

발간등록번호

11-1543000-000944-01

고품질 바이오매스 생산을 위한 리그닌 생합성
조절 기술 개발

(Discovering how to reduce lignin biosynthesis
without compromising the fitness of plants)

서울대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고품질 바이오매스 생산을 위한 리그닌 생합성 조절 기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “고품질 바이오매스 생산을 위한 리그닌 생합성 조절 기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2015 년 9 월 7 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 최 성 화

세부연구책임자 : 최 성 화

연 구 원 : 정 유 정

연 구 원 : 푸나 마야 머허르전

연 구 원 : 천 지 녕

연 구 원 : 클라우디아 코르발란

연 구 원 : 박 슬 기

연 구 원 : 박 영 훈

연 구 원 : 여 노 래

연 구 원 : 김 한 성

위탁연구책임자 : 최 영 임

요 약 문

I. 제 목

고품질 바이오매스 생산을 위한 리그닌 생합성 조절 기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

가. 성장속도 고도화 형질전환 포플러 육성

- DWF4 유전자의 발현 조절 기작 규명 논문 발표
- DWF12 유전자의 발현 조절 기작 규명 논문 발표
- 바이오매스 생산 후보, 브라시노스테로이드 (brassinosteroid; BR) 생합성 유전자인 DWF4 와 BR 신호전달 요소인 DWF12/BIN2 가 도입된 포플러 형질전환체 개발
- 형질전환 포플러 나무의 바이오매스 생산량, 리그닌 적합도 및 생화학적 특성 분석
- 바이오에너지용 리그닌 저감 포플러 신품종 육성

나. 리그닌 함량 조절 신규 BR 유전자 발굴 및 형질전환체 개발

- 전사체학적 분석을 통해 리그닌 함량 조절 BR 유전자의 발굴 및 이를 이용한 형질전환체 개발을 통한 기능 분석

III. 연구개발의 목적 및 필요성

바이오에너지를 경제적으로 생산하기 위해서는 원재료가 되는 바이오매스의 품질과 생산성이 중요함. 목질계 바이오에탄올 생산에 사용되는 일반적인 바이오매스는 난분해성 리그닌이 약 30% 정도를 차지, 이는 전처리 공정에서 여러 가지 문제점을 야기하기에 이를 줄이는 방향으로 생명공학이 적용되고 있음. 그러나, 리그닌이 식물체 방어나 지지 등 중요한 생물학적 기능을 수행하기에 리그닌 함량을 일방적으로 줄일 경우 식물의 fitness가 저하되는 문제점이 있어 이를 해결하기 위해 본 과제에서 바이오매스 대상 작물의 fitness는 최대한 유지, 리그닌 함량을 저감시키는 리그닌 생합성 제어 기술 개발에 목표를 두었음.

IV. 연구개발 내용 및 범위

식물의 스테로이드 호르몬인 BR은 식물 성장 촉진 및, 리그닌을 포함하는 2차벽이 발달하는 물관 생성·발달과 관련됨. BR의 생합성 유전자인 DWF4 와 BR 신호전달 음성조절 유전자인 BIN2의 기능 규명을 바탕으로 이를 목본 식물의 모델 시스템인 포플러에 도입, 육성, 생화학적 이해를 바탕으로 내생 BR 증가를 통한 성장속도 가속화 및 리그닌 저감 포플러 우수 품종을 개발함. 또한, 마이크로어레이 실험으로 전사체학적 분석을 실시하여 리그닌 조절 관련 신규 BR 유용 유전자를 대량 발굴 및 형질전환체 개발을 통해 리그닌 함량을 조절하는 새로운 BR 유전자를 발굴하는 전략으로 식물 fitness는 유지, 리그닌 함량은 줄일 수 있는 식물체를 육성함.

1. 성장속도 고도화 형질전환 포플러 개발

- BR 생합성 유전자인 DWF4와 BR 신호전달 요소인 DWF12가 포플러에 도입함
 - 기 개발된 벡터를 포함한 포플러 나무 육성, 생화학적 특성 및 리그닌 적합도 분석
 - 바이오에너지용 리그닌 저감 포플러 나무 개발
2. 리그닌 생성을 조절하는 신규 BR 유전자 벡터 시스템 발굴 및 품종화 개발
 - 마이크로어레이를 통해 리그닌 합성 조절 BR 유전자의 발굴 및 기능 분석

V. 연구개발결과

1. DWF4 유전자의 발현 조절 기작 규명
2. DWF12 유전자의 발현 조절 기작 규명
3. 성장속도 고도화 및 리그닌 저감 포플러 형질전환체 우수 품종 개발
 - BR 생합성 및 신호전달 음성조절 유전자를 포플러에 도입, 과발현체에서 내생 BR 함량 증가를 비롯, 리그닌 함량이 감소된 우수 포플러 형질전환체 개발함
4. 전사체학 분석에 의해 식물 성장발달과 리그닌 함량 조절 유전자 발견 및 이와 관련 형질전환체 개발
 - 광수용체에 결함이 있는 돌연변이와 BR 수용체 결함 돌연변이체와의 마이크로어레이 수행, 유전자 발현 비교 분석 결과 퍼옥시다제를 포함하는 다수의 유용 유전자 선별.
 - 퍼옥시다제 간섭카세트를 포함하는 벡터를 도입한 형질전환체 개발 및 분석을 통해 이들 유전자가 식물성장발달과 리그닌 함량 조절 기능에 관여함 시사.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. DWF4 유전자의 발현 조절에 관한 논문 발표 (Plant J. 2011, 66(4):564-78)
2. DWF12 유전자의 발현 조절에 관한 논문 발표 (J. Plant Biol. 2011, 54:126-134)
3. 성장속도 고도화 및 리그닌 저감 포플러 형질전환체 우수 품종 개발 결과를 통해 신 품종 육성 및 특허 출원 준비 중.
4. 전사체학 분석에 의해 식물 성장발달과 리그닌 함량 조절 유전자 발견 및 이와 관련 형질전환체 개발
 - 광수용체 결함 돌연변이와 BR 수용체 결함 돌연변이의 전사체 분석을 통해 퍼옥시다제를 포함하는 다수의 유용 유전자가 선별을 통해 Plant J. 2014. 77(5):737-47에 발표.
 - 퍼옥시다제 간섭카세트를 포함하는 벡터를 도입한 형질전환체 개발 및 분석을 통해 이들 유전자가 식물성장발달과 리그닌 함량 조절 기능에 관여함을 특허출원함
5. 성과 활용 계획: 본 연구 결과 얻어진 기술을 포플러뿐 아니라 백합나무등 성장속도가 빠른 기타 경제수종에 이식될 경우 고품질의 펄프 원재료 확보로 제지 공정비용을 절감할 수 있을 것임. 또한, 알팔파나 다른 forage crop에 이 기술을 접목한다면 우수한 사료작물의 개발 등 긍정적 경제적 효과를 얻을 수 있을 것임.

영문 요약서(Summary)

The sustainable production of quality biomass is essential in biofuel economy. However, the lignins consisting of approximately 30% of conventional biomass hinders availability of biomass for bioenergy production. Lignins are hard to degrade, so it takes complicated chemical processing including toxic compounds. If not alleviated, biomass-derived bioenergy ironically cause environmental burden. Thus, reducing the overall contents and complexity of lignins has been the subjects of research world wide. It is noteworthy that lignins are important components for plants, so simple drastic reduction of their contents cause plants not growing adequately. A strategy to reduce non-degradable lignin contents without compromising plant fitness is required. To address this, we first aimed to understand how the lignin genes are regulated. We performed Affymetrix microarray analysis using the RNAs isolated from four different plant seedlings including *Ws-2* wild type, *bri1-5*, *phyB-77*, and *bri1-5 phyB-77* double mutants. Bioinformatics analysis of the gene expression revealed that the expression of peroxidase (PRX) genes, which might be involved in lignin contents, are inhibited by brassinosteroids but stimulated by the light. To genetically prove this idea that PRX regulate lignin contents, we introduced these genes using RNA interference constructs into both *Arabidopsis* and poplar. Successful transgenic lines of *Arabidopsis* displayed the phenotypes of weak stem, resulting in falling down on the grounds. This phenotype suggests that the robustness of plants normally attributable to proper contents of the cell wall was significantly altered. In addition, the transgenic RNAi lines flowered earlier than their parental wild type possibly due to faster-growing pattern. Taken together, the major cell wall modifying enzymes have been identified through our comprehensive analysis of the transcriptomes. Our molecular genetic analysis of these genes strongly suggest that plant cell wall contents especially the lignins can be engineered using these genes. Throughout the period of this project, we have identified the new genes possibly playing important roles in cell wall biology, and revealed that the known brassinosteroid genes including *DWF4* and *BIN2* successfully altered the contents of lignin in poplar plants.

CONTENTS

Chapter 1. Overview on Research and Development Project	7
Chapter 2. Trends in Domestic and International Technical Development	8
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development	10
Chapter 4. Achievement levels and Contributions in Related Fields	30
Chapter 5. Outcomes and Applications of Research and Development .	32
Chapter 6. International Scientific References Obtained during Research and Development	33
Chapter 7 Research Facility and Equipments	34
Chapter 8 Laboratory safety management log	35
Chapter 9 References	36

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 1절 연구개발의 목적	7
제 2절 연구개발의 필요성	7
제 3절 연구개발 범위	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 1절 국내외 현황	8
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	10
제 1절 연구개발 수행 내용 및 결과	10
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	30
제 1절 연도별 연구개발 목표 및 달성도	30
제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도	31
제 5 장 연구개발 성과 및 활용계획	32
제 1절 연구개발 성과	32
제 2절 성과 활용 계획	32
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	33
제 7 장 연구시설·장비 현황	34
제 8 장 연구실 안전관리 이행 실적	35
제 9 장 참고문헌	36

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 : 연구개발의 목적

- 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 활용 기술은 화석연료에 의존하지 않고 액체 연료를 생산 사용할 수 있어 대기 중 순 탄소 증가량을 최소화할 수 있는 장점을 가짐.
- 그린 에너지 테크놀러지의 핵심 분야는 원료가 되는 바이오매스의 안정적인 대량 생산과 함께 공정에 투입되는 에너지 사용을 최소화할 수 있는 우수한 바이오매스의 확보를 통한 경제적인 목질계 바이오에탄올 생산임.
- 이러한 목표를 달성하기 위해 본 연구에서는 애기장대와 포플러에서 유전자를 발굴, 포플러에 도입, 셀룰로스 에탄올 생산에 최적화된 포플러 나무 개발 가능성을 제시하고자 함.

제 2 절 : 연구개발의 필요성 및 범위 등을 기술

- 화석연료의 과도한 사용으로 인한 온실가스증가는 지구 온난화 문제를 야기, 온실가스 감축이나 환경 친화적인 면에서 셀룰로오스 생산 및 이용이 해당임.
- 바이오매스로 불리는 리그노셀룰로스는 세포학적 측면에서 보았을 때 식물의 세포벽에 존재하나 이들 세포벽 분해 효소는 일부 생물에 국한해 존재 함. 산업적 측면에서 리그노셀룰로스 에탄올이 경쟁력을 갖기 위해 우수한 고품질 바이오매스 생산량 증대가 필수적임. 이를 위해 호르몬 및 광조건 에 의한 메커니즘 규명, 2) 리그닌을 포함한 세포벽 형성 과정 이해, 3) 바이오에탄올 생산 목적에 맞는 맞춤형 리그닌 저감 에너지 작물 기술 개발이 시급함.
- 리그닌은 비수용성 폴리머 구조로 물관 세포의 2차벽 구성 물질로 사용, 수분의 효율적 이동 및 식물이 직립 성장할 수 있는 견고한 지지 기반 형성함. 또한 물관 조직이 물리 화학적 및 병충해의 공격으로부터 보호되도록 방어 역할 수행함.
- 리그닌은 식물 세포 생리적 기능 면에서 수분의 효율적 이동 및 식물 지지 기반 형성, 병충해의 공격으로부터 방어 역할을 수행함. 그러나, 산업적 이용 면에서 바이오에너지 생산시 리그닌 제거의 화학적 전처리 과정에 막대한 에너지와 환경부담이 발생함.
- 따라서 생명공학에 있어 최고의 목표는 대상 작물의 리그닌 함량은 저감 및 전체 적인 생산성은 감소시키지 않는, 작물 개발이 필요함.
- 브라시노스테로이드 (BR)는 식물의 스테로이드 호르몬으로 세포의 길이 성장 촉진을 비롯, 리그닌을 포함하는 2차벽이 발달하는 물관 생성 및 발달을 촉진시킴.
- 목본 식물의 모델 시스템인 포플러는 한국뿐만 아니라 전 세계적으로 분포하고 있으며 펄프 원료, 무한한 biomass 잠재력을 가지고 있어서 유전, 육종 분야에 연구가 광범위하게 진행되고 있음. 뿐만 아니라 환경정화 능력이 뛰어나 바이오매스로 활용할 경우 환경 보존과 바이오에너지 획득이라는 이점을 동시에 얻을 수 있음.
- 바이오에너지를 경제적으로 생산하기 위해서는 원재료가 되는 바이오매스의 품질과 생산성이 중요함. 목질계 바이오에탄올 생산에 사용되는 일반적인 바이오매스는 난분해성 리그닌이 약 30% 정도를 차지함. 리그닌은 전처리 공정에서 여러 가지 문제점을 야기, 그 절대적인 양을 줄이는 방향으로 생명공학이 적용되고 있음. 하지만 리그닌은 식물체의 방어나 지지 등 중요한 생물학적 기능을 수행하기 때문에 리그닌 함량을 일방적으로 줄일 경우 식물의 fitness가 저하되는 문제점이 있음. 이를 해결하기 위해 본 과제는 양질의 바이오매스가 필요한 만큼

생산하기 위해 바이오매스 대상 작물 fitness는 최대한 유지, 리그닌 함량은 획기적으로 저감시키는 새로운 개념의 리그닌 생합성제어 핵심기술을 개발하는 데 목표를 둬.

제 3 절 : 연구개발 범위

1. DWF4 유전자의 발현 조절에 관한 논문 발표 (Plant J. 2011, 66(4):564-78)
2. DWF12 유전자의 발현 조절에 관한 논문 발표 (J. Plant Biol. 2011, 54:126-134)
3. 성장속도 고도화 및 리그닌 저감 포플러 형질전환체 우수 품종 개발 방향 제시
 - BR 생합성 유전자 및 신호전달 음성조절 유전자를 포플러에 도입, 과발현체에서 내생 브라시노스테로이드 함량 증가를 비롯하여 리그닌 함량이 감소된 우수 포플러 형질전환체 개발함 (특허 출원 준비 중).
4. 전사체학 분석에 의해 식물 성장발달과 리그닌 함량 조절 유전자 발견 및 이와 관련 형질전환체 개발
 - 광수용체에 결합이 있는 돌연변이와 BR 수용체 결합 돌연변이체와의 마이크로어레이 수행, 유전자 발현 비교 분석 결과 퍼옥시다제를 포함하는 다수의 유용 유전자가 선별됨 (Plant J. 2014. 77(5):737-47).
 - 퍼옥시다제 간섭카세트를 포함하는 벡터를 도입한 형질전환체 개발 및 분석을 통해 이들 유전자가 식물성장발달과 리그닌 함량 조절에 관여함을 시사함 (특허출원 1건)

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

- 바이오 연료의 세계 시장 규모는 2011년 기준 약 827억 달러 수준, 2021년에는 약 2.2배 성장한 1,853억 달러 규모로 도달할 전망이다 (한국바이오안전성센터 동향정보지)
- 국내: 1988년 이후 목질계 에탄올 생산 기술 개발에 치중, 목질 바이오매스의 당화에 적합한 효소 탐색 및 전처리 기술 개발, 리그닌 저감을 포함하여 바이오에탄올 경제성을 높이기 위한 연구가 진행 중이며 기술 부문에서는 우수하나 리그닌 저감 목재는 수입에 의존하고 있는 실정임. 3면이 바다로 둘러싸인 우리나라의 경우 자원이 풍부한 해양환경을 이용한 바이오 에너지 생산기술 및 이를 통한 CO₂ 저감 방안이 제시되어 연구가 진행 중임.
- 바이오매스 생산에 관련된 유전자 변형 포플러의 선두 그룹은 프랑스와 벨기에이며 리그닌 함량조절 연구는 서구에서 이미 20년 이상 투자 되어온 분야임.
- 리그닌 유전자 변형 포플러의 시험 재배: 2013년 PNAS에 발표된 논문에 의하면, 벨기에 Zwijnaarde에서 시험 재배된 리그닌 유전자가 변형된 포플러에서 당을 보다 효율적으로 전환시킬 수 있음을 밝힘. 일부 포플러에서는 수피 아래 붉은색이 선명하여 리그닌 생합성 억제가 잘 되며 붉은색이 진한 가지들은 에탄올을 160 % 더 생산할 수 있으며, 목재 1g 당 에탄올 생산 수율이 20%를 증가되는 장점을 가지고 있음이 보고됨 (Van Acker et al., 2013).
- 기존 다년생 switch grass보다 약 1/3 가량 많은 에탄올을 생산하는 형질 전환된 switch grass 품종을 2011년 PNAS지에, Chunxiang 그룹이 논문으로 발표함.
- 펄프 제조시 리그닌 제거를 위해 다량의 독성 화학약품이 사용되어 심각한 수질오염을 야기 함. 따라서, 리그닌 생합성 대사 관련 효소와 유전자 기능이 거의 규명되었으며 이들 대사 각 단계별 관련 유전자 발현 억제를 통한 리그닌 저감 시도는 쌍자엽 식물을 대상으로 진행되

어 왔음. 일본에서는 xyloglucanase 유전자를 지속적으로 발현, 셀룰로즈 함량이 증가된 포플러를 개발함 (Kaida et al., 2009). 중국에서는 리그닌 합성 관련 laccase 유전자를 포플러에 도입, 총 리그닌 함량이 증가된 형질전환체를 보고함 (Lu et al., 2013). 2008년 침엽수에서도 최초로 형질전환체의 리그닌 함량과 구성성분 변화 가능성을 제시함. 스웨덴 독일가문비나무에서 cinnamoyl CoA reductase (CCR) 유전자를 anti-sense로 형질전환, 5년생에서 측정 결과 형태적으로 정상보다 생장이 느리고 일반 가문비나무보다 리그닌 함량은 8%가 감소된 것으로 보고되고 있음.

● 미국 텍사스 A&M AgriLife Research는 목질계 바이오에탄올 생산 시 부산물로 발생하는 리그닌을 지질로 전환 가능한 미생물을 개발, 전환된 지질은 바이오디젤 생산에 활용하고자 하는 연구가 수행중임 (출처: <http://agnews.tamu.edu/showstory.php?id=1806>).

● 벨기에 겐트에 위치한 'Flanders Institute of Biotechnology (VIB)' 의 Wout Boerjan 그룹에 의해 개발된 GM 포플러가 2009년 벨기에 정부의 시험재배승인을 얻음. 선택된 GM포플러 품종은 2009년부터 재배되었으며 2010년에 처음 수확 실험을 실시함. 이들 GM포플러에 대한 시험에서 리그닌 생산이 낮았으며 바이오에탄올을 고수율로 얻어짐. 건조된 나무의 중량 당 바이오에탄올을 생산하는 비율이 리그닌 함량에 변화가 없는 기존 포플러와 비교하여 GM 포플러가 81%나 높았다고 프랑스 낭시에서 개최된 'Bioenergy Tree' 국제 컨퍼런스에서 발표됨 (Vanholme et al., 2013).

● 최근에 사탕수수나 옥수수, 콩 등 일반 재료가 아닌 새로운 재료에 대한 연구가 활발한데 뉴질랜드에서는 유가공 후 남는 유청으로 바이오 메탄올을 생산함. 네덜란드에서는 식물 씨앗에서 자동차 연료인 바이오 디젤을 추출, 당밀이나 바나나 껍질을 이용해 바이오 에탄올을 만드는 데에도 성공함. 또한, 중남미의 콜롬비아에서 당밀과 바나나 껍질, 커피 과육 등을 발효시켜 바이오 에탄올을 생산하고 있음.

● 백색부후균은 과산화효소를 이용, 리그닌을 분해 할 수 있는데 미국 클라크 대학교의 David S. Hibbett와 에너지성 산하 공동유전체 연구소 연구진들이 The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genome 이라는 제목으로 31개 곰팡이 유전체를 비교 분석을 통해 백색부후균이 다루기 어려운 식물 바이오 고분자인 리그닌을 분해하는 능력 시스템에 대해 사이언스지에 보고함. 이 연구는 바이오연료 생산을 증가 시킬 수 있는 곰팡이 효소를 사용 또는 개량 할 수 있게 한 것으로 최근에 나온 이슈 중 가장 부각되는 논문 중의 하나임 (Floudas et al., 2011)

● 남 다코타 주립대 과학자들이 잘 발달된 뿌리에 탄소를 저장할 수 있고 바이오매스용 작물의 생물 다양성에 기여할 수 있는 cup plant라고 불리는 다년생 토종식물을 새로운 바이오매스 작물로 활용할 수 있는 가능성을 검토하는 연구를 진행하고 있음 (출처: <http://www.sify.com/news/scientists-exploring-cup-plant-as-potential-new-biomass-and-carbon-storing-crop-news-international-kdupOhhhged.html>).

● 목질계 바이오에너지 개발의 가장 큰 장애물은 고품질의 바이오매스를 안정적으로 대량 확보하는 것임은 주지의 사실임. 따라서, 본 연구진 성과물은 국외 연구 수준과 견줄만하며 스트레스 보완까지 갖추어질 경우 환경보존과 바이오에너지 획득이라는 이점을 얻을 수 있음. 바이오매스 생산용 고속성장 포플러 시범 라인을 선보일 수 있을 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 DWF12 유전자의 기능: 논문 발표

● DWF12는 BR 신호전달 경로에서 negative regulator로 작용하는 유전자임. 본 과제에서는 이 유전자를 이용해 특정 조직에서 BR 신호를 선택적으로 차단하는 기술을 사용하고자 함. 먼저 이 유전자의 기능을 보다 심층적으로 이해하기 위해 이 유전자의 기능을 옥신과 ABA 호르몬과의 상호작용이라는 관점에서 분석하였음. 연구 결과 DWF12 유전자에 기능 획득 돌연변이가 유도 시 옥신 신호 전달이 대조구에 비해 촉진되었으며 이는 BR 생합성 유전자 DWF4의 발현 정도와 뿌리털의 생성 정도 면에서 확인하였음. 이 연구 결과는 2011년 3월호 Journal of Plant Biology에 게재 함.

● BIN2/DWF12/UCU1은 BR의 신호전달 경로에 있는 음성조절자로 형질 획득 돌연변이인 bin2-D는 BR 특이적인 난쟁이 표현형을 가짐 (Choe et al., 2002). BIN2는 동물의 shaggy-like kinases/glycogen synthase kinases (GSKs)와 유사한 아미노산 서열을 가지며 BR 신호전달에 있어 애기장대 AtSKs 유전자는 스트레스 저항성이나 개화 조절에 관련 기능을 가짐. 또한 동물에서 GSK3은 미세소관의 운동성이나 Wnt, Sonic Hedgehog, insulin, Notch, receptot tytosine Kinase와 같은 신호전달 경로를 담당함.

● 식물에서도 GSKs는 다양한 신호전달에 관여하게 되는데, 이는 bin2/dwf12-1D에서의 돌연변이가 특이한 BR 난쟁이 표현형과 형태를 갖는다는 것을 통해서도 확인할 수 있음. 식물체의 약간 구부러진 기관같이 독특한 표현형을 얻을 수 있는데, 이런 구부러짐이 옥신 수송계와 관련이 있기에 (Choe et al., 2002), BIN2가 옥신 신호전달에 관련이 있을 것이라고 예상할 수 있음. 이전 연구에서 BR이 옥신과 같이 뿌리털 (Lateral root) 발달 (Bao et al., 2004)과 하배측 성장을 조절함이 보고됨 (Nemhauser et al., 2004; Stavang et al., 2009).

● BIN2의 옥신 신호전달 관련 유무를 확인하기 위해 DWF4pro:GUS를 함유하고 있는 bin2/dwf12-1D와 bri1-5에 옥신 처리 결과 야생형은 2.7배, bin2/dwf12-1D는 1.8배, bri1-5는 2배 GUS 신호가 증가함이 확인됨. 그러나 옥신 처리로 인한 전체적인 GUS 활성화는 BL로 인해 DWF4의 발현이 저해되지 않는 bri1-5와 bin2/dwf12-1D돌연변이에서 가장 높았음 (Kim et al., 2006). 이를 통해 BR 생합성 유전자인 DWF4 발현에 있어 옥신과 BR의 상관관계를 알 수 있으며, BR가 DWF4의 발현을 억제시키면 옥신이 활성화됨을 규명함 (그림 1).

● 이를 통해 옥신 신호전달에서 BIN2가 뿌리털 발달을 촉진하는 것으로 예측되지만, 유전자형

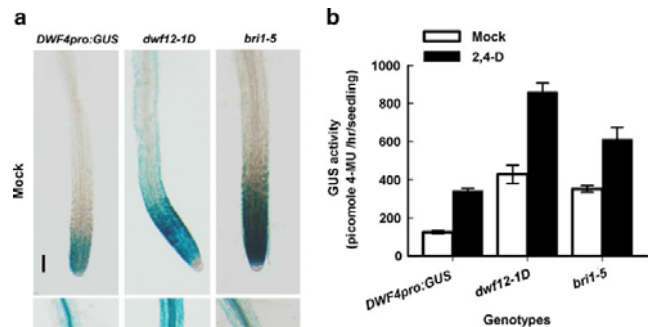


그림 1 2, 4-D 증가가 BR 반응 돌연변이에서 GUS 활성을 증가시킴. DWF4pro:GUS는 100nM 2,4-D 처리로 식물체 내에서 발현 확인

에 따라 보이는 cm 당 초기 뿌리에서의 뿌리털의 개수 (NLRCM)가 조금씩 다른 것으로 확인됨. 야생형에 비해 *bin2/dwf12-1D* 돌연변이가 12% 더 높은 것으로 보아 BIN2가 뿌리털의 발달에 도움을 주는 것으로 예측, 옥신이 처리된 식물의 NLRCM은 모든 유전자형에서 옥신 농도가 높아지면 증가됨 (그림 2C). 옥신 처리된 *bril-5*, WT, *bin2/dwf12-1D*가 각각 316, 286, 226% 증가, 또한 *bril-5*와 *bin2/dwf12-1D*가 상이한 반응을 보임에 따라 BRI1과 BIN2가 뿌리털 발달에 있어 반대 역할을 수행함. 이 결과를 통해 BR 신호전달의 음성 조절자인 BIN2가 옥신 신호 전달에서 양성 조절자로 뿌리털 발달 신호를 전달하는 데 사용됨.

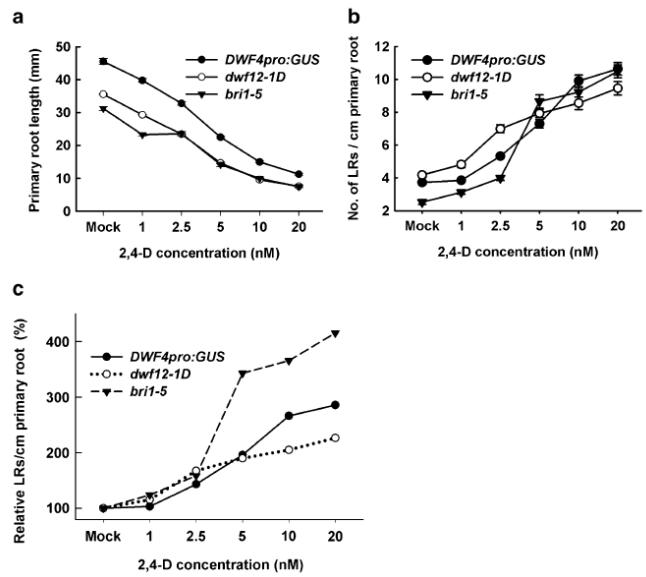


그림 2 낮은 옥신 농도에서 측근 발달을 촉진시키는 *bin2/dwf12-1D* 돌연변이

제 2 절 DWF4 유전자의 발현 조절: 논문 발표

● DWF4는 BR 생합성에서 핵심적인 기능을 수행하는 유전자임. DWF4가 매개하는 효소반응을 경계로 생합성 중간대사 산물의 활성이 확연히 차이를 보임. 즉, DWF4반응 이전까지의 중간대사 산물은 생물학적 활성이 매우 낮는데 비해 그 이후의 산물은 활성이 500배 이상이나 높아짐. DWF4는 생합성 경로의 속도결정 단계를 조절하는 것임. 현재까지 BR 생합성을 개시하는 신호가 잘 알려지지 않음. 하지만 본 연구를 통해 DWF4 유전자의 발현은 옥신에 의해 강하게 유도됨을 확인할 수 있었음. 관련 연구 결과는 2011년 Plant Journal에 게재 됨.

● BR은 생장 촉진을 유도하는 스테로이드 호르몬으로 같은 식물 호르몬인 옥신과 생리학적 작용이나 관다발 분화, 세포 신장과 분열이나 에틸렌 합성 등에 있어 서로 밀접한 관련을 맺고 있음. 애기장대에서 옥신과 BR은 뿌리털과 하배축 신장에 있어 관계가 있는데, 대부분 연구는 BR이 옥신을 상위 조절하는 것으로 보고되나 몇몇 부분에 있어서는 옥신이 BR 수준을 조절하는 것으로 보고됨. 애기장대에서 BRX (BREVIS RADIX)의 기능 상실 돌연변이체는 뿌리생장이 저해되지만 BR들에 의해 회복되며, 이러한 결과를 토대로 BRX는 전사 인자로서 옥신에 따라 BR생합성 유전자인 CPD (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM)를 조절하는 것으로 추정됨 (Rodrigues et al., 2009).

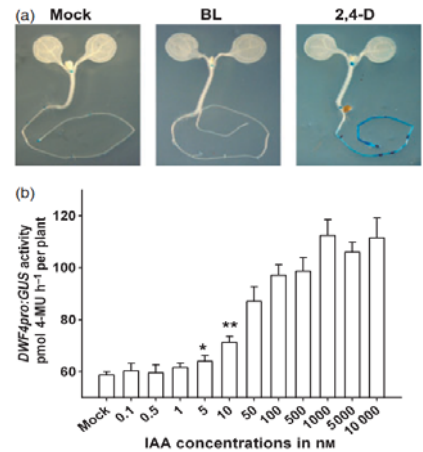


그림 3 DWF4pro:GUS의 BL과 옥신 처리에 의한 발현 조절

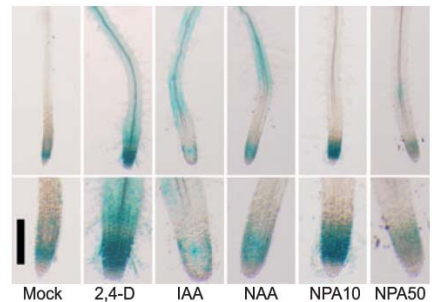


그림 4 다른 종류 옥신 처리 시 DWF4pro:GUS의 발현량 변화

● DWF4는 BR생합성의 후기 과정에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자인데, DWF4의 발현은 식물체 내의 BR의 수준을 높임 (Kim et al. 2006). 이런 DWF4의 발현을 조절하는 인자들과 그 매커니즘을 규명하기 위해 2,4-D를 처리하였고, 이는 뿌리 끝과 뿌리털에서 DWF4 발현이 급격한 증가를 보임 (그림 3). 이것이 옥신-의존적 유도인지 확인 반응에서도 GUS 발현이 증가를 확인함 (그림 3b). 또한 DWF4pro::GUS 발현이 2,4-D 특이적 옥신 반응인지 확인하기 위해 다른 종류의 옥신인 IAA 또는 NAA 처리를 통해 옥신 반응임을 확인함 (그림 4). 이를 통해 축적된 옥신이 세포에서 뿌리 정단으로 이동하지 못하는 것을 확인함. DWF4pro::GUS의 이동을 확인하기 위해 시간차 분석 결과

GUS의 움직임이 옥신 처리 후 1시간 뒤부터 관찰됨. 24시간 후 뿌리털 정단까지 염색됨 (그림 5a, 5b, 5c). 옥신 조절을 확인하기 위해 DWF4 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인한 결과 (그림 5d), 옥신 처리 1시간 후 확연히 DWF4의 발현 정도가 증가함을 볼 수 있었으며 12시간 뒤에 발현이 가장 많이 증가됨이 확인. 옥신 처리에 의한

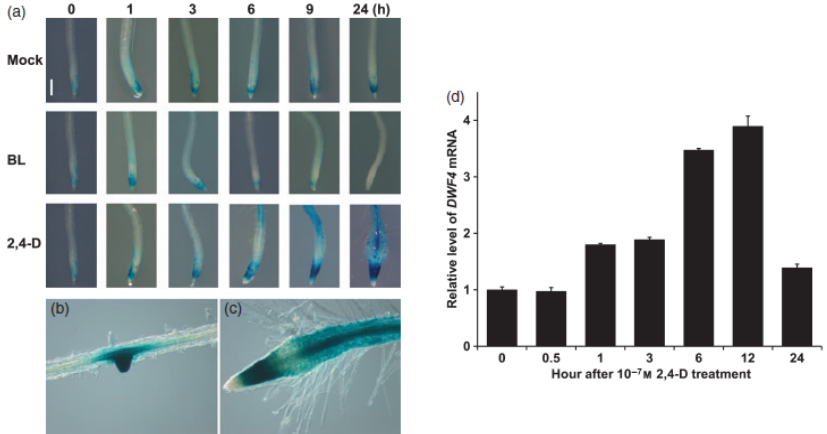


그림 5 시간 단위로 본 DWF4pro::GUS 염색 정도

DWF4pro::GUS의 발현에서 BR이 필수적인지 알기 위해 생합성 돌연변이인 *dwf7-1*과 신호전달 돌연변이인 *brl1-5*, *bzr1-D*를 통해 확인 결과, 옥신 신호전달 돌연변이에서 GUS가 발현되지 않음을 통해 옥신 신호가 DWF4 발현에는 필수조건이지만 BR 신호전달이나 생합성 경로에 필수적이지 않음 (그림 6).

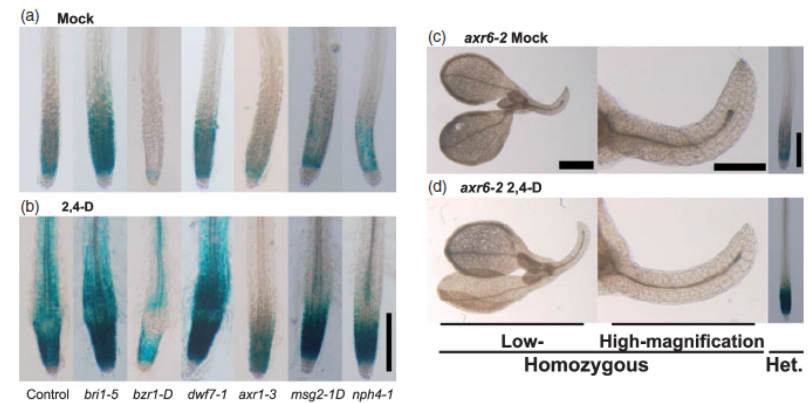


그림 6 BR과 옥신 돌연변이에서 DWF4pro::GUS의 염색 차이

● 호르몬 의존적인 DWF4의 전사 활성을 확인하기 위해 DWF4가 결합하는 BZR1, BES1, Aux/IAA와 ARF의 TGTCTC의 프로모터 1kb를 분석함 (그림 7a). BRRE는 번역 개시 코돈에서 upstream으로 606-619 bp에서 발견 됨, BES1의 주요 위치인 E-box는 301-306 bp지역에 위치하며 AuxRE TGTCTC은 305-310 bp에 *DWF4*의 프로모터의 반대편에 위치하는 것으로 확인됨. 일반적인 AuxRE의 경우 D1 요소인 TGTGCTC를 찾았으며, 옥신 반응 요소들에서 발견됨 (그림 7a와 7c). 또한 ChIp (Chromatin immunoprecipitation)을 통해 BZR1-HA가 DWF4프로모터에 BL 처리시 결합하는 것을 확인하였으나 옥신 처리 시에는 확인하지 못함. 이는 BRRE 요소가 필수적인 Aux/IAA반응요소를 함유하기 때문인 것으로 보이며 (그림 7c), 35Spro::ARF7-HA의 경우 ARF7-HA는 옥신이 처리되었을 때 성공적으로 결합하나 BL에서는 결합이 제거되는 것을 볼 수 있음 (그림 7b). DWF4 프로모터는 일반적인 Aux/IAA-RE를 근위부에 갖고 있으며

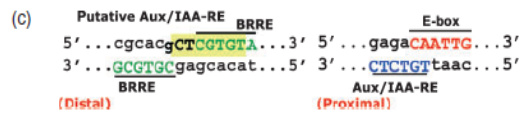
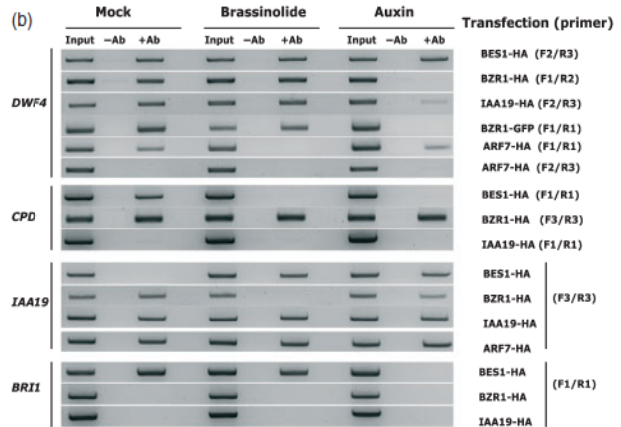
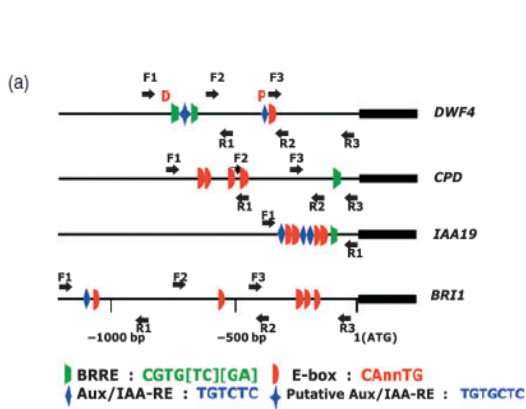


그림 7 BR 유전자 프로모터 ChIP 분석

IAA19-HA는 이 서열에 결합하는 것으로 확인됨. 하지만 ARF7-HA가 DNA에서 확인 가능한 정도의 양으로 공침 (co-precipitates)하지는 못함 (그림 7b, IAA19-HA F2/R3 and ARF7-HA F2/R3). DWF4의 활성과 이를 통한 BR 생합성 수준의 변화에 있어 옥신의 영향을 확인하기 위해 옥신 처리 후에 유식물체의 체내 BR 함량을 측정 결과, C-22-수산화 화합물과 22-OH CR, 22-OH-3-one이 각각 증가를 확인함 (그림 8). 이 결과는 애기장대 뿌리에서 옥신 처리에 의해 유동-변화 단계 (flux-determining step)에서 확연히 증가한다는 점을 시사함.

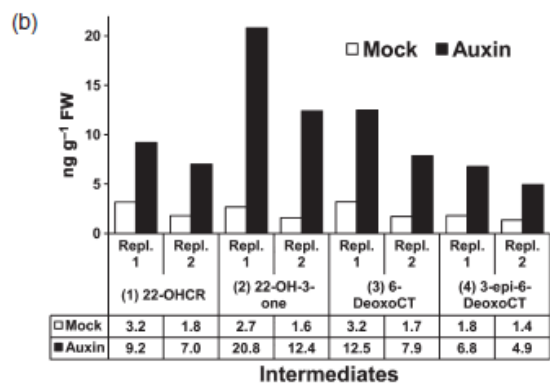


그림 8 DWF4 활성과 이를 통한 BR 생합성 수준의 변화

제 3 절 성장속도 고도화 형질전환 포플러 육성

가. 35Spro:AtDWF4, 35Spro:AtBIN2 기 개발된 포플러 나무 해부학적 및 이화학적 특성 분석

● 애기장대 BR 생합성 및 신호전달 관련 유전자들의 homologs를 포플러에서 찾아 계통학적 분석 (그림 9A와 9C) 한 결과, 대부분의 BR 관련 유전자들이 포플러에서 복제되어 있음을 확인함. 엑손-인트론의 도식도 (그림 9B와 9D)를 확인함으로써 기능적 유사성을 유추할 수 있었음.

● 포플러에서 BR 기능을 알아보고자, 생합성 효소 *DWF4*와 신호전달 음성조절자

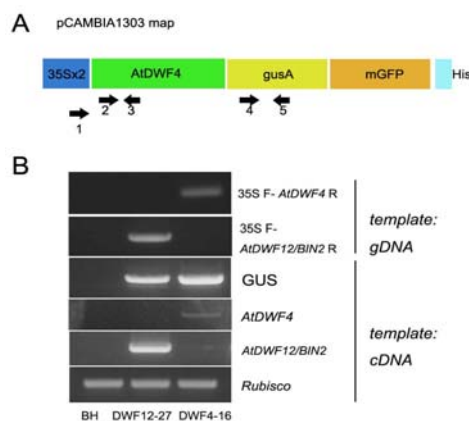


그림 10 포플러 형질전환 벡터 모식도 (A)와 과발현 여부 확인

인

AtDWF12/BIN2 를 포플러에 도입하여 과발현 여부가 확인된 라인을 중심으로 해부학 및 이화학적 특성을 분석하고자 함.

● 포플러의 형질 전환에 사용한 pCAMBIA1303 벡터는 GUS 유전자와 GFP를 함유한 과발현 벡터임. 이 벡터에 BR 생합성 유전자인 DWF4와 음성 조자 *AtDWF12/BIN2* 를 클로닝하여 과발현시킨 포플러 형질 전환체에서 대표적인 라인을 선별, 도입시킨 유전자가 잘 발현되고 있는지 확인하기 위해 PCR을 통해 전사여부 확인함. 대조군 라인

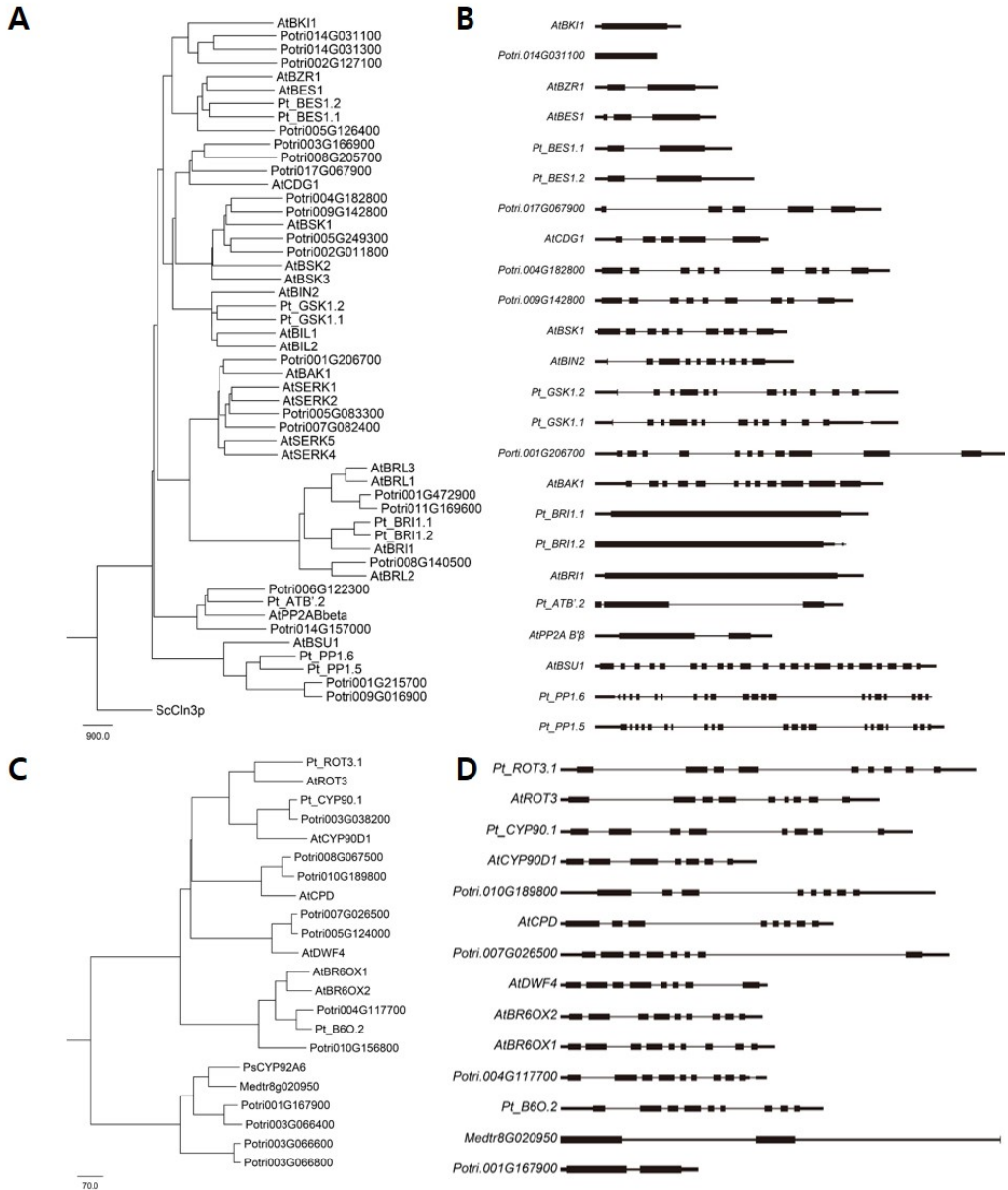


그림 9 애기장대와 포플러에서 BR 신호전달 (A, B) 및 생합성 (C, D) 관련 유전자들의 계통학적 분석 (A, C) 과 엑손-인트론 도식화 (B, D)

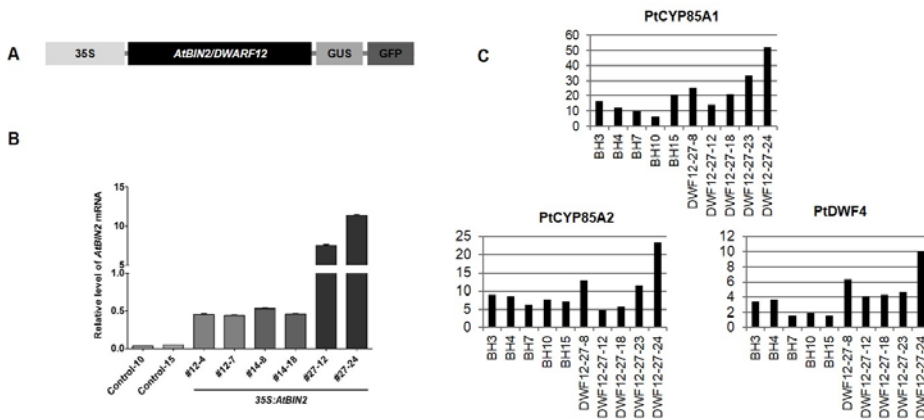


그림 11 *AtBIN2/DWARF12* 과발현 포플러 형질전환체 확인 A 도입 유전자 모식도. B 도입된 *AtBIN2* RNA 발현 수준 확인. C qRT-PCR로 포플러 내 BR 생합성 유전자 발현량 확인

인 BH (봉화)와, DWF4-16. DWF12-27 라인의 정단 부분을 잘라 genomic DNA를 추출, 포플러 염색체 안

에 pCAMBIA1303 벡터를 통해 35S프로모터와 유전자와 GUS 유전자까지 온전하게 삽입되었는지 확인하기 위해 각각의 프라이머를 제작하여 PCR로 확인함. 그림 10B와 같이 염색체 안에 삽입이 잘 되어있음을 확인함. 또한 RNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성 후 PCR을 수행하여, 도입된 DWF4와 DWF12 유전자의 전사가 잘 이루어지고 있음을 확인함. 브라시노스테로이드 생합성 유전자인 *DWF4*와 음성조절자인 *AtDWF12/BIN2*를 포플러 형질전환 벡터인 pCAMBIA1303에 클로닝, 포플러에 도입하여 그림 10과 같이 PCR을 *DWF4*와 *DWF12* 유전자의 과발현 여부가 확인된 라인을 중심으로 분석 수행함.

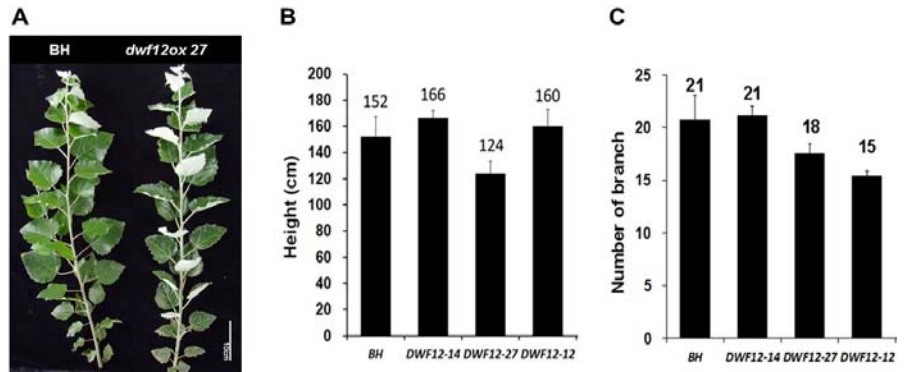


그림 11 포플러 형질전환체 수고와 가지 수 측정 결과 A. *DWF12-27* 과발현체 표현형 분석 B. 포플러 형질전환체 수고 C. 가지 수

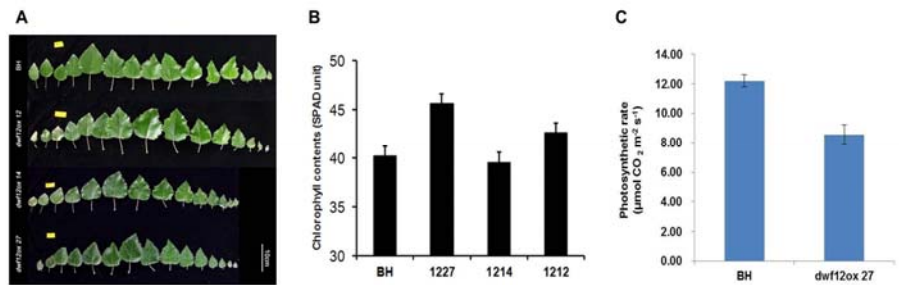
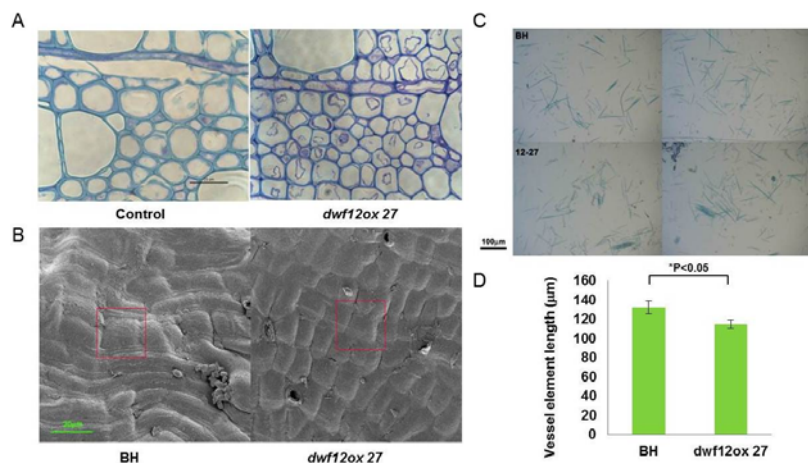


그림 13. 포플러 형질전환체 잎의 엽록소 함량 및 광합성 효율 A. 잎 표현형 비교 B. SPAD meter로 측정된 형질전환체 잎 엽록소 함량 C. 광합성 효율

● 형질전환 된 포플러에서 도입된 *AtBIN2/DWARF12*의 전사발현을 확인하였고, *AtBIN2* 과발현 포플러 내의 BR 생합성 변화를 관찰하기 위하여 계통학적 분석 결과를 활용함 (그림 9). 애기장대 생합성 유전자와 상동성이 높은 유전자 *AtDWF4* 경우 POPTR_0005s12550.2, POPTR_0007s12730.1 가 선별, *AtCYP85A1*과 *AtCYP85A2*의 경우 11680.1과 13340.1이 선별됨.

● 이들 유전자가 *DWF12-27*과 *DWF4* 과발현체 라인에서 어떻게 조절되고 있는지 확인하기 위하여 qRT-PCR을 수행 결과, *PtDWF4*, *PtCYP85A1*, *PtCYP85A2*에서 모두 증가됨 (그림 11).



● *DWF12-27* 라인은 포플러의 수고가 현저하게 짧은 편임 (그림 11) 그림 14. *DWF12-27* 과발현체 세포 크기 A. 줄기 횡단면 B. 엽병 일부 C. 도관요소 D. 도관 요소 중 가장 긴 섬유세포 길이 차이

림 12).

● 대조군인 BH에 비해 포플러에 도입된 DWF12-27 과발현체에서 애기장대와 같이 난쟁이 표현형과 함께 잎 크기가 작는데 반해 엽록소 함량이 가장 높게 나타남. 반면, 광합성 효율은 DWF12-27 과발현 라인에서 가장 낮게 측정됨 (그림 13).

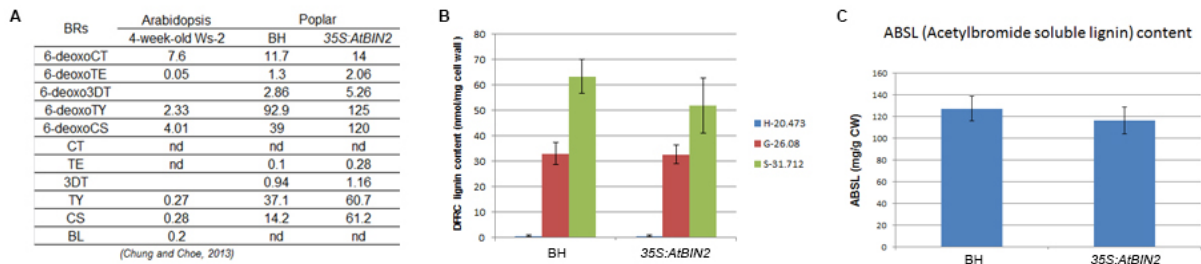


그림 15 35Spro:AtBIN2 생화학적 분석 A. 내생 브라시노스테로이드 함량 B와 C는 리그닌 함량

● DWF12-27 과발현체에서 세포수와 엽록소 함량간의 관계를 알아보기 위해 줄기의 횡단면을 section 한 결과 각각의 세포벽이 대조군에 비해 얇고, 세포의 크기가 줄어든 것을 확인 할 수 있었으며 엽병의 일부를 주사 현미경으로 관찰한 결과 같은 면적 내의 세포 크기가 현저히 줄어들었다 (그림 14).

● 형질전환 포플러의 내생 BR과 리그닌 함량 분석: 본 연구에서는 35Spro:AtBIN2 포플러 과발현체에서 내생 BR 함량이 야생형 (BH)에 비해 전반적으로 증가된 양상을 보이는데 반해 리그닌 함량은 35Spro:AtBIN2 포플러 과발현체에서 감소된 경향을 보임. 특히 S 리그닌 함량이 감소는 것으로 보아 통계적으로 유의하지는 않지만 리그닌 합성을 줄일 수 있는 가능성을 제시 할 수 있음 (그림 15).

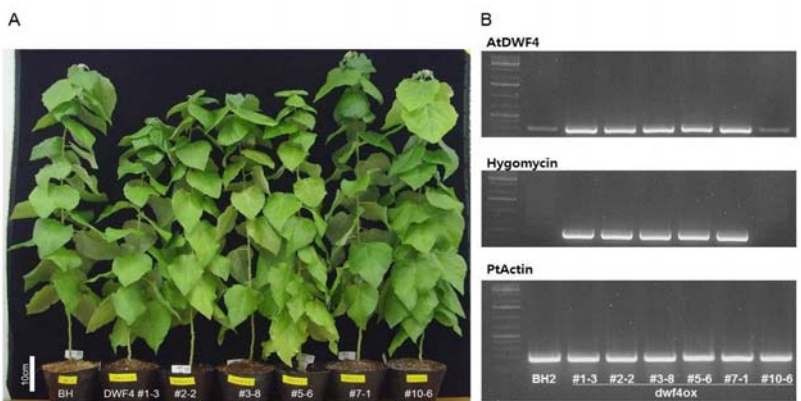


그림 16 애기장대 DWF4 유전자가 과발현 된 포플러 A. 수고와 표현형 사진 B. gDNA로 PCR하여 도입된 유전자 확인

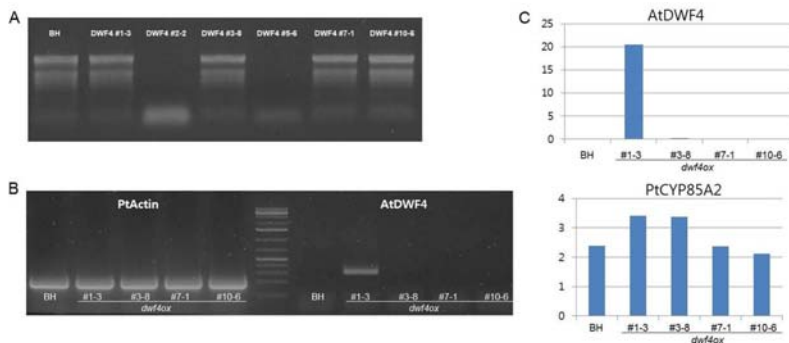


그림 17 포플러 DWF4 과발현체 확인 A. 총 RNA 1ug을 전기영동으로 확인 B. 합성된 cDNA로 semi qRT-PCR 확인 C. qRT-PCR로 삽입 유전자 확인과 포플러 내 BR 생합성 유전자 발현량 확인

● 이전의 결과에서 애기장대 DWF4 과발현 포플러 개체 확보를 위하여 PCR을 통해 DWF4 유전자의 과발현 여부를 확인하고 최종적으로 #1-3 선별됨 (그림 16과 17).

나. BR 수용체인 BRI1 과 유사한 BAL 프로모터 선발: 관다발 분화에 관여하는 SERK 유전자 형질전환체 연구

● BAK1과 단백질 서열이 비슷한 유전자가 애기장대에 5개 존재하는데 BAK1-like (BAL) 유전자임. 물관세포 분화에 있어서 BR이 핵심적으로 관여한다는 사실과 조직 특이성을 염두에 두고 생각해 보았을 때 BAL1및 BAL 유전자들은 관다발과 섬유조직의 특정 세포에서 선택적으로 발현하여 BR 신호를 인지한 후 물관으로의 분화 정도를 결정하는 중요한 역할을 수행할 것임. BR 보조수용체인 BAK1과 유사한 유전자들인 SERK 유전자들은 이미 관다발 형성에 관여하고 있는 것으로 밝혀진 바 있음 (Albrecht et al., 2008). 그래서 본 연구에서 SERK 유전자의 조절을 통해, 물관 부분의 리그닌 합성을 선택적으로 조절, 식물의 지지 기능은 손상시키지 않으면서 전체 리그닌 함량은 낮추기 위해서 SERK 유전자들의 발현 부위 확인을 통하여 SERK의 물관 형성에 관련된 기능적인 연구를 수행함 따라서 본 연구에서는 BAK1과 BAL 유전자가 관다발 세포들의 분화를 결정하는 데 있어서 수행하는 기능을 알아보기 위해 proBAL:BAL-GUS 보고자 construct을 작성한 후 야생형 애기장대에 도입, 해당 유전자의 발현 위치를 리그닌 합성이나 물관 세포의 분화와 관련하여 심층적으로 연구함.

● BAL 유전자는 그 생물학적 기능이 다양하여 SERK로 불리우고 있음. SERK는 Somatic Embryogenesis Receptor Kinase의 약자로 이 유전자가 Somatic embryogenesis 동안 발현양이 증가했음에서 불리어진 이름임 (Hecht et al., 2001) BR의 co-receptor는 BRI1과 BAK1으로 알려져 있으며, BAK1은 또한 SERK3로도 불리며. 지금까지 리그닌을 포함하는 2차벽이 발달하는 물관을 조절하는 방법을 고안하기 위해, 여러 형질전환체를 통해 리그닌을 포함하는 이차벽 발달 조절에 대한 연구를 소개하였으며 BRL 유전자들을 이용한 연구 뿐 만 아니라, 보조수용체인 BAK1 또한 관다발 형성에 중요한 역할을

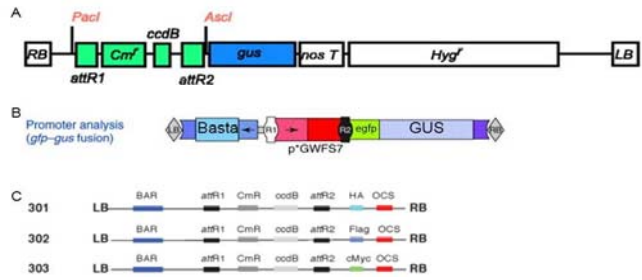


그림 18 재조합에 사용된 벡터
A. pMDC163 B. pBGWFS7 C. pEarleyGate 벡터

plant selection showing the 1 copy of SERK1:GUS line (Jinyoung) 2nd screening pink_1 copy (C3.82)

BastaR, resistant to Basta ; BastaS, sensitive to Basta
The X2 values are for an expected ratio of 3:1. X2=(o-e)2/e (BastaR) + (o-e)2/e (BastaS) # X2<3.84, p>0.05.

#	T2 line				chi-square goodness of fit test					
	total plants	Basta ^R	Basta ^S	non-germination plants	observed	expected	(o-e)	(o-e) ²	(o-e) ² /e	X ²
T2.1	59	24	12	23	27	24	3	9.00	0.38	0.38
T2.2	139	57	79	3	102	57	45	2025.00	35.53	61.16
T2.3	41	8	11	22	14.25	8	6.25	39.06	4.88	8.43
T2.4	144	0	123	21	102.25	0	-6.25	39.06	3.58	
T2.5	74	69	5	0	55.5	69	-13.5	182.25	2.64	39.09
T2.6	66	66	0	0	18.5	66	-47.5	225.00	3.75	#DIV/0!
T2.7	69	44	13	1	44.25	44	-0.75	0.56	0.01	0.30
T2.8	65	58	14	1	14.75	15	0.25	0.06	0.24	0.37
T2.9	61	44	17	0	46	14	32	1024.00	0.29	0.29
T2.10	61	44	17	0	45.75	44	1.75	3.06	0.07	0.25
T2.11	45	29	14	2	32.25	29	3.25	10.56	0.36	1.12
T2.12	43	32	11	0	10.75	14	-3.25	10.56	0.75	
T2.13	43	32	11	0	32.25	32	0.25	0.06	0.01	0.01
T2.14	43	32	11	0	10.75	11	-0.25	0.06	0.01	

plant selection showing the 1 copy of SERK2:GUS line (Jinyoung) 2nd screening pink_1 copy (C3.82)

BastaR, resistant to Basta ; BastaS, sensitive to Basta
The X2 values are for an expected ratio of 3:1. X2=(o-e)2/e (BastaR) + (o-e)2/e (BastaS) # X2<3.84, p>0.05.

#	T2 line				chi-square goodness of fit test					
	total plants	Basta ^R	Basta ^S	non-germination plants	observed	expected	(o-e)	(o-e) ²	(o-e) ² /e	X ²
T2.1	36	25	11	0	27	25	2	4.00	0.16	0.16
T2.2	63	0	61	2	45.75	0	-45.75	2093.06	34.31	#DIV/0!
T2.3	39	26	13	0	29.25	26	3.25	10.56	0.41	1.22
T2.4	166	0	164	2	123	0	-123	15129.00	92.25	#DIV/0!
T2.5	79	57	21	1	41	164	123	15129.00	92.25	#DIV/0!
T2.6	29	0	28	1	19.5	21	1.5	2.25	0.04	0.15
T2.7	17	0	17	0	12.75	17	-4.25	18.06	0.11	
T2.8	24	0	24	0	16.5	21	-4.5	20.25	0.11	
T2.9	28	0	22	6	16.5	0	-16.5	272.25	9.56	#DIV/0!
T2.10	24	0	24	0	15.75	24	-8.25	68.06	2.38	#DIV/0!
T2.11	34	4	21	9	18.75	4	14.75	217.56	10.36	64.75
T2.12	16	0	16	0	12	0	-12	144.00	9.00	#DIV/0!
T2.13	18	0	18	0	13.5	0	-13.5	182.25	9.00	#DIV/0!
T2.14	18	0	18	0	4.5	18	-13.5	182.25	10.13	

plant selection showing the 1 copy of SERK3:GUS line (Jinyoung) 2nd screening pink_1 copy (C3.82)

BastaR, resistant to Basta ; BastaS, sensitive to Basta
The X2 values are for an expected ratio of 3:1. X2=(o-e)2/e (BastaR) + (o-e)2/e (BastaS) # X2<3.84, p>0.05.

#	T2 line				chi-square goodness of fit test					
	total plants	Basta ^R	Basta ^S	non-germination plants	observed	expected	(o-e)	(o-e) ²	(o-e) ² /e	X ²
T2.1	54	41	13	0	40.5	41	-0.5	0.25	0.01	0.01
T2.2	68	52	16	0	13.5	13	0.5	0.25	0.00	0.00
T2.3	68	52	16	0	51	52	-1	1.00	0.02	0.00
T2.4	44	30	14	0	17	16	1	1.00	0.06	0.06
T2.5	44	30	14	0	23	30	-7	49.00	3.38	0.94
T2.6	100	0	100	0	11	14	-3	9.00	0.64	0.64
T2.7	69	55	14	0	75	0	-75	5625.00	86.25	#DIV/0!
T2.8	69	55	14	0	51.75	55	-3.25	10.56	1.18	0.96
T2.9	71	52	19	1	17.25	14	3.25	10.56	0.75	0.00
T2.10	71	52	19	1	52.5	52	0.5	0.25	0.01	0.01
T2.11	60	55	5	0	45	55	-10	100.00	1.71	10.36
T2.12	60	55	5	0	19	7	12	144.00	7.00	
T2.13	71	51	19	1	52.5	51	1.5	2.25	0.04	0.16
T2.14	117	60	47	2	17.5	19	-1.5	2.25	0.12	
T2.15	117	60	47	2	85.25	60	25.25	637.56	4.90	11.98
T2.16	70	51	19	1	26.25	47	-20.75	430.56	7.00	
T2.17	70	51	19	1	51.75	51	0.75	0.56	0.01	0.04
T2.18	89	59	27	3	17.25	18	-0.75	0.56	0.03	
T2.19	89	59	27	3	64.5	59	5.5	30.25	0.51	1.63
T2.20	84	65	19	0	21.5	27	-5.5	30.25	1.12	
T2.21	84	65	19	0	63	65	-2	4.00	0.06	0.22
T2.22	84	65	19	0	21	19	2	4.00	0.21	

그림 19 SERKs:GUS의 형질전환체의 chi-square 의한 도입 유전자 복제 수 확인

하고 있음.

- 야생형 애기장대에 *SERK1*, *SERK2*, *SERK3*를 유전자 프로모터 분석용 벡터인 pBGWFS7과 해당 유전자 발현 위치와 시기를 확인 할 수 있도록 GUS를 보고자로 갖는 pMDC163 벡터에, 그리고 프로티오믹스에 이용할 수 있는 pEarleyGate 벡터에 클로닝함 (그림 18).

- 클로닝된 벡터를 식물체 내에 형질전환하여 2세대에 걸쳐 각각의 *SERK*와 그 벡터에 대한 동형접합라인을 확보함 (그림 19와 20). *SERK1* 과발현체는 키가 야행형의 4/5 정도로 약간 작은 표현형을 보이고, silique 크기가 작음. *SERK2* 역시 키가 조금 작아지는 표현형을 보임 (그림 21).

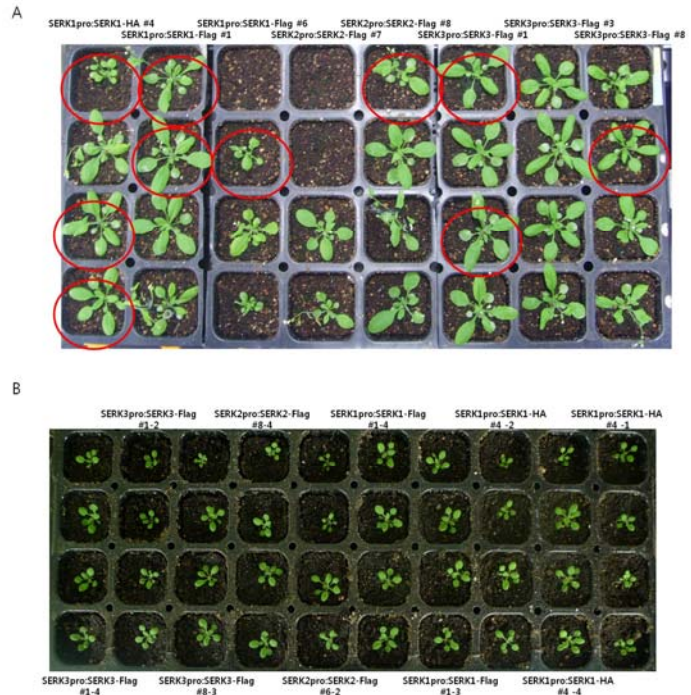


그림 20 *SERKs* 과발현체의 동형접합체 선별
A. T2 세대 B. T3 세대



그림 21 *SERK1*형 질전환체 (왼쪽)와 *SERK2*형질전환체 (가운데와 오른쪽)

- 최종적으로 동형접합체 라인의 단백질 발현 여부를 위하여 *SERK1pro:SERK1-Flag*, *SERK2pro:SERK2-Flag*, *SERK3pro:SERK3-Flag* 형질전환 식물체에서 단백질을 추출, western blot을 실시한 결과 이들 유전자에 대한 단백질이 발현된 것을 최종 확인함. 또한, 단백질 안정성 여부에 대한 실험을 한 결과 BR의 보조 수용체인 *BAKs* (*SERK1*, *SERK2*, *SERK3*) 형질전환체를 대상으로 BL, BRZ (BRs 생화학 억제제인 Brasinazole), BRZ+MG132, 조건에서 조절되는 각 인자들의 단백질 발현 수준을 western을 통하여 확인 결과 26S 프로테아좀 억제제인 MG132를 같이 처리하였을 때에는 단백질이 분해되지 않고 축적됨 (그림 22).

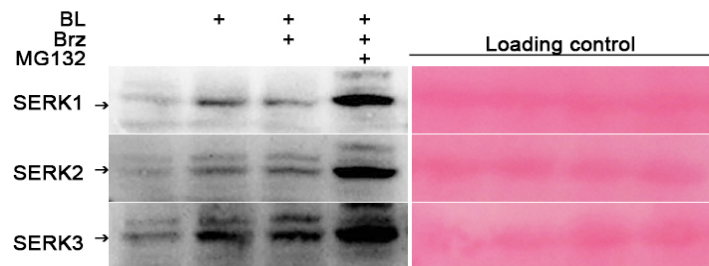


그림 22 BR에 의해 조절되는 *SERKs* 단백질 발현수준

● 유전자 발현 위치와 시기를 확인할 수 있도록 GUS 를 보기 위하여 클로닝 된 벡터를 식물체 내에 형질 전환하여 2세대에 걸쳐 동형접합체 라인을 선별함. *SERK1* 유전자의 발현 GUS 발현 위치는 그림 와 같이 있을 포함한 정단 부분에서 발현이 강하게 되었으며, *SERK3*는 잎을 포함하여 뿌리에서도 강하게 발현이 되었음 (그림 23).

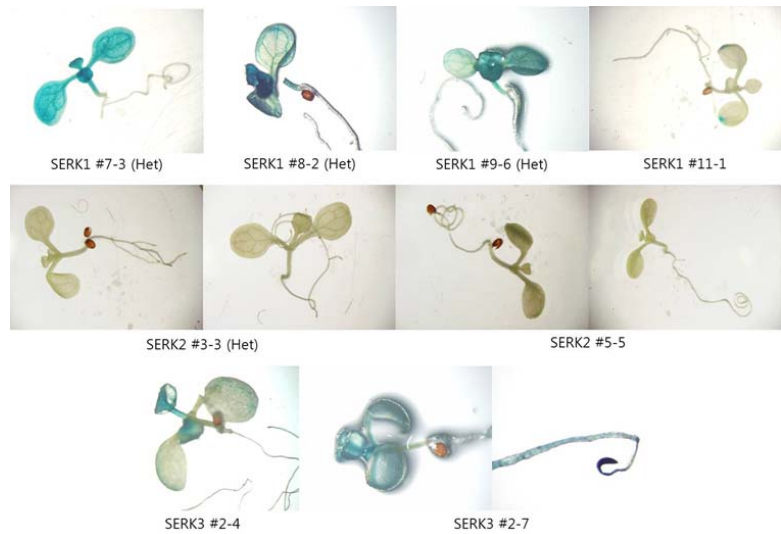


그림 23 SERKs 유전자의 GUS 발현 위치

● SERK 단백질들이 어떠한 단백질들과 상호 작용하여 관다발 형성에 관여하는지 알아보기 위하여

SERK1pro:SERK1-HA 형질전환 식물체에서 얻은 단백질을 대상으로 HA 아가로스 비드를 이용, 면역침전반응을 현재 수행중임. 정제된 단백질을 대상으로 대조군 단백질과 발현 양상이 변화된 단백질이 관찰을 관찰 하였으나 아직 새로운 인자를 발굴하지 못하였음. 현재 새로운 인자 발굴을 위해 여러 가지 방법으로 시도하고 있는 중이며 형질전환 식물체 양이 중요하기에 형질전환 식물체의 종자를 확보하여 실험이 진행 중임. 면역침전 방법을 통하여 새로운 인자를 발굴할 경우 물관 형성 및 리그닌 합성에 관련이 있는 새로운 인자들의 조절로, 물관에서의 리그닌 fiber의 양을 선택적으로 줄일 수 있는 시도가 가능해 질 것으로 보임.

다. BRL 프로모터 선별; BRL 유전자 프로모터-보고자 분석

● 애기장대에는 BR 신호를 인지하는 막 수용체 단백질인 BRI1과 유사 단백질, BRL1과 BRL3는 BRI1의 기능과 동일하게 BR을 인지하는 수용체로서 작용함 (Fàbregas et al., 2013). BRL1은 애기장대 전 조직에서 발현되나 특별히 관다발 조직에서 2차 성장을 담당하는 전형성층 세포 (procambial cell)에 발현이 집중되어 있는 반면, BRL3는 애기장대 뿌리 조직의 체관 세포에서 발현됨 (Caño-Delgado et al., 2004). 이것으로 보아 BR은 관다발에 분포하는 BRL1과 BRL3 수용체에 의해 인지되어 각각 물관과 체관 세포로 분화를 유도하는 것으로 가정하고 있지만 아직 체계적이고 깊이 있는 연구가 부족한 상황이므로 BRL 프로모터의 체계적인 분석이 필요함.

● BRL 유전자 프로모터-보고자 유전자 재조합 DNA를 얻기 위하여 ABRC에서 BAC (bacterial artificial chromosome) clone (BRL1:F20N2, BRL3:MRP15)을 구입하여 Gateway 시스템을 이용하여 클로닝 수행함. 각각의 BAC clone을 주형으로 specific primer를 이용하여 PCR을 해서 대상 유전자를 증폭하고, 증폭된 유전자는 pENTR/SD/D-TOPO vector (Invitrogen, USA)과 ligation하여 *E. coli* cell (Top 10)에 형질전환하여 cell stock을 확보하고 염기서열을 분석함.

● BRL 유전자 프로모터-보고자 유전자 즉, 확보된 BRL1pro:BRL1과 BRL3pro-BRL3를 epitope

이 HA, Flag, cMyc인 pEarlyGate 301, 302, 303 vector 에 최종 클로닝하여 애기장대에 형질전환함 (그림 24).

● 이들 벡터는 식물 형질전환 마커로 바스타 (basta) 저항성 유전자를 가지고 있으므로 바스타를 이용하여 T1 세대에서 형질전환체를 15개체 이상 선별 후 선별된 형질전환체에서 종자를 받아서 T2 세대에서 chi-square 테스트에 의해 T-DNA가 1 copy 들어간 형질전환체를 획득함 (그림 25).

● T3 세대에서 동형접합체 라인을 선별한 후 BRL1과 BRL3의 단백질 발현을 여부를 확인하여 동형접합체 최종 라인을 선별함. BRL1과 유사한 BR 인식 수용체인 BRLs (*BRL1*, *BRL3*) 형질전환체를 대상으로 BL, BRZ (BRs 생합성 억제제인 Brasinazole), BRZ+MG132, 조건에서 조절되는 각 인자들의 단백질 발현 수준을 western을 통하여 확인 결과 26S 프로테아좀 억제제인 MG132를 같이 처리하였을 때에는 단백질 분해가 억제되어 축적됨 (그림 26).

● *BRL1_{PRO}:BRL1*과 *BRL3_{PRO}:BRL3* 형질전환 식물체의 동형접합체의 표현형 분석 결과 5일된 유식물체의 경우 야생형에 비해 길이가 생장이 느리고, 하배축 및 뿌리 길이가 작은 편임. 또한 3주된 형질전환 식물체의 경우 개화시기가 느리고, *BRL1_{PRO}:BRL1* 식물체의 줄기가 약하게 보이며, *BRL3_{PRO}:BRL3* 형질전환 식물체의 shoot 길이가 *BRL1_{PRO}:BRL1* 형질전환체와 차이를 보임 (그림 27). 이러한 표현형의 차이를 바탕으로 *BRL1_{PRO}:BRL1*과 *BRL3_{PRO}:BRL3* 형질전환 식물체의 형태학·화학적 차이를 분석중임 .

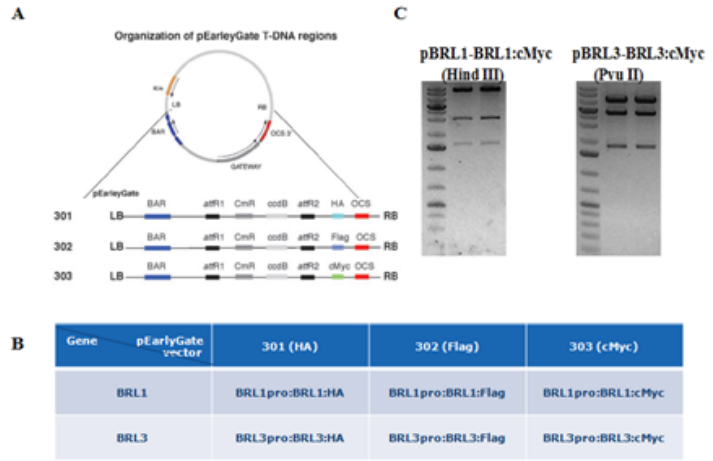


그림 24 BRL1pro-BRL1 과 BRL3pro-BRL3 형질전환용 운반체 제작

T2 line (BRL1PRO:BRL1:Flag)					chi-square goodness of fit test (p=1, 1 copy)					
#	total plants	Basta ^R	Basta ^S	non-germination plants	observed	expected	(o-e)	(o-e) ²	(o-e)/e	χ ²
T2-1	178	125	48	5	129.75	125	4.75	22.56	0.18	0.65
T2-3	194	146	46	2	144	146	-2	4.00	0.03	0.11
T2-4	152	128	23	1	113.25	128	-14.75	217.56	1.70	11.16
T2-5	154	141	13	0	115.5	141	-25.5	650.25	4.61	54.63
T2-7	142	113	27	2	105	113	-8	64.00	0.57	2.94
T2-8	154	136	16	2	114	136	-22	484.00	3.56	33.81
T2-10	154	122	32	0	115.5	122	-6.5	42.25	0.35	1.67
					38.5	32	6.5	42.25	1.32	

T2 line (BRL3PRO:BRL3:Flag)					chi-square goodness of fit test					
#	total plants	Basta ^R	Basta ^S	non-germination plants	observed	expected	(o-e)	(o-e) ²	(o-e)/e	χ ²
T2-2	133	104	28	1	99	104	-5	25.00	0.24	1.13
T2-3	137	112	24	1	103	112	-10	100.00	0.89	5.06
T2-4	169	121	48	0	126.75	121	5.75	33.06	0.27	0.96
T2-5	109	97	11	1	81	97	-16	256.00	2.64	25.91
T2-7	162	145	17	0	121.5	145	-23.5	552.25	3.81	36.29
T2-8	160	124	35	1	119.25	124	-4.75	22.56	0.18	0.83
T2-14	187	144	41	2	138.75	144	-5.25	27.56	0.19	0.86
T2-16	157	118	38	1	117	118	-1	1.00	0.01	0.03
					39	38	1	1.00	0.03	

T2 line (BRL3PRO:BRL3:cMyc)					chi-square goodness of fit test					
#	total plants	Basta ^R	Basta ^S	non-germination plants	observed	expected	(o-e)	(o-e) ²	(o-e)/e	χ ²
T2-1	191	151	40	0	143.25	151	-7.75	60.06	0.40	1.90
T2-3	140	137	3	0	105	137	-32	1024.00	7.47	348.81
T2-4	138	102	34	2	102	102	0	0.00	0.00	0.00
T2-5	138	108	29	1	102.75	108	-5.25	27.56	0.26	1.21
T2-6	129	119	9	1	96	119	-23	529.00	4.45	63.22
T2-8	126	81	42	3	92.25	81	11.25	126.56	1.56	4.58
T2-13	120	77	42	1	89.25	77	12.25	150.06	1.95	5.52
T2-14	127	86	41	0	95.25	86	9.25	85.56	0.99	3.08
					31.75	41	-9.25	85.56	2.09	

Basta^R, resistant to Basta, Basta^S, sensitive to Basta
The χ² values are for an expected ratio of 3:1. χ²=(o-e)²/e (Basta^R) + (o-e)²/e (Basta^S). If χ²<3.84, p>0.05.

그림 25 chi-square 테스트에 의한 도입 유전자 복제 수

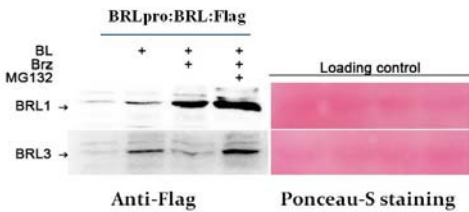


그림 26 BR에 의해 조절되는 BRL1과 BRL3의 단백질 발현 수준

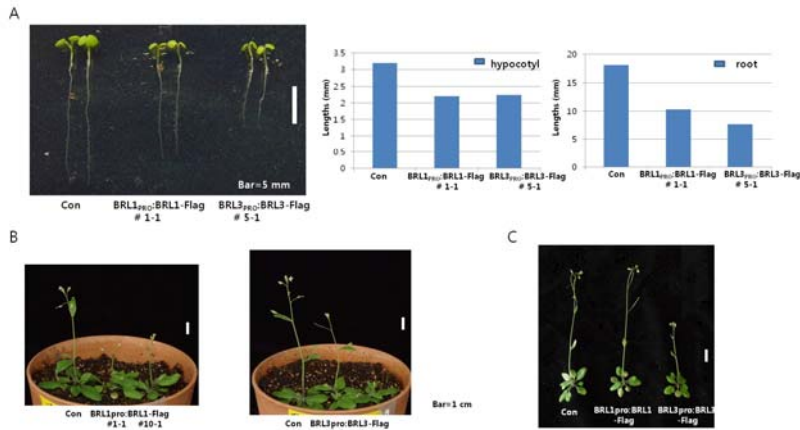


그림 27 BRL1_{PRO}:BRL1-Flag와 BRL3_{PRO}:BRL3-Flag 동형접합체의 표현형 분석

A. 5일된 형질전환 유식물체 표현형과 하배축 및 뿌리 길이 B. 3주된 형질전환 식물체의 개화 시기 차이 C. 4주 된 형질전환 식물체의 표현형 차이

제 4 절 리그닌 생성을 조절하는 신규 BR 유전자 발굴

가. 전사체학 분석에 의해 선별된 PEROXIDASE RNAi 형질전환체의 형태학적·생화학적 분석

● BR 생합성 억제제 처리하에서 하배축 신장을 보이는 광수용체 피토크롬 B에 결합이 있는 *gul2* (*phyB*) 돌연변이와 BR 수용체 결합 돌연변이체와의 마이크로어레이 유전자 발현 비교 분석 진단함. 그 결과 *gul2* 돌연변이에서 유의미하게 퍼옥시다제 (*peroxidase; Prx*) 유전자들의 발현이 상대적으로 감소되어 있음 (그림 28A). NCBI GenBank 와 Phytozome (www.phytozome.net)에 제시된 애기장대 73종의 퍼옥시다제 유전자의 아미노산 서열을 이용하여 계통수를 작성한 결과 선별된 퍼옥시다제와 상동성을 가진 퍼옥시다제 유전자를 분석할 수 있었으며 Prx35와 Prx73의 상동성이 높음을 발견 됨 (그림 28B).

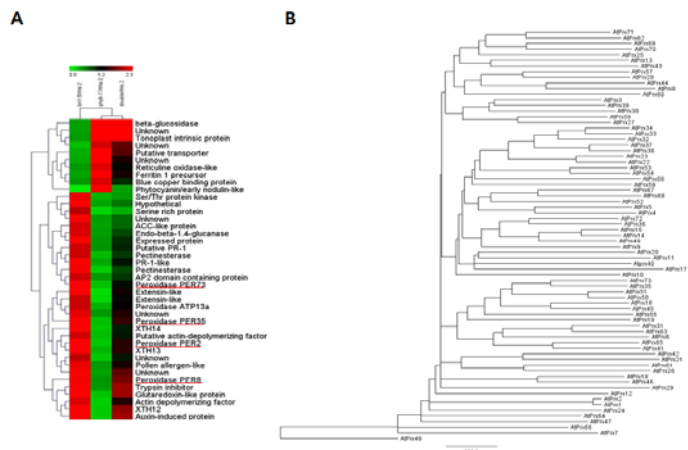


그림 28 마이크로어레이를 통해 브라시노스테로이드와 빛에 공조절되는 퍼옥시다제 유전자 선별 (A)과 73종 애기장대 퍼옥시다제 아미노산 서열 계통수 (B).

● 광수용체 돌연변이 (*phyB*) 에서 하향 조절되지만 브라시노스테로이드 결합 돌연변이 (*bri1-5*) 에서 상향 조절되는 퍼옥시다제들을 대상으로 다음과 같은 RNAi 형질전환 식물체-35Spro:Prx2 RNAi (pH7GWIWGII:Prx02), 35Spro:Prx8 RNAi (pB7GWIWGII:Prx08), 35Spro:Prx35 RNAi (pB7GWIWGII:Prx35), 35Spro:Prx73 RNAi (pB7GWIWGII:Prx73) -를 제작함 (그림 29B). 상기 제작된 재조합 DNA를 *Agrobacterium* (GV3101)에 도입, 애기장대 야생형에 형질전환함. 형질전환 후 mRNA 전사시 목적유전자가 hairpin RNAi 구조를 형성하기 위하여 각 퍼옥시다제 유전자 단편을 sense 방향과 antisense 방향으로 삽입되게 하고 이들의 중간부분에 애기장대 intron이 위치하도록 한 pB7GWIWGII 와 pH7GWIWGII 벡터의 이용은 RNAi 를 이용한 고효율 유전자 사일런싱 (gene silencing)에 유용하게 적용될 수 있음 (그림 29A). pB7GWIWGII와

pH7GWIWGII는 미생물내 선발 마커로 스펙티노마이신, 식물 형질전환 마커로 각각 바스타와 하이그로마이신 저항성 유전자를 가지고 있어 T1 세대에서 이를 이용하여 선별함.

● T2 세대에서 chi-square 테스트에 의해 T-DNA가 1 copy 들어간 형질전환체를 획득함. 이들을 대상으로 T3 세대에서 각 유전자 벡터의 식물 형질전환 마커에서 모두 생존하는 라인을 우선 선별하였음. 각각의 유식물체로부터 총 RNA를 분리, RNAi 를 이용한 gene silencing으로 형질전환 애기장대에 도입된 퍼옥시다제 (Prx02, Prx08, Prx35, Prx73) 유전자의 발현 억제 라인 선별을 위하여 각 유전자들에 해당되는 특이적 프라이머를 사용, Real-time PCR을 수행, 35Spro:Prxs RNAi 형질전환체의 순종 라인을 선별함.

● 선별된 T4 세대 35Spro:Prxs RNAi 형질 전환체의 6일된 20개체의 유식물을 대상으로 유식물 단계에서 성장 및 발달에 있어서 증가된 비율을 나타냄 (그림 30A). 하배축과 뿌리 길이를 비교한 결과 야생형에 비해 35Spro:Prx2 RNAi 는 각각 78.7%과 33.2%, 35Spro:Prx8 RNAi 는 각각 31.8%과 22%, 35Spro:Prx35 RNAi 는 각각 61%과 70.1%, 35Spro:Prx73 RNAi 는 각각 70.8%과 26.9% 증가됨 (그림 30B). 뿌리 길이가 야생형보다 더 길어지고, 하배축 신장 발달이 빠르게 일어나며 이들을 샘플링 하여 qRT-PCR을 수행한 결과 야생형에 비해 각 유전자들의 전사발현이 억제된 것을 확인됨 (그림 30C).

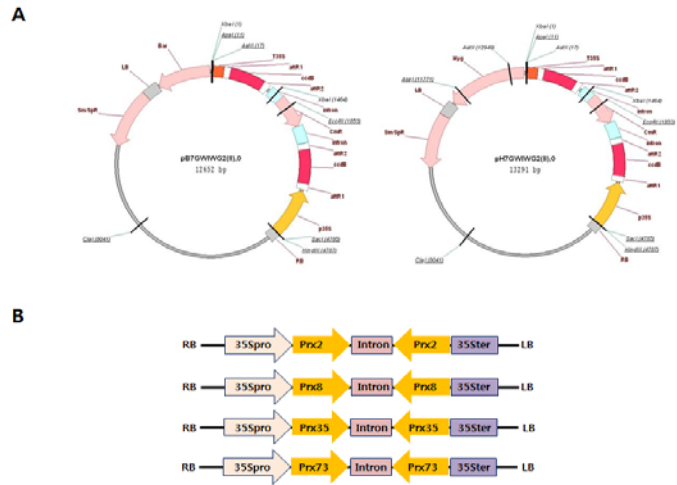


그림 29 식물체 내에 퍼옥시다제 유전자 발현을 억제 하기 위해 사용된 형질전환벡터 (RNAi) 모식도. B는 각각의 퍼옥시다제 재조합 벡터 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi, 35Spro:Prx73 RNAi 의 모식도.

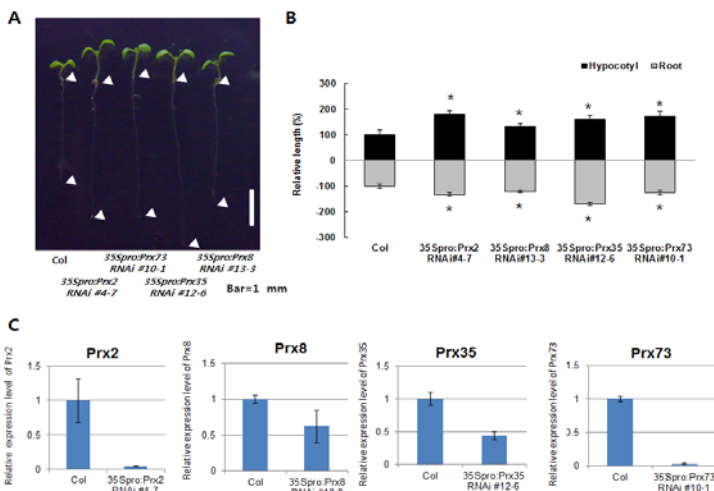


그림 30 6일된 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi, 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환 동형접합체 라인을 대상으로 야생형에 비해 하배축과 뿌리가 신장된 유식물체 표현형 (15A) 및 이들 상대적 길이 분석 (15B), qRT-PCR을 통해 각 퍼옥시다제 유전자의 전사발현 억제 수준 (15C) 을 나타낸 도면. 눈금 막대 = 1 mm.

● 6일된 각각의 35Spro:Prxs RNAi 유식물체를 대상으로 퍼옥시다제 활성을 3회 이상 측정된 결과이다. 퍼옥시다제 활성은 guaiacol (sigma)을 기질로 사용하여 Chance 와 Maehly (1955) 방법에 따라 측정함. 50 mM sodium acetate buffer (pH 7), 25 mM guaiacol, 25 mM H₂O₂ 를 제

조하여 470 nm에서 흡광도 변화를 측정함. 야생형에 비해 모든 라인이 감소되어 있었음 (그림 31).

● 각 퍼옥시다제 유전자의 전사발현이 억제된 형질전환체에서 과산화수소 축적 정도를 시각화하기 위하여 2주된 야생형과 형질전환체를 대상으로 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 염색을 수행하였다. 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 축적을 분석하기 위하여

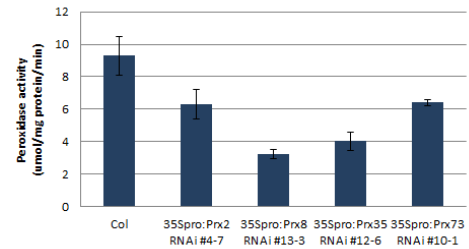


그림 31 6일된 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi, 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환 동형접합체 라인 퍼옥시다제 활성



그림 32 축적 정도 H_2O_2 를 확인하기 위해 2주된 야생형과 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi, 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환 유식물체에 0.1% 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB)으로 염색한 결과 (A). B는 상층부, C는 자엽, D는 뿌리 부분을 DAB으로 염색한 결과.

동안 끓이고, 50% 에탄올로 두 번 세척, 엽록소를 완전히 제거함. 이 샘플은 50% 글리세롤에 고정시키고, 광학 현미경하에서 촬영함. DAB은 H_2O_2 와 퍼옥시다제가 있을 때 식물체에 의해 빨리 흡수, 중합되어 갈색으로 염색이 되는데 정상적인 상태에서도 야생형에 비해 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi, 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환체에서 축적이 증가됨 (그림 17A). 특히 형질전환체 자엽에서는 DAB 및 H_2O_2 의 반응 특성인 갈색 점이 분석되었으며 잎과 뿌리의 vein과 vascular bundles 에서 높게 축적됨. 야생형에 비해 형질전환체의 떡잎 정맥 (cotyledon vein) 의 패턴이 다르며 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환체 떡잎에서 vein 의 발달이 감소됨을 보임 (그림 32B-32D). 퍼옥시다제는 과산화수소를 이용해 각종 기질을 산화시키는 반응을 촉매하는 효소이므로 형질전환체의 경우에 야생형에 비해 성장 발달이 촉진될 뿐 아니라 RNAi 형질전환체에서 퍼옥시다제의 발현이 억제되어 있어 H_2O_2 가 야생형에 비해 과산화수소가 상대적으로 더 많이 축적되었을 것으로 사료됨.

● 35Spro:Prxs RNAi 형질전환체는 야생형에 비해 꽃대 올라오는 시기가 빠를 뿐만 아니라 빠

른 줄기 성장을 보임 (그림 33).

● 초기 성장률이 증가되었으며 30일된 35Spro:Prx2 RNAi 형질전환체 분석 결과, 야생형에 비해 35Spro:Prx2 RNAi 형질전환식물체 사이즈도 증가, 키도 2배 이상 커질 뿐만 아니라 전체적인 근생엽의 엽병, 엽장, 엽폭 길이가 증가됨 (그림 34A와 34B). 야생형과 35Spro:Prx2 RNAi 형질 전환식물체의 차이를 보다 자세하게 관찰하기 위하여 52개 이상의 식물체에서 자엽을 제외한 5번 (bolting) 시점이 다른

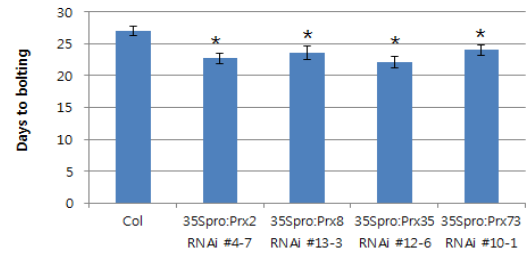


그림 33 장일 조건에서 성장시킨 야생형과 35Spro:Prxs RNAi 형질전환체에서 꽃대

째 앞의 엽병, 엽장, 엽폭 길이 결과를 그래프로 도식화 하였으며 야생형에 비해 각각 2배, 1.4

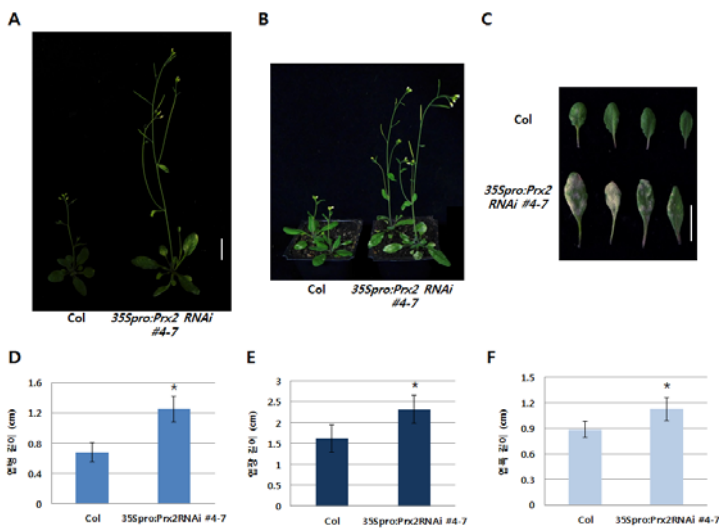


그림 34 30일된 35Spro:Prx2 RNAi 형질전환체의 표현형을 분석한 그림. A와 B는 야생형과 35Spro:Prx2 RNAi 형질전환체의 표현형을 확인한 그림이며 C는 자엽을 제외한 5, 6, 7, 8번째 잎, D, E, F는 각각 5번째 잎의 엽병, 병장, 엽폭 길이. 이미지 눈금 막대 = 2 cm.

배, 1.2배 증가됨 (그림 34D~F). 35Spro:Prx2 RNAi 형질전환체는 전체적으로 빠른 성장을 보임.

● 35Spro:Prx8 RNAi 형질전환체를 분석한 결과, 야생형에 비해 35Spro:Prx8 RNAi 형질전환식

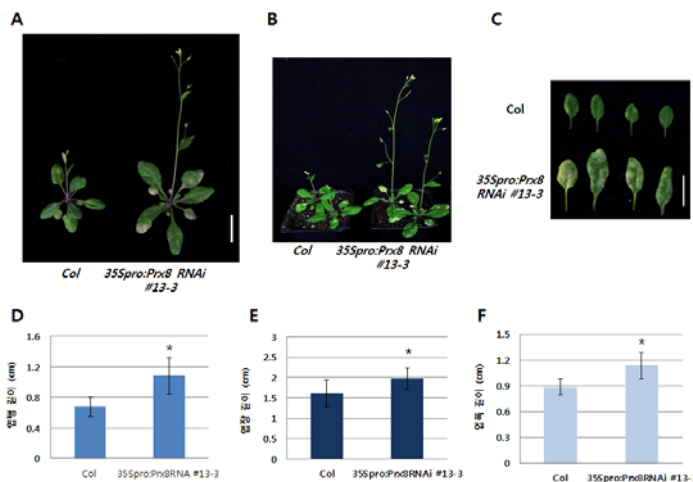


그림 35 30일된 35Spro:Prx8 RNAi 형질전환체의 표현형을 분석한 그림. A와 B는 야생형과 35Spro:Prx8 RNAi 형질전환체의 표현형을 확인한 그림이며 C는 자엽을 제외한 5, 6, 7, 8번째 잎, D, E, F는 각각 5번째 잎의 엽병, 병장, 엽폭 길이를 나타낸 그래프. 이미지 눈금 막대 = 2 cm.

물체의 전반적인 크기가 증가되었으며 키도 2배 정도 커질 뿐만 아니라 전체적인 로켓잎의 엽병, 엽장, 엽폭이 증가됨 (그림 35A와 35B). 야생형과 35Spro:Prx8 RNAi 형질전환식물체의 차이

를 보다 자세하게 관찰하기 위하여 52개 이상의 식물체에서 자엽을 제외한 5번째 잎의 엽병, 엽장, 엽폭 길이를 그래프로 도식화 한 결과 야생형에 비해 각각 1.6배, 1.2배, 1.3배 모두 증가됨 (그림 35D~35F). 35Spro:Prx8 RNAi 형질전환체는 전체적으로 빠른 성장을 보임.

● 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환체를 분석한 결과, 야생형에 비해 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환 식물체 사이즈도 증가되었으며 키도 3배 이상 커질 뿐만 아니라 전체적으로 근생엽의 엽병, 엽장, 엽폭이 증가됨 (그림 21A와 21B). 그러나 흥미롭게도 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환식물체가 모두 누워서 자라는 경향을 보여 줄기 종단면을 절단해본 결과 야생형보다 줄기 종단면 직경이 작음 (그림 25A와 D 왼쪽). 야생형과 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환식물체의 차이를 보다 자세하게 관찰하기 위하여 52개 이상의 식물체에서 자엽을 제외한 5번째 잎의 엽병, 엽장, 엽폭 길이를 측정하여 그래프로 도식화 한 결과 야생형에 비해 엽병의 길이는 비슷하였으나 엽장, 엽폭 길이는 각각 1.3배씩 모두 증가됨 (그림 36D~36F).

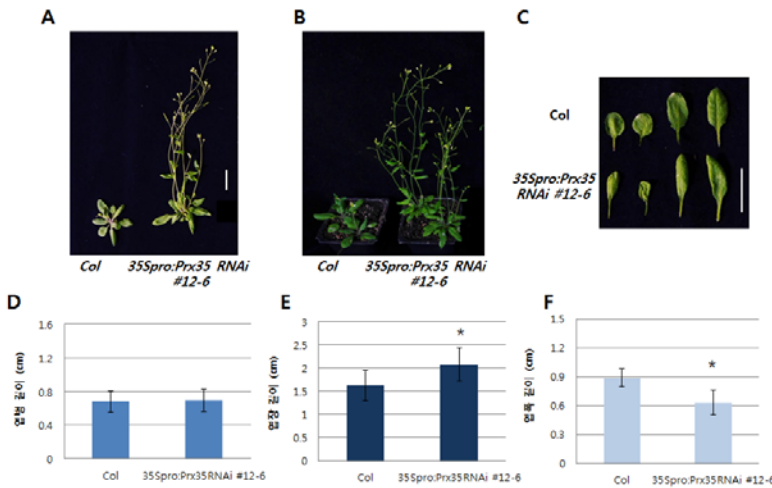


그림 36 30일된 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환체의 표현형을 분석한 그림이다. A와 B는 야생형과 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환체의 표현형을 확인한 그림이며 C는 자엽을 제외한 5, 6, 7, 8번째 잎, D, E, F는 각각 5번째 잎의 엽병, 엽장, 엽폭 길이를 나타낸 그래프. 눈금 막대 = 2 cm.

● 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환체는 전체적으로 빠른 성장을 보이는데 6주된 야생형과 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환식물체 장각과 (silique) 사이즈를 분석한 결과 형질전환체가 1.4배 작은 것이 확인되었으며 이는 꽃잎 모양 및 크기와도 일치됨 (그림 37).

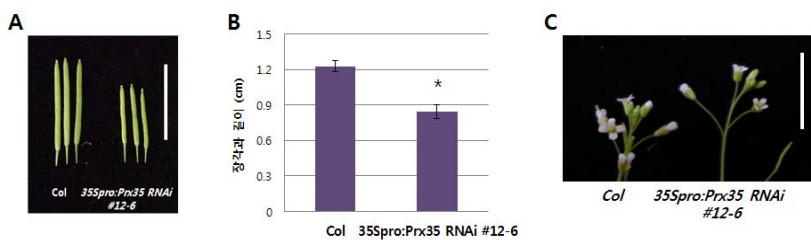


그림 37 6주된 야생형과 35Spro:Prx35 RNAi 형질전환체의 장각과 크기 (A) 및 꽃잎 비교를 보여주는 도면. 눈금 막대 = 1 cm.

● 초기 성장률도 증가되었으나 30일된 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환체를 분석한 결과, 야생형에 비해 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환식물체 사이즈도 증가되었으며 키도 2배 정도 커질 뿐만 아니라 전체적인 로제트의 엽병, 엽장, 엽폭이 증가됨 (그림 38A와 38B). 야생형과 35Spro:Prx73RNAi 형질전환식물체의 차이를 보다 자세하게 관찰하기 위하여 52개 이상의 식물체에서 자엽을 제외한 5번째 잎의 엽병, 엽장, 엽폭 길이를 측정하여 그래프로 도식화 한 결과 야생형에 비해 1.6배, 1.3배, 1.3배 모두 증가됨 (그림 38D~38F). 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환체

는 전체적으로 빠른 성장을 보이며, 꽃대가 올라오는 시기 또한 야생형보다 빠름.

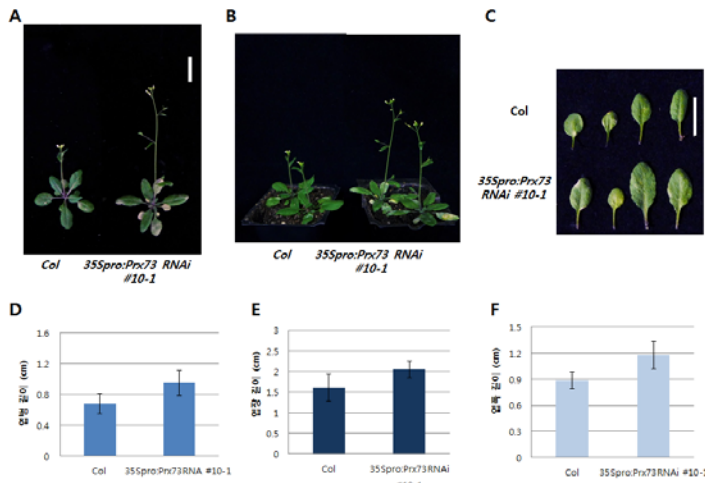


그림 38 4주된 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환체의 표현형을 분석한 그림. A와 B는 야생형과 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환체의 표현형을 확인한 그림이며 C는 자엽을 제외한 5, 6, 7, 8번째 잎, D, E, F는 각각 5번째 잎의 엽병, 병장, 엽폭 길이. 눈금 막대 = 2 cm.

● 이러한 결과를 종합해 볼 때, peroxidase 2, 8, 35, 73이 애기장대 성장 발달에 관여함을 시사함.

● 6주된 35Spro:Prxs RNAi 형질전환체에서 야생형에 비해 노화가 촉진되었으며 잎에서 전반적으로 잎의 황화 현상이 나타났으나 35Spro:Prx35 RNAi #12-6은 이러한 현상이 약화되어 있음. 야생형과 각 형질전환체 잎을 대상으로 엽록소 함량은 Lichtenthaler (1987) 방법을 이용, 엽록소를 추출한 후 663 nm와 648 nm에서 파장을 측정함. 3반복으로 엽록소 함량 측정 결과 35Spro:Prx35 RNAi #12-6 라인을 제외하고는 야생형에 비해 30-50% 감소되어 있었으며 peroxidase 2, 8, 73이 노화 조절에도 관여하고 있음을 시사함 (그림 39). 모든 도표에서 별표는 대조군과 비교하여 다음과 같은 확률로 t-테스트에 의해 통계적으로 유의한 차이를 나타냄 (*p < 0.005).

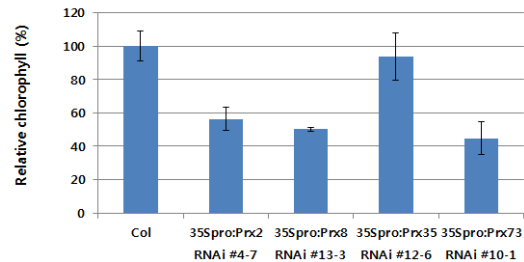


그림 39 6.5주된 야생형과 35Spro:Prx2 RNAi, 35Spro:Prx8 RNAi, 35Spro:Prx35 RNAi, 35Spro:Prx73 RNAi 형질전환체 상대적 엽록소 함량.

● 퍼옥시다제는 리그닌화 및 활성 산소종 대사에 관여하며 6주된 퍼옥시다제 식물체에서 이들 유전자의 대부분이 발현되는 것으로 알려져 있음. 또한 발단 단계나 스트레스 상태에서 발현되는 것으로 보고되어 있음. 식물 세포벽의 리그닌화는 환경 스트레스에 대한 반응으로 증가되어 식물 성장 감소 및 조직의 구조적 견고함과 연관된다. 리그닌병원균 감염에 대한 물리적 방어 작용을 포함하여, 건조 스트레스시 세포내의 증산 작용을 감소시키는 등 건조 내성과 관련이 있어 리그닌화를 조절함으로써 건조내성 식물 개발에 좋은 표본이 됨. 또한 저온, 광반응 등의 다양한 비생물학적 스트레스 방어 기작과도 관련이 있음 (Denness et al., 2011). 리그닌 기반 지지 구조가 약해질 경우 물관 발달이 둔화, 식물 생장이 전체적으로 억제되는 표현형을 지니므로 양질의 바이오매스가 필요한 만큼 생산하기 위해서는 리그닌 합성을 줄이면서 식물 fitness는 정상적인 범위로 유지하는 기술 개발이 핵심이며 꼭 필요함.

● 형질 전환 식물체를 대상으로 줄기의 횡단면을 관찰하기 위하여 조직화학적 염색을 실시함. 줄기 절편화를 위하여, 줄기를 FAA 용액 (10 % (v/v) formaldehyde, 5 % (v/v) 아세트산 및 50 % (v/v) 에탄올)에서 고정한 후, 에탄올 시리즈 (50, 70, 80, 100 %, 각각 한 시간) 에 의하여 탈수시킴. 그 후 블럭들을 Peel-A-Way disposable embedding 몰드 (Polysciences)에 셋팅함. Technovit 7100과 파라핀으로 생성 시켜 microtome (Microm)으로 절편들을 만든 후 리그닌 염색은 Chapple (1992) 방법에 의해 염색하고 toluidine blue 염색을 실시하여 현미경으로 비교 분석함. 톨루이딘 블루 (toluidine blue) 와 리그닌 염색 시약인 phloroglucinol-HCl 로 패턴을 분석한 결과 관다발 조직이 전체적으로 관다발 패턴이 야생형과 상이함을 보여주고 있음. 야생형의 경우 줄기 관다발의 수가 일반적으로 6-8개로 알려져 있으나 35Spro:Prx35 RNAi 라인은 다섯개로 관찰 되었으며 pith 비중이 줄어들고 배열 상태가 불규칙적임. 뿐만 아니라 물관 조직이 둔화 되어 있고 interfascicular fiber의 생성이 억제, 식물의 지지 기능이 약화되어 식물이 누워서 자라는 표현형을 보여줌. 35Spro:Prx8 RNAi 라인도 관다발 (vascular bundle) 이 다섯 개로 관찰 되었으며 35Spro:Prx73 RNAi 라인의 경우 물관 조직의 발달이 둔화 되어 있음 (그림 25). 리그닌 함량 또한 전체적으로 야생형보다 감소됨. 애기장대의 BR 관련 돌연변이 줄기의 횡단면을 해부학적으로 관찰해본 보면 돌연변이체는 물관 조직의 발달이 둔화된 반면 체관 조직의 발달은 상대적으로 큰 영향을 받지 않음. 이러한 표현형을 기초로 이들 퍼옥시데이즈 유전자들이 리그닌 함성에 관여되는 신규 유전자로 리그닌 및 브라시노스테로이드와의 관계를 통하여 물관 세포 분화 및 형성에 대한 지속적인 연구와도 관련이 있을 것으로 사료됨.

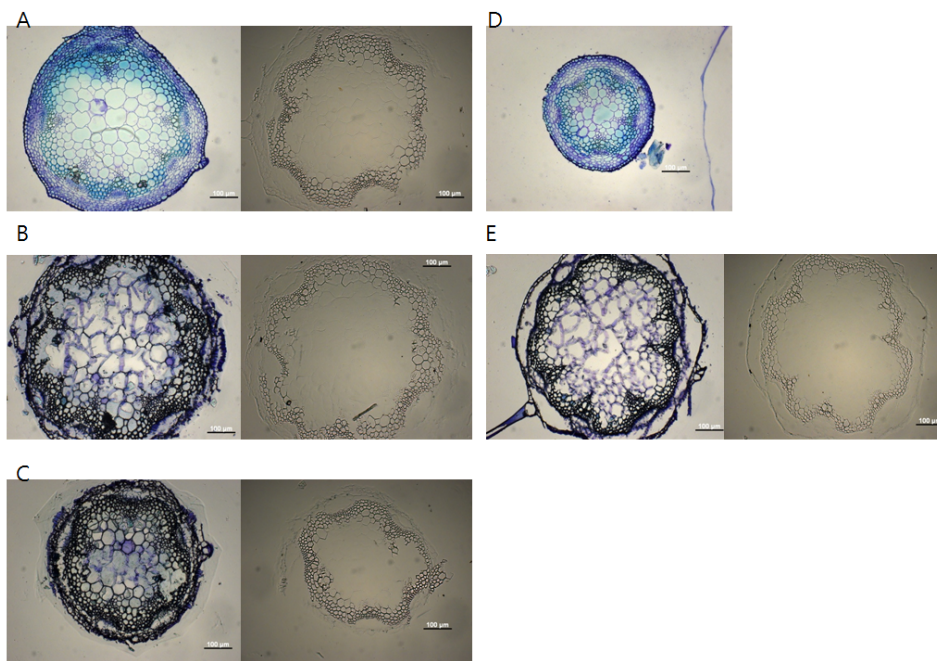


그림 40 야생형과 35Spro:Prxs RNAi 형질 전환체 줄기 종단면 Toluidine blue 및 phloroglucinol-HCl로 염색된 물관 세포에서 리그닌 축적 정도 비교
A. 애기장대 야생형 B. 35Spro:Prx2 RNAi C. 35Spro:Prx8 RNAi D. 35Spro:Prx35 RNAi E. 35Spro:Prx73 RNAi A, B, C, D, E left: toluidine blue 염색 A, B, C, D, E right: phloroglucinol-HCl 염색

● 퍼옥시다제 형질전환체를 대상으로 Foster et al (2010) 방법에 의해 리그닌 함량과 리그닌 구성 분석을 시도할 것임. 식물 세포벽의 리그닌화는 다양한 환경 스트레스에 대한 반응성으로 증가되며 이는 식물 조직의 구조적 견고함과 연관되므로 이들 결과물이 사업화나 기술 이전에 중요한 역할을 할 것으로 사료됨.

● 퍼옥시다제 유전자 및 유전자 발현제어 기술의 하나인 RNA 간섭 (RNA interference 혹은 RNAi) 법에 의한 퍼옥시다제 RNAi 카세트를 포함하는 벡터 (RNAi 벡터)가 도입된 형질전환체를 통하여 발생 초기 하배축과 뿌리가 신장 될 뿐만 아니라 잎의 크기가 커지고 엽병 길이가 길어지며 꽃대가 올라오는 시기 (bolting time) 등 전체적으로 빠른 성장을 나타냄으로써 개화 촉진, 종자 생성 시기를 앞당길 수 생산성과 기능성이 증가된 작물을 제공 할 것이다. 또한, 리그닌 함량 감소를 통하여 바이오 연료 작물 개발에 유용 할 것으로 기대됨.

나. 포플러 PEROXIDASE_RNAi 형질전환체: 퍼옥시다이스 억제라인 확보 및 표현형 분석

● 3차년도에서부터 수행중인 애기장대 peroxidase RNAi 형질전환 라인들에 대한 확보 및 표현형 분석을 위해 1차적으로 애기장대 퍼옥시다제 4개의 유전자들 (prx2, 8, 35, & 73) 중에서 prx2 RNAi 과 prx8 RNAi 형질전환체 라인들에 대한 확보 실험을 국립산림과학원의 도움으로 진행함.

● 형질전환 식물체 뿌리유도 단계

각각의 형질전환 식물체에서 발생된 줄기로부터 뿌리를 유도하기 위해 뿌리유도 고행배지가 있는 유리 시험관 안으로 식물체를 옮겨 키움. 뿌리 유도 단계는 형질전환 식물체들의 다음 단계인 토양으로 순화 및 활착을 위하여 편의상 하나의 실험관에 한 개체를 배양함 (그림 27).



그림 41 뿌리 유도 배지에서 재배중인 식물체

● 형질전환 식물체 순화 단계

형질전환 식물체들의 뿌리 유도를 통하여 자란 Prx2 RNAi 그리고 Prx8 RNAi 형질전환 식물체 라인들과 대조구 식물체 (BH) 들을 토양에서 키우기 위하여 그림 28 에서 보는 바와 같이 밀폐된 배양기 (사전에 멸균시킨 토양에서 약 2주간 키움 :Prx2 RNAi 라인; 3 개체, - Prx8 RNAi 라인; 15 개체, - 대조구 (BH) ; 7 개체



그림 42 순화 초기단계의 형질전환체들



그림 43 활착 단계 초기 식물체들

● 형질전환 식물체 활착 단계

위의 순화단계 기간이 경과된 Prx2 RNAi, Prx8 RNAi 그리고 대조구 (BH) 식물체들의 토양으로의 원활한 활착을 위하여 순화단계를 시작한 후 2주후에 아래 보이는 바와 같이 각각의 포트에 한 개체의 식물들을 옮긴 후 2-3 주간 공기 노출을 적절하게 조절하면서 배양한다. 처음에는 투명비닐커버로 씌워서 배양 (그림 43), 2-3 주



그림 44 활착단계 후 배양 중인 형질전환체들

후 식물체들의 성장과정을 관찰한 뒤 최종적으로 커버를 제거한 후 정상적인 포플러 배양 조건에서 키움 (그림 44).

다. 포플러 PEROXIDASE 과발현 형질전환체 라인 확보

● Class III 퍼옥시다제 (EC 1.11.1.7)는 식물의 발생, 분화, 성장, 목질화 (lignification), 코르크 질화 (suberization), 옥신 분해와 인돌아세이트산 산화, 세포벽 단백질 교차 결합, 병원균 침입에 대한 방어 작용, 염에 대한 내성 기작을 포함하여 노화와 관련된 다양한 기능을 담당함 (Hiraga et al., 2001). 퍼옥시다제 활성 억제 라인을 통하여 이미 리그닌화 조절이 감소됨을 확인하여 과발현체를 제작하여 리그닌 함량이 극대화된 애기장대와 포플러 퍼옥시데이즈 과발현체를 제작하여 이들의 시험 분석을 통하여 새로운 기능 분석과 함께 차별적 리그닌 합성 제어기술 확보하고자 함.

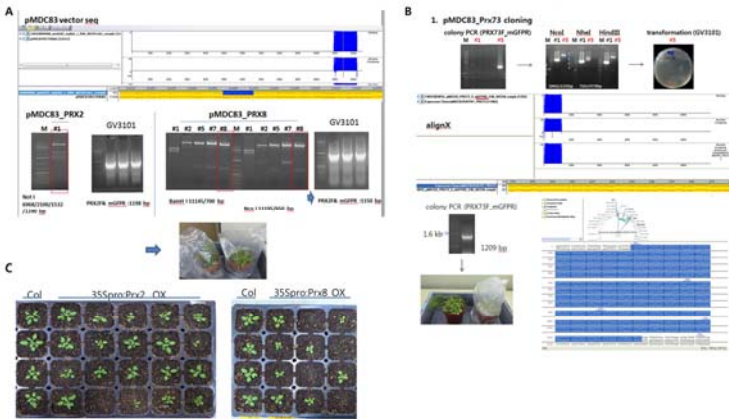


그림 45 퍼옥시다제 과발현체 제작 (35Spro:Prx2OX, 35Spro:Prx8OX, 35Spro:Prx73OX)

● 이를 위하여 먼저 식물체의 binary vector로 pMDC83을 선정하여 퍼옥시데이즈 2, 8, 73 유전자를 클로닝 (그림 45) 하고 이를 Agrobacterium (GV3101) 형질전환체를 이용하여 poplar 야생형 (BH)에 도입, 퍼옥시다제 과발현 포플러 식물체에 각각 형질전환 실험을 세부연구과제 책임자인 국립산림과학원의 최영임 박사 실험실에서 진행 중에 있음. 애기장대에도 이미 형질전환을 수행하여 식물체 선별 마커인 하이그로마이신 배지에서 선별하여 흙에서 표현형을 관찰 중이다. 현재 퍼옥시데이즈 35 유전자는 클로닝이 진행 중임.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	생장속도 고도화 형질전환 포플러 육성	BR 발현 조절 기작 규명 및 신규 유전자 발현 라인 확보	100	- DWF12 & DWF4 유전자 발현 조절 기작 규명 에 대한 논문 발표
			100	- AtDWF12, AtDWF4 형질전환 포플러 과발현 확인
			100	- BAL 유전자 프로모터-보고자 유전자 재조합 DNA 합성
			100	- BRL 유전자 프로모터-보고자 유전자 재조합 DNA 합성
	리그닌 함량 조절 및 성장 속도 고도화	전사체학 접근방법에 의해 리그닌 합성 조절 관련 유전자 확보	100	- 마이크로어레이를 통해 리그닌 합성 조절 관 련 유전자 선별
2차 연도 (2011)	생장속도 고도화 형질전환 포플러 육성	기 개발된 포플러 나무 분석 및 신규 유전자 발현 라인 확보	100	- 기 개발된 AtDWF12, AtDWF4 형질전환 포플 러 나무의 형태학적 특성 분석 (수고, 가지수, 바이오매스, 엽록소 함량)
			100	- BAL 유전자 프로모터-보고자 동형접합 형질 전환체 선별
			100	- BRL 유전자 프로모터-보고자 동형접합 형질 전환체 선별
	리그닌 함량 조절 및 성장 속도 고도화	전사체학 분석에 의해 선별된 리그닌 합성 조절 유전자 애기장대에 도입	100	- 마이크로어레이를 통해 리그닌 조절 관련 유 전자 벡터 제작
3차 연도 (2012):	생장속도 고도화 형질전환 포플러 육성	기 개발된 포플러 나무 해부학·이화학적 분석 및 신규 유전자 발현 라인 분석	100	- 해부학 · 이화학적 특성 분석 (SEM 및 현미경 촬영)
			100	- BAL 유전자 프로모터-보고자 동형접합 형질 전환체 분석
			100	- BRL 유전자 프로모터-보고자 동형접합 형질 전환체 분석
		리그닌 함량 조절 및 성장 속도 고도화	전사체학 분석에 의해 선별된 리그닌 합성 조절 유전자 라인 구축	100
4차 연도 (2014):	생장속도 고도화 형질전환 포플러 육성	기 개발된 포플러 나무 해부학·이화학적 분석	100	- 기 개발된 포플러 나무 해부학 · 이화학적 비 교 분석
	리그닌 함량 조절 및 성장 속도 고도화	전사체학 분석에 의해 선별된 리그닌 합성 조절 유전자 기능 분석	100	- PEROXIDASE 간섭카세트의 형질전환체 동형 접합체의 해부학 · 이화학적 비교 분석 - PEROXIDASE 과발현체 제작
5차 연도 (2015):	생장속도 고도화 형질전환 포플러 육성	<i>35Spro:AtDWF4</i> , <i>35Spro:AtBIN2</i> 등 품종화	100	- <i>35Spro:AtDWF4</i> , <i>35Spro:AtBIN2</i> 등 품종화
	리그닌 함량 조절 및 성장 속도 고도화	전사체학 분석에 의해 선별된 리그닌 합성 조절 유전자 기능 분석	100	- PEROXIDASE 간섭 카세트의 형질전환체 동형 접합체의 해부학 · 이화학적 비교 분석 - PEROXIDASE 과발현체 제작

제 2절 연도별 연구개발 목표 및 달성도

학술적 측면

- 식물생장발달과 리그닌 함량을 조절하는 퍼옥시다제 유전자, 퍼옥시다제 RNA 간섭 카세트를 포함하는 벡터, 및 상기벡터가 도입된 형질전환체 (2014년 4월 특허 출원)
- 이들 결과물은 세계적 리그닌 생명공학의 방향을 선도할 것임-빛과 브라시노스테로이드 식물 호르몬과의 공조절자로 선별된 유용 유전자의 경우 리그닌 조절을 포함, 이들에 대한 신호전달 기작 규명 시 수준 높은 저널에 게재 될 수 있을 것임.
- 다양한 분야의 학문적 연계 시스템 구축

기술적 측면

- 식물 세포벽의 리그닌화는 다양한 환경 스트레스에 대한 반응성으로 증가되며 이는 식물 조직의 구조적 견고함과 연관되므로 이들 결과물이 사업화나 기술 이전에 중요한 역할을 할 것으로 사료됨. 따라서, 지속적인 기술 개발을 통하여 바이오에너지 회사 및 제지 회사와의 연계를 통해 실용화 될 수 있을 것임.
- 온실가스 감축형 소재 개발로 저탄소 녹색성장 정책의 활성화 기틀 마련 및 바이오에너지 개발 기술 기반 확보를 통한 기술 인프라 확립

경제적 측면

- 식물의 fitness는 유지, 저리그닌 함량으로 조절하는 본 기술은 지식 재산 뿐만 아니라 여러 분야로 응용될 것임. 포플러나 기타 경제 수종에 이식될 경우 고품질의 펄프 원재료 확보를 통해 제지 공정비용을 획기적으로 절감할 수 있어 새로운 제지용 수목이 탄생될 것임.
- 리그닌 함량이 저하된 작물은 반추동물의 소화 효율과 밀접한 관계가 있으며 조사료용으로 매우 적합한 특성을 가짐. 따라서 알팔파나 다른 forage crop 등에 이 기술을 접목한다면 긍정적인 경제적 파급 효과를 얻을 수 있을 것임.
- 에너지원 다변화를 통해 환경 개선 및 국가 에너지 자원을 다량 확보 할 수 있을 것임.

추진성과로 인하여 바뀌게 될 미래생활상

- 세계는 지속적으로 펄프가 필요하지만 지구상에서 기후변화와 인구 폭발 및 산림의 질양적 쇠퇴로 생산성이 악화 될 전망으로 이러한 상황에 생명공학은 강력한 대안이 될 수 있음.
- 새로이 개발되는 리그닌 저함량 유전자 형질전환 임목들은 경제적으로 많은 양의 펄프와 섬유를 생산할 수 있을 것임.
- 미래에는 석유 대신 바이오매스에서 얻은 연료로 자동차를 움직이고, 바이오리파이너리를 통해 여러 화학제품을 생산케 될 것임. biorefinery란 석유에서 여러 가지 화학제품을 얻듯이 바이오매스 정제를 통해 다양한 화학제품을 얻는 과정임.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. DWF4 유전자의 발현 조절에 관한 논문 발표 (Plant J. 2011, 66(4):564-78)
2. DWF12 유전자의 발현 조절에 관한 논문 발표 (J. Plant Biol. 2011, 54:126-134)
3. 생장속도 고도화 및 리그닌 저감 포플러 형질전환체 우수 품종 개발
 - BR 생합성 유전자 및 신호전달 음성조절 유전자를 포플러에 도입, 과발현체에서 내생 브라시노스테로이드 함량 증가를 비롯하여 리그닌 함량이 감소된 우수 포플러 형질전환체 개발함 (특허 출원 준비 중).
4. 전사체학 분석에 의해 식물 생장발달과 리그닌 함량 조절 유전자 발견 및 이와 관련 형질전환체 개발
 - 광수용체에 결합이 있는 돌연변이와 BR 수용체 결합 돌연변이체의 마이크로어레이 수행, 유전자 발현 비교 분석 결과 퍼옥시다제를 포함하는 다수의 유용 유전자가 선별됨 (Plant J. 2014. 77(5):737-47).
 - 퍼옥시다제 간섭카세트를 포함하는 벡터를 도입한 형질전환체 개발 및 분석을 통해 이들 유전자가 식물생장발달과 리그닌 함량 조절 기능에 관여함을 시사 (특허출원)

제 2 절 성과 활용 계획

가. 바이오벤처회사 설립

- 본 연구를 통해 개발된 기술을 상업화하기 위해 본 연구진이 소속된 서울대 차세대융합기술연구원 내에 ‘(주) 지플러스 생명과학’ 이라는 바이오 벤처회사를 설립함
- 바이오에너지용 작물 뿐 아니라 제지용 작물 개발을 완료하여 미국이나 유럽으로 진출하여 본격적인 사업화를 추진할 예정임
- RPS (신재생 에너지 공급 의무화제도)는 일정 규명 이상의 발전사업자에게 총 발전량의 일정량 이상을 신재생 에너지로 공급하도록 의무화한 제도인데 2016년 이후 태양광과 비태양광을 통합하여 운영하는 방안이 검토 중이므로 이들의 도입과 단계적 확대 방안에 발맞추어 새롭게 추진될 정책과 기술에 협력하여 시장 점유율이 확대 시킬 수 있도록 할 계획임.

나. 리그닌 조절 신규 유전자를 도입한 우량 포플러 신품종 육성 및 보급

- 신규 리그닌 조절 유전자의 기초 연구를 바탕으로, 포플러에 도입, 우수 품종 육성 및 안정화를 통한 보급 확대
- GMO 안전성 평가 후 대량 증식, 산업화 연구 진행 가속화
- 매립지나 기타 유휴지에 식재되어 바이오에너지용 바이오매스재료로 활용

다. 신규 유전자 지식 재산화

- 본 연구를 통해 얻어진 기능성 유전자를 대상으로 특허화 및 기술실용화 추진

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 폴란드와 스웨덴 연구진은 배터리를 개발하고자 제지 공정 폐기물을 이용, 그 물질이 리그닌임. Olle Inganäs와 Grzegorz Milczarek은 배터리를 개발하기 위해 제지 공정 폐기물을 이용하여 리그닌 유도체 절연성이 폴리피롤의 전도성과 결합해 전하를 효과적으로 보유하는 복합 물질을 만들 수 있다고 사이언스에 보고함 (출처: <http://211.144.68.84:9998/91keshi/Public/File/41/335-6075/pdf/1468.full.pdf>).
- 백색부후균은 과산화효소를 이용, 리그닌을 분해 할 수 있는 것으로 알려져 있는데 미국에 있는 클라크대학교의 연구진과 에너지부 산하 공동유전체 연구소의 연구진들이 The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genome 제목으로 31개 곰팡이 유전체를 비교 분석 결과 백색부후균이 다루기 어려운 식물 바이오고분자인 리그닌을 분해하는 능력을 어떻게 발전시켰는지 사이언스지에 보고함. 이는 바이오연료 생산을 증가시킬 수 있는 곰팡이 효소를 사용·개량 할 수 있는 것으로 최근 이슈로 가장 부각되는 논문임.
- 벨기에에서 진행된 저리그닌 함량 GM 포플러 시험 재배 결과 GM 포플러 나무 목질이 당으로 전환되는 과정에서 보다 효율적임을 보고함. 이 나무에서 얻어진 당은 바이오플라스틱이나 바이오에탄올과 같은 바이오 기반 제품들을 생산하는 원료로 사용될 수 있음. 또한, 포장시험에서 리그닌 생합성 억제 GM 포플러의 경우 껍질 밑부분의 붉은색이 강하고 붉은색이 강한 GM 포플러의 에탄올 생산수율이 160% 정도로 높았음 (출처: <http://www.vib.be/en/news/Pages/Initial-field-test-results-GM-poplars-bioethanol-yield-almost-doubled.aspx>).
- 생장이 빠른 포플러, 유칼립투스나 옥수수대·사탕수수 줄기와 같은 초목 잔여물들은 식량 생산에 필요한 농경지를 사용하지 않아 바이오 연료 생산의 안정적인 공급원이 될 수 있음. 벨기에 겐트대학교, 영국 던디대학교와 제임스 허튼 연구소, 미국 위스콘신 대학교의 공동 연구팀은 바이오매스를 에너지로 변환시키는 것을 억제하는 식물의 2차 세포벽의 주요 구성물질인 리그닌 생합성 경로 내에서 새로운 유전자를 발견함 (출처: http://mirian.kisti.re.kr/futuremonitor/view.jsp?record_no=240616&cont_cd=GT).
- 미시간 주립대학 및 위스콘신 대학연구팀은, 포플러 나무의 유전자를 조작, 리그닌을 쉽게 분해함으로써, 목재를 바이오연료로 전환시키는 노력과 비용을 절감하는데 성공, 이를 사이언스에 게재함. 또한, 포플러 나무에서 쉽게 분해되는 결합을 가지는 단량체를 만들 수 있는 유전자를 규명하고 분리함. 브리티쉬 콜롬비아대학 교수 Shawn Mansfield는 이 유전자를 포플러 나무에 성공적으로 도입함. 이 나무는 단량체를 생산을 포함, 리그닌 고분자에 사용함. 리그닌 backbone에 약한 결합이 존재하도록 하고, 포플러 나무의 천연 리그닌을 변형시켜 더 쉽게 분해되도록 함 (출처: Wilkerson et al., 2014).
- 리그닌은 동일한 식물 당을 추출, 추출된 식물 당을 개선된 바이오연료를 만드는데 이용하려는 사람들에게 중요한 도전 과제임. 리그닌 도전 과제를 극복하기 위한 경제적인 방안을 찾기 위한 연구의 일환으로, 미국 JBEI (Joint BioEnergy Institute) 연구진은 리그닌을 호흡함으로써 근본적으로 리그닌을 분해하는 열대우림에 서식하는 미생물 촉매 활성을 특성화함. 연구진은 E. lignolyticus SCF1이 48시간 이내에 혐기성 조건 하에서 리그닌 56%를 분해, 대조구에 비교하여 리그닌이 변경된 조건에서 세포 풍부함을 증가시켰음을

밝힘. 단백질 유전 정보학 분석을 통해 연구진은 리그닌이 수정된 성장 조건과 리그닌이 수정되지 않은 성장 조건 사이에서 상당히 다른 정도로 풍부하게 존재하는 229개 단백질을 규명함. 이 중 127개 단백질은 리그닌 존재 하에서 최소 2배까지 세포를 풍부하게 한다고 밝힘 (출처: <http://newscenter.lbl.gov/2013/11/13/lignin-feasting-microbe/>)

- 노스캐롤라니아 주립대학 연구진은 바이오 연료 생산 비용을 낮추어 줄 간단하고 효율적이며 상대적으로 저렴한 리그닌 제거 방법을 개발함. 이들은 양성자성 이온 액체 또는 PIL이라고 불리는 여러 가지 액체 염들을 만드는 일부터 시작함. 이 PIL들은 아세트산 같은 산과 염을 섞어 만들 수 있기 때문에 저렴하며, 전처리 공정으로 바이오매스와 혼합된 후 열을 가하고 교반을 함. PIL에 용해되고 남은 셀룰로오스는 고체 상태로 가공이 용이해져 바이오연료 생산을 위해 혼합물에서 쉽게 거를 수 있는 것으로 보고됨 (출처: <http://dailyfusion.net/2014/01/new-lignin-removal-method-makes-biofuel-production-cheaper-25863/>)
- 조지아대학교 연구자들이 CRISPR/Cas 유전자 편집 도구를 이용, 나무 종 유전체를 처음으로 변형시킴. New Phytologist에 실린 결과에서 식물 유전자 편집을 신속 정확하게 할 수 있는 계기 마련함. 이 연구진은 포플러 속의 특정 유전자를 돌연변이 시킴으로써 자연발생적인 중합체 (polymers) 농도를 줄이는데 리그닌으로 생물 연료 생산에 이용되는 당과 전분을 견고한 세포벽에 축적시키거나, 또 다른 중합체는 농축된 탄닌으로, 잎과 나무껍질에 존재하는데 이는 반추 동물 먹이로는 사용 할 수 없음을 보고함 (출처: http://www.eurekalert.org/pub_releases/2015-06/uog-ure060415.php)

제 7 장 연구시설·장비 현황

연구시설·장비	규격	수량	활용용도	보유기관	확보상태	비고
Spectrophotometer (Nano-drop)	대	1	DNA, RNA정량	서울대학교	기확보	
Gel Doc system	대	1	이미지 촬영	서울대학교	기확보	
Centrifuge	대	3	핵산 분리	서울대학교	기확보	
Tissue lyser	대	1	핵산 분리	서울대학교	기확보	
Incubator	대	2	시료 배양	서울대학교	기확보	
Autoclave	대	1	멸균	서울대학교	기확보	
Deep freezer	대	1	시료보관	서울대학교	기확보	
Cold chamber	대	2	시료보관	서울대학교	기확보	
Heat block	대	2	핵산분리	서울대학교	기확보	
PCR system	대	2	유전자 증폭	서울대학교	기확보	
유리 온실		1	식물재배	서울대학교	기확보	
growth chamber		1	식물재배 및 배양	서울대학교	기확보	
clean bench		2	식물배양	서울대학교	기확보	
growth room(23도)	room	1	식물재배 및 배양	서울대학교	기확보	

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

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

1. 연구 활동 종사자 환경안전교육 실시

가. 신규교육 및 정기교육

- 석/박사 신규교육: 2015년 2월, 8월 (매 학기 당 이틀 간 14시간)
- 석/박사 정기교육: 서울대학교 환경안전원 홈페이지와 교직원 홈페이지에 사고사례 및 안전교육 동영상 공개
- 학부생 신규교육: 신입생 오리엔테이션에서 환경안전교육 진행, 실험실 안전 동영상 제공
- 학부생 정기교육: 연구개발 인력교육원에서 개발한 연구실 안전 온라인 콘텐츠를 서울대 온라인 강좌 기반 시스템에 접목하여 실시

나. 수시교육: 수시 (기관의 요청에 의해 실시)

다. 병원체 및 LMO 실험실 안전교육

- 내용: 생물안전에 관한 이론교육 (3시간) 및 실무교육 병행
- 기간: 2015년 2월 ~ 8월 (총20회)

라. 방사선 안전교육:

- 내용: 방사선안전이론교육(6시간)과 방사선취급 실습교육 병행
- 기간: 2015년 2월, 8월 (총 6회)

2. 실험실 안전점검

- 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상·정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단 실시

[표1] 안전점검 실험실 수 (2014년)

A유형 실험실	B유형 실험실	C유형 실험실	D유형 실험실	합계
376	441	143	408	1,368

* 실험실 분류 기준 :

- A형 : 미생물 및 동물(LMO), 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실
- B형 : 화학약품 등을 사용하는 실험실
- C형 : 기계·전기 설비 등을 사용하는 실험실
- D형 : 실험·실습을 수행하지 않는 설계·컴퓨터 관련 등의 실험실

3. 실험실 안전사고 대응 및 예방

- 가. 실험실 안전사고 대응조직을 설치하여 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시하여 유사사고 발생 시 대응능력 향상
- 나. 실험실 안전사고에 대한 경각심을 높이고 유사사고를 예방하기 위하여 사고사례를 이메일을 통해 전파
- 다. 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포

4. 실험실 환경개선사업 실시

- 실험실 안전사고 예방과 실험종사자 보호를 위해 안정장비 확충, 시설 및 설비, 노후

기자재 교체 등 실험실 환경 개선 유도

5. 실험폐기물관리 강화:

- 실험실에서 발생하는 실험 폐수 관리를 위해 처리·의뢰·반출까지 이력을 추적 관리하는 실험폐수처리·의뢰 프로그램 구축, 실험폐기물 발생 저감을 위해 환경안전교육 실시

6. 공기오염도 조사 실시 (2015년)

- 내용: 미세먼지, 휘발성유기화합물, 포름알데히드, 이산화탄소 등 7가지 항목

7. 연구 활동 종사자 특수건강검진 실시 및 보험가입

- 「연구실 안전 환경 조성에 관한 법률」 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구 활동 종사자를 모니터링 하여 특수건강검진 실시
- 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함
- 보험가입현황

구분	학부생	대학원생		연구원	보조 연구원	계
		석사/박사	연구생			
2015. 6. 12. - 2016. 6. 12.	8,837	7,415	3,442	173	218	20,085

8. 연구 활동 종사자 보험가입 추진 계획 (2016년도)

가. 가입대상: 과학기술분야 연구개발 활동에 종사하는 학부생, 대학원생, 연구생, 이공계 연구소 소속 연구원 (보조연구원 포함)

나. 보험계약기간: 2016. 6. 12. - 2017. 6. 12. (1년 계약)

다. 추진일정

- 보험가입 대상자 파악 : 2016. 4월 중순 ~ 4월 말
- 보험료 산정 및 입찰추진 : 2016. 5월 중
- 계약 예정일: 2016. 6월 초

제 9 장 참고문헌

Albrecht C, Russinova E, Kemmerling B, Kwaaitaal M, de Vries SC (2008) Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. *Plant Physiol.* 148(1):611-9

Denness L, McKenna JF, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennett M, Mansfield J, Zipfel C, Hamann T (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 156: 1364-1374.

- Caño-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-García S, Cheng JC, Nam KH, Li J, Chory J (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development*. 131(21):5341-51.
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of Catalase and Peroxidase. *Methods in Enzymology*. 2: 764-775
- Chapple CC, Vogt T, Ellis BE, Somerville CR (1992) An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*. 4(11):1413-24.
- Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee MO, Yoshida S, Feldmann KA, Tax FE (2002) Arabidopsis brassinosteroid insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3 β -like kinase. *Plant Physiol* 130 (3):1506-1515.
- Chung Y, Maharjan PM, Lee O, Fujioka S, Jang S, Kim B, Takatsuto S, Tsujimoto M, Kim H, Cho S, Park T, Cho H, Hwang I, Choe S (2011) Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis *Plant J*. 66(4):564-78.
- Fábregas N, Li N, Boeren S, Nash TE, Goshe MB, Clouse SD, de Vries S, Caño-Delgado AI (2013) The brassinosteroid insensitive1-like3 signalosome complex regulates Arabidopsis root development. *Plant Cell*. 25(9):3377-88.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Górecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kues U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Dueñas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS (2012) The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*. 336(6089):1715-9.
- Foster G, Annan JD, Jones PD, Mann ME, Mullan B, Renwick J, Salinger J, Schmidt GA, Trenberth KE (2010) Influence of the Southern Oscillation on tropospheric temperature. *J. Geophys. Res.* 115
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*. 127(3):803-16
- Hiraga K, Wanigasekera A, Sugi H, Hamanaka N, Oda K (2001) A novel screening for inhibitors of a pleiotropic drug resistant pump, Pdr5, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65(7):1589-95.
- Kaida R, Kaku T, Baba K, Oyadomari M, Watanabe T, Nishida K, Kanaya T, Shani Z, Shoseyov O, Hayashi T (2009). Loosening xyloglucan accelerates the enzymatic degradation of cellulose in wood. *Mol Plant*. 2(5):904-9.

- Kim B, Jeong YJ, Corvalán C, Fujioka S, Cho S, Park T, Choe S** (2014) Darkness and gulliver2/phyB mutation decrease the abundance of phosphorylated BZR1 to activate brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Plant J.* 77(5):737-47.
- Kim HB, Kwon M, Ryu H, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, An CS, Lee I, Hwang I, Choe S** (2006) The regulation of DWARF4 expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140, 548-557.
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology.* 148:350-382.
- Lu S, Li Q, Wei H, Chang MJ, Tunlaya-Anukit S, Kim H, Liu J, Song J, Sun YH, Yuan L, Yeh TF, Peszlen I, Ralph J, Sederoff RR, Chiang VL** (2013) Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(26):10848-53.
- Maharjan PM, Schulz B, Choe S** (2011) BIN2/DWF12 antagonistically transduces brassinosteroid and auxin signals in the roots of Arabidopsis. *J Plant Biol* 54: 126-134.
- Milczarek G, Inganäs O** (2012) Renewable cathode materials from biopolymer/conjugated polymer interpenetrating networks. *Science.* 335(6075):1468-71.
- Nemhauser JL, Mockler TC, Chory J** (2004) Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol* 2(9):E258
- Stavang JA, Gallego-Bartolome J, Gomez MD, Yoshida S, Asami T, Olsen JE, Garcia-Martinez JL, Alabadi D, Blazquez MA** (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J* 60(4):589-601.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J* 11(6): 1187-1194.
- Van Acker R, Leple JC, Aerts D, Storme V, Goeminne G, Ivens B, Legee F, Lapierre C, Piens K, Van Montagu MC, Santoro N, Foster CE, Ralph J, Soetaert W, Pilate G, Boerjan W** (2014) Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:845-850
- Van Acker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W** (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in Arabidopsis thaliana. *Biotechnol Biofuels* 6: 46
- Vanholme R, Cesarino I, Rataj K, Xiao Y, Sundin L, Goeminne G, Kim H, Cross J, Morreel K, Araujo P, Welsh L, Hausteraete J, McClellan C, Vanholme B, Ralph J, Simpson GG, Halpin C, Boerjan W** (2013) Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Science.* 341(6150):1103-6.
- Wilkerson CG, Mansfield SD, Lu F, Withers S, Park JY, Karlen SD, Gonzales-Vigil Padmakshan ED, Unda F, Rencoret J, Ralph J** (2014) “Monolignol Ferulate Transferase Introduces Chemically Labile Linkages into the Lignin Backbone,” *Science.* 344 (6179), 90-93

주 의

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