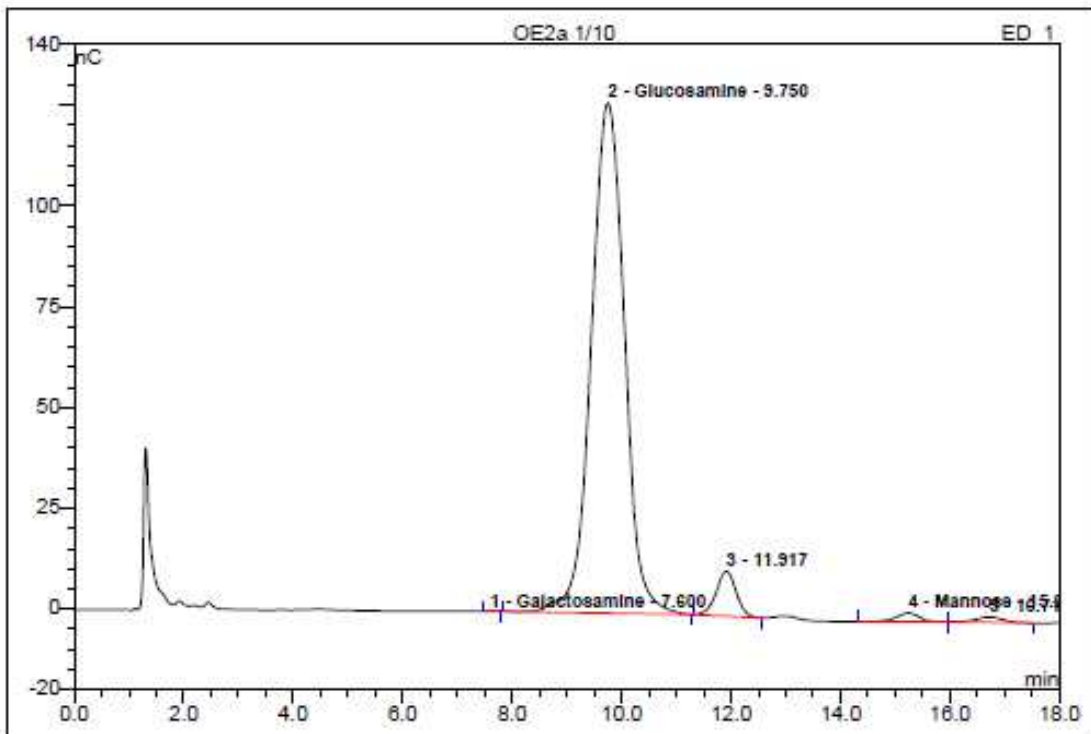


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	9.58	Glucosamine	136.588	91.228	1.11	2237.426	2.44
2	11.67	n.a.	13.888	5.718	1.02	n.a.	1.59
3	12.72	n.a.	0.942	0.389	1.12	n.a.	3.04
4	14.90	Mannose	3.404	1.711	1.06	113.553	1.72
5	16.32	n.a.	1.803	1.048	n.a.	n.a.	n.a.
Total:			156.625	100.094	4.32	2350.979	

그림 57. AtcYP21-4 OE1의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

48 OE2a 1/10

Sample Name:	OE2a 1/10	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	7	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	FGXM1	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	18.00	Sample Amount:	1.0000

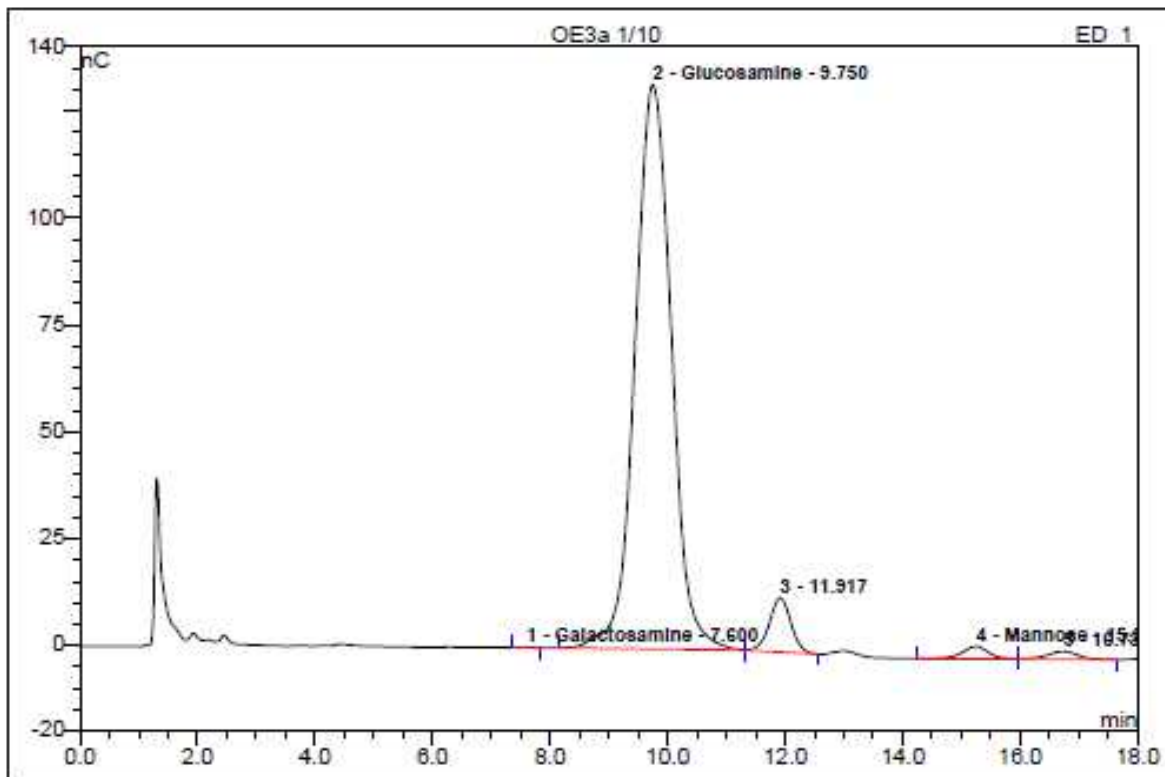


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	7.60	Galactosamine	0.011	0.002	1.19	0.046	3.02
2	9.75	Glucosamine	126.582	88.984	1.01	2182.391	2.46
3	11.92	n.a.	11.151	4.698	0.97	n.a.	4.72
4	15.23	Mannose	2.186	1.073	0.91	71.212	1.82
5	16.72	n.a.	1.325	0.737	0.97	n.a.	n.a.
Total:			141.255	95.494	5.04	2253.649	

그림 58. AtcYP21-4 OE2의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

49 OE3a 1/10

Sample Name:	OE3a 1/10	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	8	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	FGXM1	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	18.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	7.60	Galactosamine	0.046	0.010	0.97	0.237	2.89
2	9.75	Glucosamine	131.951	94.213	1.03	2310.630	2.43
3	11.92	n.a.	12.651	5.355	0.99	n.a.	4.65
4	15.25	Mannose	2.921	1.530	1.02	101.538	1.76
5	16.73	n.a.	1.875	1.122	n.a.	n.a.	n.a.
Total:			149.444	102.229	4.02	2412.405	

그림 59. AtcYP21-4 OE3의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

나. 2차 분석

- (1) Total 단백질을 대상으로 단당 조성을 3 반복하여 분석하였다. 동일한 단백질 양으로 나누어 살펴본 각 시료의 단당 조성은 WT과 OE transformants간에 의미 있는 차이를 발견하기 어려웠다 (Table 3). 표준편차를 고려하면, 단위 μg 당 단당 함량과 조성은 WT과 OE transformants가 거의 동일하다고 봐야 할 것이다. 따라서 당 함량도 거의 비슷하게 나타났다.
- (2) 2차 분석 결과도 Wild type과 OE transformant 3 종의 단당 조성 및 함량에 의미 있는 차이를 발견하기 어려웠다 (그림 60-63).

Table 6. Monosaccharide composition of the 2nd samples (n=3).

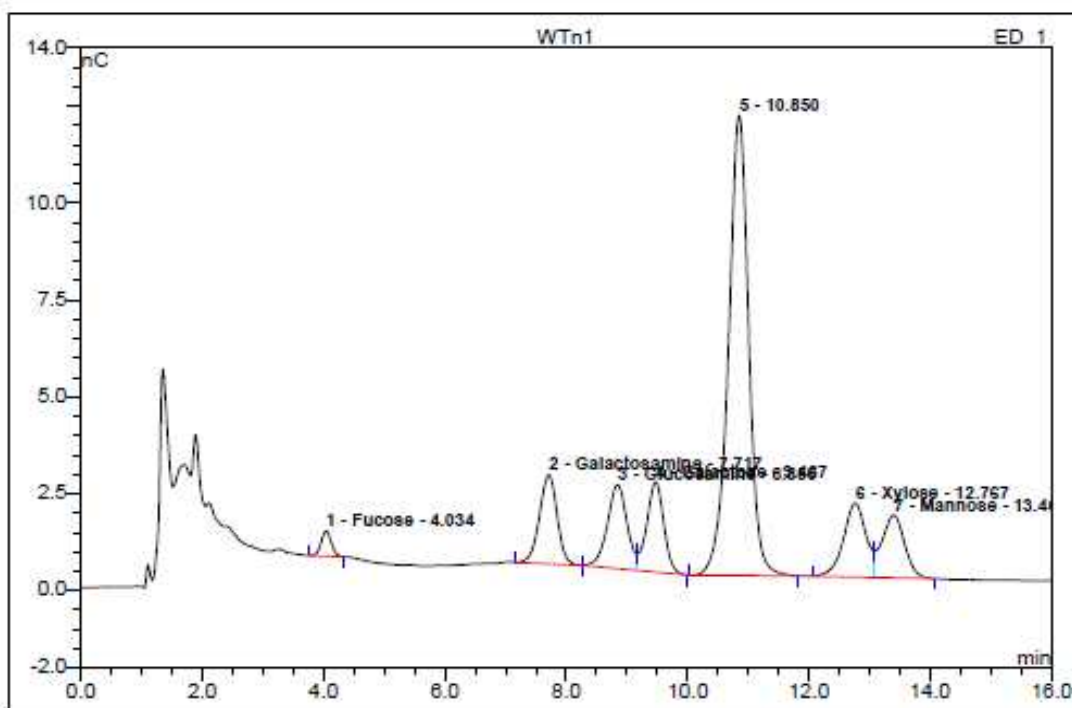
(unit: pmol/ μg protein)

samples/sugars	tWT	tOE1	tOE2	tOE3
fucose	8.4 \pm 0.2	8.5 \pm 0.3	8.5 \pm 0.7	8.5 \pm 0.8
galactose	38.8 \pm 4.4	42.1 \pm 1.5	34.7 \pm 2.0	35.8 \pm 2.1
xylose	34.1 \pm 4.0	27.0 \pm 1.9	28.2 \pm 3.1	25.5 \pm 2.1
mannose	54.3 \pm 1.8	52.1 \pm 2.2	48.4 \pm 3.7	47.6 \pm 3.7
galactosamine	0.3 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	0.4 \pm 0.2
glucosamine	28.3 \pm 5.0	30.2 \pm 1.7	26.2 \pm 0.3	29.6 \pm 2.0
Sugar to Protein (%)	2.7 \pm 0.3	2.6 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2

※ 이상의 결과, CYP21-4 골지체표적 과발현식물체의 생산성 증대 표현형과 당류의 정성적 또는 정량적 직접적 연관성을 규명하기는 어려울 것으로 판단된다.

3 WTn1

Sample Name:	WTn1	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	6	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	5X	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	16.00	Sample Amount:	1.0000

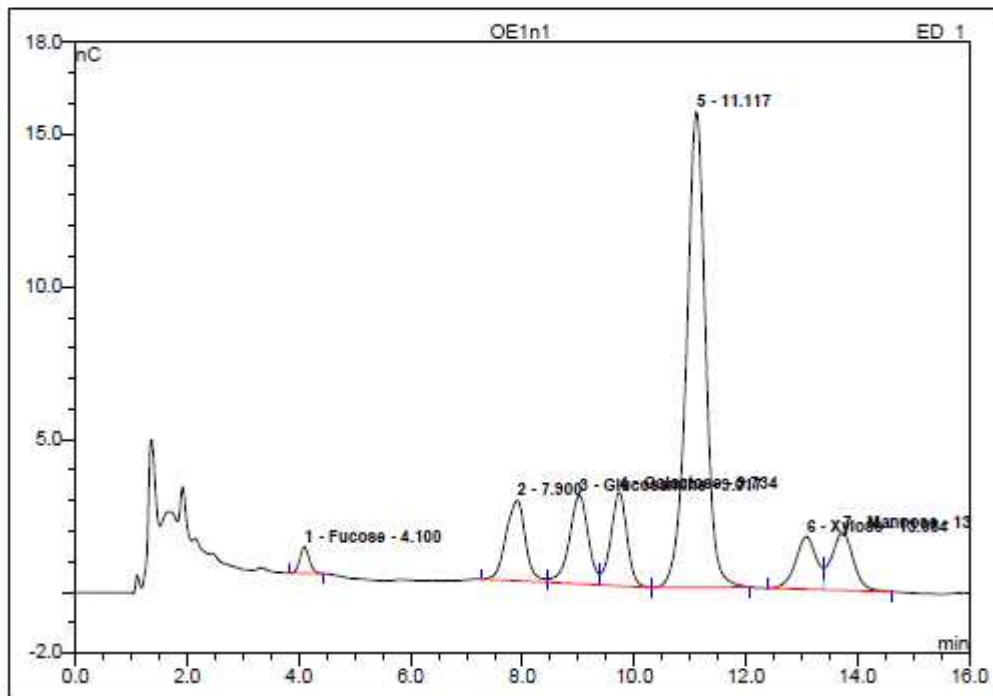


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	4.03	Fucose	0.648	0.126	1.10	5.714	8.85
2	7.72	Galactosamine	2.296	0.776	0.94	11.951	2.04
3	8.85	Glucosamine	2.167	0.811	n.a.	14.386	1.13
4	9.47	Galactose	2.325	0.759	n.a.	28.306	2.55
5	10.85	n.a.	11.884	4.573	0.94	n.a.	3.05
6	12.77	Xylose	1.914	0.825	n.a.	26.108	0.90
7	13.40	Mannose	1.616	0.700	n.a.	38.416	n.a.
Total:			22.849	8.568	2.98	124.881	

그림 60. WT 피경의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

12 OE1n1

Sample Name:	OE1n1	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	12	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	5X	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	16.00	Sample Amount:	1.0000

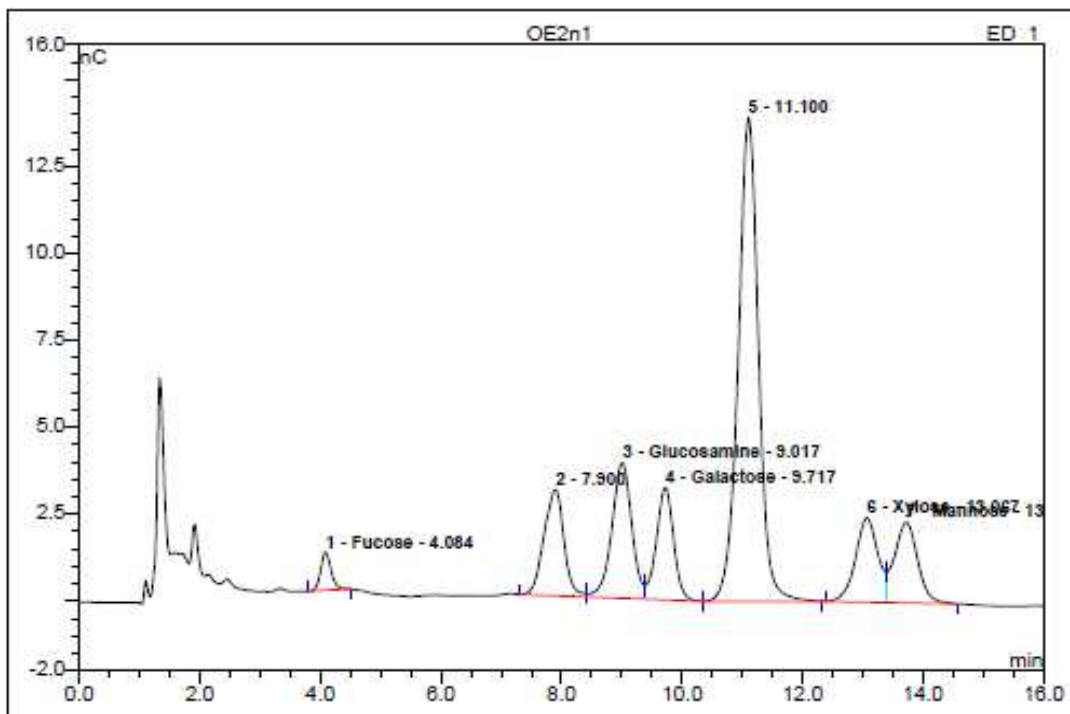


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	4.10	Fucose	0.870	0.172	1.08	7.788	8.11
2	7.90	n.a.	2.637	1.058	1.00	n.a.	1.82
3	9.02	Glucosamine	2.899	1.137	n.a.	20.172	1.29
4	9.73	Galactose	3.070	1.028	n.a.	38.344	2.50
5	11.12	n.a.	15.577	6.119	0.95	n.a.	3.01
6	13.08	Xylose	1.729	0.759	n.a.	24.028	0.90
7	13.73	Mannose	1.897	0.857	n.a.	47.056	n.a.
Total:			28.678	11.130	3.03	137.389	

그림 61. AtcYP21-4 OE1 피경의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

18 OE2n1

Sample Name:	OE2n1	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	18	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	5X	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	16.00	Sample Amount:	1.0000

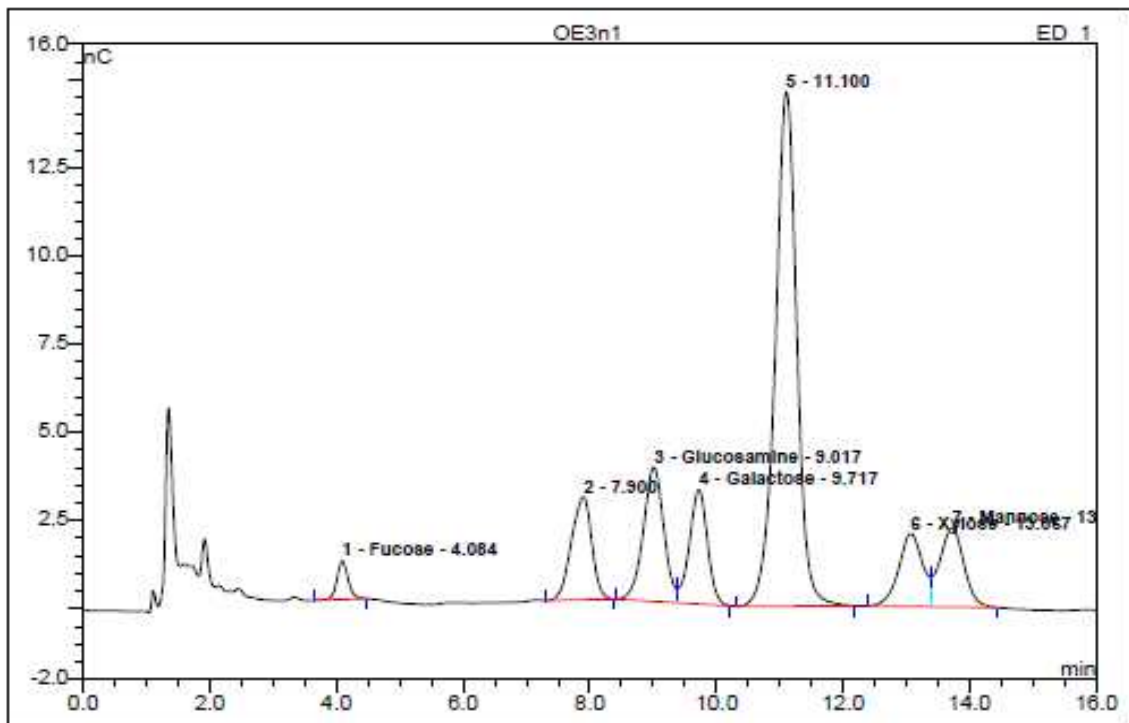


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	4.08	Fucose	1.094	0.222	1.19	10.079	8.33
2	7.90	n.a.	3.062	1.169	0.97	n.a.	1.87
3	9.02	Glucosamine	3.891	1.494	n.a.	26.490	1.27
4	9.72	Galactose	3.229	1.071	n.a.	39.957	2.52
5	11.10	n.a.	13.906	5.408	1.00	n.a.	3.08
6	13.07	Xylose	2.422	1.048	n.a.	33.179	0.92
7	13.72	Mannose	2.315	1.031	n.a.	56.591	n.a.
Total:			29.917	11.442	3.15	166.295	

그림 62. AtcYP21-4 OE2 괴경의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

24 OE3n1

Sample Name:	OE3n1	Injection Volume:	10.0
Vial Number:	24	Channel:	ED_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	5X	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	FGXM	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	16.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	symmetry(EF)	Amount pmol	esolution(EF)
1	4.08	Fucose	1.092	0.224	1.14	10.170	8.32
2	7.90	n.a.	2.915	1.088	0.89	n.a.	1.88
3	9.02	Glucosamine	3.807	1.429	n.a.	25.344	1.28
4	9.72	Galactose	3.234	1.070	n.a.	39.929	2.50
5	11.10	n.a.	14.585	5.740	0.97	n.a.	3.01
6	13.07	Xylose	2.067	0.905	n.a.	28.668	0.90
7	13.72	Mannose	2.244	1.004	n.a.	55.138	n.a.
Total:			29.942	11.460	3.00	159.249	

그림 63. AtcYP21-4 OE3 피경의 HILIC 및 MALDI-TOF 결과

제 4 절 연구추진전략 및 방법

1. 추진방법

본 연구과제는 골지체 표적 신규 유전자의 기능분석 결과를 기반으로 작물의 수량 생산성 및 외부 환경 스트레스에 대한 내성 증대에 기여 할 수 있는지를 과 발현 형질전환체를 통해 검증함으로써 유용 유전자로서의 활용 가능성을 확인하고자 한다. 크게 두 가지 접근법으로 유용 유전자로서의 활용 가능성을 타진하고자 한다.

가. 첫 번째는 형질전환체에서의 표현형 및 농업형질 분석으로 수량 생산성 증대 형질에 대한 각 성장 발달 단계별 특징과 분자유종 활용 소재로서의 가능성을 확인하고자 한다.

나. 두 번째는 신규 유전자가 수량 생산성 증대에 어떤 기작에 의해 역할을 수행하는지를 분자생물학적 접근법으로 규명함으로써 유용 유전자원에 대한 지식재산권을 확고히 보호하고자 한다.

2. 추진전략

가. 국내 벼/감자작물 연구자와의 농업형질 분석 시 고려해야 할 특성 및 주의사항 논의

- (1) 벼 작물 농업형질 분석 표준치 확립
- (2) 감자 작물 농업형질 분석 표준치 확립
- (3) 수량 생산성 분석 시 외부 환경 변화에 의한 농업형질 분석 예외사항 점검

나. 작물 환경 스트레스 전문 연구팀과의 스트레스 내성 분석에 대한 협조 요청

- (1) 작물에 따른 환경 스트레스 조건 확립
- (2) 영양번식 작물의 환경 스트레스 조건 자문 요청
- (3) 스트레스 내성에 대한 생리학적 특성 분석 기준 확립

다. 글라코실레이션(glycosylation) 관련 연구 전문가와의 당단백질 기작에서의 기능 규명

- (1) Glycosylation 관여 가능성 의논

(2) 형질전환체에서의 glycosylation 변화 분석 방법 논의

(3) 형질전환체에서의 glycosylation 변화에 의한 조직 구조 특성 분석에 대한 논의

라. 기술 가치 평가자와의 분자 육종 소재로서의 활용 가능성 타진

(1) 주요 작물의 생산성 향상에 기여 할 수 있는지에 대한 가치제고

(2) 신규성 유용 유전자로서의 지적 재산권 및 특허권 확보에 대한 자문 요청

3. 연구 추진체계

가. 이뮤노필린 유전자 관련 국내 연구현황

(1) 본 연구의 대상 유전자그룹 이뮤노필린은 단백질 번역 후 조절 기능 유전자로 proline 아미노산 잔기를 cis- trans- 이성화시킴으로써 단백질의 구조를 변화 시키는 미세조절 유전자 군임.

(2) 생체 내 필수 단백질 군임에도 불구하고 현재까지 많은 유전자의 기능은 대부분 밝혀져있지 않음

(3) 현재까지 보고된 국내 식물 이뮤노필린에 관한 연구는 경상대 이상열 박사님의 배추 유래 cyclophilin (C-CYP) 이 antifungal 활성을 보고한 예가 유일함

(4) 본 연구진은 벼 모델식물에서 단자엽 최초로 이뮤노필린 분류체계를 완성하였음 (2010, BMC Plant Biology)

(5) 본 연구진은 스트레스에 관여하는 주요 이뮤노필린 유전자를 발굴하고 있음 (2015, Plant Cell & Environ. 외 다수)

나. 이뮤노필린 유전자 관련 국외 연구현황

(1) 모델식물의 전체 염기서열 해독 후 식물 이뮤노필린 유전자 분류 체계를 완성하고 있음

(2) 최근 유전자의 중요성을 인지하고 non-model 식물체에서도 NGS를 통해 이뮤노필린의 분류체계를 확립하고 있음

(3) 세포내 다양한 대사과정에 핵심 역할을 하는 주요 이뮤노필린 유전자에 대한 기능 분석이 경쟁적으로 이루어지고 있음.

따라서, 식물 이뮤노필린 유전자에 대한 세포내 주요 역할 기능분석을 수행한다면 이 분야의 선도적 연구가 가능할 것으로 판단 됨

4. 연구추진 일정

가. 1차년도 연구추진일정

세부과제명	세부연구내용	1차년도 추진일정 (세부)												소요 연구비
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
주요작물의 생산성에 관여하는 글리코표적 단백질의 기능분석 및 활용	벼/감자 형질전환 체의 CYP21-4 과 발현에 의한 영양 생장 시기별 농업 형질 분석													30,000 (천원)
	벼/감자 형질전환 체의 CYP21-4 과발 현에 생산성 증대 농업형질 분석													30,000 (천원)
	벼/감자 형질전환 체의 CYP21-4 단백 질 수준 검증													10,000 (천원)
	CYP21-4 과발현 식물체의 조직학적 특이성 분석													10,000 (천원)
	벼/감자 형질전환 체의 glycoprotein 분리 및 함량 분석													10,000 (천원)
	벼/감자 형질전환 체의 글리코체 특이 적 glycosylation 패턴 분석													10,000 (천원)

나. 2차년도 연구추진일정

세부과제명	세부연구내용	2차년도 추진일정 (세부)												소요 연구비
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
주요작물의 생 산성에 관여하 는 골지체표적 단백질의 기능 분석 및 활용	벼/감자 형질 전 환 체의 CYP21-4 과 발현에 의한 포 장조건 농업형 질 분석													20,000 (천원)
	CYP21-4유전자 의 골지체 소기 관에서의 기능분 석													30,000 (천원)
	글리코실레이션 패턴 분석													10,000 (천원)
	환경스트레스 내성 및 관련 기작 규명													30,000 (천원)
	상호작용단백질 탐색													10,000 (천원)

제 5 절 연구성과

1. 논문게재 성과

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	게재 연도	논문명	저자명	학술지명	호	국내/외	SCI 여부
1	2016	The OsCYP19-4 Gene Is Expressed as Multiple Alternatively Spliced Transcripts Encoding Isoforms with Distinct Cellular Localizations and PPlase Activities under Cold Stress	A Lee, SS Lee, WY Jung, HJ Park, BR Lim, HS Kim, JC Ahn, HS Cho	International Journal of Molecular Science	17(7)	국외	SCIE
2	2017	Identification of flowering-related genes responsible for differences in bolting time between two radish inbred lines	WY Jung, HJ Park, A Lee, SS Lee, YS Kim, HS Cho	Frontiers in Plant Science	7:1844	국외	SCIE
3	2017	Comparative transcriptome profiling and SSR marker identification in three Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) cultivars exhibiting phenotypic variation	WY Jung, SS Lee, HJ Park, CW Kim, S-Y Kwon, J-H Jeon, H-S Kim, HS Cho	Plant Biotechnology Report	10	국내	SCIE
4	2017	Overexpression of Golgi protein CYP21-4s improves crop productivity in potato and rice by increasing the abundance of mannosidic glycoproteins	HJ Park, A Lee, SS Lee, D-J Lim, Ki-Beom Moon, JC Ahn, H-S Kim, HS Cho	Frontiers in Plant Science	1250	국외	SCIE
5	2018	Genome-wide analysis of alternative splicing in an inbred line cabbage (Brassica oleracea L.) line 'HO' in response to heat stress	AALee, WY Jung, HJ Park, A Lee, S-Y Kwon, H-S Kim, HS Cho	Current Genomics	19	국외	SCIE

2. 특허 출원/등록

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	식물의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsCYP21-4 유전자 및 이의 용도	한국	한국생명공학연구원	2016.03.15	10-2016-0031044				100

3. 학술대회발표

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016 한국응용생명공학회 정기 학술대회	조혜선	2016. 6. 16-18	제주, ICC	대한민국
2	2017 American Society of Plant Biology	조혜선	2017. 7. 5-9	미국, Hawaii	미국

4. 연구결과

가. 기술적성과

- (1) 주요 작물의 생산성 증대 유용 유전자로 활용
- (2) 바이오매스 증대 및 환경 스트레스 내성 육종 소재로 활용
- (3) 신규 유용 유전자의 지적 재산권 확보
- (4) 골지체 표적유전자의 기능 분석 기술
- (5) 당 단백질 특성 분석 기술
- (6) 신규성 유용 유전자 가치 평가 기술

나. 경제적성과

- 주요 작물의 생산성 증대 유전자원 개발
- 생산성 증대 작물 개발에 의한 종자산업 발전에 기여

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

제 1 절 목표달성도

1. 최종성과 목표 및 평가방법

가. 최종목표

본 연구의 최종목표는 주요 작물의 생산성을 증대 시킬 수 있는 **우수 신규 유전자원**을 이용하여 **형질전환체**를 생산하고 **수량 생산량** 및 **환경스트레스 내성**에 대한 표현형을 검증함으로써 분자 육종을 위한 우수 소재를 개발하고자 한다. 또한 **발굴 유전자**가 어떻게 생산성 및 환경 스트레스에 내성을 증가 시키는지에 대한 역할을 규명함으로써 특허권 및 지식재산권에 대한 주도권을 확보하고 이를 활용하여 **분자육종**을 위한 **유용 소재**를 **제공**하고자 한다

나. 연구목표

골지체 표적 CYP21-4 유전자가 과 발현된 형질전환식물체의 수량 생산성 및 환경스트레스 내성이 증대 되었는지를 확인하여 유용 유전자로서 활용 가능성을 검증한다. 또한 생산성 증대 기작에 CYP21-4 유전자가 어떤 역할을 수행하는지 유전자의 기능분석을 수행함으로써 특허권 및 지식재산권을 확보하여 작물의 농업형질을 개선하는데 원천기술을 제공하고자 한다. 세부 연구 목표는 다음과 같다.

- (1) CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 농업형질 확인
- (2) CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 수량 생산성 증대 확인
- (3) CYP21-4 유전자가 과 발현된 작물의 환경 스트레스 내성 확인
- (4) 생산성 증가 및 스트레스 내성 기작에서의 CYP21-4 유전자의 역할 규명
- (5) Inter-Class 간 CYP21-4 유전자의 활용성 검

다. 평가방법

연차별 정성/정량 성과 목표 달성에 근거한 평가

2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015 - 2016	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 과발현에 의한 생산성 증대 농업형질 분석 ○ 벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 분자수준 검증 ○ CYP21-4 과발현 식물체의 조직학적 특이성 분석 ○ 감자 형질전환체의 glycoprotein 분리 및 함량 분석 ○ 감자 형질전환체의 glycosylation 패턴 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 벼 성장발달 시기별 식물체 길이, internode 길이 및 분얼 수 비교 - 감자의 성장발달 시기별 식물체 길이, 줄기 두께 및 생체량/건중량 비교 - 벼의 경우, spike 수, spike 당 낱알 갯 수 및 무게 측정, 식물체 당 낱알 무게, 또는 낱알 갯 수 당 낱알 무게 등 분석 - 감자의 경우, 괴경의 수 및 괴경 무게 분석 - CYP21-4 단백질의 특정펩타이드를 대상으로 특이적 항체를 제작 - CYP21-4 항체를 이용하여 벼/감자 형질전환체에서 CYP21-4 단백질이 고 발현 되는지를 western 분석 - 감자 형질전환체의 줄기 및 잎 조직의 cross section 및 vertical section을 통한 식물조직학적 분석 - 줄기의 2차 비대성장 확인을 위한 리그닌 염색 - 성장 증대 표현형에서 CYP21-4 유전자가 glycoprotein 생산에 관여할 가능성이 있는지? glycoprotein 함량 분석 - CYP21-4 유전자가 골지체에서 당 단백질의 mature glycosylation 과정에 관여할 가능성에 대한 글리코실 패턴분석

2차년도	2016 - 2017	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 과 발현에 의한 포장조건 농업형질 분석 ○ 감자 괴경 형성과정에서 CYP21-4의 기능규명 ○ CYP21-4 과발현 감자 형질전환체 괴경 당류 분석 및 글리코실레이션 패턴분석 ○ CYP21-4 환경스트레스 내성 및 관련 기작 규명 ○ 상호작용단백질 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - AtCYP21-4 independent 형질전환체 각 라인 당 10개체 식물을 사용하여 비닐하우스 조건에서 4월 씨감자를 파종하고 8월말 수확함 - OsCYP21-4 T4 세대 벼 형질전환체 각 라인당 10개체씩 5월 중순 GMO 포장에 모내기하여 10월말 수확함. - <i>In vitro</i> micro-tuberization 과정에서 CYP21-4 과발현 형질전환체의 괴경 형성시기 및 생산성에 대한 대조구와의 비교실험 - AtCYP21-4 과발현체 식물체의 괴경 조직에서 전체 단백질과 ConA affinity column을 이용한 glycoprotein을 대상으로 HILIC와 MALDI-TOF 분석을 통해 당사슬의 정성 및 정량분석으로 CYP21-4 골지체 소기관에서의 기능을 분석하였다. - CYP21-4유전자는 애기장대, 벼식물체 모두에서 여러 환경스트레스에 반응하여 유전자발현이 크게 증가함을 보여주어 고농도 염, H₂O₂, 그리고 ABA 호르몬 스트레스 처리조건에서 표현형을 분석함. - CYP21-4의 스트레스 기작에서의 역할을 규명하기 위해 항산화 효소, POD, APX, 그리고 CAT 효소활성을 분석함 - 신규성 유전자의 식물체 내 기능규명을 위해 GFP trap을 이용해 <i>in vivo</i>-IP를 통한 상호작용단백질을 탐색함.
------	-------------------	---	---

3. 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	연구개발의 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차년도	2015 - 2016	벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 과발현에 의한 생산성 증대 농업형질 분석	30%	벼/감자 형질전환체의 성장시기에 따른 생산성 및 농업형질 비교분석 유무 (특허출원)
		벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 분자수준 검증	20%	벼/감자 형질전환체의 genomic DNA 삽입여부, mRNA 수준발현 정량 유무, 단백질수준 확인 유무 및 homozygous 세대진전 및 종자 수확 유무
		CYP21-4 과발현 식물체의 조직학적 특이성 분석	10%	감자형질전환체 줄기 및 잎 조직 조직학적 분석 유무 (논문발표)
		감자 형질전환체의 glycoprotein 분리 및 함량분석	20%	벼/감자 형질전환체의 ConA 컬럼을 이용한 glycoprotein 분리 및 함량분석 유무 (논문발표)
		감자 형질전환체의 glycosylation 패턴 분석	20%	Glycoprotein 또는 전체 단백질을 대상으로 ER또는 골지체 특이적 글리코실단백질 웨스턴 분석 유무
2차년도	2016 - 2017	벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 과발현에 의한 포장 조건 농업형질 분석	20%	벼/감자 형질전환체의 성장시기에 따른 생산성 및 농업형질 포장에서의 비교분석 실험 유무
		감자 괴경 형성과정에서 CYP21-4의 기능규명	20%	CYP21-4 과발현체의 <i>in vitro</i> microtuberization 실험을 통한 비교분석 유무
		CYP21-4 과발현 감자 형질전환체 괴경 당사슬 분석 및 글리코실레이션 패턴분석	20%	감자 CYP21-4 과발현체 괴경의 당 단백질 당사슬의 정성 및 정량 분석 유무
		CYP21-4 환경스트레스 내성 및 관련 기작 규명	20%	여러 환경스트레스 조건에서 CYP21-4 표현형 비교분석 유무 산화스트레스 내성과 관련하여 대표적 항산화효소활성 분석 유무
		상호작용단백질 탐색	20%	CYP21-4-GFP 단백질을 식물체내에서 발현시키고 GFP trap을 이용한 <i>in vivo</i> -IP 수행 유무

4. 연차별 성과목표 및 개발 내용 범위 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2015 ~ 2016)	주요작물의 생산성에 관 여하는 골지 체 표적 단백 질의 기능분 석 및 활용	AtCYP21-4 감자 형질전환체 의 영양생장 시기 표현형분석	100	- 감자 형질전환체 독립적 3개 라인을 구 축하고 동일 크기의 괴경을 파종하여 유리온실 조건에서 생장시기별 생산성 을 분석함. 생체량과 건중량을 분석함. - 라인당 10개체를 사용하였고 3반복의 실험을 수행함
		OsCYP21-4 벼 형질전환체의 영양생장 시기 표현형분석	100	- 벼 형질전환체 독립적 4개 라인을 구축 하고 2주째 유식물체를 유리온실에 옮겨 생장시기별 생산성을 분석하였다. - 라인당 10개체를 사용하였고 3반복의 실험을 수행함
		AtCYP21-4 감자 형질전환체 의 생산성 표현형분석	100	- 개체 당 감자 괴경의 수, 괴경의 무게 를 측정함. 지하부의 뿌리길이와 무게 를 측정함
		OsCYP21-4 벼 형질전환체의 생산성 표현형분석	100	- 개체당 spike 수, 종자 총 무게, 종자 200개당 종자의 무게 등을 측정함
		벼/감자 형질전환체의 CYP21-4 분자수준 검증	100	- Genomic DNA 삽입여부 분석 - mRNA 수준 정량분석 - 항체를 이용한 단백질수준에서의 과발 현 분석
		CYP21-4 과발현 식물체의 줄기 및 잎 조직의 2차비 대성장 조직 특이성 분석	100	- 감자 형질전환체의 엽병, 줄기, 잎 조직 을 대상으로 cross 또는 vertical section 하여 조직학적 변화를 관찰 - 2차비대성장 분석을 위해 리그닌-특이 적 염색법을 통한 분석
		벼/감자 형질전환체의 glycoprotein 분리 및 함량 분석	80	- 벼/감자 형질전환체의 잎/괴경/벼 낱알 조직에서 일정한 전체 단백질로부터 당 단백질을 ConA 컬럼을 이용해 정량 비 교분석. 2회의 반복실험을 수행
		벼/감자 형질전환체의 glycosylation 패턴 분석	80	- 분리된 당단백질로부터 high mannose 를 인지하는 ConA 항체 면역반응과 골 지체-특이적 fucose, xylose 당을 인지 하는 HRP 항체를 면역반응 분석
AtCYP21-4 단백질의 골지 체 표적 확인	100	- AtCYP21-4-GFP 재조합단백질을 담배 식물체에서 일시적 발현시키고 골지체 Man-RFP를 동시 발현시켜 골지체표적 을 확인함		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2016 ~ 2017)	주요작물의 생산성에 관 여하는 골지 체 표적 단백 질의 기능분 석 및 활용	AtCYP21-4 감자 형질전환체 의 포장실험에서의 생산성 표현형분석	100	- 비닐하우스에서 감자형질전환체 재배 (한국생명공학연구원 내) - 온도 등 포장과 동일하게 재배 - 4월 파종후 8월에 수확 - 생체량 및 괴경 수확량 분석
		OsCYP21-4 벼 형질전환체의 포장조건에서의 생산성 표현 형분석	100	- 경북대 군위 포장에서 재배 - 5월 모내기 후 10월 말 수확 - 7월 중간 성장확인 - 10월 말 종자 수확 후 생산성 관련 농업형질 분석
		AtCYP21-4 과발현체의 <i>in vitro</i> microtuberization에 미 치는 영향 규명	100	- 반복된 유리온실 실험에서 AtCYP21-4 과발현체가 대조구에 비해 괴경의 형성 에 영향을 주고 있음이 확인되어, <i>in vitro</i> microtuberization과정에서의 변화 를 4주 이상 관찰하였다
		CYP21-4 과발현 감자 형 질전환체 괴경조직 단백질 의 당사슬 정성/정량 분석	100	- 감자 괴경의 전체 당단백질의 정성적 정량적 분석을 위해 클리코실레이션 전 문분석 회사에 의뢰하여 분석하였다 - 전체단백질과 ConA에 의한 당단백질을 2차에 걸쳐 비교분석하였다.
		AtCYP21-4 감자 형질전환체 의 환경스트레스 내성 분석	100	- 감자 형질전환체를 대상으로 고농도 염, 그리고 MV, H ₂ O ₂ 산화스트레스를 농도별로 처리하여 스트레스 내성을 분석하였다.
		OsCYP21-4 벼 형질전환체의 환경스트레스 내성 분석	100	- 벼 2주 배양된 유식물체를 대상으로 고 농도의 염, MV, H ₂ O ₂ 산화스트레스 조 건에서 생체량 및 신장을 측정하여 스 트레스 반응 표현형을 분석하였다
		CYP21-4 환경스트레스 내 성 기작 규명	100	- 생리학적 스트레스 내성 기작을 확인하 기 위해 스트레스 조건에서 활성산소종 을 DAB 염색법으로 관찰하였다. - 산화스트레스에 관여하는 항산화 효소 활성을 측정하였다. - 200mM 염, 10 mM & 30 mM H ₂ O ₂ 조건에서 POD, SOD, 그리고 CAT 효소 활성을 각 각 분석하였다.
<i>In vivo</i> CYP21-4 상호작용 단백질 탐색	70	- CYP21-4의 식물체내 기능을 규명하기 위해 상호작용단백질을 <i>in vivo</i> 수준에 서 탐색하였다. - CYP21-4-GFP 단백질을 담배에서 일시 발현 시키고 GFP trap방법으로 Co-IP를 수행하였다.		

제 2 절 관련분야 기여도

- 국내 벼 품종육성은 고품질을 추구하고 있으며, 병해충와 환경스트레스 내성 형질에 대한 수요가 지속적으로 증가될 것임. 현재 가장 중요한 형질은 생산성이며, 다양한 소비자의 수요를 목적하는 신품종개발의 필요성이 대두되고 있음. 따라서, 본 연구과제 수행 및 결과는 벼 품종육성 연구를 위한 원천기술 기반 마련에 크게 기여할 수 있음.
- 감자의 경우에도, 국내기술 경쟁력은 최고 수준이지만 산업적 측면에서는 전문기업이 전 무한 실정임. 국제적 경쟁력을 갖기 위해서는 전통육종을 통한 품종개발보다는 생명공학적인 접근을 통한 원천기술력 확보가 훨씬 유리하기 때문에 본 연구과제 수행 및 결과는 감자 작물의 생산성 증대 연구에 기여할 것임.
- 특히, 국내 인공씨감자 기내 대량배양 생산시스템은 세계 최고수준으로 본 연구에서의 *in vitro* microtuberization 과정에서의 CYP21-4발현에 의한 소 괴경 형성 속도가 빨라지고 괴경의 양도 많아지는 연구결과는 국가 경쟁력을 강화시킬 수 있을 뿐만 아니라 거의 연구가 되고 있지 않은 괴경형성에 관한 분야에도 중요한 결과를 도출할 가능성이 있음.
- 골지체는 단백질의 폴딩, sorting, processing등 매우 중요한 생물학적 기능을 수행하는 소기관임에도 불구하고 특히 식물에서는 글리코실레이션 이외의 기능에 대해서는 보고된 연구가 거의 존재하지 않고 있다. 본 연구의 골지체표적 단백질도 다수의 이뮤노필린 중 최초로 골지체로 표적되는 단백질을 규명하였으며 골지체 소기관에서의 번역 후 조절기작에 의한 미세조절 가능성을 시사하고 있어 골지체의 생물학적 기능을 이해하는데 큰 역할을 할 수 있는 연구로 판단됨.
- 현재까지 주요 농업형질 개량을 위해 전자인자를 중심으로 연구가 진행되어 왔으나 스트레스 조건에 아닌 정상조건에서 하위 유전자의 과도한 발현으로 식물생장이 지연되는 부정적인 측면이 있어 본 연구를 통한 번역 후 미세조절기작에 관여하는 유전자의 장점을 우수 농업형질 도입에 활용할 수 있는 가능성을 제시.
- 주요 경제작물의 핵심 농업 개량형질인 생산성증대 관련유용 유전자발굴은 종자산업 시장의 고부가가치 창출에 크게 기여할 것임.

제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

1. 연구개발결과의 활용방안

- 생산성 증대 유전자를 주요작물 육성에 활용
- 본 과제에서 연구된 유전자 기능분석은 다른 주요작물의 ortholog 연구기반에 활용
- 다른 작물의 유전자로부터 생산성 증대 우수 유전자를 발굴하여 heterologous 시스템에 활용
- 본 연구에서 발굴한 생산성 증대/환경스트레스 내성 유전자를 목적에 맞는 작물에 도입하고 표현형이 확인된다면, 보다 상세한 분자생물학적 기능분석이 필요하며 필요할 경우 아직은 발굴하지 못한 상호작용단백질을 후속 연구를 통해 탐색하고 유전자의 기능을 명확히 규명할 것임.
- 골지체 기능분석 연구기반에 기여할 것임

2. 기술적 측면 활용 가능성

- 골지체표적 단백질 기능분석 방법론적 기여
- 식물 골지체 표적 마커 단백질로 사용
- 식물 당단백질 분석법 제공

3. 경제·산업적 측면 활용 가능성

- 생산성 증대 육종소재 개발
- 환경스트레스 내성 육종 소재 개발
- 본 연구과제의 결과를 기반으로 육종전문가와 유기적인 관계를 통해 포장에서의 수량 생산성 및 안정성을 검토하고 육종소재로 개발

4. 추가 연구의 필요성

- 우수 농업형질 유전자의 기초연구 부재로 인한 GMO 개발의 어려움이 존재하나 원천기술 기반 마련을 위해서는 유전자의 명확한 기능과 식물체내 역할 이해에 대한 추가 연구가 필요함.
- 포장조건에서의 생산성 증대 표현형의 큰 변이차는 GMO 개발을 위한 걸림돌로 이를 해결하기 위한 통계학적 연구가 요구됨
- 기술가치평가 전문가를 통해 기술사업화 가능성을 확인

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

제 1 절 특허분석

1. 기존 특허는 작물의 기능 유전체 기초연구 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 농업형질 방향으로 연구를 추진하여 수량 생산성이 증가된 우수 유전자원 활용화 관련 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 필요성이 있음.
2. 식물 골지체 단백질에 대한 유용 유전자발굴은 거의 이루어지고 있지 않은 실정으로, 본 연구과제에서는 수행한 골지체표적 이뮤노필린유전자의 생산성증대 기능분석을 통한 유용 유전자발굴에 관한 특허는 국내 및 국외에서 본 연구진이 유일함.
3. 현재까지는 생산성증대 유전자 발굴에 관한 특허는 주요 전사인자가 환경스트레스 내성에 대한 기능분석으로 주를 이루고 있어 본 연구에서와 같은 번역 후 조절기작에 관여하는 유전자의 발굴이 차세대유전체 시대로의 패러다임 변화로 급격히 증가할 것으로 판단 됨.

제 2 절 논문분석

1. 골지체 표적 유전자에 대한 기능분석은 거의 진행되고 있지 않아 신규성 골지체표적 유전자의 기능연구는 선도적 분야임.
2. 본 연구진의 선행연구 결과 다수의 이뮤노필린이 골지체로 표적 될 가능성을 확인하여 식물 골지체 연구분야에 크게 기여할 수 있음
3. 골지체 소기관의 생물학적 기능을 이해하기 위한 골지체 특이적 프로테오믹 연구가 활발히 진행되고 있어 신규성 단백질의 기능연구가 활발히 진행될 것임
4. 식물의 생산성과 환경스트레스 내성 기능을 보이는 우수 농업형질 조절 유전자 발굴이 가속화될 것임
5. 표준유전체 이후 주요 농업형질인 생산성 증대 연구의 필요성이 급증하고 있으며 최근 발표된 논문은 아래와 같다

- Identification and characterization of a novel group of legume-specific, Golgi apparatus-localized WRKY and Exo70 proteins from soybean. 2015. J of Exp. Botany
- ECA3, a golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in arabidopsis. 2008. Plant Physiology
- MYB and bHLH transcription factor transgenes increase anthocyanin pigmentation in petunia and lisianthus plants, and the petunia phenotypes are strongly enhanced under field conditions. 2014. Frontiers in Plant Science

- Transcriptional activation of *Brassica napus* β -ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor. 2012. *Plant Biotechnology J.*
- The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. 2012. *J. of Exp. Botany*
- Effect of over-and under-expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase on tolerance of plants to water-deficit stress. 2015. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*

※ 골지체 표적 유전자의 생산선증대 관련 세포학적 기능 및 기작에 관한 심층 연구가 지속적으로 진행되어야 하며, 유리온실 조건과는 다르게 포장 조건에서는 개체 간 변이차가 너무 심하게 나타나고 급변하는 기후변화에 따른 현실적 어려움이 존재하여 작물의 생산성 또는 환경스트레스 내성에 대한 농업형질 분석은 해결해야할 많은 문제점이 있다. 하지만, 지속적인 인구증가와 작물재배를 위한 환경조건의 변화가 가속화되고 있는 현 상황을 고려하면 생산성 증대를 위한 기초원천 기술과 생명공학적 기술개발이 절대적으로 필요하며 유용 육종소재 활용이 필수적으로 요구될 것이다.

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당없음		

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 기술적 위험요소 분석: 특이사항 없음</p> <p>○ 안전관리대책 [주관연구기관: 한국생명공학연구원]</p> <p>1. 연구실 안전점검 체계 및 실시</p> <p>1) 한국생명공학연구원의 경우 연구실 안전 환경 조성에 관한 시행규칙 제2조 1항에서 제시한 안전관리규정 작성 연구실 규모 (10인이상)에 해당하며 근무 매일 각 연구실에 대한 보안 및 안전 점검부의 해당 사항을 모두 체크하고 기록하고 있음</p> <p>2) 위험폐기물은 필요한 표식을 부착하여 따로 보관한 후 관련 업체에 위탁하여 폐기함</p> <p>2. 교육, 훈련</p> <p>1) 안전 교육을 연 2회 의무교육 실시.</p> <p>2) 담당 부서장이 수행되는 연구와 관련된 안전 교육 실시</p> <p>3. 건강검진</p> <p>1) 전직원 건강검진 의무화 연1회 실시. 및 위험물질 취급자 특수 건강검진 의무화</p> <p>4. 연구활동 종사자 보험</p> <p>1) 모든 연구원 종사자의 보험가입의 경우 연구실 안전 환경 조성에 관한 단체 상해보험에 가입되어 재해 시 산업재해보상보험법에 따라 보상이 행하여 짐</p>		

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재 지/ 특허등록 국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	The OsCYP19-4 Gene Is Expressed as Multiple Alternatively Spliced Transcripts Encoding Isoforms with Distinct Cellular Localizations and PPLase Activities under Cold Stress	한국생명 공학연구 원	교신저자	IJMS	3.295	2016.07.20	중복사사	SCI
2	논문	Identification of flowering-related genes responsible for differences in bolting time between two radish inbred lines	한국생명 공학연구 원	교신저자	Frontiers in Plant Science	4.298	2016.12.	중복사사	SCI
3	논문	Comparative transcriptome profiling and SSR marker identification in three Jerusalem artichoke (<i>Helianthus tuberosus</i> L.) cultivars exhibiting phenotypic variation	한국생명 공학연구 원	교신저자	IJMS	3.295	2016.	중복사사	SCI
4	논문	Overexpression of Golgi protein CYP21-4s improves crop productivity in potato and rice by increasing the abundance of mannosidic glycoproteins	한국생명 공학연구 원	교신저자	Frontiers in Plant Science	4.298	2017.09.	중복사사	SCI
5	논문	Genome-wide analysis of alternative splicing in an inbred line cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L.) line 'HO' in response to heat stress	한국생명 공학연구 원	교신저자	Current Genomics	1.89	2018.01	중복사사	SCI
5	특허	식물의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 벼 유래의 OsCYP21-4 유전자 및 이의 용도	한국생명 공학연구 원	주발명자	한국	-	2017.07.24	단독사사	특허 출원

제 11 장 참고문헌

코드번호	D-14.
1.	WY Jung, HJ Park, A Lee, SS Lee, YS Kim, HS Cho. 2016. Identification of Flowering-Related Genes Responsible for Differences in Bolting Time between Two Radish Inbred Lines. <i>Frontiers in Plant Science</i> 7: 1844
2.	A Lee, SS Lee, WY Jung, HJ Park, BR Lim, HS Kim, JC Ahn, HS Cho. 2016. The OsCYP19-4 Gene Is Expressed as Multiple Alternatively Spliced Transcripts Encoding Isoforms with Distinct Cellular Localizations and PPlase Activities under Cold Stress. <i>International J. of Molecular Science</i> 17(7): 1154
3.	DH Yoon, SS Lee, HJ Park, JL Lyu, WS Cheong, JR Liu, BG Kim, JC Ahn, HS Cho. 2016. Overexpression of OsCYP19-4 increases tolerance to cold stress and enhances grain yield in rice (<i>Oryza sativa</i>). <i>J. of Experimental Botany</i> 67(1): 69-82
4.	SS Lee, HJ Park, DH Yoon, BG Kim, JC ahn, S Luan, HS Cho. 2015. Rice cyclophilin OsCYP18-2 is translocated to the nucleus by an interaction with SKIP and enhances drought tolerance in rice and <i>Arabidopsis</i> . <i>Plant Cell & Environment</i> 38(10): 2071-2087
5.	HJ Park, WY Jung, SS Lee, JW Lee, YS Kim, HS Cho. 2015. Physiological and molecular characterization of two inbred radish lines with different bolting times. <i>J. of Plant Biotechnology</i> 42: 215-222
6.	WY Jung, SS Lee, HJ Park, CW Kim, SY Kwon, JH Jeon, HS Kim, HS Cho. 2016. Comparative transcriptome profiling and SSR marker identification in three Jerusalem artichoke (<i>Helianthus tuberosus</i> L.) cultivars exhibiting phenotypic variation. <i>Plant Biotechnology Report</i> 10: 447-461
7.	SS Lee, HJ Park, WY Jung, A Lee, DH Yoon, YN You, HS Kim, BG Kim, JC Ahn, HS Cho. 2015. OsCYP21-4, a novel Golgi-resident cyclophilin, increases oxidative stress tolerance in rice. <i>Frontiers in Plant Science</i> 6: 797