

313058-5

발간등록번호

11-1543000-002609-01

과제명
활용한
생물발광
자체
발광
세균
유래의
LUX
유전자들을
개발
최종
보고서

생물발광 세균 유래의 LUX 유전자들을 활용한 자체 발광 화훼작물의 개발 최종보고서

2019. 3. 26.

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 충남대학교 산학협력단
(주)로즈피아
국립농업과학원

2019

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생물 발광 세균 유래의 LUX 유전자들을 활용한 자체 발광 화훼작물의 개발”(개발기간 : 2013. 12. 24 ~ 2018. 12. 23)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 3. 26.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단장 (인)

협동연구기관명 : 충남대학교 산학협력단장 (인)

(주)로즈피아 대표 (인)

국립농업과학원장 (인)

주관연구책임자 : 김 강 민

협동연구책임자 : 이 찬 용

이 광 진

임 명 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	313058-5	해당단계 연구기간	2013.12.24. ~ 2018.12.23 (60개월)	단계구분	1/ 1
연구사업명	단위사업	농생명산업기술개발			
	사업명	생명자원 부가가치 제고기술			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	생물 발광 세균 유래의 LUX 유전자들을 활용한 자체 발광 화웨이 작품의 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 127명 내부: 명 외부: 127명	해당단계 연구개발비	정부: 850,000천원 민간: 212,500천원 계: 1,062,500천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 127명 내부: 명 외부: 127명	총 연구개발비	정부: 850,000천원 민간: 212,500천원 계: 1,062,500천원	
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 생명공학부		참여기업명 (주)로즈피아		
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:		연구책임자:		

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일 반
-------------------------	--------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	5	5	1					5			

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 자체 발광 세균의 발광 조절 인자들의 특성 규명
 - 자체 발광 효소인 luciferase 와 lumazine 단백질 유전자의 클로닝
 - 발광 인자들의 대장균내에서의 발현 시스템 구축 및 발광 증대를 위한 과발현 시스템 개발
- 세균의 자체 발광 및 형광 세기 증진을 위한 단백질 및 유전자 엔지니어링의 기법 개발
 - 루마진 단백질의 형광 세기 증진 기법 개발
 - Luciferase AB 융합 재조합 단백질의 제작
 - Luciferase 활성을 조절하는 cysteine 아미노산 잔기 동정 및 기능 연구
 - Lux F에 의한 luciferase 활성 및 발광 증진 확인
 - 형광 및 발광 세기 증진을 유도하는 27개 아미노산 peptide 개발
- 자체 발광 유용 유전자 확보
 - *Photobacterium leigonathi*와 *P. phosphoreum*등의 자체 발광 세균에서 LUX 유전자 전체 operon (LUX CDABEFG)확보 및 개별 유전자들의 클로닝
- 자체 발광 폐튜니아의 개발
 - 폐튜니아의 조직 재분화 및 DNA bombarding기술을 통한 엽록체 형질전환 기법 확립
 - 자체발광세균(*Photobacterium phosphoreum*)의 발광 유도 operon을 구성하는 7개의 유전자 (LUX CDABEFG)를 엽록체 형질전환 기법을 통해 폐튜니아에 도입하여 발광 형질을 확보
- 자체 발광 애기장대의 개발
 - 자체 발광세균 (*P. phosphoreum*)의 LUX AB 융합 유전자와 LUX CDE 융합 유전자를 각각 애기장대 핵에 도입시킨 후, 유전 교잡을 통해 발광 형질을 확보
 - 발광 세균의 lucifersae AB 융합유전자와 루마진 단백질 유전자 동시 발현 형질전환 계통 제작
- 자체 발광 형질 전환 애기장대의 세대 진전, 유전자 전장 및 전사체 서열 분석 및 해당 유전자원 등록
- 국내외 절화 시장 동향 분석 및 자체 발광 작물의 잠재적 가치 산출 및 시장 도입 가능성 분석

보고서 면수
106 페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>생명공학 기술을 이용한 고부가가치 자체 발광 화훼작물 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 화훼작물 대상 생물 발광 시스템 분석 및 유전 정보 확보 ● 생물 발광 유전자 발현 시스템 확립 및 화훼 작물 대상 식물 형질 전환체 개발 ● 발광 식물체의 대량 증식법 구축, 지식 재산권 확보 및 산업화 추진 ● 자체 발광 화훼 작물들의 세대 안정성 평가, 이벤트 적격성 평가, 및 안정성 심사 신청 위한 자료 확보 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 신규 부가가치 화훼 작물 개발을 목적으로, 자체 발광 형질을 나타내는 식물 개발에 필요한 유전공학적 소재 및 관련 원천 기술들을 개발 ● 자체 발광 유용 유전자 확보 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Photobacterium leigonathi</i>와 <i>P. phosphoreum</i>등의 자체 발광 세균에서 LUX 유전자 전체 operon 및 개별 유전자들의 클로닝 ● 자체 발광 페튜니아의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 페튜니아의 조직 재분화 및 DNA bombarding기술을 통한 엽록체 형질전환 기법 확립 - 자체발광세균(<i>Photobacterium phosphoreum</i>)의 발광 유도 operon을 구성하는 5개의 유전자 (<i>LUX CDABE</i>)를 엽록체 형질전환 기법을 통해 페튜니아에 도입하여 발광 형질을 확보 ● 자체 발광 애기장대의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 자체 발광세균 (<i>P. phosphoreum</i>)의 <i>LUX AB</i> 융합 유전자와 <i>LUX CDE</i> 융합 유전자를 각각 애기장대 핵에 도입시킨 후, 유전 교잡을 통해 발광 형질을 확보 ● 자체 발광 형질 전환 애기장대의 유전자 전장 및 전사체 서열 분석 및 등록 ● 세균의 자체 발광 및 형광 세기 증진을 위한 단백질 및 유전자 엔지니어링의 기법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 루마진 단백질의 형광 세기 증진 기법 개발 - 자체 발광 및 형광 단백질들의 효율 증진에 관여하는 small peptide의 확보와 활성 분석 ● 국내외 절화 시장 동향 분석 및 자체 발광 작물의 잠재적 가치 산출 및 시장 도입 가능성 분석 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 발광 형질을 도입한 신규 화훼 품종으로 활용 ● 장기적으로 신규 형질 화훼 품종으로 등록 ● 다른 화훼 작물 (예, 장미) 및 주택 인테리어 식물에 동일 형질 도입 ● 발광 식물에 대한 독점적인 원천 기술을 확보함으로써, 이로부터 파생되는 다양한 산업화 기술에 대한 고유의 특허권의 보유 및 지적 재산권 행사 ● 발광 유전자 발현 조절을 통하여 주변 환경의 물리적, 화학적 조건에 특이적으로 발광할 수 있는 친환경 표지 식물의 개발 ● 기존 화훼작물에 완전히 새로운 기능을 부여함으로써, 화훼시장 및 인테리어 시장에 새로운 패러다임 제시 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	단백질 엔지니어링	발광유전자	엽록체 형질전환	자체발광	화훼작물
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Protein engineering	Luminescence gene	chloroplast transformation	autoluminescence	floral crop plants

< 목 차 >

1장 연구개발과제의 개요.....	6
1절 연구개발 목적.....	6
2절 연구개발의 필요성.....	6
3절 연구개발 범위.....	9
2장 연구수행 내용 및 결과.....	14
1절 연구 과제 추진 전략 및 체계.....	14
2절 연구 수행 내용 및 결과.....	19
3절 정량적 성과 요약.....	95
3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도.....	96
1절 연구 목표.....	96
2절 목표 달성 여부.....	96
4장 연구결과의 활용 계획.....	103
1절 학술적 활용 계획.....	103
2절 산업적 활용 계획.....	103
붙임.	
참고문헌.....	105

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

본 연구는 국내 화훼작물의 세계 시장 경쟁력과 원예 농가 및 기업의 소득을 높이고자 기존 식물에 자체 발광이라는 고부가가치 신규 형질을 도입할 수 있는 원천 기술을 개발하고자 한다. 이를 위해서, 해양 자체 발광 세균이 가지고 있는 생물 발광 시스템을 분석하고 및 유전 정보들을 확보하였다. 그리고, 식물내에 생물 발광 유전자 발현 시스템을 확립시키고, 이를 활용하여 자체 발광 형질 전환을 실시하였다. 장기적으로는, 개발된 형질 전환 화훼작물의 대량 증식법 및 지식 재산권을 확보하고, 산업적 활용을 위해 자체 발광 화훼 작물들의 세대 안정성 평가, 이벤트 적격성 평가, 및 안정성 심사 신청 위한 자료들을 확보하고자 한다.

2절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

최근 신자유주의 무역 정책 기조의 확대에 따라 우리나라 농업은 WTO, DDA, 그리고 FTA와 같은 국가 간 농산물 전면 개방 협정에 점진적으로 동참하고 있다. 이러한 국제 동향의 변화 속에서, 향후 해외 농업 선진국들의 국내 시장 진입으로부터 자국 농업을 보호하고 관련 산업 종사자들의 생존을 보장하기 위해서는 농산물의 상품성 및 부가가치성 등의 향상을 통한 경쟁력확보가 절실히 필요하다. 아울러, 농산물이 미치는 경제적 파급효과를 고려할 때, 농업 대국으로부터 우리 농산물의 안보를 유지하는 것은 향후 국가 존망이 걸린 중대한 사안으로서 인식되고 있다.

화훼산업의 경우 이미 1980년대 중반에 모든 화훼류에 대한 전면 개방이 이루어졌다. 2011년 기준 전 세계 화훼시장의 규모는 약 46조원으로서 이는 2008년에 비해 거의 두 배에 달하는 금액이며, 우리나라 1년 예산에 10%에 상당하는 규모이다. 이중 국제 화훼 무역의 약 50%정도를 네덜란드가 담당하고 있다. 한국의 연간 화훼 생산량은 약 1조원 가량이고, 수출액은 약 480억원 정도이다. 한편, 가까운 중국의 화훼 수출액은 약 4400 억원으로서 한국의 10배에 해당하는 금액이다.

우리나라의 경우, 화훼 생산량은 세계적 수준에 도달하였지만, 연간 약 110억원에 달하는 로열티를 외국에 지불하고 있기 때문에, 국가적 측면에서 화훼산업의 수익개선을 위해서는 신품종 개발을 통한 국내 보급 및 수출의 증대가 필수적이다. 최근, 농촌진흥청 및 지자체 산하 여러 연구소 및 화훼 재배 단지에서 다양한 노력을 통해서 외국산 화훼 품종에 대한 의존도를 줄이고, 자체 개발을 통해 국산 품종 보급률을 증진시키고 있지만, 아직은 시장 보급률이 6.4% 정도에 그치고 있다. 따라서, 수출 경쟁력 우위를 점하기 위해서는 우리나라만이 생산할 수 있는 새로운 형질의 고부가가치 화훼작물의 생산이 필요한 상황이다. 2012년부터 모든 농작물에 대한 UPOV 적용을 받기 때문에 신품종 육성을 통한 수입대체, 나아가서는 종자 수출국으로서 자립이 중요하다. 지난 실용 정부는 이러한 추세에 대비하기 위한 일환으로서 Golden Seed Project를 기획하여 국산 주력 품종의

종자 재산권 확보를 위한 연구 지원등을 추진하고 있다.

한편, 국민 소득 및 생활 수준이 높아지면서 생존을 위한 먹거리 뿐만 아니라 주거 환경에 대한 관심이 증가하고 있으며, 인테리어 및 조명에 대한 관심 및 경제적 지출 또한 늘고 있는 추세이다. 화훼는 인테리어 장식용으로 우리 일상생활에 오랫동안 인식되어 온 점을 감안하면, 화훼 및 관상 작물을 이용한 다양한 기능성의 확보, 특히 조명으로서의 역할이 기존 형질에 새로이 추가된다면 잠재적 부가가치는 훨씬 증대될 것으로 사료된다. 사실, 식물을 이용한 발광 및 조명에 관한 연구는, 자연과학 분야에서 이미 오래전부터 진행되어 왔다. 대개의 경우는 반딧불이나 어류등의 생물발광 (bioluminescence)나 형광 (fluorescence) 발현에 관여하는 단백질들을 이용하고 있는 데, 이들 기술은 외부에서 발광 기질을 넣어 주거나, 자외선을 쬐어 주어야 관측이 가능함으로써, 실제 생활 조명 및 인테리어 요소로는 적합하지 않다. 한편, 자연계에는 외부의 요소에 의존치 않고 자체적으로 발광을 낼 수 있는 다양한 생물들이 존재한다. 현재까지 발광하는 생물은 세균에서부터 어류에까지 널리 분포하고 있으며, 발광 메커니즘도 생물의 종류에 따라 다양한 것으로 알려져 있으나, 일부를 제외한 많은 생명체의 발광 메커니즘은 명확하게 밝혀져 있지 않다.

현재까지 자연상태의 식물에서는 자체 발광이 관측되고 있지 않지만, 2010년 미국 뉴욕대학의 Krichevsky등이 세균의 발광 유전자를 식물내로 도입시켜 발광식물체를 개발하여 관련 분야의 산업화의 가능성이 제시되었다. 아직은 발광 정도가 지극히 희미하여 (암실에서 6분 정도 지속적으로 관찰할 경우에 식별이 가능한 정도) 산업화시키기에는 아직 많은 난관을 해결해야 하는 단계이다. 하지만, 멀지 않은 미래에 기술 개선이 이루어 질 것이며 실제 화훼시장에 관련 품종이 등록이 될 전망이다. 따라서, 향후 관련 작물로의 로열티 지급 및 잠재적 시장 잠식을 방지하고 관련 산업 분야에서 우리나라가 선도적인 역할을 수행하기 위해서는, 국내에서도 조속한 시일 내에 관련 기술 개발 및 원천 기술 확보에 대한 정부의 지원과 산, 학, 연간의 적극적이면서도 상호 교류적인 연구가 시급하다. 본 과제의 성공적인 결과 도출은 향후 국내 화훼산업이 세계 시장을 선도할 수 있는 교두보를 확보케 할 것이며, 인간의 일상생활에도 새로운 주거 문화와 연계되어 경제적 가치를 창출할 수 있는 무한한 잠재력을 제공할 것으로 믿는다.

2. 국내 산업·시장 동향

현재 자체 발광 식물에 관해서는 관련 기술이 적용된 식물이 품종으로 등록된 바 없기 때문에 산업동향이나 시장 규모는 예측이 불가능하다. 다만, 유사한 형질을 띠, 즉 기존 화훼 형질에 인위적 처리를 함으로써 부가가치를 올린 작물들이 유통되고 있기 때문에 이들 유사 형질의 화훼작물 시장을 토대로 자체 발광 식물 시장 규모를 예측해 볼 수 있다. 제안하는 기술은 관상식물 시장 (2010년 국내 1조원) 중에서 i) 수출 효과가 크고 ii) 소비자들에게 어필 가능한 신규성이 높은 화훼류의 절화류 시장을 목표시장으로 한다. 절화류 시장 중에서는 일본 (화훼 최대 수출국) 수출 효과가 높고 소비자 만족도 높은 장미 시장을 핵심 목표시장으로 선정하였으며, 장미 시장에서 유사한 기능으로 시장 장악력을 보이고 있는 “메직로즈 (약제 처리를 통한 장미 색 변화)”제품 시장을 비교 가능한 시장으로 평가함으로써 시장성을 검토하였다.

가. 국내 시장 분석

2010년 국내 화훼 시장은 절화류 (5,000억원)가 가장 크며, 다음으로 분화류 (4,000억원)가 크고, 나머지 초화, 관상수, 화목, 종자 및 구근류 시장 (각각 1,000억원 내외)이 형성되어 있다. 국내 주요 절화류 시장은 장미(40%)와 국화(23%)가 전체 시장의 63%를 점유하고 있으며, 장미의 품종 다양화를 통한 수요 확대가 진행되고 있다. 국내 장미 재배 농가는 평균 259원/본 가격으로 장미를 농협에 수매하며, 10,165천원/10a (116,869본/10a)의 소득을 올리고 있으나, 생산 비용 상승 및 화훼 로열티 지급 부담으로 인해 경제성이 높은 고부가가치 장미 생산에 대한 기대 수요가 높다 (2007년 농촌진흥청 자료).

나. 국외 시장 분석

세계 시장보다는 국내 화훼가 가장 많이 수출되고 있는 일본 시장을 주목할 필요가 있다. 2010년 일본 화훼 수요 중에서 절화류의 수요는 8,378백만본으로, 타 화훼류에 비해 월등히 높았으며, 이를 대변하듯 국내의 일본 수출 주요 품목은 절화류인 장미(전체 수출액 대비 36%)와 국화(35%)가 주를 이루고 있다 (종자 연구소, 2011). 2011년 국내 전체 화훼 수출액은 1억 달러 규모로 성장하였으며, 이 중에서 장미 수출액은 전년 대비 70% 증가한 2,013만 달러였으며, 1994년 이후 최고액을 기록하였다. 국산 장미의 고급화를 통한 성공사례로서, 메직로즈 (약제처리를 통해 빛과 온도에 따른 장미 색 변화) 장미는 2010년 500만달러의 수출액을 달성하였으며, 일반 장미보다 4배이상 높은 가격으로 판매되고 있다 (aT 공사, 2010).

다. 국내외 관련 연구 동향

해외의 경우, 2010년 미국 뉴욕대학의 Anthony와 Krichevsky등이 세균 (*Photobacteria leigonathi*)의 발광 유전자 (LUX operon)를 담배내로 도입시켜 미세한 발광을 보이는 식물체를 개발하여 관련 기술의 특허 (US2010/025366)를 등록하고 관련 내용을 학술 논문 (PLoS ONE, 2010, e15461)을 통해 게재한 바 있다. 그 후, 상기 논문 연구를 주도했던 두 연구자가 각각 독립적으로 회사를 설립하여 상용화를 추진하였다. Krichevsky는 미국 미저리주에 BioGlow LLC라는 회사를 설립하여 ALPS (autoluminescence phytosensor plant) 및 화훼 품종 개발을 추진하였으며, 'Starlight Avatar'라는 상품명으로 지닌 식물체를 개발하였다고 언론에 홍보하였으나, 2015년 이후 본 회사와 관련 품종 개발에 대한 소식은 들리는 바 없다. 한편, 2013년 미국 캘리포니아에서는 Anthony evans가 Glowing Plant Project를 통하여 자체 발광 식물에 대한 연구의 공개 start up fund raising를 진행한 바 있으며, 단기간에 예상 투자 금액을 상회하는 관심을 얻기도 하였다. 그 후, 2016년에 시제품을 생산하여 투자자들을 상대로 판매하기도 하였으나, 2017년 판매부진과 추가 투자금액 모집에 실패함으로써, 프로젝트는 종료되었다. 관련하여, 각종 포럼등에서 발광 효과에 대한 회의적인 반응들이 본 프로젝트의 발광 효율성의 신뢰도에 의문을 제기하기도 하였다. Anthony는 또한 캠브리지와 iGEM이라는 공동연구를 추진하면서, 반딧불의 발광 유전자와 *Vibrio harveyi* 발광유전자를 도입시킨 대장균 개발에 관

여하였으나, 관련 기술을 식물에도 적용하였는지의 여부는 불확실하다. 유사하게, 미국 오클라호마의 Bruce Eric Hudkins 또한 발광 유전자들의 식물 형질전환에 대한 연구를 진행, 관련 특허 (US7994396)를 보유중이나, 이는 실제 기술 개발을 통한 특허 등록이 아닌, 개념 특허 수준이었다.

상기된 연구 동향은, 본 과제에서 기획한 자체 발광 (autoluminescence) 기술에 대한 해외 선도 그룹등의 기술개발인데, 기존 화훼시장의 경우 엄밀한 의미에서의 자체 발광은 아니지만, 염료의 화학 처리에 의한 간접 발광 기술은 이미 산업화되어 시장에서 유통되고 있다. 장미의 경우, 온도변화에 따라 꽃 색깔이 변하는 온도 장미 빛의 종류에 따라 꽃 색깔 바뀌는 빛 장미 어둠 속에서 빛을 발하는 야광장미 꽃잎이 무지개 색으로 가기 다른 레이보우 장미등으로 다양하며 주로 흰색 장미인 테니스를 원본으로 생육기에 고도의 염색 기술로 만드는 것으로 알려져 있다. 야광 장미와 레이보우 장미등의 품종들을 이미 일본과 네덜란드에서 개발되어 유통되고 있다. 우리나라의 경우도, 2008년부터 마술장미 (magic rose)라고 불리는 품종들이 민간 화훼업자들에 의해 개발되어 국내 화훼산업을 선도하고 있으며, 현재는 다량을 해외에 수출중이다. 온도 장미와 빛 장미는 2008년 민간 화훼 업자들의 자체 기술로 개발되어 특허를 보유중인 품종이다. 현재, 이러한 고부가가치 장미의 개발로 우리나라의 장미 수출액은 2008년에서 2009년 사이 70%의 증가율을 기록하였고, 현재 김해와 같은 타 지역에 기술을 이전하여 지속적으로 증가 추세에 있다.

최근에는, 발광 소재 및 나노 기술을 활용한 기술들도 보고되고 있다. 2017년에는 MIT의 Michael Strano팀에서 나노 물질을 활용하여 watercress에 일시적 발광 형질을 도입하여 nanobiotic plant라고 명명하였고 관련내용을 논문으로 발표한 바 있다. 직경 10 nm의 실리카 나노 입자에 polymer인 PLGA와 키토산에 luciferase, CoA, luciferin을 동시에 결합시킨 후, 식물의 잎의 기공을 통해 infiltration시킨 후, mesophyll에 유입하여 약 3.5시간동안 발광을 유도한바 있다. 이 연구에 국내 박사인곽성영 박사가 관여하였음에 주목한다. 또한, Khattab은 식물에 strontium aluminate pigment phosphor, europium, dysprosium를 외부에서 공급함으로써, 뿌리가 발광하는 것을 발견하여 역시 학술논문에 관련 기술 개발 내용을 게재하였다 (Journal of molecular structure, 2019, V1176, pp249-253).

현재까지 자체 발광 식물 혹은 화훼작물에 관련된 기술개발은 본 과제와 더불어서 초기에는 기존의 자체 발광 생물의 발광 유전자를 활용한 유전공학적 방법을 활용하는 방법들이 주를 이루었으나, 최근에는 나노소재의 발전으로 화학적인 방법을 통해 일시적으로 자체발광 형질을 유도하는 기술 개발들도 활발히 이루어지고 있다. 두 개의 접근 모두 절화류 화훼시장에 새로운 부가가치를 제공할 수 있다는 측면에서 고무적이라고 판단되며, 관련 기술에 대한 연구개발은 지속적으로 확대될 것으로 예상된다.

3절. 연구개발 범위

1. 학술적 측면

가. 자체 발광의 생물학적, 생화학적 이해

(1) 문헌 검색

본 연구는 생물 발광 중, 해양 세균이 보유한 자체 발광 형질을 활용코자, 'bioluminescence', 'autoluminescence', 'luminescent bacteria', 'autoluminescent plant' 등 다양한 키워드를 활용하여 총론 및 관련 논문들에 대한 다양한 학술적인 정보를 확보하였다. 또한, 자체 발광을 직접적으로 조절하는 발광효소 (luciferase) 및 이들의 단백질학 및 효소학적 특성을 연구한 다양한 논문들을 참고하여, 발광 형질 개선을 위한 단백질 엔지니어링 후보 타겟 및 특성을 선행적으로 연구하고자 하였다. 그리고, 상기 형질을 활용한 식물체의 개발에 관한 선행연구의 유무와 학술적 동향을 Google 및 Pubmed와 같은 검색 엔진을 통해 수시로 학술적, 산업적 동향을 파악하였다.

(2) 발광의 생화학적 메커니즘의 이해

(가) 발광 대사 경로 이해

자체 발광능을 가지고 있는 다양한 해양 세균들과 이들이 공통적으로 지니고 있는 발광 형질에 대한 생화학적 대사 경로 및 관련 조절 인자들에 대해서 이해를 추구하였으며, 관련 정보 및 지식을 토대로, 본 연구에서의 기술 개발 방향 및 대상을 설정하였다.

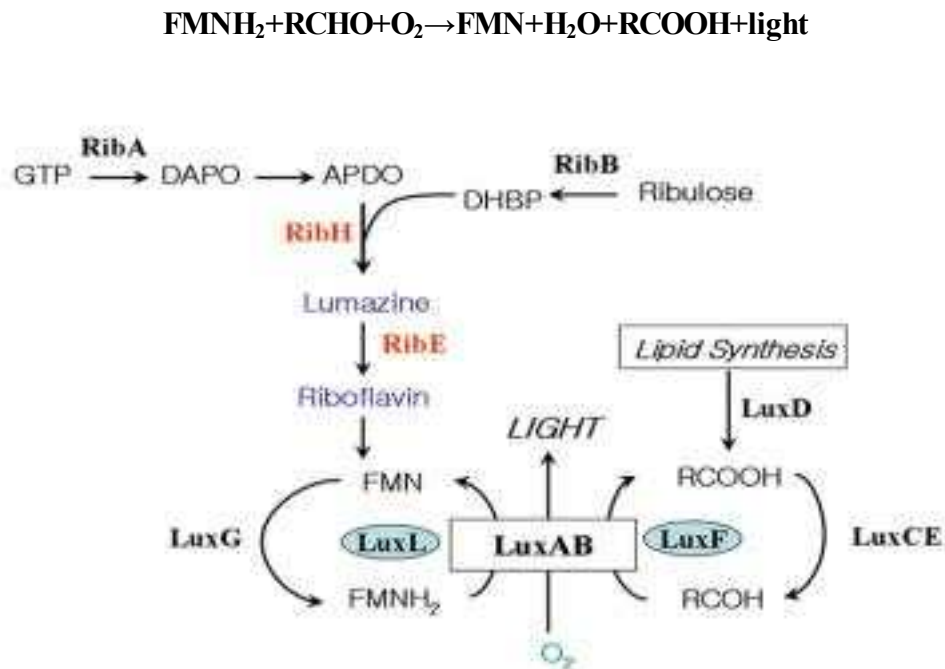


Figure 1. The gene involved in bacterial bioluminescence reaction of Photobacterium species. The functions of the gene products are as follows : luciferase(LuxAB), fatty acid reductase complex(LuxCDE), non-fluorescent flavoprotein(LuxF), flavin reductase(LuxG), lumazine protein(LuxL), GTP cyclohydrolase II (RibA), dihydroxy-butanone 4-phosphate synthase(RibB), lumazine synthase(RibH), and riboflavin synthase(RibE)

(나) 발광 효소 (luciferase)의 활성 조절 인자 특성 연구

세균 발광은 luciferase A와 B의 subunit이 중합체를 이루어서 활성을 나타낸다. 본 연구에서는 발광 효소 반응의 특성을 이해하고, luciferase들의 조효소, 기질 특이성, 및 구성 아미노산 잔기에 대한 구조적, 단백질학적 연구를 병행하여, 발광 세기 증진에 필요

한 단백질 엔지니어링의 기법에 활용하였다.

2. 기술적 측면

가. 발광 세균 및 이들의 유전자원 확보

한국 미생물 보존 센터 및 American type Culture Collection (ATCC)등에서 20종 이상의 발광 세균을 확보하였으며, 이들 중 3종 (*Photobacteria leignonathi*, *P. phosphoreum*, *Vibrio harveyi*)에서 발광 유전자군 (LUX operon)을 클로닝하여, 기술 개발의 재료로서 활용하였다. 또한, 형광단백질인 루마진 단백질을 코딩하는 *lumP* 유전자의 클로닝하고 자체 발광 시스템에 이용하였다.

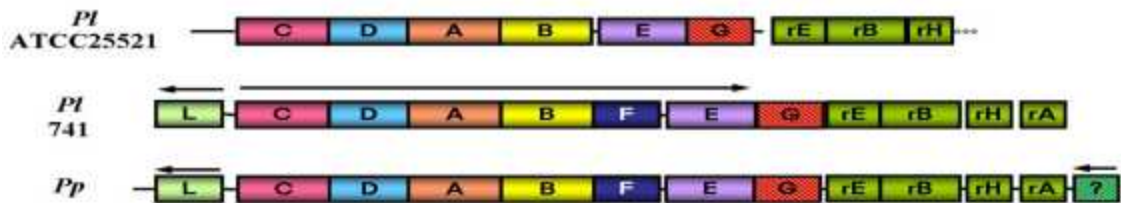


Figure 2. The gene organization of lux operon region in bioluminescence bacteria of *Photobacterium* species.

Photobacterium leignonathi (PI), *Photobacterium phosphoreum* (Pp). Arrow indicates the direction of transcription. The functions of genes are shown in Figure 1.

나. 발광 유전자 발현 시스템 구축 및 형질전환 식물 개발

(1) 대장균내에서의 유전자 발현 및 재조합 단백질 생산

발광 시스템을 이해하고 향후 발광 효율을 개선하기 위하여 각 발광 유전자들이 생산하는 각각의 단백질들을 대량 생산 및 정제한 후, 생화학적인 효율 및 효능을 측정하였다. 단백질에 대한 *in silico* 분석이나 실제 간략한 구조 예측을 통하여, 효율 개선을 위한 대상 아미노산 잔기를 선정하였다.

(2) 식물내에서의 발현 시스템 구축

핵 및 엽록체 형질전환을 통한 발광유전자의 식물 도입을 위해서, 유전자 클로닝, 벡터 확보 및 엔지니어링, 그리고 형질전환 기법 (*Agrobacterium* 활용 기법, 유전자 bombardment 기법)을 최적화하였다. 식물 엽록체 발현 벡터 제작 및 발광 유전자들의 전체 오페론을 담배 엽록체 형질 전환 벡터에 삽입하였다.

(3) 형질전환 대상 식물

화훼작물인 페튜니아를 우선 대상으로 선정하였다. 페튜니아는 담배와 마찬가지로 가지과에 속하며, 엽록체 형질전환 효율이 타 식물에 비해 비교적 높은 편이다. 가지과는 엽록체의 inverted repeated region (IR) 서열 (다수 종에 공통적으로 사용할 수 있는 homologous recombination의 target flanking sequence)에 있어 거의 동일하다. 따라서, 이미 제작된 담배 대상 엽록체 형질전환 벡터를 그대로 이용하여 페튜니아 형질전환을 실시할 수 있었다.

더불어, 모델식물인 애기장대도 형질전환을 시도하였다. 페튜니아의 경우와는 다르게, lux operon의 유전자들을 개별적으로 혹은 융합하여 핵에 도입시킨 후, 유전 교잡을 통해서 전체 Lux operon의 형질을 도입시킬 수 있는 방법을 시도하였다.

(4) 엽록체 형질전환 및 재분화 기술 확립

Biolistic gene bombardment 기법을 이용한 담배 엽록체 조직 내로의 대상 유전자군의 도입하였다. 대상 유전자가 도입된 엽록체를 함유한 잎 절편들에 대한 조직 배양 및 homoplasmic한 성체 재분화 기술을 지속적으로 구축하였다.

(5) 발광 조절 단백질의 엔지니어링

자체 발광 세기 조절에 주요한 luciferase의 아미노산 잔기들을 선정하여, 점 돌연변이를 유발하여 발광 세기를 증진시키고자 했다. 또한, 단백질의 3차원, 4차원적 구조에 영향을 주는 다양한 tag들을 가감함으로써, 단백질의 구조의 엔지니어링을 시도하였다. 덧붙여서, 단백질의 융합을 통해서, 자체 발광 효율성을 개선시키는 실험을 진행하였다.

(다) 자체 발광이 식물 생장에 미치는 생리적 영향 분석

광이 식물의 발달과 생장에 미치는 지대한 영향을 고려한다면, 제작된 형질전환체의 광신호 전달 체계의 변화에 이에 따른 생리적 현상을 분석할 필요가 있다. 자체 발광 형질전환체에 대한 총 전사체 분석을 실시하여, 새로운 발광 형질이 식물에 미치는 영향을 시스템 수준에서 이해하고자 하였다.

3. 산업적 측면

가. 화훼 시장 동향 파악

매년 화훼 특히 절화류 시장에 대한 산업 동향을 지속적으로 파악하고, 시장 수요의 변화 및 신규 형질의 필요성등을 파악하였다. 참여기업이며 협동 과제 수행기관인 (주)로즈피아에서 매년 실시하였고, 구체적으로는 국내외 화훼시장의 변화와 산업규모를 파악하여 발광식물의 사업성을 예측하였다.

나. 형질전환체의 이벤트화 및 안정성 분석

아직 국내 GMO 작물의 등록이 이루어지지 않고 있는 상황을 감안하더라도, 구축된 형질전환 작물 중 우수계통을 선별하여 이벤트화를 추진하고자 한다. 이에 따라, 발광 유전자의 도입 여부, 염기서열 분석등의 제반 연구를 수행하며, 차후에 안정성 평가를 실시할 수 있는 자료들을 수집하였으며 해당 부처에 자문을 구했다.

(1) 엽록체 형질전환작물에서의 도입유전자 안정성분석 방법의 기준 제시

도입 유전자들에 대한 PCR, southern blot 분석, sequencing 등을 이용한 정성분석법을 확립하였다. 또한 형질전환체의 세대진전에 따른 도입유전자의 generational stability을 평가하였다.

(2) 도입유전자 구조분석을 통한 이벤트 적격성 평가

대상 작물의 genome상의 형질전환벡터 및 도입된 T-DNA의 full-sequence의 삽입 위치를 확인하였다. 또한, 형질전환에 의한 신규 ORF 생성 유무 및 독성 또는 알려진 서열의 존재 유무등을 검증하였다.

(3) 도입유전자의 안정적 발현분석 및 목적형질의 평가

형질전환 식물에 삽입된 발광 유전자들에 대한 northern blot, 혹은 RT-PCR을 이용한 목적유전자들의 발현과, 고정 후대 계통의 개체별 또는 개체 내 조직별 도입유전자의 발현등을 분석하였다. 특히, 도입유전자에 의한 내재 유전자의 발현이나 기존 야생형 형질의 변화를 모니터 하였다. 개발된 형질전환체와 비형질전환체 간의 실질적 동등성 분석의 자료로 활용하기 위하여 목적유전자와 관련 가능성이 높은 작물의 주요 대사관련 유전자의 발현 변화를 분석하였다.

나. 대상 작물의 확대

본 연구기간에는 페튜니아와 애기장대의 자체 발광 형질 도입에 집중하지만, 차후에 이미 시장 점유율 및 유통 수요가 높은 장미와 같은 고부가가치 화훼작물에 자체 발광 형질의 도입 가능성을 예측한다. 자체발광 lead event와 기존의 화훼 품종들과의 다양한 교배를 통한 우수한 형질의 품종을 선발로 품종의 다양화와 우수 품종의 확보를 추진한다.

2장 연구수행 내용 및 결과

1절 연구 과제 추진 전략 및 체계

1. 추진방법 및 전략

가. 고효율의 자체 발광 유전자의 확보와 형질 전환 제반 기술의 정립

(1) 선행 연구 결과의 활용 극대화

본 연구팀은 과제 선정 이전에 선행 연구로서, *Photobacterium leigonathi*의 LUX operon을 대장균에 도입하여 자체 발광 대장균을 제작하였다. 또한, 자체 발광 세균이 보유하고 있는 형광유도 단백질인 루마진 단백질에 대한 특성에 관한 연구도 오랜 기간 진행하여 왔다. 특히, 1협동과제는 20여종의 발광 세균의 stock를 보유하고 있으며, 발광 유전자들의 다양한 개별 혹은 재조합 클론들을 구축해 놓았다. 과제 개시와 더불어 선행연구를 통해 확보된 다양한 재료 및 정보들을 본 연구에 활용하여 연구 효율성을 높였다.

(2) 제반 기술의 확립

자체 발광 관상 혹은 화훼작물의 개발은 자체 발광 생물이 지니고 있는 고효율 발광 시스템이 종을 뛰어 넘어 식물체에서도 고도로 재현될 수 있는지에 의해 개발의 성패가 결정난다. 따라서, 다양한 생물 발광 유전자원의 확보와 이를 토대로 고효율 발광 유전자를 선별하는 작업이 선행되어야 한다. 또한, 선별된 발광 유전자들의 발현을 극대화 시킬 수 있는 발현 시스템의 최적화 그리고 실제 식물의 형질전환 기술의 안정적인 구축이 필수적이다. 따라서, 본 과제는 상기 두 분야에 있어서 다양한 유전자원을 확보하고 있는 제 1 협동과제 구성팀과 식물 형질전환 및 재분화에 필요한 제반 시설, 장비, 그리고 기술력을 보유하고 있는 제 1 세부과제의 긴밀한 상호 협력 관계를 유지하고, 이를 토대로 자체 발광 형질전환 식물개발에 필요한 맞춤형 발광 유전자의 선별 및 발현 벡터 시스템을 개발을 추진함으로써 과제 진행의 효율성을 극대화 시키면서 진행하였다.

나. 발광 유전자의 식물 도입 방법

세균의 자체 발광은 기본적으로 *LUX CDABE* 등의 5개의 유전자의 활성이 필요하다. 이는 식물에 발광 형질을 도입하기 위해서는 5개의 유전자를 동시에 발현시킬 수 있는 고도의 형질전환 기법이 필요하다는 얘기이다. 본 연구는 이를 효율적으로 수행하기 위해서, 세균과 유사한 유전자 발현 조절 기작을 가지고 있는 세포 소기관인 엽록체에 *LUX operon*을 일괄적으로 삽입한 후, 개별 유전자들의 발현을 유도하는 방법을 우선적으로 적용하였다. 또한, 이 방법의 대안으로서, 개별유전자들을 각각 혹은 융합시켜 핵의 염색체에 삽입시키는 방법을 병행하였다.

(1) 엽록체 형질전환의 장점

세균의 발광 유전자들은 polycistronic한 형태로 발현이 조절 되는 데, 동일한 전사 시스템이 식물의 엽록체에 존재한다. 따라서, 본 연구는 우선적으로 식물의 엽록체에 발광 유전자를 삽입하는 기술을 우선적으로 도입하였다. 이외에도 엽록체는 모계 유전의 특성을 지니므로, 선택성 표지 유전자 및 대상 유전자들의 환경 방출이 적으며, 지구상에서 가장 강력한 프로모터인 *rubisco promoter*를 함유함으로써 대상 유전자들의 고발현을 구현해낼 수 있는 장점들이 있다.

다. 발광 효율 검증 시스템 활용

본 연구는 엽록체 형질전환을 통해서 발광유전자를 식물에 도입하고, 여러 세대에 걸쳐 식물의 재분화를 통해 homoplasmic 형질전환체를 얻는 과정을 거치기 때문에, 최종 형질전환식물의 발광 효율을 확인하는데는 오랜 기간이 소요된다. 따라서, 형질전환 후, 재분화 과정중에서도 효율적인 발광 형질 획득 여부를 확인하는 것이 중요하다. 이를 위해서, 시험관내에서 세포 추출액을 대상으로 다양한 기기분석 (*luminometer, chemiluminescent detection system*)들을 활용하였다.

라. 대상의 선택과 집중 그리고 대안

(1) 발광 세균의 선택

다양한 발광 세균 후보군에서 어떠한 발광 유전자를 도입할 것인지는 본 연구의 성패

를 결정짓는 요인이다. 본 연구에서는 이미 1협동과제의 선행 연구를 통해서, 우수한 발광 효율을 보이는 *Photobacteria phosphoreum*를 우선적으로 선별하였고, 이들의 발광 기작에 관여하는 유전자들을 선택적으로 클로닝하여 연구에 활용하였다.

(2) 형질전환 대상 작물의 선정

현재 엽록체 형질전환이 안정적으로 이루어지고 있는 식물은 주로 가지과로서 대표적으로 담배가 이에 해당한다. 본 연구에서는 화훼작물을 목표 대상으로 삼고 있기 때문에 담배의 엽록체 형질전환은 수행하지 않았다. 대신, 같은 가지과중에서 화훼작물로서 상품성이 높은 페튜니아를 엽록체 형질 전환 대상으로 선정하였다.

(3) 대안

페튜니아에 발광 유전자를 도입할 수 있는 가장 효과적인 방법은 엽록체 형질전환이다. 그러나, 여전히 낮은 형질전환 효율에 대한 대안 기술이 필요할 수 있다. 따라서, 본 과제에서는 엽록체 형질전환뿐만 아니라 애기장대를 대상으로 35S CaMV와 같은 강력한 외래 프로모터를 이용한 개별 유전자들의 핵 형질전환도 동시에 수행하였다.

마. 개발 기술의 장기적 활용 계획

페튜니아의 형질전환을 통해 자체 발광 식물이 개발되면, 그 후속 연구로서 장미와 같은 실제 시장성이 높은 화훼작물에도 형질전환을 시도함으로써, 산업화 효과를 극대화 할 계획이다. 이미 본 연구에 기존 화훼 식물 생산 업체가 과제에 참여하고 있으며, 자체 발광 화훼 식물의 대량 증식 체계를 구축하였고 유통망 및 마케팅에 대한 인프라를 갖추고 있 및 산업화의 효율화를 추진하고자 한다. 유전적 형질이 개선된 작물이니 만큼, 기존의 GMO 혹은 LMO의 안정성 평가 기준 준수가 산업화 이전의 중요한 선결 조건이다. 따라서, 본 과제는 농촌진흥청의 참여를 통하여 환경 위해성 및 안정성 평가 등의 구체적인 계획을 수립하고 실시함으로써, 실제 산업화에 필요한 신제품들의 다양한 요건들을 달성토록 할 계획이다. 온실 또한 농촌진흥청의 GMO 시험 온실을 활용할 계획이며, 차후 대량 생산을 위한 사업체의 생산 설비 구축도 병행할 계획이다.

2. 추진체계

가. 연구 조직의 전문성 및 우수성

본 연구팀은 과제의 성공적인 수행을 위해서, 관련 분야의 다양한 전문 기관 및 인력으로 구성되는 집단 연구체제를 구축하였다. 총 4개의 세부 및 협동 조직을 두어서 연구 수행에 필요한 전문성을 확보하였다.

(1) 1세부과제

5명의 책임급 연구원 (전임교수 포함)으로 구성되어 있으며, 다년간 식물을 대상으로 생리, 분자 생물, 형질전환 전문가 1명, 단백질 구조학, 효소학 전문가 1명, 식물 세포 생물학 전공 1명등을 주축으로 발광 유전자의 클로닝, 발현 시스템 확립, 페튜니아의 엽록체 형질전환등을 실시하였다.

(2) 1협동과제

다양한 자체 발광 세균의 stock을 보유하고, 이를 토대로 세균의 자체 발광 및 형광 효율 특성 연구 및 활성 증진에 대한 전문 지식 및 학술 성과물을 보유하고 있다. 본 연구에서는 유전자원을 제공하고, 지속적으로 관련 유전자원들의 생화학적 특성 연구와 발광 세기 증진 엔지니어링을 수행하였다.

(3) 2협동과제

화훼작물 특히 장미를 대상으로 국내외에서 시장을 선도하기 있는 영농법인으로서, 본 연구의 산업적인 방향성을 조율하는 역할을 담당하며, 또한 자체 생산 및 재배 시설을 통해서 연구의 성과물에 대한 대량 생산 체계를 갖추고 있다. 본 연구에서는 우선 발광 화훼 작물의 시장성 예측과 관련 산업 동향에 대한 정보를 지속적으로 제공해왔다.

(4) 3협동과제

농산물 및 각종 작물의 유전적 안정성과 GMO 작물에 대한 업무를 총괄하는 국내 연

구 기관으로서, 본 연구에서 도출되는 자체 발광 형질전환 식물에 대한 이벤트 분석, 세대간 유전 분석등을 수행하며 안정성 심사 여부에 대한 자문을 제공하였다.

나. 연구 추진의 유기적 구성

각 세부 및 협동과제들이 각각의 추진 목표를 설정하였고, 상호 유기적인 관계속에서 연구를 수행하였다. 5차년도에 걸쳐서 진행된 본 연구의 효율적인 수행을 위해서, 1협동과제에서 유용한 유전자원을 제공하고, 1 세부에서 식물 형질전환을 위한 발현 시스템 확립 및 실제 형질전환을 실시하였다. 3협동에서도 기관내 연구 역량을 활용하여 애기장대에 발광 유전자를 도입하는 연구를 1세부와 공동으로 수행하였고, 2협동에서는 도출되어진 성과물, 즉 형질전환 페튜니아와 애기장대의 상업적 잠재성 및 시장성에 대한 검토를 실시하였다.

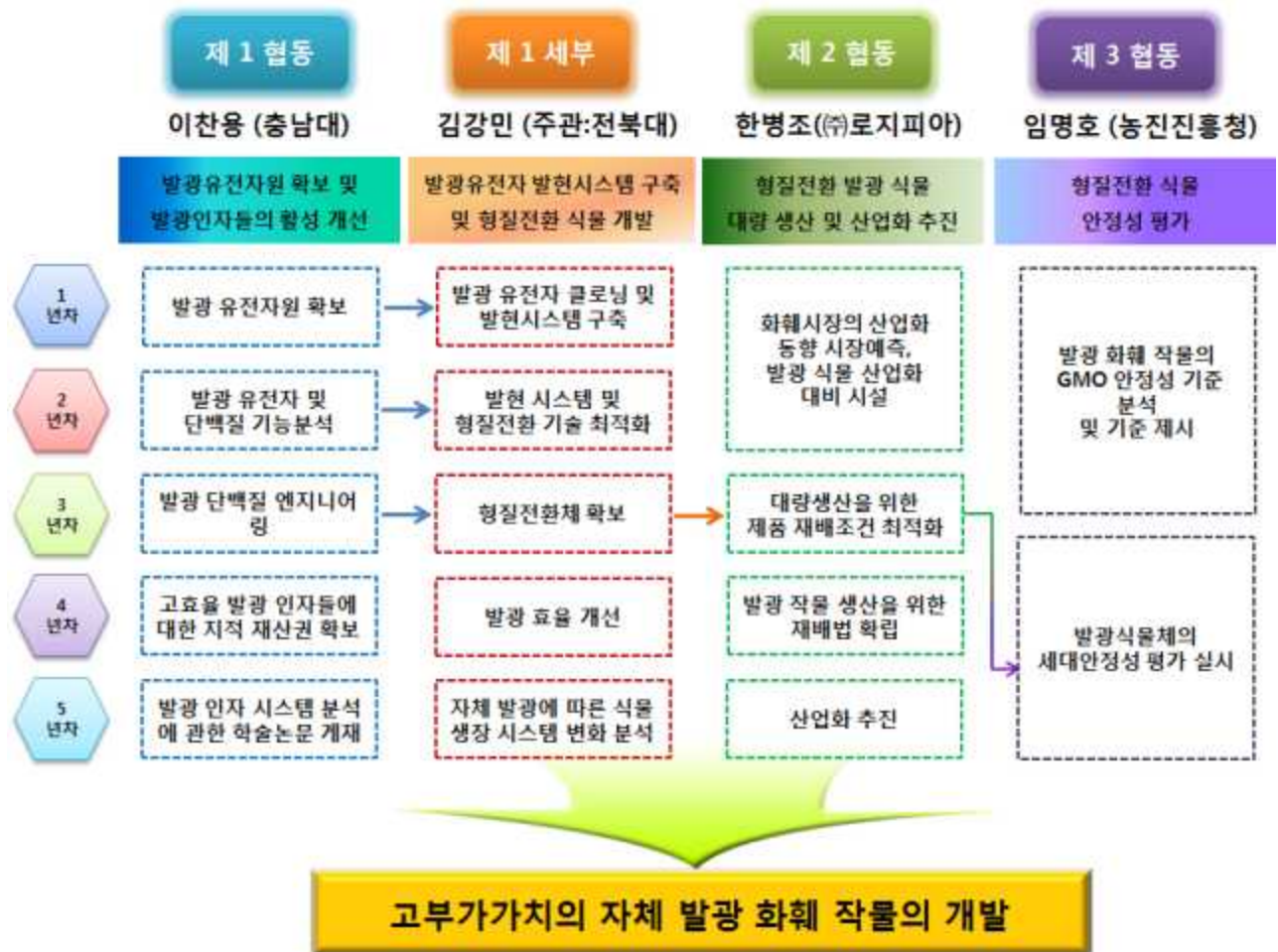


Figure 3. The organization and interactive system of research progress.

2절 연구 수행 내용 및 결과

1. 세균 발광 유전자의 특성 구명

가. *Photobacterium leiognathi*의 lumazine protein 유전자 및 *lux* promoter 영역의 DNA를 포함하는 재조합 플라스미드 제조

(1) 실험 내용

(가) 플라스미드 및 균주 배양

Photobacterium leiognathi (ATCC 25521)의 유전자가 삽입된 PIXba.pT7-3 plasmid와 고초균 (*Bacillus subtilis*)의 riboflavin synthase의 유전자가 포함된 *pRFN4* plasmid를 vector로 사용하였다. 아울러 *P. leiognathi* 741의 lumazine protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 *pPhl36* plasmid로부터 lumazine protein의 전 영역 (whole domain)과 114번의 아미노산 asparagine까지 포함된 아미노 말단 절반 영역 (N-terminal half domain)을 암호화하는 유전자를 삽입한 재조합 플라스미드 PI W-lumP of *pRFN4*와 PI N-lumP of *pRFN4* plasmid도 vector로 사용하였다. *E. coli* XL-1 blue를 cloning 균주로써 사용하였다. 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 blue는 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 Luria Bertani (LB) 배지를 사용하였으며, 37 °C에서 배양되었다.

(나) 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 통한 재조합 플라스미드 제조

PIXba. pT7-3 plasmid를 주형으로 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 DNA를 증폭시켰다. *luxC* promoter 영역의 DNA를 증폭시키기 위해 forward primer (5'-CATGAAAAATGAATTCTAAAAAATCAG-3')와 reverse primer (5'-CTTAATCATGAATTCTCCTTTGGTA-3')가 사용되었으며, 위 primer sequence에서 제한효소(restriction enzyme) *EcoRI*의 site는 밑줄로 표시하였다.

PI *luxC* promoter of *pRFN4* 및 PI *luxC* promoter of PI W-lumP of *pRFN4* 재조합 플라스미드 (recombinant plasmids)를 제조하기 위한 PCR 조건은 pre-denaturation 95 °C 5 min, denaturation 95 °C 20 sec, annealing 50 °C 20 sec, extension 72 °C 30 sec, final extension 72 °C 3 min으로 총 5 단계이며, 이 중 denaturation, annealing, extension 과정을 30 cycles로 반복 수행하였다. PI *luxC* promoter of PI N-lumP of *pRFN4* 재조합 플라스미드를 제조하기 위한 PCR 조건은 pre-denaturation 95 °C 5 min, denaturation 95 °C 20 sec, annealing 46 °C 20 sec, extension 72 °C 30 sec, final extension 72 °C 3 min으로 총 5 단계이며, 이 중 denaturation, annealing, extension 과정을 30 cycles로 반복 수행하였다.

위의 조건대로 각각 PCR을 수행한 후 gel extraction을 통해 정제 (purification)한 뒤, 정제해서 얻은 DNA product와 vector를 제한효소 (restriction enzyme) *EcoRI*로 절단

한다. 그 뒤 T4 ligase를 이용하여 절단된 DNA와 vector를 ligation 시키고, competent cell *E. coli* XL-1에 형질전환시켰다. 이후 colony를 배양하여 소량의 DNA를 추출(extraction)한 후, PCR 및 제한 효소 처리 과정을 통해 확인하였고, 염기서열 분석을 통해 올바른 서열의 DNA가 삽입되어 있는지 확인하였다.

(2) 실험 결과

(가) *Photobacterium leiognathi*의 lumazine protein 유전자 및 *lux* promoter 영역의 DNA를 포함하는 재조합 플라스미드 제조

Photobacterium leiognathi (ATCC 25521)의 유전자가 삽입되어 있는 *plXba.pT7-3* plasmid를 주형(template)으로 하는 primer와 *Taq* polymerase, dNTP 등이 포함된 PCR premix를 통해 증합 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)으로 *luxC* promoter 영역의 DNA를 증폭시켜 PCR 산물(product)을 얻었다. 이를 1% agarose gel에 loading하여 band를 확인한 후, gel purification을 통해 정제하였다. 정제된 DNA와 *pRFN4* plasmid와 *P. leiognathi* (PI 741)의 lumazine protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 *PI W-lumP* of *pRFN4*, *PI N-lumP* of *pRFN4* plasmid 모두 제한효소 *EcoRI*로 절단한 후 T4 ligase를 통해 ligation 했다. Ligation 혼합물(mixture)을 *E. coli* XL-1 blue에 형질전환 시킨 후 colony를 얻었고, 이후 colony를 소량의 Luria Bertani(LB) 배지에 배양한 후, mini prep를 통해 소량의 DNA를 얻었다. 이 DNA를 이용하여 PCR 및 위와 동일한 제한효소로 절단한 후, 1.2% agarose gel에 loading 하였고, *PI luxC* promoter of *pRFN4*, *PI luxC* promoter of *PI W-lumP* of *pRFN4*, *PI luxC* promoter of *PI N-lumP* of *pRFN4* 재조합 플라스미드(recombinant plasmids)들이 각각 약 9.0kbp, 9.5kbp, 9.3kbp의 크기(size)임을 확인하였다. 최종적으로 Bioneer사에 재조합 플라스미드(recombinant plasmids) 염기 서열 분석(sequencing analysis)을 의뢰하여 올바른 염기서열의 DNA가 삽입되어 있는지 확인하였다.

Lumazine protein은 형광성 리간드인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (Lumazine)과 1:1로 결합하는 21 kDa의 monomer이다. 효소 활성이 없는 이 형광 단백질은 해양 발광 박테리아인 *Photobacterium leiognathi*의 발광반응에서 optical transponder의 기능을 한다. 아미노산 서열을 기초로 하여 비교하면, 단백질은 위상학적으로 매우 비슷하게 folding 되어지는 두 개의 domain으로 이루어지나, 그 중 한 domain만이 Lumazine 유도체들과 결합하여 photoemitter의 기능을 갖는 것으로 알려지고 있다. 루마진 단백질의 N-말단 부위 및 전체 루마진 단백질을 코딩하는 유전자와 리보플라빈 생합성 유전자를 활용하여 루마진 단백질을 발현시키고 Lumazine 유도체들을 대량으로 생산하여 이 단백질과 루마진 유도체가 결합함으로써 형광을 띠는 세균을 제공하는 것을 그 목적으로 하였다. 재조합된 플라스미드의 유전자 맵은 Figure 4에 정리하였다.

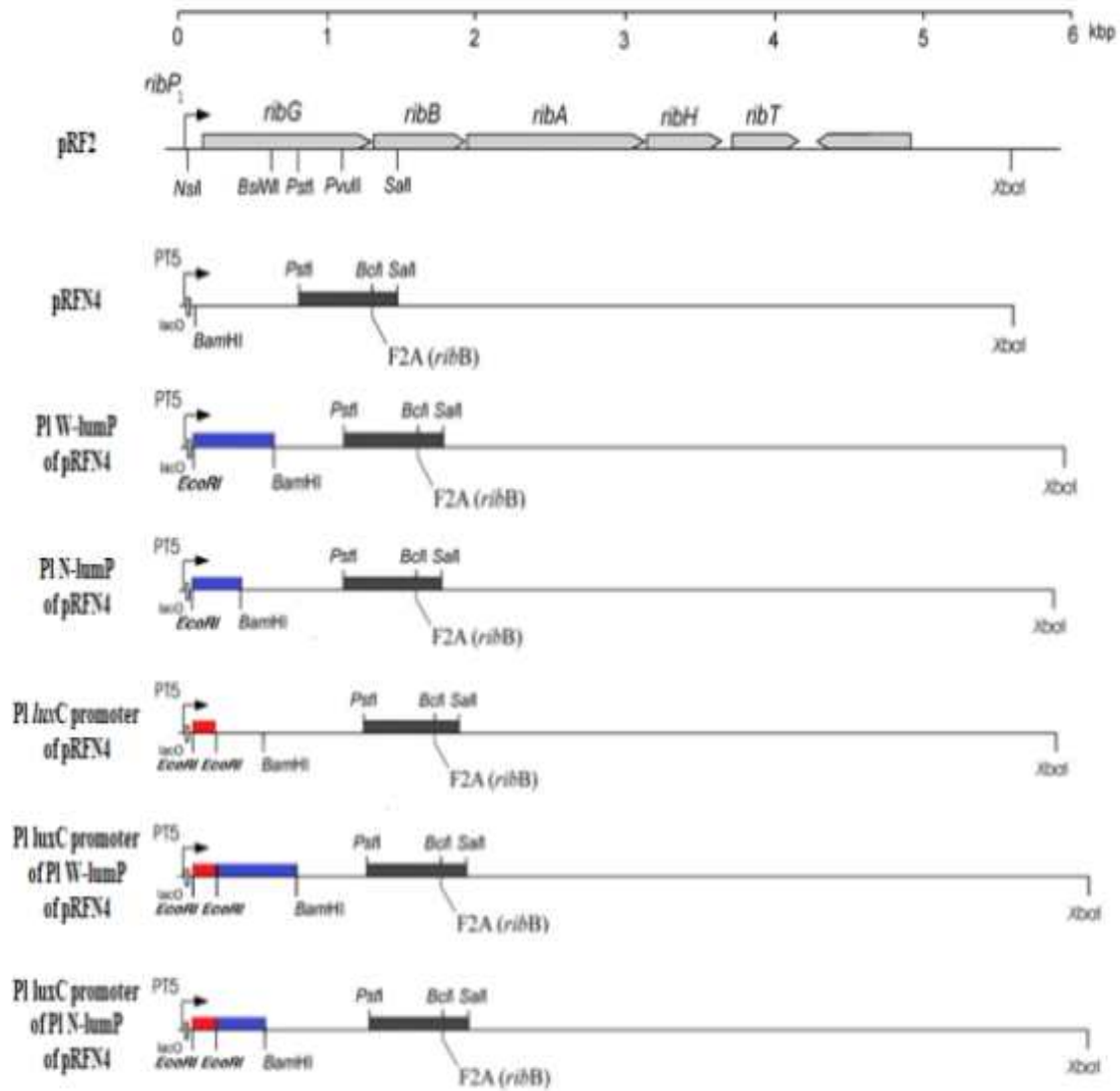


Figure 4. Gene map of recombinant plasmids with inserting *P. leiognathi lux* genes. The lists of recombinant plasmids of pRFN4 using this study ; pRFN4, PI W-lumP of pRFN4, PI N-lumP of pRFN4, PI *luxC* promoter of pRFN4, PI *luxC* promoter of PI W-lumP of pRFN4, PI *luxC* promoter of PI N-lumP of pRFN4 plasmids.

나. *Photobacterium phosphoreum*의 lumazine protein 유전자 및 *lux* promoter 영역의 DNA 를 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 제조

(1) 실험 내용

(가) 플라스미드 및 균주 배양

Photobacterium phosphoreum NCBM 844의 유전자가 삽입된 PpEE.pT7-3 plasmid와 고초균(*Bacillus subtilis*)의 riboflavin synthase의 유전자가 포함된 pRFN4 plasmid를 vector로 사용하였다. 또한 *P. phosphoreum* NCBM 844의 lumazine protein의 115번 아미노산인 glutamic acid까지 포함된 아미노 말단 절반 영역(N-terminal half domain)을 암호화하는 유전자를 삽입한 재조합 플라스미드 Pp N-lumP of pRFN4 plasmid도 vector로 사용하였다. *E. coli* XL-1 blue는 cloning 균주로서 사용하였다. 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 blue는 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였으며, 37 °C에서 배양되었다.

(다) 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 통한 재조합 플라스미드 제조

P. phosphoreum NCBM 844의 유전자가 삽입된 PpEE.pT7-3 plasmid를 주형으로 PCR를 통해 DNA를 증폭시켰다. *luxC* promoter를 암호화하는 유전자를 증폭시키기 위해 forward primer (5'-CTTTA T CATA GAATTCCTTTAAATTCC-3')와 reverse primer (5'- CTTGTT ATTTT AGAATTCCTTATTCTTTC-3')가 사용되었으며, 위 primer sequence에서 제한효소 *EcoRI*의 site는 밑줄로 표시하였다.

Pp *luxC* promoter of pRFN4 및 Pp *luxC* promoter of Pp N-lumP of pRFN4 재조합 플라스미드를 제조하기 위한 PCR 조건은 pre-denaturation 95 °C 5 min, denaturation 95 °C 20 sec, annealing 52 °C 20 sec, extension 72 °C 30 sec, final extension 72 °C 3 min으로 총 5 단계이며, 이 중 denaturation, annealing, extension 과정을 30 cycles로 반복 수행하였다.

위의 조건대로 각각 PCR을 수행한 후 gel extraction을 통해 정제한 후, 정제한 DNA product와 vector를 같은 제한효소(restriction enzyme) *EcoRI*로 절단한다. 그 뒤 T4 ligase를 이용하여 절단된 DNA와 vector를 ligation 시키고, competent cell *E. coli* XL-1에 형질전환시켰다. 이후 colony를 배양하여 소량의 DNA를 추출(extraction)한 후, PCR 및 제한 효소 처리 과정을 통해 확인하였고, Bioneer사에 보내져 염기서열 분석을 통해 올바른 서열의 DNA가 삽입되어 있는지 확인하였다.

(3) 실험결과

(가) *Photobacterium phosphoreum*의 lumazine protein 유전자 및 *lux* promoter 영역의 DNA를 포함하는 재조합 플라스미드 제조

Photobacterium phosphoreum NCBM 844의 *lux* 유전자가 삽입되어 있는 PpEE.pT7-3 plasmid를 주형으로, *luxC* promoter 영역의 DNA를 증폭시키기 위한 primer와 Taq polymerase 등을 함유한 PCR premix를 이용하여 중합 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 하여 PCR 산물(product)를 얻었다. 이를 1 % agarose gel에 loading한 후, gel purification을 통해 정제하였다. 정제하여 얻은 DNA와 pRFN4 plasmid, *P. phosphoreum*(NCBM 844)의 lumazine protein의 아미노 말단 절반 영역(N-terminal half domain)을 암호화하는 유전자가 삽입된 Pp N-lumP of pRFN4

plasmid 모두 제한효소 *EcoRI* 로 절단하였다. 이어 T4 ligase를 통해 ligation을 하였고, ligation 혼합물(mixture)을 *E. coli* XL-1 blue에 형질 전환 시킨 후 colony를 얻었다.

이후 colony를 소량의 Luria Bertani(LB) 배지에 배양한 후, mini prep을 통해 소량의 DNA를 얻었고, 이를 이용해 PCR 및 위와 동일한 제한효소로 절단한 후, 1.2 % agarose gel에 loading하여, Pp *luxC* promoter of pRFN4, Pp *luxC* promoter of Pp N-lumP of pRFN4 재조합 플라스미드(recombinant plasmids)들은 각각 약 9kbp, 9.4kbp 크기(size)를 갖는 것으로 확인하였다. 최종적으로 염기 서열 분석(sequencing analysis)을 의뢰하여 정확한 염기서열의 DNA가 삽입되어 있는지를 확인하였다. 이를 위해 제조한 플라스미드는 다음과 같다. 조합된 플라스미드의 유전자 맵은 Figure 5에 정리하였다.

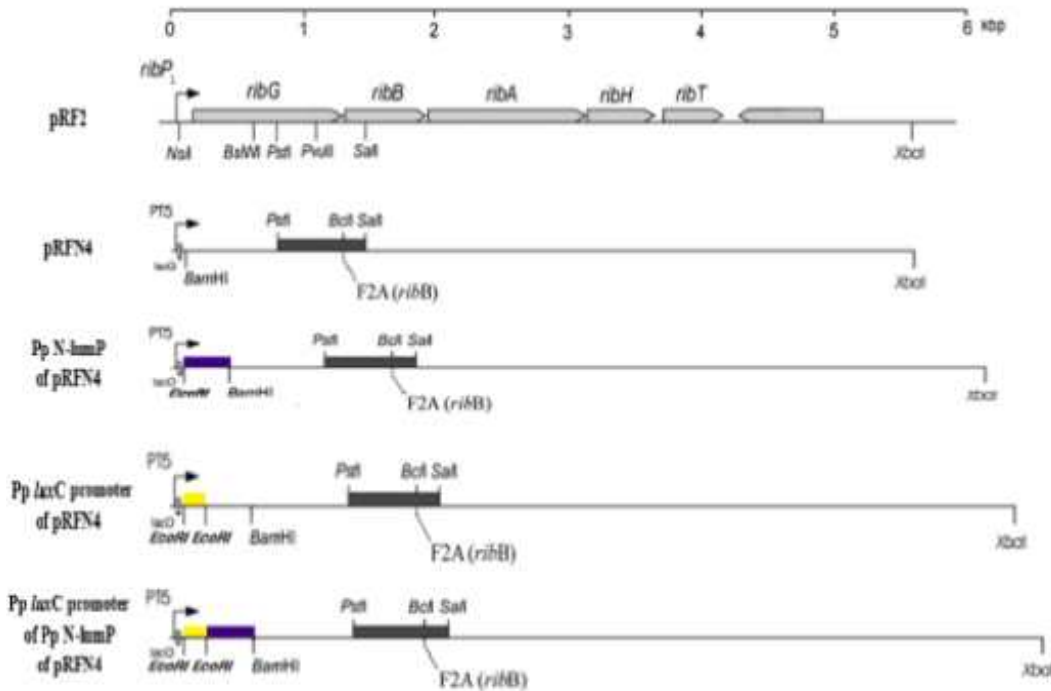


Figure 5. Gene map of recombinant plasmids with inserting *P. phosphoreum lux* genes. The lists of recombinant plasmids of *pRFN4* using this study; *pRFN4*, Pp N-lumP of *pRFN4*, Pp *luxC* promoter of *pRFN4*, Pp *luxC* promoter of Pp N-lumP of *pRFN4* plasmids.

다. 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli*의 형광 측정

(1) 연구 내용 및 방법

(가) 플라스미드 및 균주

pRFN4, Pp N-lumP of *pRFN4*, Pp N-lumP of *pRFN4*, Pp N-lumP of *pRFN4*

plasmids와 앞서 *lux promoter*를 삽입한 재조합 플라스미드를 *E. coli* XL-1 blue와 *E. coli* 43R에 형질전환시킨 후 아래의 조건에서 배양시켰다.

(나) 대장균(*Escherichia coli*)에서의 단백질 발현

형질전환되지 않은 *E. coli* XL-1 blue와 *E. coli* 43R는 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가되지 않은 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였고, 위 플라스미드(plasmids)들이 형질전환된 *E. coli* XL-1 blue와 *E. coli* 43R에는 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였다. 형질전환된 *E. coli* XL-1 blue는 37 °C에서, 형질전환된 *E. coli* 43R은 30 °C에서 각각 배양되었다.

위 조건하에 Luria Bertani(LB) 배지에서 배양된 형질전환되지 않은 *E. coli* XL-1와 *E. coli* 43R 및 형질전환된 *E. coli* XL-1와 *E. coli* 43R을 일정한 부피(A₆₆₀ X Volume = 30ml)로 맞춘 후, 원심분리기(centrifuge, 2500 rpm)를 통해 20분 동안 원심분리하여 세포추출물을 얻었다.

(다) 완충용액 조성 및 이용

원심분리를 통해 얻은 세포추출물을 50mM Tris-HCl (Tris-hydrochloride), 0.5mM DTT(dithiothreitol), 0.5mM EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid)이 포함된 pH 7.2 완충용액(buffer) 25ml로 용해시킨 후, 초음파처리(ultrasonication) 과정과 원심분리(30 sec, 3 times)를 거쳐 상등액만 얻었다.

(라) 형광 분광 분석(Fluorescence spectroscopic analysis)

LS 45 fluorescence spectrometer(PerkinElmer)를 사용하여 자극 파장(excitation wavelength) 410nm와 450nm로 각각 고정하고 위의 상등액에 있는 단백질의 방출 스펙트럼(emission spectra)을 주사(scanning)하였다. 또한 490nm와 530nm에서 방출 파장(emission wavelength)을 고정하여 자극 스펙트럼(excitation spectra)도 주사(scanning)하였다.

(2) 연구 결과

(가) 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli*의 형광 측정

*P. leiognathi*의 *lux gene*이 삽입된 재조합 플라스미드(recombinant plasmid)를 제조할 때, cloning용 competent cell이었던 *E. coli* XL-1 Blue에 플라스미드(plasmid)를 형질전환(transformation)시킨 후, 형질 전환된 대장균을 LB배지에 배양하였다. 배양액을 일정 부피(A₆₆₀X Volume = 30ml)로 맞춘 후, 완충용액으로 안정화(saturation)시킨 후, 초음파처리(ultrasonication)를 통해 상등액만 얻은 후, 형광분광광도계(fluorescence spectrometer)를 통해 형광 세기(fluorescence intensity)를 측정하였다. 형광 발색단

(fluorescence chromophore)인 lumazine ligand의 자극 파장(excitation wavelength) 410nm에 고정하고 방출 스펙트럼(emission spectrum)을 측정한 결과, *P. leiognathi*(PI 741)의 lumazine protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 PI W-lumP of pRFN4 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue의 형광 세기가 pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue의 형광 세기보다 약 1.2~2배정도 증가하였고, pRFN4 plasmid에 *P. leiognathi*(ATCC 25521)의 *luxC* promoter 영역의 DNA가 삽입된 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue의 형광세기는 pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue에 비해 약 1.5~2배 더 증가하였다. 특히, 위 형광 세기보다 *P. leiognathi* (PI 741) lumazine protein 전 영역을 암호화하는 유전자가 삽입된 PI W-lumP of pRFN4 plasmid에 *luxC* promoter 영역의 DNA가 삽입된 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue의 형광 세기가 가장 강했다(Figure 6).

이는 형광 단백질인 lumazine protein이 발색단인 lumazine ligand와 비공유결합으로 결합한다고 알려진 이전 연구를 토대로(Meighen, 1988), 발색단 lumazine ligand를 과량 생산하는 pRFN4 plasmid를 형질전환시킨 *E. coli* XL-1 Blue의 형광 세기에 비해 pRFN4 plasmid에 *P. leiognathi* 741의 lumazine protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 PI W-lumP of pRFN4를 형질전환시킨 *E. coli* XL-1 Blue의 형광세기는 발색단 lumazine ligand와 형광 단백질 lumazine protein의 비공유결합에 의해 형광 세기가 증가한 것으로 보인다. 이에 추가적으로 *P. leiognathi* ATCC 25521의 *luxC* promoter 영역의 DNA를 삽입함으로써 *lux* promoter에 의해 lumazine protein 유전자의 발현양이 증가되어, 발색단인 lumazine ligand와 결합 정도가 증가하였기에 형광세기가 더욱 현저하게 강하게 띄는 것으로 사료된다.

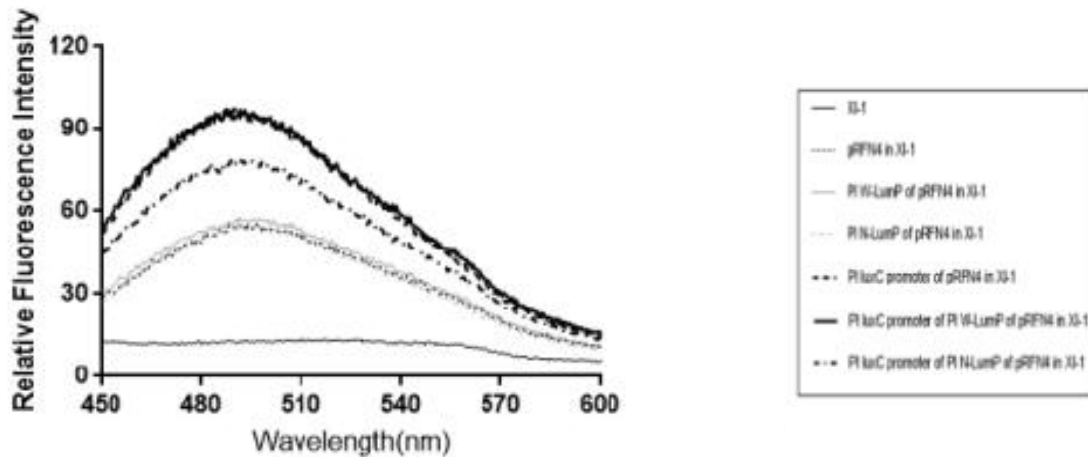


Figure 6. The fluorescence properties of *E. coli* XL-1 Blue transformed with recombinant plasmids from *P. leiognathi lux* gene. A) Emission spectrum by lumazine in fixation at excitation wavelength of 410nm.

발색단인 lumazine ligand 뿐만 아니라 riboflavin도 형광 단백질인 lumazine protein 와 경쟁적으로 결합한다는 이전 연구 결과에 의하여 (Paulus et al, 2014), riboflavin의 자극 파장(excitation wavelength) 450nm에 고정하고 방출 스펙트럼(emission spectrum)을 측정한 결과, lumazine의 방출 스펙트럼 결과와 유의하게 나타났다. *P. leiognathi* ATCC 25521의 *lux* 유전자가 포함된 PIXba.pT7-3 plasmid를 여러 대장균 균주에 형질전환시켰을 때, 빛의 세기를 조사한 이전의 발표 논문에서, 그 중 형질전환된 *E. coli* 43R 균주에서 다른 대장균 균주들에 비해 발광 세기가 1,000배 이상으로 증가하는 것으로 알려져 있다 (Cho et al., 2009). 이를 바탕으로 *E. coli* 43R에 형질전환(transformation)하면 *E. coli* XL-1 균주에서 보다 형광세기가 증가할 것으로 기대하고 형광세기를 측정하였다. 위 실험 파장과 마찬가지로 발색단 lumazine ligand의 자극 파장(excitation wavelength) 410nm에 고정하고 방출 스펙트럼(emission spectrum)을 측정하였고, 추가적으로 위 실험 파장과 반대로 방출 파장(emission wavelength) 490nm에 고정하고 자극 스펙트럼(excitation spectrum)을 측정하였다. 먼저 발색단 lumazine ligand의 자극 파장(excitation wavelength) 410nm에 고정하고 방출 스펙트럼(emission spectrum)을 측정한 결과, *P. leiognathi* (PI 741)의 lumazine protein의 114번의 아미노산 asparagine까지 포함된 아미노 말단 절반 영역(N-terminal half domain)을 암호화하는 유전자가 삽입된 PI N-lumP of pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광세기가 pRFN4 plasmid를 형질전환시킨 *E. coli* 43R의 형광세기보다 약 1.5~2배 높았다. 아울러 위 플라스미드에 *P. leiognathi* ATCC 25521의 *luxC* promoter 영역의 DNA를 삽입한 재조합 플라스미드인 PI *luxC* promoter of PI N-lumP of pRFN4를 형질전환시킨 *E. coli* 43R의 형광 세기는 pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광 세기보다 약 10배 강했으며, 이는 *E. coli* 43R에 형질전환시킨 세포들의 형광 세기 중 가장 강한 것으로 나타났다(Figure 7).

위 실험과 반대로 방출 파장(emission wavelength)을 490nm에 고정하고 자극 스펙트럼(excitation spectrum)을 측정한 결과, 앞서 언급한 결과와 동일하게 *P. leiognathi* ATCC 25521의 *luxC* promoter가 삽입된 재조합 플라스미드인 PI *luxC* promoter of PI N-lumP of pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광 세기가 최대로 증가한 것으로 나타났다. 이는 형광 단백질 lumazine protein 영역들 중 아미노 말단 절반 영역(N-terminal half domain)에 한 분자의 ligand lumazine이 결합한다는 이전 연구에 의해 (Illarionov et al., 2007), *P. leiognathi* ATCC 25521 *lux* promoter를 삽입함으로써 *lux* promoter에 의해 lumazine protein의 아미노 말단 절반 영역(N-terminal half domain)을 암호화하는 유전자의 발현양이 증가하고, 발색단 lumazine ligand와의 결합이 증가하기 때문에 형광 세기가 가장 높은 것으로 사료된다.

다음으로 riboflavin의 자극 파장 (excitation wavelength) 450nm에 고정하고 방출 스펙트럼 (emission spectrum)을 측정한 결과, 이 또한 발색단 lumazine ligand의 자극 파장 410nm에 고정하고 방출 스펙트럼을 측정한 결과와 같이 재조합 플라스미드인 PI *luxC* promoter of PI N-lumP of pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광의 세기가 가장 강했으며, 위 파장과 반대로 방출 파장 (emission wavelength) 530nm을 고정하고 자극 스펙트럼 (excitation spectrum)을 측정한 결과도 위와 같은 결과를 나타냈다.

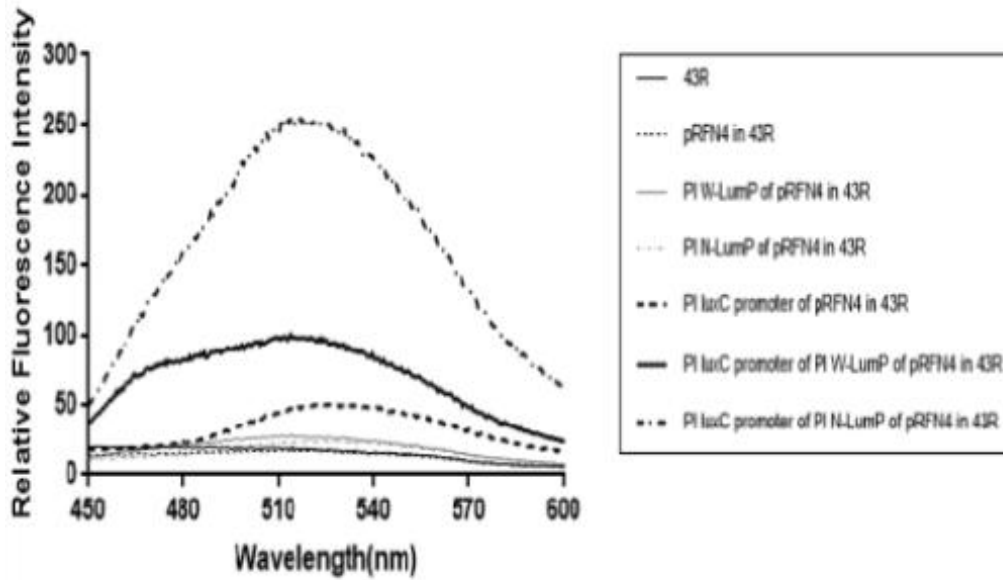


Figure 7. The fluorescence properties of *E. coli* 43R transformed with recombinant plasmids from *P. leiognathi lux* gene by lumazine. A) Emission spectrum in fixation at excitation wavelength of 410nm.

지금까지 측정된 발색단 lumazine ligand의 자극 파장 (excitation wavelength) 410nm에 고정하고 방출 스펙트럼 (emission spectrum)을 평균값으로 나타낸 결과, 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue의 형광세기보다 동일한 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광세기가 약 2~6배까지 점진적으로 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 8). 또한 riboflavin의 방출 스펙트럼을 평균값으로 나타낸 결과에서도 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* XL-1 Blue의 형광세기에 비하여 동일한 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광세기가 약 5~6배 급격하게 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 9).

위 실험 결과대로 *E. coli* XL-1 Blue보다 *E. coli* 43R에 플라스미드가 형질전환되는 경우가 형광 세기가 뛰어나게 증가하였기에, 발광 박테리아 *P. phosphoreum lux* gene이 삽입된 플라스미드는 오로지 대장균 (*Escherichia coli*) 43R에 형질전환하여 형광 세기를 측정하였다. 앞에서 실험했던 파장과 마찬가지로, 발색단 lumazine ligand와 riboflavin만의 고유한 자극 파장 (excitation wavelength)에 파장을 고정하여 방출 스펙트럼 (emission spectrum)을 측정하였고, 위 실험과 반대 파장대로 방출 파장 (emission wavelength)에 고정하여 자극 스펙트럼 (excitation spectrum)을 통해 형광 세기를 측정하였다.

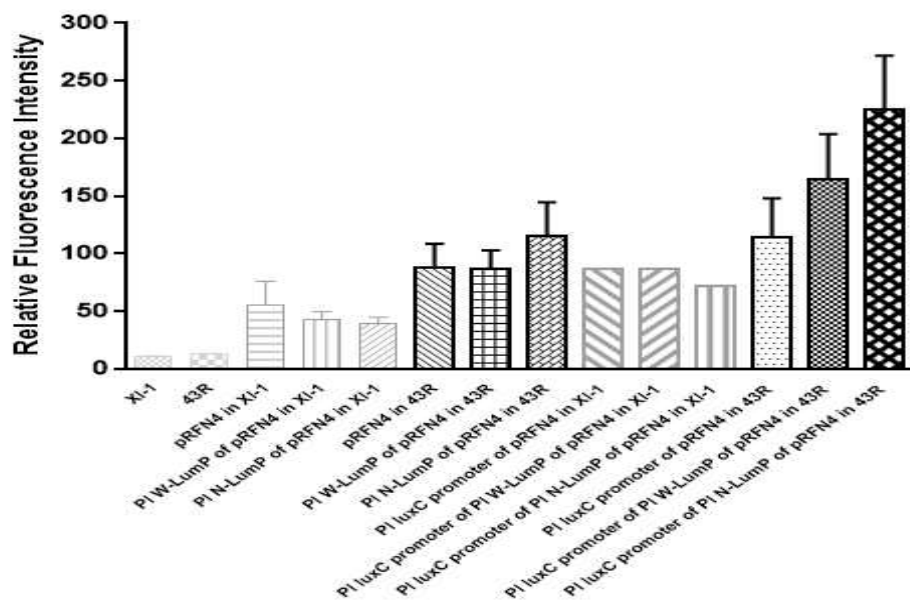


Figure 8. Average emission value by lumazine in fixation at excitation wavelength of 410nm. The x axis of bar graph means relative fluorescence intensity from the *E. coli* transformed with recombinant plasmids from *P. leiognathi lux* gene.



Figure 9. Average emission value by riboflavin in fixation at excitation wavelength of 450nm. The x axis of bar graph means relative fluorescence intensity from the *E. coli* transformed with recombinant plasmids from *P. leiognathi lux* gene.

발색단 lumazine ligand의 자극 파장 410nm을 고정하고 방출 스펙트럼을 측정한 결과와 방출 파장 490nm을 고정하고 자극 스펙트럼을 측정한 결과 모두 *P. phosphoreum* NCMB 844의 lumazine protein의 115번 아미노산인 glutamic acid까지 포함된 아미노 말단 절반 영역(N-terminal half domain)을 암호화하는 유전자를 삽입한 Pp N-lumP of pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R에서의 형광 세기가 pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R에서의 형광 세기보다 증가하였다. 하지만 *P. phosphoreum* NCMB 844 *luxC* promoter DNA가 삽입된 Pp *luxC* promoter of pRFN4, Pp *luxC* promoter of Pp N-lumP of pRFN4 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R에서의 형광 세기는 *P. leiognathi*의 *lux* promoter가 삽입된 재조합 플라스미드를 형질전환시킨 대장균의 형광 세기 측정 실험 결과와 달리, pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광세기보다 강하지만, Pp N-lumP of pRFN4 plasmid가 형질전환된 *E. coli* 43R의 형광 세기보다 현저히 낮은 것으로 나타났다(Figure 10).

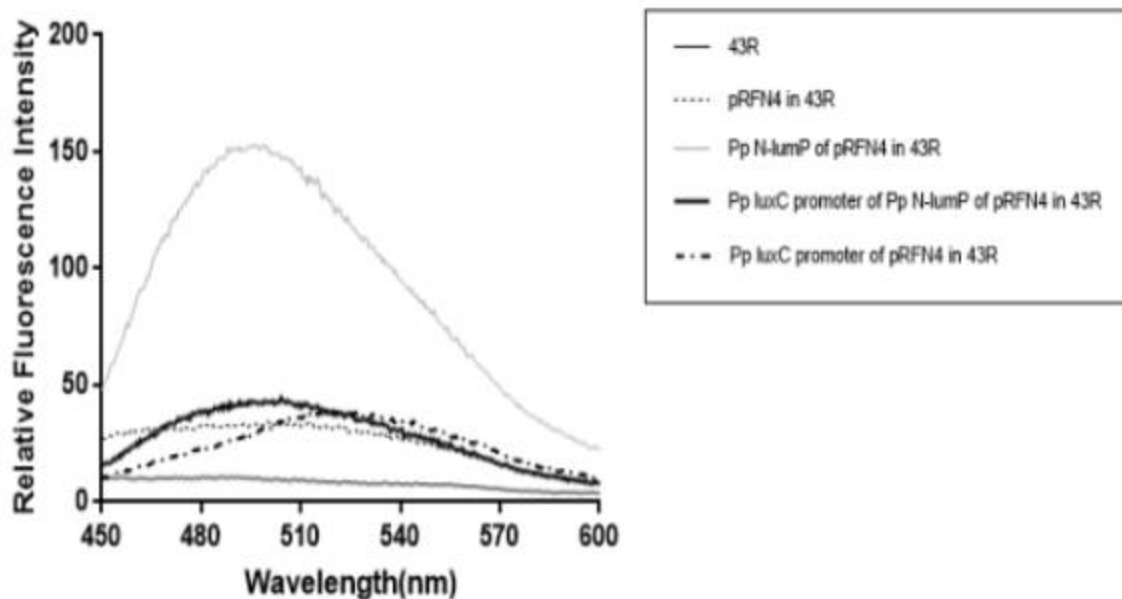


Figure 10. The fluorescence properties of *E. coli* 43R transformed with recombinant plasmids from *P. phosphoreum lux* gene by lumazine. Emission spectrum in fixation at excitation wavelength of 410nm.

(나) Confocal microscopy를 통한 형광 대장균의 관찰

발광 박테리아 *Photobacterium* species *lux* gene이 포함된 플라스미드를 *E. coli* 43R에 형질전환시킨 후, 소량의 Luria Bertani(LB) 배지에 배양하였다. 이 배양액을 poly-L-lysine으로 도말하고 1시간 이상 배양하여 코팅한 슬라이드 글라스(slide glass) 위에 올리고 커버 글라스(cover glass)로 덮어 대장균을 고정시켰다. 이를 고해상도 공초점 현미경(super resolution confocal laser scanning microscope) LSM 880 with Airyscan을 통해 DAPI(excitation 405nm)와 FITC(excitation 458~ 488~514nm)에서 단일 세포(single cell)의 형광 대장균 이미지를 관찰하였다. 플라스미드가 형질전환되지

않은 *E. coli* 43R에서는 형광을 띄지 않았지만, 발색단 lumazine ligand을 과량 생산하는 pRFN4 plasmid를 형질전환시킨 *E. coli* 43R 일부에서 형광을 띄었다(Figure 11). 이는 발색단 lumazine ligand으로 인해 대장균에서 형광을 띄는 것으로 추리된다.

또한 pRFN4 plasmid에 *P. leiognathi*의 형광 단백질 lumazine protein의 전 영역 (W-lumP) 또는 아미노 말단 절반 영역(N-lumP) 유전자가 삽입된 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R에서도 형광을 띄었고, pRFN4 plasmid가 형질전환된 대장균의 형광보다 강하고 다수의 대장균에서 형광을 관찰하였다. 이에 현재 논문에서 제조한 *P. leiognathi luxC* promoter 영역의 DNA가 삽입된 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R에서는 앞서 형광을 띄었던 형질전환된 대장균 *E. coli* 43R의 형광보다 더 진하고 대부분의 대장균에서 단일 세포(single cell)로써 형광을 나타내는 것을 관찰하고 이미지로 나타냈다(Figure 12).

위 이미지(image)를 통해 형광분광광도계(fluorescence spectrometer)로 형광세기를 측정한 결과대로 *P. leiognathi* lumazine protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 플라스미드가 형질전환된 대장균의 형광세기가 강하고, 이에 *lux* promoter를 암호화하는 유전자를 삽입하여 제조한 재조합 플라스미드를 형질전환시킨 대장균의 형광 세기가 두드러지게 강해지는 양상을 단일 세포(single cell)의 대장균에서 확인할 수 있었다.

아울러 *P. phosphoreum*의 lumazine protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R 와 *P. phosphoreum luxC* promoter를 암호화하는 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드가 형질전환된 *E. coli* 43R에서도 형광분광광도계로 측정한 형광세기 결과대로 단일 세포의 대장균에서 형광이 나타나는 양상을 공초점 현미경(confocal microscopy)을 통해 관찰 및 이미지로 나타냈다(Figure 12).

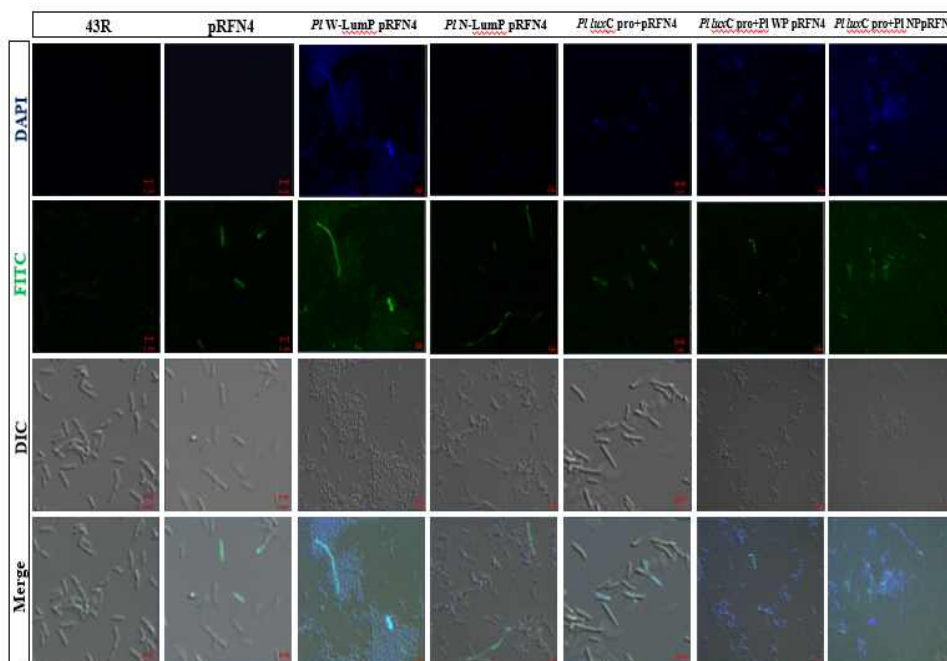


Figure 11. The microscopic images of *E. coli* 43R containing the recombinant plasmids of pRFN4 inserted the *lux* genes from *P. leiognathi*.

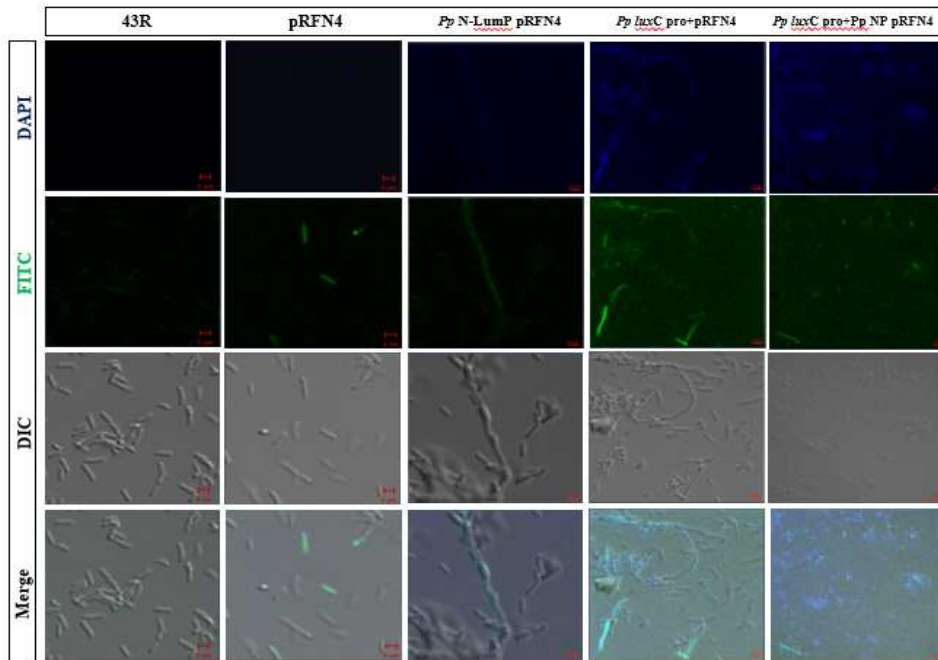


Figure 12. The microscopic images of *E. coli* 43R containing the recombinant plasmids of pRFN4 inserted the *lux* genes from *P. phosphoreum*.

2. 발광 조절 인자의 특성 연구 및 단백질 엔지니어링

가. 세균 유래의 Luciferase A와 B의 특성 연구 및 엔지니어링

(1) *P. leiognathi* Luciferase A와 luciferase B의 생산과 정제

(가) *P. leiognathi* Luciferase A와 luciferase B의 발현 유도과 생산

본 연구에서는 세균의 발광 기작을 조절하는 핵심 인자인 luciferase들의 특성을 단백질 수준에서 연구하고, 이를 토대로 발광 세기 증진을 위한 단백질 엔지니어링을 시도하고자 하였다. 이를 위해서, 우선 두 개의 subunit로 이루어진 luciferase들을 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 생산한 후, 정제코자 하였다. 우선, *P. leiognathi*의 luciferase A와 luciferase B 유전자를 클로닝하여, T7 RNA polymerase의 과발현 시스템과 효율적인 단백질 정제를 위한 his-tag을 함유한 *pET21b* 플라스미드에 각각 삽입하였다. 실제, 삽입유전자들의 과발현을 위해서 IPTG를 첨가하였고, 대장균의 세포 추출액의 수용성 및 비수용성 분획으로 구분하여 luciferase의 생산 유무 및 축적 정도를 분석하였다.

(나) *P. leigonathi* Luciferase A와 luciferase B의 정제

P. leigonathi luciferase A와 B 유전자를 대장균에서 각각 발현 시킨 결과, luciferase B 단백질은 세포 용해 후, 수용성 분획에서 검출되었는데, luciferase A의 경우에는 비수용성인 inclusion body 분획에서 검출되었다. 우선 수용성인 luciferase B의 경우, 니켈-NTA 컬럼을 활용한 his-tag purification 기법을 이용하여, 고도로 정제할 수 있었다.

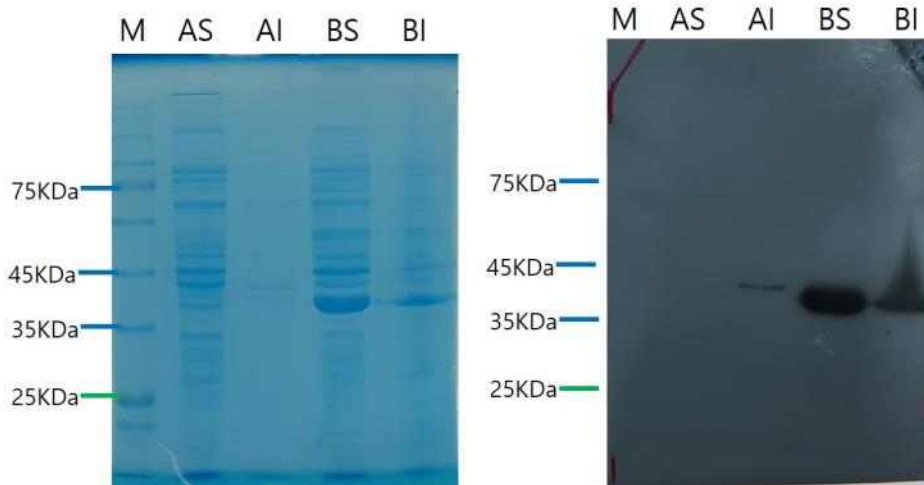


Figure 13. The fractionation of protein extracts of *E. coli* expressing *LUX A* (40kDa) and *LUX B* (35kDa).

Left panel, the comassie brilliant blue staining of protein fractionation; Right panel, the immunoblot analyses of protein fractions detected by anti-his tag antibody. M;Protein marker, AS;LuxA supernatant, AI;LuxA inclusion body, BS;LuxB supernatant, BI;LuxB inclusion body

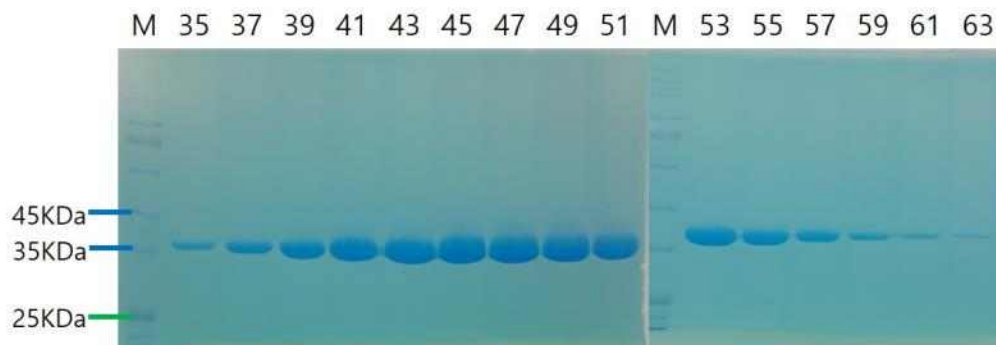


Figure 14. The comassie brilliant blue staining of protein elutes from individual fractionation in his-tag affinity chromatography using FPLC.

비수용성인 luciferase A 단백질의 경우, 4M urea를 첨가하여, unfolding을 유도한 후, 수용성으로 전환시키고, 다시 desalting을 통한 unfolding 유도한 후, his-tag affinity chromatography 방법을 이용하여 정제를 시도하였다. Luciferase B (35 kDa)와 비교하였을 때, 정제도는 낮은 수준이었지만, luciferase A의 분자량 (35 kDa)에 해당하는 수용성 단백질이 enrich되었음을 확인하였다 (#22분획 참조). 하지만, 시험관 조건하에서,

필요 기질 (0.05% decanal)을 첨가한 후, 발광 여부를 luminometer로 확인하였을 때, 대조군의 대장균 대비, 의미있는 발광 수준을 검출할 수 없었다. 이는, luciferase A의 unfolding-refolding 과정에서 효소의 활성을 잃어 버렸을 것으로 추정되었다. 한편, *P. phosphoreum* 유래의 luciferase들도 재조합 발현 및 정제를 시도하였으나, *P. leigonathi*의 luciferase A의 경우도, 비수용성인 것으로 확인되었고, 활성을 유지하고 있는 단백질을 정제할 수 없었다.

(라) 요약

발광 조절 핵심 인자인 luciferase 효소의 특성을 연구하고자, 대장균에서 *P. leigonathi*와 *P. phosphoreum* 유래의 luciferase A와 luciferase B를 과발현시켜 정제한 후, 각각의 단백질들에 대한 특성을 연구하고자 하였다. 친수성인 luciferase B의 경우는 생산 및 정제에 문제가 없었으나, luciferase A의 경우 높은 소수성으로 인해서 효율적인 정제가 어려웠다. 본 실험적 결과를 토대로, A와 B subunit를 각각 정제하는 방법보다, AB complex의 형태로 발현시켜 정제하는 방법을 대안으로서 시도하였다.

(2) *V. harveyi* 유래 luciferase AB 융합단백질의 생산 및 정제

*P. leigonathi*와 *P. phosphorem* 유래의 luciferase A의 재조합 단백질을 대장균에서 정제하는 것은 비 효율적이라고 결론짓고, 이에 대한 대안으로서, 자체 발광 박테리아의 luciferase A와 B를 융합 유전자로서 클로닝한 후, 단일 단백질의 형태로 정제를 시도하였다. 이는, luciferase B의 높은 수용성이 luciferase A의 낮은 수용성을 극복하고 AB 융합 단백질을 수용성 상태로 유지할 수 있을 것 이라는 가설에 기초하였다.

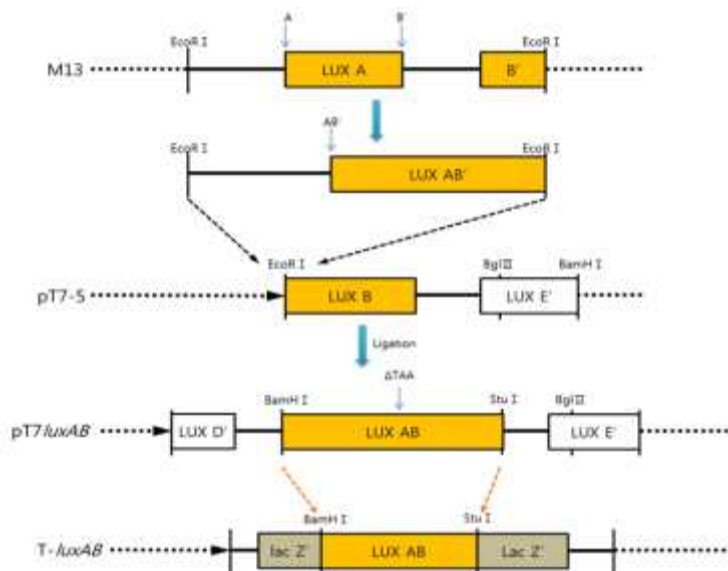


Figure 15. Cloning strategy of *V. harveyi* LUX AB fusion construct

(가) *Vibrio harveyi*의 LUX AB 융합 유전자 클론 확보

충남대학교 이찬용 교수님 연구실에서 *V.harveyi*의 LUX 유전자 중 partial *luxD*와 partial *luxE*를 비롯하여 stop codon이 제거된 *luxA*와 *luxB*가 fusion되어 삽입되어있는 유전자를 확보하였다. 발광에 주 역할을 하는 luciferase alpha, beta subunit인 *luxAB*를 확보하기 위해 특이적 프라이머를 제작하여 중합효소연쇄반응 (PCR)한 후, 증폭된 DNA를 *pGEM-T easy* 벡터에 삽입하고 이를 대장균 43R strain에 도입하였다 (Fig 15).

(나) *Vibrio harveyi* LUX AB 융합단백질의 정제

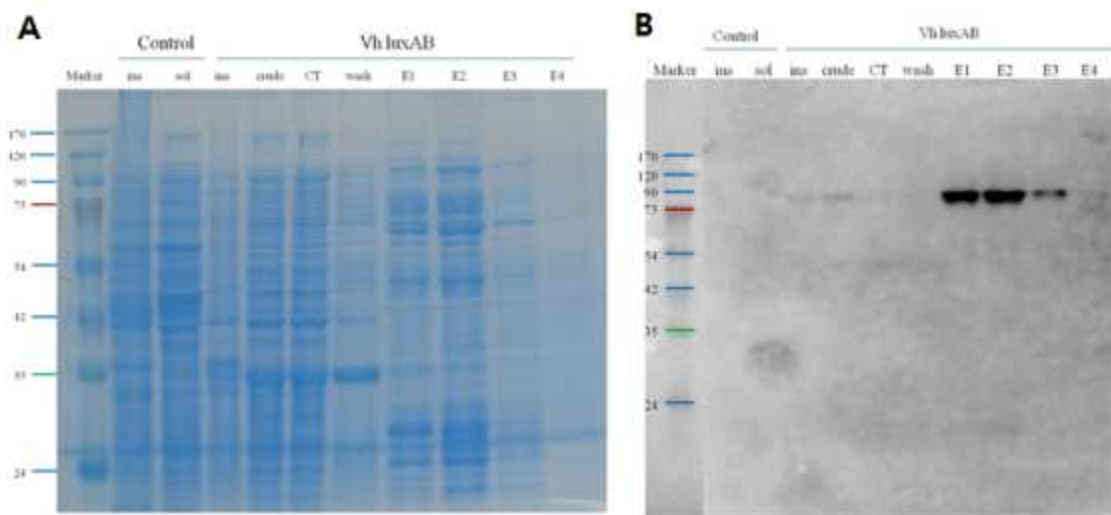


Figure 16. The expression of *pQE31::Vh luxAB* in *E. coli* and purification using His-tag.

A. The purification steps of Vh LuxAB were resolved in SDS-PAGE. B. The western blot detection of his-tagged Vh LuxAB.

16시간 동안 배양한 대장균은 4°C에서 4,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 펠렛을 수거하였고, lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH8.0)를 1 g당 4ml로 첨가하여 펠렛을 현탁하였다. 라이소자임과 sonication을 통해 cell을 파쇄한 후, 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 soluble protein을 얻었고, 이를 Ni-NTA 레진과 결합시켜 affinity chromatography를 실시하였다. Washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH8.0)를 이용해 불필요한 단백질들을 제거한 후, 500 µl elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH8.0)를 4번 로딩하여 각각 E1-E4의 4가지 elute를 얻었다. soluble protein을 얻은 후, 남은 펠렛은 8 M urea를 lysis buffer와 동량 처리하여 펠렛을 현탁한 후, 25°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다 (insoluble protein). 얻은 단백질을 bradford assay를 통해 정량한 후, SDS-PAGE 및 western blot을 실시하였다. 그 결과, 젤 상에서는 *Vh luxAB*의 발현을 구별할 수 없었으나 western blot 결과에서는 80 kDa 부근에서 *Vh luxAB*의 발현을 확인하였다 (Fig. 16).

(다) 요약

V. harveyi 유래의 *luciferase AB* 융합 유전자의 발현 및 정제의 시도를 시도하였다. 그 결과, 비록 정제도는 낮았지만, 친수성 luciferase을 얻을 수 있었다. 따라서, 부분적으로 정제된 *V. harveyi* 유래의 재조합 luciferase AB 융합체를 활용하여, luciferase의 엔지니어링을 실시하였다.

(3) *V. harveyi* 유래의 luciferase 단백질 엔지니어링

(가) *V. harveyi* luciferase 단백질 구조 분석

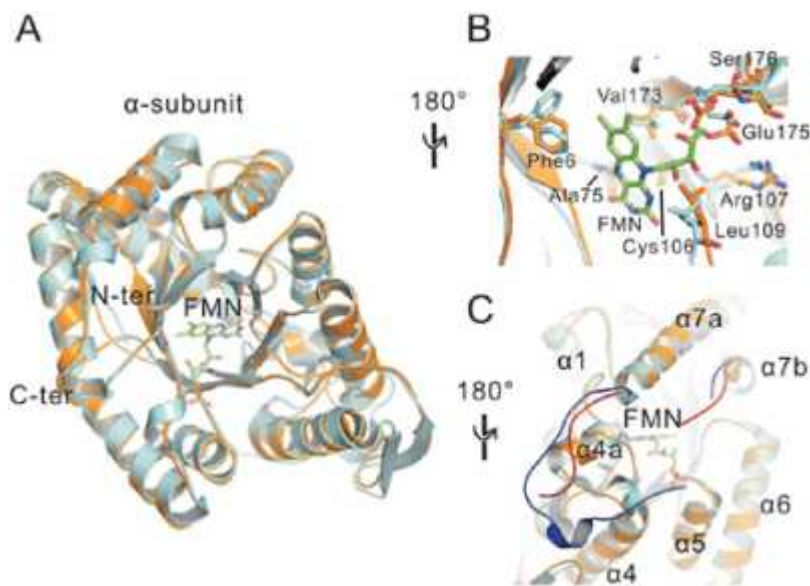


Figure 17. The three dimensional structure of *V. harveyi* luciferase

A, the barrel structure; B, Flavin binding site; C, the mobile loop

(관련 리뷰 논문 게재, Kim et al., 2018)

1995년, 2009년에 PDB에 등록된 *V. harveyi* LUCIFERASE AB dimer의 결정 구조를 토대로, 발광에 관련된 각 구성요소에 대한 중요 아미노산 잔기의 역할을 검토하였으며 (그림 17), 촉매 활성부위, 기질 결합 부위, 그리고 mobile loop으로 불리는 조절 부위등에서 최종적으로 발광세기를 증가 혹은 감소시킬 수 있는 잔기들을 선정하였고, 관련 분석은 저명한 학술지에 게재하였다.

(나) 발광 조절 cysteine 잔기들의 동정 및 이를 활용한 luciferase 엔지니어링

주로, surface charge, polarity, hydrophobicity, subunit interaction에 관련되어 있을 것으로 예상되는 10개의 잔기를 선정함. 이들 잔기들을 대상으로 point mutation을 유도

하였으며, 각각을 우선 *E. coli*에 도입시켜, *V. harveyi lux AB*를 함유한 43R strain과 발광세기를 측정 비교하였음 (Fig. 18). 10개의 잔기들 중, 발광세기를 증대시킨 mutant는 본 실험에서 확인되지는 않았음. 하지만, *luxA*의 243번, 307번 시스테인을 site-directed mutagenesis를 통해 알라닌으로 치환시킨 두 개의 mutant의 경우, 발광세기를 현저히 감소시킴을 알 수 있음 (Fig. 18)

LAS를 통해 측정할 수 없는 *Vh luxAB*의 luminescence 활성의 정량적 실험을 위하여 luminometer를 이용해 실험을 진행하였다. pGEM-T easy 벡터에 도입된 *luxAB*와 두 개의 mutant (C243A, C307A)를 액체배지에서 하룻밤동안 배양한 후, O.D₆₀₀=1.0으로 조정하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 1 ml씩 각각 옮겨 담은 후, 10초간 sonication한 0.05 M decanal 0.5µl 첨가하고 vortexing하여 섞고 luminescence를 측정하였다. decanal 첨가 후 luminometer에 tube를 넣어 측정을 시작하기까지의 시간은 4초를 맞춰 실험하였다. 측정 조건은 integration time 1.0, interval time 10.0, 18 runs로 설정하여 총 188초 동안 측정하였고, negative control로서 물과 43R 균주를 사용하여 비교하였다. *Vh luxAB*는 100초까지 luminescence 활성이 증가한 반면, 두 mutant 모두 활성이 거의 없는 negative control과 비슷한 수준의 값을 보였다. 이를 통해 243번 시스테인과 307번 시스테인이 luciferase 유전자의 luminescence 생성에 있어 주요 역할을 할 것으로 예상되었다 (Fig. 18).

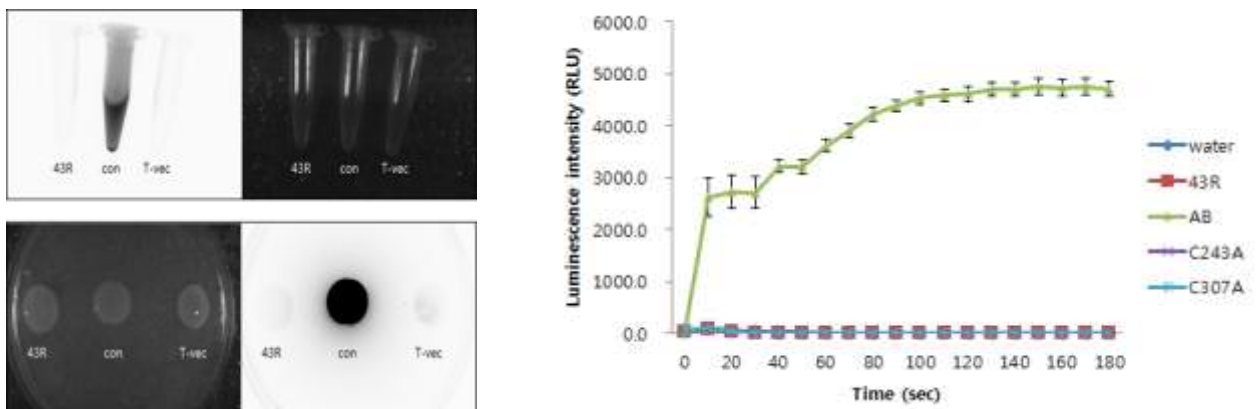


Figure 18, The confirmation of luminescence and development of luciferase activity assay system.

A. The luminescence intensity generated from the *E. coli* cell containing *V. harveyi* luciferase AB (con); 43R, cell without insert; T-vec, *E. coli* containing empty T-vector. B. The luminescence intensity changes according to time elapse among a variety version of luciferase AB mutants.

(다) 요약

V. harveyi 유래의 luciferase A와 B의 구조 분석 데이터를 통해서, 발광 활성 조절에 관여하는 주요 아미노산 잔기들에 대한 정보를 정리하였으며, 활성 세기 조절에 관여할

것으로 예상되는 복수의 아미노산 잔기를 선정하여 점 돌연변이 재조합 단백질을 생산하여 활성을 측정하였다. 대부분의 아미노산 잔기의 돌연변이체에서 발광 세기에 있어서 유의성있는 변화를 관찰하지 못했다. 하지만, 아미노산 잔기 중 243번과 307번 cysteine 잔기를 alanine으로 치환한 돌연변이를 유발하였을 때, luciferase의 활성이 감소되는 것을 확인하였다. 동정된 두 개의 cysteine 잔기의 활성 조절 기작은 본 연구에서는 구명하지 못했지만, 추가적인 연구를 통해 밝혀질 것으로 기대한다.

나. 발광 및 형광 세기의 증대를 위한 small peptide의 도입

(1) Small peptide의 확보의 배경

꼬마 선충 (nematode)의 발달 과정을 연구하는 과정에서, 발달 신호 경로에서 핵심적인 역할을 수행하는 단백질 인자들 간의 혹은 외부 신호 물질들과의 물리적 상호작용에 기인하는 결합력 및 complex 형성에 도움이 될 것으로 예상되는 지는 아미노산 motif들을 모아 27개의 잔기를 가지는 small peptide를 코딩할 수 있도록 엔지니어링 하였다. 합성된 small peptide들을 단백질의 N-이 나 C-terminal에 Tagging 하였을 경우, 단백질간의 상호작용을 보다 용이하게 증진시킬 것으로 예상되고 있다. 한편, 본 연구에서의 주안점은 상기 peptide가 부수적으로 단백질의 3차원 구조를 보다 소수성으로 전화시켜, 형광이나 발광을 증진시킬 수 있는지에 대해 가설을 세우고 검증하였다.

(2) 식물 세포에서의 small peptide의 효과

(가) Small peptide의 첨가 엔지니어링 클로닝 (담배 일시적 발현 시스템)

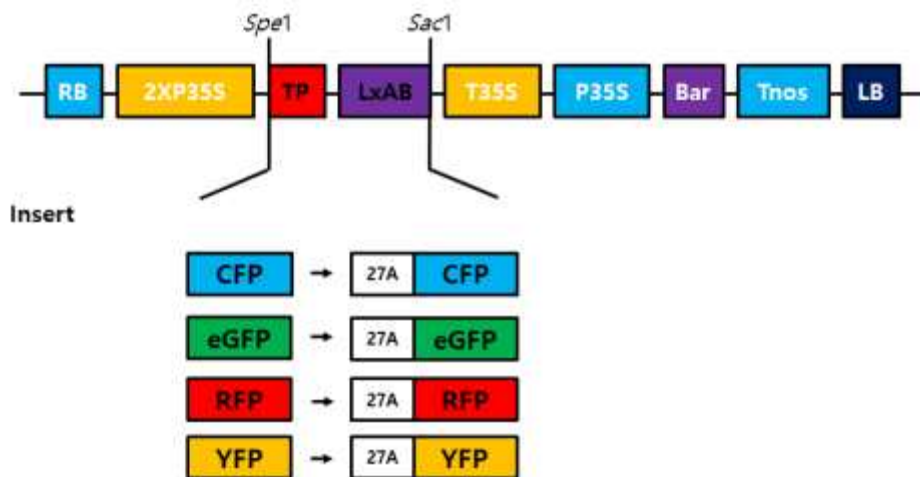


Figure 19. Construction map of pZP-p35TP-LxAB (vector) and insert DNA. It was fail to generate CFP or 27A:CFP expressing vector.

27aa의 small peptide가 형광단백질의 형광세기를 증진시킬 수 있는지를 알아보기 위해서, 담배의 원형질체에 도입하여 형광단백질의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 우

선, pPZP-p35TP-LxAB 식물발현 벡터를 공동연구원으로부터 확보 하여 pBin61-27A:eGFP의 27A:eGFP를 *Spe1* 과 *Sac1*를 포함하여 증폭하여 *Spe1* 과 *Sac1*제한 효소 처리를 하여 pPZP-p35TP-LxAB의 *Spe1* 과 *Sac1*에 삽입하여 pPZP-27A:eGFP를 만들었으며, pPZP-27A:RFP, pPZP-27A:YFP 역시 27aa *Spe1* 과 *Sac1*를 포함하여 Overlap PCR 방법으로 증폭하여 *Spe1* 과 *Sac1*제한 효소 처리를 하여 pPZP-p35TP-LxAB의 *Spe1* 과 *Sac1*에 삽입하여 만들었다 (Figure 19).

(나) Small peptide의 형광 증진 (담배 일시적 발현 시스템)

*Agrobacterium*을 pPZP-27A:eGFP, pPZP-27A:RFP, pPZP-27A:YFP로 형질전환하여 *Nicotiana bethamiana* *Agrobacterium* infiltration 방법을 통하여 발현시켰다 (Figure 19). 형광단백질에 small peptide를 첨가하여 제작한 유전자를 *N. bethamiana*에서 발현시켰을때 형광이 현저히 증가함을 보였다. 또한 pBin-mGFP5ER에 27A를 도입하여 *Nicotiana bethamiana*에 발현시켰을 경우에도 형광이 현저히 증가함을 보였다 (Figure 20).

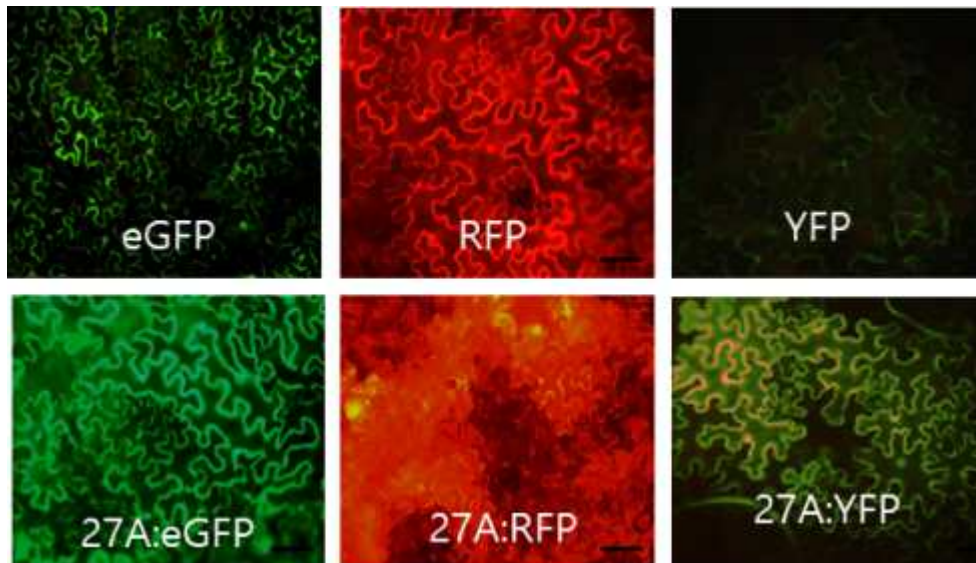


Figure 20. Expression of fluorescent protein in *Nicotiana. bethamiana* leaves.

(3) 대장균내에서의 small peptide의 효과

(가) small peptide가 부착된 eGFP 단백질의 대장균 상태의 형광 증가

27aa small peptide의 형광단백질의 형광 증진 효과를 부가적으로 확인하기 위해서, eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) 단백질의 N-terminal에 small peptide를 포함시켜, in vitro 수준에서 연구를 수행하였다. 이를 위해서, eGFP native form과 eGFP에 27aa를 tagging 한 유전자를 대장균 과발현 유도 벡터인 pET21b에 각각 삽입한 후, 대장균 BL21 (DE3) strain에 도입한 후, 형광을 모니터링 하였다.

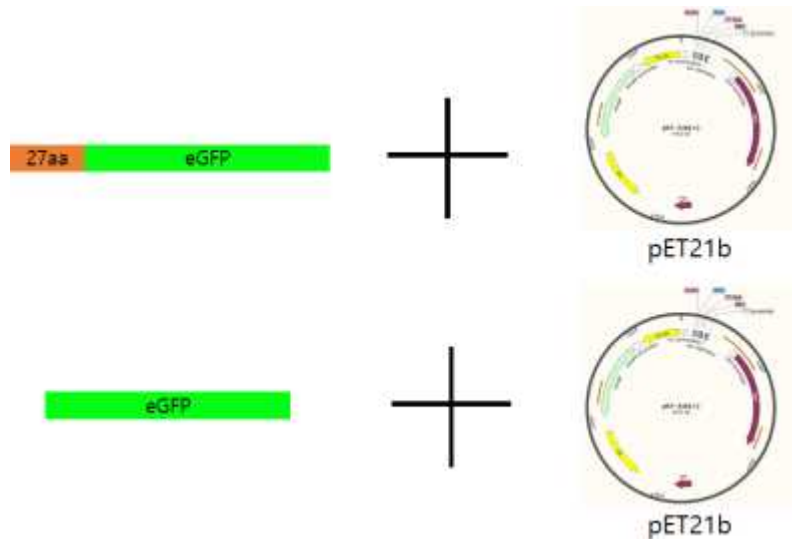


Figure 21. Scheme of cloning for comparison of eGFP and small peptide attached.

IPTG 첨가로 유도되는 과발현 상태가 아닌 상태에서도 27aa가 붙어있는 형광 단백질이 더 형광을 많이 띠는 것을 확인하였다. 다만, pET 계열의 벡터가 DE3 계열의 대장균에서 과발현을 유도하지 않더라도 기본적으로 발현되는 양 또한 과발현 유도시와 마찬가지로 27aa-eGFP의 경우가 더 발현 양이 많은 것으로 보였다.



Figure 22. Check of fluorescence from *E. coli* expression state.

The LB medium contained only ampicillin, and inoculated colonies were not counted. The each sample of optical densities(O.D. 600nm) was 2.0 to 2.2.

1;pET21b in *BL21(DE3)*, 2;pET21b::eGFP in *BL21(DE3)*, 3;pET21b::27a-eGFP in *BL21(DE3)*.

(나) Small peptide tagged 재조합 eGFP 단백질의 3차원적 구조 분석

단독 eGFP 단백질보다 small peptide 융합된 eGFP의 형광 증가 현상을 대장균 안에서 확인 한 결과를 기반으로 분자적 차이점을 확인하기 위하여 단백질의 3차원적 구조가 필요하여 X-ray crystallography 방법을 통해 분석하였다. Small peptide 융합된 eGFP 단백질의 3차원적 구조 규명을 하기 위한 방법으로 확보된 유전자를 cloning 하여 단백

질 발현을 하였고, 발현된 단백질을 정제하여 결정화를 시도하였다.

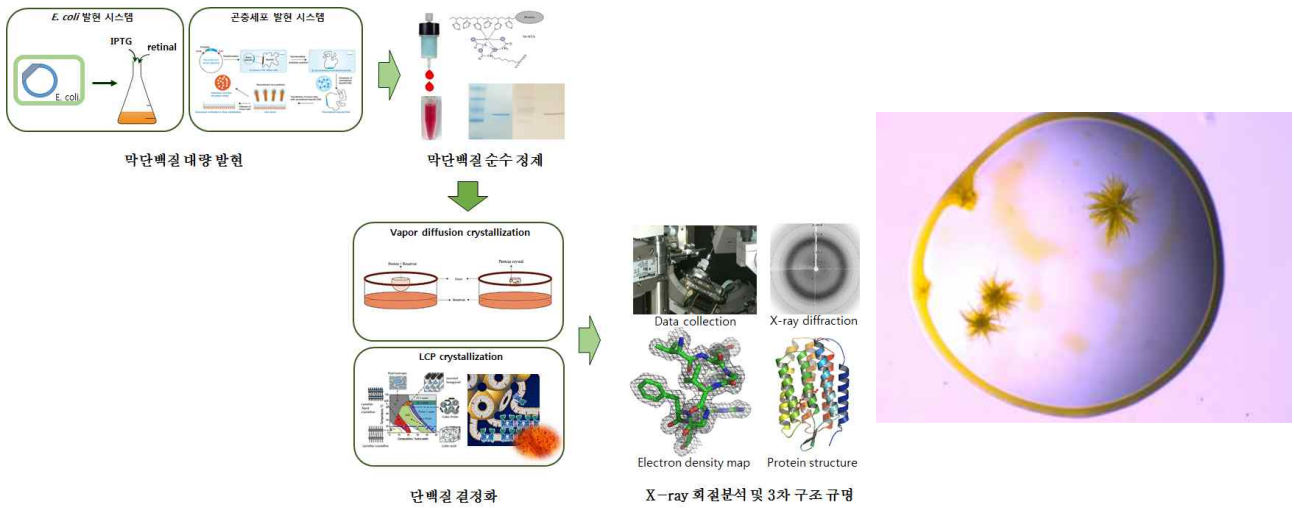


Figure 23. Small peptide 융합된 eGFP 단백질 구조 규명의 전체적인 모식도 및 small peptide 융합된 eGFP 단백질의 결정화

3차원적 구조를 밝히기 위해 포항가속기의 X-ray 빔을 이용하여 small peptide 융합된 eGFP 단백질의 결정의 회절 이미지 및 구조 분석을 위한 data collection을 진행하였다. 그 결과 3.4 Å 분해능을 얻어내었으나 보다 정밀한 구조 분석을 위해 3.0 Å 분해능 이하의 고 해상도의 회절 data가 필요한 상황이다.

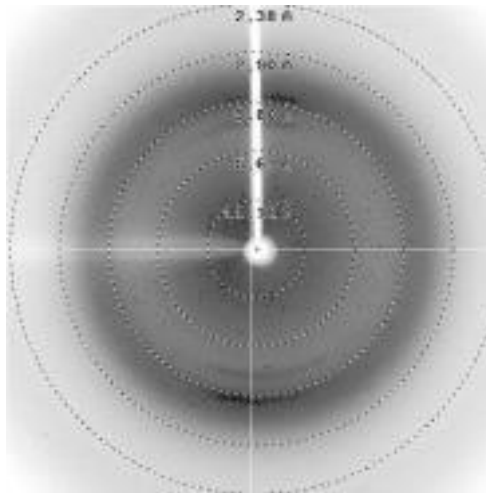


Figure 24. Small peptide 융합된 eGFP 단백질 결정의 3.4 Å 분해능에서의 회절 이미지

Table 1. Preliminary X-ray data for 27aa-eGFP fusion protein crystal

Crystal	27aa-eGFP fusion protein ^a
Space group	C2
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	<i>a</i> = 134.51 Å, <i>b</i> = 80.93 Å, <i>c</i> = 92.81 Å
α, β, γ (°)	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta = 122.23$
Resolution (Å)	45.63 – 3.57 (3.57 – 3.39) ^b
R_{merge}^c	0.037 (0.176)
$I / \sigma I$	28.2 (6.5)
Completeness (%)	98.8 (92.8)
Redundancy	6.9 (4.7)

^aOne crystal was used.

^bValues in parantheses are for the highest-resolution shell.

^c $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_j | I_{hkl}(j) - \langle I_{hkl} \rangle | / \sum_{hkl} \sum_j I_{hkl}(j)$

where $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity and $I_{hkl}(j)$ are individual intensity measurements of the reflection (hkl).

여하튼, 얻어진 회절 분석 data를 토대로 small peptide 융합된 eGFP 단백질의 결정구조 규명을 위한 refinement 과정에서 얻어진 model 및 전자 밀도 맵을 도출하였다.

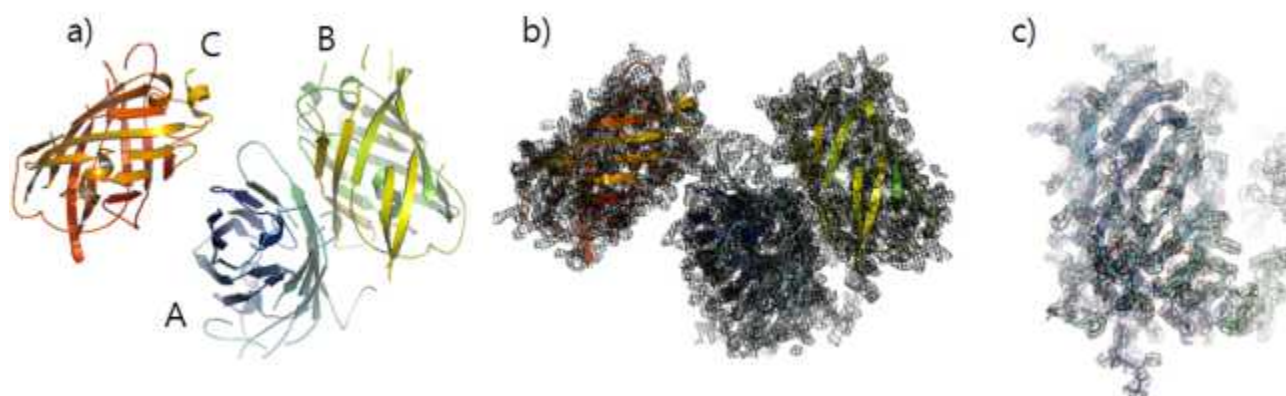


Figure 25. Refinement 과정에서 얻어진 모델과 전자 밀도 맵

(다) 27aa 펩타이드의 mCherry의 형광 증대성

27aa을 eGFP에 부착시킨 방법과 마찬가지로, mCherry 형광 단백질에도 small peptide

를 tagging하여 대장균내에서 생산한 후, 정제하였다.



Figure 26. The partial map of plasmid *pET21b::28aa-mCherry*

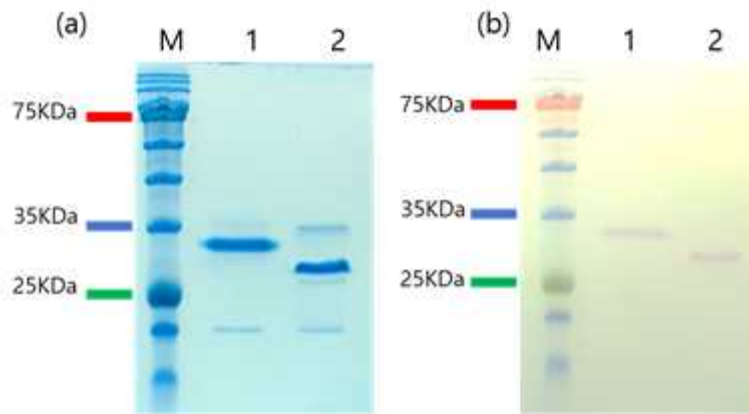


Figure 27. mCherry 단백질과 28aa-mCherry 단백질의 SDS PAGE와 Western blot 결과입니다. (anti-His) (a) SDS PAGE , (b) Western blot 결과

형광단백질 mCherry native form과 27aa-mCherry form을 각각 정제한 후, 분석기기를 활용하여 상대적 형광강도 (Fluorescence intensity)와 광냉강도 (Photoluminescence)를 각각 측정하였다.

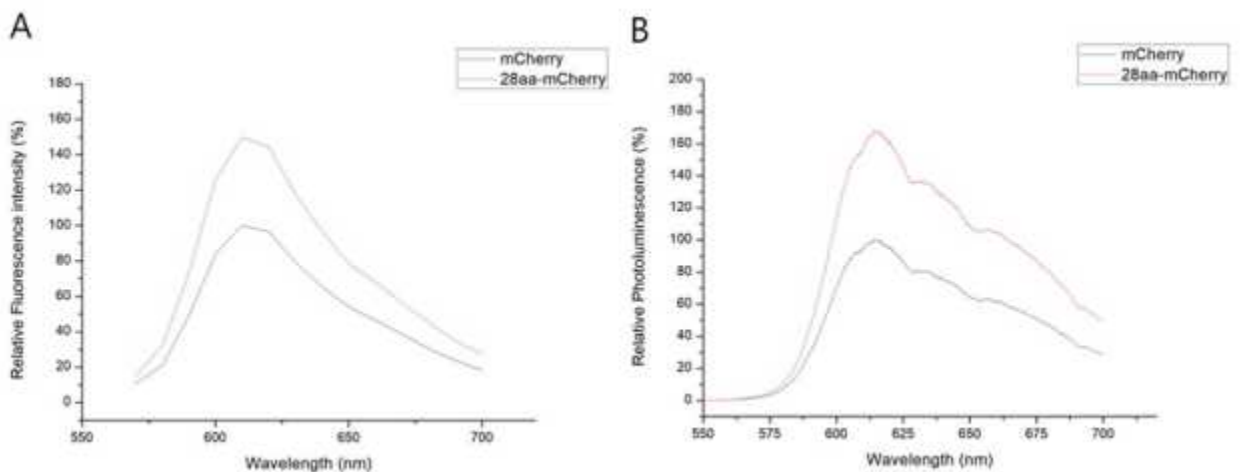


Figure 28. The relative fluorescence and photoluminescence of mCherry tagged with 27aa small peptide

측정 결과 28aa-mCherry의 형광강도는 약 150% 증가하였으며 광냉강도는 약 170% 증가하였다. 선충에서 유래한 27개의 아미노산이 mCherry 형광단백질의 형광강도와 광

냉장도를 증대하여 더욱 선명한 가시적 데이터 수집에 도움을 줄 것으로 보였다.

(4) 요약

대부분의 발광 세균들을 자체 발광 시스템을 갖추고 있지만, 부수적으로 형광 단백질을 동시에 함유하고 있어서, 외부에 보다 강한 빛을 생산한다. 본 연구는 발광과 유사한 형광에 관여하는 fluorophore 단백질들의 형광 활성을 증진시키고자, 27aa로 이루어진 small peptide를 다양한 형광 단백질에 tagging한 후, 식물과 대장균의 세포 시스템에서 활성 증진 여부를 조사하였다. 우선, 담배의 일시적 발현 시스템에서 27aa가 GFP, RFP, YFP등의 형광 활성을 증진시키는 결과를 얻었다. 그리고, 27aa가 부착된 재조합 형광 단백질들을 대장균에서 생산, 정제한 후, 시험관내에서 형광 활성을 측정하였을 경우도, 유사한 형광 증진 효과를 보이는 것으로 관찰되었다. 해당 효과에 대한 보다 정밀한 기작 분석을 위해서, 27aa가 부착된 형광단백질의 X-ray 회절 분석을 통한 단백질 구조의 변화를 구명하고자 하였으나, 낮은 회절 분석 data의 해상도로 인해서 정밀한 해석이 이루어지지 못했다. 차후 지속적 실험을 통해서 27aa의 형광 활성 증진에 대한 역할이 구명되리라 기대한다.

다. *LUX F*의 발현을 통한 발광 세기 증진

(1) 배경

다양한 발광 세균에서 luciferase A와 B가 조절하는 생화학적 반응은 다양한 부산물을 효소 촉매 반응의 저해제로서 생산하게 된다. 특히, 촉매 활성 부위에 결합한 부산물들은 효소 활성을 저해하여 외부에 방출되는 빛의 세기에 영향을 미치게 된다. 한편, *LUX F*는 luciferase B와 유사한 아미노산 조성과 3차원적 구조를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 위에서 언급한 효소 반응의 부산물들을 결합 혹은 제거하는 것으로 예상되고 있다. 본 연구는 luciferase A와 B에 *LUX F*를 동시에 발현시킨다면, 보다 개선된 발광을 유도할 수 있다는 가설을 세우고 연구를 수행하였다.

(2) 발광 세기 증진을 위한 *LUX F*의 기능 분석 및 엔지니어링

위에 제시된 가설을 토대로, 본 연구팀은 기존의 *V. harveyi*의 *LUX AB* 융합 유전자에 *P. leigonathi LUX F* 유전자의 발현을 동시에 구현하고자 하였다. 우선, *LUX AB*와 *LUX F*에 대해 각각의 유전자의 발현을 개별적으로 조절할 수 있도록, 두 개의 독립적인 유전자 발현 유도 시스템을 도입하였음 (Fig. 29). *LUX F*의 발현을 arabinose를 첨가하여 유도시켜주었을 때, 기존의 *LUX AB* 융합 유전자가 도출하는 발광 세기가 약 5배 이상 증가되고 있음을 확인함. 상기의 효과를 보다 극대화 시키기 위해서, *LUX F*와 *LUX AB*이 발현을 유도시킨 *E. coli*의 세포 현탁액의 pellet를 모아서, OD₆₀₀이 1.5이상 되도록 resuspension 시킨 후, E-tube에 luciferase assay buffer를 가한 후, 기질인 decanal을 5%가 되도록 외부에서 첨가시켜주었을 때, Figure 30의 c번



Figure 29. Expression system for *V. harveyi* LUX AB and *P. leigonathi* LUX F in *E. coli* and the increase in bioluminescence when LUX F was incorporated.

과 같이 육안으로 확인하였을 경우, 눈부실 정도의 자체 발광 효과를 보이는 것을 확인함. 이는 기존의 형질전환 식물에 LUX F 유전자를 부가적으로 발현시켜 주었을 때, 현격한 발광의 세기 증진을 유도할 수 있는 획기적인 결과라고 사료되었다.



Figure 30. The luminescence driven from LUX AB and LUX F in *E. coli* cells.

(3) 발광 세기가 증대된 *E. coli*의 식물 처리 실험

LUX AB와 LUX F를 동시에 발현시키는 *E. coli*를 뿌리를 잘라낸 애기장대에 처리하여, 조직내 흡수를 유도한 결과, 미약한 수준이지만, 발광을 유도함을 관찰할 수 있었으며, LUX F와 LUX AB가 동시에 발현하는 *E. coli*를 처리한 경우, LUX AB만 처리한 *E. coli*에 비해서 발광을 증진시킴을 확인할 수 있었음.

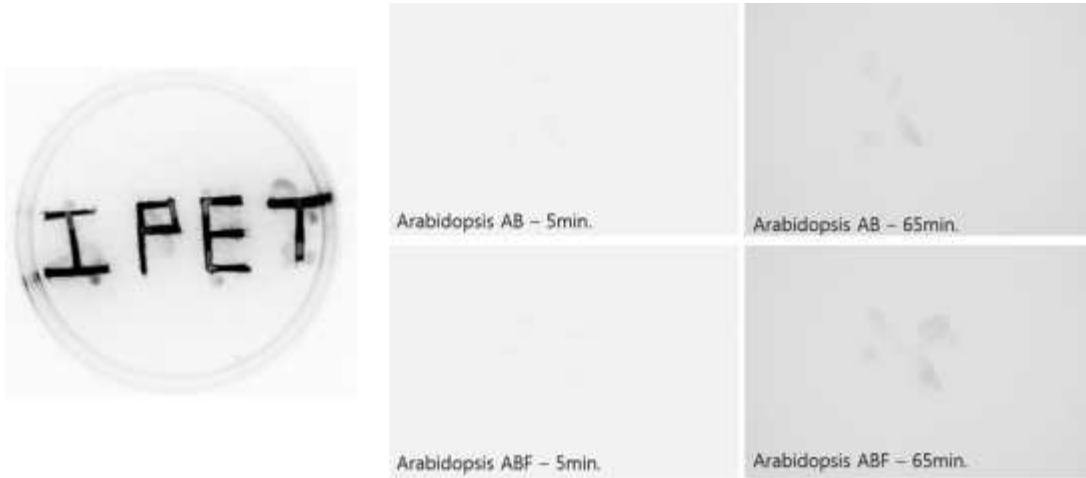


Figure 31. The bioluminescence of *E. coli* expressing *LUX AB* and *LUX F* simultaneously and the effects of such *E. coli* into the increase luminescence of *Arabidopsis*.

3. 자체 발광 폐튜니아의 형질전환체 제작

가. 발광 유전자의 확보 및 발현 시스템 확립

(1) *Photobacteria phosphoreum*의 *LUX* operon 및 *Lumazine* 유전자 클론 확보

제 1협동 충남대학교 이찬용 교수 연구실에서 신규 발광 세균인 *P. phosphoreum*의 *LUX* operon 유전자들을 확보하였다. 우선 이찬용 교수님 연구실에서 진행한 실험에서 *P. phosphoreum*의 전체 operon을 발현하는 대장균을 제작하였다. 암 조건하에서 *LUX* operon이 삽입된 대장균에서 밝게 발광하는 것을 확인하였고, 이의 발광 형질을 토대로 본 연구에서 *P. phosphoreum*의 발광 유전자를 활용하도록 선정하였다. 선행연구에서 이미 제작한 *P. leigonathi*의 발광 형질과 비교하였을 때, *P. phosphorem*의 발광 세기 및 파장이 높고 자연계에 존재하는 발광 세균의 형질과 유사함을 확인하였다.



Figure 32. The luminescence of *E. coli* expressing *Photobacterium phosphoreum* *LUX* genes.

확보된 *P. phosphoreum*의 LUX operon에는 *LUX L* (루마진 단백질), *LUX C* (acyl-CoA dehydrogenase), *LUX D* (acyl transferase), *LUX A* (luciferase A), *LUX B* (luciferase B), *LUX E* (long-chain fatty acid ligase), *LUX F* (non-fluorescent flavoprotein, NFP), *LUX G* (oxidoreductase) 등이 차례대로 배열되어 있다. 그 외에도 riboflavin protein I, II, III, IV가 뒤를 이어 위치한다. 본 연구에서 확보한 유전클론은 *LUX L, LUX C, LUX D, LUX A*가 함유된 플라스미드 *pPEE.pT7-5*와 *LUX CDABFEG*와 riboflavin 유전자 전체가 포함된 *pPSB.pT7-4*의 클론이다. 전체 Lux operon을 polycistronic하게 클로닝하기 위하여 *Lux C, D, A*의 유전자를 *ppEE.pT7-5* 플라스미드에서 그리고 *Lux A, B, F, E, G*를 클로닝하기 위하여 *ppSB.pT7-4*에서 각각 특이적인 primer들을 이용하여 두 개의 PCR amplicon을 생성하였다. *pPEE.pT7-5*의 경우, *EcoRI*을 활용하여 LUX CDA의 절편을 얻었고, *pPSB.pT7-4*를 *EcoRI/NcoI*의 제한효소들을 사용하여, LUX ABFEG의 유전자를 분리하였다.

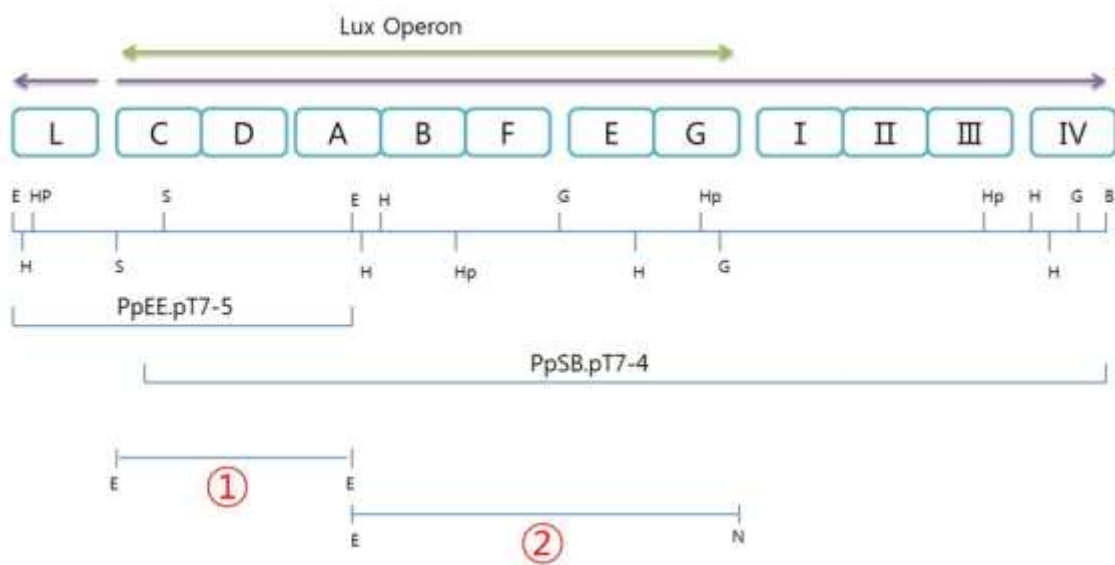


Figure 33. The cloning of *Photobacteria phosphoreum* LUX operon

(2) 식물 엽록체 형질전환 벡터의 제작

본 과제에서 선정한 엽록체 형질전환용 플라스미드는 *pBLcTV*로서 클로닝 선택성 마커인 ampicillin과 엽록체 재분화용 마커인 spectinomycin를 함유하고 있으며, 엽록체 genome상의 rRNA 부분과 homologous recombination이 일어날 수 있는 염기서열 (*trrnI*와 *trrnA*)을 포함하고 있다. 또한 삽입된 유전자의 과발현을 유도하기 위하여 Rubisco large subunit promoter가 포함되어 있다. 당해연도에서는 선행연구 결과에서 *P. leigonathi*의 전체 LUX operon이 이미 삽입된 담배 형질전환 벡터 *pBLcTV::PL-LUX*를 *NcoI*과 *EcoRI*으로 절단한 후, Figure 33의 ② 절편과 ligation하였고, 이를 다시 *EcoRI*으로 절단한 후, ①절편과 ligation하여 최종 엽록체 형질전환 벡터를 제작하였다. 클로닝의 성공여부는 삽입된 전체 유전자와 인접해 있는 벡터 backbone 위치에서부터 염기서열 분석을 실시함으로써 확인하였다 (Fig. 33).

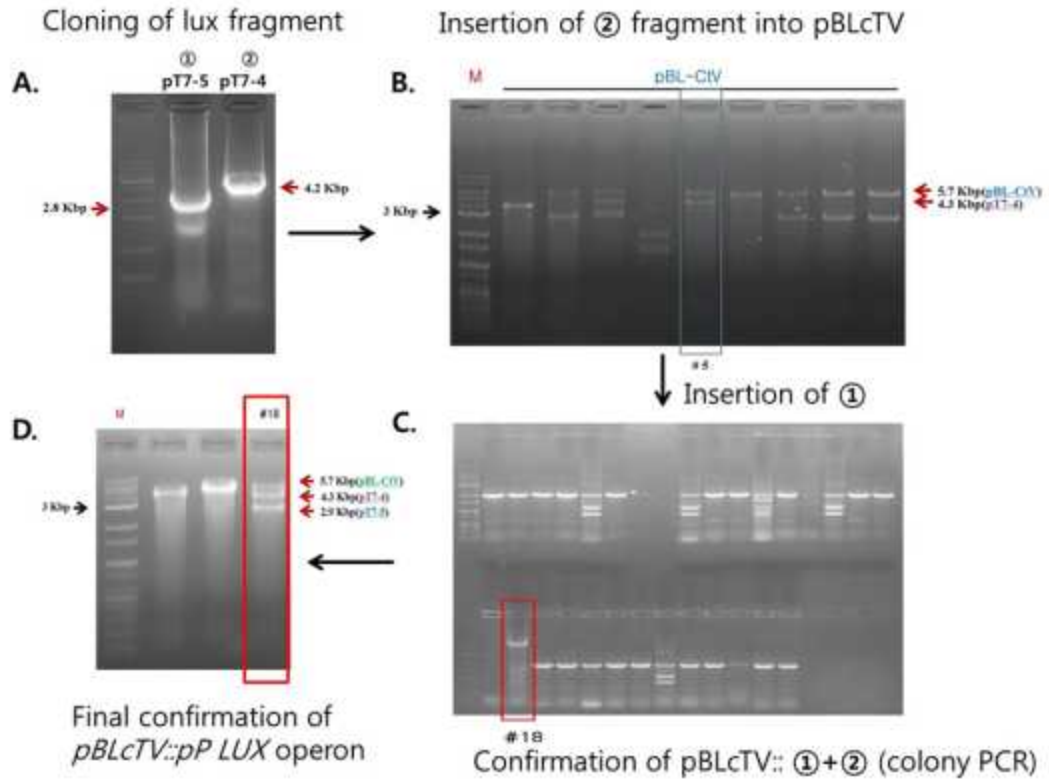


Figure 34. The cloning of *P. phosphoreum* LUX operon into *pBLcTV*
 A. PCR amplification of fragment of ① and ② (그림2), B. The restricted pattern of pBLcTV::fragment ② by NcoI and EcoRI, C. The colony PCR of clones containing pBLcTV: ① and ②. D. The restricted pattern of pBLcTV: ①+②.

나. 페튜니아 재분화 및 형질전환

(1) 페튜니아의 발아 및 생육

본 과제에서 형질전환 대상으로 선택한 화훼작물은 페튜니아 중 매드니스 레드 (Fig 36)라고 불리는 품종으로 국내 '사이버가든'에서 종자를 구입하여 발아 시킨 후, 생육시키면서 발달된 잎 조직을 연구에 사용하였다. 생육을 지속시키면, 빨간색의 꽃이 유도된다. 일차적인 형질전환 대상인 페튜니아의 생육 조건을 확인하고자, MSO 배지 (MS salt 4.3g/L, 3% sucrose, MES 0.5g/L, phytoagar 0.8%, pH 5.7)에서 발아 시킨 후, MSO 마젠타박스에 무균상태로 옮겨 주었다. 잎의 녹화가 충분히 진행되고, 유묘의 신장이 7~8cm, 잎의 폭이 2 cm정도되는 유묘를 선택하여 gold-particle mediated gene bombardment를 실시하였다.

(2) 엽록체 형질전환

유전자의 전달은 BioRad사의 헬륨가스의 압력 (1100 psi) 분출에 의해 매개되는 biolistic bombardment unit을 이용하였으며, 이를 위해 0.6 micrometer gold particle를 사용하였으며 유전자의 농도는 1 microgram/L 수준의 고농도로 적용하였다.

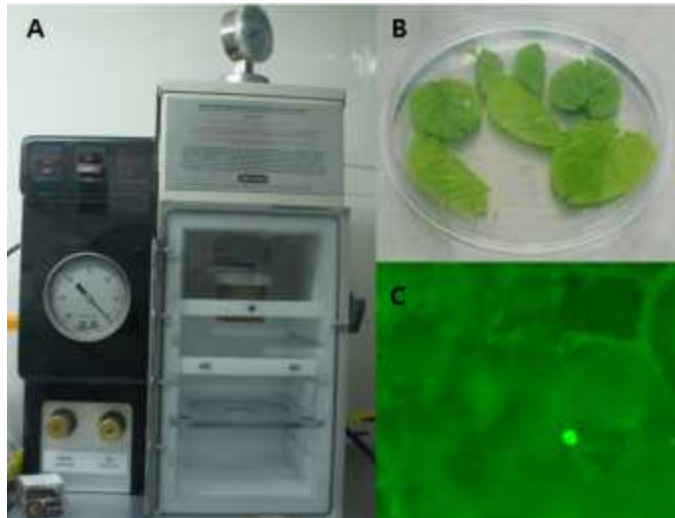


Figure 35. The scheme of gene bombardment
 A, Biolistic gene gun made from BioRad; B, The leaflets subjected to gene transfer; C, Successfully delivered GFP in chloroplast of leaflet

다. 형질전환 후 엽면 조직 치상 및 재분화

(1) 1~2 차년도

(가) 재분화

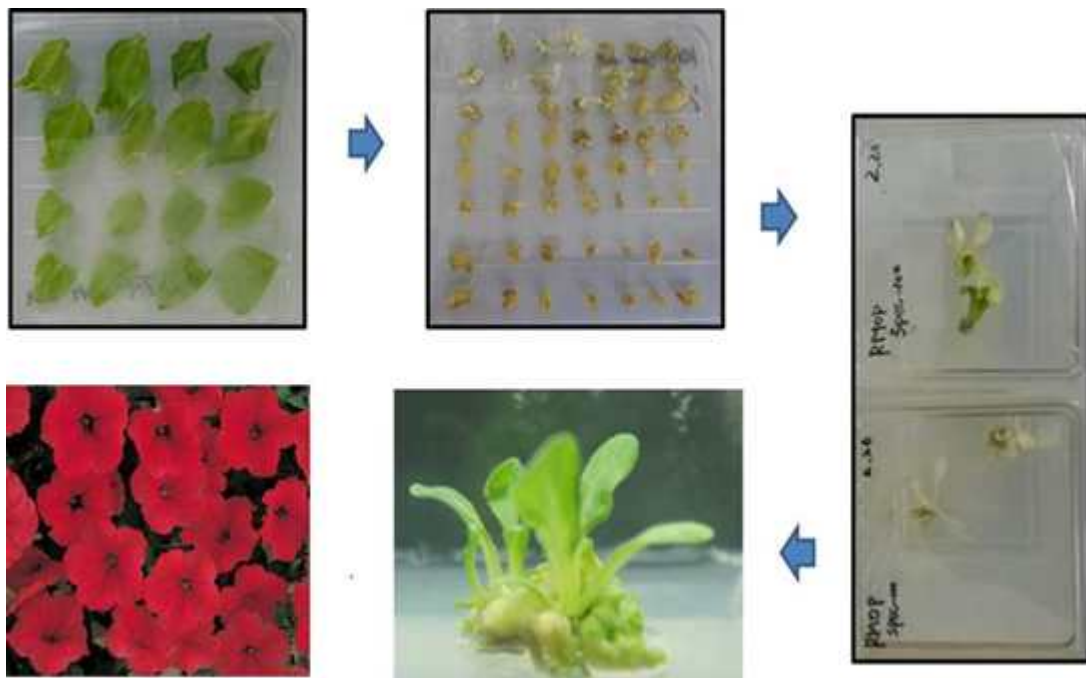


Figure 36. The progress of tissue culture and regeneration of petunia after chloroplast transformation

Bombarding후, 페튜니아의 잎조직을 0.5 X 0.5 cm 크기로 절단하여, RMOP 배지 (MS salt with vitamin 4.3g/L, Sucrose 3%, myo-inositol 0.1 g/L, pH 5.7, Thiamine-HCl 1g/L, BAP 1 µg/mL, NAA 0.1 µg/mL, phytoagar 0.6%)에 치상한 후, 3일 정도 회복시켰다. 그 다음, RMOP배지에 100 µg/ml의 spectinomycin을 첨가한 후, 캘러스 유도 및 줄기 분화를 유도시켰다. 캘러스에서 새로운 줄기가 재분화될 경우, 마젠타박스에 옮겨 치상하여 생장을 유도하였다. Homoplasmic 엽록체를 함유한 형질전환체를 얻기 위하여 위와 같은 과정을 지속적으로 반복하고 있다 (Fig. 36).

(나) 발광세기 측정

발광 유전자 도입으로 인해서 재분화된 페튜니아에 실제 발광 형질이 도입되었는지 여부를 확인하기 위해서 luminescence 측정 기기인 LAS 4000의 chamber과 BioRad 사의 Chemidoc기기를 사용하여 미세한 수준의 발광 여부를 확인하였다. 재분화 기간 중, heteroplasmic 상태로 재분화 중인 페튜니아의 경우, 미세하나마 형질전환되지 않은 야생형 페튜니아에 비해 발광정도가 강한 것을 확인하였다 (Figure 37)

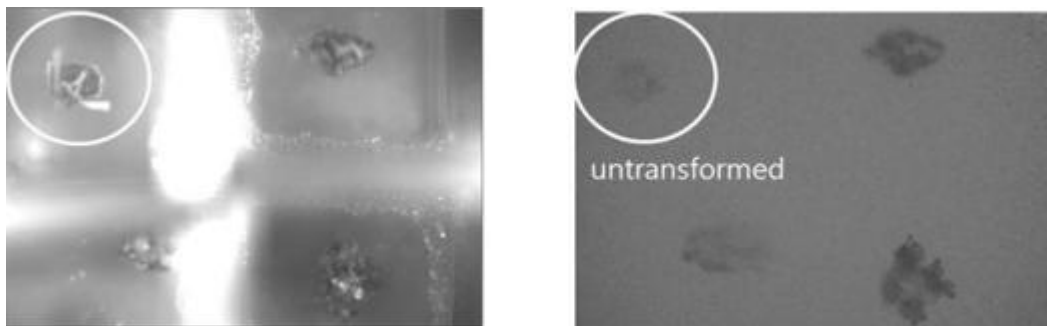


Figure 37. The monitoring of autoluminescence of petunia transformed with *P. phosphoreum* LUX operon.

Left panel: The images captured under visible light, Right panel: The image taken in LAS 4000 chemiluminescence detector in darkness. Circle; Untransformed wild type petunia.

(2) 2 차년도

(가) 형질전환 및 재분화 지속

1차년도 말부터 개시한 형질전환 및 재분화를 지속하였다. 형질전환 조건은 1차년도와 유사한, Biorad biolistic bombardment unit를 사용하였고, 도입 유전자들을 0.6 µm직경의 gold particle에 coating 시킨 후, 1100 psi 압력으로 페튜니아의 엽면에 전달시켰음. Bombarding 후, RMOP 배지 (MS salt with vitamin 4.3g/L, Sucrose 3%, myo-inositol 0.1 g/L, pH 5.7, Thiamine-HCl 1g/L, BAP 1 µg/mL, NAA 0.1 µg/mL, phytoagar 0.6%)에 치상한 후 회복시킨 후, 동일한 조성의 배지에 100 µg/ml의 spectinomycin이 첨가하여 형질전환된 캘러스 조직 및 줄기 분화를 유도하였

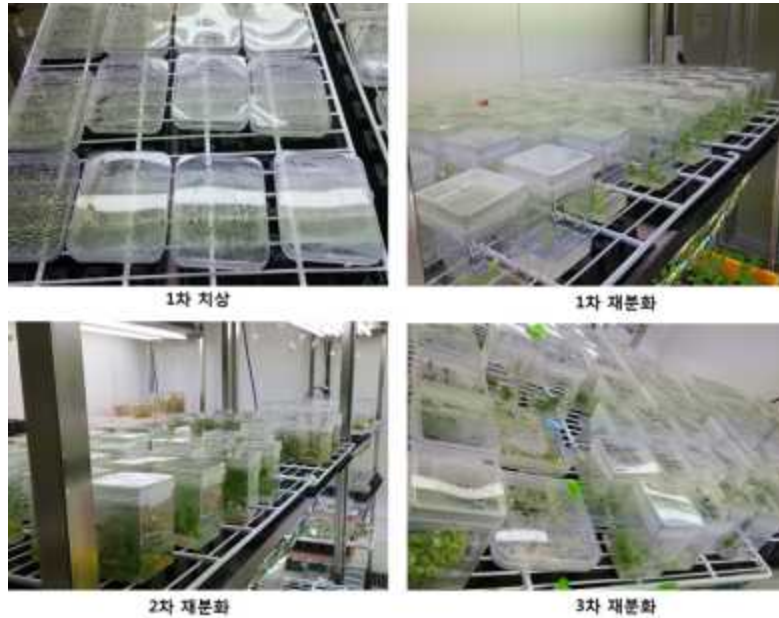


Figure 38. The various stages of petunia transformants containing *P. phosphoreum* Lux operon in chloroplast. After obtaining a initial positive transformant callus, the whole juvenile seedlings were regenerated, which was repeated to 3 times to obtain the homoplasmic chloroplast transformant.

다. 재분화 및 도입된 발광 유전자에 대해 homoplasmy를 보이는 형질전환 계통 확보를 위해서, 1차 치상된 선택성 배지에서 분화된 입조직을 0.5 X 0.5 cm 크기로 다시 절단한 후, 2차와 3차 치상 및 재분화를 반복함으로써, homoplasmic한 형질전환체를 얻고자 하였다.

(나) 형질전환체의 발광 확인

3차년도 치상을 통한 계대가 진행되고 있는 형질전환체들을 대상으로, 실제 자체 발광 정도를 측정하였다. 2년차 10월 기준으로, 현재 재분화 중에 있는 형질전환 총 135개의 계통이 1차 재분화 중이었으며, 3차년도까지 재분화된 25개의 계통을 확보하였다. 3차년도까지 분화된 계통 중, 우선 2개의 계통을 선별하여 LAS4000 chemiluminescence detection unit의 CCD 카메라를 이용하여 wild type 페튜니아의 발광 정도와 형질전환체들의 발광 정도를 비교하였음. 아직 육안으로 확인될 1정도의 발광 세기를 보이지는 않았지만, wild type 대비 발광이 되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 39).

(다) 형질전환 페튜니아에 유전자 도입 여부 확인 (PCR)

3차년도까지 재분화를 지속한 후, 여전히 만족할 수준의 발광세기를 보이는 형질전환체를 확보하지는 못했지만, 상기한 형질전환 페튜니아 내에 *P. phosphoreum* Lux operon이 도입되어 있는지의 여부를 PCR을 통해서 확인하였다.

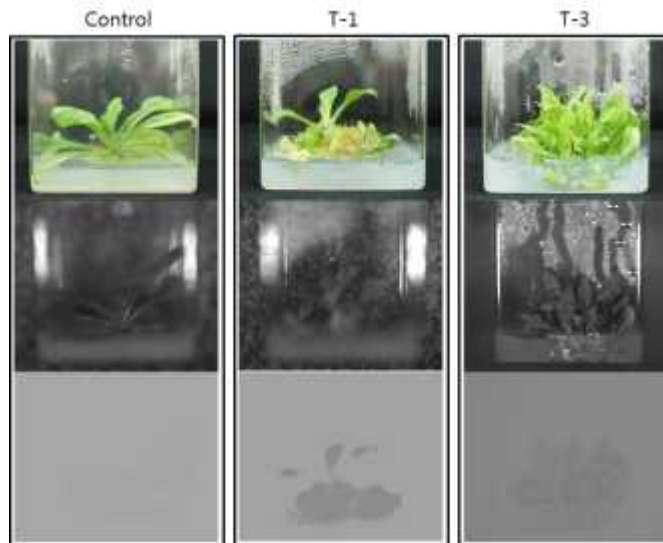


Figure 39. The autoluminescence generated from petunia containing *P. phosphoreum* *LUX* operon in its chloroplast.

발광을 확인한 동일한 계통으로부터 DNA를 추출한 후, *LUX A*의 특이적 primer를 이용하였으며, 형질전환에 사용했던 *LUX* operon을 함유한 *pBLcTV* 벡터를 positive control로 사용하였음 .

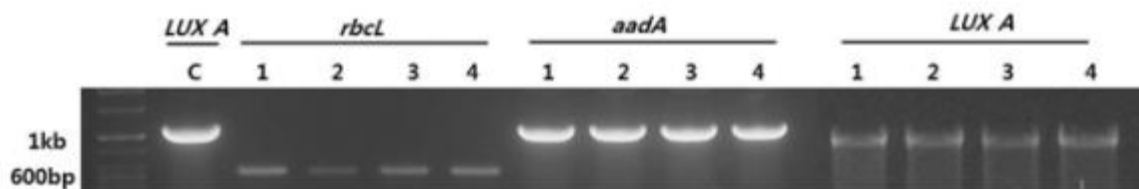


Figure 40. The confirmation of *LUX* gene inside petunia chloroplast genome using gene specific primer mediated PCR

(3) 3차년도

(가) 발광유전자 발현시스템 구축 및 형질전환 식물 개발

1) 엽록체 형질전환 페튜니아 계통 구축

2~3차년도에, 엽록체 형질전환 벡터 *pBLcTV*에 *P. phosphoreum LUX CDABEG* 유전자의 operon의 클로닝을 완료한 후, 페튜니아에 biolistic gene bombardment 기법을 활용하여 발광유전자를 도입하였으며, 3차년도에 이르기까지 도입된 엽록체에서 페튜니아의 재분화를 유도하였다. 1차 치상에서 재분화된 callus을 대상으로 5차에 걸친 nearly

homoplasmic 형질전환 계통을 확보하였으며, 이중 4개의 재분화 페튜니아를 대상으로 자체 발광 수준을 측정하였다. 모든 계통에서 육안으로 발광을 확인할 수 있는 계통은 확보하지 못했으나, LAS 3000과 같은 bioluminescence를 측정할 수 있는 분석기기를 활용하여 발광을 측정한 결과, 형질전환 후 재분화된 페튜니아에서 Wildtype 페튜니아와 비교하였을 경우, 현격한 자체 발광을 보임을 알 수 있었음 (Fig. 41 Lux #2).

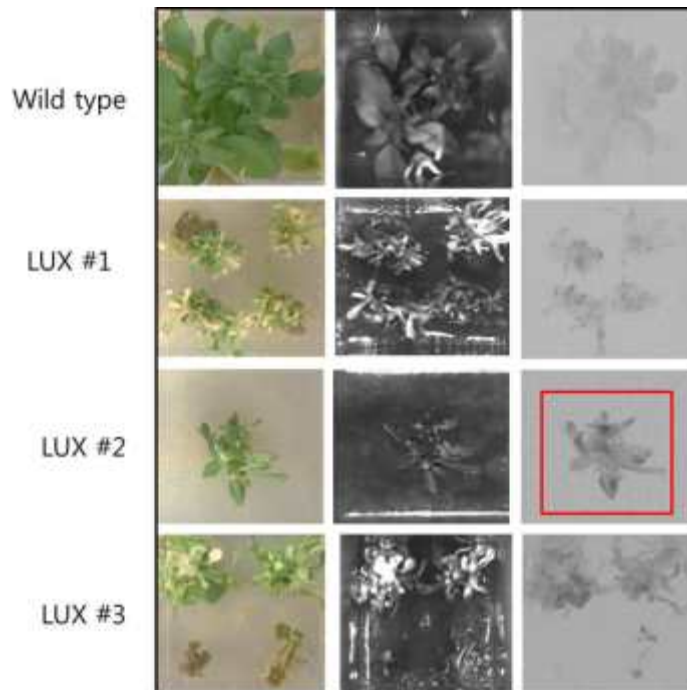


Figure 41. The luminescence images of transformed petunia with *pBLC_{TV}::LUX CDABEG*. The redbox showed the most prominent autoluminescence compared with other lines.

(3) 4차년도

(가) 엽록체 형질전환 페튜니아 계통 구축

1) 형질전환 계통의 발광 유전자 보유 확인

3년차 재분화시까지 확보한 다양한 형질전환 계통들을 대상으로 형질전환 벡터의 삽입 여부 (spectinomycin 저항성 유전자 존재 여부)와 *LUX* 유전자 삽입 (*LUX AB* 유전자) 여부를 확인하였다. 형질전환 페튜니아의 캘러스를 지속적으로 선별하기 위해서 4년차 분화시에도 spectinomycin이 첨가된 재분화배지에서 분화가 이루어졌으며, 최종 순화된 4개의 계통을 선별하여 페튜니아 내 *P. phosphoreum LUX A*와 *LUX B* 유전자가 도입되었는지를 확인하였다.

2) 형질전환 페튜니아에서의 각각의 *LUX* 유전자 발현 분석

최종 선별된 4계통 중 한 개의 계통을 선별하여 (D7) 형질전환 페튜니아를 대상으로 total RNA

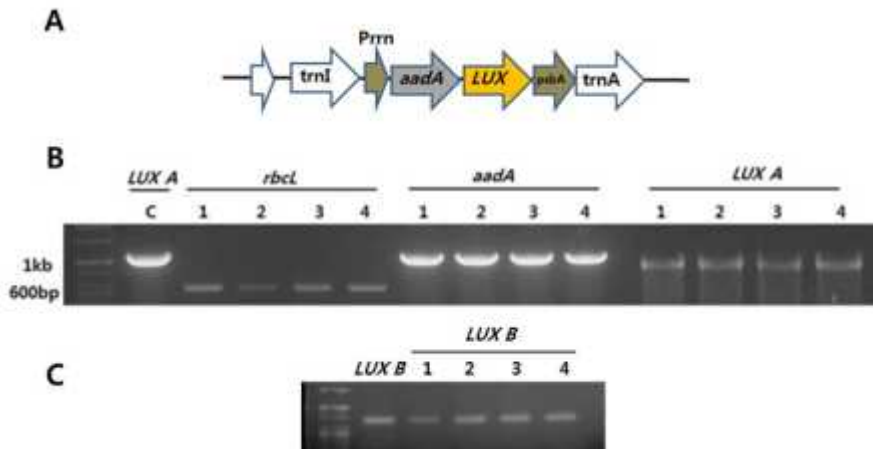


Figure 42. The introduction of *P. phosphoreum* *LUX* genes in regenerated petunia.

Petunia leaf chloroplast were transformed with *pBLcTV::P. phosphoreum LUX* operons, followed by 4 rounds of regenerations. A. The expression cassette containing *P. phosphoreum LUX* gene in pBLcTV vector. The potential homologous recombination sites were designated as trnI and trnA. B. The verification of the insertion of several selected genes by PCR. LUX A C, the amplified LuxA fragment as pBLcTV::LUX oprone as a template. RbcL, Petunia rubisco large subunit fragment, aadA, spectinomycin resistant gene. LUX A, LuxA fragment amplified from transformed petunia. Lux B: LuxB fragment amplified from transformed petunia. 1,2,3,4: the individual transformed petunia lines.

를 분리한 후, *P. phosphoreum* 각각의 유전자들을 대상으로 RT-PCR를 수행한 결과, *LuxAB*, *LuxC*, *LuxD*, 그리고 *LuxE*의 모든 operon구성 유전자들이 발현한 것으로 확인됨 (Fig 42).

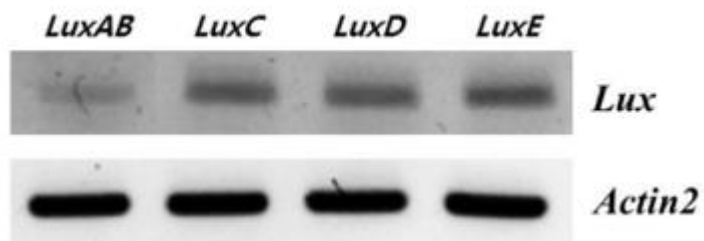


Figure 43. The expression of *LUX* operon genes in transformed petunia.

(나) 발광세기 모니터링

4차 재분화 후, 얻어진 형질전환 페튜니아 계통을 대상으로 암조건에서 발광여부를 지속적으로 모니터링 하였으나, 아직 자체 발광을 육안으로 확인할 수 있을 정도의 발광세기는 보이지 않음. 대신, LAS 4000 luminescence imaging system을 활용하여, 발광세기를 측정하였음 (Fig 44)

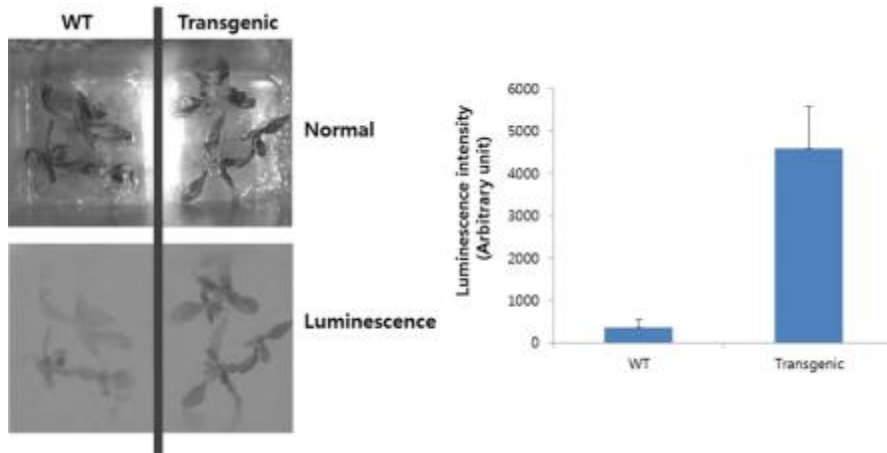


Figure 44. The autoluminescence comparison between wild type and transformed petunia containing *P. phosphoreum* LUX operon genes. Right panel, The luminescence of petunia plants. Petunia plants grown in magenta boxes in presence of regeneration media were placed in LAS4000 sample chamber and exposed for 1 min. Left panel, The images of the right panel were captured and its luminescent intensity were measured using densitometer.

(다) 형질전환 페튜니아의 표현형 분석

1) 꽃잎의 색상 변화

페튜니아의 형질 전환체의 표현형은 야생형 대비 발달학적 측면에서 다양한 변화들을 보인다. 우선, 가장 큰 변화는 꽃잎의 색깔의 변화이다. 야생형의 경우, 빨간색의 꽃잎 (petal)을 보이는 반면, 형질전환 페튜니아의 경우 대부분의 계통에서 연보라, 연분홍의 색깔을 보인다 (Fig. 45).



Figure 45. The changes of flower colors in transgenic petunia expressing *P. phosphoreum* LUX operon genes.

Transgenic petunia line number D7 and D8 exhibited the violet and pink flowers, respectively. Wild type petunia showed the red flowers.

(3) 5차년도

(가) 발달의 특이성을 보이는 형질전환 계통 선발

형질 전환 페튜니아의 경우, 꽃잎의 발달 단계에 따라, 완전히 개화하였을 때에는 연분홍의 색깔이 우세하였으며, 개화 초기 및 후기의 경우에는 보라색으로 보이는 것이 특징이다. 또한, 마젠타 박스내에서 재분화될 때 잎의 크기가 (4차년도), 야생형에 비해서 형질전환 페튜니아의 잎의 면적이 증가한 것이 관찰되었다. 그런데, 화분으로 옮겨 심은 후 (5차년도)에 발달되는 새로운 잎의 경우, 야생형의 잎의 크기와는 큰 차이를 보이지는 않았다. 야생형과 상당한 발달학적 차이를 보였다. 야생형의 경우, 잎의 경우 꽃대의 초반부에 까지만 발생하지만, 형질전환 페튜니아의 경우에는 각 꽃이 발생하는 bud마다 잎이 발달하는 것으로 보였다. 특히, sepal의 경우 야생형은 길쭉한 패턴을 보이는 반면, 형질전환 페튜니아의 경우에는 짧고 굵은 sepal이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 그 외 생식 구조상의 발달학적 차이 (예, petal 및 sepal의 수)는 보이지 않았다.

(나) 형질전환 페튜니아의 밝기

1) 무처리 형질전환 페튜니아

재분화된 형질전환 페튜니아를 마젠타 박스에서 화분으로 옮겨 심은 후, 지속적으로 표현형을 관찰하였다. 다수의 개화가 진행된 야생형과 형질전환 페튜니아를 육안으로 비교하였을 때, 꽃 색깔의 차이는 확연하게 구별되었다. 흥미로운 점은, 암 조건에서 동일한 야생형과 형질전환 페튜니아를 배치하여, 카메라의 ISO 세팅을 최대 (약 6400)으로 설정하여 노출 이미지를 확인하였을 때, 형질전환 페튜니아의 꽃잎이 희미한 수준으로 밝게 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 48).

2) Decanal 처리 후, 형질전환 페튜니아 꽃잎의 밝기

야생형과 형질전환 페튜니아의 꽃잎을 무작위로 선택하여 절화시킨 후, 밝기 여부를 비교하였다. 우선, Decanal을 처리하지 않은 무처리 조건에서는 상기와 같이, 암 조건에서 형질전환 페튜니아가 밝게 보이는 것을 확인하였다. 한편, 0.5%의 decanal을 spray시킨 후, 동일한 꽃의 옆면과 정면을 비교하였다. Decanal처리에 의해, 꽃잎이 급격히 시드는 것을 관찰할 수 있었고, 형질전환 페튜니아의 꽃잎이 야생형의 꽃잎보다 밝게 보이는 것을 확인하였다. 다만, Decanal 처리시와 무처리시의 형질전환 페튜니아의 꽃의 밝기 여부는 큰 차이를 보이지 않았다.

3) Decanal 처리 후, 형질전환 페튜니아 잎 및 줄기의 밝기

꽃과 마찬가지로, 야생형 및 형질전환 페튜니아의 잎과 줄기의 밝기를 비교하였다. 우선 무처리시, 희미한 수준이었지만, 형질전환 페튜니아의 잎이 부분적으로 야생형보다 밝게 관찰되어짐을 확인했다. 한편, Decanal을 처리한 후, 잎과 줄기의 밝기를 비교하였다. 무처리 시와 마찬가지로 형질전환 페튜니아의 잎이 부분적으로 야생형에 비해 밝음을 확인하였다.

4) UV 조사로 인한 형광 비교

본 연구는 자체 발광 형질의 도입을 목적으로 진행하였지만, 발광 유전자들의 발현으로 인해서

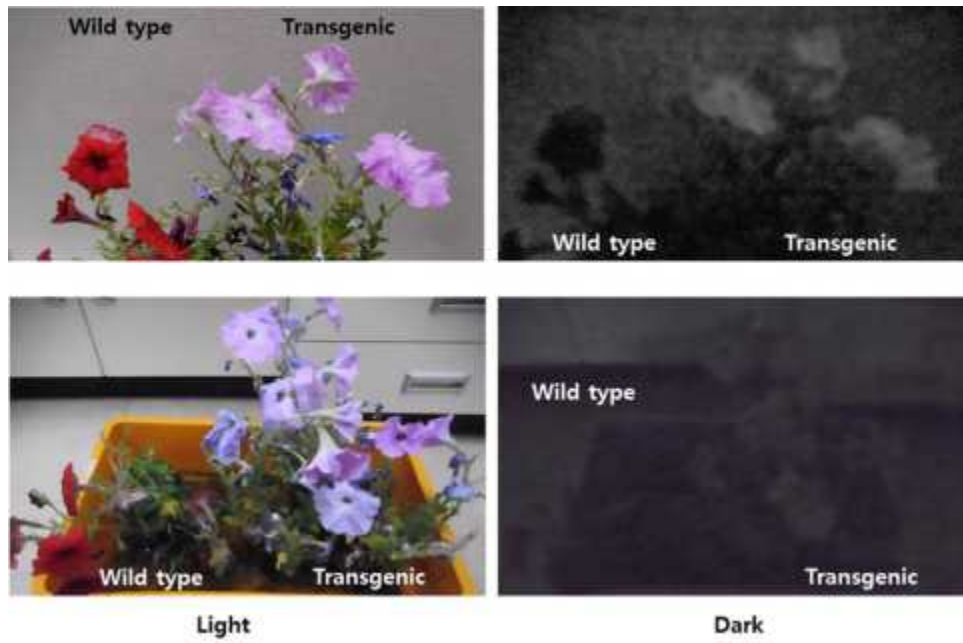


Figure 48. The luminescence of *LUX* expressing petunia grown in potting soil

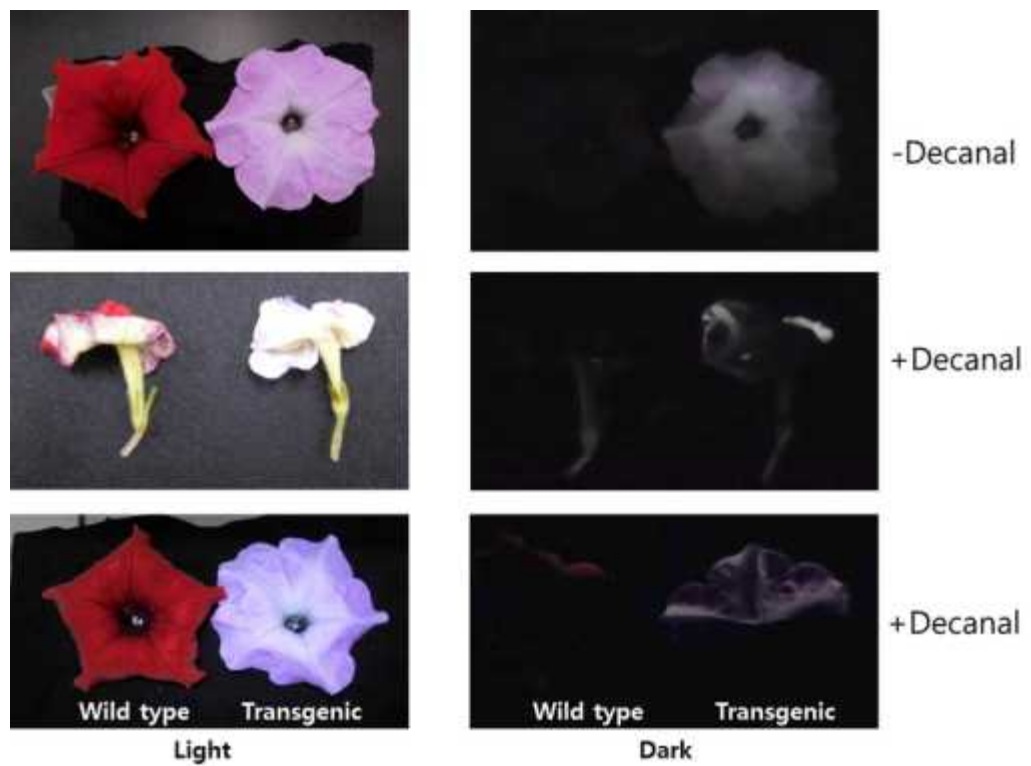


Figure 49. The comparison in luminescence of petunia in presence or absence of decanal.

다양한 대사산물 특히 지방산의 함량 및 조성이 상당한 변화를 겪었을 것으로 예상하는 바, 다양한 이중결합 및 형광을 나타내는 기능기를 가지고 있는 대사물의 생성도 예상할 수 있다. 이를 확인하기 위해서 야생형과 형질전환 페튜니아의 꽃잎을 대상으로 암조건에서 UV 조사에 활성화되는 형

광의 유무를 알아 보았다. 흥미롭게도 야생형의 꽃잎은 거의 형광을 띄지 않는 반면에 형질전환 페튜니아의 경우, 상당 수준의 형광을 나타내는 것으로 관찰되었다.

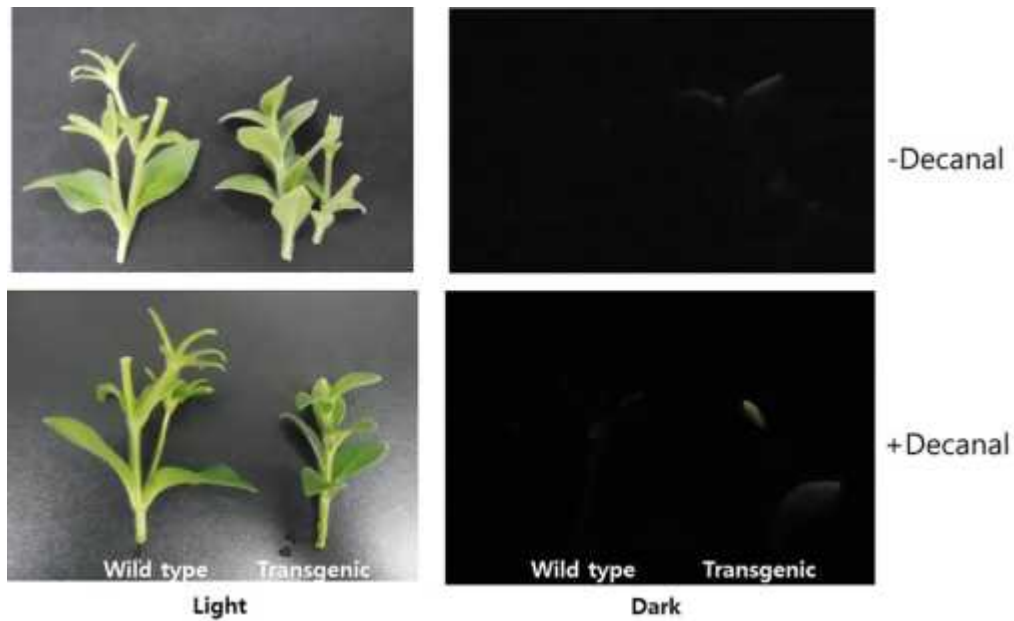


Figure 50. The luminescence of vegetative tissues of petunia expressing *LUX* genes in presence or absence of decanal

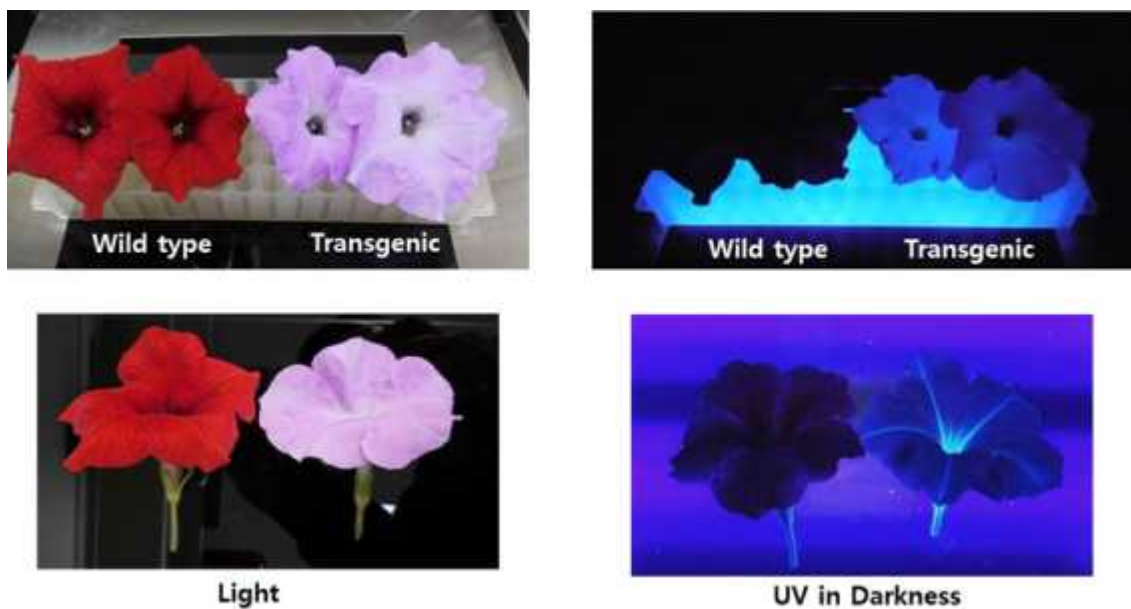


Figure 51. The fluorescence from the flower of petunia expressing *LUX* genes.

(4) 요약

자체 발광 형질을 화훼작물에 도입하기 위해서, 본 연구는 *Photobacteria phosphoreum*의 *LUX*

operon에 함유되어 있는 LUX CDABEFG의 총 7개의 유전자를 polycistronic 전사가 가능하도록 pBlcTV라는 벡터에 삽입한 후, 유전자 bombarding 기법을 활용하여, 페튜니아의 엽록체에 도입시켰다. 도입된 유전자는 야생형 페튜니아의 엽록체와 intergenic 위치에서 recombination에 의해 삽입되었다. 발광 유전자들에 대해 homoplasmic 엽록체 상태의 페튜니아 형질전환 개체를 확보하기 위해서, 선택성 배지에서 3년간에 걸쳐 지속적인 재분화를 실시하였다. 재분화 중간 과정에서 여러 세대에 걸쳐 자체 발광 정도를 분석 기기를 활용하여 측정하였으며, 최종 년도에는 화분에 재분화체를 옮겨 심어, 꽃의 발달을 유도한 후, 가시적인 발광 및 UV 조건에서의 형광을 띄는 것을 확인하였다. 현재, 엽록체 genome의 sequencing을 통한 삽입 위치를 정확히 조사한 후, leading event를 선정하고, 형질전환 식물의 향후 등록을 위한 안정성 심사등을 실시할 계획이다.

4. 자체 발광 형질전환 애기장대의 제작

가. 발광미생물 유래 luciferase 유전자의 클로닝 및 애기장대 식물 형질전환

(1) luciferase 유전자 클로닝 (*LuxAB* 융합유전자 클로닝)

발광미생물 *P. phosphorium*의 Lux operon에 존재하는 luciferase A subunit과 B subunit은 operon 시스템에 의하여 연결된 전사체로 만들어진 후 각각의 단백질 단량체를 생성한다. 자연 상태에서는 이들 단량체가 결합하여 활성형 luciferase 복합체를 형성하게 된다. 본 과제의 세부실험 항목으로서 이들 유전자를 식물체의 핵에 형질전환하여 luciferase 유전자의 발현을 확인하고자 하였다.

LuxAB 유전자 융합체 제작은 일차적으로 subunit A와 B를 각각 PCR 증폭하고 이를 연결하여 단일 reading frame을 갖는 *LuxAB*로 만들어서 pGEM-teasy vector에 클로닝하고 이차적으로 *LuxAB* 유전자를 단백질발현벡터 pET23b에 클로닝하여 융합된 단백질의 발현과 활성을 확인하는 전략을 사용하였다. Subunit A의 PCR 증폭을 위한 forward primer는 ATG 코돈의 앞쪽에 Nco I 제한효소 site를 인위적으로 도입하고 reverse primer에는 subunit B와 중첩되는 염기서열을 배치하였다. Subunit B의 PCR 증폭은 forward primer 위치에 A subunit의 reverse primer와 상보적인 염기서열 구조를 도입하였다. PCR로 각각의 subunit을 증폭한 후 agarose gel 전기영동으로 각 단편을 확인하고 gel elution 방법으로 이들 단편을 순수분리 하였다. *LuxAB* 융합된 유전자를 만들기 위하여 두 subunit을 PCR tube에 함께 첨가한 후 A subunit의 forward primer와 B subunit의 reverse primer를 이용하여 융합된 *LuxAB* PCR 단편을 증폭하였다. 이를 pGEM-Teasy vector에 클로닝하고 염기서열 분석을 통하여 확인하였다.

LuxAB 형질전환을 위하여 클로닝벡터를 제작하였다. 벡터는 pPZP2000가 backbone vector로 이용되었고, Left border (LB)와 Right border (RB) 사이에 선발마커(제초제 바스타저항성 유전자)와 목적 유전자인 *LuxAB*를 클로닝한 구조이다. 그리고 염기서열분석에 이용된 sequencing primer는 위에서 도입유전자 검출에 사용된 primer를 포함하여, TP_F_SpeI (AAAAGTAGTATGGCGCCACCGTG), TP_R_BamHI (TTGGATCCCATACAGCTGATCCTTCCAC), LxAB_F_BamHI (GGGGATCCAAGTTTGAAATATTTGTTTCTCAT) 및 LxAB_R_SmaI (CCCCGGGTTACGAGCTTGTAATTTCTTTT) 등이 사용되었다.

분석된 염기서열은 DNASTAR SeqManII multi-alignment 프로그램을 이용하여 하나로 연결된

contig로 만들었다. Multi-alignment 프로그램에 의하여 Contig로 연결된 염기서열을 NCBI website의 blastN search 프로그램을 이용하여 각 유전자의 구조를 분석하였다. 아래의 Figure 52는 최종적으로 완성된 도입유전자(T-DNA) 영역의 완전한 염기서열과 유전자 구조를 나타내는 그림이다. 참고로 염기서열 구조 내 염기를 나타내는 색상과 영역은 다음의 **RB-2XP35S-TP-LxAB-T35S-P35S-Bar-Tnos-LB** 순서이며 각각의 유전자 구성은 서로 다른 색상으로 표현하였다 (Figure 52).

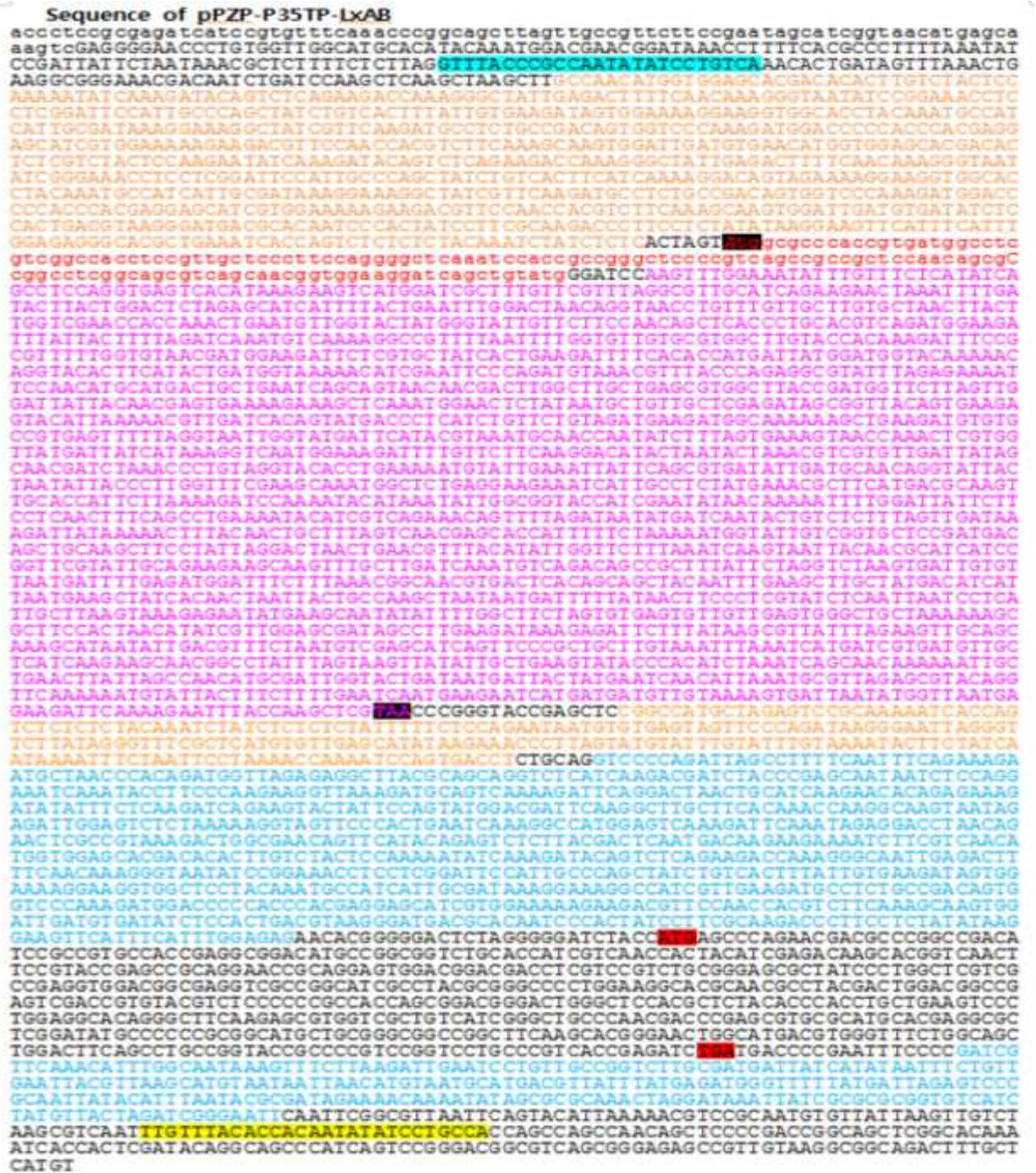


Figure 52. 형질전환벡터 내 도입유전자의 완전 염기서열 및 구조분석 결과

애기장대 식물 형질전환은 클로닝된 *LuxAB* 융합유전자는 *Agrobacterium tumefaciense* LBA

4404 균주에 도입한 후 균주 현탁액을 애기장대 식물의 꽃봉우리에 도포하여 2일간 암배양 하는 방식(공동배양)으로 수행하였다. 형질전환을 위한 공동배양 후 정상적인 생육상 조건에서 애기장대 식물을 생육하여 종자 결실을 유도하였다. 결실된 종자를 수확하고 배양토에 파종한 후 4엽기의 어린 식물에 제초제 바스타 용액(0.3%)을 살포하여 생존 개체를 선발하였다. 이들 선발된 T1세대의 종자를 수확 후 파종하여 T2 세대 식물체 또는 그 후 세대 식물체를 이용하여 도입유전자 구조, 유전자 발현, 형광 분석 등의 연구를 수행하였다.

(2) 발광 유전자 luciferase가 도입된 애기장대 형질전환체의 도입 유전자 분석

(가) 발광유전자 *LuxAB* 유전자가 도입된 애기장대에서 도입유전자 정성 검출

그림1에 제시된 유전자 모식도는 *LuxA* 유전자와 *LuxB* 유전자를 융합하여 *LuxAB* 유전자를 구성하는 형태와 두 유전자가 linker sequence로 연결되는 부위의 염기서열을 나타내는 것이다. 실제 *LuxAB* 유전자가 도입된 형질전환 애기장대 식물에서 도입유전자의 검출은 *LuxAB* 유전자의 임의의 부분을 선택하여 PCR 증폭으로 확인하면 된다. 그러나, 좀더 정확하게 검출실험을 수행하려면, *LuxA* 부분과 *LuxB* 부분 그리고, *LuxAB*의 연결부분 (Figure 53)으로 나누어 진행하였다..

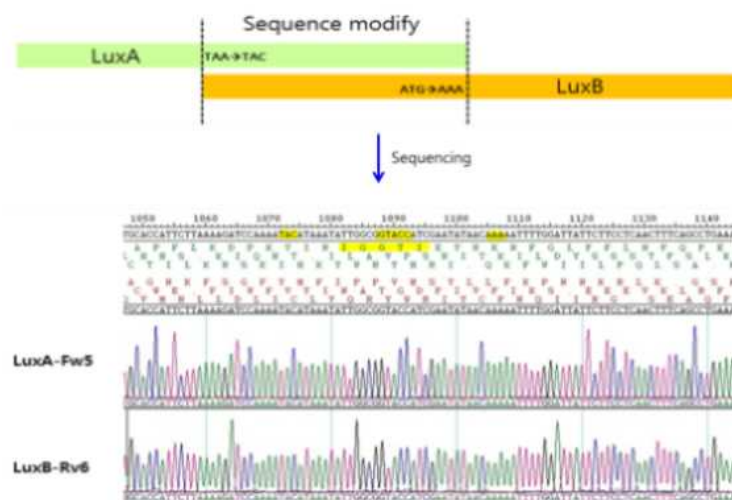


Figure 53. *LuxAB* 유전자 모식도 및 linker sequence (peptide) 영역의 염기서열 정보.

도입유전자 검출을 위한 *LuxA*와 *LuxB* 유전자의 증폭을 위한 프라이머 서열은 luxA forward primer (5'-ATG AAG TTT GGA AAT ATT TGT TTC-3'), luxA reverse primer (3'-CAA AAT TTT TGT TAT ATT CGA TGG TAC CGC CAA TAT TTA TGT ATT TTG GAT CTT-5'), luxB forward primer (5'-ACA TAA ATA TTG GCG GTA CCA TCG AAT ATA ACA AAA ATT TTG GAT TAT TC-3'), 그리고 luxB reverse primer (3'-ACG AGC TTG GTA AAT TCT TTT G-5') 이다. PCR 수행은 표준방법에 따라 수행하였으며, PCR 후 1% Agarose gel 전기영동을 수행하고, EtBr 염색을 통하여 확인하였다. 그림 3는 이들 도입유전자 특이적 primer를 이용하여 애기장대에 도입된 유전자 *LuxA* (Figure 54, *LuxA*), *LuxB* (Figure 54, *LuxB*) 및 *LuxAB* 유전자 연결부위 750 bp 영역(*LuxAB* Rice TP)을 검출한 결과를 나타낸 것이다.

아울러, 목표유전자와 함께 도입된 선발유전자인 제초제 바스타 저항성 유전자를 검출하기 위한 PCR primer로는 bar forward primer (5'-GTC TGC ACC ATC GTC AAC CA-3')와 bar reverse primer (5'- TCC AAT CAG CTC GGC CGT CCA GTC GTA-3')를 이용하였다.

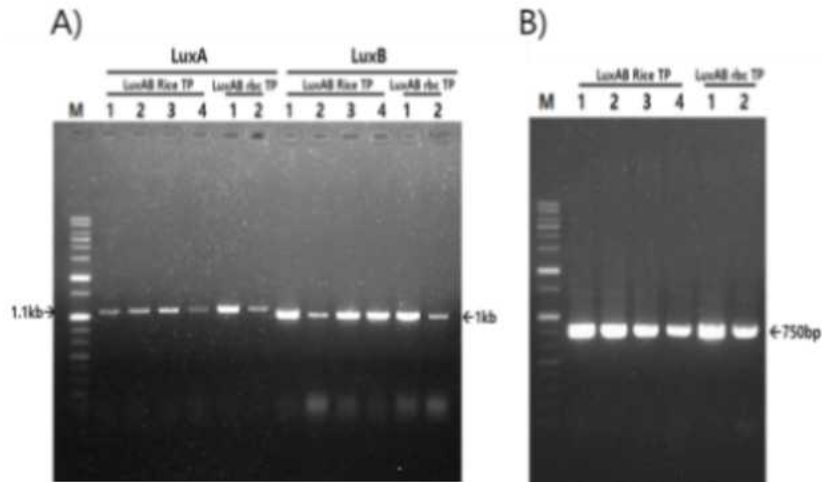


Figure 54. 형질전환 애기장대 식물에서의 도입유전자 *LuxA*, *LuxB* 및 *LuxAB*의 PCR 검출

(3) 형질전환 애기장대 및 대장균에서의 발광 분석

(가) 융합유전자 *LuxAB*의 대장균에서의 발광 측정

발광미생물 *Photobacterium phosphoreum*의 luciferase A subunit과 B subunit을 암호화하고 있는 유전자 *LuxA*와 *LuxB*를 연결하여 단일 open reading frame을 갖는 *LuxAB* 유전자 융합체를 제작하고 이를 pET23b vector에 클로닝을 하여 pET23b-*LuxAB* vector을 만들었다. 이러한 일련의 유전자 클로닝 과정을 Figure 55에 나타내었으며 융합유전자의 구조, 형질전환벡터 구조, 염기서열 등은 앞에서 설명하였다.

이 pET23b-*LuxAB* 벡터는 *E. coli* BL21 균주에 도입되었고, 대장균에서 luciferase 발광을 확인하였다. 루시퍼레이스의 활성을 정량적으로 측정하기 위해서, 박테리아를 5×10^8 cells/200 μ l가 되도록 assay buffer (10 mM potassium phosphate pH7.0, 1 mM DTT, 0.1% BSA)에 희석한 후 10%-sonicated decanal을 4 μ l를 첨가하고 10초 후 GloMax 20/20 Luminometer (Promega, USA)를 이용하여 루시퍼레이스의 활성을 정량적으로 측정하였다 (Figure 56). 이러한 결과는 융합 유전자 *LuxAB*가 정상적인 luminescence 효소활성을 갖고 있음을 나타내어 식물에 도입될 경우 발광을 나타낼 것으로 기대된다.

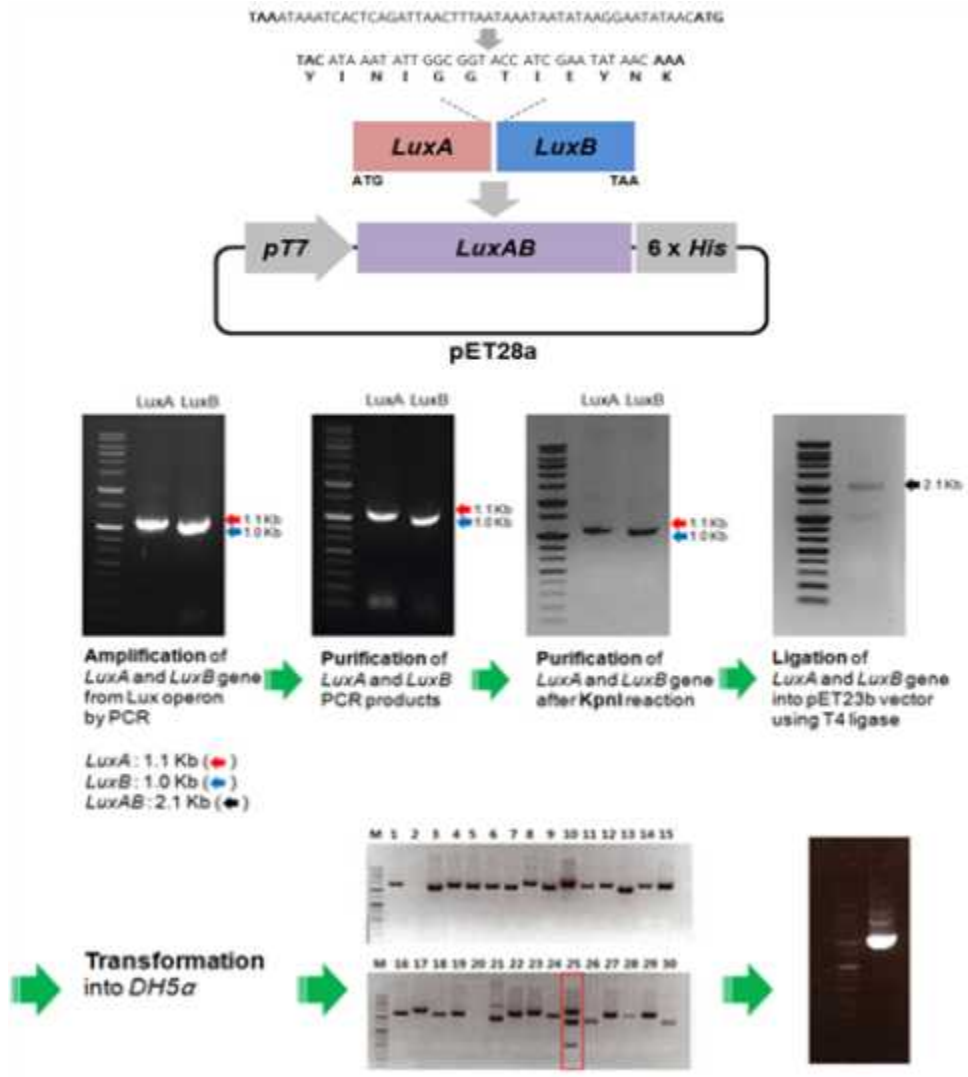


Figure 55. pET28a-LuxAB vector의 모식도 및 클로닝 과정 설명 그림

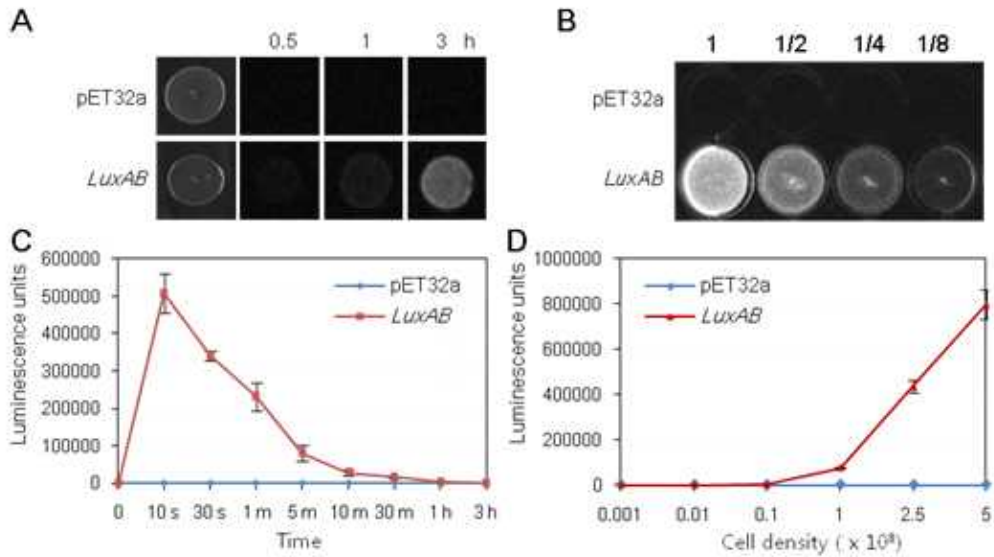


Figure 56. *LuxAB* 유전자의 대장균에서의 발광 측정 결과

(나) 형질전환 애기장대에서의 *LuxAB* 융합유전자의 발광 분석

LuxAB 융합유전자를 식물에서 발현시키기 위해서 pPZP binary vector에 클로닝을 하였고 (*rbcS3::TP-LuxAB*), 이를 애기장대로 형질전환 하였다. 형질전환은 Columbia (Col-0) 계통의 꽃 봉오리에 *Agrobacterium* 현탁액을 스프레이한 후 배양하는 floral dipping 방법을 이용하였다. 형질전환 후 애기장대의 종자를 수확하여 파종한 후 제초제 바스타를 처리하여 생존하는 개체를 선발하고, PCR 분석을 통하여 도입유전자의 존재를 확인하였다. 지금까지 서로 다른 T0 계통의 식물을 12 lines을 얻었고 이중 한 계통(T1)을 이용하여 luminescence를 확인하였다 (Figure 57). 이때 기질로써 decanal을 30분 이상 처리하였고 CCD camera를 이용하여 애기장대의 luminescence를 확인할 수 있었다. 이 결과는 비록 기질을 외부적에서 인위적으로 공급하여야 하였고 발광정도가 약하다는 문제점 들이 있지만 자체발광 식물의 개발에 대한 가능성을 보여준 결과이다. 현재 이들 형질전환 개체에 대한 분석을 수행하고 있으며, 도입유전자의 도입위치와 도입 수에 대한 분석을 진행하고 있다.

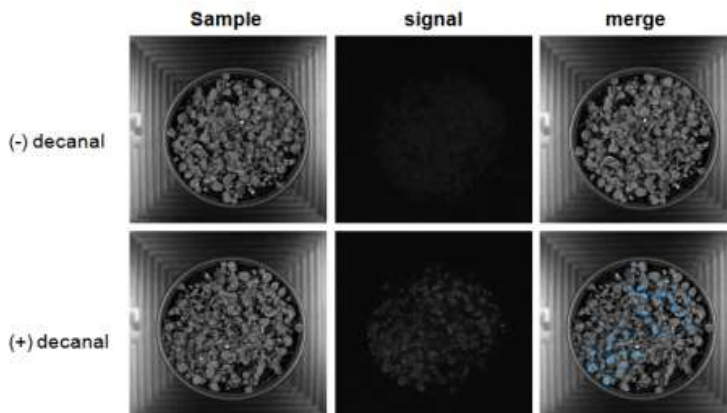


Figure 57. *LuxAB* 유전자 형질전환 애기장대의 luminescence 발광 측정

(다) 대장균에서의 LuxAB 단백질의 발현 확인 실험

LuxAB 유전자는 단백질발현벡터 pET23b의 Not I과 Nde I 제한효소 위치 사이에 클로닝하였으며 단백질의 순수 정제를 용이하게 하기 위하여 6X His tag를 3'말단에 부착하였다. Figure 58은 pET23 vector에 클로닝된 유전자 construct(*pET-LuxAB*)를 확인하기 위하여 *Not I*과 *Nde I* 제한 효소로 동시에 자른 후 전기영동으로 확인한 결과로서 약 2.1 kb 단편의 *LuxAB*(2088 bp coding sequence)와 3 kb의 pET23 backbone을 나타내고 있다. 그림 7의 B)는 발현벡터 pET-LuxAB를 *E. coli* BL21 균주에 형질전환 한 후 현탁 배양 조건에서의 LuxAB 단백질의 발현을 분석한 결과이다. 현탁 배양은 20도(16시간 배양)와 37도(4시간 배양)의 두 조건에서 수행하였고, 0.4mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 현탁 배양 후 cell을 회수하고 buffer A (0 mM Tris, 10 mM NaCl, pH8.0) 또는 buffer B (50 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0)에 현탁하고 sonicator로 세포를 파쇄하여 단백질을 용출 시켰다. 단백질은 12% SDS-PAGE를 통하여 분석하였고 그림 B의 lane 1은 uninduced total lysate, lane 2, 3, 6과 7은 IPTG induced total cell lysate 이다. 한편, lane 4, 5, 8과 9는 IPTG induced lysate 상등액을 나타낸 것이다. 결론적으로 *pET-LuxAB* plasmid에 클로닝된 fused gene *LuxAB*는 대장균 BL21균주에서 성공적으로 단백질로 만들어 짐이 확인되었으나 발현된 단백질의 수용성 용해도(solubility)가 매우 낮은 것으로 나타났다. 이를 밝히기 위한 후속 연구와 단백질의 발현과 수용성을 높이기 위한 지속적 연구가 요구된다고 판단된다.

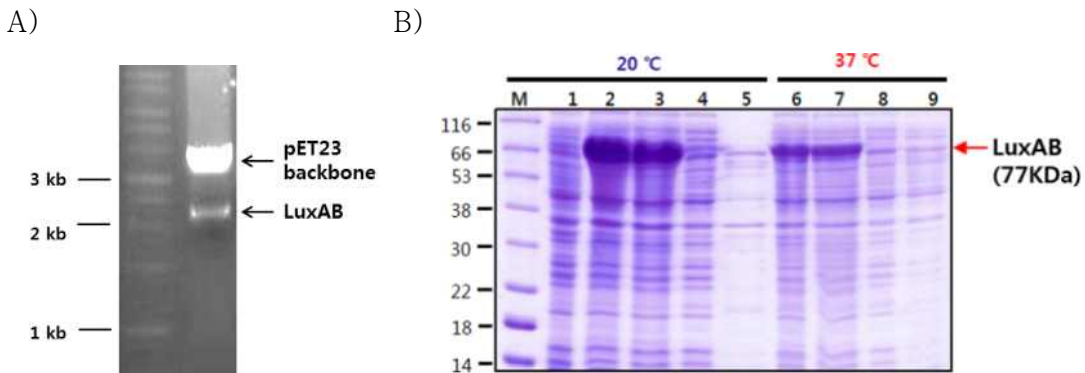


Figure 58. Cloning of *LuxAB* fusion gene in *pET23b* expression vector and expression analysis of induced LuxAB protein in *E. coli* cell.

A) The subunit A and B of bacterial luciferase gene were fused in a single reading frame and cloned into the *pET23b* expression vector. The final clone *pET-LuxAB* plasmid was digested with *NotI* and *Nde I* restriction enzymes and then analyzed through the 1% agarose gel electrophoresis. B) Solubility test of LuxAB protein expressed in *E. coli* BL21 cell line that harboring *pET-LuxAB* plasmid. For the expression of LuxAB protein, *E. coli* was cultured in liquid media at two different conditions, 20 °C for 16 hrs and 37 °C for 4 hrs, with 0.4 mM IPTG. After culture, cells were harvested, resuspended and sonicated in buffer A (20 mM Tris, 10 mM NaCl, pH8.0) or buffer B (50 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0), respectively. Each cell lysates from the two different culture conditions in buffer A or B were analyzed with SDS-PAGE.

(1) 형질전환 애기장대의 도입유전자의 구조 분석 및 luciferase 발현 분석

(가) Southern blot 분석을 통한 도입유전자 수 분석

개발한 *LuxAB* 유전자가 도입된 애기장대 11계통에 대한 southern blot 분석을 실시하였다. 각 5ug의 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RV로 각각 처리한 후 bar probe를 이용하여 분석을 하였다. 그 결과 rice TP #1번과 4번은 single 유전자가 도입된 것으로 판단되고, rice TP #2번과 rbc TP #1번은 2개의 유전자가 도입된 것으로 판단된다. 그리고 다수의 유전자가 한꺼번에 도입 (multiple insertion)된 계통들이 분석되었다 (Figure 59). 이들 southern blot 분석으로 확인된 도입 유전자 수를 바탕으로 이들 계통의 후대를 진전시키고 단일 유전자가 고정된 개체를 선발하기 위한 실험을 진행하고 있다.

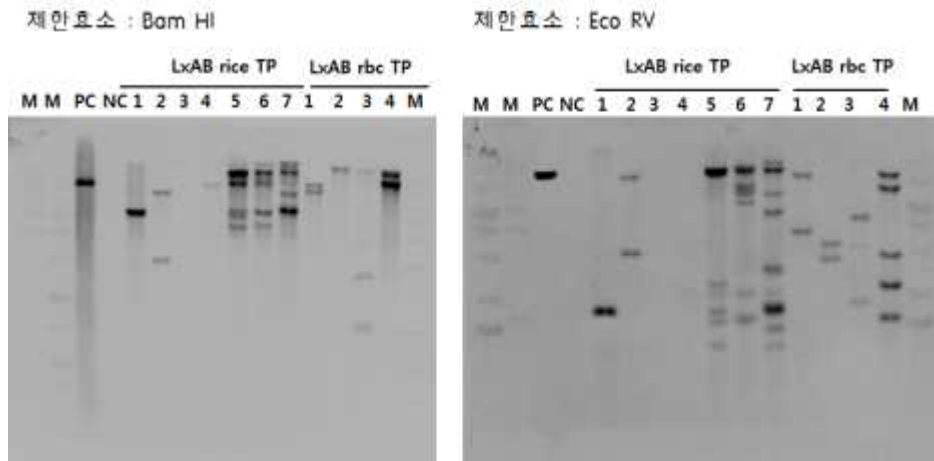


Figure 59. *LuxAB* 유전자 형질전환된 애기장대 계통의 Southern blot 분석 결과

LuxAB 유전자가 도입된 애기장대 계통 rice TP #1, 2, 5번을 대상으로 luciferase 발광을 분석하였다. 기질로 이용되는 decanal을 공급한 후 20분, 40분 및 60분 후에 형광분석기(Fision FX7)를 이용하여 발광 이미지를 만들었다. Decanal 처리 시간이 오래 일수록 발광의 강도가 확연하게 강하였고 복수(5개 또는 그 이상)의 유전자가 도입된 것으로 여겨지는 #5번에서 더욱 강한 발광이 검출되었다 (Figure 60). 이는 도입유전자 수에 의한 luciferase 단백질의 발현 양 때문일 수 있다는 추론이 가능하게 하지만, 정량적 발광 분석과 유전자 발현양이 서로 비교 되어야 하고 관련된 실험을 계획하고 있다.

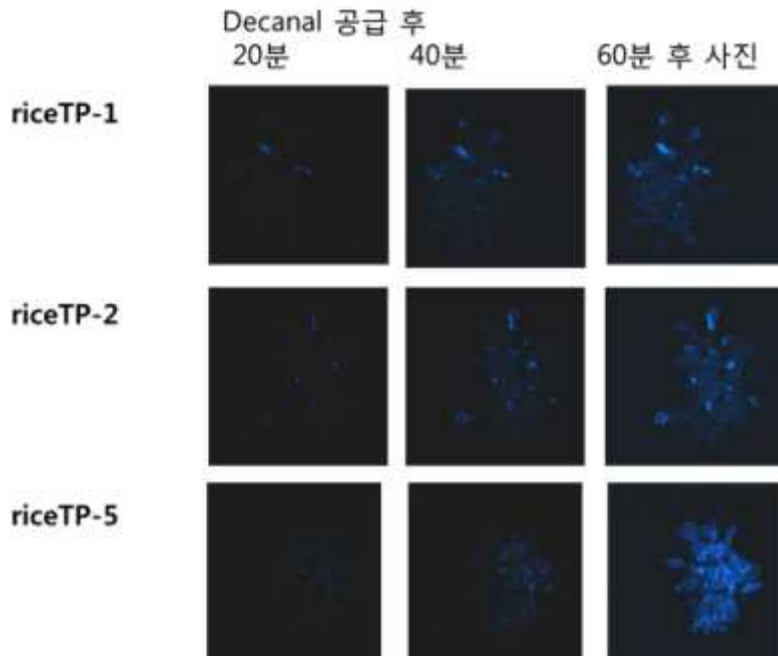


Figure 60. *LuxAB* 유전자가 도입된 애기장대의 luciferase 발광 분석

나. 발광 유전자 luciferase 활성의 기질로 사용되는 지방산 생합성 유전자의 애기장대 형질전환

(1) 융합유전자 *LuxCDE*, 형질전환벡터 제작 및 애기장대 형질전환

(가) 융합유전자 *LuxCDE* 제작

발광미생물 *P. phosphoreum*의 *LUX* operon에 존재하는 지방산 생합성 관련유전자 *Lux C, D* 및 *E* 유전자 각각을 linker peptide로 연결하여 단일 polypeptide로 연결하는 실험을 수행하였다. 그림 1과 같이 *LuxC* 및 *LuxD* 유전자의 stop codon TAG를 TAC로 각각 변환하였고 *LuxC*와 *D*의 연결은 5'-AAGGGAATTAAT-3' linker(아미노산 KGIN)로 연결하였고 *LuxD*와 *LuxE*는 5'-TTACACCTGATACATAAACACATAAAAAGGAATA-3 (아미노산 LHLIHKHIKGI) 염기서열을 갖는 linker로 연결하였다 (Figure 61).

```

ATGATAAAGAAAATCCCAATGATTGGTGGCCGGAGAGGGGATACATTCAGAACATGAAATATCGTGAACCTCACATAAATAGCTATAAAGTTAGTATACCT
ATCAATTAATCAAGATGATGTTGGAGGCGATTAAATCACAAAATGFGGAAATATCAATCAATCAAGATGAAATTTCTATACACTGGTGGTCAGAAATG
GAAAAGTGAGAAATATTCCTGCGCACTAACCTATTCCTGATTTGGTAAGATTTCGGGATATTCCTCGAAATGGCAAACTAGAACTAACCTGGATCTCAA
TGTATTTGAGCTCAAAAAGTGCTTATATGATGTTGGTGAACAGAGTAGGTTCTGCTCATTTGTAGATGAAATGGTTACCTACGGGTGATTGTTATGTCAG
GCCATCCAAAAGGAAAATCTGTTTATGGTAGCCGGTAATGTCCTCATTTGGTGTACTTCTATATATAGAGCAATCTGCACTAAAATGAAATGATCAT
TAAACATCACTAGCTATTCATTACGGCATAGCAATAGCAATAGTTTATGATGACAGACACCACTCAATTTAGCGTTTAAATGTCGGTAAATGTTAT
GGTCTCATAAAGGAAATATTCGAATCCCAACAAATTAAGAAATGTTGGTGTGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TACACCGGTAACGTCGACATAATAAAATTTGGGCGGAAAGAAAGTATGCGCAATGTTGATAAATCTGATAGATATACAGCTCTGCTATTTGGTGGTGGTCACTG
ATATTTGTTTATGATCAGCAGGCTGTTTTCACACCCAAAGATACTATATATAGGGCATAACTATGATGCTTTTGTAGAGCTTTTGTAGAGCTTTGTAGAACATTAAT
ATATATGGATAATATGCCAAAAGGCGATCAACATTTGATGAAAAGGATCATTTTCAATTAATGAAAAGAGTGCATTTCCGCAAAATATAAGTTGAGAAA
GGTGAATCACTCTGGTTACTTTGTAATCAGCGTAGGATCTTTTGGTAACTCAACATTAGCTCGATCTGCATATTTACCATGCTCCCGATATACAGAA
ATAACGCTTATAAGAAAATAGAAATACCAACAGTAAACAGTTACCCTTGGGAGTCACTAATTAATAGAGATGTTAGCCCTCAAGGTTGCTGAGCG
TATTTGTTAGTCAGGATGAAATAATTTTCGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ATACATATCAACCAAGATGTAGCCGTAAAATTTGAACCAACGCTTATCTAGAAAGATTAAGTTTATGCTTTTGTAGCTTTGATCACTATAC

```

AAG GGA ATT AAT
K G I N

```

ATGAAAAGTGAANCAATCTGTACCAATTGATCATGTTATAAAAGTTGATAACGAACGTCATATACGTTTGGGAACCTTCCCTAAAATCAATGDTGATA
AAGAATATACTATGTTTATGCTCTGGTTTGGCTCGAAGAAATGGATCATTTTGGAGGTTAGCTGAAATTTATCAACCAATGGATTTCAATGTTATGTT
ATGATTCACCTTAACTGTTGGTAAAGTAGCGTGAAATGATGACCTTCCATGTCAGTGGGAAAGAAAGTTATTAACCTTTAATGCTGGTGAATCA
GAGCATGGTATTTGATCAGGATGGTTTAAATGCACTGAGCTTTCTCGCGAATGCTTATGATAATTTCTGGCATGTTAAATGTTCTTTTAAATACCTGGCTG
GTGGTCAATTTACGGAACTCTTGAACAGGCGTTAAATATGATTAATCTGAGATGGAGATAGATGAAATACCAAGAGATTAGATTCTGATGGATATA
TTTAGTTCAAGGATTGTTTACAGATTTGTTTGAATAAATCTGGGATACATAGATTAACATATAAATAAACAAGAAATTTAAATGCTCAATTTAGCTTT
TGTCCGCAATGATGATGTTGGTCAACAGCAAGAAATGAAAGATTAATGATTAATATCAATTCAGATAAACAAGAAATTTACTTTAATAGGTTGATCA
CATGTTAGGTTAGGTAACCTAATTTGTTAAAGAAATTTCTATCAATCAATTAAGCAGCAATTTGATAGATTAATTTAGTGGGTTAGTAAAGTGGAT
TATGAAACCAGAAATTTGAAGCTCTCACTATGCTACAGTAAATGAACTGGCTTTGAAAATAAATAACAAAGTAAGCTATTAGCTATG

```

TTA CAA CTG ATA CAT AAA CCA ACA AAA GGA ATA (연결 변형전)
L Q L I H K P T K G I

TTA CAC CTG ATA CAT AAA CAC ATA AAA GGA ATA (연결 후 변형)
L H L I H K H I K G I

```

ATGACTATTACATTAGATACTGCGAAAAGATATTATTTGTAAGTACAGAGATCGAGGATATTTATTTACATCATACCTCTTGAATTTACTTACGATGAACA
AGAAAGATAAAGCATAAAATTAATATAGAACTTTCTGTTACCACTATAAATAAATGAAGATTAATAGCTTTCTGTAATCTAGGGGGTAGACGAAAT
ATTTCACTACTGTGATGATAACCTGTTTTTCCGACCTCAATGTTTAAGTATGCAAAAATAATGACAGAGATGATCACTAATGAAAACCTGGTCAAGATG
TGGTACAGTGGTGAAGAGTCAATTTCCCGATGATTAATGATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AAAATCAGCTAGAACTTTGTAATAGGGACCTGATCGTTTAAATGCTAAAAGTTTGGTGTAAAGTATGTAATGAGCTTGTGATGATTAATCCCACTAGAT
TTACTGTAATAACAGTGAATAGATTTTGAACCTTACTTAAAAGTTTAAAGAAATCTATAATAAGGAAAGGATTTGTTTAAATGGCCCTCGCATTTCT
ATTTTGTCTATGCCAGTACATGAAGAGATAATGATAATTAATAGGAGGAAATGCTATTAATTTATTTAGCTGGGGGGTGGAAAATCAAGCAAAAAC
AAGCACTAAATCGTCAAGATTTAACTCACTATTTGATGGAACCTTCCATTTAGCAATGAAAAGTCAAGATTCGAGATACATTTAAATCAAGTTGAAATTAATC
GTGTTTCTTGAAGATACCCGTCAGCGTAAGCATGTTTCCGCAATGGTTTATGACAGCTGATCTGTAATCACTAAAGCTTGGAAAGTGGTGGTGGTGGTGG
GGGCTTATGTTAGTACATGGAATGATATCCAACTATTTATGTTACTGAGCATATCGGTATAATTCATACAAATTAAGATCCAGATCCGATCC
AAGGCACTACGATGATATTTGCTCGTTGGTAAATCGAAGAGGACGAAAGGGTGTTCATTTCAATGGCTCAGCTTGAAGATG

```

Figure 61. *LuxCDE* 융합유전자의 염기서열 및 연결에 사용된 linker 서열

연결된 *LuxCDE* 유전자의 단백질 구조적 안정성 및 효소학적 기능성을 예측하기 위하여 *LuxCDE* 유전자 염기서열을 이용하여 이 단백질의 가상적 3D 구조를 예측한 결과, 각각의 *LuxC*, *D* 및 *E* 구조의 변화 없이 세 unit이 상호 일정 거리를 두고 연결된 모형이 예측되었다 (Figure 62). 이는 융합단백질 *LuxCDE*의 효소학적 활성이 유지될 수 있음을 시사하고 있으며, 이를 확인하기 위하여 대장균 발현 시스템을 이용한 연구를 진행하고 있다.

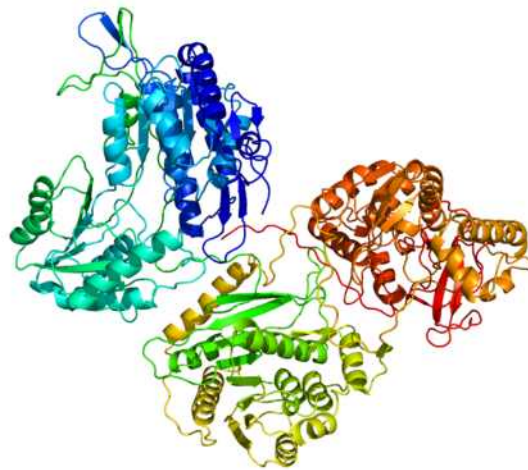


Figure 62. 융합단백질 *LuxCDE*의 3D 예측 모델

(나) 융합유전자 *LuxCDE*를 포함하는 형질전환벡터 제작

합성된 *LuxCDE* 유전자를 식물형질전환벡터(*pPZp-LuxCDE*)로 제작하였고, 벡터내 유전자 구성은 Figure 63에 나타내었다. 단위 구조 유전자들은 서로 다른 색의 염기로 표시되었고 Left border(LB)와 right border(RB) 사이의 완전장 염기서열을 나타내었다. *LuxCDE* 유전자는 CaMV

35S 프로모터에 의하여 발현이 조절되며, 선발마커는 제초제저항성 *bar* 유전자를 사용하였다. 제작된 형질전환벡터는 PCR 및 염기서열 분석을 수행하여 벡터의 완전장 염기서열을 밝혔고, blast 분석을 통하여 각 단위 구조 유전자의 위치와 염기서열을 재확인 하였다 (Figure 63).

(다) 융합유전자 *LuxCDE* 유전자의 애기장대 형질전환

형질전환벡터 *pPZP-LuxCDE*를 *Agrobacterium* GV3101 균주에 도입한 후 *Agrobacterium* 현탁 배양액을 floral dipping 방법으로 애기장대에 형질전환 하였다. 형질전환 후 애기장대 종자를 수확하여 파종하고 어린 유묘에 제초제 바스타를 살포하여 생존하는 개체를 선발하여 증식하였다 (Figure 64). 총 11개 계통의 형질전환체가 선발되었고 이들을 후대 증식하는 한편 PCR, southern blot 분석, 염기서열 분석 등을 통하여 도입유전자의 구조 분석을 진행하고 있다. 아울러 지난해 개발된 *LuxAB* 유전자를 함유한 애기장대와 *LuxCDE* 애기장대를 교배 하여 두 유전자를 모두 갖고 있는 *LuxAB x LuxCDE* 계통을 선발하였다.

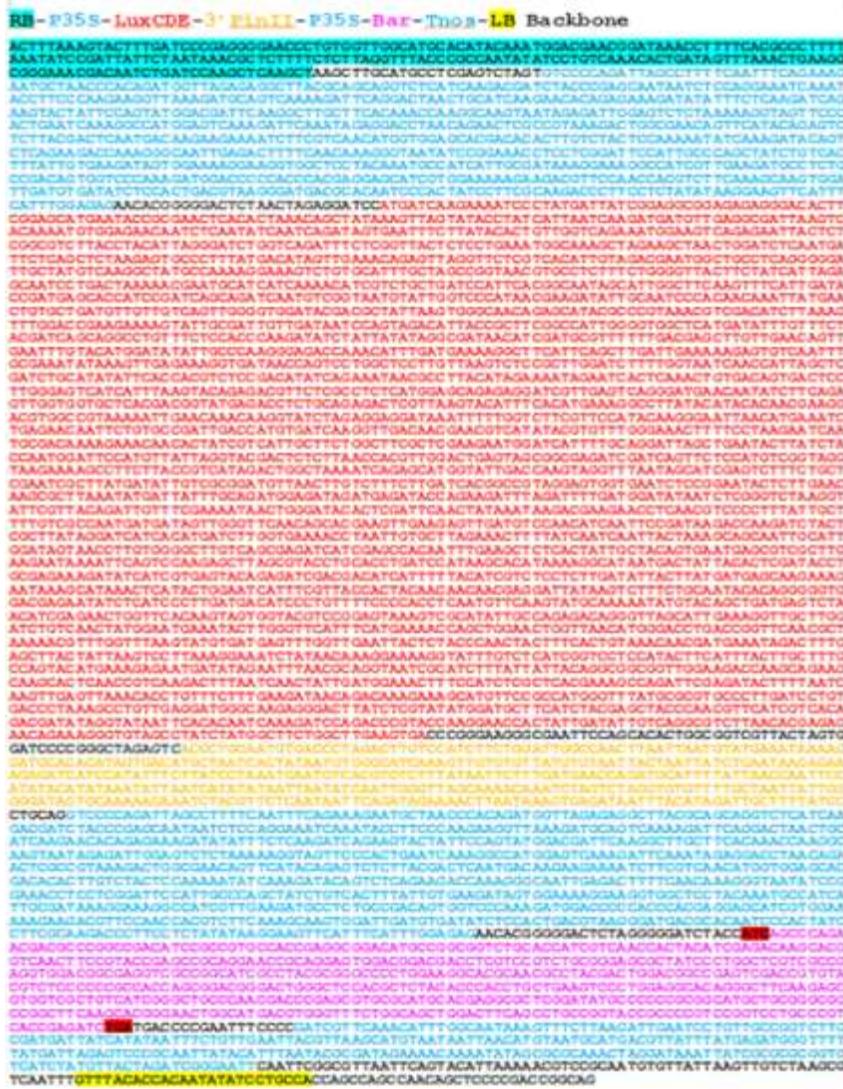


Figure 63. *pPZP-LuxCDE* 형질전환벡터의 완전장 염기서열 및 구조 유전자 모식도



Figure 64. *LuxCDE* 유전자가 도입된 형질전환 애기장대의 증식

(라) *LuxCDE* 형질전환체의 지방산 분석

지방산 생합성 관련 유전자 *LuxCDE*가 도입된 애기장대의 지방산 조성 변화를 관찰하기 위한 분석을 수행하였다. 잎 조직을 액체질소로 얼린 후 분쇄하여 hexane과 methanol의 1:1 혼합물에 녹여내면 메탄올에 녹아있는 NaOCH₃ (sodium methoxide)에 의해 지질에 붙어있는 지방산이 떨어져나가면서 carboxy기가 methyl ester로 전환된다. 전환된 fatty acyl methyl ester는 hexane에 녹는 원리를 이용하여 hexane phase를 분리한 후 가스크로마토그래프로 분석하였다. 분석 결과 형질전환체 #2, 12, 13, 16번 계통에서 애기장대와 다른 지방산 패턴이 (붉은색 및 푸른색 화살표) 나타났다. 한편 #8번과 14번에서는 대조군 Col-0와 동일한 지방산 패턴이 분석되었다 (Figure 66). 현재, 변화를 보이는 지방산의 종류를 구명하기 위한 분석을 수행하고 있으며, 이러한 지방산 패턴의 변화와 도입된 유전자의 copy 수 및 유전자 발현의 상관관계를 상호 비교하기 위하여 southern blot 분석과 reverse transcription-PCR을 이용한 분석을 수행하고 있다.

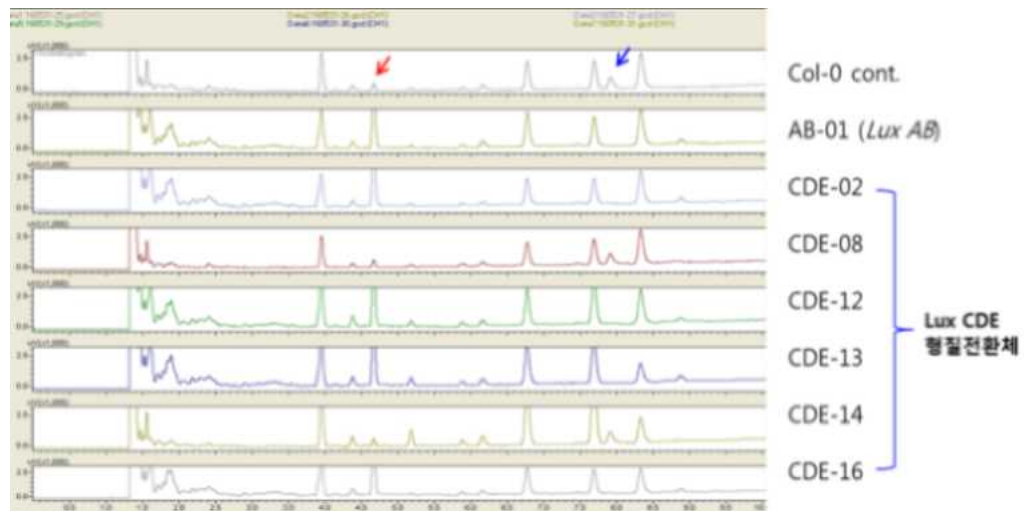


Figure 66. *LuxCDE* 유전자가 도입된 애기장대의 지방산 조성 분석

다. 애기장대 형질전환체의 Whole genome sequence 분석을 통한 도입유전자 분석

(1) 공시 재료

형질전환 애기장대는 미생물유래의 발광유전자 *luciferase (LuxAB)*가 도입된 애기장대 AB2-2-1 계통과 지방산 생합성 유전자 *LxCDE*가 도입된 애기장대 CDE2-1 및 CDE3-1이 이용되었다. 이들 애기장대는 타 과제에서 개발되었으나 LMO의 omics 분석에 활용할 수 있는 모델 식물로서의 편리함이 있기 때문에 분석의 재료로 이용하였다.

(2) DNA 추출 및 Illumina sequencing 분석

애기장대 형질전환체 AB2-2-1, CDE2-1 및 CDE3-1 계통의 total DNA 추출은 CTAB 방법(Doyle and Doyle 1987)을 이용하였으며 추출된 total DNA는 NanoDrop spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop technologies Inc. Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량 하였다. 염색체 DNA의 Illumina sequencing 분석은 애기장대 형질전환체 AB2-2-1, CDE2-1 및 CDE3-1 계통과 그의 야생형 모본인 columbia (Co_1) strain의 genomic DNA를 RNase로 처리 후 무작위로 절단한 다음에 TruSeq DNA Nano Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용해서 각각의 library를 제작하였다. 염기서열 분석은 HiSeq 2500 System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 paired-end sequencing 으로 실시하였다.

(3) WGS 분석을 통한 도입유전자의 위치, 도입 수 및 구조 분석

애기장대 형질전환 계통 AB2-2-1, CDE2-1 및 CDE3-1의 도입유전자가 삽입된 위치는 CLC genomic workbench에서 형질전환벡터 및 애기장대 reference genome 정보를 이용하여 각각 ‘map to reference’ 실시하여 확인을 하였고 분석한 결과는 표2에 나타내었다. 발광유전자 *LuxAB*가 도입된 AB2-2-1 계통은 2개의 T-DNA (transgene)가 inverted repeat 구조로 애기장대 1번 염색체 26,930,478-26,930,539bp에 삽입된 것으로 확인되었다 (Figure 67). 삽입된 정확한 위치와 삽입된 염기서열 및 genomic DNA와 접합한 주변염기서열을 표1에 나타내었다. 삽입위치와 주변 염기서열 분석은 NCBI 데이터베이스에서 BLAST 분석을 수행하여 확인하였다. 이 과정에서 T-DNA가 삽입된 위치의 genomic DNA의 62nt 염기가 결실된 것으로 확인되었으며 T-DNA의 LB border부분에 각각 1nt 및 8nt 염기가 결실된 것으로 확인되었다.

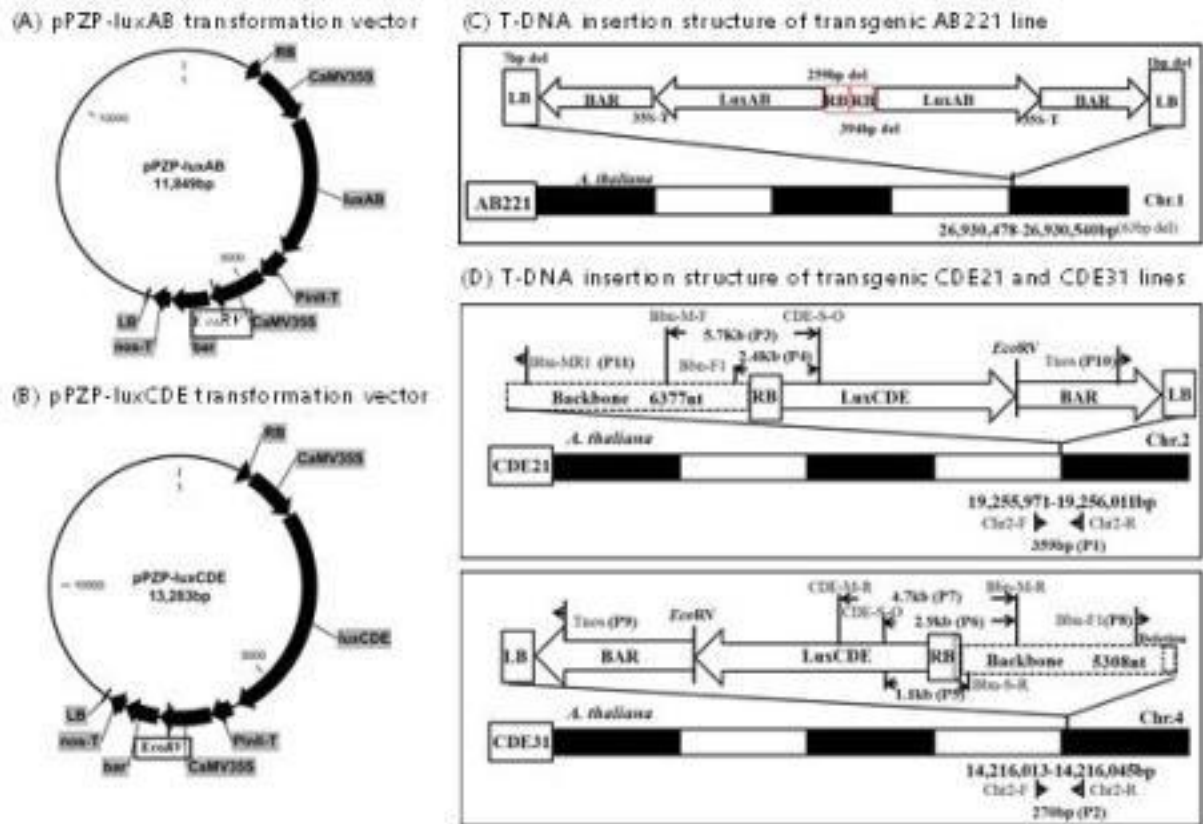


Figure 67. 애기장대 형질전환계통의 형질전환벡터 (A and B) 및 도입유전자 도입위치 및 도입구조 (C and D).

표 2. Reference mapping으로 애기장대 도입유전자의 위치 및 구조 분석

Plants (T-DNA vector)	Read depth	Potative copy number	T-DNA flanking sequence	T-DNA junction region	Genomic junction regions	T-DNA insertion Chr	Within: gene-intergenic	Backbone carrying
AB221 (pPZP-LuxAB)	0.46	1	1)CAATTOAACTGATGGGCTA CAATTOTTTTGGGGCCCTA AGCCC	LB	26,930,478- 26,930,539	1	Intergenic	No
			2)TTGOTTCAATCTTCCTCGTT TAAAAACAATTCATT	LB	26,930,443- 26,930,478			
CDE21 (pPZP-LuxCDE)	0.59	1	1)GTATATAAAATCCAAATTT GCAAAACAAAAGCCTCCAA AG	LB	19,256,020- 19,256,060	2	Intergenic	Yes
			2)GTC AATTAATACATTATAAT ATAGTAA	Backbone	19,255,044- 19,255,970			
CDE31 (pPZP-LuxCDE)	0.66	1	1)ACACATTCGGAACOTTAGC TCCGATCAATAAGCTTCT	LB	14,215,981- 14,216,009	4	Exon (AT4g28780.1)	Yes
			2)CCCTTCAGTTTAACTAT CAGTTTAA	Backbone (left direction)	RB 183-185 bp (reverse)			
			3)AASITGTAAGTCGTTTACC GCGT TTAATTTTATATGAA	Backbone (right direction)	14,216,053- 14,216,091			
			4)GTGCCGAGCTCCCGGTCC GGAGCTGTTGGCTGCGTGG	RB	Backbone 38- 1 (reverse)			

지방산 생합성 유전자 *LuxCDE*가 도입된 형질전환계통 CDE2-1 및 CDE3-1은 각각 1 copy의 T-DNA가 도입한 것을 확인하였다. CDE2-1은 애기장대 2번 염색체의 19,255,971 - 19,256,011 bp 부위에 삽입되었고, CDE3-1은 4번 염색체의 14,216,013

- 14,216,045 bp 위치에 삽입된 것으로 분석되었다(표 1). CDE2-1계통에서 형질전환벡터 backbone 6409nt의 염기서열을 검출되었으며 T-DNA가 backbone-RB-LB으로 삽입한 구조를 추측하였다. T-DNA삽입해서 genomic DNA가 41nt의 염기 또는 T-DNA LB구역에서 15nt 염기가 결실된 것을 확인되었다. CDE3-1계통의 경우 5308nt의 backbone 염기서열이 같이 삽입한 것을 확인하였고 T-DNA가 LB-RB-backbone 구조의 reverse형태로 애기장대 genome에서 삽입된 것을 확인 하였다. 삽입위치의 genomic DNA가 33nt 염기서열, 또는 T-DNA LB 영역의 10nt, RB 영역에서 158nt의 염기서열이 결실된 것으로 확인되었다. 형질전환체가 모두 heterozygous 계통인 것을 확인하였다 (Figure 68).

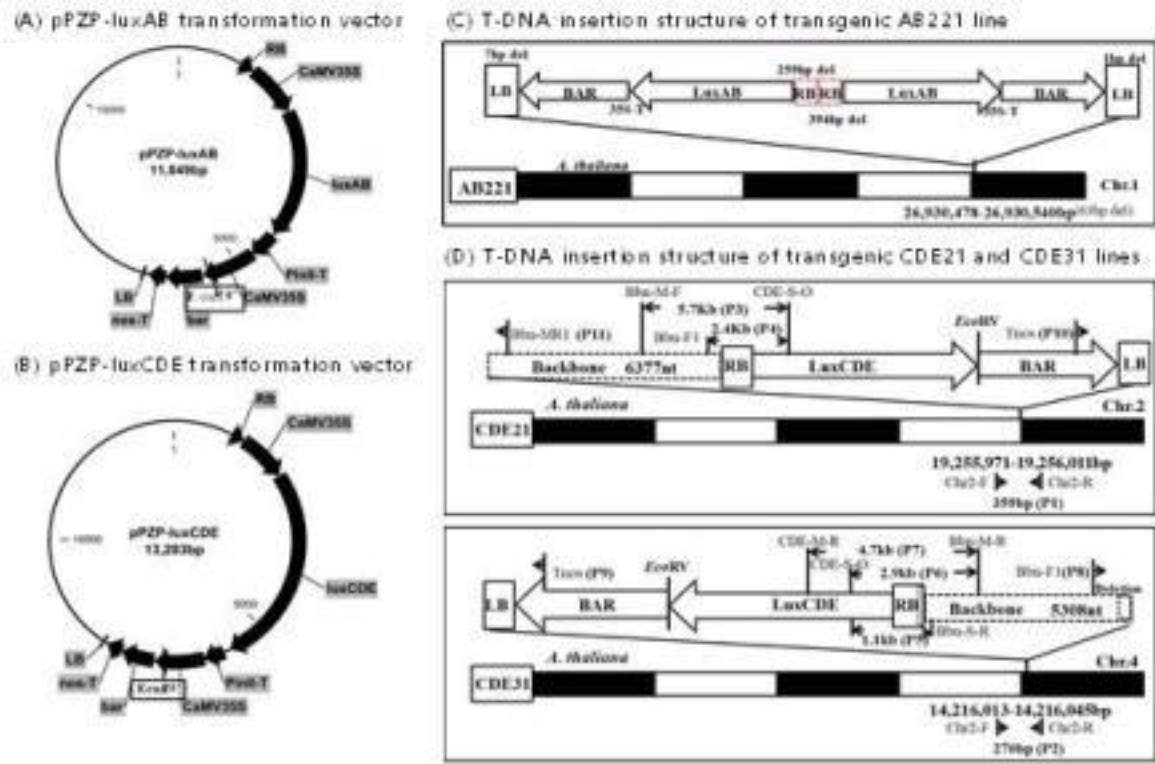


Figure 68. 애기장대 형질전환계통의 형질전환벡터 (A and B) 및 도입유전자 도입위치 및 도입구조 (C and D).

라. *LUX AB*와 루마진 단백질을 동시에 발현하는 형질전환 애기장대 제작

(1) 연구 내용

다양한 자체 발광 세균은 청녹색의 발광을 외부에 발산하는 데, 대개의 경우 발광과 형광이 동시에 관여하는 경우들이 보고되었다. 예를 들면, *Photobacteria phosphoreum*의 경우, luciferase 활성에 의해 생성된 빛이 lumazine이라는 형광 기질에 전해져 최종 밝은 청녹색의 빛을 낸다. 이에 착안하여 본 연구에서는 *P. phosphoreum*유래의 luciferase AB와 루마진 단백질을 코딩하는 *lux L* (혹은 *LumP*) 유전자를 동시에 발현시켜, *Lux AB*에 의해 유도되는 발광이 증진되는 지, 혹은 발광이 lumazine의 형광 형태로 전환되는 지를 연구하였다. 이를 위해서 *LUX AB*와 *LUX L*을 각각

발현하는 형질전환 애기장대를 제작한 후, 유전교잡 (cross)를 통해서 *LUX AB* x *LUX L* 동시 발현 계통을 제작하고자 했다. 또한, 제반 연구를 보다 cell 수준에서 보다 효율적으로 진행하기 위해서, 애기장대 원형질체에 *LUX AB*와 *LUX L*을 발현시키는 일시적 발현 시스템을 구축했다.

(2) 형질전환 애기장대 계통 구축

전체 *LUX* operon을 엽록체에 도입시켜 자체 발광 식물을 개발하는 것은 본 과제와 주요 목표 이기는 하나, 형질전환 효율이 낮은 단점이 있다. 이에 대한 대안으로서 본 연구팀은 여러조합의 *LUX* 유전자들을 식물의 핵에 도입시킨 후, 차후 유전적 교배를 통해서 전체 *LUX* 유전자들을 함유하는 형질전환 교잡 세대를 개발하고자 한다. 우선, 첫 번째로 발광 과정에 중요한 조절인자인 luciferase 효소 단백질을 인코딩하는 *LUX A*와 *LUX B* 유전자를 중간에 아미노산 잔기들로 연결하여 하나의 fusion된 복합 단백질을 발현시킬 수 있는 시스템을 구축했다.

(가) *LUX AB* 융합 유전자를 식물 과발현 벡터인 *pCB302ES*에 도입

LUX AB 융합유전자를 핵에 도입시켜 과발현시킬 수 있는 플라스미드로서 *pCB302ES*를 이용하였는데, 상기 벡터는 35S CaMV promoter, nos terminator, tobacco omega leader sequence 그리고 HA tag를 함유하고 있어서 과발현 및 단백질 축적정도를 쉽게 monitor할 수 있게 한다. 우선 *LUX AB* 유전자를 *P. phosphoreum* *LUX* 유전자를 함유하고 있는 *pPPP7-4* 플라스미드에서 PCR을 이용하여 증폭한 후, *BamHI*과 *StuI* 제한효소 부위를 이용하여 *pCB302ES*에 도입하였다 (Figure 69).

(나) *P. phosphoreum*의 lumazine 단백질 유전자를 *pCB302ES*에 도입

Lumazine 단백질은 genomic 위치 상, *LUX* operon과 연결되어 있으며, lumazine이라는 화학물질의 형광을 유도한다. lumazine에서 기인하는 형광도 *P. phosphoreum*의 자체 발광에 synergistic하게 영향을 주는 것으로 예측되는 바, 본 과제에서도 Lumazine 단백질의 유전자를 식물에 도입하고자 하였다. 상기한 *LUX AB* 융합유전자와 동일한 방법으로, *pCB302ES* 벡터에 Lumazine 유전자들 도입하였다.

(다) 애기장대 핵 형질전환

클로닝된 *pCB302ES::PpLUX AB*와 *pCB302ES::PpLumazine* 유전자를 각각 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입시킨 후, floral dipping 방법으로 애기장대를 형질전환시켰다. 현재, 형질전환체의 T1세대가 선별중에 있으며, 차후 발현 수준이 높은 형질전환 계통을 선정하여 in vitro 조건에서 발광 기질을 넣어 주었을 때, 발광 효율을 측정하고자 한다.

(3) 일시적 발현 시스템의 구축

본 과제의 애로기술은 식물 세포내에 도입된 *P. phosphoreum* *LUX* 유전자들이 높은 효율의 발

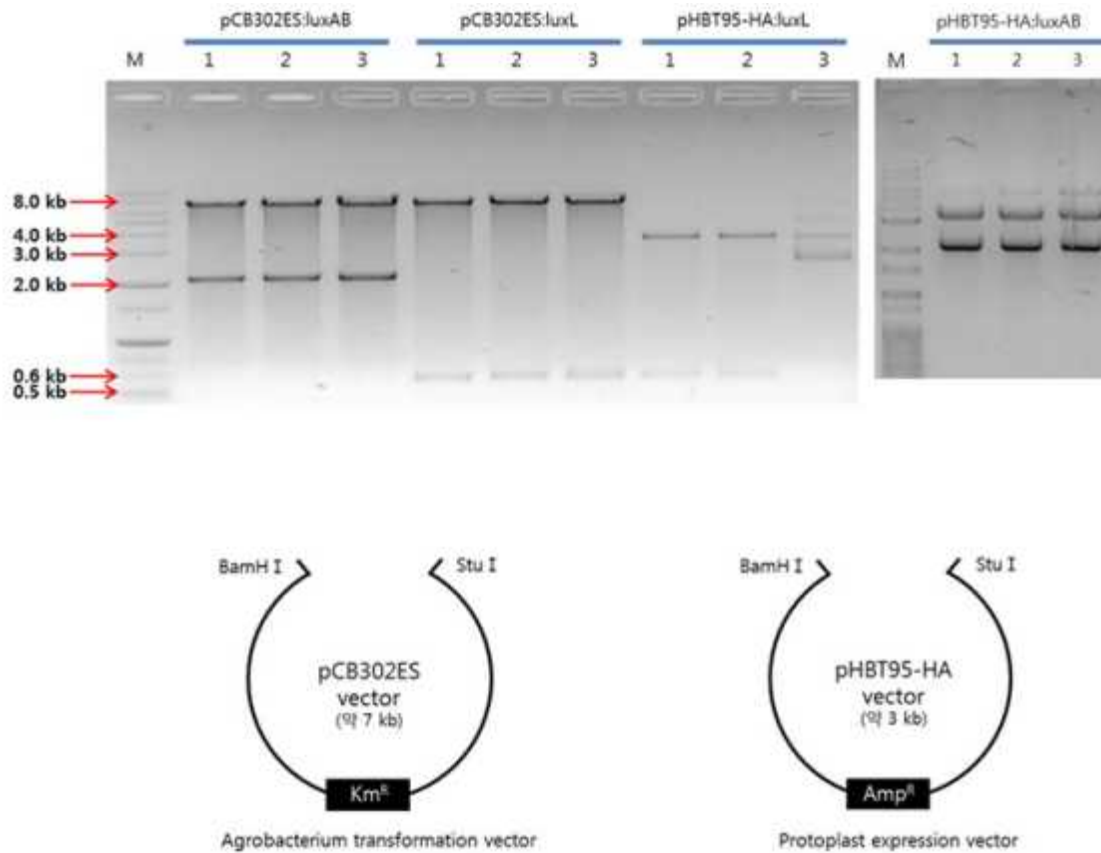


Figure 69. Cloning of *LUX AB* and Lumazine genes into plant transformation vector

광 세기를 유도할 수 있도록 하는 점이다. 실제 형질전환체를 제작하여 확인하는 방법은 시간이 오래 소요되기 때문에 짧은 시간에 도입된 유전자들의 발광 유도 수준을 확인할 방법을 구축할 필요가 있다. 본 과제는 이를 위하여 애기장대 protoplast에 *LUX AB* 및 *lumP* 유전자들 각각 과발현 시킨 후, 외부에서 발광에 필요한 기질을 포화상태로 공급하여 최대 발광효율을 측정하고자 하였다.

(가) 발광유전자들을 원형질체 일시적 과발현 벡터인 *pHBT95-HA*에 도입

상기의 발광유전자들을 *pHBT95-HA* 벡터 (35S CaMV promoter enhancer sequence, promoter, nos-terminator, ampicillin selection marker, HA-tag)에 삽입시켰다 (Figure 70)

(나) 애기장대 원형질체에서 과발현된 발광 단백질들의 검출

pCB302ES (핵형질전환)과 *pHBT95-HA* (원형질체 일시적 발현)의 경우 모두 HA tag를 함유하고 있기 때문에, 발현된 단백질들의 추적 정도를 확인하기 용이한 점이 있다. 본 과제는 이를 활용하여 상기 발광유전자들을 발현하는 애기장대 원형질체에서 단백질을 추출하여 western blot 분석을 실시하였다. 결과로서, 과발현된 단백질들을 특이적으로 검출하지는 못하였다. 그런데 원형질체 형질전환 효율의 positive control로 쓰인 여러 유전자들의 발현 또한 확인되지 않은 점을 토대로 원

형질체 형질전환 효율에 문제가 있다고 판단된다. 조건 최적화를 통해서 안정적으로 발광 유전자가 과발현된 시스템을 구축하고자 지속적으로 노력중이다.

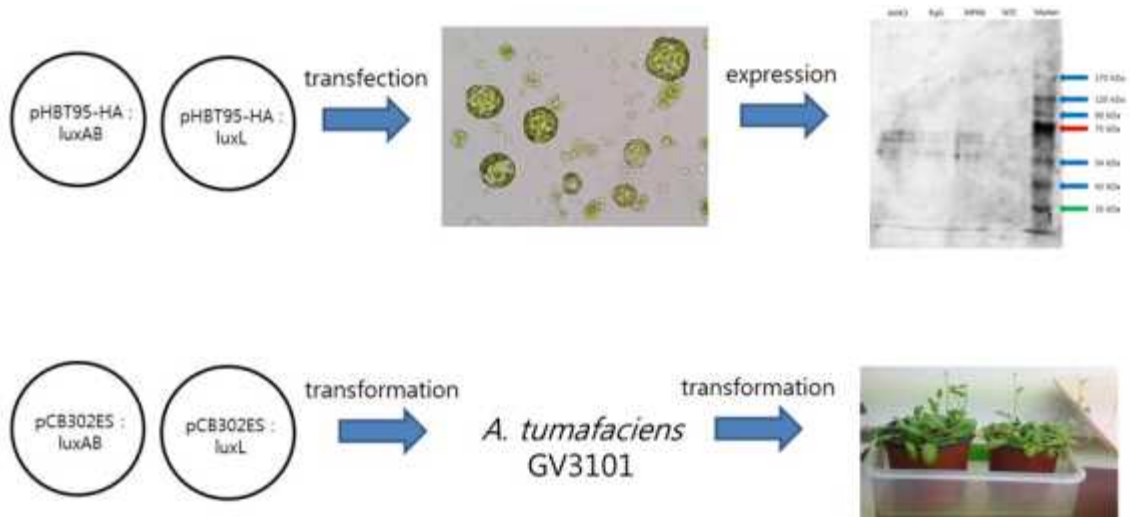


Figure 70. The transformation of *Arabidopsis* plants and protoplast with *LUX AB*와 *LUX L* (lumazine gene).

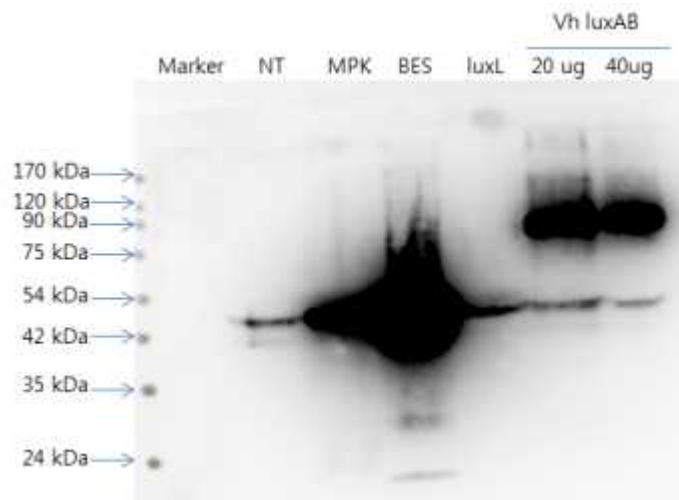


Figure 71. The transient expression of *LUX AB* in *Arabidopsis* protoplast

(4) 자체 발광 유전자 발현 애기장대 제작

(가) *P. phosphoreum Lum P*와 *LUX AB* 발현 애기장대의 구축 및 교잡

- 3년차에 이미 LUX A와 LUX B의 융합 유전자를 제작하여, 이를 애기장대에 도입하였으며, 발광 기질인 decanal을 처리하였을 때, 자체 발광을 분석기기 감도수준에서 확인하였음.
- 4차년도에서는 몇몇 자체 발광 세균들이 lumazine이라는 물질에 결합하여 약 496 nm에서 형광을

유발하는 단백질 (lumazine protein)을 함유하고 있고, 이러한 기작이 Luciferase A와 B에 의해 유도되는 자체 발광세기를 증진시킨다는 점에 착안하여, *P. phosphoreum*에서 lumazine protein을 코딩하는 *Lum P* 유전자를 클로닝하여, 이를 과발현하는 애기장대를 제작하였으며, 이들 형질전환 애기장대에서 해당유전자 발현을 단백질 수준에서 확인함 (Figure 72)

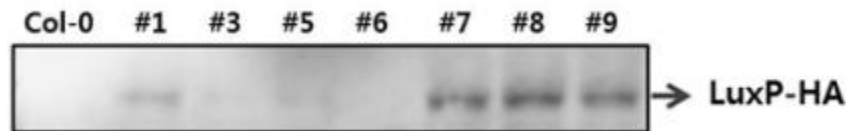


Figure 72. The accumulation of *P. phosphoreum* LUX P proteins fused with HA epitope in *Arabidopsis*.

- 또한, *Lux P*를 발현하는 애기장대의 protein extract에 형광기질인 lumazine을 첨가한 후, 495 nm에서의 형광 emission 파장의 세기를 분석한 결과, *Lux P* 단백질을 축적하는 애기장대의 계통들에서 높은 형광 특성을 보임을 확인함 (Figure 73)

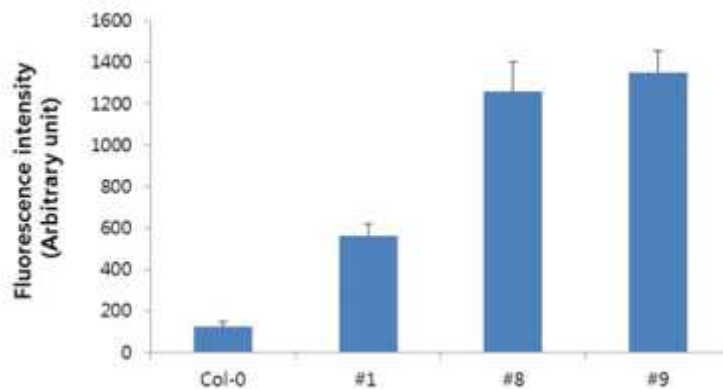


Figure 73. The fluorescence intensities of wild type and *Arabidopsis* expressing *P. phosphoreum* *Lux P* gene.

The *Arabidopsis* seedlings were collected and its proteins were extracted. The 0.05% lumazine were added to the protein extracts and monitored for the fluorescence at 495 nm.

(나) *Lum P*와 *Lux AB* 발현 애기장대의 교잡

*Lux AB*가 유도하는 자체 발광의 세기를 증진시키기 위해서 *Lux P*가 가장 높은 수준으로 축적되는 애기장대 계통 (#9)과 이미 선별된 *Lux AB*를 발현하는 애기장대간의 유전적 교잡을 실시하여, F1 세대의 복합 형질 애기장대라인을 확보함 (Fig 74). 우선, 두 유전자원의 교잡을 통해서, lumazine의 형광세기가 증진되는지 확인하고자, 각각의 애기장대 계통의 유묘에서 protein extract를 추출한 후, lumazine을 0.05%되게 처리한 후, UV를 excitation 시면서, 495 nm에서 emission되는 형광 세기정도를 비교하였음. 그 결과, 기존의 *Lux P*를 과발현하는 형질전환계통에서 가장 높은 형광 세기를 보였음. 한편, 주목할 점은 *Lux P*와 *Lux AB*의 교잡 F1 세대에서, *Lux AB*만을 발현하는 애기

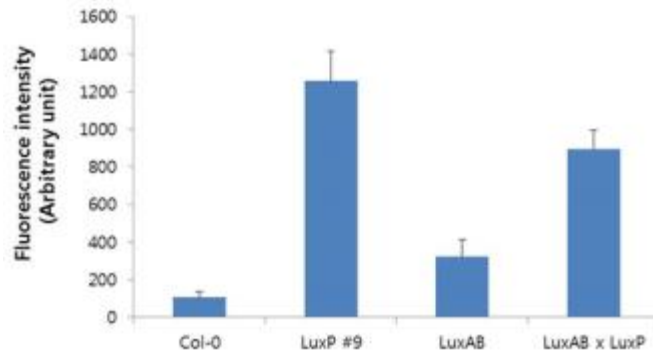


Figure 74. The comparison of fluorescence of *Arabidopsis* lines in presence of lumazine.

장대보다 높은 형광세기를 보이는 것임 (Figure 74).

또한, *LumP*와 *LuxAB*이 동시에 발현될 경우, 실제 *LuxAB*에 의해 조절되는 자체발광의 세기가 증진될 수 있는지를 확인하기 위해서, decanal을 처리한 후, 발광 세기를 각각의 애기장대별로 측정하여 비교하였음. 그 결과, *LumP* x *LuxAB*의 F1 세대에서 가장 높은 발광세기를 보이는 것으로 확인됨 (Figure 75). 이는 *LumP*의 발현이 *LuxAB*만으로 조절되는 자체발광세기를 증진시킨 것으로 볼 수 있다.

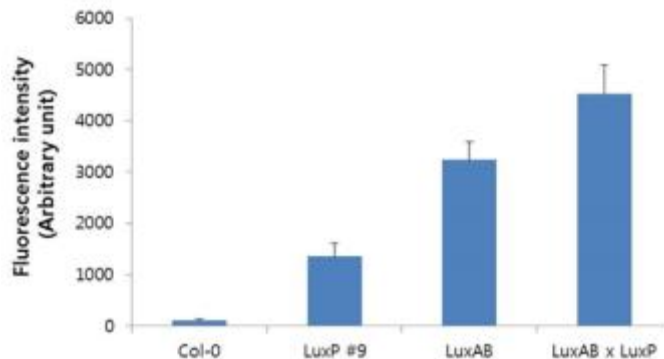


Figure 75. The comparison of luminescence of *Arabidopsis* lines in presence of decanal, the substrate for autoluminescence.

5. 화훼 산업 국내의 시장 동향

가. 국내 산업 현황

(1) 화훼산업의 변화

(가) 90년도 하반기부터 수출유망작목으로 각광을 받기 시작하였으며, 국가 경쟁력을 갖춘 고부가가치 산업으로 크게 성장하여 2010년까지 증가추세에 있다. 농가 수(호)는 2000년까지 증가추세에 있다가 그 이후로는 소폭 하락세를 보이고 있다. 재배면적과 생산액은 2005년까지 가파르게 상승하다가 농가수의 감소에 따라 하락하고 있는 추세이다. 수출액은

일본의 엔저 현상과 화훼가격의 하락으로 인해 2010년까지 증가추세에 있다가 현재에 이르기까지 회복하지 못하고 감소추세에 있다.

(나) 화훼산업의 변화 추이 (1990~2016)

구분	1990	1995	2000	2005	2010	2014	2015	2016
농가 수(호)	8,945	12,509	13,080	12,859	10,347	8,688	8,328	7,837
재배면적(ha)	3,503	5,343	5,891	7,950	6,829	6,222	5,831	5,365
생산액(억원)	2,393	6,090	6,649	10,101	8,510	7,047	6,332	5,602
수출액(만\$)	144	636	2,889	5,214	10,307	4,060	2,846	2,643

출처 : 농림축산식품부

수출액(단위: 천\$)

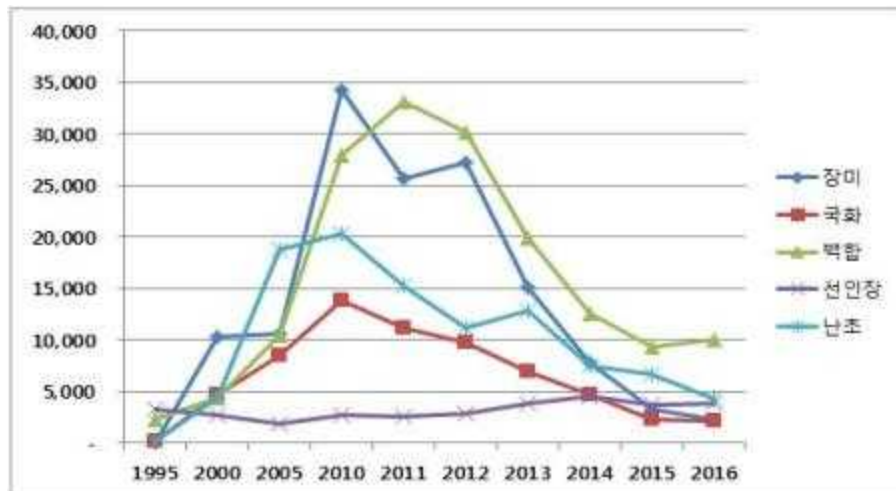


그림 76 화훼 및 관상 작물 별 수출액 규모

(다) 나라별 수출실적

(단위: 톤, 천불, %)

구분	2016(A)		2017(B)		증감률(B/A)	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액
합계	2,937	26,464	2,711	23,630	▽7.7	▽10.6
일본	1,989	17,349	1,924	14,984	▽3.3	▽13.6
중국	585	4,024	392	2,839	▽33.0	▽29.5
미국	178	2,267	199	2,699	△11.9	△19.0
대만	10	417	31	1,073	△223.5	△157.2

- 수출품종 식재 기피에 따른 수출물량 부족으로 절화로 수출 부진 지속, 다육식물은 중국 정식 통관물량 증가, 대만 등 중화권 시장 확대에 수출증가

(라) 화훼류: ('16) 26.4백만 불 → ('17) 23.6 백만 불, ▽ 10.6%

- 절화류는 주 수출시장인 일본의 한국산 화훼 수요는 꾸준히 있으나 수출단가는 등락 없이 계속 하락 추세로 생산 농가의 채산성 악화에 따른 수출용품종 식재 기피 현상 심화 및 수출물량 부족

(단위: 톤, 천불, %)

품목	2016(A)		2017(B)		증감률(B/A)	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액
백합	927	10,104	918	8,220	▽0.9	▽18.6
장미	487	2,363	455	1,885	▽6.7	▽20.2
국화	293	2,197	258	1,975	▽12.0	▽10.1

- 다육식물은 중국으로 정식 통관 수출물량이 증가하면서 실적이 큰 폭으로 상승했으며, 중국 남방지역, 대만, 동남아 등 수요 확대

(단위: 톤, 천불, %)

주요국	2016(A)		2017(B)		증감률(B/A)	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액
중국	36	1,110	246	1,874	△594.5	△68.8
대만	9	405	29	1,050	△243.2	△159.2

출처: 농림수산물 수출입동향 및 통계, 2017

(2) 국내 화훼 품목별 시장현황

(가) 국화 시장현황

1) 국화는 우리나라 절화류 중 재배면적이 가장 큰 작목이며 수출도 전체 화훼류 수출량의 약 10%를 차지하고 있음 (농림축산 식품부, 2016)

-국화 생산 현황('16) : 재배면적 374ha, 생산량 156백만 본, 생산액 438억 원

-전체 절화류 대비 재배면적 27.4%, 생산량 30.4%, 생산액 24.7%를 차지

-국화 수출액(천\$) : ('14)4,723 → ('15)2,370 → ('16)2,197

2) 2010년 수출액 최대 도달 이후, 급격한 감소추세를 보이고 있음. 수출의 대부분은 일본으로 편중되어 있어 중국, 러시아 등 수출국 다변화를 위한 신규 수출시장을 개척할

필요가 있으며, 최근 국화 생산 및 수출 급증추세에 있는 베트남 시장도 개척할 필요가 있음

(단위: 톤, 천불, %)

구분	2014		2015		2016		증감률	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액
총계	829	4,723	340	2,370	293	2,197	△13.6	△7.3
일본	824	4,701	393	2,366	292	2,187	△13.9	△7.6
중국	2	6	0.4	2.4	0.3	8.9	△32.2	268.2

*자료: 농수산물식품 수출지원정보 (KATI-AG코드 기준)

(나) 장미 시장현황

1) 장미는 우리나라 화훼류 중 비중이 큰 작목이며 수출도 전체 화훼류 수출량의 약 16.6%를 차지하고 있음(농림축산 식품부, 2016)

-장미 생산 현황('16) : 재배면적 292ha, 생산량 150백만 본, 생산액 528억 원

-전체 절화류 대비 재배면적 21.4%, 생산량 29.2%, 생산액 29.8%를 차지

-미 수출현황 : ('14)1,188 → ('15)745 → ('16)487

-그러나 90% 이상의 장미 수출이 일본으로 편중되어 있어 중국, 러시아 등 수출국 다변화를 위한 신규 수출시장을 개척할 필요가 있음

(단위 : 톤, 천불, %)

구분	2014		2015		2016		증감률	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액
총계	1,189	7,807	745	3,264	487	2,363	△34.6	△27.6
일본	1,151	7,440	735	3,157	477	2,257	△35.1	△28.5
중국	0.4	8	1.4	10	6	53	314.7	413.1

* 자료: 농수산물식품 수출지원정보 (KATI-AG코드 기준)

(3) 국내 화훼 품종개발 현황

(가) '90년대 초부터 주요 품목에 대해 국가와 지자체, 민간이 참여한 품종개발과 보급사업 추진

품종보호등록('17)

	국화	장미	백합	팔레놉시스	선인장	코데우스	페튜니아	심비디움
개인	111	28	24	70	0	0	1	1
종자업계	8	60	1	18	0	70	0	1
지자체	280	219	84	29	56	0	11	0
국가	84	87	84	18	85	0	24	3
기타	10	3	15	1	0	0	0	0
합계	493	397	208	136	141	70	36	5

- 1) 품목별 보급률 : 프리지아 57.0% > 국화 30.6% > 거베라 29.8% > 장미 29.5% > 글라디올러스 29.8% 등
- 2) 정부주도 육성품종의 경우는 보급과제 등을 통해 보급이 활발하게 진행되고 있으나 민간육성 품종의 경우는 진입장벽이 높음(정부품종과 로열티 상이함, 보급과제 사업화 등)
- 3) 일부 개인 육종가와 육묘회사 등 민간분야의 육종참여 : 국내의 시장진입의 장벽이 높음

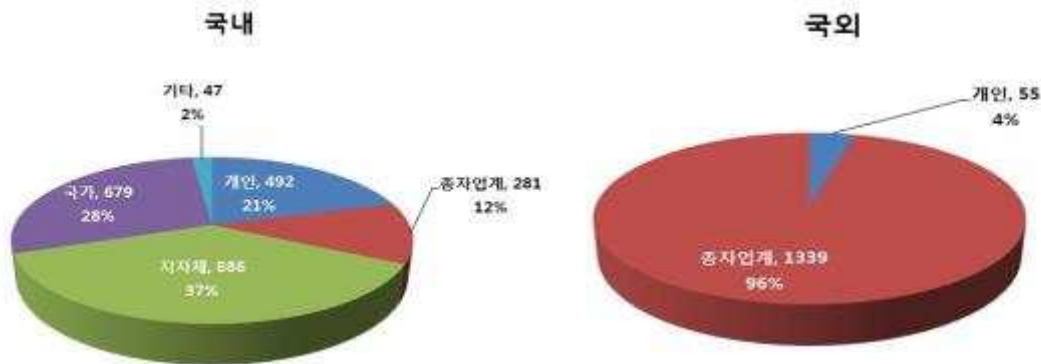
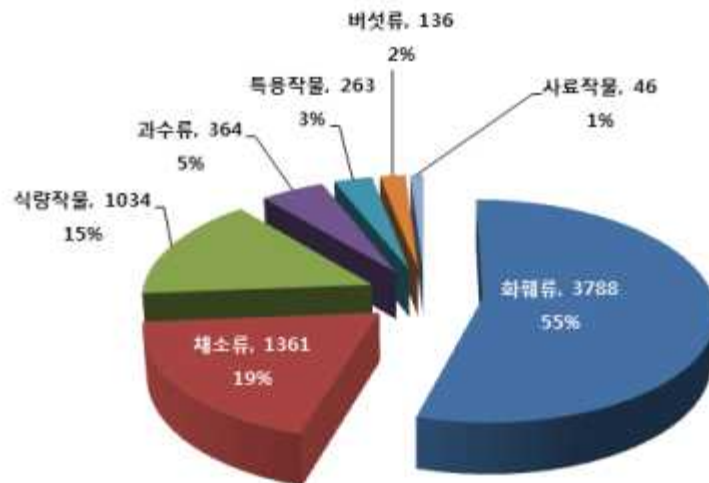


Figure 77. 품종보호권등록 현황, 국립종자원(2017)

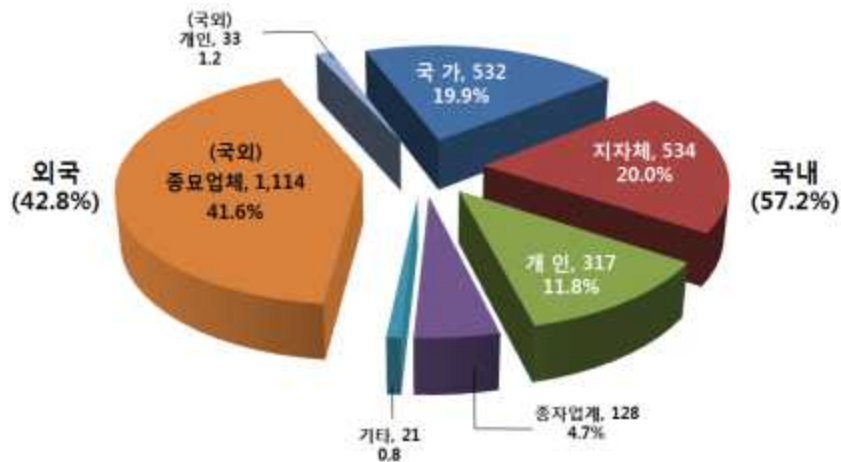
(4) 국내 화훼 민간육종 현황

(가) 국내 화훼류 품종등록 현황

- 총 6,992 품종이 등록 (2018.02, 국립종자원)
- 그 중 화훼류가 3,788 품종으로 55% 점유율 (출원은 5,006 품종)



- 화훼류는 보호 등록된 2,679품종 중 국산품종이 1,532품종으로 57.2% 점유율 국산품종 중 1,066개(69.6%)는 국가기관에서 육성: 정부 주도형 화훼 품종 육성)



- 국내 화훼류 품종개발은 국가와 지방농촌진흥기관을 중심으로 상당한 기술수준에 이르렀으나, 민간의 참여는 매우 저조한 상황임

- 글로벌 종자기업은 글로벌 생산-유통-판매 네트워크가 구축되어 있는 반면에 국내 화훼 종자산업의 구조는 정부주도하에 민간혼합형 산업형태를 취하고 있기 때문에 민간 육종인프라 구축이 미흡한 실정임
- 화훼종묘업체의 공급인프라 구축 취약, 영세, 품종보호권 법적보장 강화가 시급한 실정
- 유전자원 보유는 화훼선진국의 90-100%인 것 대비, 한국은 40%수준으로 저조함

- 교배육종기술은 선진국과 대등하나, 생명공학 기반기술은 선진국의 70%수준의 개발단계임
ex) 일본의 산토리사 청색장미, 호주의 카네이션
- 개인 중심의 육종시작, 민간기업의 육종참여 극히 미미한 실정이며, 또한 전통육종 연구인력 양성 미흡한 실정임
- 해외시장개척 노력 미흡, 주요수출국으로의 수출전략품종개발 미흡, 수출국의 종자시장 및 소비자 기호분석 정보 부족한 실정
- 화훼종묘업계는 세계시장의 트렌드 변화 심하여 품종의 판매주기가 3~5년으로 짧음
- 신품종 개발기술의 세계적 변동추세에 신속한대처가 미흡한 상황
- 돌연변이 육종에 의한 품종의 시리즈, 패밀리그룹 등 다양성 추구에 대해서는 아직도 국내는 초기단계이고 생산단가 높고 기계화 수준 낮음
- 최근 농식품부 주관의 「개인육종가 지원 사업1」 등으로 국화, 팔레놉시스 등 다양한 품목에서 민간 육종가들의 참여가 점차 확대되고 있으나, 육종기술 기초기반(유전자원 유지·보존, 종속 간 교잡 등) 및 종묘생산·유통·보급 체계(조직배양 시설 설치·운영 등)의 부재로 개발된 품종의 실용화율은 미미한 수준임
- 민간육종가 품종등록 현황(2004~2017년 현재) : 총 63품목 453품종
- 현재 민간육종가 등록인 중 88명이 실제 품종육성 및 등록실적이 있음
- 이들 중 지속적으로 품종육성에 종사하는 민간육종가는 20명 내외였음
- 대표품목으로는 국화, 팔레놉시스, 심비디움, 장미 등이었음
- 대표품목의 민간육종가들의 경우 대부분 생산기반을 지닌 소규모 업체형태의 주년생산 시스템을 지닌 가족농, 법인이었음
- 육묘업 또는 재배생산 농가들이 육종시도를 통해 점진적인 발전양상을 보이는 추세임
- 국내 유일한 육종기업으로서 우리꽃(주)은 조경 및 정원용 소재 품종육성, 육묘보급, 생산기반을 갖추고 있으며 육종에서부터 수출 및 국내에서는 도시녹화에 이르기까지 다양성 추구 및 화훼저변확대에 기여하고 있음

(5) 국내 기술 현황

(가) 국화

- 국화 품종육성은 1980년대에 절화용 소국, 화단용 국화 등으로 시작하였으나, 국내 산업 여건의 미성숙으로 크게 부각되지 못하였으나, 1992년 농촌진흥청 원예연구소(현 국립 원예 특작과학원)의 연구인력 증원 등 화훼연구의 기반이 조성되면서 본격적인 품종개발이 착수되었음
- 이 후 지속적인 품종개발로 2017년 원예원을 비롯한 농촌진흥기관 및 개인육종가 등에 의해 493품종의 국내육성품종이 품종등록 되었음
- 또한 비교적 짧은 육종역사에도 불구하고 일월, 핑크프라이드, 백마 등 국산품종이 국내 및 해외 시장진출에 성공하고 국산품종 보급률을 제고로 대외 로열티 부담을 경감하는 등 품종 육성과 관련된 전통육종기술은 상당한 수준임
 - 국산품종보급면적 : (‘06) 36.2ha → (‘14) 136.4, 국산국화품종수출비율 : (‘14) 30.7%

- ‘백마’ 품종 대일수출 : (‘07) 5만본 → (‘14) 200만본(약 150만 불)
- 그러나 목적형질 육종을 위한 유전육종 기술 개발에 관한 연구는 초기 단계로 내병성 육종을 위한 병 저항성 검정방법 개발 및 유전분석에 대한 기초연구가 일부 진행되고 있음
- 특히, 육종연한을 단축하고 육종효율을 증진시키기 위하여 최근에는 유전체를 분석하고 그 정보를 활용하여 유용유전자 개발 및 분자표지 개발을 통한 MAS (Marker Assisted Selection) 등과 같은 분자육종 방법이 다양한 원예작물 육종에 도입되어 활용되고 있으나, 상대적으로 이형접합성과 배수성이 높은 국화의 분자육종 연구는 거의 없는 상황임
- 최근 국내 육성 국화품종(Yes Morning, Hi-Maya, Peace Pink 등)을 이용하여 약배양을 통한 반수체 순계라인 육성(Kabir et al., 2014), 6배체 재배 국화의 배수성에 대한 유전양상 구명(Park et al., 2016), 2배체 야생 산국(*Dendranthema boreale* L.)의 유전체 분석(미발표) 등을 통해 국화의 육종효율을 증진하기 위한 기술개발을 지속적으로 진행 중임
- 지식재산권현황
 - 2017년까지 국내 국립종자원에 품종출원 및 등록된 국화 품종은 724품종으로, 국내 493 품종(68%), 외국 231품종(32%)임

국내 품종보호권 등록 현황 (국립종자원, 2017.12. 기준)

출원 작물	계						국 내						외 국			
	계	개인	중자 업계	지자 체	국가	기타	계	개인	중자 업계	지자 체	국가	기타	계	개인	중자 업계	국가
국화	724	126	224	280	84	10	493	111	8	280	84	10	231	15	216	0

- 육종기술 현황
 - CRISPR/Cas9 기술개발 현황
 - 국내의 CRISPR/Cas9 기술력은 IBS 기초과학연구원의 유전체교정연구단이 세계적인 기술력을 보유하고 있으며 관련 연구 성과를 세계적인 저널들에 발표하며 그 기술력을 인정받고 있는 상태임
 - 관련 국내 선두기업으로는 바이오벤처 업체 툴젠 및 엠젠플러스 등이 있으며 국내외 대학 및 연구소와 공동연구를 함으로써 유전자 가위기술을 이용한 치료제 개발 및 관련 시장 점유를 위해 노력하고 있음
 - 그러나, 가장 기술력이 높은 것으로 평가 받고 있는 IBS 유전체교정연구단 조차 향후 원천 특허에 대한 소유권 결정이 완료되지 않은 상태이며, 식물분야 투자가 상대적으로 적어 품종개발보다는 유전체 교정기술 고도화에 연구가 집중되고 있는 등 농업적인 형질개량을 목적으로 진행되고 있는 예는 아직 미비한 상황

- 원형질체에 sgRNA와 Cas9 단백질의 결합체인 ribonucleoprotein (RNP) complex를 transfection 하여 애기장대 PHYB 유전자, 담배 AOC 유전자, 벼의 P450과 DWD1 유전자 및 상추의 BIN2 유전자를 교정하였으며 상추의 경우에는 유전자가 교정된 원형질체로부터 식물체로 재분화 하는데 성공하였음
- IBS 기초과학연구원의 유전체교정연구단은 곰팡이 변종인 TR4에 멸종할 위기에 처해 있다는 바나나의 경우 유전자교정을 이용하여 파나마병에 내성을 갖는 개량종 바나나를 개발하고자 연구 중임
- 우리나라 화훼산업의 부흥을 위해서는 이러한 첨단 기술과 우리나라가 비교우위성이 높은 전통육종과 융합을 통해서 새로운 가치를 창조하는 일이 필요한 상황이나, 국내 기술진에 의해서 CRISPR/Cas9을 통해 화훼작물의 유전형질을 변화시키고 품종화 한 예는 아직 없는 상황임

(나) 장미

- 국내 장미 신품종 육성은 1990년대 초 원예연구소(현 국립원예특작과학원)를 중심으로 시작되어 1995년 이후 각 도농업기술원 및 시군농업기술센터로 확대되었으며, 최근 들어 민간으로까지 그 영역이 확대되고 있음 (국립원예특작과학원, 2017)
- 국내 절화장미 육종기술은 200년 이상의 육종 역사를 가진 독일과 네덜란드에 비해 전체적으로 열세에 있는 것은 사실이나, 국내에서 육성된 품종의 수와 외국 육종회사의 국내 출원 품종 수가 서로 비슷한 상황으로 국내 장미 육종산업도 양적으로 크게 성장하였음(국립종자원, www.seed.go.kr)
- 그러나 외국의 육종회사가 연간 30품종 이상을 상업화 및 보급에 성공하는 반면, 국내 육성품종은 연간 5품종을 넘기지 못하는 등 품종의 질적 수준을 향상시키기 위한 노력이 필요한 상황임(한국농수산물유통공사, www.at.or.kr)
- 최근 국내 장미 품종의 육종 목표는 흰가루병, 뿌리혹병 등의 저항성 품종을 육성하는 것으로 국립원예특작 과학원을 중심으로 `엔틱컬` 등 병저항성 우수 장미 26품종(`06~`14)을 개발하였으며, 경남농업기술원, 경기농업기술원, 전남농업기술원 등 각 도 농업기술원에서도 매년 1~3품종을 육성하여 보급하고 있음
- 특히, 경기도 농업기술원 절화 장미 육성품종의 해외판매 기관인 `G-rose breeding`은 국내 `원우무역`사를 통해 세계 각국의 지사와 시험 포장을 가지고 있는 `듀먼오렌지`사와 전략적 제휴를 맺고 해외 판매를 대행하는 계약을 체결하여 국내육성 품종을 수출하고 있음
 - 수출실적(`08~`17) : `딤퍼플` 등 9품종, 450만주 이상(연간 약 50만주 이상)
 - 수출국 : 에콰도르, 케냐 등 19개국
- 또한 카이노스, 국제화훼종묘 등 몇몇 민간종묘업체를 중심으로 품종육종이 시작하여 `지니`(카이노스 사)등 약 10여 품종이 육성되어 보급 중임
- 지식재산권현황
 - 2017년까지 국내 국립종자원에 품종출원 및 등록된 절화 장미 품종은 903품종으로, 국내 397품종(44.0%), 외국 506품종(56.0%)임

국내 품종보호권 등록 현황 (국립종자원, 2017.12. 기준)

출원 작물	계						국 내						외 국			
	계	개인	종자 업계	자자체	국가	기타	계	개인	종자 업계	자자체	국가	기타	계	개인	종자 업계	국가
장미	903	29	565	219	87	3	397	28	60	219	87	3	506	1	505	0

나. 해외시장동향

(1) 세계종자산업 현황

- 세계 종자시장 규모는 2008년 대비 2013년 15.5%, 2015년 27.5%로 확대 예상 (박현태 외, 2013)
 - 향후 15년간 식량 종자시장 연평균 4.5% 성장세 유지(CONTEXT, 2011)
 - 2010년 세계 농작물(field crop) 종자시장 규모가 291억 불, 2025년에는 585억 불 예상(박동배 외, 2015)
- 종자시장의 구조는 유럽 북미 → 아시아, 남미 지역으로 확대, 종자시장의 추가성장 예상
 - 교배종(F₁), 생명공학기술 활용을 통한 GM종자시장의 확대, 종자산업의 융복합화 등으로 종자산업의 지속적인 성장 예상
 - 미국 GMO 종자 확산, 중국 교배종(F₁), 브라질 제초제저항성 콩, 인도 해충저항성 옥수수 & 면화 등으로 확대
- 글로벌 종자 기업들 간의 인수합병에 따른 독과점화 현상 가시화

(2) 해외 화훼 품목별 시장현황

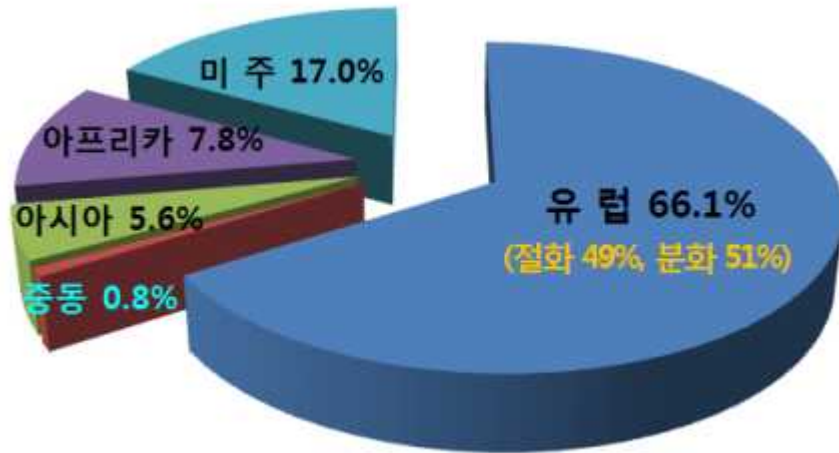
(가) 장미 시장현황

- 2016년 세계 장미 수입액은 2,570백만\$(한화 약 3조원)로 전년대비 1.5% 감소하였으며, 주요 수입국은 네덜란드(27.9%)이며, 미국(18%), 독일 (14.1%), 영국(7.3%), 러시아(7%) 순임



장미 주요 수입국 및 수입액(2016)

(나) 분화 수출현황



- 총 수출규모는 102.8억 유로('12) 이나 증가추세
- 유럽이 66%, 네덜란드는 49%(50.8억 €) 점유
 - 화훼산업은 1990년도 하반기부터 수출유망작목으로 각광받았고 국가 경쟁력을 갖춘 고부가가치 산업으로 크게 성장하였으나, 최근 2010년 이후로 생산 및 수출의 급격한 하락세에 있음

<주요 국가별 수출금액 현황>

(단위: 천\$)

구분	일본	홍콩	중국	네덜란드	미국	캐나다	대만	기타	합계
2010	80,273	53	18,575	1,728	1,332	82	76	942	103,061
2011	73,214	22	12,924	1,149	1,932	62	25	1,268	90,596
2012	70,366	2	9,036	1,170	1,835	97	33	1,421	83,960
2013	44,991	0	10,992	1,718	2,019	128	41	1,264	61,153
2014	27,767	14	7,013	1,716	2,354	141	117	1,482	40,604
2015	17,751	27	5,937	949	2,460	52	77	1,207	28,460
2016	17,349	16	4,024	936	2,267	27	417	1,398	26,434

자료: 농림축산식품부, 2016화훼재배현황

- 주력 수출 품목으로는 절화용 장미, 국화, 나리, 분화용 난, 선인장 등 5대 작목이었으나, 2010년 이후로 주요 수출시장의 여건변화로 화훼류 절화 및 분화류 수출이 약 70%가량 감소함으로써 화훼산업의 기반이 흔들리기 시작함
- 주요 수출대상국은 일본으로 수출시장이 극히 한정되어 있어 여건에 따라 등락이 심함
 - 주 수출국(`11기준): 3대 절화(장미, 국화, 백합)의 95.5%이상 일본 점유
 - `13년도 일본의 엔저정책으로 국내화훼수출 타격
- 주요 분화류인 난초의 주요수출대상국으로는 중국을 중심으로 재편
- 주요 수입국으로는 대만, 중국, 네덜란드 등으로 주로 종묘 및 구근을 수입, 내수 및 수출용으로 사용
 - 절화류 수입국은 중국 > 콜롬비아 > 태국 > 남아프리카공화국 등
 - 절화류의 다양성 미흡, 소비자 기호성 맞춤형 품종 및 지속적인 물량공급의 어려움

<품목별 수출금액 현황>

(단위: 천\$,%)

구분	장미	국화	백합	선인장	난초	기타	합계
2009	20,132	8,004	24,742	2,626	16,519	5,146	77,169
2010	34,235	13,802	27,845	2,756	20,264	4,165	103,067
2011	25,676	11,192	33,088	2,583	15,201	2,856	90,596
2012	27,142	9,759	30,090	2,854	11,224	2,891	83,960
2013	15,064	6,888	19,876	3,828	12,829	2,697	61,182
2014	7,807	4,723	12,309	4,544	7,459	3,762	40,604
2015	3,264	2,370	9,328	3,786	6,648	3,064	28,460
2016	2,363	2,197	10,104	3,855	4,304	3,611	26,434

자료: 농림축산식품부, 2016화훼재배현황

(3) 화훼류 종자산업 현황

- 세계 종자 교역 규모에서 화훼종자의 비중은 2.9%(장미, 국화) 차지함
- 화훼종자의 주요수출국이자 주요수입국인 네덜란드, 미국, 독일, 일본은 무역수지 흑자 기록의 종자수출국으로서 국제 종자교역의 허브 역할 함

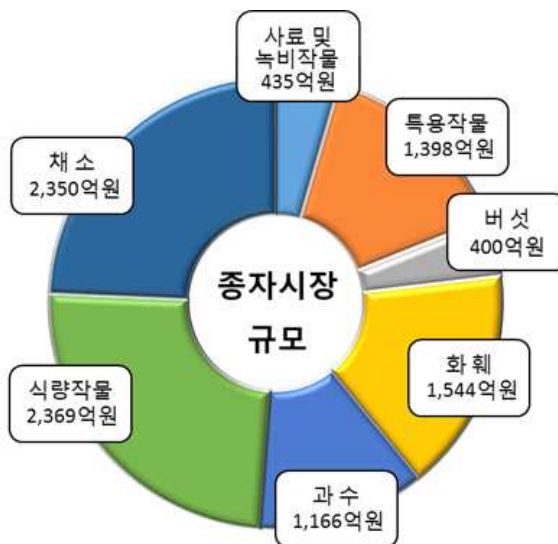
세계 화훼종자 수출액 (2016) 단위: 백만달러



주: () 내는 전체 세계 화훼종자 수출금액에 대한 각 국가의 비중임.

자료 : ISR(International Seed Federation)

- 국내 화훼종자시장의 규모는 1,544억 원으로 우리나라 전체의 약 16% 해당되며 대부분 영세한 소규모업체임



국내 화훼종자시장 규모 (종자협회, 2015)

- 우리나라 화훼종자시장은 정부주도하의 민간 혼합형 산업형태를 취하고 있음
- 품종개발은 영양번식작물에 대한 로열티 대응을 위한 방어전략 수준으로, 정부기관인 농촌진흥청과 지방자치단체 산하 연구기관에서 품종육성을 지속적으로 추진하고 있지만, 화훼분야 R&D 투자개발이 소극적 상태임

- 대부분 외국품종에 절대적으로 수입에 의존하고 있는 실정이지만 선인장, 장미, 국화, 난의 국산품종의 보급률 향상에 대한 가시적 성과가 나타나고 있음

(4) 해외 기술 현황

(가) 국화

- 외국의 경우 민간육종회사에 의해 상업용 품종들이 대거 개발되고 있으며 국제간 공조체계를 유지하며 시장을 선점하고 있음
 - 정홍원(일본) ↔ Royal van Zanten(화란), (주)기린(일본) ↔ Fides(화란) → Dummen Orange(화란)
- 특히, 일본은 동양권에서 소비가 많은 대국과 소국의 대부분 품종을 개발하고 있으며, 화란은 스프레이 국화 품종을 중심으로 세계시장을 석권하고 있음
- 분자유종연구와 관련하여 네덜란드 WUR에서는 국화 SNP genotyping을 통한 고밀도 유전자 지도를 작성하고, 이들 마커의 유전분석을 통한 6배체 국화의 유전양상을 구명하였음
- 중국에서는 국화의 preliminary genetic linkage map을 작성하여 보고하였고, 대량의 cDNA library를 제작하여 약 8,000여개의 EST를 NCBI에 등록하였음
- 또한, 국화 반수체 육성을 위한 약배양과 소포자배양의 최적 배지 조건을 구명하여 국화 기내배양 시 캘러스 유도과 뿌리 성장에 적합한 배지 호르몬 조성을 확인하였음 (Yang et al., 2005)
- Yang et al. (2010)은 재배 국화(*D. grandiflora*)의 가뭄저항성을 향상시키기 위하여 *Chrysanthemum indicum* L. 야생종과 중간교잡 하였고, Sun et al. (2010)은 위의 중간교배 후대 집단을 분석하여 국화의 프롤린 함유량, 뿌리털, 식물 생존율이 높아진 것을 확인하였음. 또한 He et al. (2016)은 재배 국화(*D. grandiflora*)의 방향성을 증진시키기 위하여 *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*과 중간교잡을 시도하였음
- 경쟁기관현황
 - 네덜란드, 영국, 독일, 미국 등 종자선진국은 거대자본의 투입양상을 보이며 민간 육종회사가 품종개발, 종묘보급 및 마케팅 Network 구축 등, 전 세계시장을 장악하고 있음
 - 최근 글로벌 M&A에 따른 업체 간의 통합을 통해 적도지역의 생산적지에 대규모 생산시설을 설립하여 개발품종을 투입, 세계 화훼시장의 공급처로 운영하고 있음
 - 현재 세계 국화 종자시장은 네덜란드 육종업체에서 전체 시장의 90% 정도를 장악하고 있으며, 최근 베트남의 하스팜이 아시아의 허브로 자리매김하면서 품종육성에 박차를 가하고 있음

○ 대표적인 국화 육종 회사

국 가	육 종 회 사
네덜란드(4)	데커(Dekker), 듀먼오렌지(Dummen orange), 델리플로어(Deliflor), 로열반잔텐(Royal van Zanten)
일본(5)	정홍원(Seikoen), 암전농원, 빈송특화원, 수방원, 소정호미소원
이스라엘(1)	단지거(Danziger)
베트남(1)	하스팜(Dalat Hasfarmt)
미국(1)	요더(Yoder)

- 네덜란드의 Dekker Chrysanten은 세계적인 육종회사 중 하나로, 탄자니아와 한스브룩에 자체적인 생산시설을 보유, 신품종 국화 육성을 통해 화훼시장을 주도하고 있음
- 네덜란드의 Deliflor 또한 국화에 있어 세계적인 육종 기업으로, 매년 새로운 국화 품종 소개, 전시회 개최 함. 300가지 이상의 스프레이, 디스버드, 산티니 형태의 국화를 취급하고 있음
- 네덜란드의 Fides(Dummen Orange)는 전 세계적인 절화, 분화 국화 육종 회사로 Barcadi, Arctic Queen, Celebrate와 같이 잘 알려진 품종을 취급하고 있음
- 베트남의 Dalat Hasfarm은 국화의 생육적지에 위치한 육종회사로, 51품종의 국화를 취급하고 있음. 아직은 네덜란드 우수 국화육종회사에 비해서는 기호성이 떨어지는 수준임

○ 지식재산권현황

- 국화 지식재산권 조사 결과, 기존 특허는 주로 신품종 보호등록 관련임
- 국화 기능성 물질을 이용한 제품 등록, 화색·화형 등 형태적 형질에 대한 형질전환 식물체 육성 관련임

○ CRISPR/Cas9 유전자 가위 기술개발 현황

- 불과 6년 전인 2012년 크리스퍼 (CRISPR/Cas9) 유전자 가위의 기술 개발 이후, 미국, 중국 등에서 인간대상의 질병치료 임상시험 시작 계획을 발표하는 등 관련 기술이 발전하고 세계적으로 주목을 받고 있음
- 크리스퍼 유전자 가위 기술은 2015년 Nature지와 Science지에서 혁신기술로 선정되었고 2014년과 2016년 연속 MIT 에서 혁신기술로 선정되는 등 정교한 유전자 교정 기술로 각광 받고 있는 상황임
- 최근 크리스퍼 유전자 가위에 의한 유전자편집 기술이 GMO 회피기술로 인정될 가능성이 고조되면서 새로운 작물 품종 개발을 위한 새로운 방법으로 연구자의 관심이 크게 증가되고 있음
- 기존에 GMO로 연구되면서 그 실용성에 의구심이 있었던 작물의 생산성 향상, 기능성 물질 생산증대, 제초제 저항성, 알리지 유발물질 제거, 환경저항성 증대, 병저항성 증대를 갖는 품종 개발을 Non-GMO 개념으로 연구할 수 있게 되며 더욱 많은 연구 분야에 적용되기 시작함

- 유전자 교정을 이용한 대사물질 조절 품종 개발의 예로, CRISPR/Cas9을 이용하여 버섯의 polyphenol oxidase를 교정함으로써 폴리페놀의 산화를 막아 색을 오래 유지시킬 수 있도록 갈변 저항성을 향상시킨 버섯을 개발함. 미국 농무부(USDA)는 Yang 연구팀의 버섯을 GMO 규제대상에서 제외한다고 발표함
- 유전자 교정을 이용한 병저항성 품종개발의 예로, TALEN을 이용하여 3개의 TaMLO 유전자에 mutation을 일으켜 powdery mildew 병에 저항성을 갖는 밀을 개발함 (Dr Caixia Gao and Jin-Long Qiu team 중국)
- 가장 최근으로는 2017년 일본에서 CRISPR/Cas9 유전자 교정을 이용하여 일본의 전통적인 정원 식물인 Japanese morning glory (*Ipomoea nil* or *Pharbitis nil*)의 화색을 바꾸는데 성공하였음
- 국화와 관련해서는 2017년 Sasaki 그룹에서 CRISPR/Cas9을 이용하여 국화 (*Chrysanthemum morifolium*)에서 Agrobacterium-mediated transformation 방법을 통한 genome editing의 가능성을 열었음
- 그러나 6배체 국화의 특성과 유전체 정보의 부족으로 실제 국화의 genome을 편집한 것이 아니라 형질전환체 국화를 제작한 후 외부에서 도입된 유전자를 편집하는 방법을 사용하였음

(나) 장미

- 유럽은 200여년 이상의 장미 육종 역사를 가진 네덜란드, 독일, 프랑스 등 유럽 12개 육종회사가 장미 육종(품종보호권)에 박차를 가하고 있으며 스탠다드 중심의 대형 품종을 매년 100여 품종 이상 육성하고 있음
- 현재 세계 장미 종자시장은 독일과 네덜란드 육종업체에서 전체 시장의 90% 정도(네덜란드 50%, 독일 40%)를 장악하고 있으며, 나머지 국가의 육종업체가 10%내외를 점유하고 있음
- 유럽의 민간 육종회사에서는 전 세계의 지역별 상위 품종군을 발굴하고 지역에 맞는 품종을 접목하여 육성하며, 육성된 품종을 케냐, 에콰도르, 콜롬비아 등 고산지역 재배적지에서 생산하여 수출하는 시스템으로, 화란의 유통·물류시스템과 결합하여 폭발적인 시너지 효과를 거두고 있음(장미재배, 농촌진흥청)
- 유럽에서 육성한 품종을 케냐 에티오피아에서 생산하여 유럽으로 수출하고, 남미에서 생산하여 미국, 러시아, 일본에 수출하는 세계적 유통망 형성

○ 대표적인 장미 육종 회사

국 가	육 종 회 사
독일(2)	코르데스(W Kordes sonne), 띠따우(Rosen Tan tau)
네덜란드(6)	스쿠루(Schreurs), 프레스먼(Preesman), 잔스펙 로젠(Jan Spek rozen), 데루이트(De Ruiter), 인터플란트(Inter plant roses), 듀먼오렌지(Dummen orange)
스페인(1)	콘티넨탈(Continental breeding)
이탈리아(1)	너프(NIRP International)
프랑스(1)	메이앙(Meilland international)
영국(1)	데이비드 오스틴(David Austin)

- 주요 육종 목표는 고산지대 환경(주야간 기온차가 크고, 주간 조도가 우수한 환경적지)에 적합한 저온적응성(야온 15℃이하), 대형 품종(절화장 80cm 이상, 개화시 직경 12cm 이상)임
- 또한 장거리 물류 이동시 꽃잎이 상처를 받지 않도록 화형이 둥글고 꽃받침이 위로 향한 형태의 품종, 전형적인 장미의 화형을 벗어난 잉글리쉬 패턴, 토마토타입 등 신화형의 품종, 유통·소비의 편의성을 목적으로 한 가지 없는 장미 품종을 육성하는 등 장미 육종의 트렌드도 변화하고 있음
- 독일의 Max-planck 연구소 등에서는 장미의 흑반병 및 흰가루병 저항성 유전분석 및 고밀도 유전자 연관지도를 작성하였으며, 병저항성 연관 분자표지를 이용한 MAS (Marker Assisted Selection) 시스템 구축을 시도 중임 (PNAS, 2004)



둥근 화형



잉글리쉬 타입



토마토 타입

○ 경쟁기관현황

- 독일 육종업체인 코르데스와 띠따우는 40여 년 전에는 세계장미 시장을 평정하여 점유율이 90%에 달했으나, 약 30여 년 전부터 네덜란드 육종업체가 시장에 뛰어 들어 두각을 나타내기 시작했으며, 스쿠루사를 위시한 듀먼 오렌지사가 근래에 빠른 성장세를 보이며 시장을 확대 하고 있음 (원우무역, 정병수)
- 특히, `듀먼 오렌지사`는 `올라이 로젠`과 `렉스`, `바틀스로즈`, `테라니그라` 등 6개 장

미 육종업체를 합병하여 만들어진 종합 화훼 육종 업체로 앞으로 절화 장미 분야에서 시장을 선도해 갈 업체임(듀먼오렌지, Phillippe veys)

다. 향후 국내 수출 화훼산업 발전을 위한 연구방향

이러한 국내외적으로 어려운 화훼산업이 위기를 극복하기 위하여 지금까지 내수 및 수출시장에서 한국화훼의 Target이 중저가 시장이었다면 향후는 Premium 시장으로 전환되어야 할 것이다. 이를 위하여 품종 개발, 복합환경제어가 가능한 생산시설의 첨단화, 채화 후 절화품질 유지를 위한 수확 후 관리 기술 개발, 절화 수명 보증 시스템 개발, Premium 시장을 Target으로 한 집중적 마케팅 활동 등이 복합적으로 추진되어야 한다

그 중에서도 가장 유효한 방법 중 하나는 우리만 가지고 있는 Premium 품종 개발과 국제 특허가 가능한 자체발광화훼의 개발일 것이다

이러한 자체발광화훼의 개발이 성공적으로 수행되면 한국 화훼가 Premium 시장으로 전환을 추진하는 과정에 많은 촉진효과를 기대할 수 있으며 높은 부가가치를 창출하여 농가 소득 향상에 큰 도움 될 것으로 기대한다.

라. 페튜니아 (초화류 종자 시장 규모)

전체 화훼 시장의 약 10% 정도를 차지함. 초화류 종자의 수입량에 대한 공식적인 통계 자료는 없지만, 국내에서 생산되는 종자는 없어서 거의 전량을 수입하는 것으로 파악. 페튜니아의 경우, 일년초에 속하고, 소비처는 관공서 중심의 행사용이나 거리 환경 미화용의 조경 소재 이용이 85%를 차지함.

페튜니아의 원종은 지구상에 약40여종 정도 있는 것으로 보고된다. 원래는 다년생이나 우리나라에서는 노지에서 월동이 불가능하여 일년초로 취급하고 있다. 일반적으로 페튜니아는 암술과 수술이 모두 정사으로 수정해 종자 번식이 가능하지만, 더블 페튜니아는 암술의 퇴화가 빨라서 종자 번식이 잘 되지 않는다. 따라서, 삼수번식 (깍꽃이)으로 진행해야 하므로 대량 번식이 어렵다. 우장춘 박사가 더블 (겹꽃) 페튜니아를 육종할 것으로 유명하다. 우장춘 박사는 일본에서 종자로 번식하는 더블 페튜니아를 개발하였다. 색상은 30가지 색상의 다양한 품종들이 유통중이다. 주로 유통되는 품종은 샤피니아로 일본 선토리 (Suntory) 품종이다. 대부분 국내에서 유통되는 씨피니아 품종은 정상적인 유통보다는 불법 번식으로 증식되어 판매되고 있다. 연간 소비량은 대략 500만 포기정도 소비되고 있지만, 해마다 수요가 증가하고 있다.

3절. 정량적 성과 요약

성과지표	계획	달성	세부 내용	비고
특허출원 및 등록	3	5	• 10-2016-0102301	
			• 선충 DNA sequence를 이용한 형광단백질의 형광 향상	
			• 10-2017-0130155 (출원 및 등록)	
			• 루마진 단백질과 리보플라빈 생합성 유전자를 이용한 형광 미생물의 제조	
			• 10-2014-0132634	
			• 루마진 단백질의 돌연변이체 및 이의 용도	
기술이전	1	1	• 10-2018-0164123	
			• 형광세기가 증진된 적색형광단백질 변이체	
			• 10-2018-0167735	
			• 생물발광 유도용 재조합 플라스미드	
			• 자체발광 유전자군의 엽록체 형질전환을 통해 꽃잎의 색상이 변화된 페튜니아	노하우 기술이전
			• Velmurugan 외 3명 (2016), Fibers and Polymers, V17(11), pp 1875-1883	SCI
논문	9	5	• 이의호 외 4명 (2016), Korean Journal of Microbiology, V52(4), pp495-499	비SCI
			• Velmurugan 외 8명 (2017) Journal of Photochemistry and Photobiology, B, V173,pp571-579	SCI
			• Velmurugan 외 7명 (2017), 3Biotech, V7, pp147-157	SCI
			• 김다솜 외 3명 (2018), Current Protein & Peptide Science, V19(1), pp16-21	SCIE
			• 2014년 11월 27일 창조경제 박람회, 전시품목: 자체발광 균주, 서울삼성동 코엑스,	
홍보전시	3	1		
학술발표		13	• 2014 한국자원식물학외 외 12건	
생물자원	2	5	• NU-1135: LUX AB-BAR 벡터 염기서열	NABIC
			• NV-1136: LUX CDE-BAR 벡터 염기서열	NABIC
			• NN-5361: 자체발광세균 LUX AB 발현 애기장대 RNA sequence	NABIC
			• NN-5364: 자체 발광 세균 LUX AB 발현 애기장대 genome 염기서열	NABIC
			• NN-5365: 자체발광 세균 LUX CDE 발현 애기장대 gemone 염기서열	NABIC

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 연구 목표

1. 최종목표

고효율 자체 발광능을 지닌 유전자원을 확보하고 발광 시스템을 분석한 후, 자체 발광에 필요한 유전인자들을 화훼작물 (페튜니아 혹은 장미)에 도입시켜서 고부가가치의 신 화훼작물을 개발하고 추후 산업화를 위한 핵심 원천 기술 및 제품에 대한 산업재산권을 확보한다.

2. 세부목표

- 가. 생물 발광 형질을 보유한 해양 세균등의 발광 유전자원을 확보한다. 특히, 이들 자원들의 자체 발광 대사경로에 관여하는 핵심 조절 인자들을 분리하고 이들의 기능을 분석한다.
- 나. 생물 발광 유전자들의 식물 발현 시스템 및 화훼 작물 대상 식물 형질전환체 제작 기법을 확립한다. 자체 발광 화훼 작물의 우선적인 대상작물은 페튜니아로 선정하고, 차후 장미로 기술을 확대시킨다.
- 다. 발광 유전자들에 대한 분자 유전학적 및 단백질학적 분석을 실시하고 이를 토대로 발광 증진 및 형질 개선을 위한 엔지니어링을 시도한다.
- 라. 발광을 나타내는 형질전환 식물 계통의 지속적 유지 및 대량 증식법을 확보한다.
- 마. 발광 유전자를 활용한 화훼작물에 대한 향후 산업화 추진을 위한 지식 재산권들을 확보한다.
- 바. 개발된 형질전환 화훼 작물을 대상으로 이벤트 계통을 선별하고, 도입된 형질에 대한 세대안정성 및 환경 위해성 평가를 준비한다.

2절 목표 달성 여부

1. 세부 목표 별 달성 여부 (요약)

가. 발광 유전자원을 확보하고 발광 시스템을 분석 여부

과제 개시 전, 다양한 경로를 통해서 확보한 수십종의 발광 세균 중에서, 발광 효율의 우수성을 토대로 3종 (*P. leigonathi*, *P. phosphoreum*, *V. harveyi*)의 세균 및 이들이 함유한 발광 유전자들에 대한 클론들을 확보하였다. 또한, 발광 효소 (luciferase) 및 루마진 단백질 유전자들이 관여하는 발광 및 형광 조절 특성을 대장균 재조합 기술을 활용하여 시험관 조건에서 연구하였다.

나. 자체 발광유전자 도입 형질전환 식물의 제작

선행연구에서는 *P. leigonathi*의 LUX operon을 담배에 도입시키기 위한 제반 연구를 수행하였지만, 본 과제의 연구가 개시되면서, 보다 높은 발광 효율을 보유한 *P. phosphoreum*의 LUX operon을 엽록체 형질전환 기법을 활용하여 화훼작물인 페튜니아에 도입하였다. 형질전환체의 재분화를 세대간 지속하여, 야생형 대비, 발광 형질을 띄는 페튜니아 성체를 확보하였다. 또한, *P. phosphoreum*의 LUX operon 유전자들을 개별 유전자 혹은 융합유전자들 수준으로 클로닝하여, 모델식물인 애기장대에 도입시켰으며, 각각의 형질전환 애기장대들을 대상으로 유전 교잡을 실시하여, 발광에 필요한 전체 유전자를 핵에서 발현시킬 수 있도록 융합 형질 애기장대를 제작하였다.

다. 발광 형질 개선을 위한 단백질 엔지니어링

본 과제에서 제작된 형질전환 식물의 경우, 발광 유전자를 도입시켰지만, 가시적 수준에서 뚜렷하게 확인될 발광을 보이지는 않았다. 본 과제는 이러한 결과를 대비해서, 과제 초기 단계에서부터 발광 효율을 증진시키기 위한 엔지니어링 기법에 필요한 기초 연구를 실시하였다. 우선, 발광 효소인 luciferase 활성을 조절하는 아미노산 잔기를 새롭게 동정하였고, luciferase의 활성 저해를 경감시키는 LUX F 단백질의 기능도 구명하였다. 또한, *P. phosphoreum*의 발광에 관여하는 루마진 단백질의 기능 분석을 통해서, 발광 세기를 대폭 증가시킬 수 있는 유전자 발현 시스템을 개발하였고, 단백질 형광을 증진시키는 27개의 아미노산을 가진 small peptide도 동정하는 등, 발광 개선 엔지니어링 기법에 유용하게 활용될 수 있는 다양한 연구결과물을 확보하였다.

라. 형질전환 식물의 지속적 유지 및 대량 증식법 확보

발광 유전자가 도입된 형질전환 페튜니아의 경우, 종자를 맺지 않는 품종을 background 야생형으로 사용하였기 때문에, 형질전환 식물의 세대간 진전 및 지속적 유지는 조직 배양을 통한 재분화 방법에 의존한다. 본 과제에서는 이미 다년간의 연구를 통해, 형질전환 식물의 지속적 재분화 시스템을 구축하였으며, 필요 시, 참여기업이자 협동연구기관인 (주)로즈피아의 구축된 대량 재배 시설을 이용할 수 있다.

마. 산업화 추진을 위한 지식 재산권들을 확보

본 과제를 수행하는 기간동안, 형광 혹은 발광 형질 개선에 필요한 엔지니어링 기법을 활용하여 6건의 특허 출원을 완료하였으며, 이중 한 건은 등록 심사 중, 수정 의견을 통보 받은 후, 재 심사를 요청하여 등록 승인을 기다리는 중이다.

바. 형질전환 식물의 이벤트 계통을 선별, 세대안정성 및 환경 위해성 평가

형질전환 페튜니아의 경우, 현재 유사한 표현형 및 발광 형질을 나타내는 계통들을 선

별하였으며, 이 중 한 계통을 lead event로서 필요한 제반 분석을 실시할 예정이다. 한편, 형질전환 애기장대의 경우, 형질전환 계통들에 대해서 도입 유전자의 계능 상 삽입 copy 수, 위치등의 분석을 실시하였으며, 전 genome의 유전자 염기서열 분석 및 전사체 분석을 실시하여 총 5건의 생명정보센터 (NAVIC)에 유전자원 등록을 완료하였다.

2. 년차별 목표 달성 여부

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 결과
1차 년도	2013 ~ 2014	<ul style="list-style-type: none"> • 자체 발광 유전정보 확보 • 자체 발광 시스템의 구현 <ul style="list-style-type: none"> - 대장균 • 페튜니아 형질전환을 위한 과발현 벡터 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 엽록체 형질 전환 용 - 핵 형질전환 용 	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 발광 유전자원 확보 및 분석 : ATCC를 통한 발광 세균 확보 및 이중 3종의 세균 선정 <ul style="list-style-type: none"> - <i>P. leigonathi</i>, <i>P. phosphoreum</i>, <i>Vibrio harveyi</i> • <i>P. phosphoreum</i> lux CDABEFG operon 클로닝 및 대장균 형질전환 (가시적 발광 확인) • <i>P. phosphoreum</i> LUX operon 엽록체 형질전환 벡터 제작 및 확인 (<i>pBLcTV:LUX CDABEFG</i>) • 식물 핵 형질전환 과발현 벡터에 개별 혹은 복수의 유전자들의 클로닝 (<i>pCB302ES</i>벡터: 35S CaMV promoter, nos terminator, HA-tag 함유) • 페튜니아 재분화 조건 및 엽록체 형질전환 조건 확립 • 형질전환 개시 • 형질전환 조직 배양 및 재분화 과정 중, 발광 효율 탐지 (luminescence imaging system 이용)
		<ul style="list-style-type: none"> • 발광유전자 특성 구명 및 발광 세기 증진을 위한 genetic engineering • 발광 유전자 및 단백질 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 발광 구성 인자 문헌, 실험 분석을 토대로 식물체 자체 발광에 필요한 최소 크기, 최대 효율의 도입 유전자군 결정 (세부1 공동) • <i>P. phosphoreum</i> LUX operon의 개별 유전자들과 <i>Lumazine</i>유전자의 클로닝 • 재조합단백질의 제작 및 정제 • 각각의 발광 단백질의 효소 활성도 측정 방법 시스템 구축 • 발광 효율 증대를 위해서 아미노산 치환 돌연변이를 통한 단백질 엔지니어링 개시
2차	2014		<ul style="list-style-type: none"> • 발광 효율 증진을 위한 돌연변이

년도	~ 2015	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환 식물체 확보 및 형질전환 지속 	<ul style="list-style-type: none"> 유전자들의 벡터 제작 페튜니아 재분화 조건 확립 페튜니아 엽록체 및 핵 형질전환 지속 형질전환 조직 배양 및 재분화 과정 중, 발광 효율 탐지 (luminescence imaging system 이용) (II)
		<ul style="list-style-type: none"> 발광유전자 특성 구명 및 발광 세기 증진을 위한 genetic engineering 발광 유전자 및 단백질 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 유전자 발현 후 생성된 발광반응에 관여하는 단백질의 효소활성도 등의 검출
		<ul style="list-style-type: none"> 형질전환작물 도입유전자 분석방법 기준제시 	<ul style="list-style-type: none"> 도입유전자의 정성/정량 분석법 확립, 세대 진전에 따른 도입유전자의 안정적 유전현상 분석방법 제시
3차 년도	2015 ~ 2016	<ul style="list-style-type: none"> 발광 유전자 발현 식물체 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 페튜니아 및 애기장대 형질전환 여부 확인 및 계통 선별
		<ul style="list-style-type: none"> 발광 단백질의 Engineering 	<ul style="list-style-type: none"> Lumazine 단백질 활성화에 필요한 프로모터,
		<ul style="list-style-type: none"> 발광식물체의 재배방법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 시범온실을 활용한 발광식물체의 재배특성 및 재배방법 확보
		<ul style="list-style-type: none"> 엽록체 형질전환작물의 이벤트 적격성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환벡터 및 작물 도입유전자의 완전염기서열분석, 유전자 구조 분석, 위해성 염기서열 존재 유무 분석, 목적형질의 발현 확인
4차 년도	2016 ~ 2017	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환 계통의 확보 자체 발광이 식물 생장에 미치는 생리적 영향 분석 발광 효율 증가를 위한 기술 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 형질 전환 애기장대에서 지방산 함량 및 조성 변화 확인 형질전환식물체의 발광 효율 평가 발현량 향상을 위한 프로모터 및 유전자개량 연구 형질전환 식물체의 발달 및 성장 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 고효율 발광인자들에 대한 지적재산권 확보 발광 인자 유전공학 엔지니어링 	<ul style="list-style-type: none"> 잠재적으로 상업화 될 수 있는 발명에 대한 특허 출원 및 등록
		<ul style="list-style-type: none"> 화훼작물 시장 동향 및 발광 식물 진입 가능성 파악 	<ul style="list-style-type: none"> 주력수출시장 및 신규수출시장, 내수시장에 대한 상품화 가능성 타진 GMO 작물의 대량 생산 체계 구축 개시 (로즈피아 공장부지 내)
		<ul style="list-style-type: none"> 도입유전자의 안정적 세대유전 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 비교정량 PCR, 비의도적 유전자 발현분석, 조직별 생육단계별 발현분석,
5차 년도	2017 ~	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환체의 특성 구명 	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환체의 총전사체 분석 실시 발광 효율 개량 유전자 도입 및

2018	<ul style="list-style-type: none"> • 발광 효율 개선 형질전환 지속 	형질전환 지속
	<ul style="list-style-type: none"> • 발광인자의 시스템 분석을 통한 • 학술 논문지 발표 	<ul style="list-style-type: none"> • 학술적 가치가 있는 연구, 실험 결과에 대한 학술지 게재
	<ul style="list-style-type: none"> • 발광 식물체의 효율성 및 경제성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 발광 작물의 현장 적용성 평가
	<ul style="list-style-type: none"> • 발광 식물체의 목적형질의 안전성 및 실질적 동질성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 도입유전자의 안정적 발현분석 및 전환체와 비전환체의 실질적 동등성 분석

3. 평가의 착안점 및 달성도

년도 연구내용	평가의 착안점	가중 치	달성 도
발광 유전자원을 확보하고 발광 시스템 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 신규 발광 유전자원 확보 및 분석 • 발광 유전자원 클로닝 • 식물 형질전환 벡터의 제작 	<ul style="list-style-type: none"> • LUX 유전자 클로닝 및 대장균 발현 여부 • 식물 엽록체 형질전환 벡터 제작 여부 • 식물 핵 형질전환 벡터 제작 여부 	25%	100
자체 발광유전자 도입 형질전환 식물의 제작 <ul style="list-style-type: none"> • 폐튜니아 엽록체 형질전환 실시 • 애기장대 형질전환 실시 	<ul style="list-style-type: none"> • 엽록체 및 핵 형질전환을 위한 화훼작물 재분화 여부 • 형질전환 실시 여부 • 단백질의 효소 활성도 비교치 구축 여부 • 도입유전자의 정성/정량 분석법 확립 및 안정적 유전 분석방법 제시 여부 	25%	100
발광 형질 개선을 위한 단백질 엔지니어링 <ul style="list-style-type: none"> • 형질 개선 후보 유전자 선별 및 특성 연구 • 형질 개선 목적 돌연변이 제작 • 중합효소연쇄반응, 위치지정돌연변이를 통한 고기능 발광 단백질의 제조 • 시범온실을 활용한 발광식물체의 재배특성 및 재배방법 확보 • 엽록체 형질전환작물의 이벤트 (완전염기서열분석, 유전자 구조분석, 위해성 염기서열 유무분석, 목적형질 발현 확인) 적격성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • LUX AB 활성 조절 아미노산의 동정 여부 • LUX AB 활성 조절에 관여하는 인자 분석 여부 • 실제 자체 발광 형질전환체의 확보 여부 • 장미의 형질전환 진행 여부 • 발광효율이 개량된 단백질 확보 여부 • 재배법 확립 여부 • 벡터 및 도입유전자의 염기서열분석 여부, 유전자 도입 및 발현 확인 여부 	20%	100
형질전환 식물의 지속적 유지 및 대량 증식법 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 발광 효율의 정량적 평가 여부 	20	100

<p>산업화 추진을 위한 지식 재산권들을 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> • 형질전환식물체의 발광 효율 평가 • 발현량 향상을 위한 프로모터 및 유전자개량 연구 • 형질전환 식물체의 발달 및 성장 분석 • 잠재적으로 상업화 될 수 있는 발명에 대한 특허 출원 및 등록 • 비교정량 PCR, 비의도적 유전자 발현분석, 조직별 생육단계별 발현분석, 	<ul style="list-style-type: none"> • 개량된 유전자 확보 및 형질전환 적용 여부 • 자체 발광 형질전환체의 총 전사체 분석 여부 • 특허 출원 여부 • 비교정량 PCR과 발현분석을 통한 실질적 동등성 분석 여부 		
<p>형질전환 식물의 이벤트 계통을 선별, 세대안정성 및 환경 위해성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 형질전환체의 총전사체 분석 실시 • 발광 효율 개량 유전자 도입 및 형질전환 지속 • 학술적 가치가 있는 연구, 실험 결과에 대한 학술지 게재 • 발광 작물의 현장 적용성 평가 • 도입유전자의 안정적 발현분석 및 전환체와 비전환체의 실질적 동등성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 전사체 분석 실시 여부 • 형질전환체 추가 구축 여부 • 논문게재 여부 • 농가보급을 위한 경제성 달성여부 • 전환체와 비전환체의 실질적 동등성 분석평가 여부 	10	100

4. 목표 미달성 시 원인 (사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)

가. 형질전환 식물체의 자체 발광 수준

본 연구를 통해서 자체 발광에 필요한 모든 유전자가 삽입된 페튜니아와 애기장대 형질전환체를 구축하였으나, 가시적인 발광이 확인되는 수준의 발광세기를 관찰할 수 없었다. 종합적으로 볼 때, 가시적 발광 효과가 관찰되어지지 못한 원인으로 제시할 수 있는 것들은 첫째, 여전히 발광 세균이 보유한 자체 발광에 관여하는 대사 과정이 형질전환 식물에서 비슷한 수준으로 재현이 되지 못했을 가능성이있고 이로인해 발광 기질의 효율적 생성과 재순환이 미비하였을 것이라는 가설, 둘째, 세균과 달리 식물의 경우, 화학적, 물리적으로 복잡한 세포 구조를 (예, 세포벽, 큐티클층) 지닌 탓에 세포내 발광이 외부로의 전달 효율이 저조했다는 가설들이다. 이를 극복하기 위한 방편으로서, 페튜니아에 도입한 유전자들에 대한 각각의 발현율을 높이며 (각각의 유전자들의 open reading frame을 정확히 유전적으로 재단하여 발현의 효율성을 증대시킴), 조건별 발현 특이성을 증대시킬 기술 (꽃 및 암조건 특이적 유전자 프로모터의 사용을 통한 발현 시스템을 개선시킬 것이다.

나. 본 연구를 통해서, 자체 발광 식물 개발이라는 정량적 목표는 달성하였다고 판단되나, 정성적으로 실제 산업화에 적용할 수준의 정성적인 성과는 미비하였다고 평가될 수 있다. 다만, 5년 동안의 짧은 연구 기간 동안, 한정된 재원을 활용하여 분석기기를 통해 확인된 자체 발광 형질전환 식물을 개발하였고, 발광 조절에 관여하는 인자들의 특성을 분자수준에서 이해함으로써, 차후 발광 형질 개선 엔지니어링의 교두보를 확보했다고 본다. 차후 지속적인 연구를 통해서 개선될 수 있으며, 나아가 실제 가시적으로 확인 가능하고 유용한 발광 형질을 지닌 화훼 작물의 작물을 개발할 수 있는 잠재성은 여전히 크다고 판단된다.

따라서, 후속 연구를 위해서, 우선적으로 개발한 형질전환 식물 계통들에 대해 리드 이벤 트로서의 자료를 수집하고, 지속적으로 정부 혹은 기업으로부터의 재원을 확보할 수 있도록 관련 연구를 계속 수행할 계획이다.

다. 화훼 작물의 시장 및 산업적 동향의 파악의 경우, 기존 절화식물인 장미를 대상으로 파악하였다. 따라서, 본 연구에서 진행된 페튜니아의 경제성 분석이 미비하였다. 차후, 화훼 시장 동향 파악에 있어서, 페튜니아의 경우도 파악할 필요가 있다고 판단된다.

라. 본 연구를 통해서 개발된 형질전환 식물의 경우, 기본적인 유전적 분석은 진행하였으나, 이들의 환경 위해성 평가를 위한 분석은 미처 실시하지 못하였다. 차후, 보다 개선된 발광 형질을 나타내는 새로운 형질전환체들이 확보될 경우, lead event들에 대한 유전적 분석 뿐만 아니라, GMO의 환경 위해성 심사 및 환경 방출을 위한 기초적인 자료를 구축하는데 노력할 것이다.

4장 연구결과의 활용 계획

1절 학술적 활용 계획

1. 논문 및 학술대회 발표

가. 논문

본 연구를 통해서 다양한 발광 세균 유래의 발광인자들의 생화학적 특성에 관한 많은 정성적인 연구 결과들을 도출하였다. 구체적으로, 자체 발광 및 형광 효율에 관여하는 luciferase의 아미노산 단위의 기능들과, 루마진 단백질의 활성 domain의 분석, 그리고 이를 활용한 발광 효율 증진 엔지니어링에 관한 연구들을 가시적 성과물로 도출시키고자 한다. 특히, 발광 인자들을 융합 시킨 형질전환체 식물들의 자체 생리적인 특성과 부수적으로 관찰된 지방산 함량 및 조성의 변화, 꽃잎의 색상 변화, 그 외 발달학적 변화들의 연구들을 보완하여, 저명한 국내외 학술지에 게재함으로써, 본 연구가 세균의 자체발광이라는 기초 생명 현상에 대한 일진보한 학술적 통찰력을 학계에 제공하고자 한다.

나. 학술대회

논문 게재와 더불어서, 다양한 국내외 학술대회에 포스터 및 구두발표등을 통해서, 본 연구의 성과물을 발표하고 홍보함으로써, 추후 관련 연구를 추진하고자 하는 연구들에 활용될 수 있는 방안을 지속적으로 추진하고자 한다.

2. 관련 연구의 지속 방안 계획

5년간에 걸친 연구기간동안 도출된 연구 결과들을 선행연구 결과로서 활용하여, 정부 출연금의 지원을 받는 후속 연구 등에 선정되도록 지속적으로 노력함으로써, 미처 본 연구기간동안 결론짓지 못한 열린 가설들에 대해 보다 다양하고 심도있는 과학적인 연구를 수행토록 노력할 것이다.

2절 산업적 활용 계획

1. 지적재산권 확보

가. 특허 출원 및 등록

본 연구기간 동안, 총 5건의 특허를 출원하였고, 이 중 한건은 1차 심사 결과를 통보 받았으며, 등록을 위한 수정을 진행시켜 재 심사 중 이다. 상기 건 이외에도, 관련 특허 출원을 부가적으로 추진할 것이며, 관련 연구의 원천 기술들에 대한 지적 재산권을 확보하고자 부단한 노력을 실시할 것이다.

2. 성과의 산업화 연계 추진 (화훼 작물 시장에 고부가가치 높은 작물의 개발 및 투입으로 화훼 산업 활성화 및 농가소득 증진에 기여)

가. 기술 실시 및 이전

본 연구에서 도출된 성과 중, 엽록체 형질전환을 실시한 페튜니아의 꽃잎 색상이 변화된 것을 착안하여, 참여기업에 기술 실시를 진행한 바 있다. 앞으로도, 형질전환 페튜니아, 그리고 애기장대의 결과들을 토대로 관련 기술 적용 대상을 다른 화훼작물에게까지도 확대하여 추진할 것이며, 나아가서 장미와 같은 시장 규모와 상품성이 높은 고 부가가치 화훼작물에도 관련 기술을 활용하고자 한다.

나. GMO작물 등록 준비

본 과제에서 구축된 페튜니아와 애기장대 계통들을 선별하여 이벤트화 시키며, 이중 1 ead event 계통을 추가적으로 선별하여, GMO 작물로서 등록을 위한 다양한 기초 준비 자료를 구축할 것이다. 향후, 국내에서 GMO가 하나의 품종으로서 등록이 가능해 지는 시점에, 본 연구에서 확보된 연구 성과물 및 기술들이 신속히 적용될 수 있도록 만반의 준비를 마칠 것이다.

3. 산업적 활용 범위 확대

가. 가시적 바이오 센서 (biosensor), marker, reporter로 개발

루마진 단백질의 발현 (expression)된 형광 단백질과 리간드인 lumazine을 다량 생산시킬 수 있는 유전자가 삽입된 vector를 활용함으로써 단백질과 리간드가 결합함으로써 더 강한 형광을 띠게 되는 것에 착안한 것으로써, 궁극적으로 세포내에서 빛을 발하여 세포내의 동력학을 연구하는 데 쓰여 질 표지 (reporter) 세균을 발굴하는 데 주요한 역할을 할 수 있다.

나. 생물발광은 cellular viability의 표지 역할을 할 수 있고, flow cytometry와 측정 방법과 연계되어 세포내의 luminescence 혹은 fluorescence intensity로써 세균의 밀도 측정을 하는 등 초감도 센싱 기술을 활용한 정확한 세균의 계수를 결정할 수 있을 것이며, 외부의 독성화합물에 대한 반응성을 보인다면 bioluminescence를 이용한 중금속 등의 검출에 이용될 수 있을 것이므로 본 발명은 발광 세균의 *lux* 유전자를 이용한 초고속 정밀 바이오 분석 시스템 기술 기반을 구축할 수 있다. 상기 목표의 성취를 위하여서는 유용 발광 자원의 확보 측면에서 *lux* 유전자와 lumazine protein의 발현 시스템을 탐색 하는 것이 선결 조건인데, 본 발명에서는 single colony에서도 형광을 내게 되는 대장균 형질전환체를 얻음으로써 세균 수와 형광세기와의 상관관계 수립, 세포의 고정화, 강력한 형광을 유전자의 제조등을 바탕으로 하여 초고속 바이오시스템 기술 구축 (multichannel luminometer, cell morphology monitoring, toxicity testing)의 기반을 제공할 수 있다. 이들 형광세균이 대장균의 세포 대 세포의 communication, adhesion 등에 활용 될 가능성을 염두에 둔 응용 연구에 주력할 연구 실험을 수행한다.

붙임. 참고문헌

Krichevsky A, Meyers B, Vainstein A, Maliga P, Citovsky V (2010) *PLoS ONE* V5(11): e15461.

Tawfik A. Khattab, Ahmed M. Gabr, Ayman M. Mostafa, Tamer Hamouda (2019) *J Mol Struct* **1176**, 249–253

Seon–Yeong Kwak, Juan Pablo Giraldo, Min Hao Wong, Volodymyr B. Koman, Tedrick Thomas Salim Lew, Jon Ell, Mark C. Weidman, Rosalie M. Sinclair, Markita P. Landry, William A. Tisdale, and Michael S. Strano (2017) *Nano Lett* **17**(12), 7951–7961

Campbell, A.K. 1989. Living light: Biochemistry, function, and biomedical applications. *Essays Biochem.* **24**, 41–76.

Cho, M.M., Kim, Y.D., Kang, K.S., Kim, S.K., Yang, I.C., Park, S.R., and Lee, C.Y. (2009) *The K.J. Microbiol.* **45**, 419–424.

Fischer, M. and Bacher, A. 2005. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 324–350.

Hastings, J.W. and Nealson, K.H. 1977. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 549–545.

Herring, P.J. 1987. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1**, 147–163.

Hoffman, R.M. 2004. *Apmis* **112**, 441–449.

Illarionov, B., Eisenreich, W., Wirth, M., Lee, C.Y., Woo, Y.E., Bacher, A., and Fischer, M., (2007) *Biol. Chem.* **388**, 1313–1323.

Lee, C.Y. and E.A. Meighen. 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 690–997.

Lee, C.Y., D. O'Kane, and E.A. Meighen. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 2100–2104.

Marcus, R. and Coulston, A.M. (1990) Water soluble vitamin. The vitamin complex and ascorbic acid. In *The pharmacological basis of therapeutics*. (Gilman, Rall, Nies, and Taylor eds.) 8th eds. Pergamon press, New York, 1534–1536.

Meighen, E.A. (1988) *Annu. Rev. Microbiol* **42**, 151–179.

Meighen, E.A. (1991) *Microbiol, Rev.* **55**, 123–142.

Meighen, E.A. (1993) *FASEB J.* **7**, 1016–1022.

Meighen, E.A. (1994) *Annu. Rev. Genet.* **28**, 117–139.

Muller, F. *Chemistry and Biochemistry of flavoenzymes*, Vol. III, ed. CRC press, Boca Raton, FL, (1992), 672

Paulus, B., Illarionov, B., Nohr, D., Roellinger, G., Kacprzak, S., Fischer, M., Weber, S., Bacher, A., Schleicher, E. (2014) *J. Phy.Chem.* **118**, 13092–13105.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 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.