

발간등록번호

11-1543000-002115-01

기술사업화지원사업  
RD Report

# 세포막 파괴 제초제 저항성 형질의 개발 및 기술 사업화 최종보고서

2018. 03. 16.

주관연구기관 / (주)팜한농

협동연구기관 / 차세대융합기술연구원

협동연구기관 / 충북대학교

농림축산식품부

● LG Chem






## 제 출 문


농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 "기술사업화지원사업"과제(세부과제 "세포막 파괴 제초제 저항성 형질의 개발 및 기술 사업화")의 보고서로 제출합니다.

2018년 3월 16일

주관연구기관명: (주)팜한농 (대표자) 박진주  김용환 

1협동연구기관명: 차세대융합기술연구원 (대표자) 정택동 (인) 

2협동연구기관명: 충북대학교 산학협력단 (대표자) 우수동 (인) 

주관연구책임자: 성 순 기

1협동연구책임자: 권 순 일

2협동연구책임자: 이 이

## 보고서 요약서

과제고유번호	814004-3	해당단계 연구기간	3년	단계구분	1단계/1단계		
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업					
	사업명	기술사업화지원사업					
연구과제명	대과제명	(해당 없음)					
	세부과제명	세포막 파괴 제조제 저항성 형질의 개발 및 기술 사업화					
연구책임자	성순기	해당단계 참여 연구원 수	총: 57 명 내부: 57 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 900,000천원 계: 1,800,000천원		
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 57 명 내부: 57 명 외부: 명		총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 900,000천원 계: 1,800,000천원	
		연구기관명 및 소속부서명			참여기업명: (주)팜한농		
		위탁연구			연구책임자: 강린우 연구책임자: 형남인		
요약				보고서 면수: 172 장			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 비선택성 PPO계 제조제에 대한 내성 형질을 개발하기 위해 식물에서 발현이 가능한 CyPPO 유전자를 확보함.</li> <li>- PPO계 제조제에 내성을 갖는 CyPPO 변이유전자를 개발하기 위한 내성 검증 시스템을 확립함 (BT3 test 및 in vitro enzyme assay).</li> <li>- CyPPO 변이유전자가 도입된 애기장대 형질전환체를 확보하고, PPO계 제조제에 대한 고내성을 확인함.</li> <li>- CyPPO 변이유전자 도입 애기장대 형질전환체의 정상 생육 특성 확인결과 제조제 내성 외 다른 형질에서 야생형과의 유의미한 차이를 보이지 않아, 도입유전자에 의한 부작용은 없는 것으로 평가됨.</li> <li>- CyPPO 변이유전자 도입 애기장대 형질전환체의 전사체 및 대사체 변화 분석결과, 제조제 처리 후에도 야생형과 거의 유사함을 확인하여, 형질전환체의 내성 형질이 잘 발현됨을 입증함.</li> <li>- PPO계 제조제 고내성 유전자를 도입한 콩 형질전환체를 확보하고, 내성을 확인함.</li> <li>- 유채 형질전환체에서 PPO계 제조제 내성 확인</li> <li>- PPO계 제조제 내성 유전자의 옥수수 형질전환체 진행</li> <li>- PPO계 제조제 내성 형질의 안전성 확인(modified PPO 단백질의 열안정성, 인공위장액 분해수준, 아급성 동물시험)</li> <li>- CyPPO와 PPO계 제조제 결합 결정 입체 구조 확보</li> <li>- Glyphosate + 多種 PPO계 제조제 내성 형질을 확인함.</li> <li>- PPO계 제조제 내성 형질 개발 관련 국내외 특허 21건 출원하고, PPO계 제조제의 기작연구의 논문을 submit 함</li> </ul>							

〈 국문 요약문 〉

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Glyphosate 저항성 잡초의 출현으로 차세대 제초제 내성 형질 개발이 필요</li> <li>2. PPO계 제초제는 속효성으로 저항성 잡초의 출현 위험이 상대적으로 낮아 글로벌 농화학기업의 PPO계 제초제 내성 형질 개발이 진행중이나, 제초제 내성 수준이 상업적 성능에 미치지 못함</li> <li>3. 기존의 관련 특허를 회피할 수 있는 PPO 유전자 확보 및 이의 변이체를 이용한 상업적 성능의 PPO계 제초제 내성형질 개발이 필요</li> <li>4. 형질이 도입된 식물에서 PPO계 제초제 내성 성능 확인하고 기술 사업화 함</li> </ol>				
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 식물에서 발현이 가능한 CyPPO 유전자 확보</li> <li>2. PPO계 제초제 내성을 갖는 CyPPO 변이유전자 개발 (내성 검증 시스템 개발, BT3 test 및 <i>in vitro</i> enzyme assay)</li> <li>3. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 애기장대 형질전환체 확보 및 제초제 고내성 확인</li> <li>4. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 애기장대 형질전환체의 정상 생육 확인</li> <li>5. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 애기장대 형질전환체의 전사체 분석</li> <li>6. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 애기장대 형질전환체의 대사체 변화 분석</li> <li>7. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 콩 형질전환체 확보 및 내성 확인</li> <li>8. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 유채 형질전환체 확보 및 내성 확인</li> <li>9. PPO계 제초제 고내성 유전자 도입 옥수수 형질전환체 제작</li> <li>10. PPO계 제초제 고내성 유전자의 단백질 안전성 확인(엘러지 유발 가능성, 열 안정성, 인공위/장액 분해수준, 아급성 동물시험) - 안전성 확보</li> <li>11. CyPPO와 PPO계 제초제 결합 단백질 결합 입체 구조 확보</li> <li>12. Glyphosate + PPO계 제초제 다중 내성 형질전환체 확보</li> <li>13. PPO계 제초제 내성 형질 관련 특허 21건 출원 함</li> <li>14. (주)팜한농에서 개발한 신규 PPO계 제초제인 Tiafenacil의 작용 기전 규명</li> </ol>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PPO계 제초제 내성 형질의 사업화 추진 - 글로벌 농화학종자기업 (Bayer, BASF, 신젠타) 기술이전 (향후 10년간 1000억원 이상의 로열티 수입 예상)</li> <li>2. CyPPO 변이유전자의 제초제 내성 특허, 형질전환체의 내성분석 결과, 생육 평가, 안전성 평가 자료, Tiafenacil 작용기전 연구결과 - 기술 마케팅 자료로 활용</li> <li>3. PPO의 제초제 결합 결정구조 정보 - PPO계 제초제 형질의 성능 향상 및 신규 제초제 개발 자료로 활용</li> <li>4. 세포 소기관 별 PPO 타겟팅 결과 - 제초제 내성 형질의 발현 향상 기술 개발에 활용</li> <li>5. CyPPO 형질전환체의 전사체, 대사체 분석 결과 - 논문발표</li> </ol>				
중심어 (5개 이내)	세포막 파괴 제초제	제초제 내성 형질	GM작물	Protoporphyrin ogen IX oxidase	

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose & Contents	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. New generation herbicide-tolerant traits are needed as glyphosate-resistant weed emergence.</li> <li>2. PPO-based herbicides have relatively low risk of emergence of resistant weeds due to their short-term efficacy. PPO herbicide resistant traits of global agrochemical companies are under development, but they do not reach commercial level.</li> <li>3. We need to acquire PPO genes that can avoid the related patents and develop high-performance PPO herbicide-resistant traits using their mutants.</li> <li>4. Commercial performance of PPO herbicide tolerance in transgenic plants is required to examine.</li> </ol>				
Results	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Selection of CyPPO genes that can be expressed in plant</li> <li>2. Development of CyPPO mutants having PPO herbicide tolerance (BT3 test, in vitro enzyme assay)</li> <li>3. Generation of Arabidopsis transformants introduced PPO herbicide tolerant genes, and investigation of their high-performance</li> <li>4. Identification of normal growth in CyPPO mutant transgenic plants</li> <li>5. Transcriptomic analysis of Arabidopsis CyPPO mutant transgenic plants</li> <li>6. Metabolomic analysis of Arabidopsis CyPPO mutant transgenic plants</li> <li>7. Generation of soybean transformants introduced PPO herbicide tolerant genes, and investigation of their high-performance</li> <li>8. Generation of rapeseed transformants introduced PPO herbicide tolerant genes, and investigation of their high-performance</li> <li>9. Generation of corn transformants introduced PPO herbicide tolerant genes</li> <li>10. Investigation of bio-safety of CyPPO mutant protein (Allergenicity, thermal stability, digestibility by artificial gastric and intestinal juices, animal test)</li> <li>11. Acquisition of 3D crystal structure of CyPPO and PPO inhibitor complex</li> <li>12. Generation of glyphosate and PPO inhibitor tolerant plant, and investigation of their multiple herbicide tolerance</li> <li>13. Applianc of 21 patents (Korea, PCT, overseas)</li> <li>14. Investigation of mode-of-action of tiafenacil which is a new PPO inhibitor developed by FarmHannong, Co, Ltd</li> </ol>				
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Licensing-out of PPO herbicide tolerant traits to global companies (Bayer, BASF or Syngenta) - estimation of 100 billion won for ten years after licensing-out</li> <li>2. Patents, results of PPO herbicide tolerance and agricultural characteristics, bio-safety, tiafenacil's mode-of-action - use for technical marketing</li> <li>3. Information of PPO protein crystal structure - use to enhance PPO herbicide tolerant traits</li> <li>4. Results of transit peptide functionality - use to develop high expression system of PPO protein</li> <li>5. Transcriptomic and metabolomic analysis - scholarly journal paper submission</li> </ol>				
Keywords	Cell membrane disrupter herbicide	Herbicide-resistance traits	GM crops	Protoporphyrinogen IX oxidases	



## < Contents >

Chapter 1. Overview of the research and development .....	6
Chapter 2. Present development of technologies in South Korea and overseas .. .....	10
Chapter 3. Scope and results of the study .....	11
Chapter 4. Degree of achievement of research goals, and contribution to related areas .....	154
Chapter 5. Plan for utilizing study results, etc .....	164
Chapter 6. Information on overseas scientific technology, collected during the study .....	165
Chapter 7. Security grade of the research and development outcomes .....	166
Chapter 8. Current overview of research facilities and equipment that have been registered with the national science and technology information system .....	167
Chapter 9. Performance record of safety actions for the laboratory, etc., following implementation of the research and development task .....	168
Chapter 10. Representative study outcomes of the research and development task .....	170
Chapter 11. Other matters .....	171
Chapter 12. References .....	172

## < 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의개요 .....	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	10
제 3 장 연구수행 내용 및 결과 .....	11
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	154
제 5 장 연구결과의 활용계획 등 .....	164
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	165
제 7 장 연구개발성과의 보안등급 .....	166
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	167
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ...	168
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	170
제 11 장 기타사항 .....	171
제 12 장 참고문헌 .....	172



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 가. GM 종자와 제초제 저항성 형질 현황

세계 경작지의 11%인 1.75억 ha에 GM 작물이 재배되고 있으며 GM 종자 시장 규모는 '13년 201 억\$ (기술료 포함, 기술료 시장은 종자시장의 약 17% 규모)로 지난 수년간 평균 성장률이 10%를 상회하고 있음(ISAAA, 2013, PhillipMcDougall, 2014).

GM 종자에 사용된 형질은 제초제 저항성 형질, 살충성 형질, 내병성 형질, 사료 가치 향상 형질이 있으며 개발 중인 형질은 가뭄 저항성, 질소 이용효율 향상 등이 있음.

GM 작물 재배 면적기준으로 보면 제초제 저항성 형질이 탑재된 종자의 재배 비중이 85% (multi gene stacking 된 종자 포함)로 가장 중요한 형질임. 현재는 아미노산 합성저해 약제인 glyphosate, glufosinate의 저항성 형질을 사용하고 있으며 이들 저항성 형질이 도입된 종자의 비중은 glyphosate가 90%, glufosinate가 10%를 차지 함.

Glyphosate 의 과점과 반복적 사용으로 저항성 bio-type 잡초가 급격히 증가함 ('16년 기준 37종). 미국 농부의 3/4이 glyphosate 저항성 잡초를 우려하고 있으며 새로운 방제 기술을 원함.

GM 종자회사는 작용 기전이 다른 두 가지 제초제 (예: glyphosate+dicamba)의 저항성 형질을 탑재한 종자를 개발하여 glyphosate 저항성 잡초 문제 해결을 시도 함. 그러나 재배지에는 두 가지 약제 (glyphosate, dicamba) 에 저항성을 지닌 bio-type 의 잡초가 있음.

표 1. GM 종자에 적용되는 제초제 저항성 형질과 제초제 저항성 잡초 현황('12년 기준)

GM 종자 기업	사용제초제	저항성 형질	저항성잡초수	약제중복 저항성 잡초수
Monsanto	Glyphosate	CP4 EPSPS 유전자	24	8
Bayer CropScience	Glufosinate	bar, PAT 유전자	2	-
Monsanto	Dicamba	DMO 유전자	14	1 (Common lambsquarters)
Dow AgroScience	2,4-D	2,4-D monooxygenase	5	1 (Common Waterhemp)

중복저항성 잡초 수는 glyphosate와 동시에 저항성을 갖는 bio-type 잡초 종류. Glufosinate는 방제 비용이 70\$/ha로 glyphosate (20\$/ha) 대비 가격 경쟁력이 취약하고, 이 약제의 작용 기전도 저항성 bio-type 식물체의 발생이 쉬운 제초제 임. Dicamba, 2,4-D는 합성 오옥신으로 가격이 저렴한 선택성 제초제로 glyphosate 와 이종 처리하기 위해 개발 됨 (저항성 잡초 자료원: Weed Science Society of America).

저항성 잡초를 문제를 해결하기 위해서는 식물이 저항성을 획득하기 어려운 약제 (변이 유발 가능성이 낮고, 가격 저렴하고, 비선택성 제초제)가 개발되고, 이 약제에 대한 저항성 형





질을 개발해야 함.

상용화된 제초제 중에서 비선택성 제초제는 paraquat (1962년 출시), glyphosate (1972년 출시), glufosinate (1986년 출시), saflufenacil (Pyrimidinedione 계열 물질, 2009년 출시) 이고, 이중 2 종은 이미 저항성 형질을 개발하여 사용하고 있으며, paraquat는 인축 맹독성 문제로 선진국에서는 사용이 제한되고 있음 (한국에서는 퇴출되었음).

Pyrimidinedione 계열 PPO 제초제는 Syngenta社가 2001년 butafenacil 출시(잔류약해 문제로 매출 1천만\$ 미만, 제품 수명 다함), BASF社가 2009년 saflufenacil 를 출시하였음 (시장에서 호응이 좋음). 이 제초제는 엽록체 tetrapyrrole 합성 경로의 key 효소인 Protoporphyrinogen IX oxidases에 결합하여 클로로필 합성과 heme 합성 저해 및 비정상적으로 축적된 protoporphyrin (활성산소 보유)의 광산화 반응에 의해 세포막이 파괴되어 식물을 사멸하는 비선택성 제초제임.

세 번째로 개발된 Pyrimidinedione 계열의 제초제는 (주)팜한농이 개발한 tiafenacil ('18년 한국 출시, 19년 해외 출시 예정)로 비선택성 제초제로 광엽 잡초와 화본과 잡초의 방제 효과가 우수하고, glyphosate에 저항성을 지닌 잡초에 방제 효과가 우수하며, 가격 경쟁력도 보유하고 있음.

새로운 비선택성 제초제에 대한 저항성 형질 개발은 GM 종자회사에서 최대 관심사 임. Syngenta社는 butafenacil 의 약해로 GM 종자개발 중단하였으나, BASF社는 saflufenacil 저항성 형질을 개발 하고 있으며, (주)팜한농도 tiafenacil 저항성 형질을 개발하고 있음.

#### 나. 제초제 저항성 형질 개발

제초제 저항성 형질의 개발은 두 가지 접근 방안이 있음. 첫 번째는 제초제 타깃 효소의 active site가 제초제와 결합력이 낮은 구조를 지닌 효소 유전자를 식물에 형질전환 하는 방법 임 (사례: glyphosate 저항성 유전자는 토양 박테리아 유래 EPSPS 로 glyphosate 와 결합하지 않는 구조를 지녀 제초제 저항성을 갖게 됨).

\* EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase

두 번째 방법은 제초제의 화학구조를 변형하는 효소 유전자를 식물에 형질전환 하는 방법 임. 상용화 사례는 제초제 (dicamba, 2,4-D) 구조를 변형하는 monooxygenase 유전자임.

신규 PPO 계 제초제인 saflufenacil, tiafenacil 화합물은 uracil 링과 벤젠구조에 tail을 지닌 화합물임.

'14년 BASF社 특허에 의하면, saflufenacil 분해 기능을 지닌 cytochrome P450 oxidase



유전자 형질전환한 콩의 saflufenacil 저항성을 조사한 결과, 저항성이 낮았음(특허번호 WO 2014030090 A1).

Syngenta社は 식물 PPO 단백질의 아미노산을 치환한 PPO 유전자를 옥수수에 형질전환하여 butafenacil 저항성을 획득한 연구 결과가 있음 (특허번호 US 6308458, US 6808904, 특허만료 2020년).

특허 검색과 PPO 계 제초제 구조를 감안할 때 제초제에 둔감한 PPO 효소 개발 방안이 성공 가능성이 높으며, 관련 선행 특허를 회피하기 위해서는 진핵생물 (식물)이 아닌 원핵생물에서 식물과 유사한 hemY 타입 PPO 유전자원을 활용하면 특허 확보가 가능함.

#### 다. 제초제 저항성 형질의 기술 가치

GM 종자의 제초제 저항성 형질은 무경운 농법을 가능케 하므로 토양 내 과도한 비료성분의 용출을 막아 하천의 부영양화를 방지하는 공익적 이익이 있음. 그리고 대규모 영농에서 효율적 잡초방제 기술을 제공하므로 GM 종자에서는 기본적인 형질로 사용되고 있음.

Glyphosate 저항성 잡초 확산의 해결책으로 개발된 2가지 제초제(glyphosate+dicamba, 또는 2,4-D, '15년 출시) 저항성 형질을 탑재한 GM 종자라도 GM 작물 경작지의 문제 잡초 (비름속, 흰 명아주)를 방제하지 못하므로 새로운 제초제에 대한 저항성 형질이 개발되고 있음.

표 2. 개발 중인 제초제 저항성 형질 현황

제초제 종류	형질개발사	대상 작물	방제 범위	농민방제 (\$/ha)	저항성 잡초 수 <sup>1</sup>	중복 잡초수 <sup>2</sup>	특징
Sulfonylurea	듀폰-파이오니어	콩, 옥수수	잡초방제 수 65 광엽, 화본과	10	121	16	아미노산 합성 저해 제초제 저항성 잡초가 많음 Glyphosate 교차 효과 미흡
imidazolinone	바스프	콩	잡초방제 수 48 광엽 선택성	14	48	7	아미노산 합성 저해 제초제 저항성 잡초가 많음 Glyphosate 교차 효과 보통
Isoxaflutole	신젠타, 바이엘	콩	잡초방제 수 49 선택성 잡초	27	0	0	색소합성 저해, 토양처리제 옥수수, 사탕수수에 사용 선택성 제초제로 제한적임
Tiafenacil	동부팜한농	콩, 옥수수	잡초방제 수 77 비선택성 제초제 속효성	40	-	-	세포막 파괴, 비선택성 제초제 단독 방제 우수, 신규 물질 (잡초 방제시험 확대 필요)

1: Glyphosate 저항성 잡초 수; 2: Glyphosate와 해당 약제 처리에도 방제가 안되는 잡초의 숫자. 많을수록 교차 처리에도 방제가 어려움

개발 파이프라인에 있는 대부분의 형질들은 저항성 잡초가 많거나 선택성 제초제이어서 이들 형질은 다른 제초제 저항성 형질과 stacking 하여 사용하려는 용도로 개발되고 있음.

제초제 저항성 형질은 잡초방제 범위, 저항성 잡초 수, 방제 비용이 중요한 성공 변수 임. 비선택성 제초제인 tiafenacil (Pyrimidinedione 계열 PPO 계 제초제) 저항성 형질이 개발되면 이중 형질의 사용뿐만 아니라 단독 형질로도 잡초 방제가 가능함.

PPO 계 비선택성 제초제 저항성 형질의 가치를 전문 업체를 통해 평가한 결과, 기술의

경제적 수명을 14년으로 하고, GM 종자회사의 제품 중 15%가 개발된 저항성 형질을 사용한다고 가정하였을 때 Monsanto 회사를 대상으로 한 기술 가치는 24억 1,600 달러, DuPont社를 대상으로 한 기술 가치는 7억 3,900만 달러로 평가되었음.

그간의 국내 농업생명공학 분야의 투자는 많았으나 뚜렷한 성과가 없는 실정에서 생명공학 기술을 활용한 새로운 사업화 모델이 필요함.

제초제 저항성 형질의 개발은 기술 Licensing Out를 통한 기술 사업이 가능하고, 제초제 저항성 형질을 바탕으로 국내 종자회사에서도 GM 종자 사업의 기반을 확보함.

형질을 구매한 회사에서 제초제 저항성 형질을 탑재한 GM 종자 판매가 실시되면 경장기  
술료 뿐만 아니라 국내기술에 의해 개발된 제초제인 tiafenacil 매출 증대에도 기여함.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### ○ 국내

- 토양세균인 *Myxococcus xanthus*의 PPO(MxPPO)의 PPO 유전자 특허 출원하였으나 특허 권리가 소멸된 상태임(출원번호 KR2004-0024878, Jung and Kuk, 2007).

### ○ 해외

- 제초제 내성 GM 콩은 몬산토의 글리포세이트 내성 형질(라운드업 레디)이 대부분 도입되어 있고 독보적인 시장 점유율을 가지므로 타 기업들의 시장 진출이 어려운 상황이었으나, 저항성 잡초의 증가로 새로운 제초제 내성 형질(생장조절제, dicamba, 2,4-D)의 품종을 개발함.

- 성장조절 교란 제초제(Dicamba)와 글리포세이트 내성 유전자를 stacked 한 품종을 출시하였으나, 사용한 제초제(dicamba)에 의한 이웃 경작지의 성장 교란 부작용 문제가 발생되었음.

- 새로운 제초제 내성 형질의 후보로 PPO계 제초제 내성이 연구되어 왔고, 신젠타, BASF가 특허를 확보하였으나 아직 상업적 수준의 내성 유전자는 개발하지 못하였음.

- 몬산토는 스미토모와 공동으로 PPO계 제초제 내성 형질을 개발하는 것을 공표하였음(2016년).

- 글로벌 종자회사는 GM 작물의 차세대 제초제 내성 형질로 PPO계 제초제에 초점을 맞추고 있음. 새로운 제초제 내성 형질이 개발되면 우선 적용 대상은 콩이 될 것임(현재 재배되는 GM콩의 99.5%는 제초제 내성 형질만 사용하므로 새로운 제초제 내성 형질이 있으면 시장 창출 가능 함).



### 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

## 제 1 절 PPO 계 비선택성 제초제에 저항성을 부여하는 형질의 개발 (1세부)

### 가. PPO 계 제초제 저항성 유전자 확보

#### (1) BT3에서 tiafenacil 저항성 PPO 검증

식물체에 PPO 계 제초제(tiafenacil)에 대한 저항성을 부여하기 위해 식물과 가장 가까운 세균인 남세균에서 PPO 유전자를 분리하여 이용하기로 함. 남세균 중 genome sequencing이 완료된 종으로부터 PPO 로 예측되는 유전자들을 선별하였음. 총 15종의 유전자가 예측되었는데, 이들 중 균주를 획득 가능하여 유전자를 분리할 수 있는 균주들을 아래와 같이 선정함.

- CyPPO1: *Gloeobacter violaceus* PCC xxx
- CyPPO2: *Oooo* PCC xxx
- CyPPO3: *Crinalium epipsammum* PCC xxx
- CyPPO4: *Looo* PCC xxx
- CyPPO5: *Arthrospira platensis* NIES-39(ATCC 29408)
- CyPPO6: *Arthrospira* sp. PCC xxx
- CyPPO7: *Dactylococcopsis salina* PCC xxx
- CyPPO8: *Hooo* sp. PCC xxx
- CyPPO9: *Pseudanabaena* sp. PCC xxx

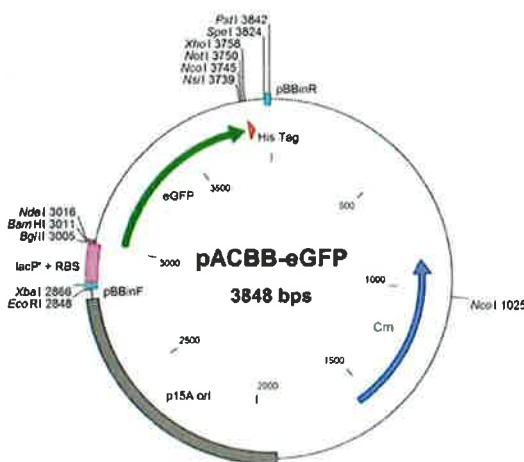


그림 1-1. pACBB-eGFP 벡터 구조

각각의 균주로부터 예측, 분리된 PPO 유전자가 실제로 PPO 의 기능을 하는 지 여부와 tiafenacil 에 대한 저항성을 갖는 지를 판단하기 위해 PPO 유전자가 knock out 된 E. coli

균주를 complementation 하여 실험하기로 함.

실험을 위해 PPO 유전자가 knock out 된 E. coli 로 BT3 균주를 획득하였고 발현 vector 로 pACBB-eGFP 를 이용하기로 함(그림 1-1).

제작된 vector 를 BT3 형질전환 뒤 tiafenacil 에 대한 저항성을 판단하였음(그림 1-2). Control 로 empty vector, AtPPO1, AtPPO1(Y426M+S305L) 유전자 삽입된 vector, MxPPO 삽입된 vector 를 이용함. empty vector 삽입된 BT3 는 생장을 회복시키지 못하였고, 나머지 CyPPO 와 AtPPO1 은 모두 BT3 의 생장을 회복시켰음. 이로써 CyPPO 가 BT3 내에서 PPO 로서의 기능을 수행함을 알 수 있었음.

Tiafenacil 농도별 BT3 의 생장을 관찰시 AtPPO1 이 삽입된 BT3 는 0.5  $\mu$ M에서 생장 저해 되었지만 (그림 1-2, WT), 아미노산 치환 유전자인 AtPPO1 (Y426M+S305L)가 삽입된 BT3 는 25 $\mu$ M에서 생장 저해가 일어나지 않음을 관찰함 (그림 1-2, MT). 이를 통해 돌연변이가 tiafenacil 에 저항성을 가짐을 알 수 있었음. CyPPO 의 경우 CyPPO1는 0.5 $\mu$ M에서 생장저해를 보이고, CyPPO5, CyPPO6 는 25 $\mu$ M에서 생장을 보이며, CyPPO2, CyPPO3, CyPPO4, CyPPO7, CyPPO8, CyPPO9 는 400 $\mu$ M에서 생장을 보였음.

이들 결과로부터 CyPPO 유전자의 PPO 로서의 기능을 확인하고 tiafenacil 저항성을 보이는 PPO 유전자를 선발할 수 있었음.

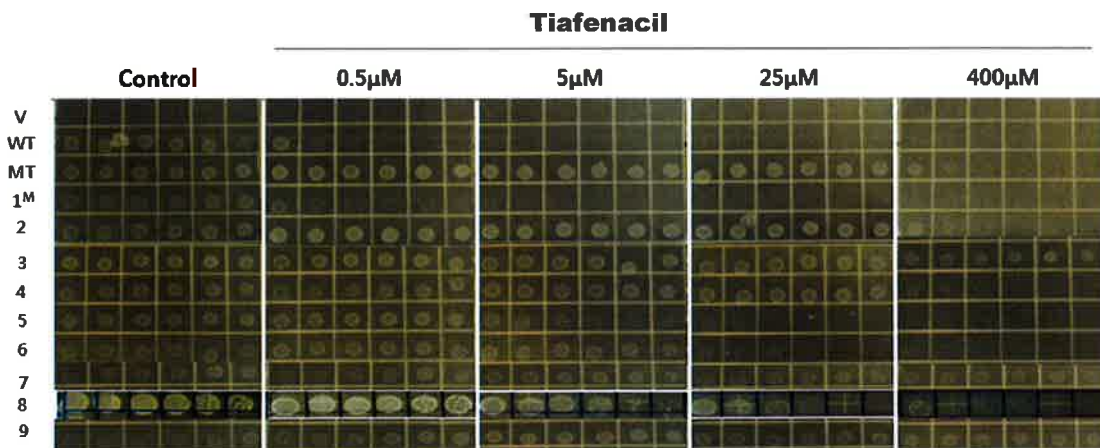


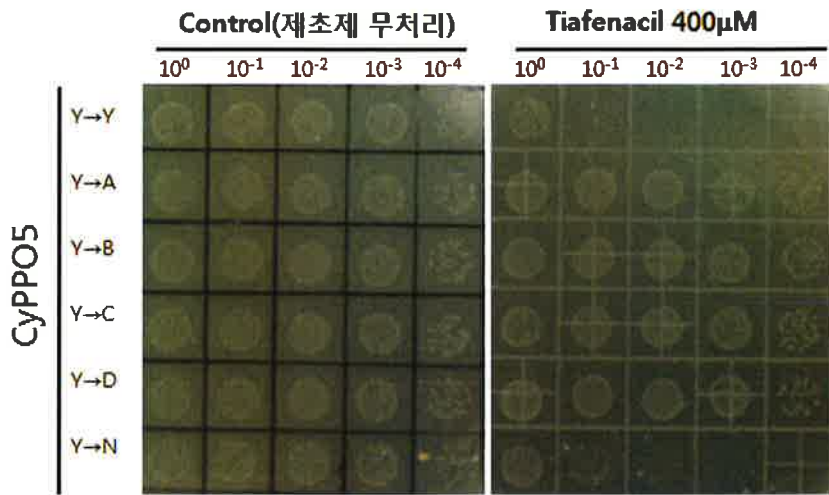
그림 1-2. CyPPO를 발현시킨 BT3에 대한 tiafenacil 저항성 테스트

V = empty vector, WT= 애기장대 PPO1(chloroplast type), MT=애기장대 PPO1(chloroplast type) 치환 유전자 (Y426M+S305L), 1<sup>M</sup> = CyPPO1, 2 = CyPPO2, 3 = CyPPO3, 4 = CyPPO4, 5 = CyPPO5, 6 = CyPPO6, 7 = CyPPO7, 8 = CyPPO8, 9 = CyPPO9

**(2) 아미노산 변이 CyPPO 의 제조제 저항성 조사**

CyPPO5 의 경우 애기장대 PPO1 보다는 생장이 잘 되나 고농도의 tiafenacil에서 생장 저해가 관찰되어 돌연변이를 통해 저항성을 증가시키고자 함. 입체구조 정보를 활용하여 CyPPO5 의 tiafenacil 과 binding 에 관여할 것으로 판단되는 아미노산을 임의의

아미노산으로 치환하여 tiafenacil 에 대해 저항성을 보이는 것을 변이 유전자를 스크리닝 하였음.



33

10<sup>0</sup>~ 10<sup>-4</sup> : CyPPO5 변 유전자가 삽입된 대장균의 희석 배수

그림 1-3. CyPPO5 돌연변이의 tiafenacil 저항성 테스트

A, B, C, D 의 4개 돌연변이가 BT3 시스템에서는 wild type(Y->Y) 보다 저항성이 증가된 것을 확인할 수 있었고 이 돌연변이가 식물인 애기장대에서도 tiafenacil 에 저항성을 부여할지를 조사함(그림 1-3).

### (3) 저항성 유전자, 변이 PPO 유전자의 애기장대 형질전환 및 저항성 라인 선발

CyPPO 유전자를 애기장대에 형질전환하기 전 CyPPO 가 식물체의 엽록체로 타겟팅되어 기능해야 하기 때문에 CyPPO 의 엽록체 타겟팅에 필요한 transit peptide 의 기능을 검정함. 엽록체 타겟팅을 위해 AtPPO1 의 N-terminal region 에 존재하는 transit peptide(cTP) 를 이용하고, 엽록체로의 이동을 확인하기 위해 C-terminal region 에 YFP 를 tagging 하여 형광현미경으로 관찰하고자 함.

CaMV 35S::cTP-CyPPO-YFP::Tnos 구조의 construct 를 제작한 후 Nicotiana benthamiana 의 잎에 transient expression 시켜 CyPPO 의 발현 위치를 형광현미경으로 관찰함.

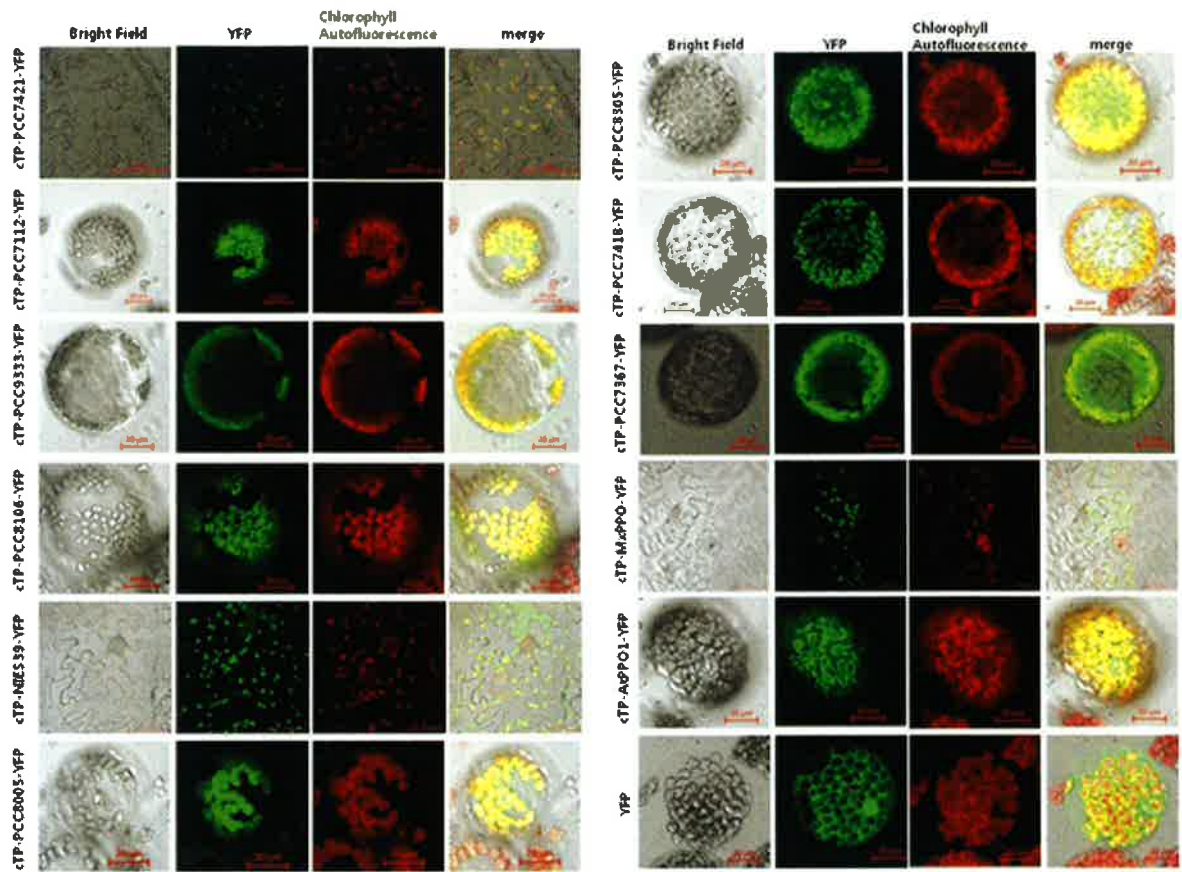


그림 1-4. transit peptide 에 의한 CyPPO 단백질의 엽록체 이동 확인

CyPPO의 YFP signal 과 엽록체가 보이는 autofluorescence 가 겹쳐 CyPPO 9종은 모두 엽록체로 타겟팅되는 것을 확인할 수 있었음. 반면, transit peptide 없이 YFP 만을 발현시킨 경우에는 YFP signal 이 cytoplasm 에 위치하여 엽록체로 타겟팅되지 않는 것을 알 수 있었음(그림 1-4, YFP).

엽록체로 타겟팅됨을 확인 후 실제 CyPPO 의 애기장대 형질전환체를 제작하기 위해 다음의 식물발현 벡터를 제작함(그림 1-5).



그림 1-5. CyPPO 의 애기장대 발현을 위한 형질전환 construct 구조

제작된 식물 발현벡터는 bar 유전자가 있어 glufosinate 로 형질전환체 선발이 가능하며 cTP-CyPPO-2xHA 구조의 단백질을 만들어 CyPPO 단백질이 엽록체에서 발현되도록 제작함. 2XHA(his tag) 은 향후 형질전환체 식물에서 발현된 CyPPO 단백질의 양을





판단하기 위함.

제작된 binary vector를 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 균주에 형질전환하고 *Agrobacterium* 을 이용하여 애기장대를 floral dipping 방법으로 형질전환 수행함. 형질전환된 애기장대로부터 종자를 획득한 뒤 형질전환된 식물체를 선발하기 위해 50uM glufosinate 를 포함한 1/2 MS 배지에 종자를 파종하여 생장실에서 7일간 성장 뒤 정상 성장 개체를 흙으로 이식하였음.

형질전환 식물체는 파종 후 4주 성장 시키고, 꽃대 형성 전에 1 μM tiafenacil 를 spray 하였음. 제초제 살포 7일 경과 후 약해(injury index) 정도를 판단하였음(표 1-1).

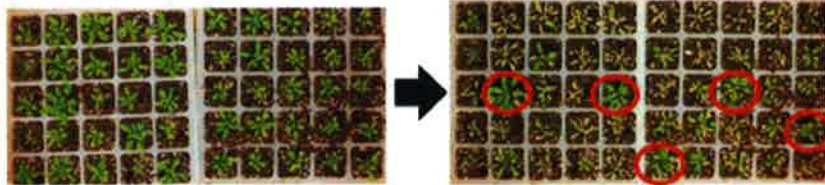
표 1-1. 애기장대 대상 PPO 계 제초제 처리에 따른 약해(injury index) 기준

injury index(ID)	약해 발생 현상(definition)
0	약해 없음, 제초제를 살포하지 않은 일반 애기장대와 동일한 수준
1	잎에서 spot 형태의 반점 bleach 관찰,
2	잎의 1/3 내외에서 bleach 관찰
3	잎의 2/3 내외에서 bleach 관찰, 줄기가 타 들어감
4	제초제 접촉한 식물체 부위 전체가 bleach 관찰되며 사멸하는 수준

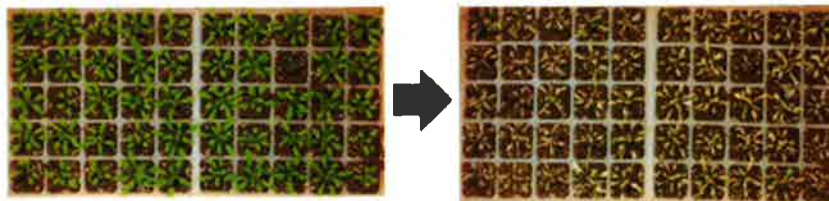
CyPPO 유전자 별로 제초제 저항성 결과는 아래와 같음

제초제 처리 전

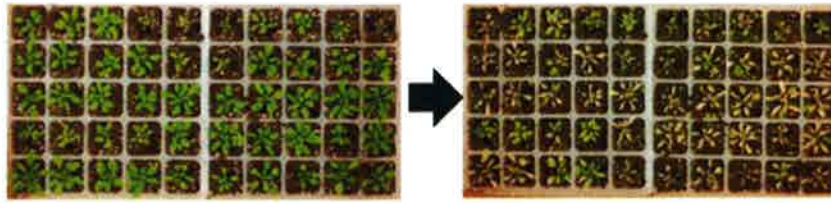
제초제 처리 후



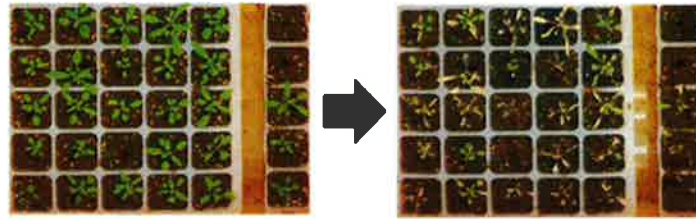
a) CyPPO2-HA 단백질 형질전환 식물체 50개체 중, 5개체 tiafenacil 저항성 확인함



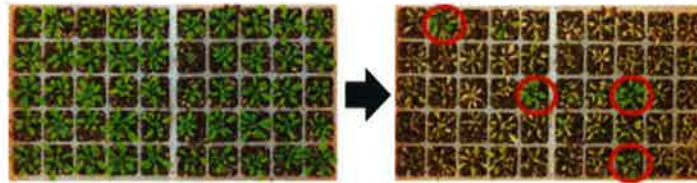
b) CyPPO3-HA 단백질 형질전환 식물체 50개체 중, 저항성 개체 無



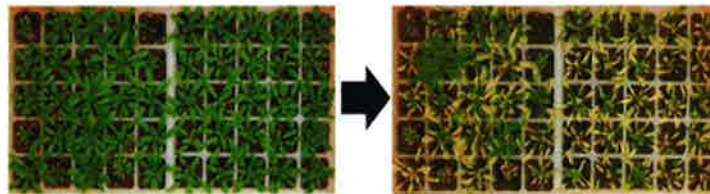
c) CyPPO4-HA 단백질 형질전환 식물체 50개체 중, 약한 저항성 다수 有



d) CyPPO7-HA 단백질 형질전환 식물체 30개체 중, 저항성 개체 無



e) CyPPO8-HA 단백질 형질전환 식물체 50개체 중, 4개체 tiafenacil 저항성 확인함



f) CyPPO9-HA 단백질 형질전환 식물체 50개체 중, 1개체 tiafenacil 저항성 확인함



g) MtAtPPO1(애기장대 PPO, Y426M+S305L 치환체, 신젠타 특허)-HA 단백질 형질전환 식물체 10개체 tiafenacil 저항성 확인함

CyPPO2, 8 형질전환체의 경우 1uM tiafenacil 에 저항성 식물체 라인들이 있고, CyPPO4 형질전환체의 경우 전반적으로 약한 저항성 개체가 다수 있었음. CyPPO3, 7, 9 형질전환체의 경우 1uM tiafenacil 처리에 약해를 보여 저항성 부여 하지 못하는 것으로 판단됨. Positive control 로 사용된 MtAtPPO1 (Y426M+S305L, 신젠타 특허) 유전자의



형질전환체는 tiafenacil 저항성 확인 됨.

#### (4) 아미노산 변이 CyPPO5 유전자의 애기장대 형질전환체 분석

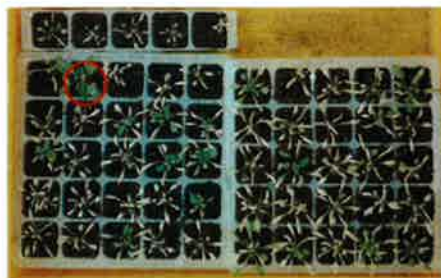
CyPPO5 유전자는 제초제 저항성을 갖지 못하지만 아미노산 변이체의 CyPPO5는 BT3에서 제초제에 저항성을 보였음. 아미노산을 치환시킨 CtPPO5 유전자를 모델식물인 애기장대에 형질전환하여 제초제 저항성을 조사함.

CyPPO5 아미노산 잔기 중 tiafenacil과 결합하는 자리로 판단되는 위치의 아미노산 잔기 -타이로신(Y), 발린(V), 프롤린(P), 아스파라진(N), 알라닌(A)을 다양한 다른 아미노산으로 치환한 유전자를 형질전환한 애기장대는 1  $\mu$ M Tiafenacil 에 약해가 관찰되었음.

반면 CyPPO10 유전자를 대상으로 이에 상응되는 위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 유전자 형질전환 애기장대 T1 세대에서 1  $\mu$ M Tiafenacil 처리에서 약해가 전혀 관찰되지 않았고 (13P, 그림 7), T2 세대에서는 30  $\mu$ M Tiafenacil 처리에도 약해가 관찰되지 않았으며(30~33P, 그림 16~19) T3 세대에서는 50 $\mu$ M Tiafenacil 처리에서도 약해가 관찰되지 않았음(36P, 그림 1-22). 이러한 결과는 CyPPO13 유전자를 대상으로 이에 상응되는 위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 유전자에서도 유사한 결과를 얻었음(data not shown).

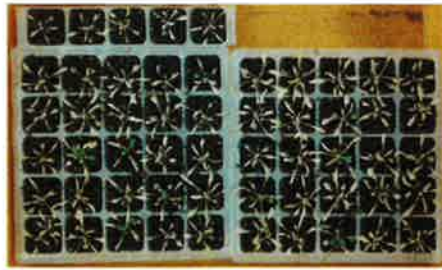


h) CyPPO5 돌연변이(Y->A) 형질전환 식물체 50개체 중, injury index 3 수준 4개체.



j) CyPPO5 돌연변이(Y->B) 형질전환 식물체 50개체 중, injury index 3 수준 1개체.





k) CyPPO5 돌연변이(Y->C) 형질전환 식물체 50개체 중, 저항성 개체 없음



l) CyPPO5 돌연변이(Y->D) 형질전환 식물체 50개체 중, injury index 3 수준 1개체.

이러한 결과는 CyPPO5 돌연변이 유전자가 BT3 시스템에서 tiafenacil 저항성을 보이거나 식물인 애기장대에 형질전환에서는 tiafenacil 저항성을 갖진 못하는 것을 제시함. 본 연구팀은 식물의 엽록체에서 발현이 되는 17개의 광합성 세균을 대상으로 변이 유전자를 개발하여 애기장대에서 저항성 증가를 확인한 결과 6종류 (CyPPO2, CyPPO8, CyPPO10, CyPPO13, CyPPO16, CyPPO17)만 정상적인 발현이 되는 것이 확인되었음. 이는 광합성 세균의 종류에 따라 식물에서 정상적인 작동을 하는 유전자가 있음을 보여 주고 있으며 이러한 결과를 바탕으로 이후의 연구는 주로 CyPPO10, CyPPO13을 중심으로 진행하였음.

#### (5) 형질전환 애기장대 식물체의 single homoline 확보

저항성을 부여하는 유전자 CyPPO2, 4, 8 형질전환체 중 tiafenacil 저항성과 감수성 개체를 세대 진전하여 도입유전자가 single insertion 된 homo line 을 제작하여 형질전환체 간 동일 조건에서 저항성을 판단하고자 함.

T2 종자를 확보하여 3:1 segregation ratio 분석을 통한 single insertion 확인을 위해 각 라인 당 100개의 종자를 1/2 MS+PPT 배지에 파종함. 분석 시 tiafenacil 에 대한 저항성을 다시 확인하기 위해 Col-0 종자가 발아하지 않는 70 nM tiafenacil 포함 배지에 라인별 종자를 파종한 뒤 정상 발아하는 라인을 다시 선발함. 파종 7일 경과 후 segregation ratio 를 분석하여 single insertion line 을 선발함(표 1-2, 1-3, 1-4, 1-5).

표 1-2. CyPPO2-HA 형질전환체

라인 No.	저항성:감수성	비율	70nM tiafenacil 저항성 여부	선발 여부
1	82:18	4.56:1	O	O
8	61:39	1.56:1		
10	74:26	2.85:1		
20	73:27	2.70:1		
23	60:40	1.5:1		
30	63:37	1.7:1		
35	67:33	2.03:1		
38	72:28	2.57:1		
40	76:24	3.17:1		
49	65:27	2.41:1	O	O

표 1-3. CyPPO4-HA 형질전환체

라인 No.	저항성:감수성	비율	70nM tiafenacil 저항성 여부	선발 여부
4	71:29	2.45:1		
6	73:27	2.7:1		
11	74:26	2.85:1		
15	72:28	2.57:1	O	O
20	73:27	2.7:1	O	O
21	72:28	2.57:1	O	O
C1	70:30	2.33:1	O	
C2	73:27	2.7:1	O	
C3	68:32	2.13:1	O	

표 1-4. CyPPO8-HA 형질전환체

라인 No.	저항성:감수성	비율	70nM tiafenacil 저항성 여부	선발 여부
6	72:28	2.57:1	O	O
16	74:26	2.85:1	O	O
23	69:31	2.23:1	O	
38	67:33	2.03:1		
40	74:26	2.85:1	O	O
C1	87:13	6.69:1	O	
C2	85:15	5.67:1	O	
C3	68:32	2.13:1		



표 1-5. AtPPO1(Y426M+S305L)-HA 형질전환체

라인 No.	저항성:감수성	비율	70nM tiafenacil 저항성 여부	선발 여부
1	61:39	1.56:1	O	
2	62:38	1.63:1	O	
3	77:32	3.35:1	O	O
4	62:38	1.63:1	O	
5	69:31	2.22:1	O	
6	67:33	2.03:1	O	
7	76:24	3.17:1	O	O
8	60:40	1.5:1	O	
9	80:20	4:1	O	
10	80:20	4:1	O	

선발된 라인들의 homoline 을 제작하기 위해 T3 종자를 확보 후 라인 당 50개 종자를 1/2MS+PPT 배지에 파종함. 50개 종자 모두 살아남는 라인을 homoline 으로 판단함(표 1-6, 1-7, 1-8, 1-9).

표 1-6. CyPPO2-HA 형질전환체

라인 No.	T2 개체 No.	PPT 배지상 100% 성장 여부	Homoline
1	1	X	
	2	X	
	3	O	O
	4	O	O
	5	O	O
49	1	X	
	2	X	
	3	X	
	4	O	O
	5	X	

표 1-7. CyPPO4-HA 형질전환체

라인 No.	T2 개체 No.	PPT 배지상 100% 성장 여부	Homoline
15	1	X	
	2	X	
	3	O	O
	4	O	O
	5	X	
20	1	O	O
	2	O	O
	3	X	
	4	X	
	5	X	
21	1	X	
	2	X	
	3	O	O
	4	X	
	5	O	O

표 1-8. CyPPO8-HA 형질전환체

라인 No.	T2 개체 No.	PPT 배지상 100% 성장 여부	Homoline
6	1	X	
	2	O	O
	3	X	
	4	X	
	5	O	O
16	1	O	O
	2	X	
	3	O	O
	4	X	
	5	X	
40	1	O	O
	2	X	
	3	X	
	4	O	O
	5	X	

표 1-9. AtPPO1(Y426M+S305L)-HA 형질전환체

라인 No.	T2 개체 No.	PPT 배지상 100% 성장 여부	Homoline
3	1	X	
	2	X	
	3	O	O
	4	X	
	5	X	
7	1	X	
	2	X	
	3	O	O
	4	O	O
	5	X	

(6) 형질전환 애기장대의 CyPPO 단백질 발현량 분석

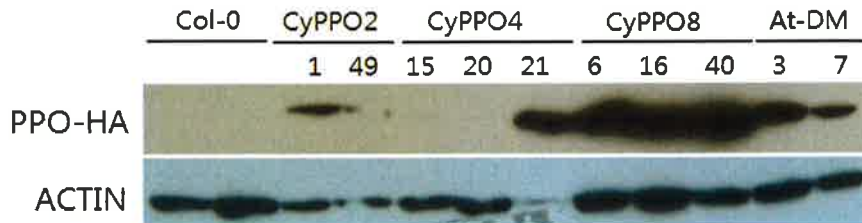


그림 1-6. CyPPO, MtAt-DM(Y426M+S305L) 형질전환 애기장대에서 PPO단백질 발현확인

Single insertion/homoline 인 개체들을 이용하여 CyPPO2, 4, 8 단백질량을 분석하고 형질전환체의 저항성 수준과 단백질량과의 상관관계를 분석하고자 함. 각 라인의 total protein 을 이용하여 western blotting 을 수행함(그림 1-6).

western blotting 결과 저항성 개체로 선발되었던 CyPPO2, CyPPO8 형질전환체 라인들은 모두 PPO 단백질이 발현되고 있었고, CyPPO8 의 경우는 발현량이 높음. 반면 뚜렷한 저항성을 보이지 않았던 CyPPO4의 경우 단백질 발현량이 CyPPO8에 비해 높지 않았음.



(7) 선발된 형질전환 애기장대(single homoline) 대상 제초제 저항성 조사

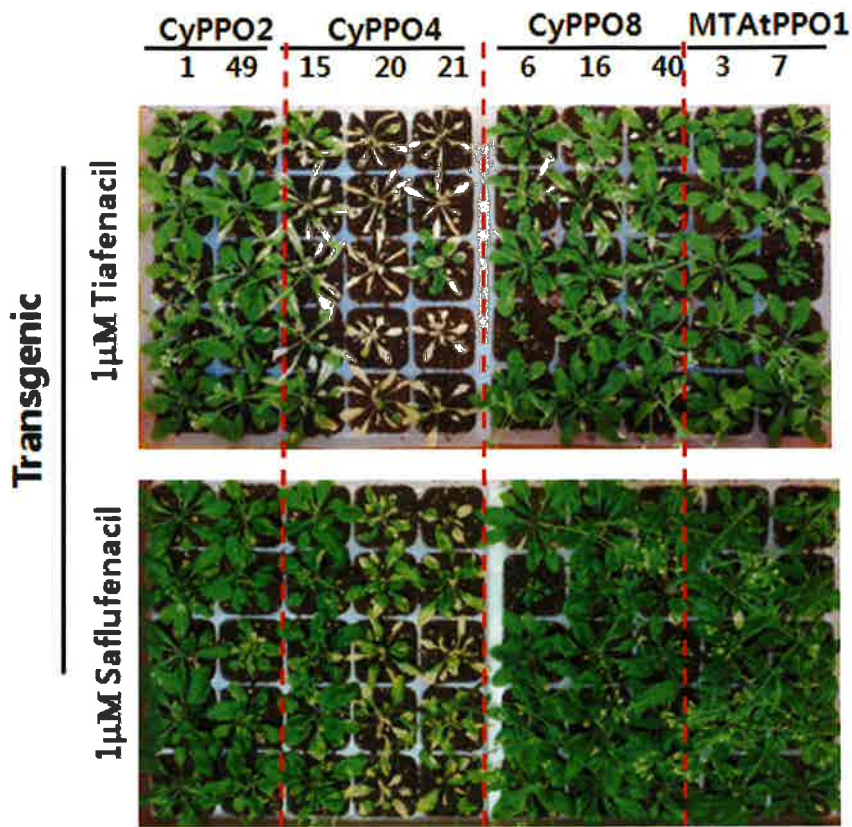


그림 1-7. Single copy 삽입 형질전환 애기장대 대상 Pyrimidinedione 계열 제초제 spray 결과

CyPPO2, CyPPO8 유전자 형질전환체는 Saflufenacil, Tiafenacil에 저항성을 확인함. CyPPO4 형질전환체는 중도 저항성 수준임. Positive control은 애기장대 PPO1의 아미노산 2자리 치환 유전자 형질전환체(MtAtPPO1-Y426M+S305L)를 사용함(그림 1-7).

나. 신규 저항성 유전자 확보

(1) 신규 PPO 유전자 선정

식물의 PPO와 동일한 hemY 타입 PPO 를 선정하기 위해서, genome sequencing이 완료된 남세균 종을 후보로 PPO 유전자를 탐색함. 식물 PPO의 아미노산 서열을 template로 하여 BLASTX 수행, 식물 PPO 서열과 아미노산 수준 30% 이상의 homology가 있는 6종의 남세균을 선정하여 CyPPO10~15로 명명함(표 1-10).

표 1-10. 신규 CyPPO

No.	학명
1	CyPPO10 <i>Too</i>
2	CyPPO11 <i>Soo</i>
3	CyPPO12 <i>Moo</i>
4	CyPPO13 <i>Soo</i>
5	CyPPO14 <i>Too</i>
6	CyPPO15 <i>Poo</i>

(2) 신규 남세균 PPO 유전자 확보

Genbank database를 기초로 유전자를 합성하였음. 제초제 저항성 유전자의 선발은 애기장대 형질전환체를 제작, Tiafenacil 저항성을 확인할 계획이므로 유전자의 합성에 애기장대의 코돈을 적용함. GeneScript 社의 codon optimization과 유전자 합성 서비스를 활용하여 애기장대 codon으로 맞추어 PPO 6종을 합성함.

(3) CyPPO 단백질의 대장균 내 발현 위한 construct 제작(pLac::PPO-His)

대장균 발현벡터인 pACBB 벡터에 신규 PPO 유전자 6종을 각각 재조합 함(그림 1-8).



그림 1-8. 대장균 발현 벡터

(4) BT3 형질전환을 통한 PPO 기능 및 Tiafenacil 저항성 확인

고유의 PPO가 제거된 대장균 strain인 BT3( $\Delta$ hemG)를 이용하여 PPO 기능 회복 실험 및 Tiafenacil 저항성을 실험함. 위에서 제작한 construct를 BT3에 형질전환하여 신규 PPO 유전자들에 의한 PPO 기능 회복(complementation test) 및 신규 PPO 유전자의 Tiafenacil 저항성을 확인함.

Negative control로 PPO 유전자가 삽입되지 않은 공벡터(pACBB-eGFP)와 애기장대 PPO(*AtPPO1* WT)를 이용함. Positive control로 Syngenta 社가 개발한 Butafenacil 저항성 PPO(*MtAtPPO1*, 애기장대 PPO 아미노산 치환)를 사용함.

확인 결과 신규 PPO 유전자 6종 BT3의 정상 성장을 회복시키고 이 중 다수의 유전자가 Tiafenacil 저항성을 보유함. CyPPO10, 12, 13, 15 유전자가 *AtPPO1*(WT)보다 높고, *MtAtPPO1*(MT)와 유사한 Tiafenacil 저항성을 가졌음(그림 1-9).

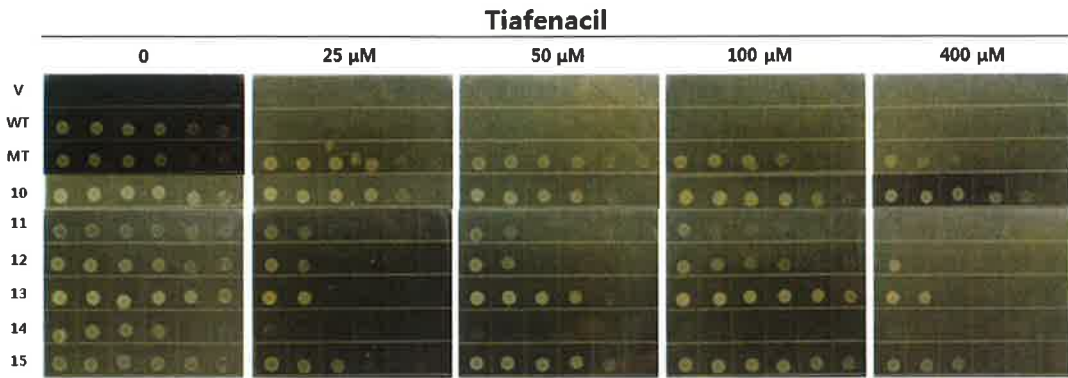


그림 1-9. 신규 납세균 유전자의 제초제 저항성 스크리닝 결과.

V: pACBB-eGFP, WT: AtPPO1 Wild type, MT: Syngenta社 개발 Butafenacil 저항성 PPO, 10~15: 각 신규 CyPPO 가 삽입된 BT3 형질전환 대장균.

다. 호열성 CyPPO(CyPPO10, 13) 의 제초제 저항성 아미노산 변이체 탐색

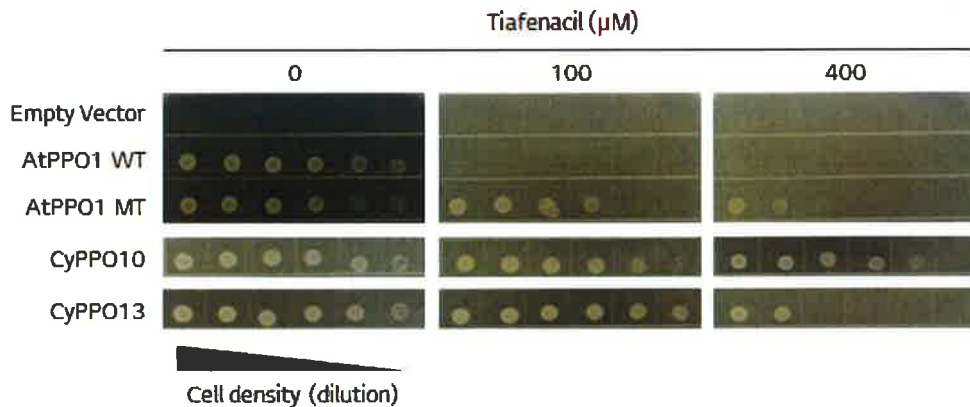


그림 1-10. CyPPO10 및 CyPPO13의 Tiafenacil 저항성 확인(BT3 test)

호열성 광합성 박테리아 유래 CyPPO10과 CyPPO13을 E. Coli 발현 vector에 클로닝하여 BT3 strain에 transformation 시킨 뒤, Tiafenacil이 포함된 LB 배지에 spotting하여 저항성 여부를 확인함. <그림 1-10> 에서 보이는 것처럼, AtPPO1 WT은 25μM Tiafenacil 포함 배지에서 성장하지 못하고 AtPPO1 MT(mutant)는 400μM 에서 어느 정도의 성장 저해를 보이 반면 CyPPO10은 더 높은 저항성을 보였음. 한편 CyPPO13은 AtPPO1 MT 수준의 저항성을 보이는 것을 알 수 있었음.

CyPPO10 및 CyPPO13에 대해 아미노산 변이체를 제작하여 BT3 system에서 Tiafenacil에 대한 저항성이 증대된 변이체를 스크리닝 함. CyPPO의 BT3내 발현이 너무

많으면 스크리닝이 어렵기 때문에, E. coli 발현 벡터를 pET303 (low expression vector)으로 바꾸어 저항성을 분석함.

CyPPO10의 경우, CyPPO10\_F<sup>1</sup>, CyPPO10\_F<sup>2</sup>, CyPPO10\_F<sup>3</sup>, CyPPO10\_F<sup>4</sup>, CyPPO10\_F<sup>5</sup>, CyPPO10\_A<sup>1</sup>, CyPPO10\_A<sup>2</sup>, CyPPO10\_V<sup>1</sup> 등 총 8종의 아미노산 변이체를 제작하여 저항성을 분석한 결과, 아미노산 변이체가 100~200  $\mu$ M의 Tiafenacil에서 생장함을 확인함 (CyPPO10 WT은 5~25  $\mu$ M 생장, 1-12, WT).

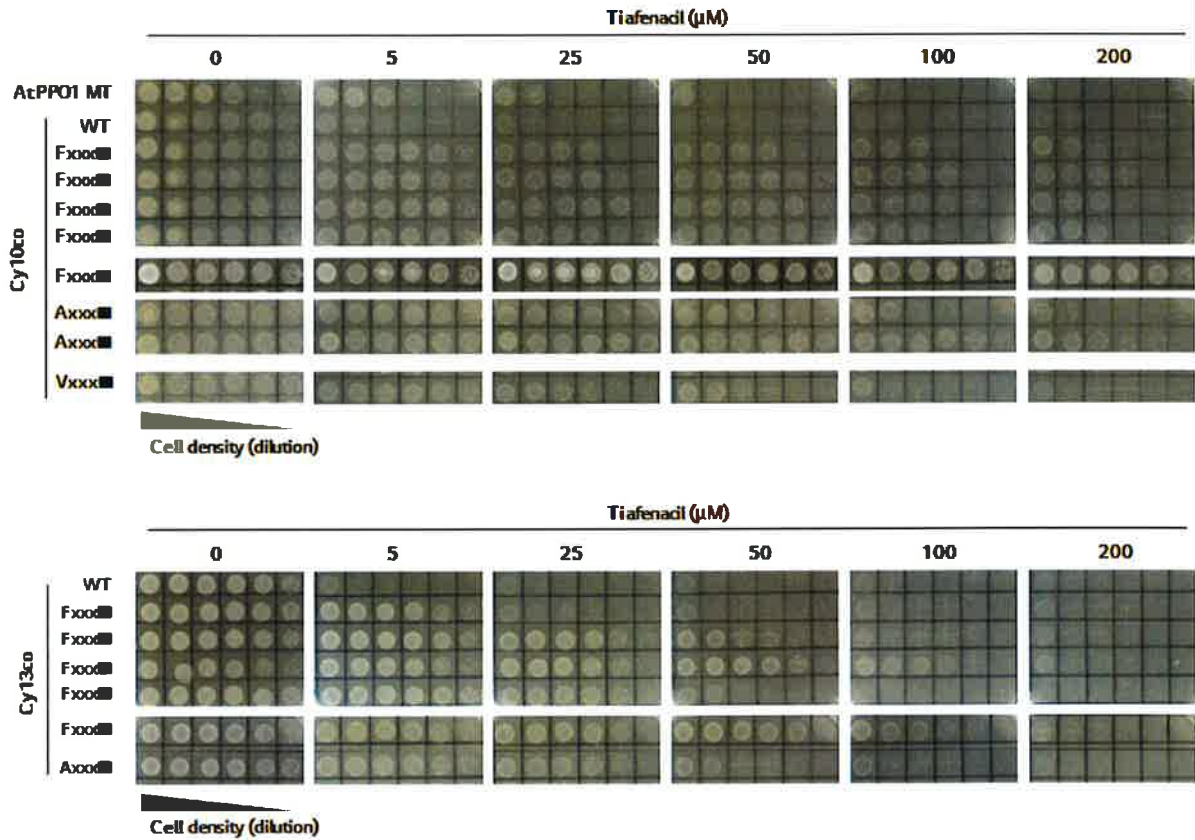


그림 1-11. CyPPO10의 아미노산 변이체에 대한 Tiafenacil 저항성 분석(BT3 test)

CyPPO13의 경우 CyPPO13\_F<sup>1</sup>, CyPPO13\_F<sup>2</sup>, CyPPO13\_F<sup>3</sup>, CyPPO13\_F<sup>4</sup>, CyPPO13\_F<sup>5</sup>, CyPPO13\_A<sup>1</sup> 등 총 6종의 아미노산 변이체를 제작하여 저항성을 분석한 결과 CyPPO13 WT보다 높은 저항성을 보임 (그림 1-11, 아래).

## 라. PPO 단백질 분리 정제 및 효소 활성 측정

### (1) 변이 CyPPO 효소의 제초제 binding affinity 분석

남세균 유래 CyPPO 유전자 중 애기장대에서 tiafenacil에 저항성을 보인 PPO 단백질의

효소 활성을 조사하기 위하여 CyPPO유전자의 재조합 단백질을 대장균에서 발현시켜 효소 활성을 분석함. Native PPO 단백질의 solubility가 낮아 단독으로 재조합 단백질을 발현시킬 경우, inclusion body를 형성한다는 것이 확인되어, 재조합 단백질의 수용성을 증가시킬 수 있는 fusion protein과 함께 발현되는 벡터 시스템을 이용하였음. 또한, 대장균내 자체 PPO 단백질로 인해 효소활성의 간섭을 받으므로 재조합 단백질을 정제하여 효소활성을 측정해야하므로 affinity chromatography가 가능한 발현벡터를 이용함(그림 1-12).

**1) GST (Glutathione S-transferase) 결합 단백질용 벡터**



**2) Nus (전사조절 단백질) 결합 단백질용 벡터**



**3) MBP (Maltose binding protein) 결합 단백질용 벡터**



그림 1-12. CyPPO 단백질의 발현 연구에 사용된 단백질 expression 벡터 구조

**1) 발현벡터 선정 및 제작**

- 대상유전자: CyPPO2, CyPPO4, CyPPO5, CyPPO8, AtPPO, MTAtpPO
- 발현벡터: pET43a, pGS2.1, pMAL-2CX
- 발현균주: BL21 (DE3) codonplus
- 대장균 발현용 벡터 제작

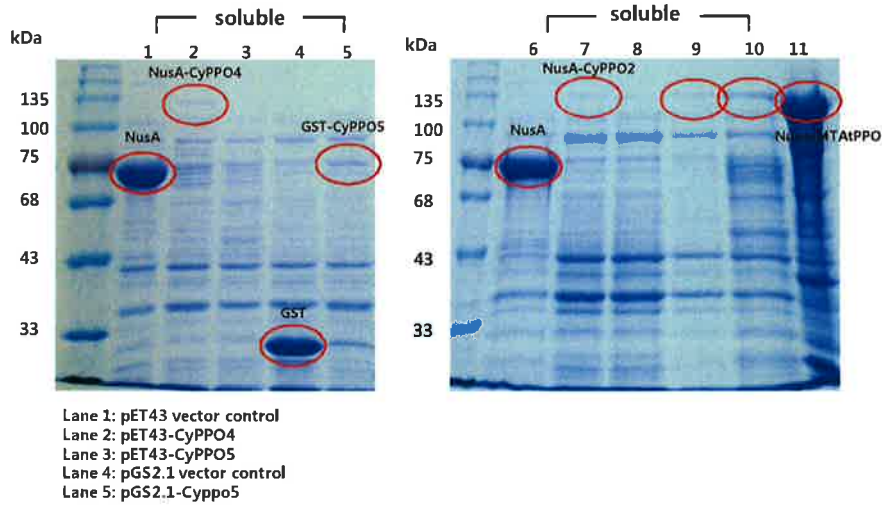
**2) PPO 단백질 발현 확인**

PPO 유전자가 도입된 발현벡터를 발현균주인 BL21(DE3)codonplus에 형질전환하여 CyPPO 단백질의 발현을 유도하였음.

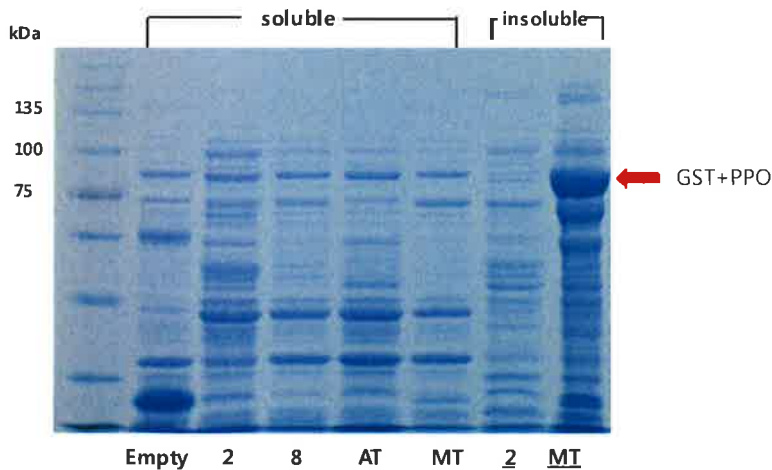
- 발현조건
  - Induction: OD<sub>600</sub>=0.2, 0.1 mM IPTG 투입
  - 발현온도: 23도, 180rpm
  - 발현시간: 15hrs

- 배양규모: 50ml/250ml flask
- 배양액을 8,000g, 15분 원심분리로 세포(대장균)를 회수
- 대장균에 Novagen社 (merckmillipore) 의 Bugbuster를 이용하여 cell lysis
- 8,000 g에서 15분 원심분리로 soluble fraction과 pellet (insoluble fraction)을 분리
- 각각의 fraction을 1% SDS-PAGE gel로 분석

ㄱ. pET 43a vector system



ㄴ) pGS 2.1 vector system



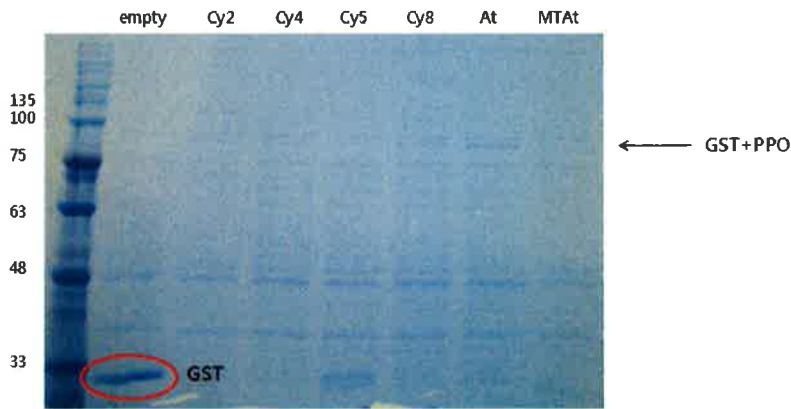
pGS2.1 vector system의 경우, 약 77kDa size 위치에 endogenous protein이 있어 SDS-PAGE 상에서 soluble protein의 발현 여부를 확인하기 어려움. 따라서, GST를 이용하여 재조합단백질을 정제하거나, antibody를 이용한 western blot으로 확인이 필요함.



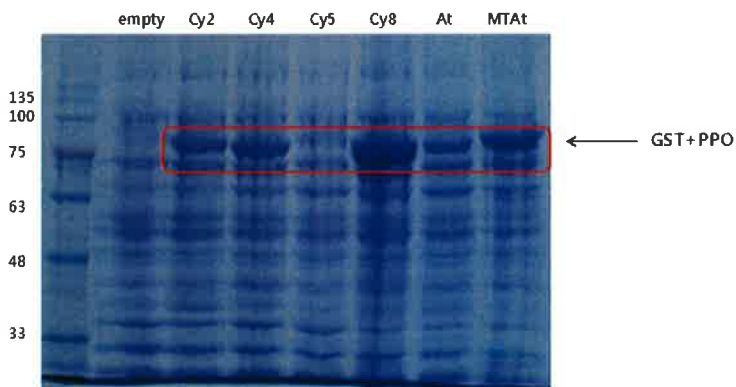
ㄷ) Glutathione Sepharose 4B

Glutathione Sepharose 4B를 이용한 partial purification을 수행하여, GST-PPO 단백질의 수용성 발현 여부를 확인하였으나 수용성 발현양이 적었음.

a. Soluble fraction

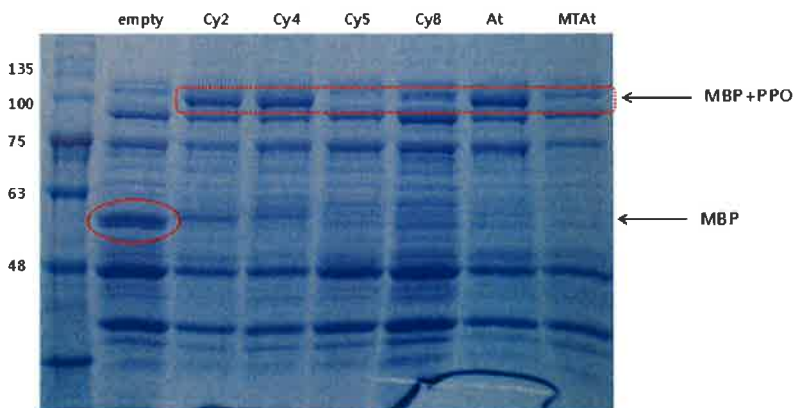


b. Insoluble reaction

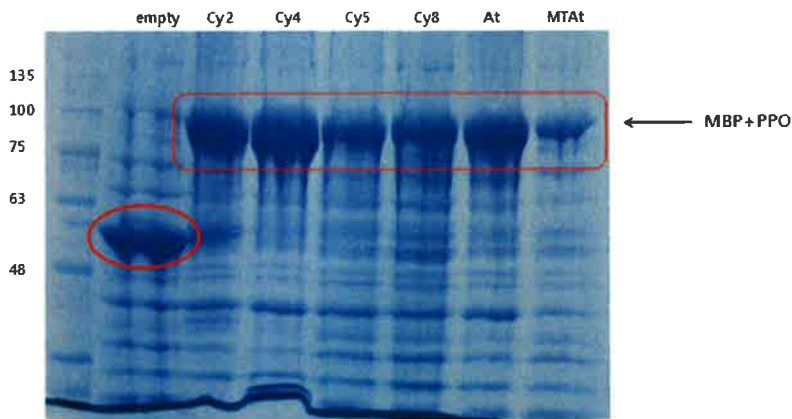


ㄹ) pMAL-2CX vector system

a. soluble fraction



b. insoluble fraction



여러 단백질 발현 벡터시스템을 분석한 결과, CyPPO2, CyPPO4, CyPPO5, CyPPO8, AtPPO, MTAtPPO 중 CyPPO5만 세 가지 모든 벡터에서 수용성 발현이 확인되지 않았음. 다른 PPO 유전자의 경우, pMAL-2CX 벡터에서 수용성 발현이 가장 잘 되는 것으로 확인되었음. 따라서 scale up을 통한 대량생산을 위한 시스템으로 pMAL-2CX 벡터 시스템을 최종 선택하였음.

(2) MBP-PPO 재조합 단백질 정제

NusA, GST, MBP fusion 단백질을 결합한 재조합 단백질 발현 테스트로부터 최종 MBP fusion 발현 시스템이 가장 수용성 단백질을 많이 발현시키는 것으로 확인하여, PPO 단백질의 재조합 단백질 발현 및 정제시스템으로 선정하였음. PPO 효소 활성 및 효소학적 분석을 위한 정제를 위해 대량 발현한 배양액을 대상으로 MBP에 결합하는 amylose resin을 이용한 affinity 정제를 수행하였음.

- 발현조건

- Induction: OD600=0.2, 0.1 mM IPTG 투입
- 발현온도: 23도, 180rpm
- 발현시간: 15hrs
- 배양규모: 200ml/1,000ml flask

- 세포 파쇄 및 단백질 추출

- 추출 버퍼: Column buffer (50mM Tris-Cl, pH8.0, 200mM NaCl)  
5ml buffer/g cell
- Sonication: SONICS&MATERIALS社 VCX130 (130 watts)
- 15 sec ON, 10 sec OFF for 5 min on ice

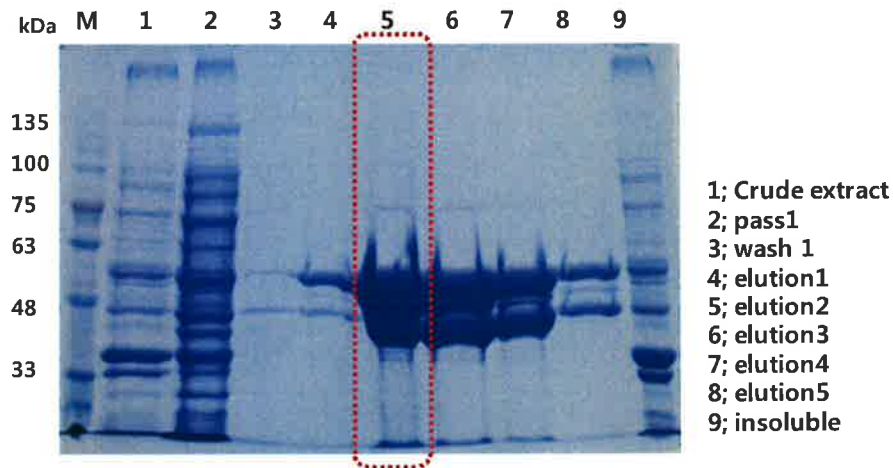


- 4도, 20분간 원심분리 (20,000 x g)
- Supernatant를 1:6 비율로 column buffer로 희석.

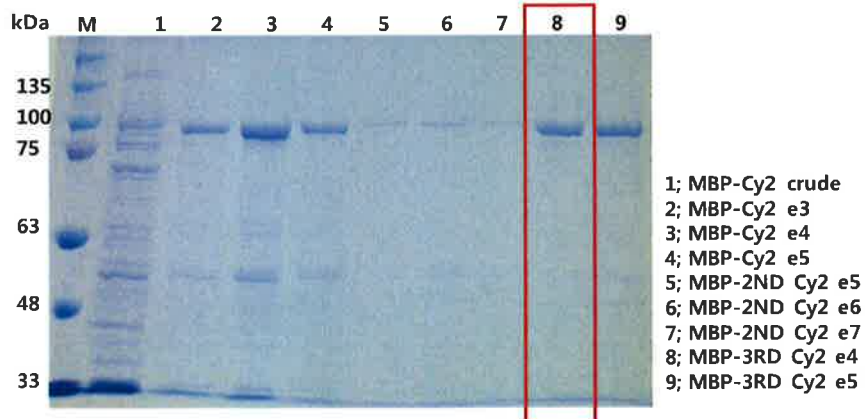
- 정제

- 1.5 x 15 cm column에 amylose resin을 부어 컬럼을 packing 함.
- MBP-PPO 재조합 단백질을 포함하는 조효소액을 컬럼에 loading 함 (0.2ml/min)
- 3배 볼륨의 column buffer로 washing 후 washing액 내의 단백질 양을 확인하여 더 이상 단백질이 검출되지 않으면 washing 종료
- 약 2배 볼륨의 20 mM maltose 용액으로 MBP-PPO 단백질을 elution (1.5 ml E-tube에 각 fraction을 분취)하면서 각 eluant의 단백질 농도를 확인
- 더 이상 단백질이 검출되지 않으면 elution 종료
- 각 fraction의 10ul를 취해 단백질 정량, 단백질이 검출된 fraction을 전기영동 분석함.

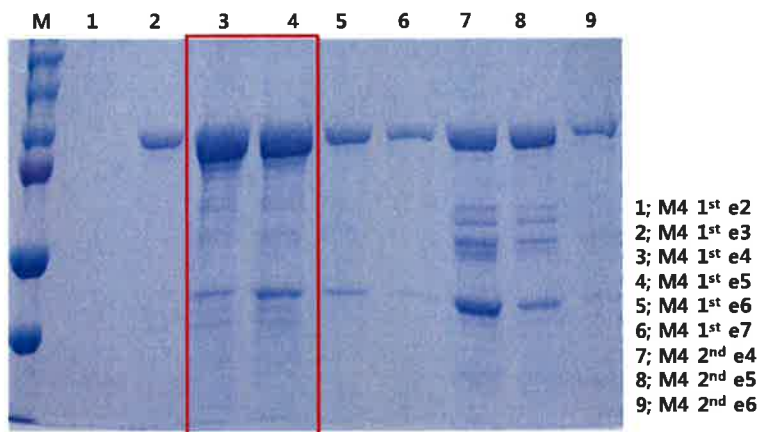
ㄱ) pMAL-empty vector (MBP)



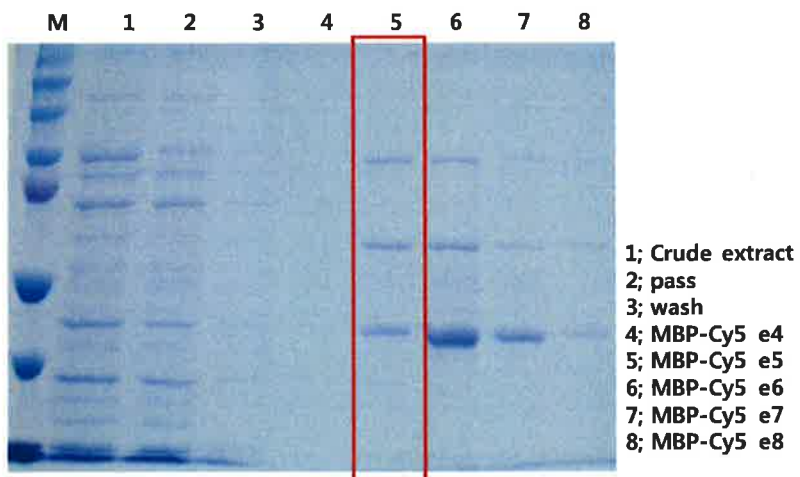
ㄴ) CyPPO2 expression in pMAL-2CX and purification



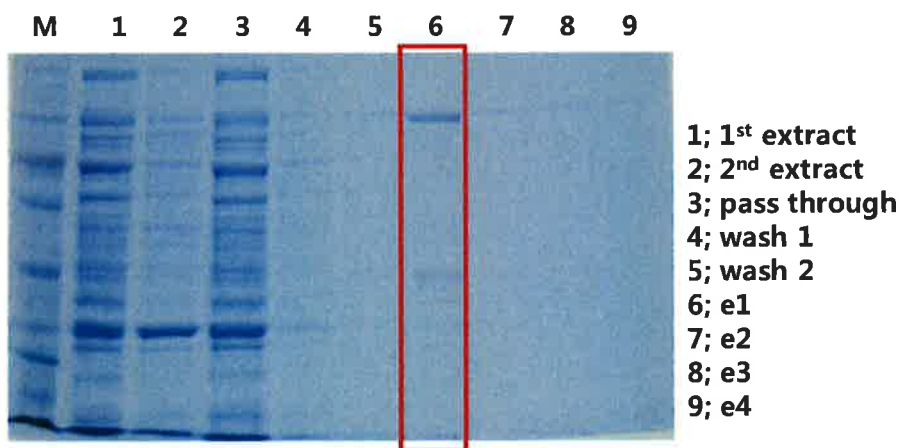
ㄷ) CyPPO4 expression in pMAL-2CX and purification



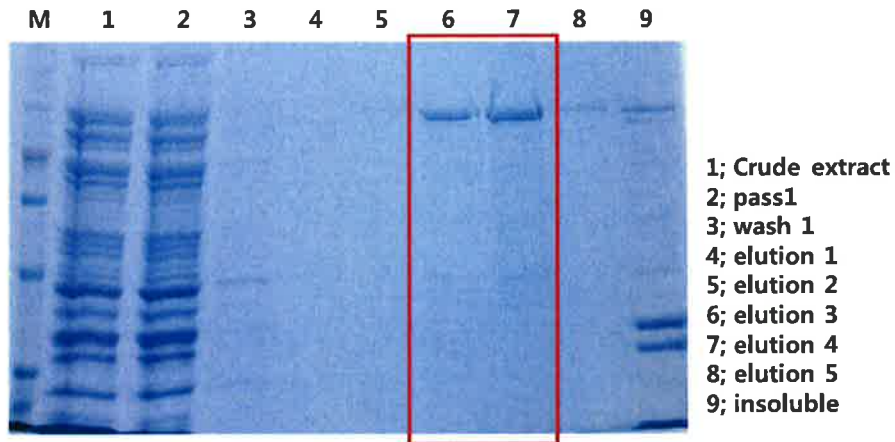
ㄹ) CyPPO5 expression in pMAL-2CX and purification



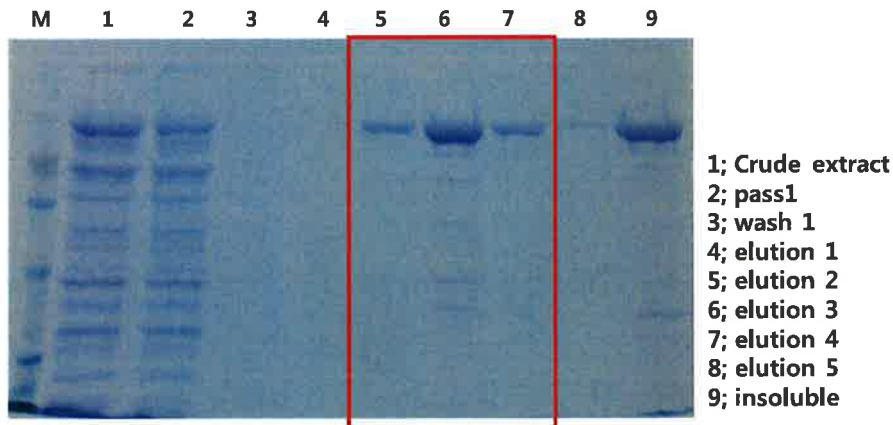
ㅁ) CyPPO8 expression in pMAL-2CX and purification



ㄷ) AtPPO expression in pMAL-2CX and purification



ㄸ) MTAtPPO expression in pMAL-2CX and purification



남세균 유래 PPO 단백질 4종 (CyPPO2, 4, 5, 8) 및 애기장대 PPO 단백질 2종 (AtPPO, MTAtPPO) 을 MBP fusion system을 이용하여 발현시켜 정제하였음. 각 PPO 단백질의 eluates를 SDS-PAGE로 분석하여 90% 이상 정제된 fraction을 PPO 효소 활성을 측정하는데 활용하였음.

**(3) Protoporphyrinogen IX 합성 조건 연구**

정제된 PPO 단백질의 효소활성을 분석하기 위해 기질인 Protoporphyrinogen IX을 합성하는 조건을 탐색하였음. 기존에 발표된 논문(Kato et al., 2012) 에서 소개된 방법을 선택하여 Protoporphyrinogen IX 합성을 수행하였으며 상세 합성 조건은 아래와 같음.

1) Protoporphyrinogen IX 합성

- ① Nitrogen gas가 streaming 되는 공간에서 작업
- ② 3mg의 protoporphyrin IX을 20ml의 20% EtOH에 용해
- ③ Dark condition에서 30분간 stirring



- ④ 15ml screw tube에 800ul의 protoporphyrin IX solution 을 넣고 5분간 nitrogen gas를 flushing
- ⑤ 0.5g의 sodium amalgam을 첨가
- ⑥ 2분간 vigorous shaking
- ⑦ tube안의 수소gas를 배출하기 위해 뚜껑을 open
- ⑧ 뚜껑을 닫고 3분간 incubation
- ⑨ Syringe와 cellulose membrane filter를 이용해 protoporphyrinogen IX solution 을 filtering 함.
- ⑩ protoporphyrinogen IX solution 600 ul에 2M MOPS를 약 300ul 첨가해 pH를8.0으로 조절

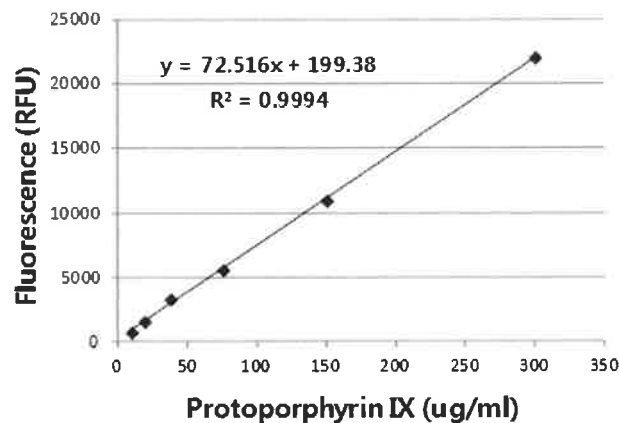


그림 1-13. Protoporphyrin IX standard curve

## 2) protoporphyrinogen IX 정량

- ① Protoporphyrinogen IX solution 을 공기중에서 open 하여 산화시킴(over night)
- ② 2.7N HCl 첨가
- ③ 408nm에서 absorbance를 측정
- ④ Standard protoporphyrin IX을 이용해 standard curve를 작성하고(그림 1-13), 이를 이용해 protoporphyrinogen IX의 농도를 정량함.

## (4) PPO 효소 활성 측정법 확립

- ① Reaction mixture 제조 (10ml 기준)
  - 50 mM Tris-Cl (pH 8.0)
  - 50 mM NaCl
  - 0.04% Tween 20
  - 40 mM glucose (0.072g)합성된 protoporphyrinogen IX과 정제된 PPO 단백질을 이용하여 PPO 효소활성을 측정하기 위한 분석법을 확립하였음. PPO 효소 활성은 반응액과 효소의 mixture를 만든 후, 기질인 protoporphyrinogen IX을 넣으면서 반응을 시작함. protoporphyrinogen IX은 빛과 산소가 있는 조건에서 쉽게



산화되므로 암실에서 산소가 없는 (N2 purging) 조건을 유지하는 것이 중요함. 기질과 PPO 효소의 반응은 상온에서 약 20분간 측정하며, 반응시간 동안 30초 간격으로 time course reading 하였음.

- 5 units glucose oxidase (16.6 mg)
- 10 units catalase (1 ul)
- ② 200 ul의 Reaction mixture를 96well plates에 넣음
- ③ 약 50ul의 mineral oil을 첨가
- ④ PPO 효소 첨가
- ⑤ 약 20ul (10uM)의 protoporphyrinogen IX solution 첨가 (약 1/10 volume)
- ⑥ Room temperature에서 30분간 반응
- ⑦ Microplate reader (Hidex社 sense)에서 protoporphyrin IX의 형광을 측정
  - excitation : 405 nm
  - emission: 633 nm
- ⑧ Protoporphyrin IX의 standard curve를 이용하여 protoporphyrin IX를 calibration 하여 PPO 활성을 측정

**(5) CyPPO10, CyPPO13 변이유전자의 효소활성 및 Tiafenacil의 의한 활성저해도 측정**

위에서 확립한 PPO 활성 분석법과 제초제에 의한 PPO 활성 저해 분석법을 이용하여, CyPPO의 아미노산 변이체들에 대한 분석을 진행함. BT3 test에서 Tiafenacil에 대한 저항성이 확인된 변이체 단백질을 E. coli에서 발현시켜 정제하고, CyPPO 단백질에 의해 Protoporphyrinogen IX이 Protoporphyrin IX로 변환되는 것을 Spectrofluorometer를 이용하여 측정함.

한편, 이와 같은 CyPPO의 활성이 여러 PPO 계 제초제 처리에 의해 저해되는 수준을 IC<sub>50</sub>(효소 활성이 50%로 저해되는 제초제의 처리 농도, 수치가 높을수록 제초제에 대한 저항성이 높음)을 기준으로 평가함(표 1-11).

**표 1-11. CyPPO10 및 CyPPO13의 아미노산 변이체 단백질의 효소활성 및 IC<sub>50</sub>**

Mutation site	Activity (%)	IC <sub>50</sub> (nM)			
		Tiafenacil	Saflufenacil	Fomesafen	Butafenacil
WT	100	21	9	15	8
Fxxx■	93	115	1500	114	24
Fxxx■	67	359	3,000	-	-
Fxxx■	59	172	-	-	-
Fxxx■	56	307	-	-	-
Axxx■+ Fxxx■	62	543	-	-	-
Rxxx■+ Fxxx■	67	527	5,000	-	-

	Rxxx■+ Fxxx■	38	1935	5,000		
	Rxxx■+ Fxxx■	30	1000			
	Vxxx■+ Fxxx■	78	435			
	Vxxx■+ Fxxx■	63	818			
	Vxxx■+ Fxxx■	59	470			
	Vxxx■+ Fxxx■	52	929			
	Axxx■+ Fxxx■	80	5,000	5,000		
	Axxx■+ Fxxx■	32	5,000			
	Axxx■+ Fxxx■	90	4,500	5,000		
	Axxx■+ Fxxx■	48	4,500			
	Vxxx■+ Fxxx■	87	356	5,000		
	Vxxx■+ Fxxx■	10	276			
	Rxxx■+ Vxxx■+ Fxxx■	5	741			
	Sxxx■+ Vxxx■+ Fxxx■	17	2,720			
	Sxxx■+ Vxxx■+ Fxxx■	12	3,580			
	Sxxx■+ Ixxx■+ Fxxx■	5	2,000			
	Rxxx■+ Fxxx■	57	242			
	Rxxx■+ Fxxx■	51	184			
	WT	100	28	36	30	37
	Fxxx■	98	56	481	77	18
	Fxxx■	83	135	1,480	-	-
	Fxxx■	82	141	1,470	-	-
	Fxxx■	86	212	-	-	-
	Rxxx■+ Fxxx■	55	615	5,000		
	Axxx■+ Fxxx■	77	336	4,500		
	Axxx■+ Fxxx■	75	261	4,700		
CyPPO13	Axxx■+ Fxxx■	75	1,122	5,000		
	Axxx■+ Fxxx■	66	1,630			
	Axxx■+ Fxxx■	68	1,972			
	Vxxx■+ Fxxx■	93	203	1,375		
	Vxxx■+ Fxxx■	72	386	1,924		
	Axxx■+ Fxxx■	62	4,700	5,000		
	Axxx■+ Fxxx■	49	4,500			
	Axxx■+ Fxxx■	80	3,900			
	Axxx■+ Fxxx■	56	3,200			

<표 1-11>에서 CyPPO10의 단일 아미노산 치환체에서 CyPPO10 WT과 비교하여 효소 활성은 56~98% 까지 유지가 되면서 각 제초제에 대한 저항성은 Tiafenacil IC<sub>50</sub> 359 nM(wild type의 경우 21 nM)로 17배 증대되는 변이유전자 및 Saflufenacil IC<sub>50</sub>값 기준으로 333배(wild type의 경우 9 nM, 단일아미노산 변이 유전자 3,000 nM) 증가된 변이체를 확인하였음.

CyPPO10의 double 아미노산 치환체에서는 tiafenacil과 Saflufenacil 제초제에 저해를 받지 않는 수준의 IC<sub>50</sub> 값이 4,500~5,000nM(CyPPO10 WT 대비 각각 238배와 555배 증가)를 확인하였으며 이들 변이 PPO 단백질의 효소활성은 30~90% 수준임.

CyPPO13의 단일아미노산 치환체에서 Saflufenacil IC<sub>50</sub> 값은 ~1,500 nM, 효소 활성은 80% 수준의 변이체가 개발되었으며 double 아미노산 치환체에서 Tiafenacil에서는 4,700nM, Saflufenacil 에는 5,000 nM의 IC<sub>50</sub>값을 갖는 변이체(CyPPO13 대비 각각 168배와 139배 증가)를 개발하였음.

마. CyPPO 유전자의 애기장대 형질전환체 제작 및 제초제 저항성 비교 분석

(1) CyPPO10, 13 변이 유전자의 애기장대 형질전환체 제작 및 제초제 내성 검증

효소 활성과 제초제에 대한 저항성을 기준으로 CyPPO10과 CyPPO13의 single amino acid 변이체(대조군으로 CyPPO10 WT, CyPPO13 WT 포함)를 선정하여 <그림 1-14>와 같이 binary vector에 클로닝하여 Agrobacterium을 통해 애기장대 형질전환체를 제작하고, BASTA를 이용하여 변이체(총 7종)에 대해 single insertion line을 선발함.



그림 1-14. 신규 CyPPO 유전자의 제초제 저항성 아미노산 변이체의 애기장대 형질전환용 binary vector map

선발된 형질전환체를 대상으로 제초제를 처리하여 저항성을 평가함. 먼저, CyPPO10 및 CyPPO13 WT에 대한 Tiafenacil 저항성을 확인함. <그림 1-15>에서 Tiafenacil 1 $\mu$ M 처리 5일 후 Col-0는 사멸하는 반면, CyPPO10 및 CyPPO13 WT 형질전환체는 약해가 없이 정상적으로 성장하는 것을 볼 수 있음.

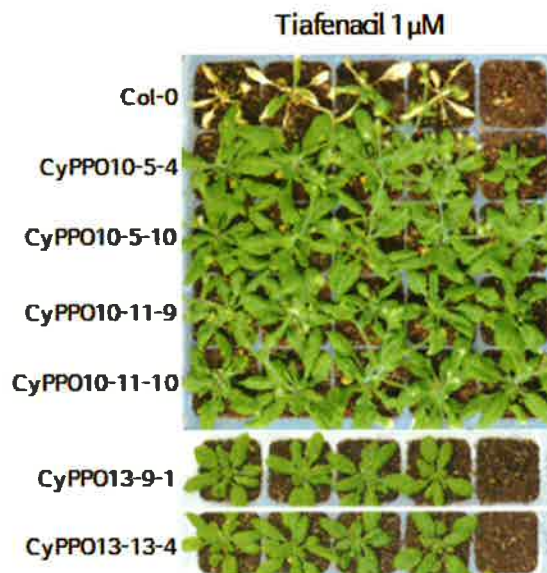


그림 1-15. CyPPO10 및 CyPPO13 original 유전자 형질전환체의 Tiafenacil 저항성 분석

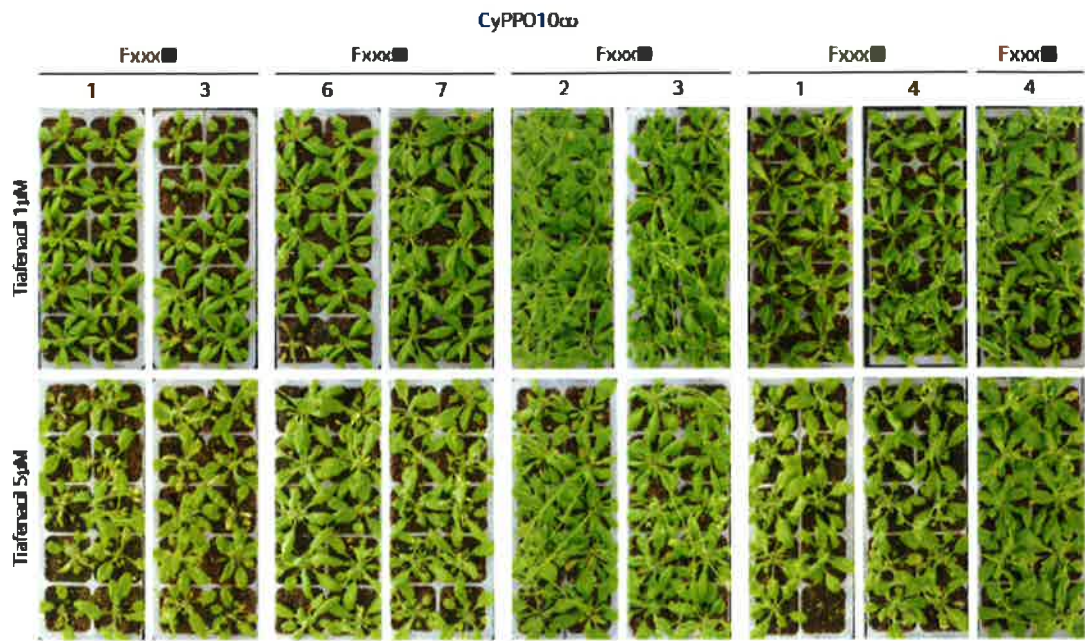


그림 1-16. CyPPO10 단일 아미노산 변이 유전자의 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 확인

다음으로 CyPPO10 및 CyPPO13 아미노산 변이체의 형질전환체에 대한 제초제 저항성을 분석함. CyPPO10 변이체의 형질전환체를 대상으로 Tiafenacil 1uM, 5uM을 처리후 약해를 평가한 결과, 대부분의 line에서 약해를 보이지 않았음(그림 1-16). 해당 아미노산의 변이가 Tiafenacil에 대한 저항성을 증대시킨 것을 의미함.

한편, CyPPO13의 변이체들은 일부 line은 Tiafenacil 5uM에서 약해를 보이지 않았지만, 일부 line은 약해를 나타냄(그림 1-17). 즉, CyPPO13 WT에 비해서는 저항성이 유사하거나 향상된 line들을 확보함. CyPPO10과 CyPPO13 변이체 형질전환체 간에는 CyPPO10 형질전환체가 상대적으로 저항성이 우수한 것으로 확인됨.





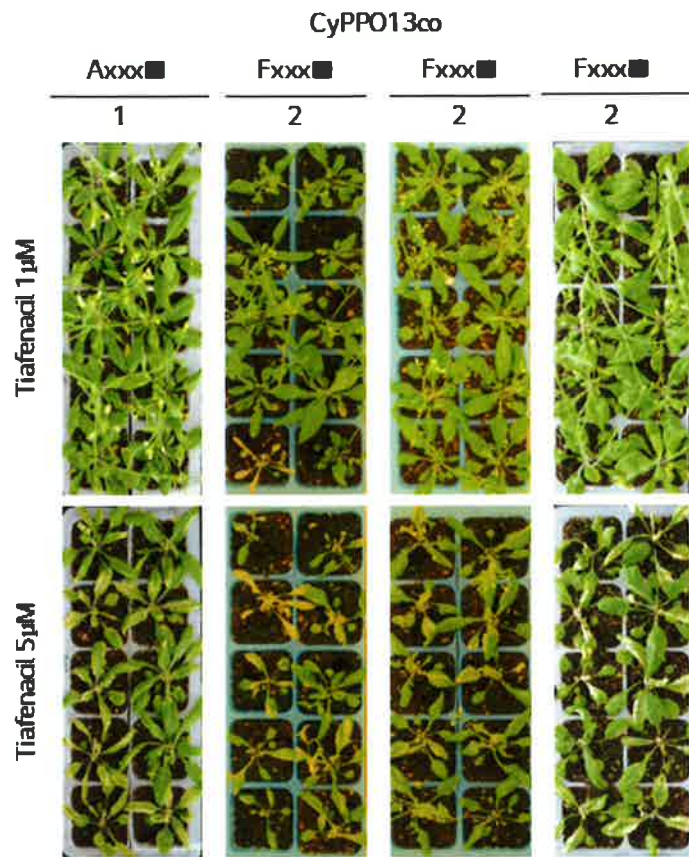


그림 1-17. CyPPO13 단일 아미노산 변이 유전자의 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 확인

CyPPO10 변이체(단일 아미노산 치환)의 일부 형질전환체(single copy, homo line)를 대상으로 고농도 Tiafenacil을 처리하여 저항성을 확인하였음. Tiafenacil 15uM, 30uM을 처리후 약해 정도를 분석한 결과, 일부 line은 Tiafenacil 15~30uM 처리에도 약해를 보이지 않았음. 해당 line은 CyPPO10 WT 대비 15배 이상의 저항성이 증가되었음(그림 1-18).

이러한 저항성 증대는 CyPPO 효소 활성 및 Tiafenacil에 의한 활성 분석(in vitro assay)에서 확인된 것(CyPPO10 WT 대비 최대 17배 증대)과 유사한 수준으로, in vitro에서 확인된 결과가 in vivo(형질전환 애기장대) 에서도 유사한 패턴으로 나타남을 확인하였음.

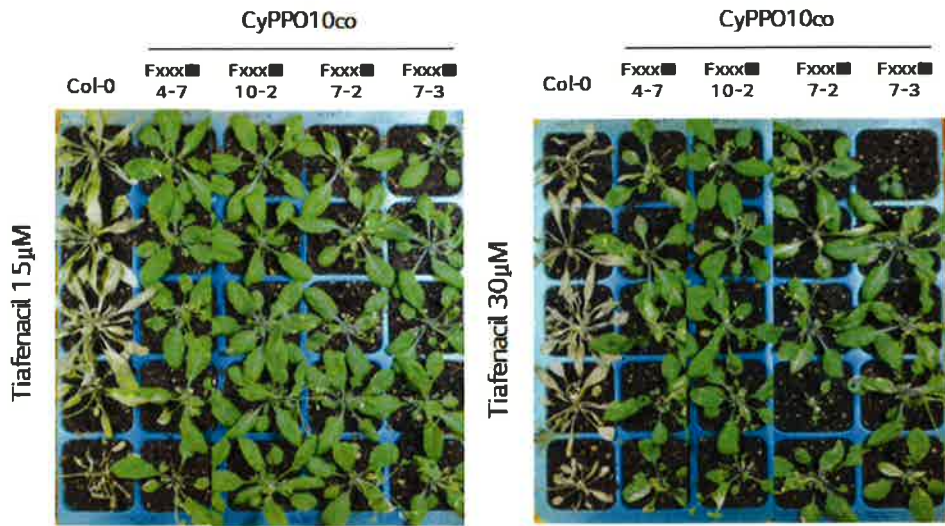


그림 1-18. CyPPO10 단일 아미노산 변이유전자의 형질전환체 애기장대 대상 고농도 Tiafenacil 30 uM 처리 결과

CyPPO10과 CyPPO13의 도입에 의한 저항성 수준을 비교 검증하기 위해, 각 유전자의 sequence 상 대응되는 아미노산 자리를 치환한 변이체 형질전환체(CyPPO2\_Y■, CyPPO4\_Y■, CyPPO8\_F■은 비교군으로 사용)를 대상으로 Tiafenacil 5uM, 25uM, 50uM을 처리함(그림 1-19).

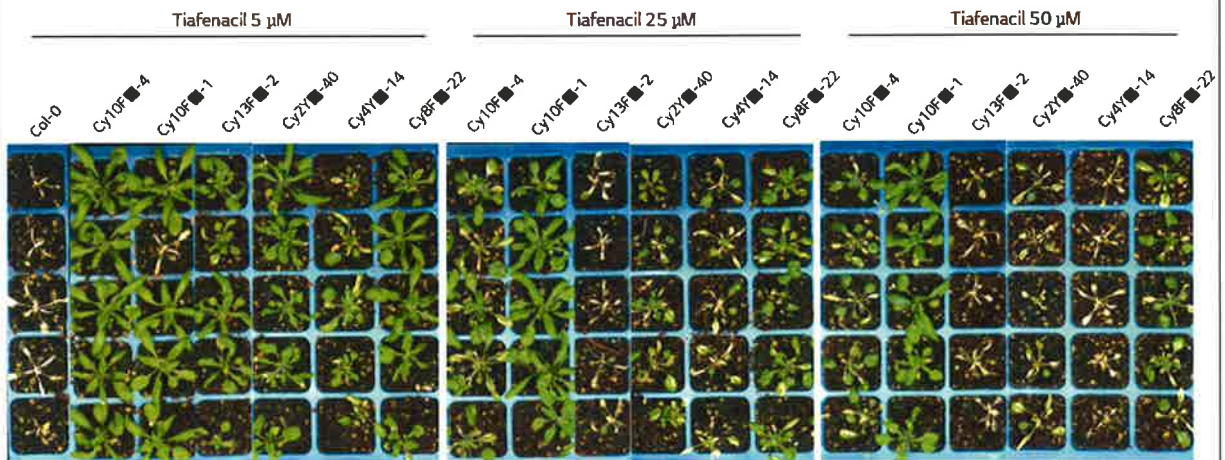


그림 1-19. CyPPO10 및 CyPPO13의 단일 아미노산 변이 유전자의 제초제 저항성 수준 조사.

CyPPO2, CyPPO4, CyPPO8의 대응되는 위치의 아미노산을 치환한 유전자를 형질전환한 애기장대를 비교군으로 사용.



Col-0는 Tiafenacil 처리 후 사멸하였고, Tiafenacil 처리 농도가 높아짐에 따라 형질전환체에서도 약해 정도에 차이를 보임. 즉, CyPPO10\_F■, CyPPO10\_F■는 Tiafenacil 50uM처리 후에도 약해를 거의 받지 않았으며 CyPPO10\_F□가 제초제 저항성이 두드러지는 것으로 확인됨. 반면, CyPPO13\_F■은 Tiafenacil 25uM 처리에도 약해를 보였음. CyPPO2\_Y■, CyPPO4\_Y■, CyPPO8\_F■과 비교할 때, CyPPO10\_F■, CyPPO10\_F□는 CyPPO8\_F■ 이상의 저항성을 보이고, CyPPO13\_F■은 다른 line 보다 저항성이 낮은 것으로 확인됨.

## (2) CyPPO 변이 유전자별 제초제 저항성과 도입 단백질의 발현량 분석

Tiafenacil 처리로 저항성이 확인된 line들을 대상으로 도입유전자 발현량과의 상관관계를 분석하기 위해 도입유전자의 c-term에 있는 HA-tag을 활용하여 Western blot을 수행하였음(그림 1-20).

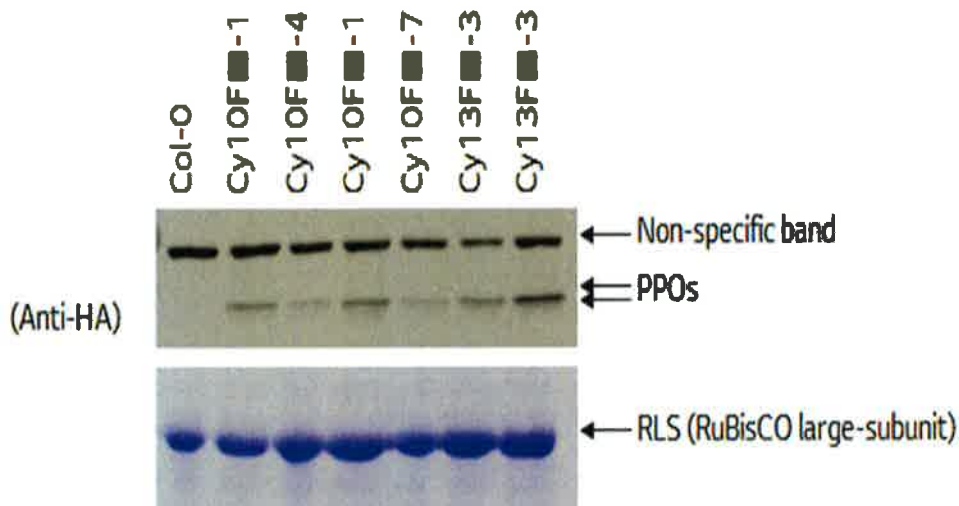


그림 1-20. CyPPO 아미노산 변이 애기장대 형질전환체의 도입 유전자 발현량 분석

형질전환 애기장대에서 Western blot 결과, CyPPO10 유전자 도입 line의 단백질 발현량은 CyPPO13 유전자와 비교할 때, 유사하거나 적게 발현됨에도 불구하고 CyPPO13 유전자 도입 애기장대보다 제초제 저항성이 높게 나타났음(data not shown).

단백질 발현량과 제초제 처리 후에 확인된 저항성과의 연관성은 같은 유전자 내에서는 정비례 하는 것으로 보이나, 다른 유전자 간의 상호 비교에서는 항상 정비례 하지는 않는 것으로 확인됨. 이는 각 유전자가 가지는 고유한 특성으로 인해, 형질전환 식물체 내에 발현되었을 때, PPO 효소의 활성 및 stability 등의 차이로 인해 나타나는 것으로 추정됨.



### (3) CyPPO10 Modified 유전자 대상 제초제 종류별 저항성 수준 조사

PPO계 제초제 중에서 리딩 제초제에 대한 내성 수준을 파악하기 위해 Single copy 유전자가 형질전환된 애기장대 (T3)를 대상으로 5종의 리딩 PPO계 제초제(표1-12)를 고농도로 처리함

표1-12. 리딩 PPO계 제초제 종류

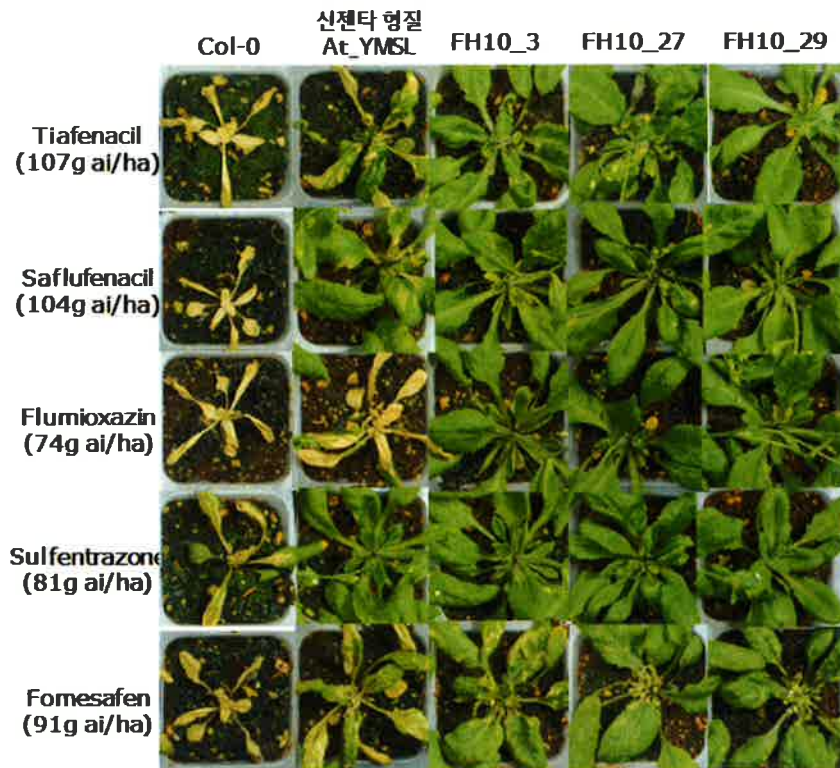
PPO계 제초제	원제사	매출(\$M)	비고
Flumioxazin	Sumitomo	370	콩, 옥수수, 캐놀라 파종 3~12개월 전
Sulfentrazone	FMC	200	옥수수, 캐놀라 파종 10~21개월 전
Saflufenacil	BASF	180	콩, 파종 0.5~1개월 전 처리
Fomesafen	Syngenta	175	복합제, 콩, 옥수수 파종 10개월 전
합계		925	PPO계 제초제 58% 차지

농경지에서 이들 제초제의 권장 약량은 원제(active ingredient) 기준 플미옥사진은 100 g ai/ha 이하, Saflufenacil은 140 g ai/ha 이하, Sulfentrazone 430g ai/ha, Fomesafen은 420g ai/ha 수준이며 Tiafenacil 의 경우 ~100 g ai/ha 정도 임.

한편 식물 종류별로 사멸하는데 요구되는 제초제 종류별로 약량의 차이를 조사한 결과 애기장대에서는 2 g ai/ha, 콩 6~8 g ai/ha, 옥수수 10 g ai/ha, 벼는 60 g ai/ha 이었음.

이 결과를 바탕으로 애기장대에서의 제초제 내성 수준의 정도을 알면 콩, 벼, 옥수수에서의 내성 수준을 평가할 수 있으며 콩, 벼에서 일정한 비례 관계를 확인할 수 있었음.

CyPPO10 Modified 유전자를 형질전환한 애기장대에서 5종의 제초제를 처리한 결과 신젠타에서 개발한 애기장대 PPO1 변이 유전자(At\_YMSL) 대비 내성을 지니는 제초제 종류가 많고 고내성을 확인하였음(신젠타 개발 형질=사프라페나실, 설펜트라존 내성, 팜한농 형질(FH10\_3, FH10\_27, FH10\_29)은 Tiafenacil 뿐만 아니라 리딩 PPO계 제초제 모두에 높은 저항성을 지님을 확인됨(그림1-21).



Injury Index (약해 지수)

구분	Col-0	신젠타 AtYMSL	FH10_3	FH10_27	FH10_29
Tia	5	3	0-1	0-1	0-1
Saflu	5	1	0	0	0
Flumi	5	4-5	0-1	0-1	0-1
Sulfen	4	0	0	0	0
Fome	5	3-4	2	1	1

그림 1-21. CyPPO10 Modified 유전자 성능 평가

Col-0: 야생형 애기장대, MtAt(YMSL): 신젠타 개발형질, FH10-3, FH10-27, FH10\_29: 팜한농 개발 형질

애기장대의 결과를 바탕으로 콩에서의 내성 수준을 감안하면 Tiafenacil 200g, Saflufenacil 300 g, Flumioxazin 200 g, Sulfentrazone 500 g 이상, Fomesafen 500g ai/ha 처리에도 약해가 없을 것으로 예측됨.

이 결과는 다종의 PPO계 제초제를 사용할 수 있고, 농경지의 잡초를 방제하는 약량 이상의 처리에서도 형질전환 작물은 약해가 없어 대규모 재배지에서 잡초 방제의 새로운 솔루션을 제공할 수 있음을 제시함. 또한 적용 제초제의 처리약량이 기존의 glyphosate (1200g ai/ha사용) 보다 훨씬 적게 사용하므로 농경지의 환경 친화적인 약제를 사용하게 하여 환경 부하도 적은 장점을 제공함.



GM 재배지에서 glyphosate 저항성 잡초를 방제하기 위해 작용 기전이 다른 제초제인 Dicamba, 2,4-D 내성 유전자를 stacked 한 종자가 출시되었으나 사용되는 Dicamba나 2,4-D의 이행성 문제가 있어 미국에서는 7개주 이상에서 집단 소송이 진행되고 있음.

따라서 개발된 PPO계제초제 내성 형질은 지금까지 문제점이 있는 것을 해결할 수 있어 인류의 안정적인 식량생산에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단 됨.

#### 마. CyPPO10 변이유전자 도입 작물 형질전환체 제작 및 제초제 내성 검증

당초 과제계획서의 계획대비 조기 달성으로 인해, 3차년도에 추가적으로 작물 형질전환체 제작을 통해 PPO계 제초제 내성 형질의 검증을 시도하고자 하였음. 이를 위해 콩, 유채, 옥수수를 대상작물로 선정하여 계획에 반영하였음. 콩과 옥수수는 1세부에서 형질전환체 제작을 의뢰하는 방식으로 진행하였고, 위탁과제(단백질 구조 연구 --> 유채 형질전환)를로 진행하였음 (단백질 구조연구가 2년차에 완료되어 3년차는 유채 형질전환 연구로 변경).

##### (1) 콩 형질전환체 제작

형질전환 기술이 확립되어 있는 광안콩을 대상으로 동아대학교 정영수 교수팀에 의뢰하여 콩 형질전환체를 제작함. 대상 변이 유전자(CyPPO10-1, CyPPO10-5)는 애기장대에서 PPO계 제초제 고내성이 확인된 변이유전자로 콩에 도입시 제초제 내성 성능을 평가하기 위해 선정함.

<그림 1-22>과 같이 binary 벡터에 CyPPO 변이 유전자를 클로닝하여, Agrobacteria를 이용하여 콩 형질전환체를 제작함

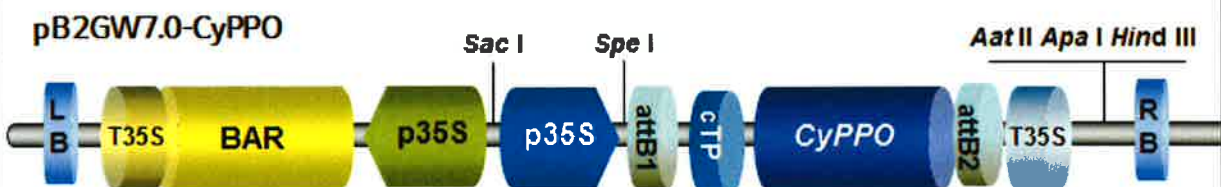


그림 1-22. 콩 형질전환용 벡터

확보된 형질전환체를 대상으로 유전자 삽입 수를 Southern blotting을 통해 확인하였음. <그림 1-23>와 같이, CyPPO10-1의 T1세대 세 라인중 2번 라인에서 single band가 확인되었고, CyPPO10-5의 8번 라인에서 single band가 확인되었음(그림 1-23)



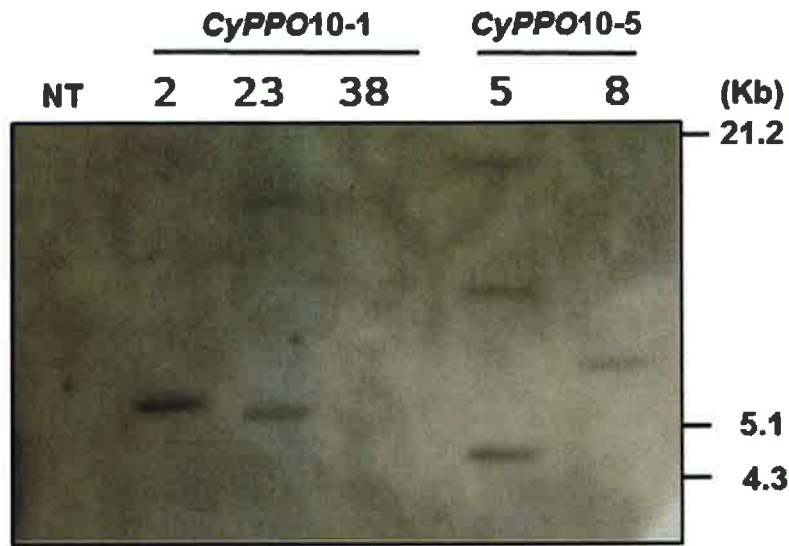


그림 1-23. 콩 형질전환체의 Southern blotting 결과

(2) 콩 형질전환체 대상 제초제 내성 검증

CyPPO10-1의 2번 라인을 대상으로 PPO계 제초제 Tiafenacil 및 Saflufenacil에 대한 내성을 검증하였음. 먼저, Tiafenacil을 각각 25uM, 50uM 처리한 뒤, 5일후에 약해를 관찰하였음.

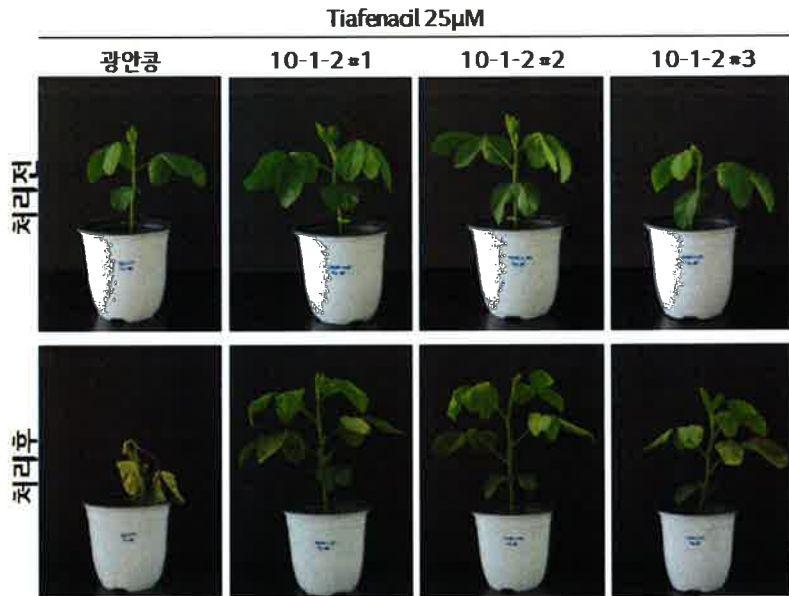


그림 1-24. 콩 형질전환체 Tiafenacil 25uM 내성 검증

Tiafenacil 25uM(53.4 g ai/ha) 처리후 약해 정도를 확인한 결과, 광안콩(wild type, control)은 완전히 고사하는 반면, 형질전환체들은 일부 약해를 보이는 잎들이 있지만 새로 발생한 잎들에서는 전혀 약해를 보이지 않았음(그림 1-24).

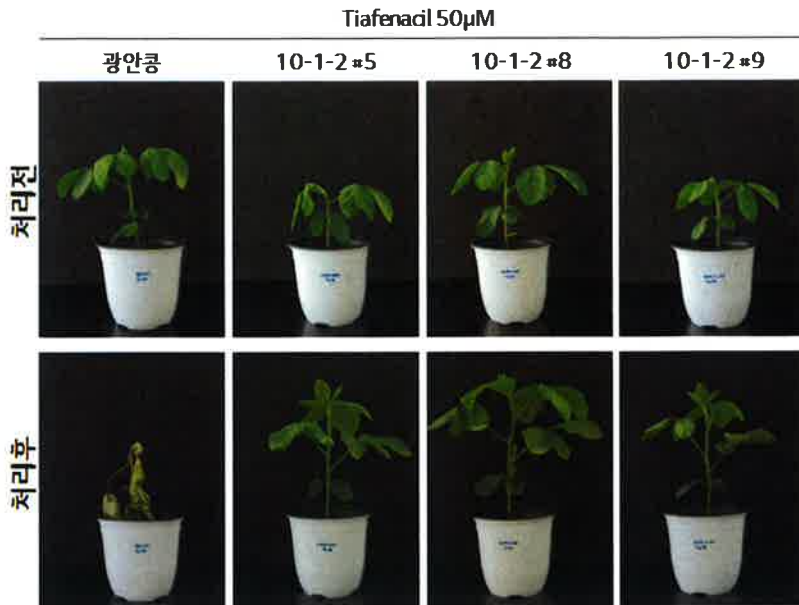


그림 1-25. 콩 형질전환체 Tiafenacil 50 $\mu$ M 내성 검증

마찬가지로, Tiafenacil 50 $\mu$ M (106.7g ai/ha)을 처리한 경우에도 일부 잎을 제외하고는 전혀 약해가 관찰되지 않았음(그림 1-25).

다음으로, Saflufenacil 100 $\mu$ M, 150 $\mu$ M, 300 $\mu$ M을 각각 처리하고, 5일 후 약해를 관찰하였음. Saflufenacil의 경우 Tiafenacil 보다 성능이 낮은 것을 고려하여 보다 높은 농도를 처리하여 형질전환체의 내성 수준을 확인하고자 하였음.

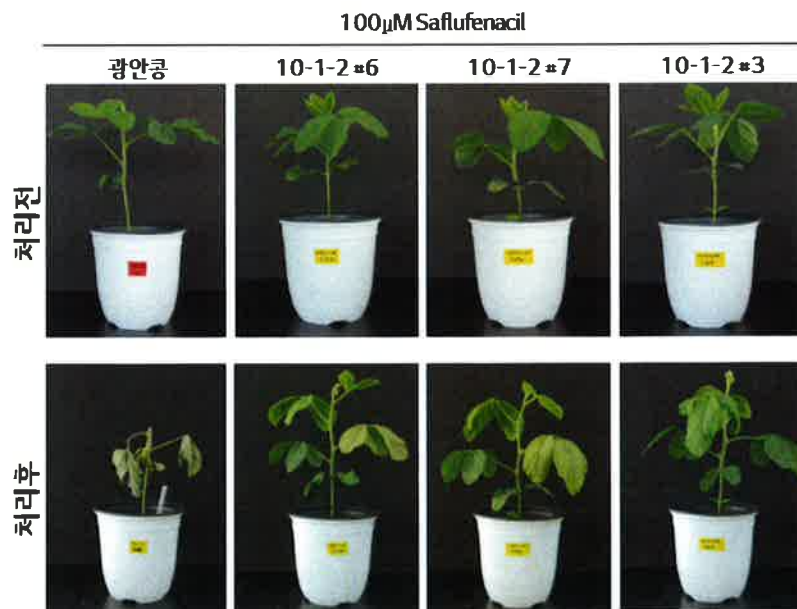


그림 1-26. 콩 형질전환체 Saflufenacil 100 $\mu$ M(208 g ai/ha) 처리 결과



Saflufenacil 100uM (208.8 g ai/ha)을 처리한 경우, 광안콩(wild type, control)은 완전히 사멸하는 반면, 형질전환체들은 아래쪽 일부 잎을 제외하면 약해가 거의 관찰되지 않았음(그림 1-26).

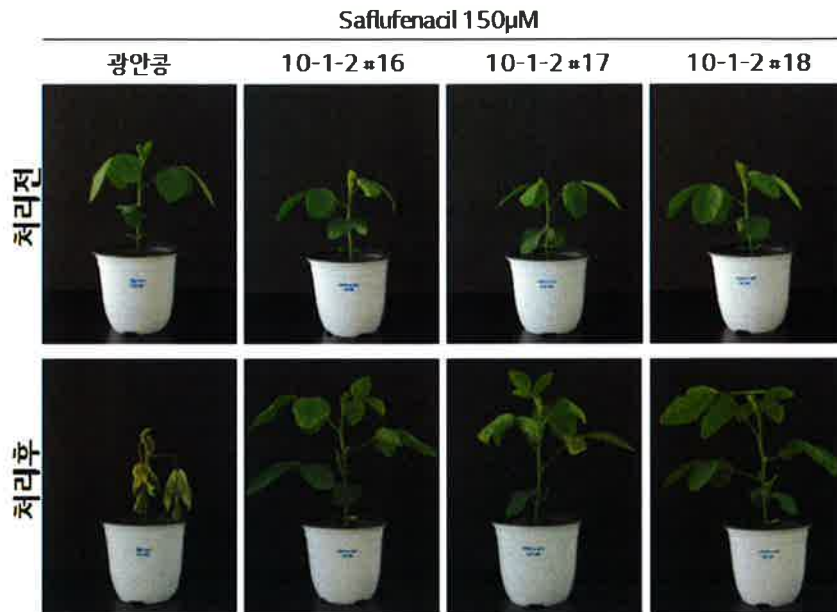


그림 1-27. 콩 형질전환체 Saflufenacil 150uM (314 g ai/ha) 처리 결과

마찬가지로, Saflufenacil 150uM(314.1g ai/ha)을 처리한 경우에도, 새로 발생한 잎들은 전혀 약해를 보이지 않았음(그림 1-27).

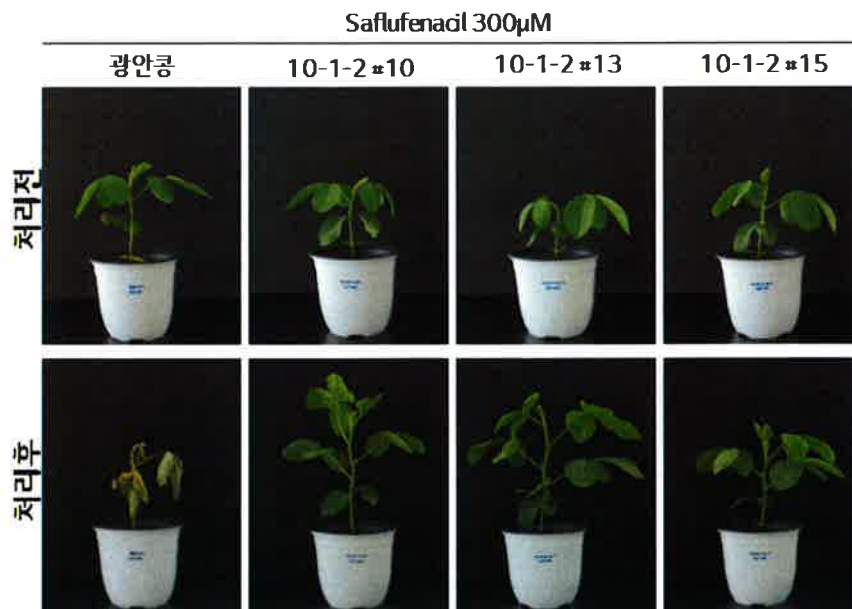


그림 1-28. 콩 형질전환체 Saflufenacil 300uM (628g ai/ha) 처리 결과

또한, Saflufenacil 300uM(628.2g ai/ha)을 처리한 경우에도 일부 잎에서 약해가 관찰될 뿐, 새로 발생한 잎들에서는 전혀 약해를 보이지 않았음(그림 1-28).

이상의 Tiafenacil 및 Saflufenacil 고농도 처리 결과에서, CyPPO10-1 유전자가 도입된 콩 형질전환체에서 상업적 수준의 PPO계 제초제 내성 성능을 확인하였음.

추가적으로, 본 형질전환체가 고농도 제초제 처리 후, 일부 약해를 극복하고 정상생육이 가능한지 확인하기 위해서, 제초제 처리후 한 달간 생육 상태를 관찰하였음

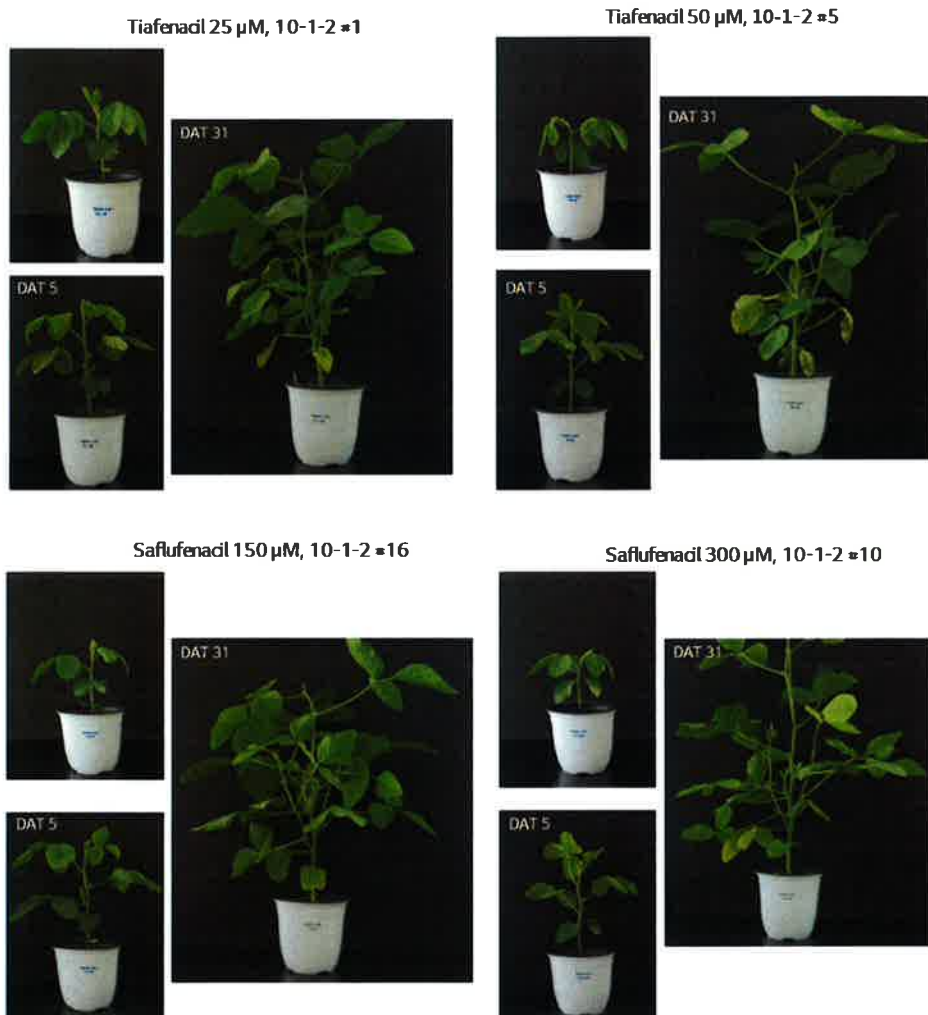


그림 1-29. 콩 형질전환체 Tiafenacil 및 Saflufenacil 처리 후, 생육 상태 관찰

Tiafenacil 25uM, 50uM 및 Saflufenacil 150uM, 300uM을 처리한 뒤, 31일 후에 생육 수준을 관찰한 결과, 제초제 처리시 직접적으로 약해를 받은 잎(각 식물체의 아랫부분)을 제외하고, 나머지 잎들에서는 약해가 전혀 관찰되지 않았고, 정상적으로 생육이 이루어지는 것을 확인하였음(그림 1-29).

이는 CyPPO10-1 유전자가 도입된 콩 형질전환체는 PPO계 제초제에 대해 고내성을 보이는 동시에, 이후 정상적인 생육이 가능함을 보여주는 결과임.

### (3) 옥수수 형질전환체 제작

연차평가의 의견을 반영하여 CyPPO10과 13의 변이 유전자 5종을 대상으로 옥수수 형질전환체를 제작하고자, 미국 미주리대학교에 옥수수 형질전환을 의뢰하였음. 옥수수 형질전환이 기간이 많이 소요되는 작업인 관계로 2018년 6월 경 종자를 확보할 수 있을 것으로 예상되며, 그 이후 제초제 내성 성능을 평가할 계획임.

#### • 옥수수 형질전환 벡터 제작

- 애기장대와 벼 형질전환체에서 제초제 저항성이 검증된 Single ~ Triple 아미노산modified CyPPO10, CyPPO13 유전자 5종에 대한 옥수수 형질전환용 벡터를 제작하였음 (그림 1-30).

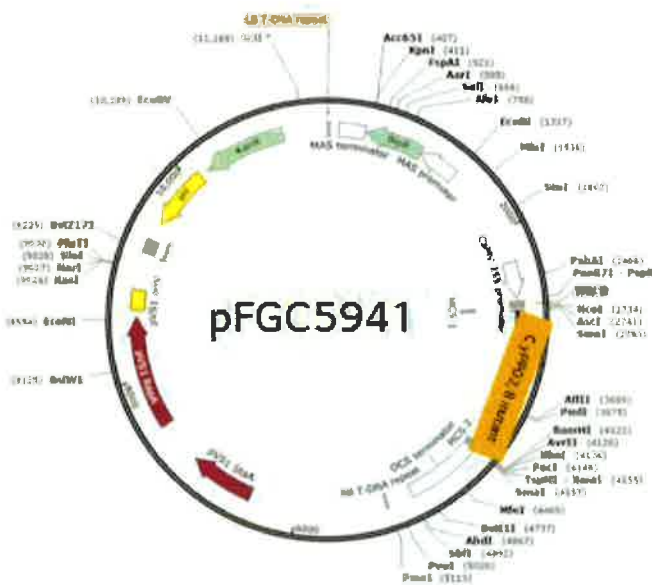


그림 1-30. CyPPO10, CyPPO13 변이체 옥수수 형질전환 벡터

- 옥수수 형질전환 벡터의 back bone은 pFGC5941로 CaMV 35S Promoter와 OCS terminator로 CyPPO 유전자가 발현되며, 선발마커는 BAR 유전자로 제초제인 PPT로 선발됨. Chloroplast에 타게팅 하기 위해 애기장대와, 벼, 콩에서 검증된 애기장대 PPO1의 Chloroplast transit peptide를 N-terminus에 연결하였음.

#### • PPO계 제초제 고내성 유전자의 옥수수 형질전환용 벡터 제작 및 성능 검증

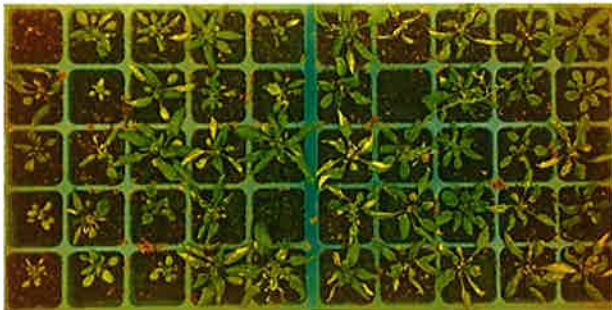
- 옥수수 형질전환 벡터 이용 애기장대 형질전환체 제작 및 제초제 저항성 테스트
- 옥수수 형질전환을 위해 pFGC5941 벡터에 CyPPO10 변이체 4종 (FH4, FH5, FH6, FH7), CyPPO13 변이체 1종 (FH8)을 클로닝함. 제작된 벡터는 미주리 대학에 옥수수 형질전환 용

역 의뢰하였음.

- 한편 제작된 벡터가 식물에서 정상적으로 작동함과 제초제 저항성 부여함을 확인하기 위해 애기장대 형질전환체를 제작하고 PPT selection 한 뒤, 1uM Tiafenacil 저항성을 테스트 함.

- 5종 변이체 유전자의 애기장대 형질전환체는 모두 1uM Tiafenacil 저항성을 보이는 라인 들이 있음을 확인함 (그림 1-31). 따라서, 제작된 pFGC5941 벡터가 애기장대에서 정상적으로 PPT, Tiafenacil 저항성 부여함을 확인하였고, 동일한 벡터를 이용해 옥수수 형질전환에 이용 시 옥수수에 정상적으로 PPT, Tiafenacil 저항성을 부여할 가능성을 확인함.

① FH4 형질전환체



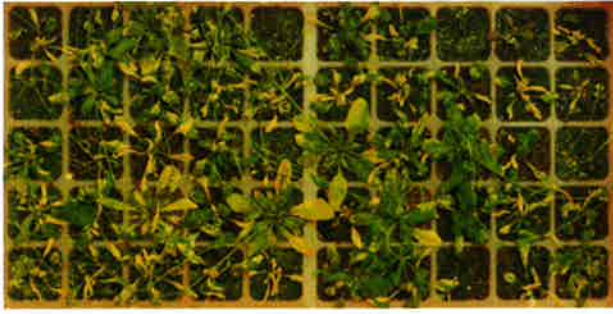
② FH5 형질전환체



③ FH6 형질전환체



④ FH7 형질전환체



⑤ FH8 형질전환체

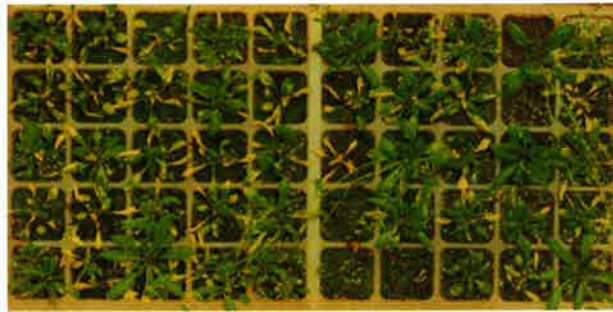


그림 1-31. CyPPO10 변이체 (FH4, FH5, FH6, FH7), CyPPO13 변이체 (FH8)의 옥수수 형질전환 벡터의 애기장대 발현 검증

사. CyPPO 단백질의 알러지 motif 조사

Genes	Length	AllergenOnline Databasev15 (January 12, 2015)			
		80 mer Sliding Window Search		8 mer Exact Match	
		No. of 80 mers	No. of Sequences with hits (Greater than 35% Identity)	No. of 8 mers	No. of Sequences with an exact 8mer match
CyPPO1		387	0	459	0
CyPPO2		407	0	479	0
CyPPO3		396	0	468	0
CyPPO4		400	0	472	0
CyPPO5		404	0	476	0
CyPPO6		405	0	477	0
CyPPO7		382	2*	454	0
CyPPO8		387	0	459	0
CyPPO9		423	0	495	0
CyPPO10		388	0	460	0
CyPPO11		419	0	491	0
CyPPO12		407	0	479	0
CyPPO13		406	0	478	0
CyPPO14		403	0	475	0
CyPPO15		400	0	472	0
AtPPO.DM. Syngenta	537	458	0	530	0
Amarantus DM. BASF	533	454	0	526	0

그림 1-32. CyPPO 15종단백질에 대한 알러지 motif 분석

제초제 저항성 형질의 사업화는 곧 작물에 도입하여 그 생산물을 이용하는 것이기 때문에 도입 단백질의 안전성을 평가하기 위해 남세균 15종에서 확보한 CyPPO 단백질 서열을 기준으로 현재까지 알려진 알러지 motif가 포함되어 있는지를 AllergenOnline database를 활용하여 검색함. 비교군으로 애기장대 PPO(AtPPO1)와 Amaranthus PPO DM(double mutant, from BASF)의 단백질 서열을 사용함.

CyPPO 15종류와 AtPPO1, Amaranthus PPO DM 모두 현재 알려진 알러지 motif는 검색되지 않는 것으로 확인됨(그림 1-32).

### 아. CyPPO 단백질 안전성 분석

개발된 CyPPO 변이 유전자를 작물에 도입하여 활용하기 위해서는 도입된 단백질의 안전성을 확보하는 것이 필요하기 때문에, 단백질 자체의 열안정성, 인공위액 및 인공장액에서의 소화성, 아급성 경구독성 실험을 진행함.

#### (1) CyPPO 변이체 단백질의 열안정성 분석

CyPPO10-6 및 CyPPO13-4 변이 단백질의 열안정성을 분석하기 위해 약 2 µg의 정제된 CyPPO10-6 단백질을 20 mM Tris-HCl, and 5 mM EDTA, pH 8.5. 버퍼에 녹인 working solution을 준비함.

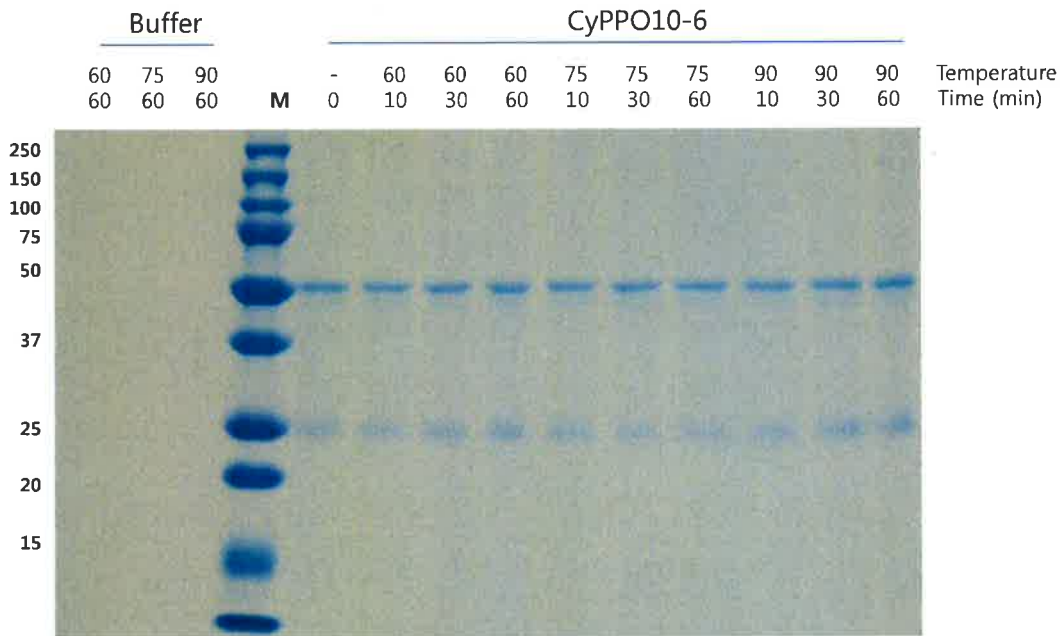


그림 1-33. CyPPO10-6 변이 단백질의 열안정성 분석

Aliquots을 60, 75, 90도에서 10, 30, 60분간 가열하고, 얼음에서 즉시 냉각 후 SDS-PAGE 분석으로 단백질의 변성을 확인함. Buffer (control)에서는 단백질 band가 전혀



확인되지 않았고, 처리군에서 약 50 kDa의 CyPPO10-6 단백질은 겔에서 뚜렷이 확인되며, CyPPO10-6 단백질은 90도에서 60분 처리에도 전혀 열에 의한 영향이 없음을 확인함(그림 1-33).

또한 CyPPO13-4 변이 단백질 역시 90도에서 60분 처리에도 전혀 열에 의한 영향이 없음을 확인함(그림 1-34).

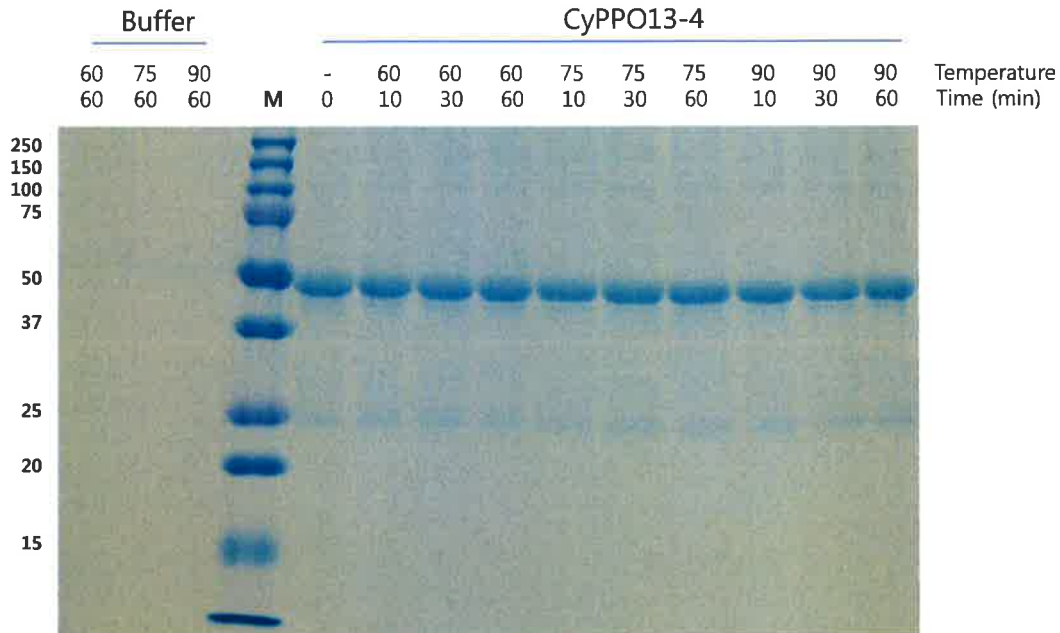


그림 1-34. CyPPO13-4 변이 단백질의 열안정성 분석

## (2) CyPPO 변이체 단백질의 인공 위액 소화성 분석

CyPPO10-6 및 CyPPO13-4 변이 단백질 1 ug 당 약 10 U의 pepsin (Sigma)을 37도에서 활성화시켜 인공위액(미국약전 기준)을 준비하고, 각 단백질(0.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 인공위액에 첨가한 후 37도에서 반응시킴.

0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60 분의 간격으로 100 uL 씩 prep 하여 35  $\mu\text{L}$ 의 700mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 11 과 35  $\mu\text{L}$ 의 2 $\times$ Laemmli buffer를 첨가한 뒤, 75도에서 약 10분간 열처리 한 후 SDS-PAGE를 전개하여 인공위액에서 반응시킨 각 단백질의 분해정도를 확인함.

인공위액을 첨가하지 않은 샘플(오른쪽 끝)의 CyPPO10-6 단백질은 60분간 반응을 해도 분해되지 않는 반면, 인공위액 처리 5분이 지나면 모든 CyPPO10-6 변이 단백질이 분해되는 것으로 확인됨(그림 1-35).



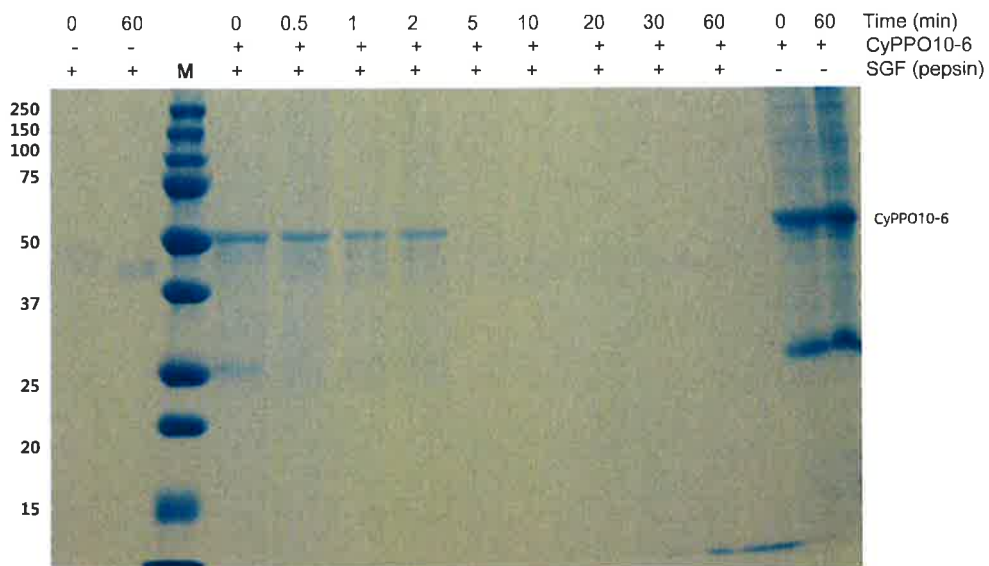


그림 1-35. CyPPO10-6 변이 단백질의 인공위액 소화성 분석

마찬가지로, CyPPO13-4 변이 단백질도 5분 이내에 모두 분해되는 것을 확인함(그림 1-36).

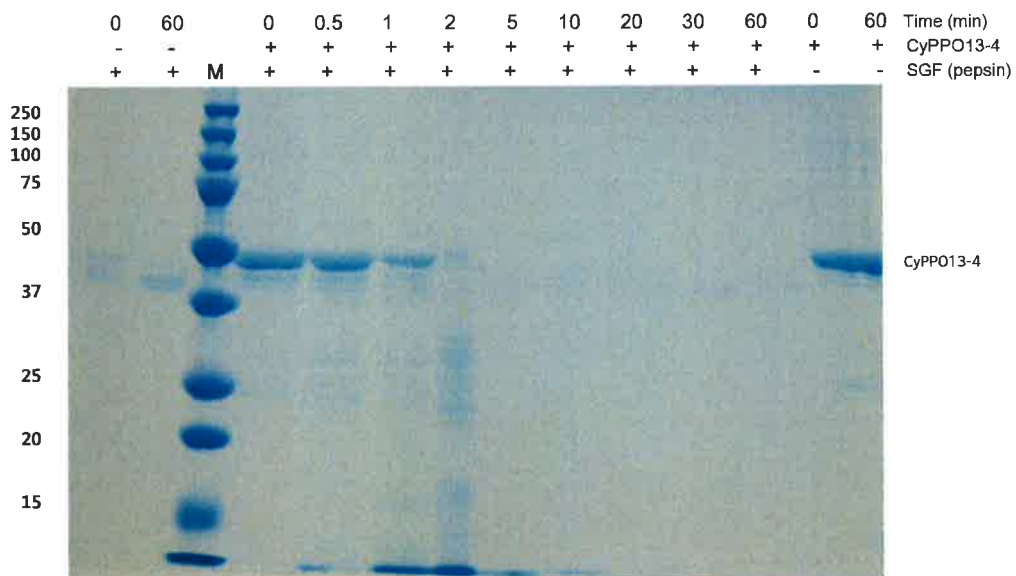


그림 1-36. CyPPO13-4 변이 단백질의 인공위액 소화성 분석

### (3) CyPPO 변이체 단백질의 인공 장액 소화성 분석

인공 장액은 미국약전 기준에 따라 2.5 mg/mL pancreatin을 포함하는 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5로 제조하여 37도에서 활성화시킨 후, CyPPO10-6 및 CyPPO13-4 단백질량의 1/10을 첨가하여 37도에서 반응시킴.

0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60 분의 간격으로 100 µl씩 aliquot 한 후, 2×Laemmli buffer를





첨가하고 100도에서 10분간 가열한 뒤, SDS-PAGE 분석을 수행함.

<그림 1-37>와 같이 CyPPO10-6 변이 단백질은 인공장액에서 약 5분 후 완전 분해됨을 확인함.

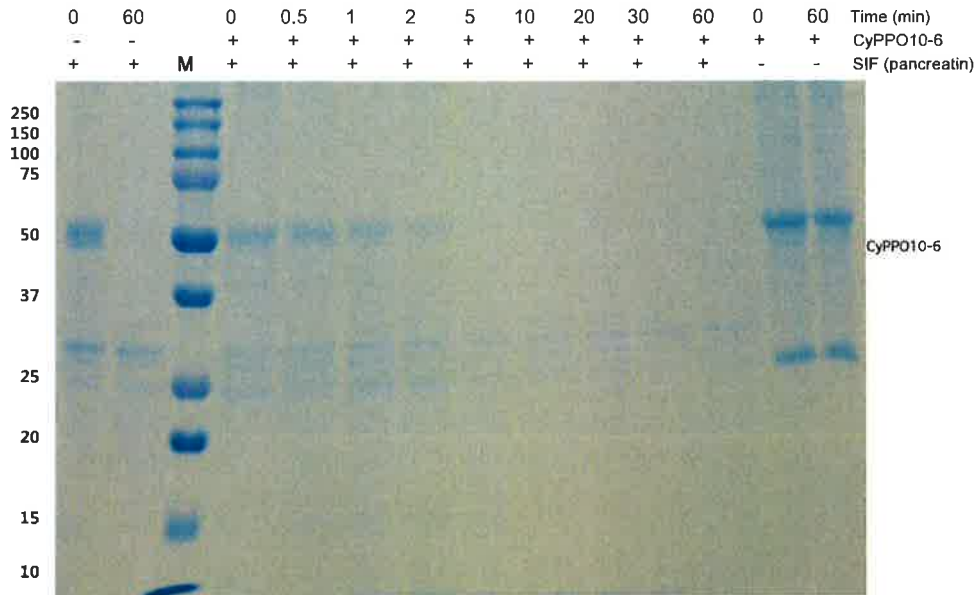


그림 1-37. CyPPO10-6 변이 단백질의 인공장액 소화성 분석

또한, CyPPO13-4 단백질의 경우에도, 10분 후 모두 분해되는 것을 확인함(그림 1-38).

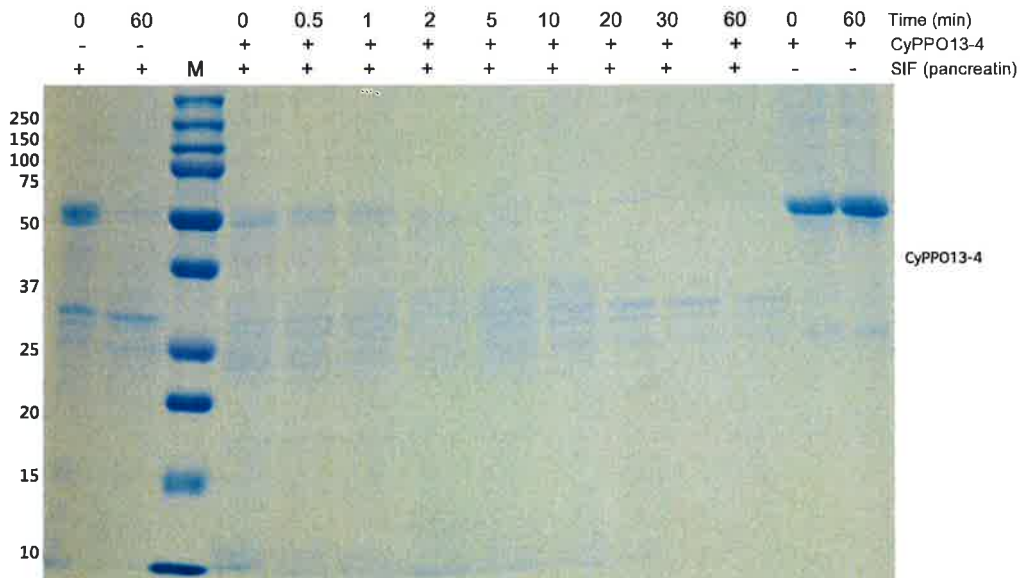


그림 1-38. CyPPO13-4 변이 단백질의 인공장액 소화성 분석



**(4) CyPPO 변이체 단백질의 아급성 경구독성 실험**

CyPPO 변이 단백질의 아급성 경구독성을 검증하기 위해서, 대장균에서 발현하여 정제된 FH10\_3 (CyPPO10-3의 팜한농 형질 일련번호) 및 FH13\_15 (CyPPO13-15) 변이단백질을 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(GLP인증기관)에 시험을 의뢰하였고, 전혀 무해하다는 결과를 얻었음 (그림 1-39).

<p><b>FH10_3</b> : Acute Oral Toxicity Study in ICR Mice      KIT Study No. : G217013</p> <p><b>FH10_3</b> : Acute Oral Toxicity Study in ICR Mice</p> <p style="text-align: center;"><b>SUMMARY</b></p> <p>To investigate the acute toxicity of the test item, <b>FH10_3</b> was administered orally at dose levels of 300, 300, 2000 and 2000 mg/kg by the stepwise procedure to female ICR mice. Three rats were used for each test step. Mortality, clinical signs and body weight changes were monitored for 15 days following administration in each test step. Macroscopic observations were conducted at necropsy. The results are summarized as follows:</p> <p>The results are summarized as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) There were no dead animals during the study period.</li> <li>(2) No test item-related clinical signs were observed during the study period.</li> <li>(3) No test item-related body weight changes were observed during the study period.</li> <li>(4) In macroscopic observations, no test item-related gross findings were observed.</li> </ol> <p>On the basis of the results above, there were no treatment-related findings on mortality, clinical signs, body weight changes or macroscopic observations. Therefore, it was concluded that the LD<sub>50</sub> value of <b>FH10_3</b> for female ICR mice is greater than 2000 mg/kg body weight and is ranked as a Category 5 (2000 mg/kg &lt; LD<sub>50</sub> ≤5000 mg/kg) or Unclassified substance, according to the Globally Harmonized System (GHS)<sup>1)</sup> for the classification of chemicals which cause acute toxicity.</p>	<p><b>FH13_15</b> : Acute Oral Toxicity Study in ICR Mice      KIT Study No. : G217012</p> <p><b>FH13_15</b> : Acute Oral Toxicity Study in ICR Mice</p> <p style="text-align: center;"><b>SUMMARY</b></p> <p>To investigate the acute toxicity of the test item, <b>FH13_15</b> was administered orally at dose levels of 300, 300, 2000 and 2000 mg/kg by the stepwise procedure to female ICR mice. Three rats were used for each test step. Mortality, clinical signs and body weight changes were monitored for 15 days following administration in each test step. Macroscopic observations were conducted at necropsy. The results are summarized as follows:</p> <p>The results are summarized as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) There were no dead animals during the study period.</li> <li>(2) No test item-related clinical signs were observed during the study period.</li> <li>(3) No test item-related body weight changes were observed during the study period.</li> <li>(4) In macroscopic observations, no test item-related gross findings were observed.</li> </ol> <p>On the basis of the results above, there were no treatment-related findings on mortality, clinical signs, body weight changes or macroscopic observations. Therefore, it was concluded that the LD<sub>50</sub> value of <b>FH13_15</b> for female ICR mice is greater than 2000 mg/kg body weight and is ranked as a Category 5 (2000 mg/kg &lt; LD<sub>50</sub> ≤5000 mg/kg) or Unclassified substance, according to the Globally Harmonized System (GHS)<sup>1)</sup> for the classification of chemicals which cause acute toxicity.</p>
--	--

그림 1-39. CyPPO 변이 단백질의 아급성 경구독성 시험 결과

이상의 CyPPO 변이 단백질을 대상으로 한 앨리지 유발 motif 분석, 열안정성, 소화성, 경구독성 시험 결과는 모두 해당 단백질이 안전함을 증명하고 있으며, 이는 개발된 CyPPO 변이 유전자가 작물에 도입되어도 안전성에 문제가 없다는 것을 제시함.

**자. Tiafenacil의 photodynamic herbicide 기전 연구-Tiafenacil의 PPO targeting 확인**

Tiafenacil이 신규 PPO 계 제초제인 만큼, Tiafenacil 처리시 잎에 침투되어 PPO의 활성을 억제함으로써 나타나는 기전에 대한 연구를 통해 Tiafenacil이 PPO를 특이적으로 targeting 함을 증명하는 기술 자료가 필요하기 때문에 기존에 보고된 연구논문 가운데 제초제에 의한 PPO 활성 억제를 분석한 실험방법(Witkowski and Halling, 1989)을 차용하여 분석법을 구축하였음.

완두 잎에서 분리된 엽록체에 tetrapyrrole pathway 상의 PPO 효소 상위에 있는 전구체인 ALA(5-aminolevulinic acid)를 넣고 반응을 시키면 Tiafenacil이 처리된 엽록체는 PPO의 활성이 억제되어 Protoporphyrin IX (Proto) 및 Mg-Protoporphyrin IX (Mg-Proto)의 생성량이 줄어들게 되고, Proto와 Mg-Proto의 양을 spectrofluorometer로 특정 파장에서 분석함으로써 정량 분석할 수 있음 (그림 1-40).

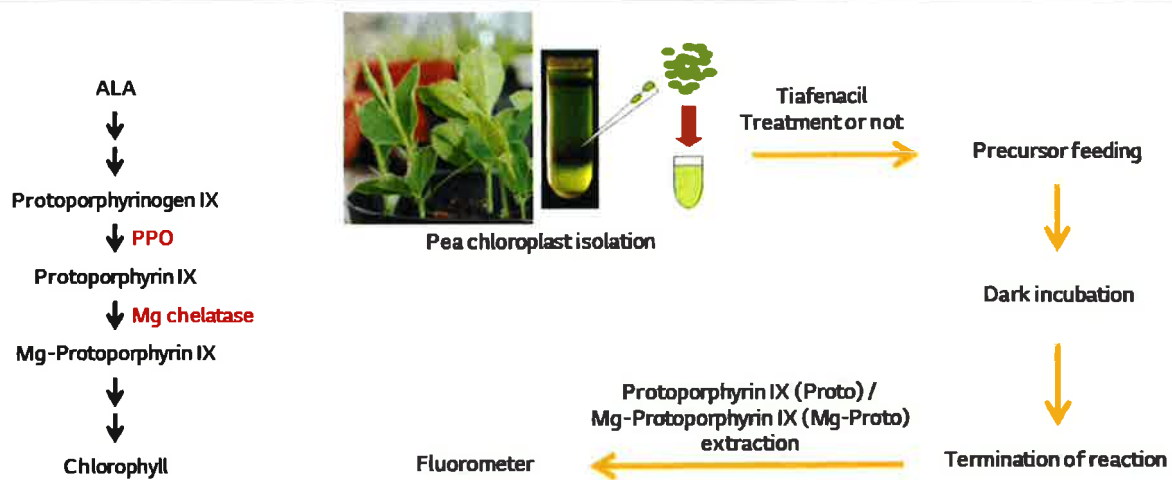


그림 1-40. Tetrapyrrole pathway 상의 주요 반응 단계(왼쪽) 및 Proto 생성 억제 실험 모식도(오른쪽)

먼저, 분석 조건을 확립하기 위해 반응시간에 따른 Proto 및 Mg-Proto 생성 패턴을 분석함. <그림 1-41>와 같이, ALA를 첨가한 샘플에서 반응 시간이 길어짐에 따라 Proto 및 Mg-Proto의 생성량이 증대되는 것을 확인함.

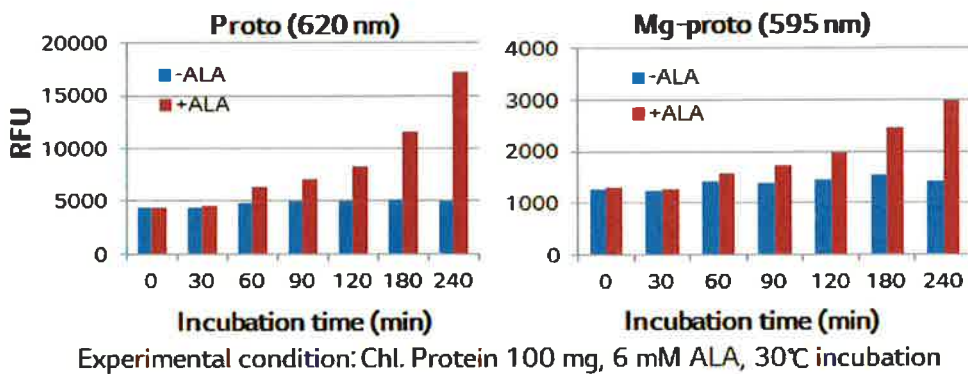


그림 1-41. 반응시간에 따른 Proto / Mg-Proto 생성량

또한, 엽록체에 처리할 tiafenacil의 농도를 결정하기 위해 0부터 1000 nM까지 10배씩 희석하여 처리 후, Proto 및 Mg-Proto 생성 억제 효율을 확인함. <그림 1-42>와 같이 100 nM과 1000 nM 농도에서 생성량이 확연히 감소되었음.

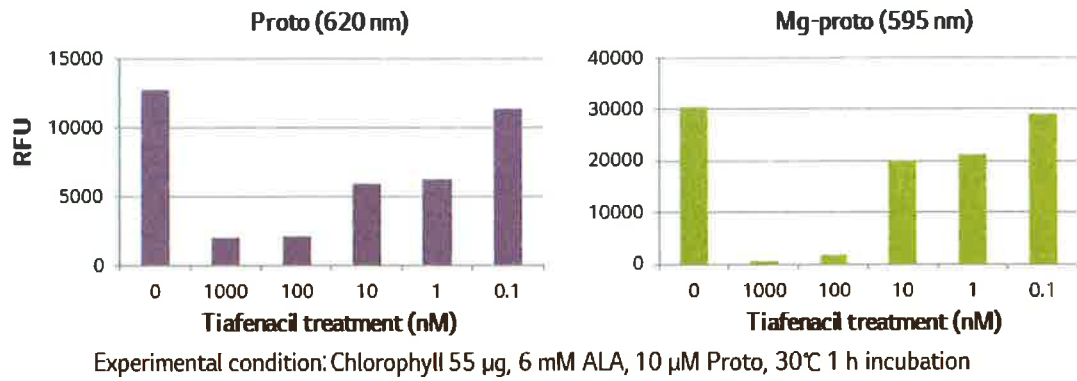


그림 1-42. Tiafenacil 농도에 따른 Proto / Mg-Proto 생성 억제

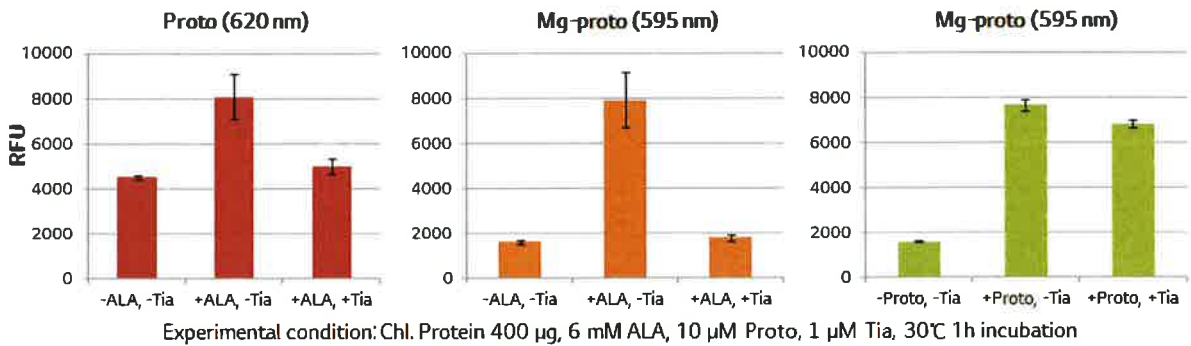


그림 1-43. Tiafenacil에 의한 Proto(왼쪽) / Mg-Proto(가운데) 생성 억제 및 Mg-chelatase에 대한 반응(오른쪽)

확립된 조건을 적용하여, Tiafenacil에 의한 PPO 활성 억제 여부를 분석하였음. <그림 1-43>에서와 같이, Tiafenacil을 처리한 샘플에서 Proto 및 Mg-Proto의 생성량이 거의 억제됨. 반면에 Mg-chelatase가 Proto를 Mg-Proto로 변환하는 반응은 거의 억제되지 않는 것을 확인함.

PPO계 제초제가 PPO의 활성을 억제하게 되면, 엽록체 내에 protoporphyrinogen IX이 축적되고 세포질 쪽으로 빠져나오게 되며, 세포질에서 protoporphyrinogen IX이 빛에 의해 protoporphyrin IX으로 산화되고 이와 함께 singlet oxygen이 방출되어 세포내 membrane 구조를 파괴하는 것으로 알려져 있기 때문에, 실제로 PPO계 제초제를 처리하였을 때, 조직내에 protoporphyrin IX 함량이 증가하는지를 확인함.

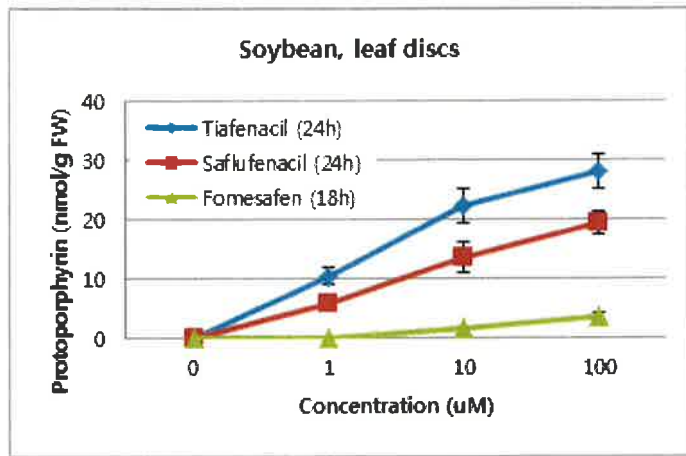


그림 1-44. 제초제 처리후 protoporphyrin 축적량 비교

<그림 1-44>에서처럼 Tiafenacil, Saflufenacil, Fomensafen을 각각 0, 1, 10, 100uM 농도로 처리하고 24시간까지 암처리를 한 경우, 모든 샘플에서 protoporphyrin IX의 함량이 증가하는 것을 확인하였고, 이는 각 제초제의 처리농도에 비례하는 것으로 확인됨.

또한, Tiafenacil이 다른 두 제초제에 비해서 protoporphyrin IX를 더 많이 축적시키는 것으로 볼 때, Tiafenacil의 성능이 다른 두 제초제에 비해 우수함을 알 수 있음.

제초제 처리 후 축적된 protoporphyrin IX이 membrane을 파괴하는 것을 엽록체의 형광 수준 변화와 membrane 파괴시 나오는 물질 (malondialdehyde, MDA)을 분석하여 확인하였음.

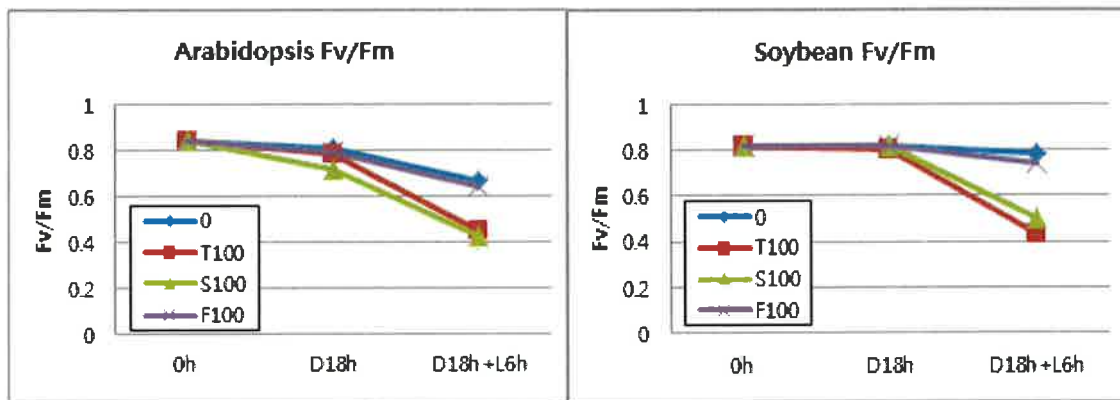


그림 1-45. 제초제 처리 후, 약해에 의한 엽록체 형광 수준 변화

T100: Tiafenacil 100 uM, S100: Saflufenacil 100 uM, F100: Fomesafen 100 uM, D18h: dark incubation 18h, L6h: light incubation 6h

애기장대와 콩에서 PPO계 제초제를 처리한 이후에, 엽록체의 형광 수준이 급격히 낮아짐을 알 수 있고, 이는 protoporphyrin IX에 의한 세포 damage 때문으로 볼 수



있음(그림 1-45).

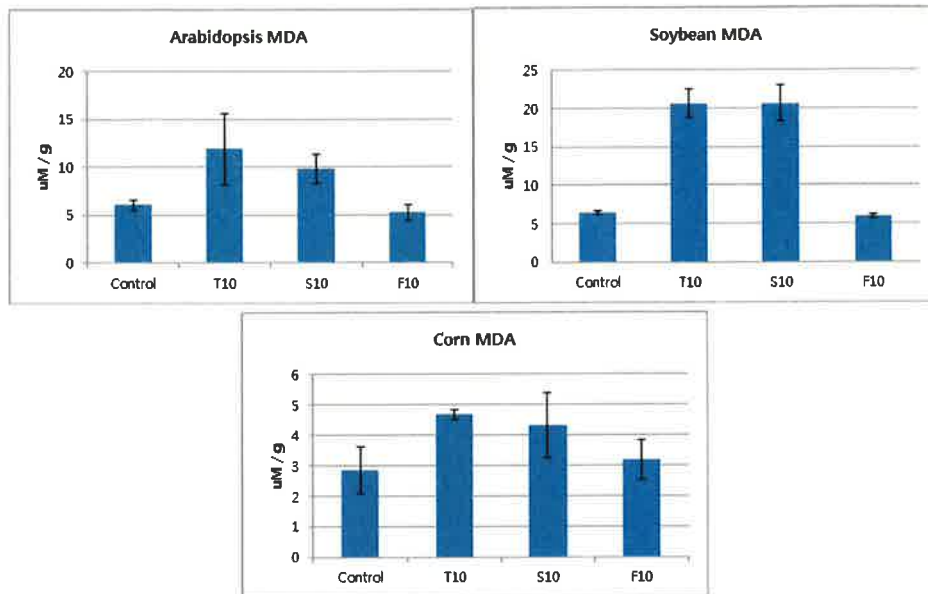


그림 1-46. 제초제 처리 후, MDA(malondialdehyde) 생성량 비교  
T10: Tiafenacil 10uM, S10: Saflufenacil 10uM, F10: Fomesafen 10uM

또한, 각 제초제를 처리한 샘플에서 MDA의 함량이 증대되며, 특히 Tiafenacil을 처리한 샘플에서 가장 많은 MDA가 측정된 것으로 볼 때, Tiafenacil의 우수한 성능을 확인할 수 있음(그림 1-46).

본 결과들은 Tiafenacil이 PPO를 특이적으로 targeting하여 효소 활성을 억제하는 것을 보여주며, 앞에서 PPO가 억제되었을 때 Protoporphyrinogen IX가 축적되어 엽록체 밖으로 유출되어 Photodynamic damage를 일으키는 전형적인 PPO 계 제초제의 활성 기작을 따르는 것으로 보임.

본 결과들을 종합하여 Tiafenacil 작용기전을 주제로 논문 투고 중에 있음 (2018년 3월 submission 예정, *Pesticide Biochemistry and Physiology*)



## 제 2 절 Protoporphyrinogen IX oxidase 단백질 구조 연구

(1위탁, 연구기간 : 1-2차년도)

### 가. 남세균 PPO 단백질 발현 및 순수분리 정제

PPO 단백질은 3개의 도메인으로 구성되어 있는데 (FAD binding domain, substrate binding domain, membrane binding domain) 그중에서 membrane binding domain은 다수의 소수성 잔기들로 구성되어 있어서 단백질 발현 및 정제에 있어서 soluble한 단백질을 얻기가 어렵고, 단백질 결정을 획득하는데 어려움.

따라서 남세균 PPO 단백질의 membrane binding domain을 분석하여 소수성 잔기들을 친수성 잔기로 돌연변이를 통해 soluble 형태의 남세균 PPO 단백질 발현 및 순수분리 정제 조건을 확립함.

정상적으로 발현된 3종의 남세균 PPO 단백질(CyPPO2, 8, 10)을 affinity chromatography, ion chromatography, size-exclusion chromatography을 통해서 순수분리 정제하였음.

#### (1) CyPPO2 단백질 발현 및 순수분리 정제

수용성 CyPPO2 단백질을 얻기 위해서 membrane binding domain 의 소수성 잔기들을 친수성 잔기로 돌연변이를 수행하였음. Membrane binding domain 부위 중에서 7곳을 mutation 실시한 CyPPO2 단백질을 cell 8L 로부터 6mg 의 단백질을 순수 분리하였음 (그림 2-1).

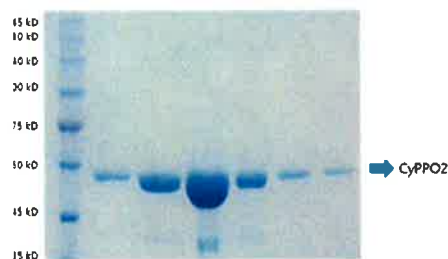


그림 2-1. 순수 분리된 CyPPO2 단백질

#### (2) CyPPO8 단백질 발현 및 순수분리 정제

CyPPO8 유전자 클로닝 및 박테리아 발현 시스템을 이용한 정상 발현 시스템 확보. Affinity tag을 사용하여 타겟 남세균 유전자인 CyPPO8 유전자를 발현하였으며, 이 단백질의 효과적인 결정화를 위해서 insoluble하여 membrane에 결합하는 부위 residue에 돌연변이를 만듦으로써 soluble한 단백질을 얻었음. CyPPO8 단백질을 pET29b vector, rosetta cell, 0.25mM IPTG, 15 °C 조건 아래 발현시킴. 20mg의 순수 분리된 CyPPO8



단백질을 확보함 (그림 2-2).

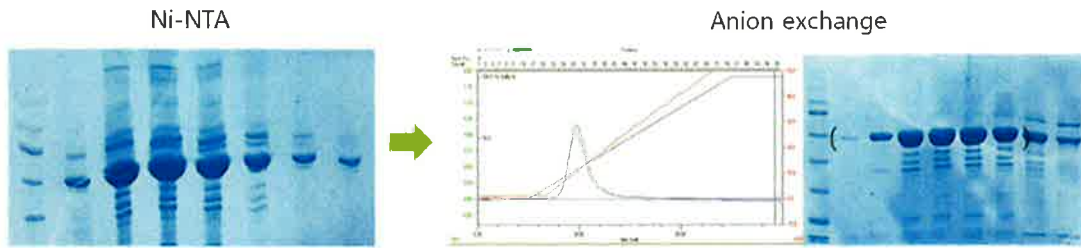


그림 2-2. 순수 분리된 CyPPO8 단백질

정상적으로 발현된 PPO 단백질들은 affinity column과 anion exchange column을 통해서 순수분리정제 하였음. 남세균 PPO 단백질들은 membrane에 붙어 작용하는 membrane 단백질로서 soluble상태의 발현이 안 됨. 이 insolubility를 해결하기 위해서 다양한 non-ionic detergent들이 다양한 농도에서 탐색하였음. 초기 발현시 detergent의 첨가 및 중간의 분리정제과정에서 detergent를 제거해서 최종으로는 결정화를 저해할 수 있는 detergent를 제거하는 연구를 수행하였음.

초기에 PPO 유전자에 돌연변이 없이 발현 및 순수분리정제에 성공하였지만 이들 단백질로부터는 결정화를 이루지 못했음. 단백질이 insoluble하고 이를 soluble하게 만들기 위해서 넣어준 detergent가 결정화를 방해한 것으로 생각 됨. 단백질을 denature 시킬 만큼 강한 detergent가 아님에도 불구하고 결정화를 방해하는 결과를 얻었으며, 이 문제를 해결하기 위해서 insoluble한 membrane 결합부위의 domain에 hydrophobic 아미노산 잔기를 soluble한 잔기로 돌연변이 시켜 다시 발현 및 순수분리정제를 수행하였음. 이 과정에서는 결정화를 방해할 수 있는 detergent를 최소화해서 처리하는 실험과정을 거쳤음.

### (3) CyPPO10 단백질 발현 및 순수분리 정제

수용성 CyPPO 단백질을 얻기 위해 CyPPO10의 membrane binding domain 부위 중에서 소수성 잔기의 mutation을 실시함. CyPPO10 mutant 단백질을 pET29b vector, rosetta cell, 0.25mM IPTG, 15°C 조건하에 발현시켰음. CyPPO10 cell 8L을 배양하여 최종 20mg의 단백질을 순수 분리함 (그림 2-3).



그림 2-3. 순수 분리된 CyPPO10 단백질





## 나. 남세균 PPO 단백질 결정화 조건 탐색

### (1) CyPPO2 단백질 결정 스크린 및 최적화

순수 분리된 CyPPO2 단백질을 Hydra II 자동화 결정 시스템을 사용하여 약 1,000개 조건하에 결정을 스크린 하였음. CyPPO2 단백질 결정이 Index kit 2-54 조건에서 결정이 스크린 되었음(그림 2-4).

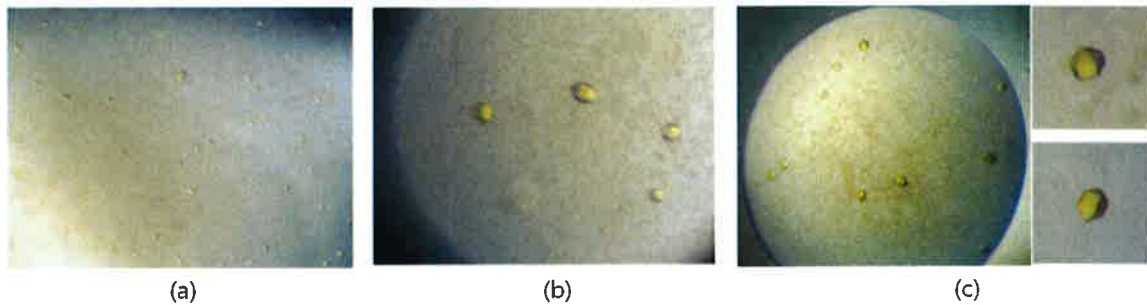


그림 2-4. CyPPO2 단백질 결정화 최적화

(a) 스크린된 CyPPO2 단백질 결정, (b) CyPPO2 단백질 결정 reproduce, (c) CyPPO2 단백질 결정 최적화

스크린 버퍼 조건을 이용하여 CyPPO2의 단백질 결정을 reproduce 하였고, 최적화를 통해서 크기가 크고 모양이 좋은 CyPPO2 단백질 결정을 획득하였음. CyPPO2 단백질 결정이 내부에 결합된 FAD에 의해 노란색을 띄고 있음.

### (2) CyPPO8 단백질 결정 스크린

Affinity column과 anion exchange column을 이용하여 순수분리 정제된 CyPPO8 단백질을 SDS-PAGE를 통해서 그 순도가 확인되었던 후 결정화를 시도하였음. 초기 500여 결정화 조건이 시도되었으며, 추후 500조건을 추가하여 총 1,000여 조건에서 결정화가 시도되었음. 결정화가 실패하였을 시 분리정제 조건을 변화시켜 특히 detergent에 의한 단백질의 denature를 최소화하는 시도가 이루어 졌음.

변화된 조건에서 순수분리 정제된 단백질들을 다시 결정화가 시도되었음. 결정화가 이루어지지 않을 시에는 남세균의 PPO 유전자의 insoluble 한 membrane결합 부위의 domain을 돌연변이시켜 구조의 변화를 일으키지 않으면서 남세균 PPO를 soluble하게 조절한 단백질을 발현시켜 결정화를 시도하였음. CyPPO8 단백질을 Hydra II 자동화 결정 시스템을 사용하여 약 1000개 조건하에 다양한 결정화 용액 및 12도와 25도의 2개의 다른 온도에서 결정화가 이루어졌음. 그럼에도 불구하고 CyPPO8의 단백질 결정화 조건이 스크린 되지 않았음.

### (3) CyPPO10 단백질 결정 스크린 및 최적화

순수 분리 정제된 CyPPO10 단백질을 자동화결정시스템(Hydra II)을 사용하여 sitting



drop 방법으로 약 1000개 조건하에 결정화 조건을 탐색함. 결정 스크린에 사용된 buffer는 Crystal screen, Index, PEG/Ion screen, SaltRx, PEGRx, Crystal screen Cryo, Crystal screen Lite, MembFac, Natrix, Grid Screen, Morpheus MD1, Wizard, Wizard precipitant synergy 을 사용하였음. 결정화는 14°C 에서 진행함.

스크린을 시도한 buffer 중에서 Crystal screen 1-15 조건에서 CyPPO10 결정이 스크린 되었음. 초기 결정의 모양은 단백질이 응집된 등근 형태로 노란색을 띄고 있음. 이후 스크린된 조건을 기초하여 pH, salt, precipitant 등을 변화하여 CyPPO10 단백질 결정 최적화를 진행함.

단백질 결정의 모양을 개선하기 위해서 Additive screen kit (Hampton Research)을 사용하여 96개 조건으로 변화를 주었는데 기존의 모양에서 효과적으로 개선된 결정이 스크린 되지 않음. 이후 microseeding method를 사용하여 모양이 개선된 단일 결정이 만들어짐. 결정의 크기는 50um-100um 정도로 모양은 직사각형이고 노란색을 띄고 있음. 그리고 CyPPO10과 제초제의 결합 구조를 확보하기 위해서 CyPPO10 단백질에 제초제 (tiafenacil, saflufenacil, fomesafen)를 결합하여 결정을 획득하였음 (그림 2-5).

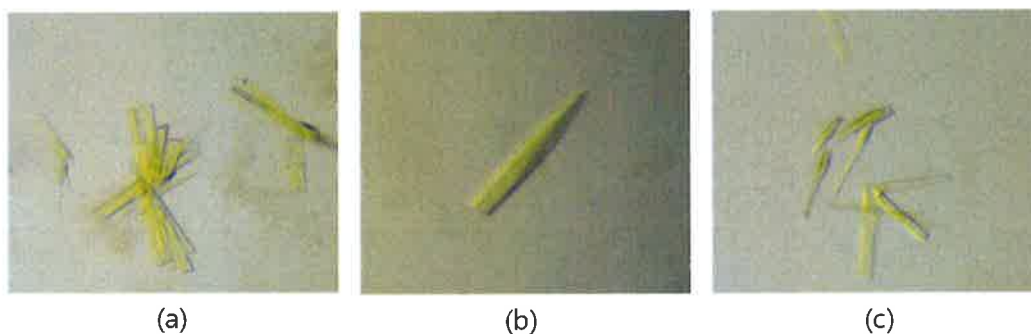


그림 2-5. 제초제와 결합된 CyPPO10 결정

(a) CyPPO10+tiafenacil, (b) CyPPO10+saflufenacil, (c) CyPPO10+fomesafen

#### 다. 남세균 PPO 단백질 결정 X-ray 회절 데이터 수집 및 삼차원 구조 규명

##### (1) CyPPO2 X-ray 회절 데이터 수집 및 구조 규명

CyPPO2 단백질을 apo, soaking with tiafenacil으로 준비하여 포항가속기연구소 빔라인 5C로부터 방사광 회절데이터를 수집함. 그 중에서 apo data 와 soaking with 3mM tiafenacil data을 수집하였음. 2개 data 모두 space group은  $p2_12_12_1$ 이고, resolution은 apo (3.5Å), soaking with 3mM tiafenacil (2.8Å) 임 (그림 2-6).



	Apo	3mM Tiafenacil
Data collection		
X-ray source*	5C, PLS	5C, PLS
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters		
a, b, c (Å)	96.6, 167.7, 175.7	96.4, 167.5, 175.6
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50.00–3.50 (3.56–3.50)	50.00–2.80 (2.85–2.80)
Total reflections	209622	299761
Unique reflections	33709	61253
Completeness (%)	91.8 (70.9)	88.0 (71.7)
Multiplicity	6.2 (2.1)	4.9 (2.5)
<I/σ(I)>	11.9 (1.7)	6.0 (1.7)
R <sub>merge</sub> (%)	8.2 (34.8)	13.1 (45.3)

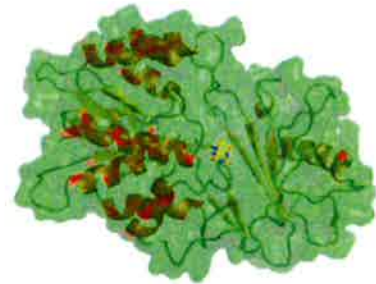


그림 2-6. CyPPO2 X-ray 회절 데이터, CyPPO2 삼차원 구조

## (2) CyPPO10 X-ray 회절 데이터 수집 및 구조 규명

최적화된 CyPPO10 결정을 사용하여 포항가속기연구소 빔라인 5C 로부터 X-ray 회절 실험을 수행함. Cryoprotectant 로 20% glycerol을 첨가하는데 결정이 cryoprotectant buffer에 옮겨지면 손상을 받아서 X-ray 회절 이미지의 peak이 좋지 않음. 따라서 1개의 데이터를 얻기 위해서 여러 개의 결정을 시도하였음.

CyPPO10과 제초제 (tiafenacil, saflufenacil, fomesafen)가 결합한 X-ray 회절 데이터를 resolution: 1.7~2.0 Å 수준으로 high resolution 데이터를 수집하였음. 수집된 X-ray 회절 이미지를 HKL2000 프로그램을 사용하여 processing 한 결과 space group C222<sub>1</sub>으로 processing 되었음. CyPPO10 X-ray 회절 데이터를 Matthews\_coef 프로그램으로 분석한 결과 1 molecule/asym, solvent: 48.5% (space group: C222<sub>1</sub>)로 분석되었음.

CyPPO10 단백질 구조를 규명하기 위해서 MxPPO (PDB id: 2IVE, sequence identity: 34.9 %) 구조를 template 로 사용하여 Molrep 프로그램으로 molecular replacement 수행하였음. MR을 통해서 1개의 solution 을 찾았고, Refmac5 프로그램을 사용하여 refinement 을 실행하였음. 이후 Coot 프로그램을 사용하여 모델링을 수행함. CyPPO10과 제초제 (tiafenacil, saflufenacil, fomesafen)가 결합한 X-ray 회절 데이터를 통해 각 제초제가 결합한 구조를 확보하였음(그림 2-7).

	CyPPO10+ Tiafenacil	CyPPO10+ Saflufenacil	CyPPO10+ Fomesafen
Data collection			
X-ray source	5C, PLS	5C, PLS	5C, PLS
Space group	C222 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters			
a, b, c (Å)	92.2 135.0 79.6	92.4 135.7 80.2	92.2 135.4 80.1
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50.00–1.80 (1.83–1.80)	50.00–1.70 (1.73–1.70)	50.00–2.00 (2.03–2.00)
Total reflections	316292	558172	290702
Unique reflections	46038	55750	33811
Completeness (%)	99.1 (99.6)	99.8 (99.6)	99.1 (97.8)
Multiplicity	6.9 (4.7)	10.0 (6.6)	8.6 (5.0)
<I/σ(I)>	17.3 (2.0)	18.4 (2.0)	12.8 (2.0)
R <sub>merge</sub> (%)	6.5 (36.2)	9.4 (46.7)	11.3 (37.5)

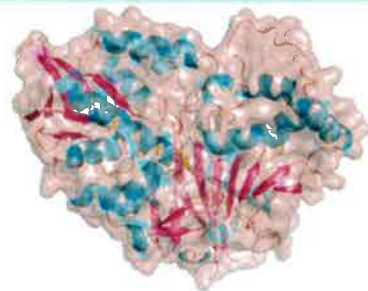


그림 2-7. CyPPO10+제초제의 X-ray 회절 데이터, CyPPO10 삼차원 구조



### 제 3 절 제초제 저항성 유채 형질전환체 제작 (2위탁, 연구기간 : 3차년도)

#### 가. 고효율 유채 형질전환 시스템 개발

연차평가의 의견을 반영하여 콩, 옥수수과 함께 CyPPO 변이 유전자가 도입된 작물을 대상으로 PPO계 제초제 저항성을 확인하고자 유채 형질전환체를 제작하기로 함.

#### (1) 유채의 형질전환 시스템 효율 개선

유채 품종 ‘영산’을 재료로 이용하여, 재생 배지의 식물생장조절제 조합 및 PPT 농도 처리를 실시하여 적정 식물생장조절제의 조합 및 농도를 선정하였고 형질전환체 선발에 적합한 PPT 농도를 결정하였음.

표 3-1. 식물생장조절제 Kinetin과 NAA 처리에 따른 유채 ‘영산’의 잎 절편체로부터 재생 효율

Plant growth regulators (mg/L)		Shoot formation (%)	No. of shoots / explants
Kinetin	NAA		
1.0	0.1	0.0	0.0
	0.2	25.0	1.0
	0.5	66.7	1.1 ± 0.4
	1.0	75.0	1.2 ± 0.4
2.0	0.1	16.6	1.0 ± 0.0
	0.2	58.3	1.3 ± 0.5
	0.5	83.3	1.3 ± 0.5
	1.0	75.0	1.6 ± 0.5
3.0	0.1	8.3	1.0
	0.2	66.7	1.3 ± 0.5
	0.5	66.7	1.5 ± 0.5
	1.0	91.7	1.8 ± 0.8
4.0	0.1	16.7	1.5 ± 0.7
	0.2	50.0	1.5 ± 0.5
	0.5	91.7	1.6 ± 1.0
	1.0	100.0	1.8 ± 0.8
5.0	0.1	0.0	0.0
	0.2	41.7	1.8 ± 0.8
	0.5	91.7	1.5 ± 0.7
	1.0	83.3	1.5 ± 0.5

종자의 기내 발아를 통해 얻어진 식물체의 엽병 포함 자엽을 절취하여 신초 기관형성의 적정 조건을 알아보았음. MS 염류와 비타민, sucrose 30g/L, 배지고형제(phytagel)을 포함한 신초재생기본배지에 Kinetin(1.0-5.0mg/L)과 NAA(0.1-2.0mg/L), BA(1.0-5.0mg/L)와 NAA(0-2.0mg/L)를 첨가한 신초재생배지에 절편체를 치상하여 신초 재생 효율을

조사하였음.

Kinetin 1.0mg/L와 NAA 0.1mg/L, Kinetin 5.0mg/L와 NAA 0.1mg/L 처리구를 제외한 모든 처리구에서 배양 4주 후부터 싹초가 형성되었음. 배양 8주후 싹초 재생 효율을 조사하였을 때, 싹초 형성율과 절편체당 싹초수는 Kinetin의 농도에 관계없이 NAA 농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었고, Kinetin 4.0mg/L +NAA 1.0mg/L 처리구가 싹초 재생에 가장 효과적이었음(표 3-1, 그림 3-1).

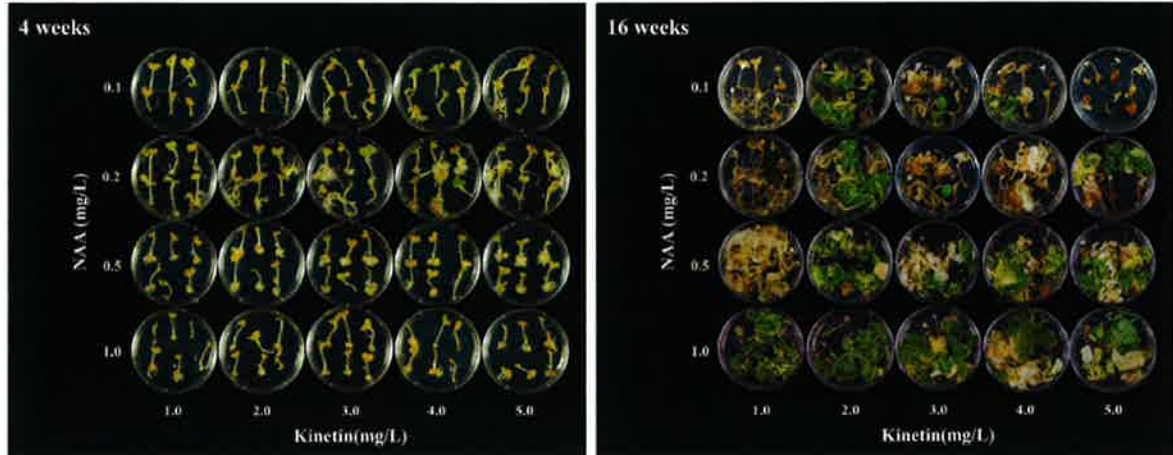


그림 3-1. 식물생장조절제 Kinetin과 NAA 처리에 따른 유채 ‘영산’의 잎 절편체로부터 싹초 재생

기내 발아 종자의 엽병 포함 자엽을 절취하여 싹초재생 기본배지에 BA(1.0-5.0mg/L)와 NAA(0-2.0mg/L)를 첨가한 싹초재생배지에 치상하여 배양하였음. NAA가 0.5-10mg/L에서 재생 효율이 높은 경향을 보였음. 20개 처리구중, BA 1.0mg/L + NAA 0.5mg/L 처리구가 100%의 싹초 형성율과 1.8개 절편체당 싹초수로 싹초재생에 가장 효과적이었음(표 3-2, 그림 3-2).

싹초재생 효율과 정상적인 발달 등을 종합적으로 볼 때 유채 ‘영산’의 싹초 재생에는 Kinetin과 NAA 조합처리보다는 BA와 NAA의 조합처리가 적합하다고 생각됨. 이로 보아 유채 ‘영산’의 형질전환 실험에서는 BA 1.0mg/L + NAA 0.5mg/L를 첨가한 배지를 사용하는 것이 바람직하다고 판단됨.



표 3-2. 식물생장조절제 BA와 NAA 처리에 따른 유채 '영산'의 잎 절편체로부터 재생 효율

Plant growth regulators (mg/L)		Shoot formation (%)	No. of shoots / explants
BA	NAA		
1.0	0.1	0.0	0.0
	0.2	33.3	1.0
	0.5	100.0	1.8 ± 0.4
	1.0	100.0	1.6 ± 0.5
2.0	0.1	0.0	0.0
	0.2	8.3	1.0
	0.5	66.7	1.1 ± 0.4
	1.0	66.7	1.3 ± 0.5
3.0	0.1	0.0	0.0
	0.2	33.3	1.3 ± 0.5
	0.5	75.0	1.4 ± 0.5
	1.0	75.0	1.2 ± 0.4
4.0	0.1	0.0	0.0
	0.2	58.3	1.3 ± 0.5
	0.5	75.0	1.4 ± 0.5
	1.0	83.3	1.7 ± 1.2
5.0	0.1	25.0	1.7 ± 1.2
	0.2	66.7	1.1 ± 0.4
	0.5	75.0	1.4 ± 0.5
	1.0	58.3	1.1 ± 0.4

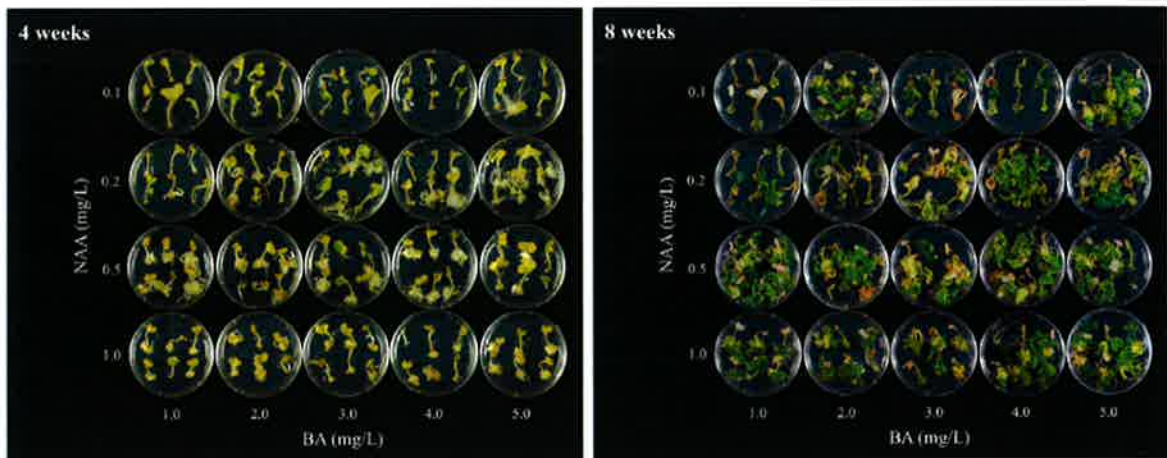


그림 3-2. 식물생장조절제 BA, NAA 처리에 따른 유채 '영산'의 잎 절편체로부터 신초재생

제조제 PPT의 농도별 처리가 유채 '영산'의 엽병 포함 자엽으로부터의 신초 재생에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 신초재생배지에 PPT 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0mg/L의 8개 농도를 각각 첨가한 배지를 제조한 후 절편체를 치상하여 암조건에서 4주, 명조건에서 14주(총 18주) 배양 후 절편체의 반응을 조사하였음.

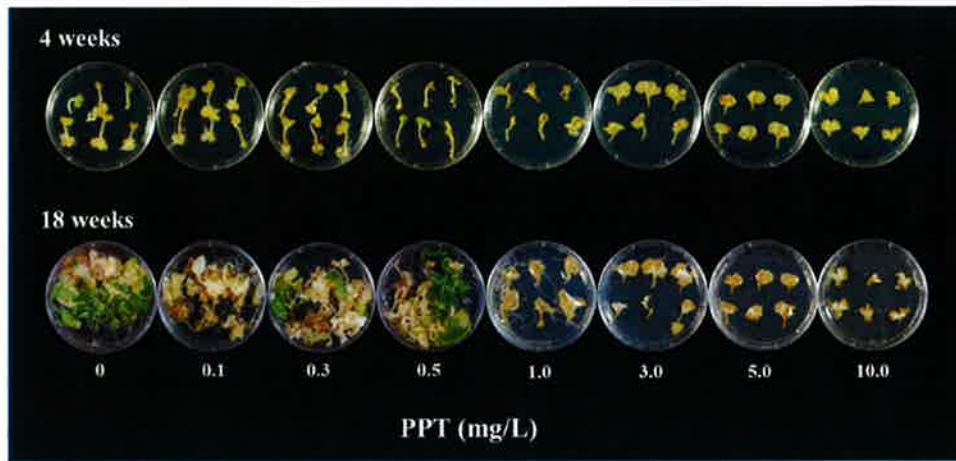


그림 3-3. 유체 ‘영산’ 및 절편체로부터 신초재생에 미치는 PPT 농도의 영향

초기 암배양 4주 후, PPT 농도가 증가함에 따라 켈러스의 형성이 감소하는 경향을 보이다가 PPT 1.0mg/L 이상 포함 처리구에서는 켈러스 형성이 관찰되지 않았음(그림 3-3). 배양 18주 후, PPT 무첨가 처리구에서는 신초재생율이 90%를 상회하였으나, PPT 농도 증가에 따라 신초 재생율이 저하되었고, PPT 1.0mg/L 이상 처리구에서는 절편체가 완전히 갈변 고사하였음(그림 3-3, 3-4).

이로 보아 PPT 선발을 통한 형질전환체 생산에서는 PPT 1.0mg/L를 사용하는 것이 적당하다고 판단되었음.

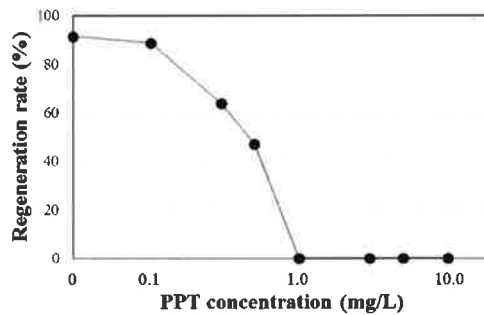


그림 3-4. 유체 ‘영산’의 자엽에서 신초 재생에 미치는 PPT의 효과

유체 ‘영산’의 엽병 포함 자엽을 배양하여 제초제 Tiafenacil의 농도별 처리가 미치는 영향을 조사하기 위하여, Tiafenacil 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0nM의 6개 농도를 각각 첨가한 배지에 절편체를 치상한 후 배양 4주부터 8주까지 절편체를 관찰하였음.

암배양 4주 후 모든 처리구에서 절편체에 켈러스가 형성되었으나, 명배양 4주 후(총 8주) Tiafenacil 무첨가 배지에서는 높은 신초 재생율을 보여주었으나 Tiafenacil 농도 증가에 따라 신초 재생율이 저하되었으며 5.0nM 이상에서는 절편체와 켈러스가 모두 갈변되어 신초

재생이 이루어지지 않았음(그림 3-5, 3-6). 이로 보아 유채 ‘영산’의 자엽 절편체로부터 Tiafenacil 선발을 통한 형질전환체 생산에서는 Tiafenacil 5.0nM 이상을 사용하는 것이 적합하다고 판단 하였음.

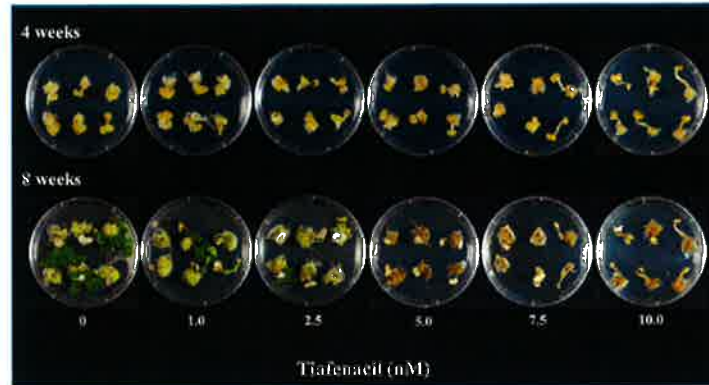


그림 3-5. 유채 ‘영산’ 잎 절편체로부터 신태 재생에 미치는 Tiafenacil 농도의 영향

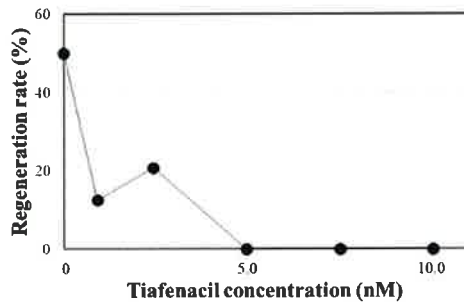


그림 3-6. 유채 ‘영산’의 자엽에서 신태 재생에 미치는 Tiafenacil의 효과

#### 나. 유채 형질전환 및 Tiafenacil 저항성 유전자 도입 형질전환체 생산

##### (1) Tiafenacil 저항성 유전자 도입 형질전환 식물체 생산

제초제 저항성 유전자 CyPPO10-1, CyPPO10-4, CyPPO13-2가 각각 도입된 벡터를 (주)팜한농으로부터 전달받아 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환 시킨 후, 유채 ‘영산’의 기내 발아된 소식물체의 엽병 포함 자엽 절편체를 대상으로 형질전환을 실시함(그림 3-7).



그림 3-7. 제초제 저항성 유전자 CyPPO를 도입한 vector map



기내 발아 종자의 엽병 포함 자엽 절편체를 세균 현탁액에 공조배양한 후, PPT 1.0mg/L와 Timentin(Tm) 250mg/L를 포함한 선발배지에서 배양하면서 형질전환 신초 재생을 유도하였음. 이후 절편체에서 형성된 신초를 분리하여 신장과 발근을 유도하여 형질전환체를 선발하였음.

형질전환시킨 절편체를 PPT 1.0mg/L, Tm 250mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하였을 때, 암배양 4주 후부터 켈러스가 형성되기 시작하였고, 명조건으로 옮긴 1주 후(배양 5주 후)부터 bud가 관찰 되었고 배양 8주 후에는 절편체로부터 신초가 형성되어 성장하였음.

절편체로부터 재생된 신초 가운데 0.5cm 이상 신장한 신초를 분리하여 배양하였는데, 다수의 재생 신초가 갈변 고사하였고 일부의 신초만이 지속적으로 신장 발달하였음. 신장 발달한 신초 가운데 정상적으로 뿌리가 형성된 소식물체를 골라 추가적인 선발과정을 거친 형질전환체들은 화분으로 옮겨 성공적으로 활착시켰음(그림 3-8).

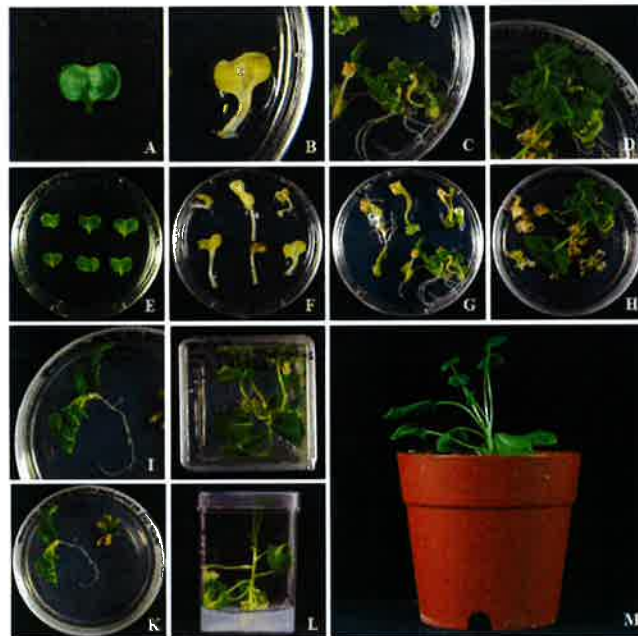


그림 3-8. 유채 ‘영산’의 *Agrobacterium*-매개 형질전환을 통한 CyPPO 유전자 도입 형질전환 식물체 생산 과정

#### 1) CyPPO10-1 유채 형질전환체 제작

제초제 저항성 유전자 CyPPO10-1가 도입된 유채 ‘영산’의 형질전환 식물체를 생산하기 위하여, *Agrobacterium*-매개 형질전환을 실시하였음. 형질전환시킨 2,040개 절편체 가운데, 48개의 절편체에서 신초가 재생되었고, 이후 선발과정을 거쳐 1차 선발배지에서 51개, 2차 선발배지에서 17개, 3차 선발배지에서 7계통의 식물체를 생산하였음(표 3-3).



표 3-3. CyPPO10-1 유전자 도입 유채 '영산'의 형질전환 식물체 생산 현황

도입유전자	차수	절편체 수	생존 절편체 수	신초 재생 절편체 수	재생 신초 수	계대배양 후 생존 형질전환 계통의 수		
						1차	2차	3차
10-1	1	90	5	1	1	0	0	0
	2	117	11	1	1	1	0	0
	3	120	10	0	0	0	0	0
	4	109	6	1	1	1	0	0
	5	96	2	0	0	0	0	0
	6	129	5	1	1	1	0	0
	7	111	43	8	9	9	4	2
	8	147	75	16	28	28	7	4
	9	175	29	0	0	0	0	0
	10	212	54	4	5	5	3	0
	11	87	61	5	8	1	1	1
	12	54	2	0	0	0	0	0
	13	120	100	4	5	3	2	선발중
	14	144	56	3	3	0	0	0
	15	105	39	2	2	0	0	0
	16	110	3	2	2	2	선발중	
	17	114	선발중					
합계	17	2,040	501	48	65	51	17	7

현재 3차 선발이 끝난 7계통의 형질전환 식물체는 신초 신장과 발근 과정을 진행하고 있으며 활착을 실시하고자 함(그림 9). 또한, 일부 절편체로부터 재생된 절편체를 이용한 선발이 진행되고 있어 추가적인 형질전환 계통의 확보가 가능할 것으로 판단됨.



그림 3-9. CyPPO10-1 유전자 도입 유채 '영산'의 형질전환 계통의 모습

## 2) CyPPO10-4 유채 형질전환체 제작

제초제 저항성 유전자 CyPPO10-4가 도입된 유채 '영산'의 형질전환 식물체를 생산하기 위하여, *Agrobacterium*-매개 형질전환을 실시하였음.

유채 ‘영산’의 기내 발아된 종자의 엽병 포함 자엽 절편체를 재료로 하여 제초제 저항성 유전자 CyPPO10-4가 도입된 construct를 가지고 있는 *Agrobacterium*-매개 형질전환을 실시함. 10차에 걸친 형질전환에 사용된 1,374개의 절편체로부터 선발배지에서의 배양을 통해 43개의 신초가 재생되었고, 반복적인 선발을 통하여 8계통을 선발하였음. 이들 형질전환 계통은 신장 및 발근 과정을 거쳐 활착을 준비하고 있음(표 3-4, 그림 3-10).

표 3-4. CyPPO10-4 유전자 도입 유채 ‘영산’의 형질전환 식물체 생산 현황

도입유전자	차수	절편체 수	생존 절편체 수	신초 재생 절편체 수	재생 신초 수	계대배양 후 생존 형질전환 계통의 수		
						1차	2차	3차
10-4	1	111	49	6	6	6	4	1
	2	93	21	6	8	6	4	1
	3	129	65	3	7	7	1	0
	4	120	56	5	5	5	1	1
	5	187	17	4	4	4	2	0
	6	182	133	3	3	3	3	3
	7	138	101	3	3	3	1	1
	8	184	21	1	1	1	0	0
	9	128	74	3	4	4	1	1
	10	102	2	2	2	0	0	0
합계	10	1,374	539	36	43	39	17	8

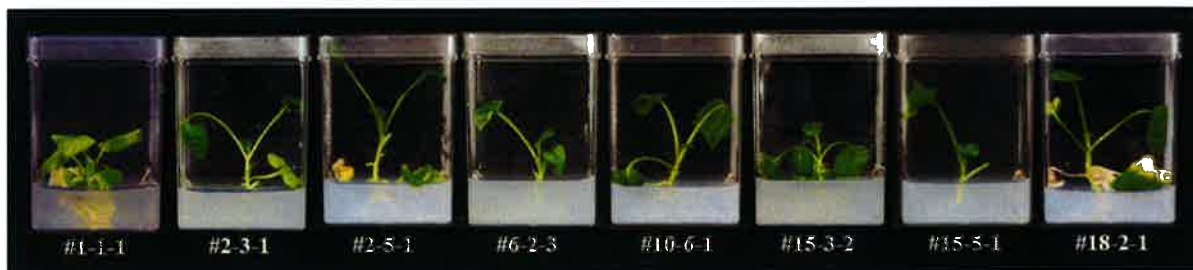


그림 3-10. CyPPO10-4 유전자 도입 유채 ‘영산’의 형질전환 계통의 모습

### 3) CyPPO13-2 유채 형질전환체 제작

제초제 저항성 유전자 CyPPO13-2가 도입된 유채 ‘영산’의 형질전환 식물체를 생산하기 위하여, *Agrobacterium*-매개 형질전환을 실시하였음.

CyPPO13-2 유전자 도입 형질전환 실험을 실시한 결과, 1,445개의 절편체 중 1차 선발배지에서 22개, 2차 선발배지에서 7개, 3차 선발배지에서 3개의 재생 신초가 생존함(표 5). 현재 선발이 끝난 3계통은 신초 신장과 발근 과정을 수행하고 있음(표 3-5, 그림 3-11)



그리고 일부 선발을 계속적으로 진행하고 있어 추후 일부 계통을 추가적으로 확보할 수 있을 것임.

표 3-5. CyPPO13-2 유전자 도입 유채 ‘영산’의 형질전환 식물체 생산 현황

도입유전자	차수	절편체 수	생존 절편체 수	신초 재생 절편체 수	재생 신초 수	계대배양 후		
						생존	형질전환	계통의 수
						1차	2차	3차
13-2	1	127	21	3	3	3	0	0
	2	166	90	9	10	5	4	1
	3	140	82	7	7	3	2	1
	4	180	111	3	3	2	선발중	
	5	144	104	2	2	2	선발중	
	6	163	13	3	3	3	1	1
	7	54	18	4	4	0	0	0
	8	204	10	6	6	2	0	0
	9	132	44	1	2	2	선발중	
	10	90	90	선발중				
	11	45	45	선발중				
합계	11	1,445	628	38	40	22	7	3

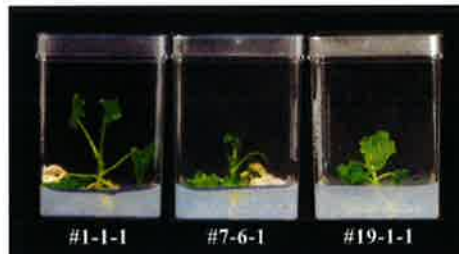


그림 3-11. CyPPO13-2 유전자 도입 유채 ‘영산’의 형질전환 계통의 모습

형질전환을 통해 생산된 신초를 PPT 1.0mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양한 후, 정상적으로 자란 형질전환체를 절단하여 PPT 1.0mg/L가 포함된 배지가 포함되어 있는 사각 배양용기로 옮겨 배양하면서 신장 및 발근을 유도함(그림 3-12).





그림 3-12. Tiafenacil 저항성 유전자 도입 유체 형질전환 식물체의 기내 증식, 발근과정

(2) Tiafenacil 도입 유체 ‘영산’ 형질전환체 분자생물학적 검정

제초제 저항성 유전자 CyPPO10-1, CyPPO10-4, CyPPO13-2가 도입된 형질전환 식물체 가운데 정상적인 성장을 보이고 있는 8계통, 5계통, 3계통을 대상으로 선발마커인 *bar* 유전자의 도입 및 발현을 확인하기 위하여 PCR 및 RT-PCR 분석을 실시함.

RT-PCR 분석에서는 *Brassica* 속 식물에서 안정적으로 발현하는 것으로 보고되어 있는 clathrin adaptor complex(CAC) 유전자와 tonoplasic intrinsic proteins-41(*TIPS-41*) 유전자를 대상으로 예비실험을 실시하였을 때, *TIPS-41*에 비해 보다 안정적인 발현을 나타낸 CAC 유전자를 reference 유전자로 사용함.

CyPPO10-1 형질전환 7계통을 대상으로 선발마커 *bar* 유전자의 PCR 분석을 실시한 결과, 예상된 412bp의 밴드가 모두 선명하게 관찰되어 모든 형질전환 계통으로 유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인 할 수 있었음(그림 3-13).

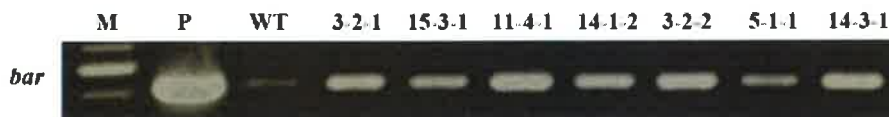


그림 3-13. CyPPO10-1 유전자 도입 유체 ‘영산’의 형질전환체의 *bar* 유전자 PCR 분석.

M: 100bp Plus DNA ladder, P: plasmid, WT: wild-type(non-transgenic) plant

CyPPO10-1 형질전환 4계통을 대상으로 선발마커 *bar* 유전자의 RT-PCR 분석을 실시한 결과, *bar* 유전자는 WT에서는 발현이 관찰되지 않았으나 모든 형질전환 계통에서 안정적으로 발현이 이루어졌음. 그러나 RT-PCR 분석에 사용된 4개 계통에서 계통간에 *bar* 유전자의 발현에 차이가 나타났으며, #3-2-2 형질전환 계통에서 가장 높은 발현이 나타남(그림 3-14).



그림 3-14. CyPPO10-1 유전자 도입 유체 ‘영산’의  
형질전환체의 *bar* 유전자 RT-PCR 분석.

WT: wild-type

또한, CyPPO10-4 형질전환 식물체 5계통을 선발하여 *bar* 유전자 PCR 분석을 실시하였을 때, 모든 계통에서 예상된 412bp의 band가 나타남. 이로 보아 모든 형질전환 계통으로 *bar* 유전자가 도입되었음을 확인함(그림 3-15).



그림 3-15. CyPPO10-4 유전자 도입 유체 ‘영산’의  
형질전환체의 *bar* 유전자 PCR 분석.

M: 100bp Plus DNA ladder, P: plasmid, WT:  
wild-type(non-transgenic) plant

CyPPO10-4 형질전환 5계통을 대상으로 실시한 *bar* 유전자의 RT-PCR 분석에서 모든 형질전환 계통에서 발현이 관찰되었음. 그러나 #2-3-1 계통에서는 강한 발현이 이루어진 것에 비하여 나머지 4개 계통에서는 매우 약한 발현이 이루어졌음(그림 3-16).

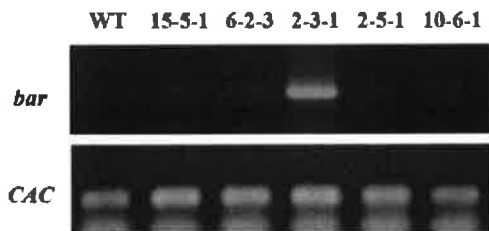


그림 3-16. CyPPO10-4 유전자 도입 유체 ‘영산’의  
형질전환체의 *bar* 유전자 RT-PCR 분석.

WT: wild-type (non-transgenic) plant

CyPPO13-2 유전자 도입 형질전환 식물체 3계통의 *bar* PCR 분석을 실시하였을 때, 3계통 모두 예상된 band가 관찰된 것으로 보아 모든 형질전환체에 유전자가 정상적으로



도입되었음을 확인함(그림 3-17).

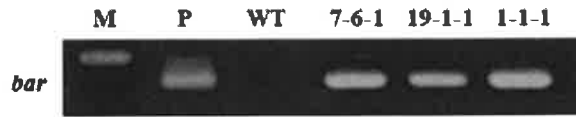


그림 3-17. CyPPO13-2 유전자 도입 유체 ‘영산’의  
형질전환체의 *bar* 유전자 PCR 분석.

M: 100bp Plus DNA ladder, P: plasmid, WT:  
wild-type(non-transgenic) plant

CyPPO13-2 형질전환 식물체 3계통의 *bar* 유전자 RT-PCR 분석을 실시한 결과, 3계통에서 모두 *bar* 유전자의 발현을 확인할 수 있었으며 #7-6-1 계통에서 강한 발현이 나타남(그림 3-18).

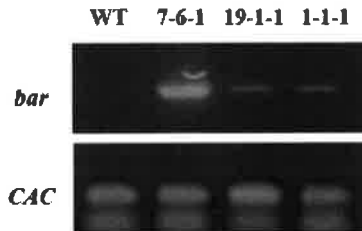


그림 3-18. CyPPO13-2 유전자 도입 유체 ‘영산’의  
형질전환체의 *bar* 유전자 RT-PCR 분석.

WT: wild-type (non-transgenic) plant

### (3) 유체 형질전환체의 제초제 내성 확인

유체 ‘영산’에 CyPPO 유전자 도입된 형질전환체의 Tiafenacil에 대한 저항성을 확인하기 위한 예비실험으로 leaf painting 처리의 적정 농도를 결정하였음. 유체 ‘영산’의 온실에서 재배중인 식물체의 잎에 일직선으로 Tiafenacil을 leaf painting한 후 7일 경과 후 약해를 조사함.

유체 ‘영산’에 Tiafenacil을 leaf painting한 후 7일 경과하였을 때, 1.0 $\mu$ M 처리구에서는 미약한 약해를 나타내었으며, 3.0 $\mu$ M 이상의 농도에서는 잎의 Tiafenacil 처리 부분의 갈변 현상이 심하게 나타남. 이로 보아 형질전환체 선발에서는 Tiafenacil 3.0 $\mu$ M이 적합한 농도로 판단됨(그림 3-19).



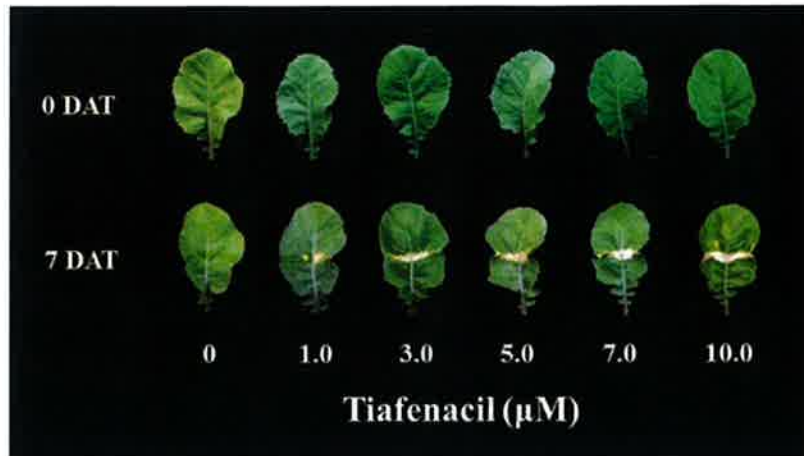


그림 3-19. 유채 ‘영산’의 제초제 Tiafenacil leaf painting 처리에 따른 반응

한편, CyPPO10-1 도입 형질전환체 6계통을 선발하여 Tiafenacil 저항성 검정을 실시함. 이를 위하여 기내 배양중인 식물체의 잎을 절취하여 Tiafenacil 5.0 $\mu$ M 용액을 각각 leaf painting 한 다음 MS 기본배지에 치상하여 4일간 배양 후 잎의 반응을 조사함. WT의 경우 처리된 부위의 약해가 뚜렷이 관찰되었음. CyPPO10-1 형질전환체의 경우 약해가 없거나 미미한 수준으로 나타남 (그림 3-20).

이로 보아 CyPPO10-1 유전자 도입 형질전환체들은 WT에 비해 Tiafenacil 제초제에 대해 저항성을 가지고 있다고 판단됨. 그러나 형질전환체 확보에 많은 시간이 소요되기 때문에 아직 기내에 있는 식물체를 대상으로 제초제 저항성 분석을 진행할 수밖에 없었으나 이후 화분에 활착된 상태에서 제초제 저항성 분석을 진행하여 명확한 결론을 낼 수 있을 것으로 판단됨.





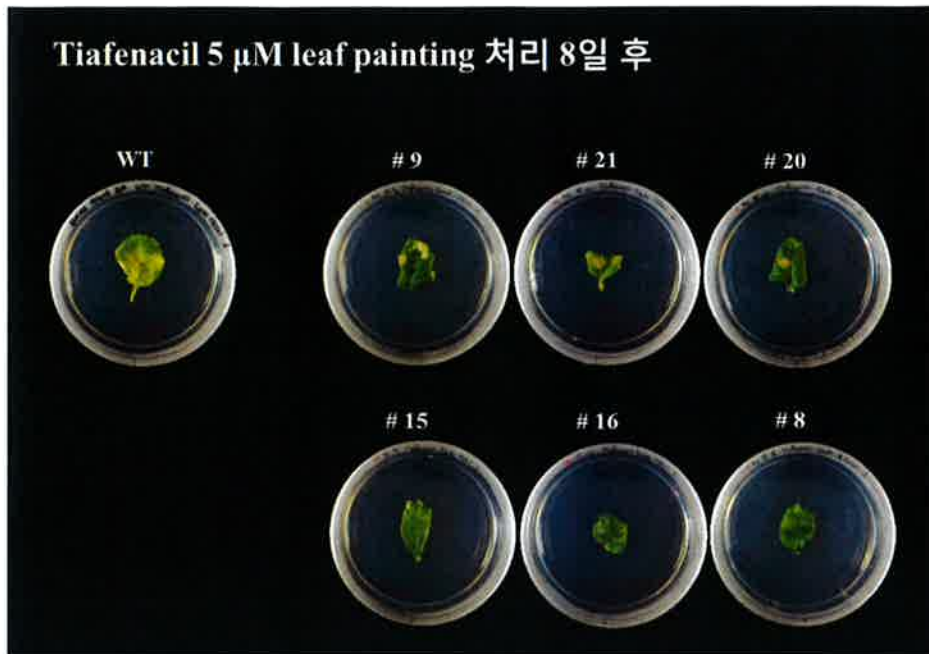


그림 3-20. 유채 ‘영산’의 CyPPO10-1 유전자 도입 형질전환 식물체의 Tiafenacil 5 $\mu$ M 처리에 따른 반응

본 결과들로부터 유채 형질전환체 제작 기술이 확립되어, 도입시킨 유전자가 잘 발현하여 해당 형질전환체가 PPO계 제초제에 대한 저항성을 갖게 되었음을 확인할 수 있었음. 연구기간이 1년간이므로 확보된 형질전환체의 수가 아직까지 많지 않으므로 향후, 더 많은 형질전환체를 확보하여 유채에서 CyPPO 변이 유전자별로 제초제 저항성 수준을 종합적으로 분석할 필요가 있다고 판단됨.

한편 유채(캐놀라) 형질전환은 품종별 효율 차이가 있으므로 외국 종자회사가 형질전환에 사용한 Topas (Bayer) 와 Westar (Monsanto, BASF) 품종을 확보하여 형질전환에 사용할 계획임.

## 제 4 절 PPO의 세포소기관 이동 관여 유전자 및 제초제 저항성 형질전환체의 유전체 연구(1협동)

가. 세포 소기관 이동 transit peptide (TPs)에 따른 제초제 저항성 효과 연구

### (1) 엽록체, mitochondria & chloroplast/mitochondria dual targeting transit peptide 조사

총 9개의 유전자들의 세포내 소기관으로 전이하는데 관여하는 TP 선정

#### 1) Chloroplast targeting TP

- rice ferredoxin 1 gene (171 bp)
- arabidopsis ATP synthase delta subunit (174 bp)
- arabidopsis acyl carrier protein 1 (236 bp)
- arabidopsis EPSPS (171 bp)

#### 2) Mitochondria targeting TP

- arabidopsis mitochondrial ATP synthase beta-subunit (111 bp)

#### 3) Chloroplast/Mitochondria dual targeting TP

- At5g16715 (EMB2247) (174 bp)
- At3g13490 (ATKRS-2) (144 bp)
- At1g79230 (ATMST1) (135 bp)
- Amaranthus tuberculatus PPX2L (90 bp)

### (2) 선별된 TP 도입 형질전환체 제작

pBA002-cTP::CyPPO8::HA와 pBA002-cTP::CyPPO8::YFP 클론을 이용하여 해당 cTP 부분을 위에서 선정한 유전자들의 TP로 교체하고 이를 이용하여 애기장대 형질전환체를 제작함 (표 4-1, 그림 4-1, 4-2, 4-3).

표 4-1. 제초제 저항성 검증을 위해 확보된 TP<sub>s</sub>-CyPPO8 애기장대 형질전환체

TP	Arabidopsis 형질전환체	T1	T2	최종선발 라인
Chloroplast targeting TP (cTP)	2. Os03g61960(Ferredoxin cTP)+pBA002-CyPPO2-HA #6	10	7	
	3. Os03g61960(Ferredoxin cTP)+pBA002-CyPPO8-HA	93	67	Homo: 11, 15, 17, 18, 23, 24, 25, 31, 34, 35, 39, 48, 53
	4. Os03g61960(Ferredoxin cTP)+pBA002-CyPPO8-YFP	12	8	Hetero: 4-4
	5. At03g05020 (cTP ACYL) + pBA002-CyPPO8-HA #1	25	22	5-5-1
	6. At03g05020 (cTP ACYL) + pBA002-CyPPO8-YFP #1	15	10	Hetero: 6-5, 6-6 Homo: 6-3, 6-10
	7. At2g45300 (cTP EPSPS) + pBA002-CyPPO8-HA #1	35	13	Hetero: 7-8 Homo: 7-5, 10, 12, 13
	8. At2g45300 (cTP EPSPS) + pBA002-CyPPO8-YFP #2	3		
	9. At4g09650 (cTP ATP F1δ) + pBA002-CyPPO8-HA #1	23	15	9-2-1
	10. At4g09650 (cTP ATP F1δ) + pBA002-CyPPO8-YFP #1	2		
	Mitochondrial targeting TP (mTP)	11. At5g08670 (mTP ATP F1β) + pBA002-CyPPO8-HA #1	135	125
12. At5g08670 (mTP ATP F1β) + pBA002-CyPPO8-YFP #1		70	42	Homo-; 12-8, 10, 11, 12, 18, 24, 31, 32, 36, 40, 41
Dual targeting TP (dualTP)	16. PPX2L (dual targeting) + pBA002-CyPPO8-HA #1	> 100	85	16-3, 7, 9, 10, 12, 14, 30, 35
	17. At1g79230 (dual targeting) + pBA002-CyPPO8-HA #1	> 150	130	Homo: 17-62, 63, 66, 67, 79 외 18개
	21. PPX2L (dual targeting) + pBA002-CyPPO8-YFP #1	> 50	35	



Os03g61960(Ferredoxin cTP) + pBA002-CyPPO8-HA



At03g05020 (cTP ACYL) + pBA002-CyPPO8-HA

그림 4-1. cTP-CyPPO8 애기장대 형질전환 식물체 (T1 plants)





#11 At5g08670 (mTP ATP F1 $\beta$ ) + pBA002-CyPPO8-HA



#12 At5g08670 (mTP ATP F1 $\beta$ ) + pBA002-CyPPO8-YFP

그림 4-2. mTP-CyPPO8 애기장대 형질전환 식물체 (T1 plants)

#16

PPX2L (dual targeting) + pBA002-CyPPO8-HA



#17

At1g79230 TP (dual targeting TP) + pBA002-CyPPO8-HA



그림 4-3. dual TP-CyPPO8 애기장대 형질전환 식물체 (T1 plants)

(3) 확보된 여러 TP 도입 애기장대 형질전환체의 Tiafenacil 저항성 확인

1) chloroplast TP-CyPPO8 도입 형질전환체의 Tiafenacil 제초제 저항성 검증

Col-0	A1DM (3-7)	5-2-1	5-2-2	5-2-4	5-5-1	7-9-4	7-10-1
//	//	//	//	//	//	//	//
CyPPO8 (F40)	A1DM (7-3)	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//



1 μM Tiafenacil 처리 후 3일째 (즉 72시간 경과)



1 μM Tiafenacil 처리 후 2일째 (즉 48시간 경과)



1 μM Tiafenacil 처리 후 4일째 (즉 96시간 경과)

그림 4-4. At03g05020/ACYL cTP-CyPPO8와 At2g45300/EPSPS cTP-CyPPO8 도입 애기장대 형질전환체 Tiafenacil 제초제 저항성 검정

Col-0	A1DM (3-7)	7-13-1	9-1-1	9-2-1	10-1-2	10-1-4	11-1-1
//	//	//	//	//	//	//	//
CyPPO8 (F40)	A1DM (7-3)	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//



1 μM Tiafenacil 처리 후 3일째 (즉 72시간 경과)



1 μM Tiafenacil 처리 후 2일째 (즉 48시간 경과)



1 μM Tiafenacil 처리 후 4일째 (즉 96시간 경과)

그림 4-5. At2g45300/EPSPS cTP-CyPPO8와 At4g09650/ATP F16 cTP-CyPPO8 도입 애기장대 형질전환체 Tiafenacil 제초제 저항성 검정

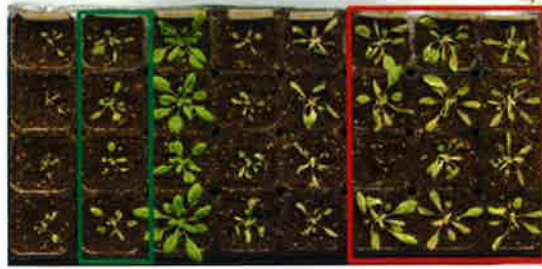


Col-0	CyPPO8 #16	AIDM (3-7)	AtTP 3-26	AtTP 3-11	AtTP 3-15	AtTP 3-31	AtTP 3-34
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//

1  $\mu$ M Tiafenacil 처리 후 2일째 (즉 48시간 경과)



1  $\mu$ M Tiafenacil 처리 후 3일째 (즉 72시간 경과)



3-15 3-31 3-34

그림 4-6. Os03g61960/Ferredoxin cTP-CyPPO8 도입 애기장대 형질전환체 Tiafenacil 제초제 저항성 검정

2종류의 cTP (At03g05020/ACYL, At4g09650/ATP F16)에서 저항성을 보이는 형질전환체를 선별할 수 있었음 (그림 4-4, 4-5, 4-6).

2) Mitochondrial TP-CyPPO8 도입 형질전환체의 Tiafenacil 제초제 저항성 검증

Col-0	CyPPO8 #16	AIDM (3-7)	AtTP 16-9	AtTP 11-44	AtTP 11-45	AtTP 11-46	AtTP 11-48
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//



1  $\mu$ M Tiafenacil 처리 후 1일째 (즉 24시간 경과)



1  $\mu$ M Tiafenacil 처리 후 2일째 (즉 48시간 경과)



1  $\mu$ M Tiafenacil 처리 후 3일째 (즉 72시간 경과)

11-48

그림 4-7. mTP (At5g08670/ATP F1 $\beta$ ) 도입 형질전환체의 Tiafenacil 저항성 분석



한 종류의 mTP (At5g08670/ATP F1β) 애기장대 형질전환체에 대해서 검증한 결과, 제초제 저항성을 보이지 않는 것으로 확인됨 (그림 4-7).

3) Dual TP-CyPPO8 도입 형질전환체의 Tiafenacil 제초제 저항성 검증

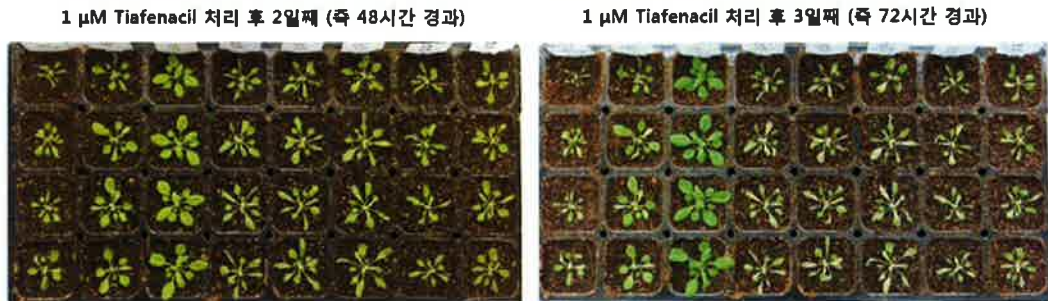
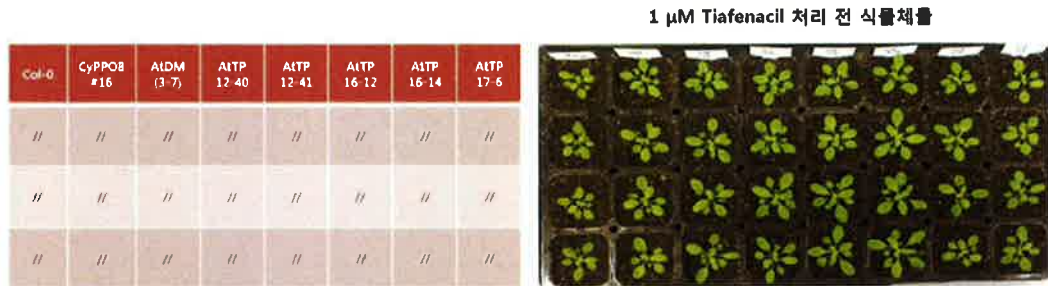


그림 4-8. dual TP (At1g79230) 도입 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 분석

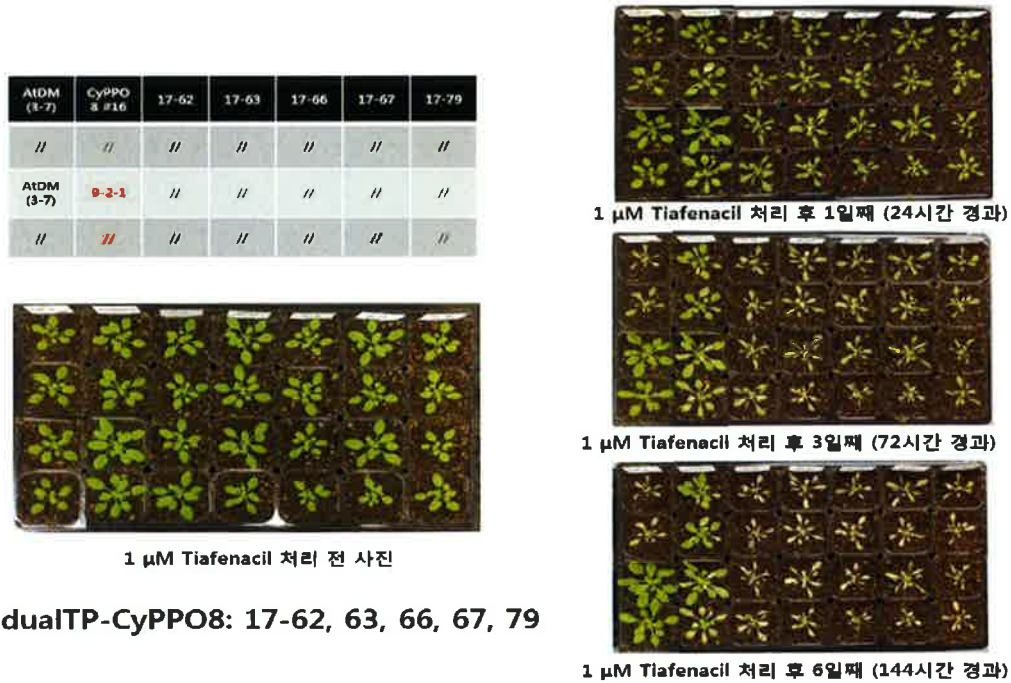


그림 4-9. dual TP (PPX2L) 도입 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 분석

두 종류의 dual TP (PPX2L, At1g79230) 애기장대 형질전환체에 대해서 제초제 저항성을

검증한 결과, 전반적으로 cTP-CyPPO8 애기장대 형질전환체들에 비해 제초제 저항성을 보이지 않는 것으로 확인됨(그림 4-8, 4-9).

**(5) 다양한 TP-CyPPO8 애기장대 형질전환체 단백질 발현 비교 (Western blotting)**

다양한 TP에 따른 CyPPO8 단백질의 세포내 소기관들 (엽록체, 미토콘드리아 또는 양쪽 모두)로의 전이와 이에 따른 애기장대 형질전환체들의 Tiafenacil 제초제 저항성 연관성을 확인하기 위하여 cTP-CyPPO8, mTP-CyPPO8 & dual TP-CyPPO8 각각의 애기장대 형질전환체들로부터 단백질을 분리한 후, HA-tag anti-body를 이용하여 western blotting을 수행함(그림 4-10).

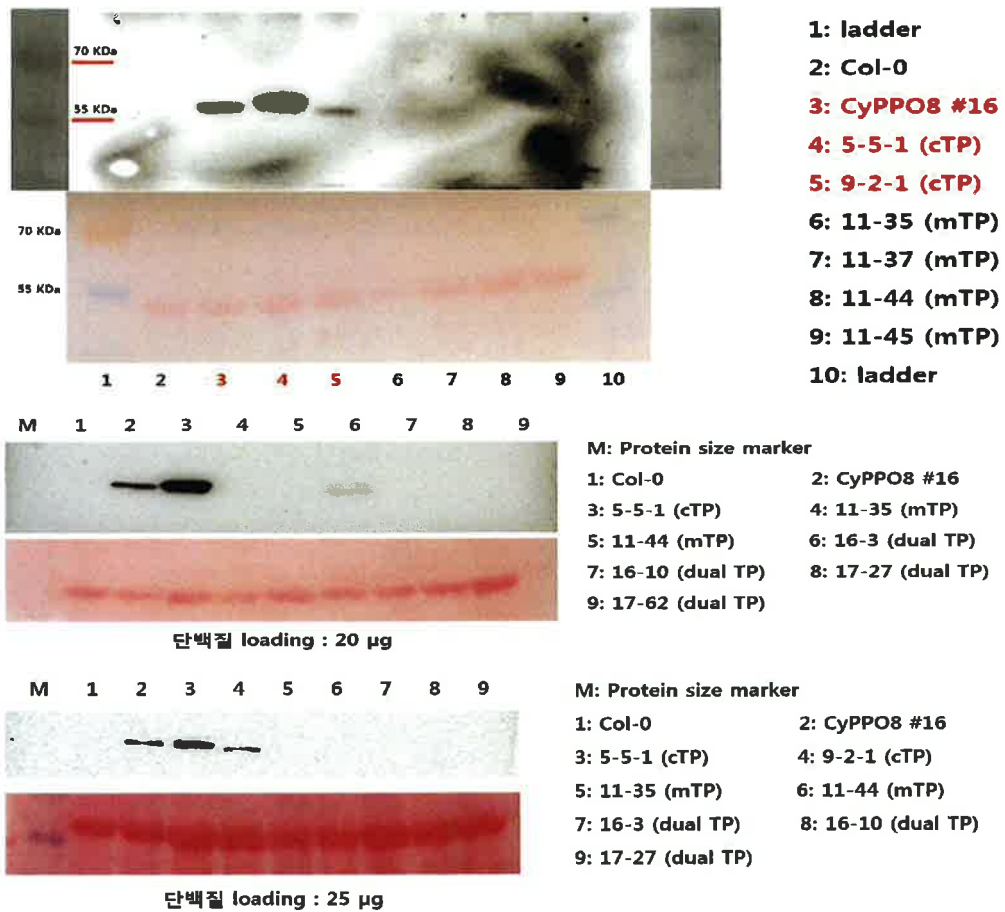


그림 4-10. 다양한 TP-CyPPO8 애기장대 형질전환체들의 CyPPO8 단백질 발현 양상

western blotting 결과, chloroplast로 전이되는 cTP-CyPPO8 애기장대 형질전환체(5-5-1 & 9-2-1)는 단백질들의 발현을 확인할 수 있었으며, 기존의 TP를 가지고 있는 CyPPO8 애기장대 형질전환체들보다 단백질 발현량이 높게 나타남. 특히 5-5-1 (At03g05020/ACYL cTP-CyPPO8) 형질전환체의 발현량이 가장 높게 나타남.



한편, mTP-CyPPO8 애기장대 형질전환체들(11-43 & 11-45)의 단백질 발현은 확인할 수 없었음.

또한, 총 13개 호모라인 dual TP-CyPPO8 애기장대 형질전환체들 (16-3, 16-9, 16-10, 16-14, 16-30, 16-35, 17-15, 17-27, 17-30, 17-63, 17-88, 17-92, 17-97)에 대한 단백질 발현을 확인한 결과, CyPPO8 단백질 발현을 확인할 수 없었음.

dual TP 형질전환체들이 Tiafenacil 처리시 저항성이 미미하였던 결과는 도입된 유전자가 제대로 엽록체와 미토콘드리아에서 발현되지 않았기 때문으로 추정됨.

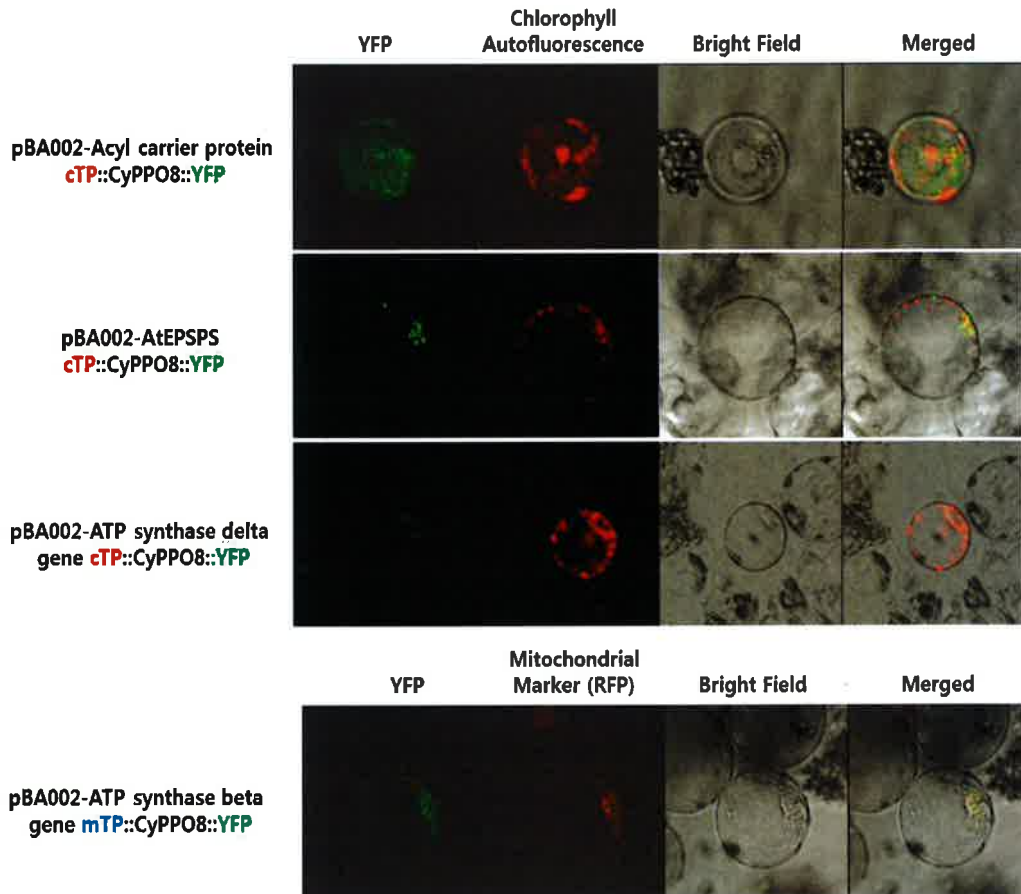


그림 4-11. Cellular localization of cTPs (transient peptide of acyl carrier protein, AtEPSPS, and ATP synthase delta subunit genes) of CyPPO8::YFP and mTP (ATP synthase beta subunit gene) of CyPPO8::YFP.

#### (6) cTP 및 mTP 의 cellular localization 확인

cTP와 mTP가 세포내에서 예상한 대로 각각 엽록체와 미토콘드리아로 타겟팅되는지 여부를 확인하기 위해, 애기장대와 벼의 원형질체(protoplast)를 분리하여, cTP & mTP

clones plasmid DNA를 PEG-mediated transfection 한 뒤, 형광현미경으로 관찰함 (그림 4-11).

Acyl carrier protein의 TP의 경우, 일부 세포질에 퍼져 있는 듯한 패턴을 보여 정상적으로 엽록체로만 타겟팅되는 것은 아닌 것으로 판단됨. EPSPS의 TP 역시, 엽록체로만 타겟팅 되는 것은 아닌 것으로 판단됨. ATP synthase delta의 TP의 경우에는 발현 수준이 너무 낮아 확인이 어려움. ATP synthase beta의 TP의 경우에는 미토콘드리아의 marker와 상당부분 겹치는 패턴을 보이는 것으로 보아, 미토콘드리아로 잘 타겟팅되는 것으로 판단됨.

이 결과는 각 TP의 형질전환체에서 일부 Tiafenacil에 대한 저항성을 보였다는 사실을 고려하면, 각 TP가 subcellular localization에서 추정된 것과는 다르게 일부 정상적으로 각각 엽록체로 타겟팅되고 PPO로서의 기능을 수행했음을 의미함. 단, 미토콘드리아 타겟팅 TP의 경우, subcellular localization에서 제대로 미토콘드리아로 타겟팅되는 것으로 추정되나, 실제 형질전환체에서 제대로 기능하지 않음을 알 수 있음.

#### 나. CyPPO8 형질전환체의 전사체 분석

##### (1) 처리조건 및 RNA seq 분석

Tiafenacil 과 Saflufenacil을 서로 다른 조건하에서 처리한 후, 배양조건 별로 sampling 하여 RNA를 추출함. CyPPO8-1 및 CyPPO8-40 은 변이되지 않은 CyPPO8을 도입하여 과발현시킨 형질전환체임. AtDM3-7 식물체는 애기장대 PPO1 변이 유전자를 과발현시킨 형질전환체로써 Tiafenacil 제초제 저항성 관련 positive control로 사용함.

표 4-2. 전사체 분석용 샘플의 제초제 처리 조건 및 추출한 RNA

Number	line	처리시간	처리약제	RNA Conc.	A <sub>260/280</sub> ratio
1	Col-0	0 hr	DMSO	679.36	2.1
2	CyPPO8-40	0 hr	DMSO	523.72	2.1
3	CyPPO8-1	0 hr	DMSO	1974.11	2.0
4	AtDM	0 hr	DMSO	1439.41	2.0
5	Col-0	dark 18 hr	1 uM Tiafenacil	1518.44	2.1
6	CyPPO8-40	dark 18 hr	1 uM Tiafenacil	976.01	2.0
7	CyPPO8-1	dark 18 hr	1 uM Tiafenacil	1027.45	2.1
8	AtDM	dark 18 hr	1 uM Tiafenacil	798.72	2.0
9	Col-0	dark 18 hr	1 uM Saflufenacil	803.65	2.1
10	CyPPO8-40	dark 18 hr	1 uM Saflufenacil	1069.17	2.0
11	CyPPO8-1	dark 18 hr	1 uM Saflufenacil	764.75	2.1
12	AtDM	dark 18 hr	1 uM Saflufenacil	748.19	2.1
13	Col-0	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Tiafenacil	784.87	2.0
14	CyPPO8-40	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Tiafenacil	274.71	2.1
15	CyPPO8-1	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Tiafenacil	931.02	2.0
16	AtDM	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Tiafenacil	667.18	2.0
17	Col-0	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Saflufenacil	785.02	2.0

18	CyPPO8-40	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Saflufenacil	697.81	2.0
19	CyPPO8-1	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Saflufenacil	1775.70	1.7
20	AtDM	dark 18 hr + light 3 hr	1 uM Saflufenacil	509.68	2.0

<표 4-2>의 총 20개 RNA 샘플에 대해서 RNA Seq. 분석을 수행하였으며, 총 31가지 비교군을 설정하여 처리 샘플들 간의 전사체 발현양상의 차이를 비교분석(DEG 분석)하였음(표 4-3).

표 4-3. 각 샘플간 비교군에서의 유전자 발현 패턴 차이 분석

DEG	Group 1 (G1)	Group 2 (G2)	Sum	Genes	
				Up (G2 only)	Down (G1 only)
1	1_160517	2_160517	575	447 (123)	128 (30)
2	1_160517	3_160517	631	390 (125)	241 (13)
3	1_160517	4_160517	418	158 (34)	260 (38)
4	1_160517	5_160517	1,086	722 (315)	364 (108)
5	1_160517	9_160517	1,157	749 (269)	408 (98)
6	1_160517	13_160517	1,159	849 (369)	310 (118)
7	1_160517	17_160517	1,111	804 (219)	307 (35)
8	2_160517	6_160517	1,163	703 (129)	460 (73)
9	2_160517	10_160517	1,092	651 (145)	441 (74)
10	2_160517	14_160517	1,013	709 (89)	304 (72)
11	2_160517	18_160517	1,155	834 (149)	321 (36)
12	3_160517	7_160517	1,196	734 (257)	462 (133)
13	3_160517	11_160517	1,134	711 (186)	423 (126)
14	3_160517	15_160517	1,008	578 (106)	430 (56)
15	3_160517	19_160517	1,082	697 (129)	385 (45)
16	4_160517	8_160517	1,131	740 (272)	391 (70)
17	4_160517	12_160517	1,196	829 (285)	367 (84)
18	4_160517	16_160517	989	624 (133)	365 (18)
19	4_160517	20_160517	1,123	749 (226)	374 (35)
20	5_160517	6_160517	1,001	394 (110)	607 (67)
21	5_160517	7_160517	1,005	426 (189)	579 (58)
22	5_160517	8_160517	1,055	368 (129)	687 (78)
23	9_160517	10_160517	641	305 (102)	336 (38)
24	9_160517	11_160517	759	371 (56)	388 (31)
25	9_160517	12_160517	615	319 (55)	296 (23)
26	13_160517	14_160517	948	312 (91)	636 (121)
27	13_160517	15_160517	1,132	384 (200)	748 (157)
28	13_160517	16_160517	1,023	316 (138)	707 (124)
29	17_160517	18_160517	767	593 (106)	174 (57)
30	17_160517	19_160517	850	463 (163)	387 (48)
31	17_160517	20_160517	788	283 (122)	505 (67)

**(2) 각 비교군에서 발현변화 유전자들의 GO (gene ontology) 분석**

각 비교군에서 발현변화를 보인 유전자들을 대상으로 GO term 분석을 수행하여, 처리 조건에 따라 변화가 주로 일어나는 대사경로를 확인함(표 4-4).

**표 4-4. 비교군 간의 GO 분석 결과**

DEG	Name	# of gene	# of GO	molecular_ function	biological_ process	cellular_ component
1	1_160517 vs 2_160517	575	2292	27 / 546 (4.9%)	173 / 1565 (11.1%)	6 / 181 (3.3%)
2	1_160517 vs 3_160517	631	2315	22 / 555 (4.0%)	174 / 1577 (11.0%)	13 / 183 (7.1%)
3	1_160517 vs 4_160517	418	1973	9 / 429 (2.1%)	146 / 1362 (10.7%)	1 / 182 (0.5%)
4	1_160517 vs 5_160517	1086	2641	9 / 663 (1.4%)	323 / 1776 (18.2%)	26 / 202 (12.9%)
5	1_160517 vs 9_160517	1157	2938	9 / 753 (1.2%)	351 / 1979 (17.7%)	25 / 206 (12.1%)
6	1_160517 vs 13_160517	1159	2754	17 / 702 (2.4%)	252 / 1832 (13.8%)	4 / 220 (1.8%)
7	1_160517 vs 17_160517	1111	2854	34 / 736 (4.6%)	372 / 1895 (19.6%)	50 / 223 (22.4%)
8	2_160517 vs 6_160517	1163	2840	15 / 712 (2.1%)	328 / 1915 (17.1%)	27 / 213 (12.7%)
9	2_160517 vs 10_160517	1092	2870	18 / 720 (2.5%)	338 / 1934 (17.5%)	24 / 216 (11.1%)
10	2_160517 vs 14_160517	1013	2865	34 / 763 (4.5%)	343 / 1887 (18.2%)	39 / 215 (18.1%)
11	2_160517 vs 18_160517	1155	2761	37 / 742 (5.0%)	380 / 1781 (21.3%)	45 / 238 (18.9%)
12	3_160517 vs 7_160517	1196	2949	25 / 750 (3.3%)	279 / 1966 (14.2%)	33 / 233 (14.2%)
13	3_160517 vs 11_160517	1134	2870	13 / 736 (1.8%)	339 / 1913 (17.7%)	24 / 221 (10.9%)
14	3_160517 vs 15_160517	1008	2786	29 / 707 (4.1%)	350 / 1849 (18.9%)	53 / 230 (23.0%)
15	3_160517 vs 19_160517	1082	2775	20 / 708 (2.8%)	398 / 1840 (21.6%)	51 / 227 (22.5%)
16	4_160517 vs 8_160517	1131	2853	15 / 704 (2.1%)	327 / 1930 (16.9%)	28 / 219 (12.8%)
17	4_160517 vs 12_160517	1196	2844	13 / 713 (1.8%)	347 / 1911 (18.2%)	23 / 220 (10.5%)
18	4_160517 vs 16_160517	989	2946	28 / 781 (3.6%)	417 / 1959 (21.3%)	49 / 206 (23.8%)
19	4_160517 vs 20_160517	1123	2813	21 / 756 (2.8%)	351 / 1816 (19.3%)	48 / 241 (19.9%)
20	5_160517 vs 6_160517	1001	2691	16 / 658 (2.4%)	229 / 1805 (12.7%)	19 / 228 (8.3%)
21	5_160517 vs 7_160517	1005	2610	18 / 602 (3.0%)	283 / 1766 (16.0%)	11 / 242 (4.5%)
22	5_160517 vs 8_160517	1055	2688	21 / 657 (3.2%)	245 / 1806 (13.6%)	16 / 225 (7.1%)
23	9_160517 vs 10_160517	641	2329	14 / 524 (2.7%)	184 / 1634 (11.3%)	9 / 171 (5.3%)
24	9_160517 vs 11_160517	759	2496	34 / 617 (5.5%)	201 / 1674 (12.0%)	14 / 205 (6.8%)
25	9_160517 vs 12_160517	615	2304	4 / 492 (0.8%)	153 / 1624 (9.4%)	4 / 188 (2.1%)
26	13_160517 vs 14_160517	948	2708	2 / 638 (0.3%)	263 / 1863 (14.1%)	14 / 207 (6.8%)
27	13_160517 vs 15_160517	1132	2791	22 / 693 (3.2%)	266 / 1860 (14.3%)	12 / 238 (5.0%)
28	13_160517 vs 16_160517	1023	2880	14 / 687 (2.0%)	281 / 1976 (14.2%)	11 / 217 (5.1%)
29	17_160517 vs 18_160517	767	2497	27 / 590 (4.6%)	185 / 1727 (10.7%)	9 / 180 (5.0%)
30	17_160517 vs 19_160517	850	2541	17 / 620 (2.7%)	263 / 1727 (15.2%)	12 / 194 (6.2%)
31	17_160517 vs 20_160517	788	2459	14 / 531 (2.6%)	250 / 1702 (14.7%)	18 / 226 (8.0%)

**(3) 예기장대 Col-0 및 CyPPO8 형질전환체 RNA Seq. 분석 결과 요약**

Col-0/dark 18 h SF 처리한 샘플에서는 dark (At3g47340/ASN1/DIN6)와 노화관련 유전자(At4g35770/SEN1)의 발현이 증가하였으나, Col-0/dark 18 h TF 처리한 샘플에서는

이들 유전자들의 발현이 증가되지 않음. (At3g47340/ASN1/DIN6: glutamine-dependent asparagine synthase 1) (표 4-5)

Col-0/dark 18 h, light 3 h, SF 처리 샘플에서 노화(SAGs) 및 병저항성 (PRs) 관련 유전자들의 발현이 증가함.

**표 4-5. Tiafenacil(TF) 및 saflufenacil(SF) 처리에 의해 Col-0에서 차이를 보이는 유전자**

DEG4 (1:5)	DEG5 (1:9)	DEG6 (1:13)		DEG7 (1:17)	
Col-0/DMSO : Col-0/dark 18 h TF	Col-0/DMSO : Col-0/dark 18 h SF	Col-0/DMSO : Col-0/dark 18 h + light 3 h, TF		Col-0/DMSO : Col-0/dark 18 h + light 3 h SF	
At1g66600 (AtWRKY63) [28]	At1g36622/At1g36640 [47]	At1g53540 [111]	At2g15780 [78]	At1g75040 (PR5) [223]	At2g43570 [389]
At1g36622/At1g36640 (unknown protein) [42]	At1g62420 [33]	At1g11925 [40]	At4g22470 [30]	At1g02920 [660]	At3g02480 [48]
At1g62420 (unknown protein)[38]	At2g02930 [59]	At1g36622/At1g36640 [146]	At5g50760 [51]	At1g60730 [105]	At3g26830 (PAD3) [135]
At2g02930 (AtGSTF3/Glutathione S-TRANSFERASE 16) [54]	At2g31945 [35]	At2g31945 [51]	At5g36970 [35]	At1g76930 [163]	At3g44300 [205]
At2g31945 (unknown protein) [57]	At2g39518 [42]	At2g39518 [80]	At5g57510 [65]	At1g05380 [6324]	At4g02380 [313]
At2g39518 (unknown protein) [36]	At3g02480 (ABA-responsive protein)[41]		At1g75830 [60]	At2g29350 (SAG13) [355]	At5g20230 (ATBCB/SAG14) [500]
At4g37220 (Cold acclimation protein) [34]	At4g39675 (unknown protein) [45]	At3g02480 [69]		At2g14610 (PR1) [669]	At5g49480 [200]

PPO계 제초제에 의한 약해반응이 잎에서 membrane 구조가 파괴되고, ROS가 생성되어 결국 잎이 갈변하고 고사하는 등의 결과로 나타나기 때문에, 위의 전사체 비교결과에서 노화 및 병저항성 관련 유전자의 발현변화를 보인 것은 노화와 병저항성 관련 유전자들 가운데 세포내 스트레스에 공통적으로 관여하는 유전자들이 포함될 수 있다는 점에서 유의미한 결과로 판단됨.

또한, Saflufenacil 처리시 Tiafenacil에 비해 잎이 더 건조한 경우가 관찰된 점(data not shown)을 미루어보아 Saflufenacil 처리군에서 Tiafenacil 처리군에서 보다 노화 등 관련 유전자 발현변화가 크게 나타난 점도 설명이 가능한 부분임.



#### (4) Tetrapyrrole 및 Carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

PPO계 제초제의 작용점이 Tetrapyrrole 생합성 경로이고, 또한 carotenoid 생합성 경로의 PDS도 일부 PPO계 제초제가 억제한다고 알려져 있기 때문에, Tiafenacil 및 Saflufenacil 처리시 직접적인 변화가 이들 생합성 경로와 관련된 유전자들의 발현에서 관찰되는 지 확인함.

먼저, 서로 다른 형질전환체들 및 서로 다른 제초제 처리 조건들에서의 48개 Tetrapyrrole 생합성 관련유전자의 발현 양상 비교 분석을 수행함 (그림 4-12).

4개의 서로 다른 식물체들에서 4개의 유전자 (PORC, PCB2, CHLI1, CHLI2)의 발현이 모두 감소하는 경향을 보임. 반면에, 4개의 유전자 (ATMES16, HEMA2, HO4, PORA)의 발현은 모두 증가하는 경향을 보임. 전반적으로 Tetrapyrrole 생합성 관련 유전자의 발현은 모든 식물체에서 서로 다른 제초제 처리 조건하에서도 유사한 양상을 보임을 확인할 수 있었음 (그림 4-13, 4-14, 4-15, 4-16).

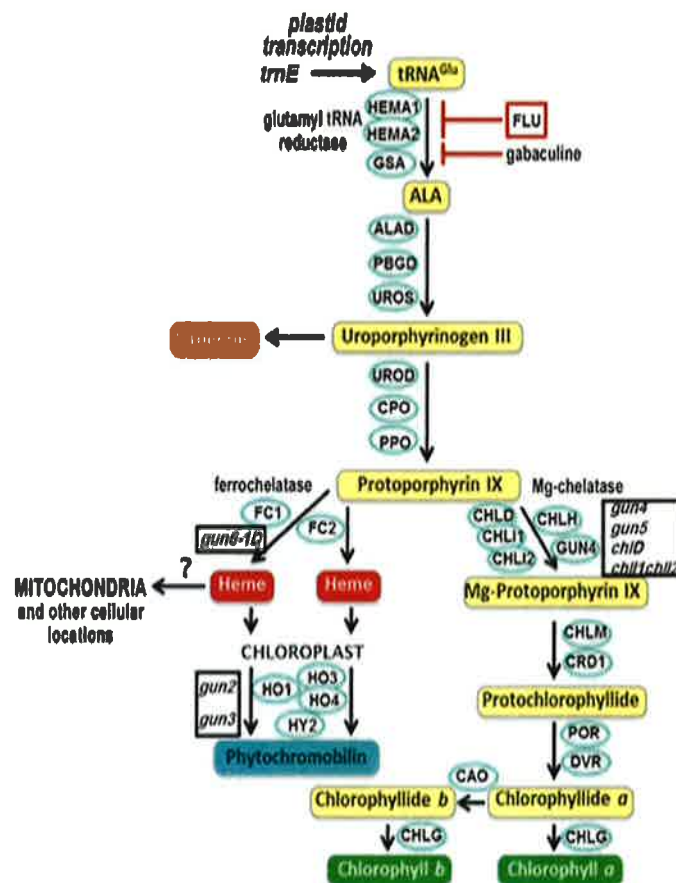


그림 4-12. Tetrapyrrole 생합성 경로 및 관여하는 유전자

GeneAcc	GeneAcc	NcbiGene	GeneName	DEG:1_160517 vs 5_160517:Log2fc	DEG:1_160517 vs 9_160517:Log2fc	DEG:1_160517 vs 13_160517:Log2fc	DEG:1_160517 vs 17_160517:Log2fc
AT1G03475	AT1G03475	839489	LIN2	-2.3	-1.8	-2.37	-1.23
AT1G03630	AT1G03630	839009	POR C	-4.64	-3.51	-3.17	-1.28
AT1G08520	AT1G08520.L01	837374	ALB1	-0.95	-0.73	-2.36	-1.13
AT1G09940	AT1G09940	837528	HEMA2	1.95	1.4	1.18	0.18
AT1G15220	AT1G15220	838089	ATCCMH	0.52	0.75	-0.63	0.06
AT1G19670	AT1G19670	838554	ATCLH1	-2.08	-2.57	1.48	-0.28
AT1G44318	AT1G44318	841025	hemb2	0	0	0	0
AT1G44446	AT1G44446	841029	CH1	0.76	1.18	-0.26	0.51
AT1G50170	AT1G50170	841439	ATSIRB	-0.53	-0.45	-0.75	-0.52
AT1G58290	AT1G58290	842198	HEMA1	0.91	1.18	0.64	0.85
AT1G58300	AT1G58300	842199	HO4	1.41	1.4	2.08	2.48
AT1G69720	AT1G69720.L01	843308	HO3	-0.67	1.2	0.2	1.56
AT1G69740	AT1G69740	843310	HEMB1	-0.77	-0.87	-0.84	-1.12
AT1G74470	AT1G74470.L01	843788	CHLP	-0.43	0.2	-1.44	0.18
AT2G26540	AT2G26540.L01	817195	HEMD	-1.75	-1.7	-1.56	-1.43
AT2G26550	AT2G26550.L01	817196	HO2	-1.68	-1.6	-2.41	-0.68
AT2G26670	AT2G26670	817208	HV1	0.32	0.57	-0.75	-0.48
AT2G31250	AT2G31250	817682	HEMA3	-1.95	-3.22	0.24	-0.96
AT2G40490	AT2G40490.L01	818644	HEME2	-2.81	-2.16	-2.63	-1.33
AT3G09150	AT3G09150.L01	820069	HV2	-0.54	-0.83	-0.65	-0.14
AT3G14110	AT3G14110.L01	820628	FLU	-1.4	-0.84	-1.76	-0.74
AT3G14930	AT3G14930.L01	820722	HEME1	-2.23	-1.6	-1.81	-1.07
AT3G48730	AT3G48730	824034	GSA2	-3.37	-2.54	-3.45	-1.53
AT3G51790	AT3G51790	824342	ATG1	0.72	0.58	1.87	0.45
AT3G51820	AT3G51820.L01	824345	ATG4	-3.35	-2.52	-2.7	-1.38

DEG1 : DEG5      DEG1 : DEG9      DEG1 : DEG13      DEG1 : DEG17

그림 4-13. Col-0에서 다양한 제초제 처리에 따른 Tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

GeneAcc	GeneAcc	NcbiGene	GeneName	DEG:2_160517 vs 6_160517:Log2fc	DEG:2_160517 vs 10_160517:Log2fc	DEG:2_160517 vs 14_160517:Log2fc	DEG:2_160517 vs 18_160517:Log2fc
AT1G03475	AT1G03475	839489	LIN2	-1.75	-1.66	-1.04	-1.13
AT1G03630	AT1G03630	839009	POR C	-3.51	-3.9	-0.56	-1.37
AT1G08520	AT1G08520.L01	837374	ALB1	-0.54	-0.53	-1.01	-1.16
AT1G09940	AT1G09940	837528	HEMA2	1.33	1.08	0.33	0.41
AT1G15220	AT1G15220	838089	ATCCMH	0.73	0.5	0.18	-0.41
AT1G19670	AT1G19670	838554	ATCLH1	-3.12	-3.86	0.18	0.24
AT1G44318	AT1G44318	841025	hemb2	0	0	0	0
AT1G44446	AT1G44446	841029	CH1	1.1	1.16	0.51	0.32
AT1G50170	AT1G50170	841439	ATSIRB	-0.51	-0.36	-0.12	-0.32
AT1G58290	AT1G58290	842198	HEMA1	1.17	1.29	1.1	0.85
AT1G58300	AT1G58300	842199	HO4	1.2	2.98	1.48	2.12
AT1G69720	AT1G69720.L01	843308	HO3	-0.37	0.06	0.45	0.24
AT1G69740	AT1G69740	843310	HEMB1	-0.62	-0.66	-0.67	-0.78
AT1G74470	AT1G74470.L01	843788	CHLP	0.44	0.41	0.27	0.06
AT2G26540	AT2G26540.L01	817195	HEMD	-1.42	-1.52	-1.14	-0.96
AT2G26550	AT2G26550.L01	817196	HO2	-1.16	-1.36	-0.55	-0.39
AT2G26670	AT2G26670	817208	HV1	0.59	0.63	-0.1	-0.43
AT2G31250	AT2G31250	817682	HEMA3	-0.14	-0.42	-3.68	-3.25
AT2G40490	AT2G40490.L01	818644	HEME2	-1.67	-1.7	-0.55	-1.04
AT3G09150	AT3G09150.L01	820069	HV2	-0.49	-0.48	0.45	-0.13
AT3G14110	AT3G14110.L01	820628	FLU	-0.81	-0.85	-0.13	-0.79
AT3G14930	AT3G14930.L01	820722	HEME1	-1.05	-1.12	-0.36	-0.79
AT3G48730	AT3G48730	824034	GSA2	-2.12	-2.38	-0.94	-1.51
AT3G51790	AT3G51790	824342	ATG1	-0.35	-0.39	0.49	0.21
AT3G51820	AT3G51820.L01	824345	ATG4	-1.98	-2.29	-0.76	-1.01

DEG2 : DEG6      DEG2 : DEG10      DEG2 : DEG14      DEG2 : DEG18

그림 4-14. CyPPO8-40 애기장대 형질전환체에서 다양한 제초제 처리에 따른 Tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

GeneAcc	GeneAcc	NcbiGene	GeneName	DEG:3_160517 vs 7_160517:Log2fc	DEG:3_160517 vs 11_160517:Log2fc	DEG:3_160517 vs 15_160517:Log2fc	DEG:3_160517 vs 19_160517:Log2fc
AT1G03475	AT1G03475	839489	LIN2	-1.67	-1.66	-1.22	-1.28
AT1G03630	AT1G03630	839009	POR C	-1.87	-1.88	-0.23	-1.27
AT1G08520	AT1G08520.L01	837374	ALB1	-0.37	-0.28	-0.68	-0.95
AT1G09940	AT1G09940	837528	HEMA2	1.22	1.64	-0.28	0.33
AT1G15220	AT1G15220	838089	ATCCMH	0.87	0.36	0.1	-0.17
AT1G19670	AT1G19670	838554	ATCLH1	-2.92	-2.3	-0.68	-0.31
AT1G44318	AT1G44318	841025	hamb2	0	100	0	0
AT1G44446	AT1G44446	841029	CH1	1.82	1.7	1.89	0.89
AT1G50170	AT1G50170	841439	ATSIRB	-0.62	-0.4	-0.06	-0.28
AT1G58290	AT1G58290	842198	HEMA1	2.09	1.71	2.32	1.51
AT1G58300	AT1G58300	842199	HO4	2.33	1.59	1.61	0.58
AT1G69720	AT1G69720.L01	843308	HO3	-0.18	0.12	0.37	1.36
AT1G69740	AT1G69740	843310	HEMB1	-0.9	-0.56	-1.06	-0.98
AT1G74470	AT1G74470.L01	843788	CHLP	0.73	0.3	0.88	0.24
AT2G26540	AT2G26540.L01	817195	HEMD	-0.96	-1.15	-1.19	-1.2
AT2G26550	AT2G26550.L01	817196	HO2	-0.89	-0.87	-0.25	-0.54
AT2G26670	AT2G26670	817208	HY1	0.32	0.3	-0.29	-0.63
AT2G31250	AT2G31250	817682	HEMA3	-0.75	-0.02	-2.75	-2.27
AT2G40490	AT2G40490.L01	818644	HEME2	-1.98	-1.96	-0.84	-1.28
AT3G09150	AT3G09150.L01	820069	HY2	-1	-0.41	-0.17	-0.5
AT3G14110	AT3G14110.L01	820628	FLU	-0.53	-0.82	-0.26	-0.69
AT3G14930	AT3G14930.L01	820722	HEME1	-1.06	-1.03	-0.31	-0.85
AT3G48730	AT3G48730	824034	GSA2	-2.74	-2.35	-1.19	-1.59
AT3G51790	AT3G51790	824342	ATG1	-0.05	0.5	0.19	0.22
AT3G51820	AT3G51820.L01	824345	ATG4	-2.41	-1.73	-0.98	-1.1

DEG3 : DEG7      DEG3 : DEG11      DEG3 : DEG15      DEG3 : DEG19

그림 4-15. CyPPO8-1 애기장대 형질전환체에서 다양한 제초제 처리에 따른 Tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

GeneAcc	GeneAcc	NcbiGene	GeneName	DEG:4_160517 vs 8_160517:Log2fc	DEG:4_160517 vs 12_160517:Log2fc	DEG:4_160517 vs 16_160517:Log2fc	DEG:4_160517 vs 20_160517:Log2fc
AT1G03475	AT1G03475	839489	LIN2	-1.33	-1.3	-1.29	-1.36
AT1G03630	AT1G03630	839009	POR C	-3.96	-4.04	-0.7	-1.45
AT1G08520	AT1G08520.L01	837374	ALB1	-0.76	-0.77	-1.06	-1.42
AT1G09940	AT1G09940	837528	HEMA2	0.9	1.64	-0.3	-0.28
AT1G15220	AT1G15220	838089	ATCCMH	0.48	0.78	0.21	-0.4
AT1G19670	AT1G19670	838554	ATCLH1	-0.02	-0.73	-0.24	0.31
AT1G44318	AT1G44318	841025	hamb2	0	0	0	0
AT1G44446	AT1G44446	841029	CH1	1.37	1.55	0.93	0.52
AT1G50170	AT1G50170	841439	ATSIRB	-0.5	-0.3	-0.25	-0.11
AT1G58290	AT1G58290	842198	HEMA1	1.47	1.59	1.32	0.94
AT1G58300	AT1G58300	842199	HO4	3.24	3.91	2.2	3.03
AT1G69720	AT1G69720.L01	843308	HO3	-0.13	0.44	0.2	1.55
AT1G69740	AT1G69740	843310	HEMB1	-0.87	-0.73	-0.99	-0.96
AT1G74470	AT1G74470.L01	843788	CHLP	0.26	0.32	0.25	-0.02
AT2G26540	AT2G26540.L01	817195	HEMD	-1.29	-1.15	-1.24	-1.3
AT2G26550	AT2G26550.L01	817196	HO2	-1.38	-1.45	-0.74	-1.05
AT2G26670	AT2G26670	817208	HY1	0.29	0.59	-0.35	-0.34
AT2G31250	AT2G31250	817682	HEMA3	0.65	-0.44	-0.75	-3.17
AT2G40490	AT2G40490.L01	818644	HEME2	-1.97	-1.9	-0.85	-1.26
AT3G09150	AT3G09150.L01	820069	HY2	-0.93	-1	-0.66	-0.13
AT3G14110	AT3G14110.L01	820628	FLU	-0.81	-0.76	-0.34	-1.02
AT3G14930	AT3G14930.L01	820722	HEME1	-1.26	-1.05	-0.53	-1.01
AT3G48730	AT3G48730	824034	GSA2	-2.45	-2.58	-1.37	-1.94
AT3G51790	AT3G51790	824342	ATG1	-0.09	0	0.14	-0.05
AT3G51820	AT3G51820.L01	824345	ATG4	-2.26	-2.16	-1.25	-1.48

DEG4 : DEG8      DEG4 : DEG12      DEG4 : DEG16      DEG4 : DEG20

그림 4-16. AtDM 애기장대 형질전환체에서 다양한 제초제 처리에 따른 Tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석



다음으로, 15개 Carotenoid 생합성 유전자의 발현 양상 비교 분석함 (그림 4-17, 표 4-6, 4-7, 4-8, 4-9).

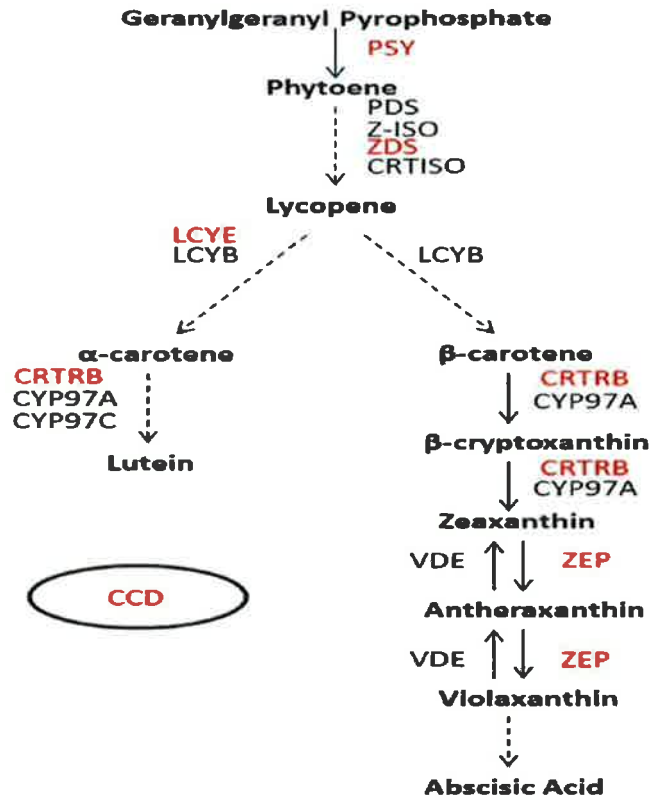


그림 4-17. Carotenoid 생합성 경로 및 관여 유전자

표 4-6. Col-0에서 다양한 제초제 처리에 따른 Carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

Customer ID	GeneName	DEG:1_160517 vs 5_160517:Log2fc	DEG:1_160517 vs 9_160517:Log2fc	DEG:1_160517 vs 13_160517:Log2fc	DEG:1_160517 vs 17_160517:Log2fc
AT1G06820	CRTISO	-0.84	-1.3	-1.34	-0.6
AT1G08550	NPQ1	-1.65	-1.5	-2.12	-0.66
AT1G10830	Z-ISO	-1.08	-1.32	-0.68	-0.87
AT1G31800	CYP97A3	-3.09	-3.03	-2.67	-1.09
AT1G57770	CRTISO	-2.37	-2.69	-2.26	-1.5
AT1G67080	ABA4	-1.51	-1.05	-1.51	-0.8
AT3G04870	ZDS	-1.06	-1.04	-0.49	0.01
AT3G10230	LYC	-0.18	-0.03	-0.98	-0.56
AT4G14210	PDS3	-1.39	-1.25	-1.51	-0.3
AT4G15110	CYP97B3	-1.91	-1.88	-1.68	-0.99

AT4G25700	BETA-OH ASE 1	-0.43	-0.82	0.39	-0.41
AT5G17230	PSY	-3.07	-2.49	-1.83	-0.64
AT5G52570	BETA-OH ASE 2	4.57	3.44	5.2	2.4
AT5G57030	LUT2	-3.27	-2.96	-2.29	-0.77
AT5G67030	ABA1	1.14	0.82	0.81	0.59

표 4-7 . CyPPO8 애기장대 형질전환체에서 다양한 제초제 처리에 따른 Carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

Customer ID	GeneName	DEG:2_160517 vs 6_160517:Log2fc	DEG:2_160517 vs 10_160517:Log2fc	DEG:2_160517 vs 14_160517:Log2fc	DEG:2_160517 vs 18_160517:Log2fc
AT1G06820	CRTISO	-1.05	-0.91	-0.34	-0.62
AT1G08550	NPQ1	-1.32	-1.3	-0.69	-0.63
AT1G10830	Z-ISO	-1.3	-1.69	-0.33	-0.83
AT1G31800	CYP97A3	-2.76	-3.04	-0.71	-1.18
AT1G57770	CRTISO	-1.95	-2.47	-0.82	-1.56
AT1G67080	ABA4	-0.85	-0.97	-0.54	-0.51
AT3G04870	ZDS	-1.05	-0.81	0	-0.13
AT3G10230	LYC	-0.22	-0.07	-0.1	-0.57
AT4G14210	PDS3	-1.25	-1.56	-0.18	-0.54
AT4G15110	CYP97B3	-1.39	-1.39	-0.45	-0.86
AT4G25700	BETA-OHA SE 1	-0.35	-0.23	0.14	-0.6
AT5G17230	PSY	-2.57	-2.55	-0.52	-0.9
AT5G52570	BETA-OHA SE 2	3.1	3.62	3.28	3.7
AT5G57030	LUT2	-3.03	-3.17	-0.66	-0.88
AT5G67030	ABA1	1.21	1.25	1.05	1.1

표 4-8. CyPPO8-1 애기장대 형질전환체에서 다양한 제초제 처리에 따른 Carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

Customer ID	GeneName	DEG:3_160517 vs 7_160517:Log2fc	DEG:3_160517 vs 11_160517:Log2fc	DEG:3_160517 vs 15_160517:Log2fc	DEG:3_160517 vs 19_160517:Log2fc
AT1G06820	CRTISO	-1.17	-0.85	-0.5	-0.46
AT1G08550	NPQ1	-0.97	-1.4	-0.44	-0.54
AT1G10830	Z-ISO	-1.16	-1.27	-0.19	-0.89
AT1G31800	CYP97A3	-2.85	-2.64	-0.68	-0.89
AT1G57770	CRTISO	-2.19	-2.18	-0.86	-1.47
AT1G67080	ABA4	-0.71	-1.06	-0.49	-0.76
AT3G04870	ZDS	-0.93	-0.96	0.08	-0.02
AT3G10230	LYC	-0.01	-0.22	-0.23	-0.59
AT4G14210	PDS3	-1.16	-1.07	-0.19	-0.2
AT4G15110	CYP97B3	-1.6	-1.33	-0.49	-0.84



AT4G25700	BETA-OH ASE 1	-0.7	-0.37	-0.16	-0.6
AT5G17230	PSY	-2.22	-2.62	0	-0.81
AT5G52570	BETA-OH ASE 2	6.51	6.07	4.18	4.39
AT5G57030	LUT2	-3.18	-2.62	-0.21	-1.01
AT5G67030	ABA1	1.42	1.3	0.94	0.82

표 4-9. AtDM 애기장대 형질전환체에서 다양한 제초제 처리에 따른 Carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현양상 비교 분석

Customer ID	GeneName	DEG:4_160517	DEG:4_160517	DEG:4_160517	DEG:4_160517
		vs 8_160517:Log2fc	vs 12_160517:Log2fc	vs 16_160517:Log2fc	vs 20_160517:Log2fc
AT1G06820	CRTISO	-0.95	-1.24	-0.53	-1
AT1G08550	NPQ1	-1.54	-1.58	-1.01	-0.99
AT1G10830	Z-ISO	-1.72	-1.56	-0.78	-1.01
AT1G31800	CYP97A3	-3.13	-3.11	-0.94	-1.26
AT1G57770	CRTISO	-2.41	-2.47	-1.46	-1.97
AT1G67080	ABA4	-0.59	-0.73	-0.33	-0.12
AT3G04870	ZDS	-1.34	-1.21	-0.37	-0.12
AT3G10230	LYC	-0.2	0.06	-0.26	-0.34
AT4G14210	PDS3	-1.36	-1.16	-0.26	-0.12
AT4G15110	CYP97B3	-1.64	-1.71	-0.68	-1.11
AT4G25700	BETA-OH ASE 1	-0.97	-0.48	-0.36	-1.03
AT5G17230	PSY	-2.61	-2.74	-0.43	-0.78
AT5G52570	BETA-OH ASE 2	4.49	4.8	2.6	2.64
AT5G57030	LUT2	-3.14	-3.53	-0.63	-0.89
AT5G67030	ABA1	1.07	1.06	0.57	0.45

다양한 처리에 따라 Carotenoid 생합성 관련 유전자들중에서 몇 개의 유전자들에서 발현 양상에 차이를 관찰할 수 있었으며, 특히 beta-OHASE2 유전자는 발현이 증가하는 양상을 보인 반면에, CYP97A3, CRTISO 그리고 LUT2 유전자는 발현이 감소하는 양상을 보임.

전반적으로 대조구인 Col-0와 CyPPO8-1 애기장대 형질전환 식물체들 사이에서 서로 다른 제초제 처리에 따른 Carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 관찰할 수 없었음.

위 전사체 분석에서 처리조건 및 형질전환체 별 뚜렷한 발현 차이를 관찰하지 못한 원인에 대해, 형질전환체와 Col-0간의 약해반응을 분명하게 관찰하기 위해서는 1uM Tiafenacil 또는 Saflufenacil 처리 농도가 충분하지 않았던 것으로 판단하여, 보다 강한 제초제 내성을 보이는 형질전환체(CyPPO10-3)를 대상으로 더 높은 농도의 제초제를 처리하고 시간대 별로 분석하는 조건으로 다시 전사체 분석을 진행하기로 함.

다. CyPPO10-3 형질전환체의 전사체 분석

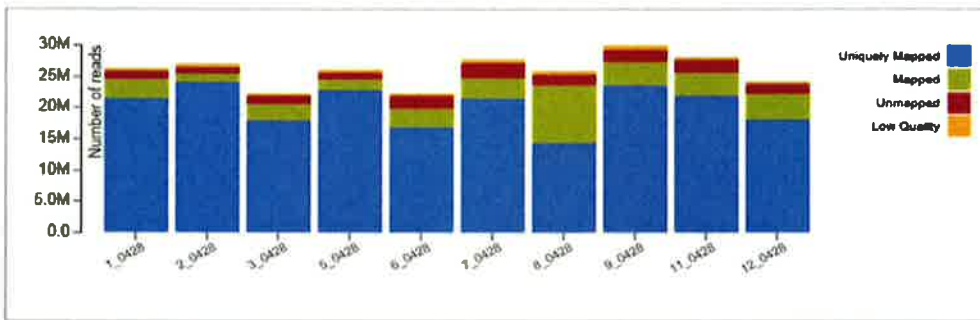
(1) CyPPO10-3 애기장대 형질전환체 대상 RNA Seq. 분석을 위한 sampling 및 RNA 추출

RNA Seq. 분석을 위한 시료로 총 10개의 samples을 선별하여 total RNA를 분리한 후, 분석 시료로 사용함 (표 4-10, 그림 4-18, 4-19, 4-20). 실질적으로 차이를 보이지 않는 samples인 (4번과 10번 샘플은 제외시킴)

표 4-10. 처리 조건 및 RNA 추출 결과

Sample #	Genotype	처리약제	처리시간 (h)	RNA Conc.	A <sub>260/280</sub> ratio
1	Col-0	DMSO	0	652.24	2.0
2			2	728.65	2.1
3			6	973.21	2.1
4		5 uM Tiafenacil	0	1031.47	2.0
5			2	918.42	2.0
6			6	864.05	2.1
7	CyPPO10-3	DMSO	0	925.43	2.1
8			2	993.74	2.0
9			6	851.62	2.0
10		5 uM Tiafenacil	0	744.83	2.1
11			2	1203.63	2.0
12			6	913.52	2.1

### Sequencing



### Read Alignment

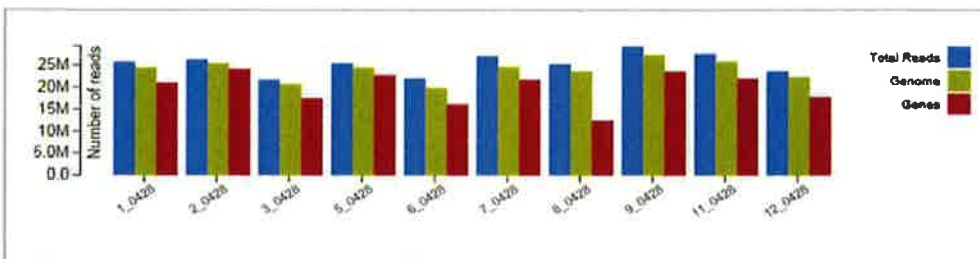


그림 4-18. RNA Seq. 분석 샘플들의 sequencing 및 read alignment

### Gene Coverage



### Expression

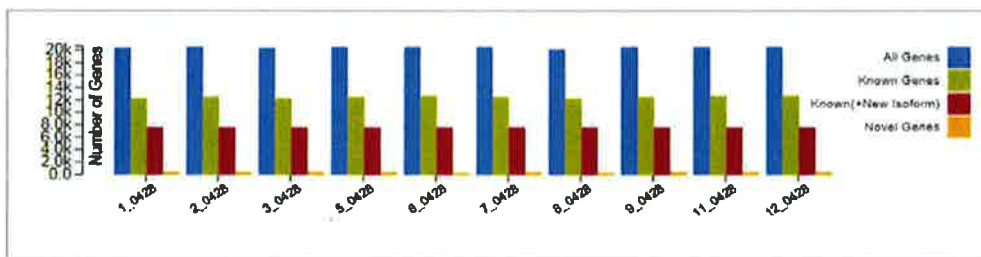


그림 4-19. RNA Seq. 분석 샘플들의 gene coverage 및 expression

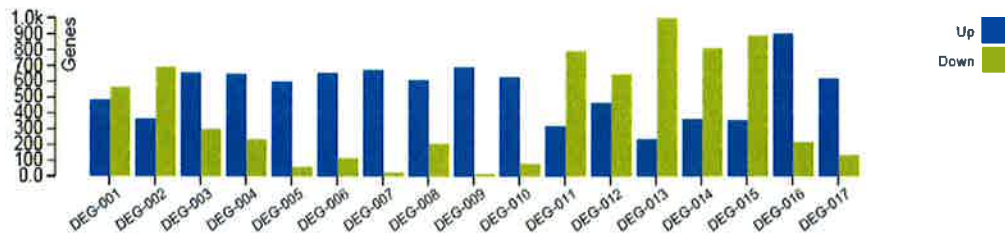


그림 4-20. RNA Seq. 분석 샘플별 DEG (Differentially Expression Genes)

(2) CyPPO10-3 형질전환체 대상 RNA Seq. 분석 결과

처리 조건 및 식물체 총 17가지 비교군을 선정하여 샘플들 간의 전사체 발현양상의 차이를 비교분석(DEG 분석)함 (표 4-11, 4-12, 4-13).

표 4-11. 각 DEG 비교결과 요약

DEG	Group 1 (sample #)	Group 2 (sample #)	Comment	결과 요약
1	1	2	Col-0에서 TF처리하지 않은 상태에서 0h와 2h 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 증가(UP, 27 genes) 또는 감소하는(DOWN, 64 genes) 경향을 보이는 전사체들이 존재함.
2	1	3	Col-0에서 TF 처리하지 않은 상태에서 0h와 6h 사이의 발현 양상 비교	발현양상에서 뚜렷하게 감소하는(DOWN, 126 genes) 경향을 보이는 전사체들이 증가양상(UP, 24 genes)을 보이는 전사체들보다 많음
3	1	5	Col-0에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5µM)에서 2h 처리한 샘플 사이의 발현 양상 비교	DEG3에서는 발현양상에서 뚜렷하게 증가(UP, 106 genes) 또는 감소하는(DOWN, 32 genes) 경향을 보이는 전사체들이 존재함.
4	1	6	Col-0에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5µM)에서 6h 처리한 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 증가하는(UP, 303 genes) 경향을 보이는 전사체들이 감소하는(DOWN, 57 genes) 전사체들보다 월등히 많음. 이들 유전자들이 아마도 제초제(TF) 처리에 의해 발현 양상에 차이를 보이는 전사체들임.
5	1	7	Col-0와 CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태에서 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 감소하는(DOWN) 양상을 보이는 전사체가 없었음. Col-0와 CyPPO10-3 형질전환체 사이에 제초제 처리 전에는 전사체 변동이 없다는 증거임.
6	2	5	Col-0에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5µM) 처리한 후 각 2h 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 감소하는(DOWN) 양상을 보이는 전사체가 없었음.
7	2	11	Col-0와 CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태에서 2h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 감소하는(DOWN) 양상을 보이는 전사체가 없었음.
8	3	6	Col-0에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5µM) 처리한 후 각 6h 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 증가하는(UP, 358 genes) 경향을 보이는 전사체들이 감소하는(DOWN, 55 genes) 양상을 보이는 전사체들보다 많았으며, DEG4와 유사한 양상을 보임.
9	3	9	Col-0와 CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태에서 6h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 감소하는(DOWN) 양상을 보이는 전사체가 없음. DEG5의 결과와 유사한편, Col-0와 CyPPO10-3 식물체 사이에 Tiafenacil 제초체를 처리한 후 UP & DOWN 전사체들의 발현양상 비교에 차이가 없다는 것은 두 식물체들이 제초제 처리에 의해 유사한 생리/생화학적 반응양상을 보인다는 간접적인 증거라고 보임.

10	5	8	Col-0와 CyPPO10-3에서 TF(5μM) 처리한 후 2h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷하게 감소하는(DOWN) 양상을 보이는 전사체가 없음
11	6	12	Col-0와 CyPPO10-3에서 TF(5μM) 처리한 후 6h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	감소하는(DOWN) 경향을 보이는 전사체들이 증가하는(UP) 양상을 보이는 전사체들보다 많음.
12	7	8	CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5μM) 처리한 2h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷한 변화 없음
13	7	9	CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태에서 0h와 6h 사이의 발현 양상 비교	감소하는(DOWN) 경향을 보이는 전사체들이 증가하는(UP) 양상을 보이는 전사체들보다 많음.
14	7	11	CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태에서 0h와 2h 사이의 발현 양상 비교	뚜렷한 변화 없음
15	7	12	CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5μM) 처리한 6h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	감소하는(DOWN) 경향을 보이는 전사체들이 증가하는(UP) 양상을 보이는 전사체들보다 많음.
16	9	8	CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 6h 샘플과 TF(5μM) 처리한 6h 경과 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷한 변화 없음
17	9	12	CyPPO10-3에서 TF 처리하지 않은 상태와 TF(5μM) 처리한 후 각 6h 후 샘플 사이의 발현 양상 비교	뚜렷한 차이를 보이는 전사체가 없었음. 흥미롭게도 유사한 처리 상태인 Col-0 (DEG8)에서는 상당히 많은 전사체들이 증가하는(UP) 양상을 보였음.

표 4-12. CyPPO10-3 예기장대 형질전환체 RNA Seq. 분석 결과

DEG	Group 1 (G1)	Group 2 (G2)	Sum	Genes	
				Up (G2 only)	Down (G1 only)
1	1_0428	2_0428	1,054	483 (50)	571 (30)
2	1_0428	3_0428	1,061	365 (45)	696 (50)
3	1_0428	5_0428	957	654 (96)	303 (31)
4	1_0428	6_0428	889	647 (254)	242 (115)
5	1_0428	7_0428	672	604 (89)	68 (18)
6	2_0428	5_0428	769	654 (23)	115 (14)
7	2_0428	11_0428	698	673 (54)	25 (15)
8	3_0428	6_0428	815	609 (157)	206 (87)
9	3_0428	9_0428	719	698 (42)	21 (10)
10	5_0428	8_0428	710	631 (24)	79 (17)
11	6_0428	12_0428	1,122	323 (72)	799 (73)
12	7_0428	8_0428	1,110	462 (51)	648 (51)
13	7_0428	9_0428	1,242	237 (43)	1,005 (59)
14	7_0428	11_0428	1,170	361 (44)	809 (28)
15	7_0428	12_0428	1,256	357 (65)	899 (55)
16	9_0428	8_0428	1,119	904 (31)	215 (25)
17	9_0428	12_0428	764	623 (27)	141 (25)

표 4-13. CyPPO10-3 형질전환체의 GO (Gene Ontology) 분석 결과

DEG	# of gene	# of GO	molecular_ function	biological_ process	cellular_ component
1	1054	2687	17 / 664 (2.6%)	268 / 1794 (14.9%)	15 / 229 (6.6%)
2	1061	2741	32 / 684 (4.7%)	280 / 1841 (15.2%)	13 / 216 (6.0%)
3	957	2827	27 / 707 (3.8%)	265 / 1874 (14.1%)	18 / 246 (7.3%)
4	889	2481	25 / 644 (3.9%)	221 / 1626 (13.6%)	1 / 211 (0.5%)
5	672	2427	13 / 517 (2.5%)	262 / 1700 (15.4%)	30 / 210 (14.3%)
6	769	2507	18 / 591 (3.0%)	277 / 1695 (16.3%)	33 / 221 (14.9%)
7	698	2361	17 / 493 (3.4%)	260 / 1629 (16.0%)	48 / 239 (20.1%)
8	815	2338	14 / 558 (2.5%)	230 / 1597 (14.4%)	0 / 183 (0.0%)
9	719	2464	23 / 531 (4.3%)	302 / 1678 (18.0%)	83 / 255 (32.5%)
10	710	2331	18 / 470 (3.8%)	234 / 1651 (14.2%)	33 / 210 (15.7%)
11	1122	2847	18 / 705 (2.6%)	307 / 1923 (16.0%)	12 / 219 (5.5%)
12	1110	2681	19 / 656 (2.9%)	223 / 1799 (12.4%)	16 / 226 (7.1%)
13	1242	2778	26 / 670 (3.9%)	278 / 1890 (14.7%)	15 / 218 (6.9%)
14	1170	2638	15 / 634 (2.4%)	245 / 1794 (13.7%)	9 / 210 (4.3%)
15	1256	2717	18 / 660 (2.7%)	263 / 1840 (14.3%)	13 / 217 (6.0%)
16	1119	2768	34 / 729 (4.7%)	298 / 1825 (16.3%)	16 / 214 (7.5%)
17	764	2392	35 / 602 (5.8%)	262 / 1594 (16.4%)	14 / 196 (7.1%)

DEG2와 DEG4에서 보이는 Down 유전자 리스트를 비교 분석한 결과, 공통적으로 log2 scale로 3.0 이상 발현이 감소하는 대표적 유전자들은 아래 표와 같으며, 이들 유전자들의 세포내 위치는 주로 식물의 대표적인 세포내소기관인 엽록체에 존재하였으며, 또한 핵과 골지체에 존재함을 보였다. 유전자들의 주된 기능들은 광합성과 관련된 기능을 수행하는 유전자들이 많았고, 다양한 종류의 광원들에 반응하는 유전자들과 일부 기공이나 세포막에서 물질 수송에 관여하는 기능을 수행하는 단백질도 존재하였으며, 세포벽 modification에 관여하는 유전자들도 존재하였음. 또한 핵내에 존재하면서 다른 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자도 존재. 이러한 결과들은 광합성 저해 제초제 특성에 기인한 유전자 발현 양상에 부합하는 결과로 판단됨 (표 4-14).

표 4-14. DEG2 및 DEG4 분석시 발현 감소 유전자 리스트

Gene	localization & Function
At1g65390	located in chloroplast, carbohydrate binding, involved in defense response
At1g65490	transmembrane protein
At2g34430	light-harvesting chlorophyl-protein complex II subunit B1, located in chloroplast, response to light stimulus, chlorophyll binding
At3g10720	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily, involved in cell wall modification, aspartyl esterase activity
At3g27690	light-harvesting chlorophyl B-binding 2, response to lights (red, blue, far red etc) stimulus, cold, & desiccation, chlorophyll binding
At3g50060	Myb domain protein 77, located in nucleus, response to chitin, ethylene, salicylic acid





<b>At3g54500</b>	located in nucleus, agglutinin-like protein night light-inducible and clock-regulated 2
<b>At4g02330</b>	AtPME41, pectin methylesterase 41, involved in cell wall modification, response to brassinosteroid, cold, & fungus
<b>At4g08950</b>	Exordium, Phosphate-responsive 1 family protein, response to brassinosteroid, located in Golgi apparatus
<b>At4g18205</b>	AtPUP21, Purine permease 21, expressed in guard cell Nucleotide-sugar transporter family protein
<b>At5g06980</b>	night light-inducible and clock-regulated 4, located in nucleus, response to karrikin
<b>At5g45340</b>	Cytochrome P450 family, involved in ABA catabolism, KO Mutant results in more drought tolerance whereas OX plant results in increased transpiration rate and reduced drought tolerance. involved in postgermination growth response to red/far red light & water deprivation

한편, DEG2와 DEG4에서 보이는 Up 유전자 리스트를 비교 분석한 결과, 공통적으로 log<sub>2</sub> scale로 3.0 이상 증가하는 대표적 유전자들은 아래 표와 같으며, 이들 유전자들의 세포내 위치는 위의 down 유전자들에서 보이는 바와는 다르게 세포내 다양한 기관들에 존재하였으며, 해당 유전자들의 기능도 다양하여 산화-환원 반응에 관여하는 유전자, 세포벽 modification 및 세포벽 분화 및 증식에 관여하는 유전자, sucrose efflux에 관여하는 유전자가 존재하였음 (표 4-15).

표 4-15. DEG2 및 DEG4 분석시 발현 증가 유전자 리스트

Gene	localization & Function
<b>At1g26770</b>	expansin 10, involved in plant-type cell wall modification, structural constituent of cell wall
<b>At4g12290</b>	Copper amine oxidase family protein, located in Golgi apparatus, expressed in guard cell
<b>At4g12735</b>	peroxisomal protein, located in peroxisome
<b>At5g43450</b>	located in cytoplasm, involved in oxidation-reduction process
<b>At5g23660</b>	AtSWEET12, MTN3, member of the SWEET sucrose efflux transporter family proteins, involved in sucrose transport located in plasma membrane
<b>At5g65870</b>	AtPSK5, Phytosulfokine 5 precursor, located in extracellular matrix, involved in cell differentiation & proliferation

흥미롭게도 DEG8와 DEG10에서 보이는 Up & Down 유전자들의 리스트를 비교 분석한 결과, log<sub>2</sub> scale로 3.0 이상 공통으로 down 또는 up 차이를 보이는 유전자들은 존재하지 않았음. 이는 CyPPO10-3에 Tiafenacil 5uM을 처리하고도 Col-0에 제초제를 처리하지 않은 상태와 같은 유전자 발현 패턴을 보인 것으로서, 처리한 제초제에 대한 내성이 충분히 강한 경우, 식물체내 전사체 변화를 일으키지 않는 것을 확인할 수 있음.

### (3) CyPPO10-3 애기장대 형질전환체 대상 RNA Seq. 결과 분석 - Carotenoid 생합성 관련 유전자의 발현 비교

Carotenoid 생합성경로에 관여하는 유전자들은 애기장대에서 총 16개의 유전자들이 보고되었으며, 이들 유전자들의 제초제 처리별 발현 차이를 분석함.

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:1_0428 vs 2_0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 3_0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 5_0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 6_0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 7_0428:Log2fc
TBIG002373	AT1G57770	CRTISO	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G57770]	0.91	0.47	1.48	-0.23	1.98
TBIG004024	AT1G10830	Z-ISO	15-cis-zeta-carotene isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G10830]	0.57	0.67	1.02	0.38	0.56
TBIG000878	AT1G04850	NPQ1	non-photochemical quenching 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G04850]	0.56	0.36	-0.93	-1.91	-0.2
TBIG019189	AT4G14210	PDS3	phytoene desaturase 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G14210]	0.45	0.18	0.23	-1.26	0.52
TBIG019247	AT4G15110	CYP97B3	cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G15110]	0.38	0.36	0.36	-0.91	0.3
TBIG003800	AT1G06820	CRTISO	carotenoid isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G06820]	0.37	0.49	0.29	-0.85	0.29
TBIG001545	AT1G31800	CYP97A3	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G31800]	0.33	0.52	-0.08	-1.67	-0.23
TBIG006255	AT1G67080	ABA4	abscisic acid (aba)-deficient 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G67080]	0.25	0.06	-0.24	-2.07	-0.84
TBIG024451	AT3G17230	PSY	PHYTOENE SYNTHASE [Source:TAIR;Acc:AT3G17230]	0.16	0.41	-0.11	-1.57	0.4
TBIM025124	AT3G53180	CYP97C1	Carotene epsilon-monooxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q6T8X7]	0.06	0.12	-0.15	-1.13	0.03
TBIG011966	AT3G04870	ZDS	zeta-carotene desaturase [Source:TAIR;Acc:AT3G04870]	-0.02	0.33	-0.04	-0.14	0.17
TBIG023118	AT5G57030	LUT2	Lycopene beta/epsilon cyclase protein [Source:TAIR;Acc:AT5G57030]	-0.1	0.02	-0.85	-2.52	-0.4
TBIG026740	AT5G67030	ABA1	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1) [Source:TAIR;Acc:AT5G67030]	-0.1	-1.21	0.25	-0.81	1.27
TBIG014285	AT3G10230	LYC	lycopene cyclase [Source:TAIR;Acc:AT3G10230]	-0.13	-0.04	-0.18	-1.28	0.58
TBIG019806	AT4G25700	BETA-OHASE 1	beta-hydroxylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G25700]	-0.82	0.29	-0.42	0.9	0.77
TBIG025993	AT5G52570	BETA-OHASE 2	beta-carotene hydroxylase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G52570]	-1.42	-3.6	0.27	3.21	1.69

그림 4-21. Col-0에서 DMSO 및 제초제 (5 μM Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 차이

DMSO 처리한 Col-0에서 carotenoid 생합성 관련 유전자의 발현차이는 거의 보이지 않았고, BETA-OHASE 2 유전자만이 약간 감소하는 양상을 보임(그림 4-21).

Tiafenacil (5μM) 처리한 Col-0에서 상당수의 carotenoid 생합성 관련 유전자의 발현이 감소하였으며, BETA-OHASE 2 만 발현이 증가함. 제초제 처리에 따라 약해반응이 진행되어 carotenoid 생합성이 저해되는 것으로 해석할 수 있음.

또한, 제초제를 처리하지 않은 Col-0와 CyPPO10-3 식물체 내에서의 carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 거의 보이지 않았음. 따라서, CyPPO10-3 유전자의 도입으로 인한 전사체 변화는 거의 없음을 확인함(그림 4-21, 4-22).

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:2_0428 vs 5_0428:Log2fc	DEG:2_0428 vs 1_0428:Log2fc	DEG:3_0428 vs 6_0428:Log2fc	DEG:3_0428 vs 9_0428:Log2fc
TBIG002973	AT1G57770	CRTISO	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G57770]	0.58	0.57	-0.76	0.77
TBIG004024	AT1G10830	Z-ISO	15-cis-zeta-carotene isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G10830]	0.42	-0.02	-0.85	0.01
TBIG000373	AT1G08550	NPQ1	non-photochemical quenching 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08550]	-0.92	-0.67	-2.33	-0.8
TBIG019189	AT4G14210	PD33	phytoene desaturase 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G14210]	-0.23	-0.53	-1.5	-0.26
TBIG019247	AT4G15110	CYP97B3	cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G15110]	-0.04	-0.2	-1.33	-0.09
TBIG003800	AT1G06820	CRTISO	carotenoid isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G06820]	-0.11	-0.19	-1.09	-0.14
TBIG001545	AT1G31800	CYP97A3	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G31800]	-0.44	-0.77	-2.25	-0.56
TBIG006233	AT1G67080	ABA4	abscisic acid (aba)-deficient 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G67080]	-0.52	-1.01	-2.18	-0.46
TBIG024451	AT5G17230	PSY	PHYTOENE SYNTHASE [Source:TAIR;Acc:AT5G17230]	-0.3	-0.09	-2.04	-0.04
TBIM025124	AT3G98130	CYP97C1	Carotene epsilon-monooxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q6TBX7]	-0.24	-0.84	-1.31	-0.05
TBIG011366	AT3G04870	ZDS	zeta-carotene desaturase [Source:TAIR;Acc:AT3G04870]	-0.06	-0.25	-0.53	-0.17
TBIG028118	AT5G57030	LUT2	Lycopene beta/epsilon cyclase protein [Source:TAIR;Acc:AT5G57030]	-0.78	-0.35	-2.6	-0.29
TBIG026740	AT5G67030	ABA1	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1) [Source:TAIR;Acc:AT5G67030]	0.31	0.86	0.64	0.35
TBIG014285	AT3G10230	LYC	lycopene cyclase [Source:TAIR;Acc:AT3G10230]	-0.08	-0.11	-1.29	0.11
TBIG019806	AT4G25700	BETA-OHASE 1	beta-hydroxylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G25700]	0.87	0.89	0.35	0.4
TBIG025993	AT5G52570	BETA-OHASE 2	beta-carotene hydroxylase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G52570]	1.66	0.5	0.75	1.99

그림 4-22. Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5 μM Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 양상 차이

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:7_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 9_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 1_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 1_0428:Log2fc
TBIG002973	AT1G57770	CRTISO	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G57770]	-0.59	-0.84	-0.59	-1.23
TBIG004024	AT1G10830	Z-ISO	15-cis-zeta-carotene isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G10830]	-0.24	0.01	-0.09	0.06
TBIG000373	AT1G08550	NPQ1	non-photochemical quenching 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08550]	-0.48	-0.05	0.01	-0.49
TBIG019189	AT4G14210	PD33	phytoene desaturase 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G14210]	-0.71	-0.7	-0.68	-0.94
TBIG019247	AT4G15110	CYP97B3	cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G15110]	-0.41	-0.13	-0.2	-0.41
TBIG003800	AT1G06820	CRTISO	carotenoid isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G06820]	-0.51	-0.04	-0.18	-0.2
TBIG001545	AT1G31800	CYP97A3	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G31800]	-0.59	0.08	-0.29	-0.46
TBIG006233	AT1G67080	ABA4	abscisic acid (aba)-deficient 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G67080]	-0.32	0.83	0	0.03
TBIG024451	AT5G17230	PSY	PHYTOENE SYNTHASE [Source:TAIR;Acc:AT5G17230]	-0.9	-0.13	-0.41	-0.61
TBIM025124	AT3G98130	CYP97C1	Carotene epsilon-monooxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q6TBX7]	-0.27	-0.07	-0.4	-0.18
TBIG011366	AT3G04870	ZDS	zeta-carotene desaturase [Source:TAIR;Acc:AT3G04870]	-0.69	-0.11	-0.82	-0.87
TBIG028118	AT5G57030	LUT2	Lycopene beta/epsilon cyclase protein [Source:TAIR;Acc:AT5G57030]	-0.74	0.02	-0.32	-0.45
TBIG026740	AT5G67030	ABA1	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1) [Source:TAIR;Acc:AT5G67030]	-1.09	-2.24	-1.09	-2.17
TBIG014285	AT3G10230	LYC	lycopene cyclase [Source:TAIR;Acc:AT3G10230]	-1.04	-0.63	-0.9	-1.04
TBIG019806	AT4G25700	BETA-OHASE 1	beta-hydroxylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G25700]	-0.94	-0.19	-1.08	-0.38
TBIG025993	AT5G52570	BETA-OHASE 2	beta-carotene hydroxylase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G52570]	-1.03	-3.41	-2.4	-1.9

그림 4-23. CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5 μM Tiafenacil) 처리 후 시간에 따른 발현 양상 차이

CyPPO10-3에서 제초제 처리 유무에 따른 발현차이를 분석함(그림 4-23).

전반적으로 제초제를 처리하기 전과 후에 carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현 양상에는 큰 차이를 보이지 않았고, 단지 BETA-OHASE 2 유전자만이 약간 감소하는 경향을 보임.

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:5_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG:6_0428 vs 1_0428:Log2fc	DEG:9_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG:9_0428 vs 1_0428:Log2fc
TBIG002373	AT1G57770	CRTISO	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G57770]	-0.02	1.06	0.2	-0.4
TBIG004024	AT1G10830	Z-ISO	15-cis-zeta-carotene isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G10830]	-0.64	0.33	-0.3	0.05
TBIG000373	AT1G08550	NPQ1	non-photochemical quenching 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08550]	-0.29	1.3	-0.48	-0.44
TBIG019189	AT4G14210	PDS3	phytoene desaturase 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G14210]	-0.37	0.92	-0.06	-0.24
TBIG019247	AT4G15110	CYP97B3	cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G15110]	-0.42	0.88	-0.32	-0.28
TBIG003800	AT1G06820	CRTISO	carotenoid isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G06820]	-0.46	0.71	-0.51	-0.16
TBIG001545	AT1G31800	CYP97A3	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G31800]	-0.68	1.06	-0.72	-0.55
TBIG006255	AT1G67080	ABA4	abscisic acid (aba)-deficient 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G67080]	-0.87	1.34	-0.7	-0.3
TBIG024451	AT5G17230	PSY	PHYTOENE SYNTHASE [Source:TAIR;Acc:AT5G17230]	-0.34	1.44	-0.82	-0.48
TBIM025124	AT3G53130	CYP97C1	Carotene epsilon-monooxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q6TBX7]	-0.03	0.66	-0.25	-0.52
TBIG011366	AT3G04870	ZDS	zeta-carotene desaturase [Source:TAIR;Acc:AT3G04870]	-0.42	0.02	-0.63	-0.27
TBIG023118	AT5G57030	LUT2	Lycopene beta/epsilon cyclase protein [Source:TAIR;Acc:AT5G57030]	-0.24	1.76	-0.81	-0.47
TBIG026740	AT5G67030	ABA1	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1) [Source:TAIR;Acc:AT5G67030]	-0.01	-0.31	1.1	0.06
TBIG014285	AT3G10230	LYC	lycopene cyclase [Source:TAIR;Acc:AT3G10230]	-0.23	0.9	-0.47	-0.42
TBIG019806	AT4G25700	BETA-OHASE 1	beta-hydroxylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G25700]	0.31	-0.42	-0.8	-0.19
TBIG025993	AT5G52570	BETA-OHASE 2	beta-carotene hydroxylase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G52570]	0.45	-3.34	2.33	1.5

그림 4-24. Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5 μM Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 양상 차이

Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 Tiafenacil (5 μM) 또는 DMSO 처리 후 시간별 샘플에서의 carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 BETA-OHASE 2 유전자를 제외하고는 거의 차이를 보이지 않음(그림 4-24).

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:9_0428 vs 12_0428:Log2fc	DEG:5_0428 vs 11_0428:Log2fc	DEG:9_0428 vs 11_0428:Log2fc
TBIG002373	AT1G57770	CRTISO	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G57770]	0.36	0.03	0.02
TBIG004024	AT1G10830	Z-ISO	15-cis-zeta-carotene isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G10830]	0.04	-0.46	0.16
TBIG000373	AT1G08550	NPQ1	non-photochemical quenching 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08550]	-0.96	0.23	0.49
TBIG019189	AT4G14210	PDS3	phytoene desaturase 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G14210]	-0.52	-0.29	0.05
TBIG019247	AT4G15110	CYP97B3	cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT4G15110]	-0.39	-0.17	0.22
TBIG003800	AT1G06820	CRTISO	carotenoid isomerase [Source:TAIR;Acc:AT1G06820]	-0.32	-0.09	0.34
TBIG001545	AT1G31800	CYP97A3	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G31800]	-1.13	-0.35	0.31
TBIG006255	AT1G67080	ABA4	abscisic acid (aba)-deficient 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G67080]	-0.78	-0.51	0.33
TBIG024451	AT5G17230	PSY	PHYTOENE SYNTHASE [Source:TAIR;Acc:AT5G17230]	-0.54	0.19	0.5
TBIM025124	AT3G53130	CYP97C1	Carotene epsilon-monooxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q6TBX7]	-0.59	-0.11	-0.11
TBIG011366	AT3G04870	ZDS	zeta-carotene desaturase [Source:TAIR;Acc:AT3G04870]	-0.45	-0.21	0.19
TBIG023118	AT5G57030	LUT2	Lycopene beta/epsilon cyclase protein [Source:TAIR;Acc:AT5G57030]	-0.78	0.22	0.43
TBIG026740	AT5G67030	ABA1	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1) [Source:TAIR;Acc:AT5G67030]	0.4	0.03	0.01
TBIG014285	AT3G10230	LYC	lycopene cyclase [Source:TAIR;Acc:AT3G10230]	-0.33	-0.04	0.16
TBIG019806	AT4G25700	BETA-OHASE 1	beta-hydroxylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G25700]	0.19	0.21	-0.12
TBIG025993	AT5G52570	BETA-OHASE 2	beta-carotene hydroxylase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G52570]	8.47	-0.88	-1.36

그림 4-25. Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5 μM Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 양상 차이

Col-0에 DMSO 6시간을 처리한 샘플과 Col-0와 CyPPO10-3에서 Tiafenacil (5  $\mu$ M)를 6시간 처리한 샘플을 비교하여 carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이를 분석한 결과 특이하게 BETA-OHASE 2 유전자의 발현 증가를 확인할 수 있었음 (그림 4-25).

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:1_0428 vs 2 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 3 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 5 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 6 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 7 _0428:Log2fc
TBIG002928	AT1G69720	HO3	heme oxygenase 3 [Source:TAIR,Acc:AT1G69720]	1.03	1.96	1.02	1.18	1.54
TBIG019125	AT4G13250	NYC1	NAD(P) <sub>i</sub> -binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT4G13250]	1.69	1.98	1.37	1.23	0.51
TBIM024415	AT3G44880	PAO	Pheophorbide a oxygenase, chloroplastic [Source:SWISS,Acc:Q9FYC2]	1.15	1.46	1.47	1.23	1.61
TBIG022392	AT5G43860	ATCLH2	chlorophyllase 2 [Source:TAIR,Acc:AT5G43860]	0.97	0.32	1.66	1.71	0.75
TBIG010237	AT2G30390	FC2	ferrioxalatease 2 [Source:TAIR,Acc:AT2G30390]	0.77	1.14	0.27	-1.28	0.36
TBIG024265	AT5G13800	PPH	pheophytinase [Source:TAIR,Acc:AT5G13800]	0.71	0.56	0.67	2.71	0.93
TBIG010288	AT2G31250	HEMA3	GlutamyL-tRNA reductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT2G31250]	0.68	-0.83	0.99	1.01	0.8
TBIG022505	AT5G45930	CHL12	magnesium chelatase 12 [Source:TAIR,Acc:AT5G45930]	0.51	0.19	0.28	-8.07	0.05
TBIG024533	AT5G18660	PCB2	NAD(P) <sub>i</sub> -binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT5G18660]	0.49	0.49	0.34	-2.84	0.24
TBIG005833	AT1G58300	HO4	heme oxygenase 4 [Source:TAIR,Acc:AT1G58300]	0.48	0.18	0.40	0	0.53
TBIG010025	AT2G26540	HEMD	uroporphyrinogen-III synthase family protein [Source:TAIR,Acc:AT2G26540]	0.42	0.33	0.29	-0.13	0.26
TBIM039081	AT5G04900	NOL	Chlorophyllide b reductase NOL, chloroplastic [Source:SWISS,Acc:Q8LEU3]	0.39	0.29	0.66	-0.49	1.08
TBIG026539	AT5G63290	Y1917_SYNY3	Radical SAM superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT5G63290]	0.36	0.8	0.03	0.79	-0.44
TBIG015896	AT3G51790	ATG1	transmembrane protein G1P-related 1 [Source:TAIR,Acc:AT3G51790]	0.36	0.28	0.91	2.12	0.81
TBIG004457	AT1G19670	ATCLH1	chlorophyllase 1 [Source:TAIR,Acc:AT1G19670]	0.34	2.05	1.02	-1.19	1.66
TBIG016620	AT4G18690	PPOX	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR,Acc:AT4G18690]	0.33	0.06	0.76	-0.44	2.69
TBIG007966	AT2G26670	HY1	Plant haem oxygenase (decyclizing) family protein [Source:TAIR,Acc:AT2G26670]	0.28	0.08	0.14	-1.06	-0.14
TBIG010026	AT2G26550	HO2	heme oxygenase 2 [Source:TAIR,Acc:AT2G26550]	0.27	-0.18	-0.43	-2.89	-0.31
TBIG002022	AT1G50170	ATSIRB	silyhydrochlorin ferrioxalatease B [Source:TAIR,Acc:AT1G50170]	0.21	0.1	0.11	-0.62	0.1
TBIG018394	AT4G37000	ACD2	accelerated cell death 2 (ACD2) [Source:TAIR,Acc:AT4G37000]	0.17	0.27	0.1	-1.1	0.49
TBIG024293	AT5G14220	HEMG2	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR,Acc:AT5G14220]	0.16	0.03	-0.02	-0.34	-0.32
TBIG004261	AT1G15220	ATCCMH	cytochrome c biogenesis protein family [Source:TAIR,Acc:AT1G15220]	0.16	-0.09	0.05	0.32	0.1
TBIG000370	AT1G08520	ALB1	ALBINA 1 [Source:TAIR,Acc:AT1G08520]	0.14	-0.05	0.05	-1.5	0.12
TBIG019440	AT4G18480	CHL11	Ph-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT4G18480]	0.13	-0.09	0.12	-2.46	0
TBIG026578	AT5G64050	ATERS	glutamate tRNA synthetase [Source:TAIR,Acc:AT5G64050]	0.08	0.05	0.11	-1.28	-0.03
TBIG000139	AT1G03630	POR C	protochlorophyllide oxidoreductase C [Source:TAIR,Acc:AT1G03630]	0.07	0.27	0.28	-2.83	0.66

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:1_0428 vs 2 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 3 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 5 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 6 _0428:Log2fc	DEG:1_0428 vs 7 _0428:Log2fc
TBIG013042	AT3G48730	GSA2	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 [Source:TAIR,Acc:AT3G48730]	0.04	0.02	0.4	-1.45	0.13
TBIG015898	AT3G51820	ATG4	UbA prenyltransferase family protein [Source:TAIR,Acc:AT3G51820]	0.02	0.01	0.19	-1.3	0.32
TBIG002929	AT1G69740	HEMB1	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT1G69740]	0.01	0.04	0.68	0.5	0.99
TBIG001820	AT1G44318	Hemb2	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT1G44318]	0	0	0	0	0
TBIG024003	AT5G08280	HEMC	hydroxymethylbilane synthase [Source:TAIR,Acc:AT5G08280]	-0.03	-0.01	0.39	-1.33	0.62
TBIG017885	AT4G27440	PORB	protochlorophyllide oxidoreductase B [Source:TAIR,Acc:AT4G27440]	-0.06	-1.32	0.01	-3.09	0
TBIG008672	AT2G40490	HEME2	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR,Acc:AT2G40490]	-0.13	-0.55	-0.13	-2.49	-0.1
TBIG014514	AT3G14110	FLU	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT3G14110]	-0.15	-0.15	0.12	-1.21	0.28
TBIG003611	AT4G03475	LN2	Coproporphyrinogen III oxidase [Source:TAIR,Acc:AT4G03475]	-0.18	0.12	-0.04	-1.09	-0.11
TBIG021791	AT5G26710	GluRS	GlutamyL-glutaminyL-tRNA synthetase, class Ic [Source:TAIR,Acc:AT5G26710]	-0.2	-0.35	-0.05	0.08	-0.64
TBIG016306	AT3G59400	GUN4	enzyme binding tetrapyrrole binding [Source:TAIR,Acc:AT3G59400]	-0.27	-0.79	0.26	-3.06	1.4
TBIG003173	AT1G74470	CHLP	Pyridine nucleoside-disulphide oxidoreductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT1G74470]	-0.33	-0.98	-0.08	-2.83	0.84
TBIG011865	AT3G14930	HEME1	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR,Acc:AT3G14930]	-0.36	-0.66	-0.31	-2.26	-0.11
TBIG023440	AT5G63570	GSA1	glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase [Source:TAIR,Acc:AT5G63570]	-0.42	-0.31	-0.02	-0.6	-0.14
TBIG005281	AT1G44446	CH1	Pheophorbide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain [Source:TAIR,Acc:AT1G44446]	-0.42	-1.93	-1.04	-8.41	-0.71
TBIG011564	AT3G09150	HY2	phytylchromobilin:ferredoxin oxidoreductase, chloroplast / phytylchromobilin synthase (HY2) [Source:TAIR,Acc:AT3G09150]	-0.44	-0.33	-0.93	-1.72	-0.97
TBIG024257	AT5G13630	GUN5	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH) [Source:TAIR,Acc:AT5G13630]	-0.47	-1.15	0.08	-2.79	1.43
TBIG013459	AT3G56940	CRD1	dicarboxylate diiron protein, putative (Crd1) [Source:TAIR,Acc:AT3G56940]	-0.51	-1.41	-0.21	-2.87	0.78
TBIG022216	AT5G40850	UPM1	uroporphyrin methylase 1 [Source:TAIR,Acc:AT5G40850]	-0.52	0.38	0.23	0.93	1.12
TBIG019334	AT4G16690	ATMES16	methyl esterase 16 [Source:TAIR,Acc:AT4G16690]	-0.57	0.32	-0.26	1.46	0.24
TBIM031410	AT4G03205	CPX1	Coproporphyrinogen-III oxidase 1, chloroplastic [Source:SWISS,Acc:Q9LR25]	-0.7	-0.13	-1.92	-4.36	-1.14
TBIG017764	AT4G25080	CHLM	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase [Source:TAIR,Acc:AT4G25080]	-0.71	-0.58	-1.01	-2.08	-0.08
TBIG005832	AT1G58290	HEMA1	GlutamyL-tRNA reductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT1G58290]	-1.33	-2.01	-1.08	-2.36	0.39
TBIG003973	AT1G09940	HEMA2	GlutamyL-tRNA reductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT1G09940]	-1.57	-2	-0.7	1.49	1.08
TBIG026069	AT5G4190	PORA	protochlorophyllide oxidoreductase A [Source:TAIR,Acc:AT5G4190]	-1.74	-5.59	-1.37	-3.34	-0.23
TBIG021764	AT3G26030	FC1	ferrioxalatease 1 [Source:TAIR,Acc:AT3G26030]	-2.44	-2.71	-1.62	0.21	0.38

그림 4-26. Col-0에서 DMSO 및 제초제 (5  $\mu$ M Tiafenacil)처리후 시간에 따른 발현 양상 차이



#### (4) CyPPO10-3 애기장대 형질전환체 대상 RNA Seq. 결과 분석 - Tetrapyrrole 생합성 관련 유전자의 발현 비교

Tetrapyrrole 생합성경로에 관여하는 유전자들은 애기장대에서 총 52개의 유전자들이 보고되었으며, 이들 유전자들의 제조제 처리별 발현차이를 비교함.

Col-0 식물체에서 DMSO 2시간 및 6시간 처리에 따른 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현양상에 큰 차이를 발견할 수 없었으며, 단지 **AtCLH1** 유전자가 약간 증가한 반면, **PORA** 유전자의 발현이 감소함(그림 4-26).

Col-0 식물체에서 Tiafenacil (5 $\mu$ M) 처리에 따른 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 처리 후 6시간 경과한 샘플에서 상당수의 유전자들의 발현이 증가하거나 감소하는 양상을 보임. LOG2 스케일로 3이상 (즉, 8배 이상) 증가하는 경향을 보이는 유전자들은 **PAO, PPH**, 그리고 **ATCHL1** 이었으며, 반대로 LOG2 스케일로 -3 이상 (즉, 8배 이상) 감소하는 양상을 보인 유전자들은 **CPX1, CH1, CHLI2** 임.

단, 제조제를 처리하지 않은 WT Col-0 식물체와 CyPPO10-3 식물체 내에서의 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 거의 관찰되지 않았고 몇몇 유전자(**PAO, HO3, ATCHL1**)에서 미비하게 증가하는 양상을 보였음.

Col-0와 CyPPO10-3 식물체 사이의 발현양상 비교에 PPOX 유전자의 발현 증가는 CyPPO10-3 형질전환 식물체 도입 유전자와의 서열 유사성 기인한 것으로 판단됨(그림 4-27).

Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 Tiafenacil (5  $\mu$ M) 처리 후 2시간 샘플과 DMSO 처리한 Col-0 샘플과 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이를 비교한 결과 거의 차이를 보이지 않았음.

Col-0 식물체에서 Tiafenacil (5 $\mu$ M) 처리에 따른 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 처리 후 6시간 경과한 샘플에서 상당수의 유전자들이 발현이 증가하거나 (**HEMA2, FC1** 등) 또는 감소하는 (**CPX1, CHLI2**) 양상을 보였음.

제조제를 처리하지 않은 (DMSO 6시간 처리) WT Col-0 식물체와 CyPPO10-3 식물체 내에서의 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 거의 보이지 않았음 (DEG 3 : 9).

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:2_0428 vs 5_0428:Log2fc	DEG:2_0428 vs 11_0428:Log2fc	DEG:3_0428 vs 6_0428:Log2fc	DEG:3_0428 vs 9_0428:Log2fc
TBIG002928	AT1G69720	HOS	heme oxygenase 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G69720]	-0.94	-0.51	-0.84	-0.40
TBIG019125	AT4G13250	NYC1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT4G13250]	-0.35	-0.26	-0.8	-0.11
TBIM024415	AT3G04880	PAO	Phenolphorbide a oxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q99YC2]	0.29	0.39	1.73	0.66
TBIG022392	AT5G43860	ATCLH2	chlorophyllase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G43860]	0.66	0.65	1.33	0.94
TBIG010237	AT2G30390	FC2	ferrochelatase 2 [Source:TAIR;Acc:AT2G30390]	-0.53	-0.4	-2.48	-0.19
TBIG024285	AT5G15800	PPH	phenylalanine [Source:TAIR;Acc:AT5G15800]	-0.08	0	2.09	0.38
TBIG010286	AT2G81250	HEMA3	Glutamyl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G81250]	0.28	0.09	1.79	1.84
TBIG022505	AT5G45930	CHL2	magnesium chelatase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G45930]	-0.27	-0.47	-3.32	-0.23
TBIG024583	AT5G18660	PCB2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT5G18660]	-0.18	-0.41	-2.88	-0.18
TBIG005833	AT1G98300	HO4	heme oxygenase 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G98300]	-0.08	-0.46	-0.18	1.47
TBIG010025	AT2G26540	HIMD	wcoporphyrinogen-III synthase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G26540]	-0.16	-0.24	-0.51	0.09
TBIM039081	AT5G04900	NOL	Chlorophyllide b reductase NOL, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q9LEU3]	0.24	0.18	-0.83	0.2
TBIG026539	AT5G63290	Y1917_SYNY3	Radical SAM superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT5G63290]	-0.36	-0.58	-0.07	-0.01
TBIG015896	AT4G31790	ATG1	transmembrane protein GTP-related 1 [Source:TAIR;Acc:AT4G31790]	0.52	1.02	1.78	0.75
TBIG004457	AT1G19670	ATCLH1	chlorophyllase 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G19670]	0.65	0.77	2.08	0.94
TBIG016620	AT4G01690	PPOX	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR;Acc:AT4G01690]	0.4	2.93	-0.56	2.91
TBIG007966	AT2G26670	HV1	Plant haem oxygenase (decyclizing) family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G26670]	-0.18	-0.51	-1.2	-0.44
TBIG010028	AT2G26550	HO2	heme oxygenase 2 [Source:TAIR;Acc:AT2G26550]	-0.73	-0.68	-2.26	-0.1
TBIG002022	AT1G80170	ATSIRB	sirohydrochlorin ferrochelatase B [Source:TAIR;Acc:AT1G80170]	-0.18	-0.18	-0.78	0.21
TBIG018394	AT4G37000	ACD2	accelerated cell death 2 (ACD2) [Source:TAIR;Acc:AT4G37000]	-0.1	-0.27	-1.43	0.01
TBIG024293	AT5G14220	HIMG2	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR;Acc:AT5G14220]	-0.2	-0.38	-0.42	-0.06
TBIG004261	AT1G15220	ATCCMH	cytochrome c biogenesis protein family [Source:TAIR;Acc:AT1G15220]	-0.14	-0.42	0.88	0.7
TBIG000370	AT1G08520	ALB1	ALBINA 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08520]	-0.13	-0.13	-1.51	-0.14
TBIG018440	AT4G18480	CHL1	P-loop containing nucleotide triphosphate hydrolases superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT4G18480]	-0.04	-0.38	-2.43	-0.27
TBIG026578	AT5G64050	ATERS	glutamate tRNA synthetase [Source:TAIR;Acc:AT5G64050]	0	-0.2	-1.38	-0.12
TBIG000139	AT1G03630	POR C	protochlorophyllide oxidoreductase C [Source:TAIR;Acc:AT1G03630]	0.17	0.09	-2.95	0.19

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:2_0428 vs 5_0428:Log2fc	DEG:2_0428 vs 11_0428:Log2fc	DEG:3_0428 vs 6_0428:Log2fc	DEG:3_0428 vs 9_0428:Log2fc
TBIG013042	AT3G048730	GSA2	glutamate-1-semialdehyde 2L-aminomutase 2 [Source:TAIR;Acc:AT3G048730]	0.88	0.16	-1.53	0.18
TBIG013998	AT3G1820	ATG4	UBA1 prenyltransferase family protein [Source:TAIR;Acc:AT3G1820]	0.14	0.09	-1.36	0.18
TBIG002929	AT1G69740	HEMB1	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT1G69740]	-0.84	-0.98	0.4	0.77
TBIG001820	AT1G44318	hemb2	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT1G44318]	0	0	0	0
TBIG024003	AT5G08280	HEMC	hydroxymethylbilane synthase [Source:TAIR;Acc:AT5G08280]	0.89	0.87	-1.38	0.42
TBIG017885	AT4G27440	PORB	protochlorophyllide oxidoreductase B [Source:TAIR;Acc:AT4G27440]	0.08	0.25	-1.83	0.35
TBIG008872	AT2G04090	HEME2	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR;Acc:AT2G04090]	-0.04	-0.36	-2	-0.11
TBIG014514	AT3G14110	FLU	Tetrapeptide repeat (TPR)-like superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT3G14110]	0.24	0.16	-1.12	0.44
TBIG003611	AT1G03475	LIN2	Coproporphyrinogen III oxidase [Source:TAIR;Acc:AT1G03475]	0.1	0.02	-1.27	-0.02
TBIG021791	AT3G26710	GLU5	Glutamyl-glutamyl-tRNA synthetase, class II [Source:TAIR;Acc:AT3G26710]	0.13	0.1	0.37	0.06
TBIG016306	AT3G08400	GUN4	enzyme binding/tetrapyrrole binding [Source:TAIR;Acc:AT3G08400]	0.49	-1.28	-2.33	1.11
TBIG003173	AT1G74470	CHLP	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G74470]	0.22	0.41	-1.9	0.24
TBIG011865	AT3G14930	HEME1	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR;Acc:AT3G14930]	0.02	-0.27	-1.66	-0.16
TBIG023440	AT3G08370	GSA1	glutamate-1-semialdehyde 2L-aminomutase [Source:TAIR;Acc:AT3G08370]	0.87	0.14	-0.84	0.12
TBIG005261	AT1G44446	CH1	Phenolphorbide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain [Source:TAIR;Acc:AT1G44446]	-0.68	-0.87	-1.54	-0.36
TBIG011564	AT3G09150	HY2	phytochromobilin ferredoxin oxidoreductase, chloroplast / phytochromobilin synthase (HY2) [Source:TAIR;Acc:AT3G09150]	-0.52	-0.53	-1.45	-0.3
TBIG024287	AT3G18630	GUN5	magnesium chelatase subunit CHL4 chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHL4) [Source:TAIR;Acc:AT3G18630]	0.92	0.55	-1.7	0.39
TBIG013459	AT3G36940	CRD1	dicarboxylate diiron protein, putative (Crd1) [Source:TAIR;Acc:AT3G36940]	0.27	0.16	-1.52	0.1
TBIG022216	AT3G40850	UPM1	uroporphyrin methylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT3G40850]	0.73	0.59	0.49	0.28
TBIG019334	AT4G16690	ATMES16	methyl esterase 16 [Source:TAIR;Acc:AT4G16690]	0.28	0.05	1.07	0.22
TBIM011410	AT4G03205	CPX1	Coproporphyrinogen-III oxidase 1, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q9LR75]	-0.85	-1.02	-4.29	-0.75
TBIG017764	AT4G25080	CHLM	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase [Source:TAIR;Acc:AT4G25080]	-0.34	-0.19	-2.45	-0.11
TBIG005832	AT1G58290	HEMA1	Glutamyl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G58290]	0.22	0.07	-0.41	0.01
TBIG003973	AT1G09940	HEMA2	Glutamyl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G09940]	0.83	0.6	1.44	0.24
TBIG026089	AT3G54190	PORA	protochlorophyllide oxidoreductase A [Source:TAIR;Acc:AT3G54190]	0.33	1	2.19	1
TBIG021764	AT3G26030	FC1	ferrochelatase 1 [Source:TAIR;Acc:AT3G26030]	0.79	0.22	2.86	-0.16

그림 4-27. Col-0와 CyPP010-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5  $\mu$ M Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 양상 차이

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:7_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 9_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 11_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 12_0428:Log2fc
TB1G002928	AT1G09720	HO3	heme oxygenase 3 [Source:TAIR,Acc:AT1G69720]	-0.38	-0.18	-0.21	-0.1
TB1G019125	AT4Q13250	NYC1	NAD(P) binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT4G13250]	0.48	1.25	0.84	1.17
TB1G024415	AT3Q44880	PAO	Phosphoribide 4 oxygenase, chloroplastic [Source:SWISS,Acc:Q9FYC2]	-0.24	0.2	-0.13	0.66
TB1G022392	AT3Q43860	ATCLH2	chlorophyllase 2 [Source:TAIR,Acc:AT3G43860]	0.09	0.41	0.77	1.13
TB1G010237	AT2G30390	FC2	ferrochelatase 2 [Source:TAIR,Acc:AT2G30390]	-0.49	0.49	-0.07	-0.06
TB1G024265	AT5G13800	PPH	pheophytinase [Source:TAIR,Acc:AT5G13800]	-0.39	-0.09	-0.29	0.75
TB1G010288	AT2G31250	HEMA3	Glutaryl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT2G31250]	-0.22	0.1	-0.12	-0.01
TB1G022503	AT5G45880	CHL2	magnesium chelatase i2 [Source:TAIR,Acc:AT5G45880]	-0.31	-0.2	-0.08	-0.84
TB1G024533	AT3Q18660	PCB2	NAD(P) binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT3G18660]	-0.35	-0.02	-0.24	-0.52
TB1G005938	AT1G58300	HO4	heme oxygenase 4 [Source:TAIR,Acc:AT1G58300]	-1.53	-1.01	-1.42	-2.33
TB1G010025	AT2Q26540	HEMD	uroporphyrinogen III synthase family protein [Source:TAIR,Acc:AT2Q26540]	-0.24	0.05	-0.16	-0.28
TB1G039081	AT5G04900	NOL	Chlorophyll(ide) b reductase NOL, chloroplastic [Source:SWISS,Acc:Q8LEU3]	-0.47	-0.71	-0.6	-1.28
TB1G026530	AT5G68290	Y1817_3VNV8	Radical SAM superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT5G68290]	0.23	1.12	0.15	1.14
TB1G013896	AT3Q31790	ATG1	transmembrane protein G1P-related 1 [Source:TAIR,Acc:AT3G31790]	0.89	0.11	0.48	0.33
TB1G004437	AT1G19670	ATCLH1	chlorophyllase 1 [Source:TAIR,Acc:AT1G19670]	-0.7	1.22	-0.83	1.07
TB1G016620	AT4G01680	PPOX	flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR,Acc:AT4G01680]	-0.6	0.16	0.49	0.25
TB1G007966	AT2G26670	HY1	Plant haem oxygenase (decyclizing) family protein [Source:TAIR,Acc:AT2G26670]	-0.42	-0.38	-0.17	-0.59
TB1G010026	AT2Q26550	HO2	heme oxygenase 2 [Source:TAIR,Acc:AT2Q26550]	-0.49	-0.08	-0.13	-0.5
TB1G002022	AT1G50170	ATSI8B	sirohydrochlorin ferrochelatase B [Source:TAIR,Acc:AT1G50170]	0.07	0.1	-0.15	-0.17
TB1G018394	AT4G37000	ACD2	accelerated cell death 2 (ACD2) [Source:TAIR,Acc:AT4G37000]	-1.03	-0.32	-0.88	-0.71
TB1G024298	AT5G14220	HEMO2	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR,Acc:AT5G14220]	-0.01	0.18	0.02	0.27
TB1G004261	AT1G15220	ATCCMH	cytochrome c biogenesis protein family [Source:TAIR,Acc:AT1G15220]	0.14	0.4	-0.48	0.38
TB1G000370	AT1G08520	ALB1	ALBINA 1 [Source:TAIR,Acc:AT1G08520]	-0.16	-0.42	-0.19	-0.67
TB1G019440	AT4Q18480	CHL1	P-loop containing nucleotide triphosphate hydrolases superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT4Q18480]	-0.31	-0.46	-0.81	-0.88
TB1G026578	AT3Q64050	ATERS	glutamate tRNA synthetase [Source:TAIR,Acc:AT3Q64050]	-0.13	-0.15	-0.17	-0.3
TB1G000189	AT1G08680	POR C	protochlorophyllide oxidoreductase C [Source:TAIR,Acc:AT1G08680]	-0.71	-0.81	-0.87	-0.93

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:7_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 9_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 11_0428:Log2fc	DEG:7_0428 vs 12_0428:Log2fc
TB1G013042	AT3Q46730	GSA2	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminotransferase 2 [Source:TAIR,Acc:AT3Q46730]	-0.03	-0.04	-0.02	-0.84
TB1G013898	AT3G51820	ATG4	UbA pronytraesterase family protein [Source:TAIR,Acc:AT3G51820]	-0.32	-0.25	-0.29	-0.88
TB1G002929	AT1G09740	HIMB1	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT1G09740]	-0.1	-0.29	-0.08	-0.48
TB1G001820	AT1G44318	hemb2	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT1G44318]	0	0	0	0
TB1G024003	AT3G08280	HEMC	hydroxymethylbilane synthase [Source:TAIR,Acc:AT3G08280]	-0.4	-0.32	-0.36	-0.74
TB1G017885	AT4G27440	PORB	protochlorophyllide oxidoreductase B [Source:TAIR,Acc:AT4G27440]	-0.18	-1.08	0.1	-1.54
TB1G008672	AT2G40490	HEMB2	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR,Acc:AT2G40490]	-0.59	-0.67	-0.47	-1.04
TB1G014514	AT3G14110	FLU	Tetrapicopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein [Source:TAIR,Acc:AT3G14110]	-0.27	-0.1	-0.35	-0.38
TB1G003611	AT1G03475	LIN2	Coproporphyrinogen III oxidase [Source:TAIR,Acc:AT1G03475]	-0.27	0.11	-0.12	-0.25
TB1G021791	AT5G26710	GLU5	Glutaryl-glutamyl-tRNA synthetase class Ic [Source:TAIR,Acc:AT5G26710]	0.39	0.25	0.46	0.21
TB1G016806	AT3G59400	GUN4	enzyme binding/tetrapyrrole binding [Source:TAIR,Acc:AT3G59400]	-1.08	-1.19	-0.47	-1.6
TB1G003178	AT1G74470	CHLP	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT1G74470]	-0.63	-1.7	-0.84	-2.06
TB1G011883	AT3G14930	HEMB1	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR,Acc:AT3G14930]	-0.61	-0.82	-0.59	-1.15
TB1G023440	AT5G63570	GSA1	glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminotransferase [Source:TAIR,Acc:AT5G63570]	-0.3	-0.17	-0.22	-0.94
TB1G003281	AT1G44446	CH1	Phosphoribide 4 oxygenase family protein with Rieske (2Fe-2S) domain [Source:TAIR,Acc:AT1G44446]	-0.67	-1.89	-0.66	-1.91
TB1G011364	AT3G09150	HY2	phytyltransferase/ferredoxin oxidoreductase, chloroplast / phytyltransferase synthesis (HY2) [Source:TAIR,Acc:AT3G09150]	-0.73	0.28	-0.08	0.03
TB1G024257	AT5G13630	GUN5	magnesium-chelatase subunit chB4, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH) [Source:TAIR,Acc:AT5G13630]	-1.22	-2.11	-1.43	-2.24
TB1G013459	AT3G56940	CRD1	dicarbonylate diiron protein, putative (Crd1) [Source:TAIR,Acc:AT3G56940]	-1.15	-2.2	-1.21	-2.52
TB1G022216	AT3G40850	UPM1	uroporphyrin methylase 1 [Source:TAIR,Acc:AT3G40850]	-0.73	-0.6	-1.12	-0.66
TB1G019334	AT4G16690	ATMES16	methyl esterase 16 [Source:TAIR,Acc:AT4G16690]	-1.03	0.19	-0.84	0.23
TB1G031410	AT4G03205	CPX1	Coproporphyrinogen-III oxidase 1, chloroplastic [Source:SWISS,Acc:Q9LR75]	-0.29	0.16	-0.66	-0.04
TB1G017764	AT4G25080	CHLM	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase [Source:TAIR,Acc:AT4G25080]	-0.96	-0.72	-0.89	-1.16
TB1G005832	AT1G58290	HEMA1	Glutaryl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT1G58290]	-1.43	-2.49	-1.73	-2.21
TB1G003973	AT1G09940	HEMA2	Glutaryl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR,Acc:AT1G09940]	-1.05	-2.95	-2.13	-2.6
TB1G026069	AT3G54190	PORA	protochlorophyllide oxidoreductase A [Source:TAIR,Acc:AT3G54190]	-0.61	-4.47	-0.59	-4.18
TB1G021764	AT3G26030	FC1	ferrochelatase 1 [Source:TAIR,Acc:AT3G26030]	-1.8	-1.36	-2.68	-2.79

그림 4-28. CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5  $\mu$ M Tiafenacil) 처리 후 시간에 따른 발현 양상 차이

전반적으로 CyPPO10-3 식물체에서는 제초제를 처리하기 전과 후에 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상에는 큰 차이를 보이지 않았고, 단지 몇몇 유전자들 (PORA, FC1, HO4, GUN5 등)의 발현이 감소하는 경향을 보였으며, 뚜렷하게 증가하는 양상을



보인 유전자는 없었음(그림 4-28).

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG-5_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG-6_0428 vs 12_0428:Log2fc	DEG-9_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG-9_0428 vs 12_0428:Log2fc
TB1G002928	AT1G69720	HO3	heme oxygenase 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G69720]	0.2	0.84	-0.28	0.04
TB1G019123	AT4G13280	NYC1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT4G13280]	-0.38	0.88	-0.85	-0.08
TB1M024415	AT3G44880	PAO	Pheophorbide a oxygenase, chloroplastic [Source:SWISS:Acc:Q9FYC2]	0.16	-0.7	-0.49	0.46
TB1G022392	AT5G49860	ATCLH2	chlorophyllase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G49860]	-0.77	0.28	-0.37	0.71
TB1G010237	AT2G90390	FC2	ferrochelatase 2 [Source:TAIR;Acc:AT2G90390]	-0.29	1.66	-0.97	-0.55
TB1G024265	AT5G13800	PPH	pheophytinase [Source:TAIR;Acc:AT5G13800]	-0.07	-0.95	-0.34	0.84
TB1G010288	AT2G31250	HEMA3	Glutamyl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G31250]	-0.84	-0.14	-0.37	-0.11
TB1G022505	AT5G45930	CHL2	magnesium chelatase ii [Source:TAIR;Acc:AT5G45930]	-0.48	2.16	-0.16	-0.84
TB1G024893	AT5G18660	PCB2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT5G18660]	-0.4	2.14	-0.88	-0.8
TB1G005833	AT1G58300	HO4	heme oxygenase 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G58300]	-0.54	0.18	-0.57	-1.32
TB1G010025	AT2G26540	HEMD	uroporphyrinogen III synthase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G26540]	-0.23	0.18	-0.85	-0.83
TB1M039081	AT5G04900	NOL	Chlorophyllide b reductase NOL, chloroplastic [Source:SWISS:Acc:Q8LBU3]	0.01	0.87	0.39	-0.58
TB1G026539	AT5G63290	Y1917_SVNV3	Radical SAM superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT5G63290]	-0.18	-0.01	-0.94	0.02
TB1Q015896	AT3G91790	ATG1	transmembrane protein G1P-related 1 [Source:TAIR;Acc:AT3G91790]	0.66	-0.69	0.52	0.42
TB1G004457	AT1G19670	ATCLH1	chlorophyllase 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G19670]	-0.01	-1.39	-1.97	-0.16
TB1G016620	AT4G01690	PPOX	flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR;Acc:AT4G01690]	2.59	1.46	0.39	0.08
TB1G007866	AT2G26670	HV1	Plant haem oxygenase (decycling) family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G26670]	-0.64	0.41	-0.14	-0.28
TB1G010026	AT2G26550	HO2	heme oxygenase 2 [Source:TAIR;Acc:AT2G26550]	-0.81	1.65	-0.45	-0.42
TB1G002022	AT1G90170	ATSI8B	6-hydrochlorin ferrochelatase B [Source:TAIR;Acc:AT1G90170]	0.12	0.63	-0.07	-0.28
TB1G018384	AT4G87000	ACD2	accelerated cell death 2 (ACD2) [Source:TAIR;Acc:AT4G87000]	-0.89	0.97	-0.77	-0.89
TB1G024293	AT5G14220	HEMB2	flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR;Acc:AT5G14220]	-0.25	0.17	-0.23	-0.12
TB1G004261	AT1G15220	ATCCMH	cytochrome c biogenesis protein family [Source:TAIR;Acc:AT1G15220]	0.26	0.25	-0.31	-0.02
TB1G000970	AT1G08520	ALB1	ALBINA 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08520]	-0.08	1.03	0.2	-0.26
TB1G019440	AT4G18480	CHL1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT4G18480]	-0.58	1.59	-0.1	-0.49
TB1G026578	AT3G64050	ATERS	glutamate tRNA synthetase [Source:TAIR;Acc:AT3G64050]	-0.24	1.03	-0.05	-0.18
TB1G000139	AT1G03630	POR C	protochlorophyllide oxidoreductase C [Source:TAIR;Acc:AT1G03630]	-0.27	2.44	-0.44	-0.62

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG-5_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG-6_0428 vs 12_0428:Log2fc	DEG-9_0428 vs 8_0428:Log2fc	DEG-9_0428 vs 12_0428:Log2fc
TB1G013042	AT3G48730	GSA2	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 [Source:TAIR;Acc:AT3G48730]	-0.23	1.13	-0.04	-0.5
TB1G015898	AT3G51820	ATG4	UbA1 prenyltransferase family protein [Source:TAIR;Acc:AT3G51820]	-0.14	0.82	-0.13	-0.64
TB1G002929	AT1G69740	HEMB1	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT1G69740]	0.26	0.11	0.13	-0.18
TB1G001820	AT1G04318	hemb2	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT1G04318]	0	0	0	0
TB1G024009	AT3G08280	HEMC	hydroxymethylbilane synthase [Source:TAIR;Acc:AT3G08280]	-0.11	1.1	-0.13	-0.42
TB1G017848	AT4G27440	PORB	protochlorophyllide oxidoreductase B [Source:TAIR;Acc:AT4G27440]	-0.18	1.63	0.85	-0.47
TB1G008872	AT2G04490	HEMB2	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR;Acc:AT2G04490]	-0.44	1.43	0.08	-0.38
TB1G014514	AT3G14110	FLU	Tetrapeptide repeat (TPR)-like superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT3G14110]	-0.05	1.25	-0.22	-0.28
TB1G008611	AT1G08473	LIN2	Coproporphyrinogen III oxidase [Source:TAIR;Acc:AT1G08473]	-0.28	0.81	-0.48	-0.86
TB1G021791	AT5G26710	GluRS	Glutamyl-/glutamyl-tRNA synthetase, class k [Source:TAIR;Acc:AT5G26710]	-0.14	-0.43	0.09	-0.04
TB1G016906	AT3G59400	GUN4	enzyme binding tetrapyrrole binding [Source:TAIR;Acc:AT3G59400]	0.13	2.94	0.06	-0.42
TB1G008173	AT1G74470	CHLP	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G74470]	0.33	1.7	1.02	-0.87
TB1G011665	AT3G14930	HEME1	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR;Acc:AT3G14930]	-0.36	1.08	0.16	-0.33
TB1G028440	AT5G63570	GSA1	glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase [Source:TAIR;Acc:AT5G63570]	-0.26	0	-0.19	-0.38
TB1G005281	AT1G44446	CH1	Pheophorbide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain [Source:TAIR;Acc:AT1G44446]	-0.28	0.87	1.17	-0.03
TB1G011664	AT3G09150	HV2	phytylchromobilin:indole-3-acetyl-CoA oxidoreductase, chloroplast / phytylchromobilin synthase (HV2) [Source:TAIR;Acc:AT3G09150]	-0.71	0.87	-1	-0.2
TB1G024257	AT3G13630	GUN5	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH) [Source:TAIR;Acc:AT3G13630]	0.19	2.06	0.83	-0.14
TB1G018459	AT3G56940	CRD1	dicarbonylase diron protein, putative (Crd1) [Source:TAIR;Acc:AT3G56940]	-0.1	1.21	1	-0.32
TB1G022218	AT5G40850	UPM1	uroporphyrin methylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT5G40850]	0.22	-0.39	-0.19	-0.07
TB1G018934	AT4G16690	ATME516	methyl esterase 16 [Source:TAIR;Acc:AT4G16690]	-0.47	-0.91	-1.27	0.03
TB1M031410	AT4G03205	CPX1	Coproporphyrinogen-III oxidase 1, chloroplastic [Source:SWISS:Acc:Q9LR75]	0.14	1.25	-0.5	-0.2
TB1G017764	AT4G25080	CHLM	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase [Source:TAIR;Acc:AT4G25080]	0.08	1.8	-0.29	-0.48
TB1G005893	AT2G58290	HEMA1	Glutamyl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G58290]	0.09	0.62	1	0.27
TB1G003979	AT1G09940	HEMA2	Glutamyl-tRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G09940]	0.79	-2.93	1.65	0.33
TB1G026068	AT3G34190	PORA	protochlorophyllide oxidoreductase A [Source:TAIR;Acc:AT3G34190]	0.58	-1	1.8	0.28
TB1G021784	AT5G26030	PC1	ferrochelatase 1 [Source:TAIR;Acc:AT5G26030]	0.23	-2.54	1.51	0.87

그림 4-29. Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5 μM Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 양상 차이

Col-0에 5 μM Tiafenacil 2시간 처리한 샘플과 CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 2시간 처리한 샘플 사이의 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상에는 큰 차이점이 없었음(그림 4-29).



Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 제초제 (5  $\mu$ M Tiafenacil) 6시간 처리 후 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상을 비교한 결과, 상당수의 유전자들의 (CPX1, GUN4, PORC, CHL12 등) 발현이 증가함을 보였으며, 소수의 유전자들 (HEMA2, FC1)의 발현이 감소함을 나타냄.

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:3_0428 vs 12_042	DEG:5_0428 vs 11_042	DEG:8_0428 vs 11_042
				8:Log2fc	8:Log2fc	8:Log2fc
TB1G002928	AT1G69720	HO3	heme oxygenase 3 [Source:TAIR;Acc:AT1G69720]	-0.44	0.42	0.19
TB1G019125	AT4G13250	NYC1	NAD(P) binding Rossmann fold superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT4G13250]	-0.22	0.07	0.4
TB1M024415	AT3G44880	PAO	Pheophorbide a oxygenase, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q9FYC.2]	1.1	0.29	0.1
TB1G022392	AT5G48860	ATCLH2	chlorophyllase 2 [Source:TAIR;Acc:AT5G48860]	1.64	0.15	0.89
TB1G010237	AT2G30390	FC2	ferrochelatase 2 [Source:TAIR;Acc:AT2G30390]	-0.76	0.12	0.38
TB1G024265	AT5G13800	PPH	pheophytinase [Source:TAIR;Acc:AT5G13800]	1.21	0.07	0.11
TB1G010288	AT2G31250	HEMA3	Glutamyl-IRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G31250]	1.71	-0.21	0.11
TB1G022305	AT5G45930	CHL12	magnesium chelatase 12 [Source:TAIR;Acc:AT5G45930]	-0.89	-0.22	0.24
TB1G024538	AT5G18660	PCB2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT5G18660]	-0.88	-0.25	0.18
TB1G005833	AT1G58800	HO4	heme oxygenase 4 [Source:TAIR;Acc:AT1G58800]	0.14	-0.4	0.12
TB1G010025	AT2G26540	HEMD	uroporphyrinogen-III synthase family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G26540]	-0.27	-0.1	0.1
TB1M039081	AT5G04900	NOL	Chlorophyll(a) b reductase NOL, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q8LEU.3]	-0.4	-0.08	-0.11
TB1G026539	AT5G63290	Y1617_SVNV3	Radical SAM superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT5G63290]	-0.02	-0.23	-0.08
TB1G015896	AT3G51790	ATG1	transmembrane protein GIP-related 1 [Source:TAIR;Acc:AT3G51790]	1.15	0.48	-0.19
TB1G004457	AT1G19670	ATCLH1	chlorophyllase 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G19670]	0.76	0.1	0.08
TB1G010620	AT4G01690	PPOX	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR;Acc:AT4G01690]	2.97	2.51	-0.1
TB1G007966	AT2G26670	HY1	Plant haem oxygenase (deacylating) family protein [Source:TAIR;Acc:AT2G26670]	-0.73	-0.35	0.26
TB1G010026	AT2G26550	MO2	heme oxygenase 2 [Source:TAIR;Acc:AT2G26550]	-0.54	0.09	0.37
TB1G002022	AT1G50170	ATSIRB	sirohydrochlorin ferrochelatase B [Source:TAIR;Acc:AT1G50170]	-0.09	-0.06	-0.21
TB1G018394	AT4G37000	ACD2	accelerated cell death 2 (ACD2) [Source:TAIR;Acc:AT4G37000]	-0.4	-0.19	0.37
TB1G024293	AT5G14220	HEMG2	Flavin containing amine oxidoreductase family [Source:TAIR;Acc:AT5G14220]	-0.1	-0.19	0.03
TB1G004261	AT1G15220	ATCCMH	cytochrome c biogenesis protein family [Source:TAIR;Acc:AT1G15220]	0.88	-0.29	-0.58
TB1G000870	AT1G08520	ALB1	ALBINA 1 [Source:TAIR;Acc:AT1G08520]	-0.42	-0.02	-0.01
TB1G018440	AT4G18480	CHL11	P-loop containing nucleotide triphosphate hydrolyses superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT4G18480]	-0.78	-0.39	0.22
TB1G026578	AT5G64050	ATERS	glutamate-IRNA synthetase [Source:TAIR;Acc:AT5G64050]	-0.29	-0.21	0
TB1G000139	AT1G03890	POR C	protochlorophyllide oxidoreductase C [Source:TAIR;Acc:AT1G03890]	-0.48	-0.1	0.14

Gene Id	Gene Acc	Gene Name	Description	DEG:3_0428 vs 12_042	DEG:5_0428 vs 11_042	DEG:8_0428 vs 11_042
				8:Log2fc	8:Log2fc	8:Log2fc
TB1G013042	AT3G48730	GSA2	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 [Source:TAIR;Acc:AT3G48730]	-0.84	-0.19	0.02
TB1G015898	AT3G51820	ATG4	UbA1 pramytransferase family protein [Source:TAIR;Acc:AT3G51820]	-0.48	-0.06	0.05
TB1G002929	AT1G66740	HEMB1	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT1G66740]	0.37	0.32	0.03
TB1G001820	AT1G44318	hemb2	Aldolase superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT1G44318]	0	0	0
TB1G024003	AT5G08280	HEMC	hydroxymethylbilane synthase [Source:TAIR;Acc:AT5G08280]	-0.02	-0.03	0.05
TB1G017885	AT4G27440	PORB	protochlorophyllide oxidoreductase B [Source:TAIR;Acc:AT4G27440]	-0.14	0.19	0.29
TB1G008672	AT2G40490	HEME2	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR;Acc:AT2G40490]	-0.81	-0.34	0.08
TB1G014314	AT3G14110	FLU	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein [Source:TAIR;Acc:AT3G14110]	0.19	-0.1	-0.07
TB1G003611	AT1G03475	LIN2	Coproporphyrinogen III oxidase [Source:TAIR;Acc:AT1G03475]	-0.39	-0.1	0.16
TB1G021791	AT3G25710	GluRS	Glutamyl-glutamyl-IRNA synthetase, class Ic [Source:TAIR;Acc:AT3G25710]	0	-0.04	0.08
TB1G016306	AT3G59400	GUN4	enzyme binding tetrapyrrole binding [Source:TAIR;Acc:AT3G59400]	0.88	0.77	0.82
TB1G008178	AT1G74470	CHLP	Pyridine nucleotide disulphide oxidoreductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G74470]	-0.14	0.18	-0.2
TB1G011865	AT3G14930	HEME1	Uroporphyrinogen decarboxylase [Source:TAIR;Acc:AT3G14930]	-0.51	-0.3	0.03
TB1G023440	AT5G68570	GSA1	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase [Source:TAIR;Acc:AT5G68570]	-0.28	-0.24	0.09
TB1G005281	AT1G44446	CH1	Pheophorbide a oxygenase family protein with Ruelka [2Fe-2S] domain [Source:TAIR;Acc:AT1G44446]	-0.6	-0.28	0.02
TB1G011864	AT3G09150	HY2	phytylchromobilin:ferredoxin oxidoreductase, chloroplast / phytylchromobilin synthase (H Y2) [Source:TAIR;Acc:AT3G09150]	-0.52	-0.03	0.88
TB1G024257	AT5G13630	GUN5	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH) [Source:TAIR;Acc:AT5G13630]	0.43	0.02	-0.19
TB1G013459	AT3G58940	CRD1	dicarbonylate dikim protein, putative (Crd1) [Source:TAIR;Acc:AT3G58940]	-0.24	-0.13	-0.05
TB1G022216	AT5G40850	UPM1	uoporphyrin methylase 1 [Source:TAIR;Acc:AT5G40850]	0.17	-0.13	-0.38
TB1G019384	AT4G16690	ATMES18	methyl esterase 16 [Source:TAIR;Acc:AT4G16690]	0.23	-0.24	0.2
TB1M031410	AT4G08205	CPX1	Coproporphyrinogen-III oxidase 1, chloroplastic [Source:SWISS;Acc:Q9UR75]	-0.97	-0.19	-0.36
TB1G017764	AT4G25080	CHLM	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase [Source:TAIR;Acc:AT4G25080]	-0.58	0.14	0.08
TB1G005832	AT1G58290	HEMA1	Glutamyl-IRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G58290]	0.27	-0.17	-0.29
TB1G005973	AT1G09940	HEMA2	Glutamyl-IRNA reductase family protein [Source:TAIR;Acc:AT1G09940]	0.57	-0.25	-1.07
TB1G026089	AT3G84190	PORA	protochlorophyllide oxidoreductase A [Source:TAIR;Acc:AT3G84190]	1.26	0.68	0.04
TB1G021764	AT5G26030	FC1	ferrochelatase 1 [Source:TAIR;Acc:AT5G26030]	0.89	-0.38	-0.86

그림 4-30. Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 DMSO 및 제초제 (5  $\mu$ M Tiafenacil) 처리후 시간에 따른 발현 양상 차이

CyPPO10-3 식물체에서 Tiafenacil (5  $\mu$ M) 또는 DMSO 처리에 따른 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이는 거의 차이를 보이지 않았으며, 단지 PORA 유전자만이 DMSO 2시간대비 6시간 처리에서 발현이 제법 증가함(그림 4-29).

Col-0에 DMSO 6시간을 처리한 샘플과 Col-0와 CyPPO10-3에서 Tiafenacil (5  $\mu$ M)를 6시간 처리한 샘플을 비교하여 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상 차이를 분석한 결과 거의 발현양상에 차이가 없었음(그림 4-30).

Col-0와 CyPPO10-3 식물체에서 Tiafenacil (5  $\mu$ M)를 2시간 처리한 샘플에서 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상을 비교한 결과 큰 차이를 발견할 수 없었음.

한편, CyPPO10-3 식물체에서 DMSO와 Tiafenacil (5  $\mu$ M)를 6시간 처리한 샘플에서 tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상을 비교한 결과 발현양상에 큰 차이를 보이는 유전자를 발견할 수 없었음.

지금까지의 Col-0와 CyPPO10-3 식물체 사이의 제초제 Tiafenacil (5  $\mu$ M) 처리에 따른 tetrapyrrole 생합성 유전자들의 발현양상을 요약하면,

⇒ 증가하는 유전자 : AtCLH1, PAO, PPH, HO3, GUN4, PORC

⇒ 감소하는 유전자 : CH1, PORA, HO4, GUN5

⇒ 처리에 따라 증가하거나 또는 감소하는 유전자 : HEMA2, FC1, CPX1, CHLI2

표 4-16. Tiafenacil 처리시 발현 변화 유전자 리스트

Gene Acc	Gene Name	localization & Function
AT1G19670	ATCLH1/C OII	- involved in chlorophyll catabolic process, defense response to bacterium, defense response to fungus - located in chloroplast & vacuole
AT3G44880	PAO/ACD1	- involved in cell death, chlorophyll catabolic process, defense response to bacterium, incompatible interaction, flower development, fruit development, oxidation-reduction process - located in chloroplast, chloroplast envelope, chloroplast inner membrane, chloroplast thylakoid, chloroplast thylakoid membrane
AT5G13800	PPH	- involved in chlorophyll catabolic process - located in chloroplast, chloroplast stroma, chloroplast thylakoid membrane
AT1G69720	HO3	- involved in heme oxidation, photosynthesis - located in chloroplast
AT3G59400	GUN4	- involved in chlorophyll biosynthetic process, chloroplast-nucleus signaling pathway, positive regulation of catalytic activity - located in chloroplast, chloroplast membrane
AT1G03630	POR C	- Encodes for a protein with protochlorophyllide oxidoreductase activity. - involved in chlorophyll biosynthetic process, oxidation-reduction process, photosynthesis - located in chloroplast, chloroplast stroma, chloroplast thylakoid membrane
AT1G44446	CH1	- Encodes chlorophyllide <i>a</i> oxygenase which converts chlorophyllide <i>a</i> to chlorophyllide <i>b</i> by catalyzing two successive hydroxylations at the 7-methyl group of chlorophyllide <i>a</i> . - involved in chlorophyll biosynthetic process, oxidation-reduction process - located in chloroplast, chloroplast inner membrane, chloroplast thylakoid membrane, thylakoid membrane



AT5G54190	PORA	- involved in chlorophyll biosynthetic process, oxidation-reduction process, photomorphogenesis, photosynthesis, response to ethylene, skotomorphogenesis - located in chloroplast, chloroplast envelope, chloroplast thylakoid
AT1G58300	HO4	- Encodes a member (HO4) of the heme oxygenase family - involved in heme oxidation, photosynthesis - located in chloroplast
AT5G13630	GUN5	- Encodes magnesium chelatase involved in plastid-to-nucleus signal transduction - involved in chlorophyll biosynthetic process, photosynthesis - located in chloroplast, chloroplast inner membrane, chloroplast stroma, mitochondrion
AT1G09940	HEMA2	- Encodes glutamyl-tRNA reductase - involved in chlorophyll biosynthetic process, heme biosynthetic process, oxidation-reduction process, porphyrin-containing compound biosynthetic process, protoporphyrinogen IX biosynthetic process, response to oxidative stress, tetrapyrrole biosynthetic process - located in chloroplast, plastid
AT5G26030	FC1	- encodes ferrochelatase I located in plastids - involved in heme biosynthetic process, response to oxidative stress, tetrapyrrole biosynthetic process - located in chloroplast, chloroplast membrane, chloroplast thylakoid membrane, mitochondrion, plastid
AT4G03205	CPX1	- encodes Coproporphyrinogen III oxidase - involved in chlorophyll biosynthetic process, oxidation-reduction process, protoporphyrinogen IX biosynthetic process - located in chloroplast, chloroplast stroma
AT4G18480	CHLI1	- Encodes the CHLI subunit of magnesium chelatase which is required for chlorophyll biosynthesis - involved in chlorophyll biosynthetic process, photosynthesis, response to cytokinin - located in cell wall, chloroplast, chloroplast stroma

- RNA Seq. 결과 분석에 기초하여 제초제 처리 유무에 상관없이 Col-0 식물체와 CyPPO10-3 식물체 내에서의 carotenoid & tetrapyrrole 생합성 관련 유전자들의 발현 양상에는 거의 차이가 없었으며, 몇몇 유전자들에서 미비한 차이를 보임.

라. 복합제초제 (glyphosate, tiafenacil) 저항성 테스트 라인 구축

**(1) cp4EPSPS 및 CyPPO8-1 도입 형질전환체 제작 및 복합 제초제 저항성 검증**

Glyphosate 제초제에 저항성을 부여하는 cp4EPSPS 유전자와 Tiafenacil 제초제에 저항성을부여하는 CyPPO8-1 유전자를 동시에 도입하여 복합제초제 저항성 테스트 라인을 제작함.

총 150개 이상의 T1 식물체로부터 20개의 호모라인을 확보하여 이들 라인들을 대상으로 복합 제초제(Glyphosate & Tiafenacil) 저항성 검증 실험을 수행함.

먼저, 20개 라인을 대상으로 Tiafenacil 저항성을 확인함 (그림 4-31, 4-32).

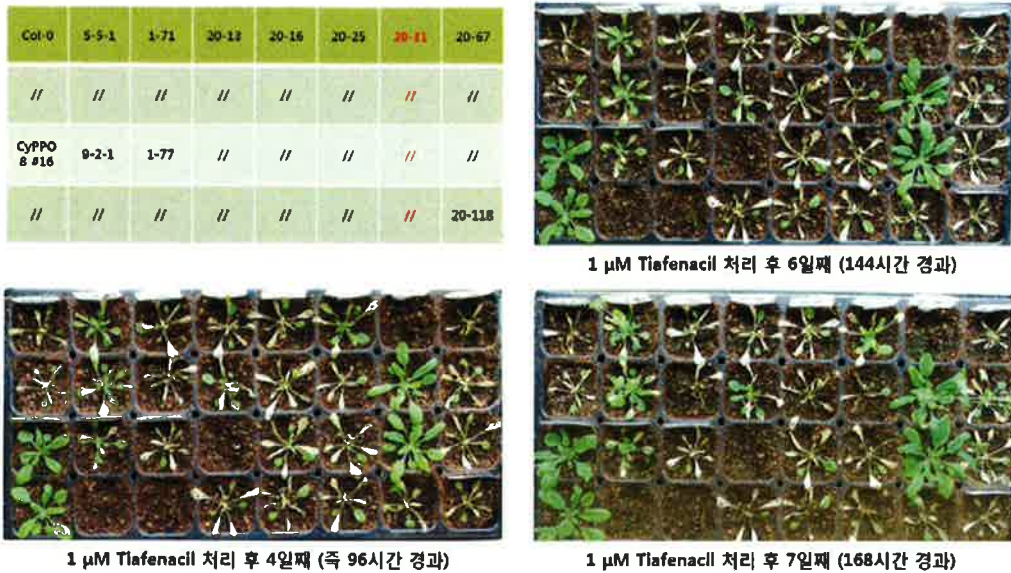


그림 4-31. cp4EPSPS+CyPPO8-1 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 검증

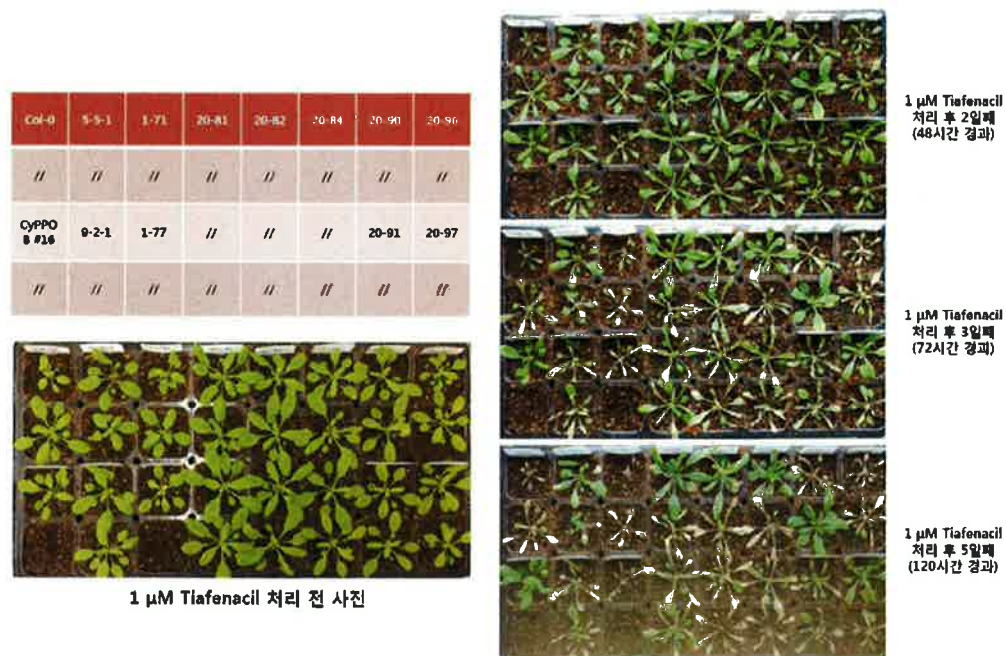


그림 4-32. cp4EPSPS+CyPPO8-1 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 검증

다음으로, glyphosate 저항성을 확인함 (그림 4-33, 4-34, 4-35, 4-36).

Col-0	ABDM 37	5-3-1	5-2-1	cypp08-1	cp4	20-97	20-110
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//



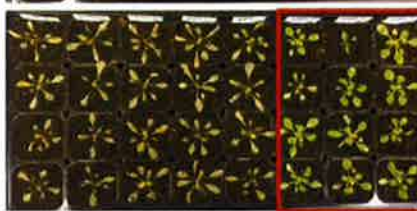
1 μM Glyphosate 처리 전 사진



1 μM Glyphosate  
처리 후 2일째  
(48시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 5일째  
(120시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 8일째  
(즉 192시간 경과)

그림 4-33. Glyphosate 제초제 처리에 대하여 저항성을 보이는 cp4EPSPS+CyPPO8-1 애기장대 형질전환체

20-57	20-82	20-84	20-88	20-94	20-97	20-106	20-110
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//	//	//	//	//	//	//



1 μM Glyphosate 처리 전 사진



1 μM Glyphosate  
처리 후 2일째  
(48시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 5일째  
(120시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 8일째  
(즉 192시간 경과)

그림 4-34. Glyphosate 제초제 처리에 대하여 저항성을 보이는 cp4EPSPS+CyPPO8-1 애기장대 형질전환체



CP4EPSPS	CyPPO8	CyPPO8	AGRS	5-3-1	5-7-1	1-77	20-18
//	//		//	//	//	//	//
//	//		//	//	//	1-77	20-18
//			//	//	//	//	//



1 μM Glyphosate 처리 전 사진



1 μM Glyphosate  
처리 후 2일째  
(48시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 5일째  
(120시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 8일째  
(즉 192시간 경과)

그림 4-35. Glyphosate 제초제 처리에 대하여 저항성을 보이는 cp4EPSPS+CyPPO8-1 애기장대 형질전환체

20-25	20-31	20-62	20-67	20-81	20-80	20-91	20-96
//	//	//	//	//	//	//	//
//	//		//	//	//	//	//
//	//		//	//	//	//	//



1 μM Glyphosate 처리 전 사진



1 μM Glyphosate  
처리 후 2일째  
(48시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 5일째  
(120시간 경과)



1 μM Glyphosate  
처리 후 8일째  
(즉 192시간 경과)

그림 4-36. Glyphosate 제초제 처리에 대하여 저항성을 보이는 cp4EPSPS+CyPPO8-1 애기장대 형질전환체



**(2) cp4EPSPS 및 CyPPO8-1 도입 형질전환체에 대한 복합제초제 (glyphosate + Tiafenacil) 저항성 검증 결과**

20개의 서로 다른 cp4EPSPS + CyPPO8-1 이중 유전자 복합 애기장대 형질전환체들에 대한 복합 제초제 (Glyphosate + Tiafenacil) 저항성 검증 실험을 수행한 결과, 6개의 호모라인에서 각각의 제초제들에 대하여 강한 저항성을 보임 (표 4-17).

붉은색으로 표시한 6개 라인은 Tiafenacil과 glyphosate 모두에 강한 저항성을 보이는 것을 확인하였고, 이는 CyPPO 변이유전자를 이용한 PPO계 제초제 내성 형질을 타 기작의 제초제 내성 형질과 함께 활용할 수 있음을 보여주는 결과로, 본 과제에서 개발된 PPO계 제초제 내성 형질의 적용범위 확장성을 제시해주고 있음.

**표 4-17. 복합 제초제 저항성 분석 결과**

# of homo lines	Homozygous lines	Tiafenacil (TF) Resistemce	Glyphosate (GP) Resistance	Both Resistance
1	20-1	No germination	No germination	
2	20-13	+	+++	
3	20-16	+	+++	
4	20-17	No germination	No germination	
5	20-25	+	+++	
6	20-31	+++	+++	✓
7	20-57	+	+++	
8	20-62	+	+++	
9	20-67	+	++	
10	20-81	++	+++	
11	20-82	+++	+++	✓
12	20-84	+++	+++	✓
13	20-88	+	+++	
14	20-90	+++	+++	✓
15	20-91	++	++	
16	20-94	+++	+++	✓
17	20-96	+	++	
18	20-97	++	+++	
19	20-106	+	+++	
20	20-110	+++	+++	✓



## 제 5 절 제초제 저항성 형질전환체의 생리적 특성 및 대사체 연구(2협동)

### 가. 형질전환체의 생리특성 조사

#### (1) 애기장대 wild type에 대한 tiafenacil 처리 농도 결정

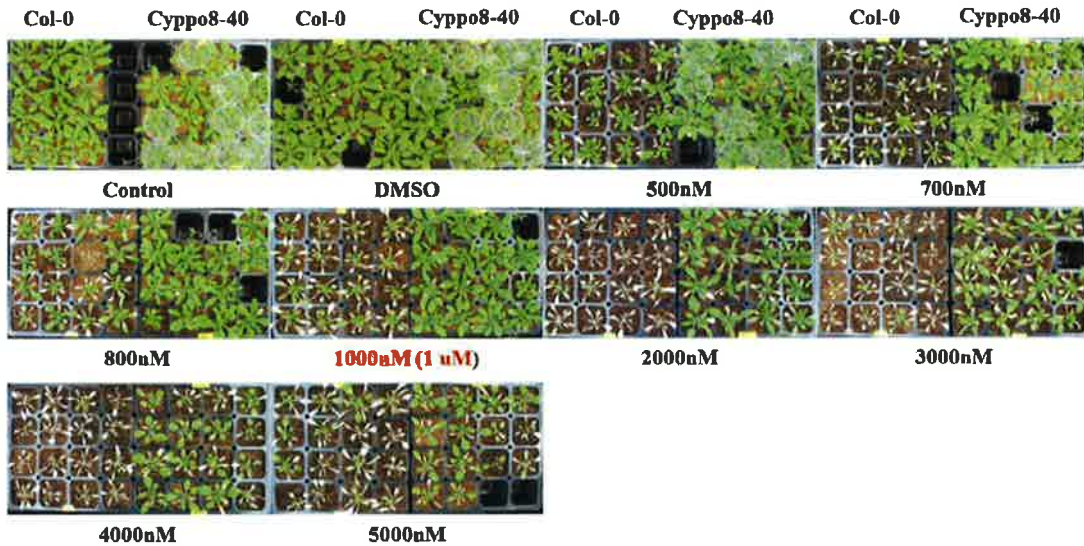


그림 5-1. Tiafenacil을 농도별로 애기장대에 처리함. (처리 후 7일)

애기장대 wild type의 사멸농도를 확인하기 위해, Tiafenacil을 여러 가지 농도로 처리하여, 시간별로 관찰함. <그림 5-1>은 처리 후 7일 후의 사진으로, 1  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서 tiafenacil이 접촉한 잎 조직은 완전히 파괴됨. 이 결과를 바탕으로, 제초제 처리농도를 1  $\mu\text{M}$ 로 고정하고 추후 실험을 수행함.

#### (2) 애기장대 형질전환체 CyPPO 8-16과 CyPPO 8-40 라인 생육 조사

변이되지 않은 CyPPO8 유전자 도입 형질전환체 중, 유전자 삽입 위치가 intergenic region인 것이 확인된 라인을 선정하여, 생육 정도, 종자수확량, 건물중, 광합성 효율, 제초제 저항성 등을 비교함.



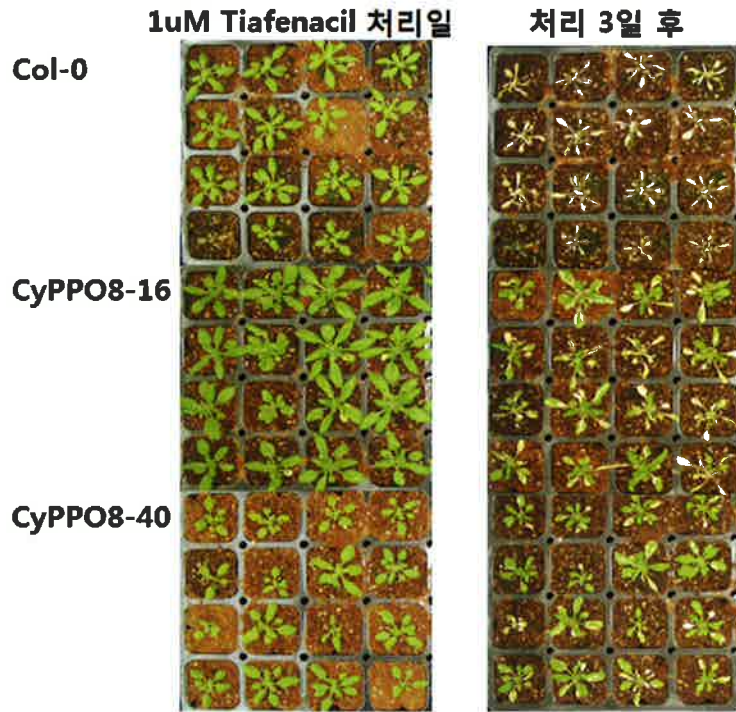


그림 5-2. wild type 애기장대와 형질전환체의 생육 조사 비교

CyPPO 8-16과 8-40 라인에 1 uM tiafenacil을 처리한 결과, Col-0의 경우, 3일 경과 후 제초제 처리에 의해 완전히 고사하였으나, 형질전환체는 다소 저항성을 보임. CyPPO 8-40 라인이 8-16 라인보다 약간 더 강한 저항성을 보였음 (그림 5-2).

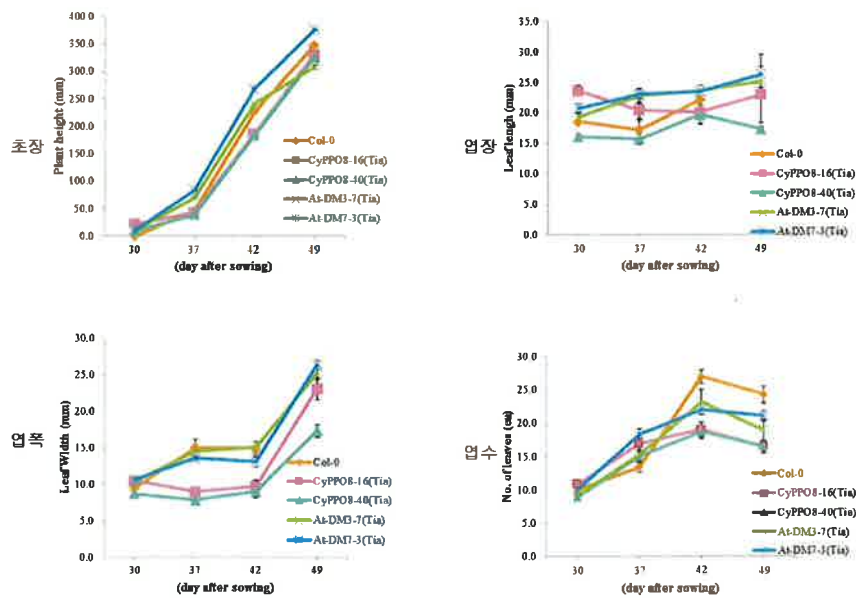


그림 5-3. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 생육 조사 비교

다음으로 형질전환체 및 wild type을 대상으로 초장, 엽장, 엽폭, 엽수 등 생육 실험을 실시하였고, Col-0는 DMSO만을 처리함.

두 라인의 생리적 특성은 크게 다르지 않았으며, 애기장대 PPO 유전자 돌연변이체인 AtDM3-7과 AtDM7-3 두 라인과 비교하였을 때도, 생육 차이가 거의 보이지 않았음(그림 5-3).

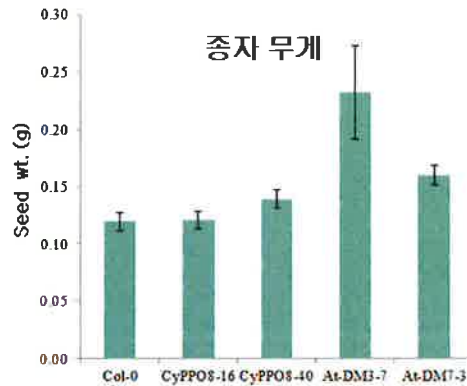


그림 5-4. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 종자 생산량 비교

종자생산량을 두 형질전환체에서 비교한 결과, Col-0와 CyPPO8번 라인 사이에는 커다란 차이가 없었으며(그림 5-4), 제초제에 대한 저항성과 확보한 종자량 및 발아율을 종합하여 CyPPO8-40 라인을 선택하여 추후 실험에 사용하기로 함.

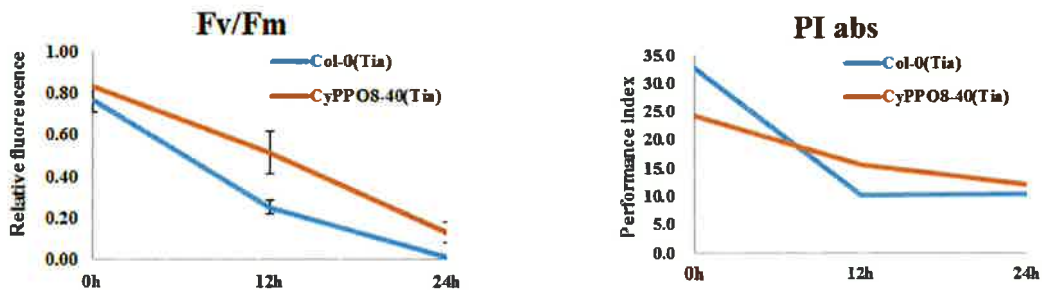


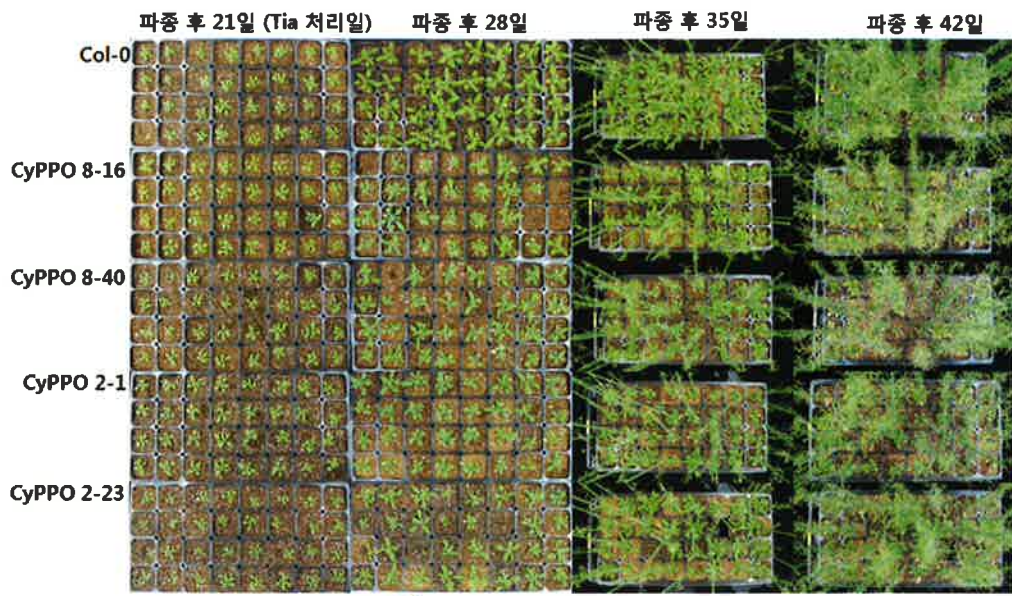
그림 5-5. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 광합성 효율 비교

Tiafenacil 처리후 광합성효율을 비교한 결과, CyPPO8-40 형질전환체 라인도 Col-0와 같이 시간의 경과에 따라, 광합성 효율이 서서히 감소하였으나, Col-0와 비교한 경우, 감소 정도는 경미함(그림 5-5).

(4) 형질전환체 CYPPO 8-16, CyPPO 8-40, CyPPO 2-1, CyPPO 2-23 라인의 생육 조사 실험

표 5-1. 토양 재배시 애기장대의 생육단계 수치화 기준

Stage	Description
Principal growth stage 1	Leaf development
1.02	2 rosette leaves > 1 mm in length
1.03	3 rosette leaves > 1 mm in length
1.04	4 rosette leaves > 1 mm in length
1.05	5 rosette leaves > 1 mm in length
1.06	6 rosette leaves > 1 mm in length
1.07	7 rosette leaves > 1 mm in length
1.08	8 rosette leaves > 1 mm in length
1.09	9 rosette leaves > 1 mm in length
1.10	10 rosette leaves > 1 mm in length
1.11	11 rosette leaves > 1 mm in length
1.12	12 rosette leaves > 1 mm in length
1.13	13 rosette leaves > 1 mm in length
1.14	14 rosette leaves > 1 mm in length
Principal growth stage 3	
3.20	Rosette is 20% of final size
3.50	Rosette is 50% of final size
3.70	Rosette is 70% of final size
3.90	Rosette growth complete
Principal growth stage 5	Inflorescence emergence
5.10	First flower buds visible
Principal growth stage 6	Flower production
6.00	First flower open
6.10	10% of flowers to be produced have opened
6.30	30% of flowers to be produced have opened
6.50	50% of flowers to be produced have opened
6.90	Flowering complete
Principal growth stage 8	Silique ripening
8.00	First silique shattered
Principal growth stage 9	Senescence
9.70	Senescence complete; ready for seed harvest



\* Col-0를 제외한 라인에는 Tiafenacil 1 uM 처리함

그림 5-6. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 생육 조사 비교

새롭게 제작된 CyPPO2-1과 CyPPO2-23 형질전환체 라인을 대상으로 생육 조사를 수행함. 파종 후, 21일 (추대 전)에 Col-0을 제외한 형질전환체 라인에 1μM의 tiafenacil을 처리 한 후, 생육 조사를 수행함(그림 5-6. 5-7).

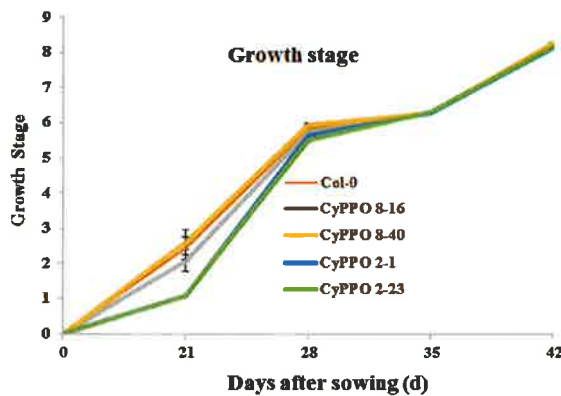


그림 5-7. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 생육 조사 비교

Growth stage를 조사한 결과, CyPPO2-1은 CyPPO8-16 라인과 CyPPO8-40의 생육과 비슷한 정도였으나, CyPPO2-23 라인의 생육은 약간 떨어졌음.

CyPPO2-23의 생육은 tiafenacil 처리 후, 약간 감소하였으나, 완전히 고사하지는 않음. 따라서, 이 라인은 약한 제초제 저항성을 가진 것으로 추정됨.

CyPPO2-1 라인은 CyPPO8번 라인과 비슷한 제초제 저항성과 생육 정도를 가진 것으로 판단됨.

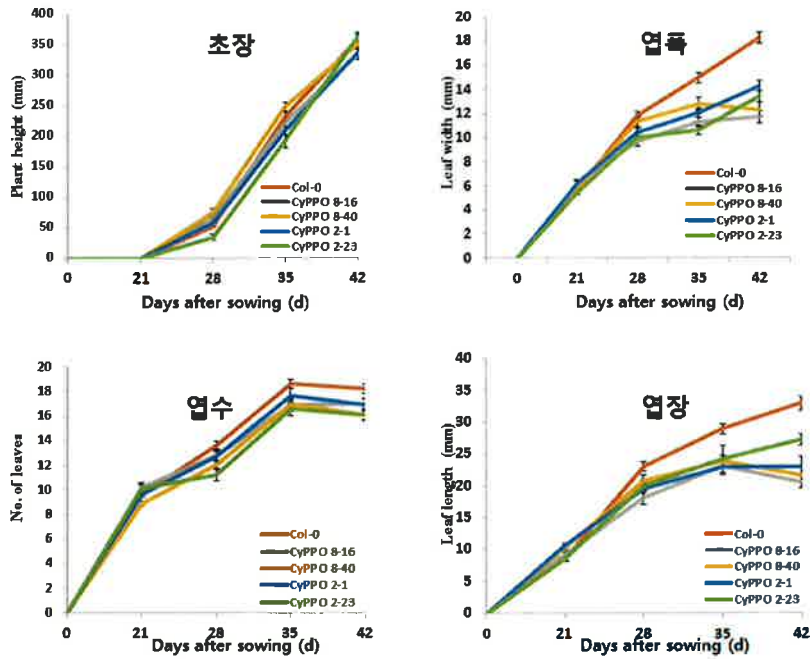


그림 5-8. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 생육 조사 비교

초장을 비교한 결과, 초장은 CyPPO2-23 라인에서 약간 감소한 경향을 보였으나, 전체적으로 모든 형질전환체 라인이 Col-0와 비슷한 생육상태를 보임(그림 5-8).

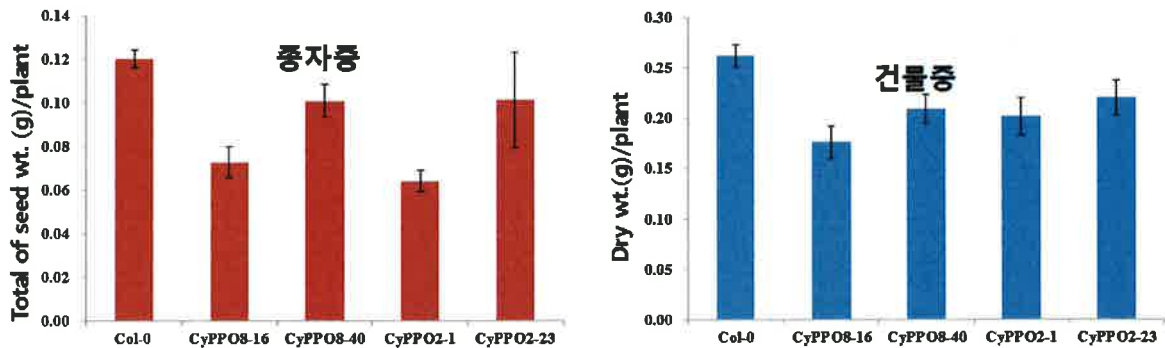


그림 5-9. 비형질전환 애기장대와 형질전환 애기장대의 종자중 건물중

종자량과 건조중을 조사한 결과 CyPPO 8-40과 CyPPO 2-23은 Col-0와 거의 비슷하였으나, CyPPO 8-16과 CyPPO 2-3 라인은 다소 감소하였음(그림 5-9).

## 나. 형질전환체 대상 대사체 분석

애기장대의 대사체 분석을 수행함으로써 비형질전환체와 형질전환체 식물의 대사체 물질의 성분, 또는 함량 변화 등을 알고자 함.

이를 위하여 Col-0 개체를 이용하여 실험조건 검토를 수행

### (1) 애기장대 대사체 분석을 위한 GC-TOF-MS 조건 검토 실험

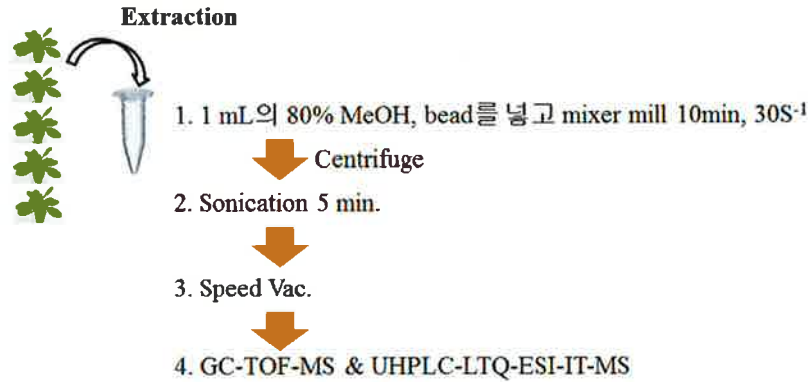


그림 5-10. GC-TOF-MS 조건 검토

비형질전환체 (Col-0) 5개체를 pooling한 후, 무처리, 용매처리 (DMSO), 1  $\mu$ M tiafenacil, 1  $\mu$ M saflufenacil, 1  $\mu$ M fomesafen을 처리하여 GC-TOF-MS를 수행함(그림 5-10).

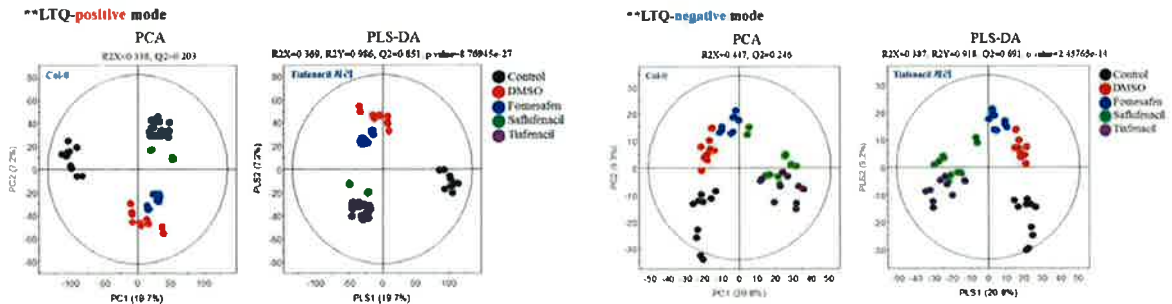


그림 5-11. Tiafenacil 처리시 비형질 전환체 (Col-0)의 대사체 다변량 분석

다변량 분석을 수행하여 각 처리별로 대사체 물질의 변화를 분석함(그림 5-11).

결과, 무처리와 DMSO (용매 처리구)에서 서로 다른 대사체 변화를 보임에 따라, 이후 실험에서 control구로써 DMSO 처리구를 사용하기로 함.

Tiafenacil 처리구와 saflufenacil 처리구에서는 예상대로 대부분의 대사체 물질의 변화 패턴이 유사하였음.



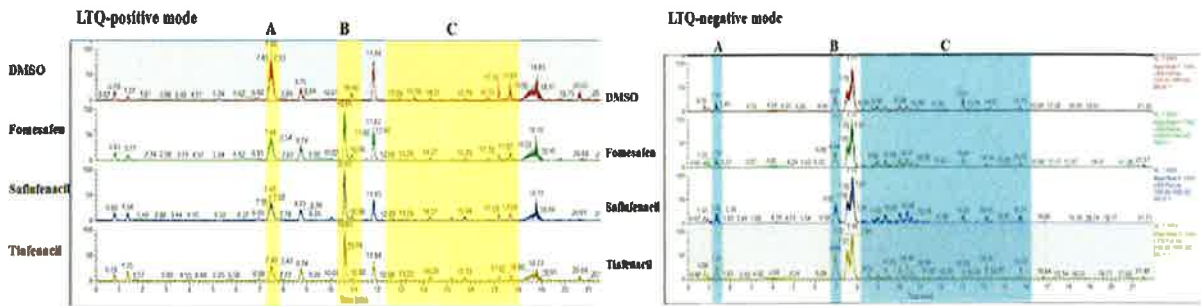


그림 5-12. Tiafenacil 처리시 비형질전환체 (Col-0)의 대사체 물질 분석

제조제를 처리하였을 때 검출되어진 모든 피크를 검출하여, positive 와 negative 양쪽 방법으로 대조구(DMSO 처리구)와 비교함.

결과, DMSO 처리구에서 보이지 않았던 피크, 또는 함량변화가 보이는 곳이 A, B, C 등의 세곳에서 개략적으로 관찰됨(그림 5-12).

위 결과를 바탕으로, 제조제 처리에 의해 변화하는 대사물질들이 다수 존재하고 있음이 추측되었음.

위 실험에서 검출된 피크의 물질 ID를 진행하여 이를 목록화 함(표 5-2).

아래 표를 기본으로 하여 대사 물질 검출 조건과 시료 개체수를 조절함.





표 5-2. GC-TOF-MS 에 의해 검출되어진 물질들의 목록

No	ID
1	α-D-GALACTOSIDE, METHYL TETRAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)-
2	α-D-Glucopyranoside, 1,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-α-D-fructofuranosyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
3	Benzoic acid trimethylsilyl ester
4	D-(-)-Fructose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti) -2
5	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-
6	d-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-
7	Fructose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime
8	Fumaric acid (2TMS)
9	GABA 3TMS
10	Galactinol, nonakis(trimethylsilyl) ether
11	Glyceric acid, tri-TMS
12	Glycerol, tris(trimethylsilyl) ether
13	Glyceryl-glycoside TMS ether
14	GLYCINE, N,N-BIS(TRIMETHYLSILYL)-, TRIMETHYLSILYL ESTER
15	Lactic acid, bis-TMS
16	L-ALANINE, N-(TRIMETHYLSILYL)-, TRIMETHYLSILYL ESTER
17	L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
18	L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ester
19	L-Threonine, N,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
20	l-Threonine, o-(tert-butyldimethylsilyl)-, tert-butyldimethylsilyl ester
21	l-Threonine, O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
22	Malic acid, O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl)ester
23	Maltose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)
24	Maltose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 2)
25	M Y O - I N O S I T O L , 1,2,3,4,5,6-HEXAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)-
26	N,O,O-TRI(TRIMETHYLSILYL)-1-C(13)-N-CARBOXY-GLYCI NE
27	Serine, bis(trimethylsilyl)-
28	Serine, N,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
29	Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-
30	Succinic acid (2TMS)

(2) Tiafenacil 처리시 암처리 및 광처리 3시간 경과 후 형질전환체 CyPPO 8-40의 대  
사체 물질 변화

Col-0의 경우, 24시간이 지나면 조직의 피사가 광범위 일어나므로, tiafenacil 처리에 의해  
직접적으로 합성 또는 함량의 변화가 일어나는 대사체를 알기 어렵다는 판단하에, 18시간의  
암처리 후, 광처리 3시간을 처리함.

실험 처리구는 <표 5-3>과 같음.

표 5-3. Tiafenacil 처리효과를 극대화하기 위한 광 처리 조건 및 비교 제초제

no	Plant Lines	Treatmetns	Hours	Hours	No. of plants /replication	
1		DMSO (10 $\mu$ l / 100ml)	0hr	dark 18hr	dark 18hr + light 3hr	3/3
2	Col-0	Tiafenacil (1 $\mu$ M)		dark 18hr	dark 18hr + light 3hr	3/3
3		Saflufenacil (1 $\mu$ M)		dark 18hr	dark 18hr + light 3hr	3/3
4		DMSO (10 $\mu$ l / 100ml)	0hr	dark 18hr	dark 18hr + light 3hr	3/3
5	CyPPO8-40	Tiafenacil (1 $\mu$ M)		dark 18hr	dark 18hr + light 3hr	3/3
6		Saflufenacil (1 $\mu$ M)		dark 18hr	dark 18hr + light 3hr	3/3

위 개체의 대사체 분석을 수행하기 위해 GC-MS를 수행함. 식물체 라인별로 PCA 분석을 수행함(그림 5-13).

Plant lines	0 hr	dark 18 hr	dark 18 hr + light 3 hr
Col-0	●	▲DMSO(control) ▲Saflufenacil ▲Tiafenacil	■DMSO(control) ■Saflufenacil ■Tiafenacil
CyPPO8-40	○	△ △Saflufenacil △Tiafenacil	□ □Saflufenacil □Tiafenacil

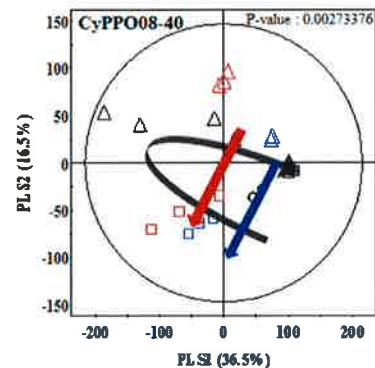
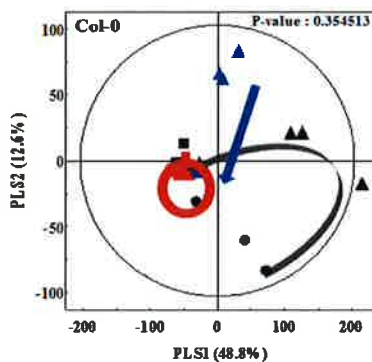


그림 5-13. Tiafenacil 처리시 비형질전환체 (Col-0)와 형질전환체 (CyPPO8-40)의 GC-TOF-MS 수행에 의한 PCA 분석

Col-0에서는 대조구와 비교하여 두가지 제초제의 처리에 따라 대사체 함량의 패턴이 달랐는데, 이것은 대조구에서는 식물체가 영향을 받지 않으며, saflufenacil 처리 시에는 약간의 고사만 일어나며, tiafenacil 처리에서는 식물체가 고사하는 세 가지 유형의 반응 패턴과 일치함.



Col-0와 CyPPO8-40 라인에서 제초제 처리시 대사체 물질은 서로 다르게 움직임이 PCA 분석에 의해 확인됨.

CyPPO8-40 형질전환체 라인에서 tiafenacil 처리시의 물질 변화와 saflufenacil 처리 시 물질의 변화 경향은 서로 비슷함. 따라서, 두 가지 제초제가 비슷한 대사경로의 물질에 영향을 미침을 추측할 수 있었음 (그림 5-14).

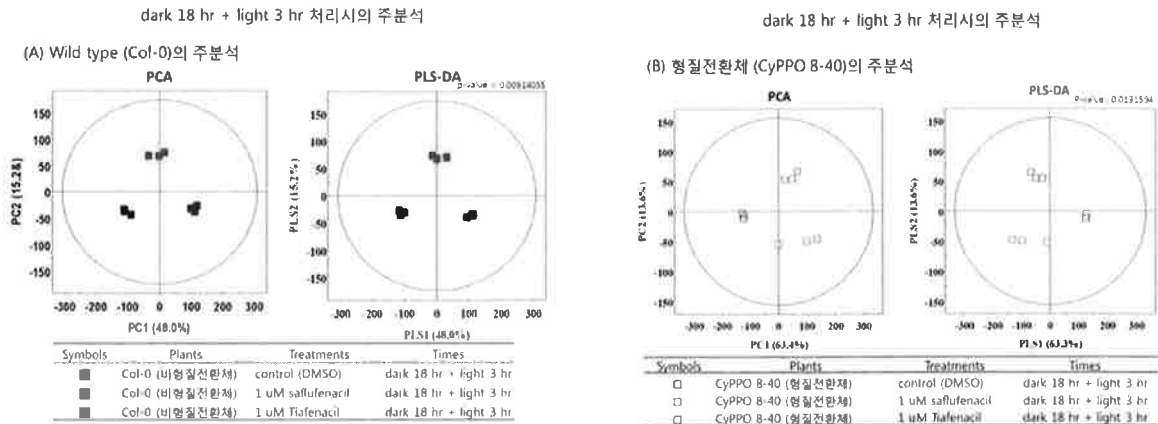


그림 5-14. Tiafenacil 처리 후 18시간 암 처리와 3시간의 광 처리를 추가한 경우 대사체 물질 변화에 관한 주분석

dark 18 hr + light 3 hr 처리구에서 일어난 대사체의 변화를 분석함.

분석 결과, 비형질전환체와 형질전환체 모두에서 tiafenacil과 saflufenacil 처리시 많은 물질이 공통되는 변화를 보이나, 몇몇 물질은 다른 분포를 나타냄에 따라 두 약제간의 특이적인 대사체 경로가 있을 것이라고 추측됨.

처리에 따라 통계적으로 유의차가 보이는 물질의 개수를 확인한 결과, Col-0에서는 31개 물질이 통계적으로 유의하게 시간에 따라 변화하였으며, 형질전환체에서는 30개의 물질이 통계적으로 유의하게 변화함(표 5-4).

표 5-4. 시간에 의해 함량 변화가 통계적으로 유의하게 변하는 물질의 갯수

Plant lines	No. of compounds(P<0.05)
Col-0	31
CyPPO8-40	30

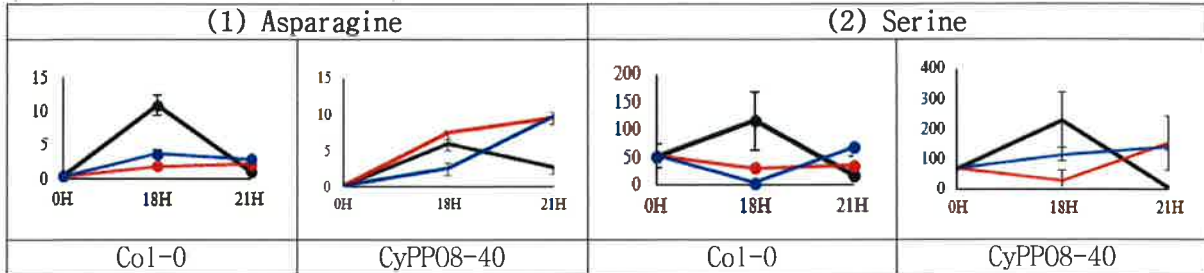
검출되어진 물질은 대부분 아미노산, 당류 및 당알코올, 유기산에 속하는 물질들이었음. 제초제 처리 이후 시간의 흐름에 따라 물질 변화가 통계적으로 유의한 물질의 개수를 정리하고 목록화 함(표 5-5).

표 5-5. 본 실험처리에서 검출되어진 물질목록

No	ID	No	ID
1	2-Ketoglutaric acid	36	Malonic acid
2	4-Hydroxybenzoic acid	37	Maltose
3	5-Oxoproline	38	Monomethylphosphate
4	Acetic acid	39	Myo-inositol
5	Adenosine	40	Myristic acid
6	Alanine	41	N-acetyl-glucosamine
7	Arabinose	42	Oleamide
8	Arachidonic acid	43	Oleic acid
9	Ascorbic acid	44	Oxalic acid
10	Asparagine	45	Palmitic acid
11	Aspartic acid	46	Palmitoleic acid
12	Benzoic acid	47	Parabanic acid
13	Citric acid	48	Phenylalanine
14	Erythrono-1,4-lactone	49	Phosphoric acid
15	Ethanolamine	50	Proline
16	Fructose	51	Pyruvic acid
17	Fumaric acid	52	Rhamnose
18	GABA	53	Ribitol
19	Glucose	54	Ribonic acid
20	Glutamic acid	55	Serine
21	Glutamine	56	Shikimic acid
22	Glyceric acid	57	Sinapinic acid
23	Glycerol	58	Stearic acid
24	Glyceryl-glycoside	59	Succinic acid
25	Glycine	60	Sucrose
26	Hexanoic acid	61	Sugar derivatives
27	Hydroxylamine	62	Sugar derivatives (mannose)
28	Isobutyric acid	63	Sugar derivatives (xylose)
29	Isoleucine	64	Threonic acid
30	Lactic acid	65	Threonine
31	Linoleic acid	66	Tryptophan
32	Linolenic acid	67	Tyrosine
33	Lysine	68	Urea
34	Maleic acid	69	Valine
35	Malic acid	70	Xylose

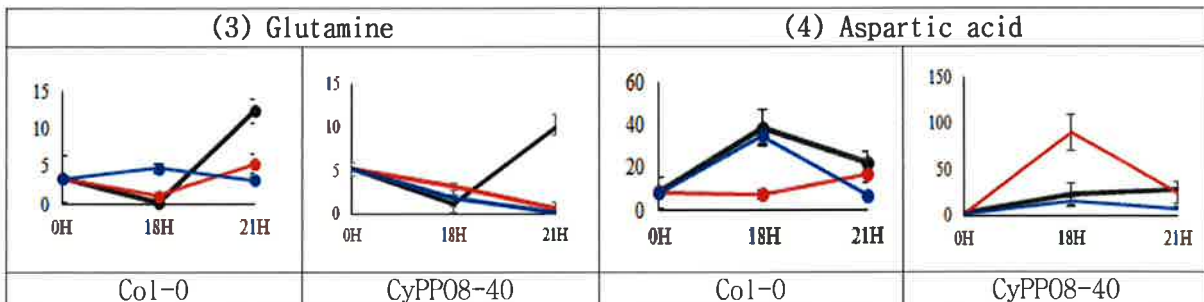
모든 처리구에서 총 70개의 물질이 검출되었으며, Col-0와 CyPPO8-40에서 변화의 추이를 유의차가 나타난 물질을 중심으로 그래프로 표시고, 식물체 라인별로 그 변화추이를 비교함.

아미노산 10가지의 변화를 식물체 라인별로 비교하여 그 변화를 비교함 (1~10까지)



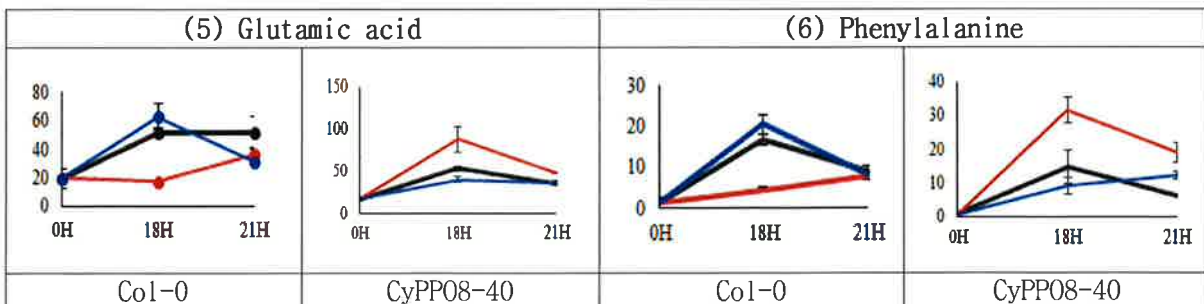
Asparagine 은 Col-0에서는 광 처리가 시작되면, 함량이 거의 증가하지 못하나, CyPPO8-40에서 tiafenacil, saflufenacil 처리 시 모두 증가하여 이를 생산하는 대사계가 정상적으로 움직이고 있다고 추측됨.

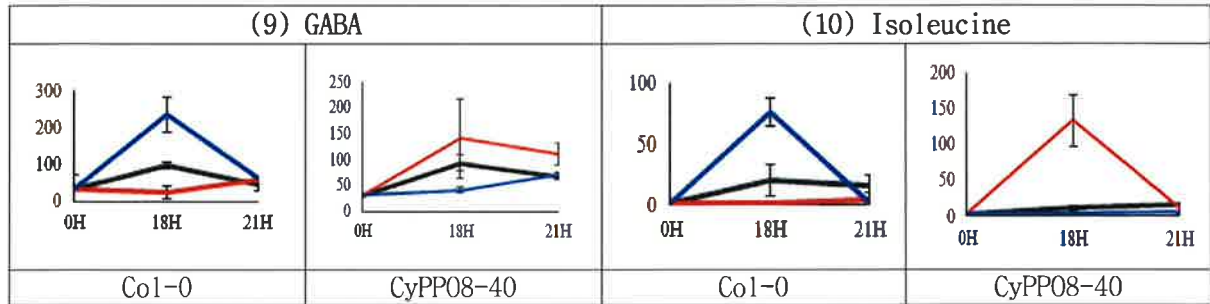
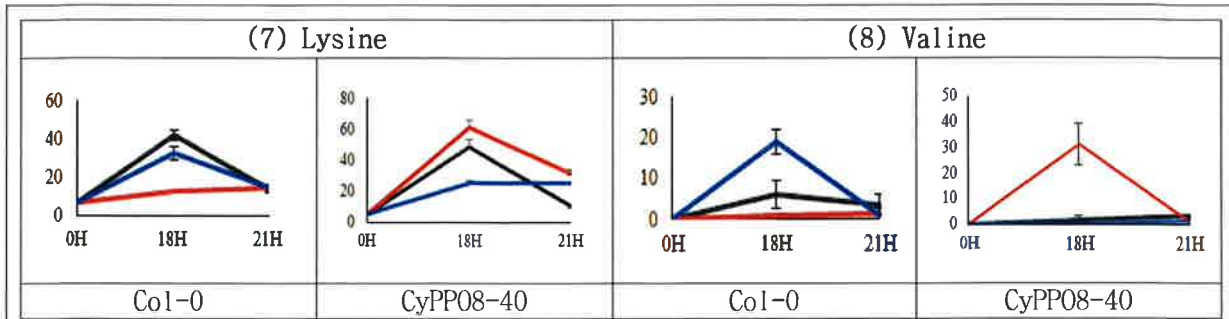
Serine은 형질전환체에서 Col-0보다 훨씬 많은 양이 검출되었으며, tiafenacil 처리에 의해 그 함량이 지속적으로 미미하게 증가하였으나, Col-0에서는 암 처리 동안 잠시 감소하였다가, 광 처리에 의해 약간 증가하는 패턴을 보임.



Glutamine은 제초제 처리 시 Col-0와 형질전환체에서 커다란 변화를 보이지 않았음.

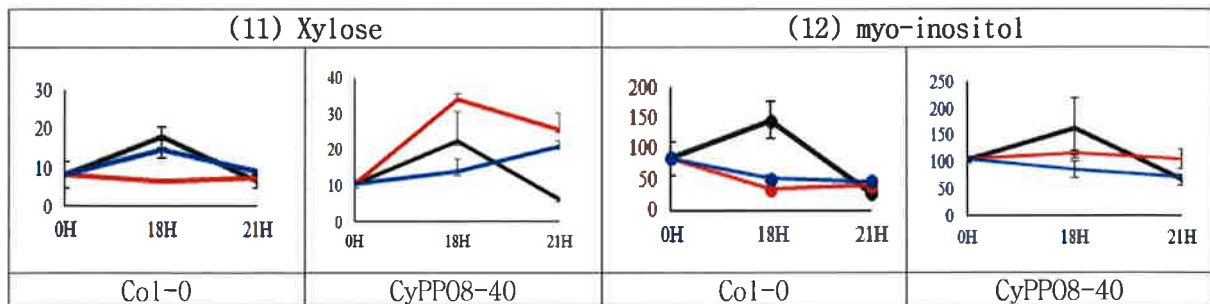
Aspartic acid는 tiafenacil 처리 시 Col-0에서는 tiafenacil 처리 시 18시간 암 처리 동안 증가하였다가, 광 처리를 하면 감소하였는데, 형질전환체에서는 커다란 변화가 없었음.





Glutamic acid, phenylalanine, lysine, valine, GABA, isoleucine 등의 아미노산은 tiafenacil 처리 시 Col-0에서는 tiafenacil 처리 이후, 증가하였다가, 이후 광 처리를 추가하면 점차 감소하는 경향을 보였으나, 형질전환체에서는 tiafenacil 처리 시 다소의 증감은 있었으나 크게 변화하지는 않았음.

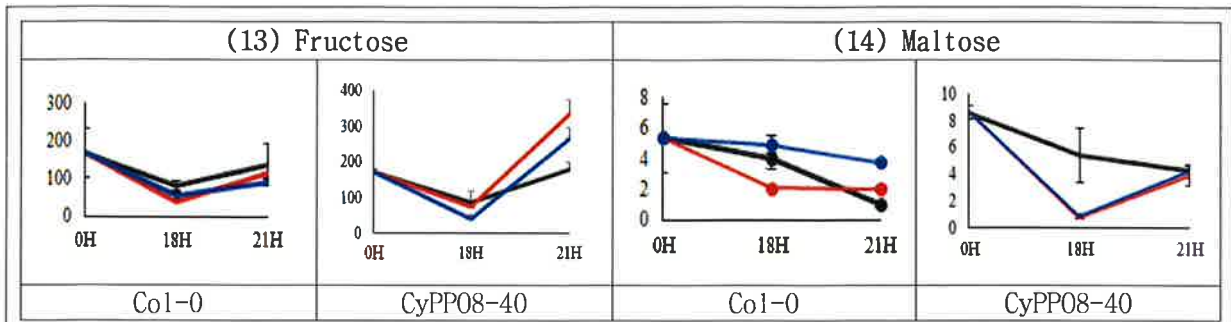
당 및 당알코올 대사 물질의 변화를 식물체 라인별로 비교하였음 (11~14)



Xylose는 재초제의 종류에 따라 서로 상반되게 그 함량이 변화하였는데, tiafenacil을 처리한 경우, Col-0에서는 함량의 변화가 거의 없거나, CyPPO8-40에서는 암 처리 동안 증가하였다가, 광 처리를 하면 약간씩 증가하였음.

myo-inositol은 시간에 따라 약간의 함량 차이를 보였으나, 두 가지 식물체라인에서 그 변화 패턴은 유사하였음

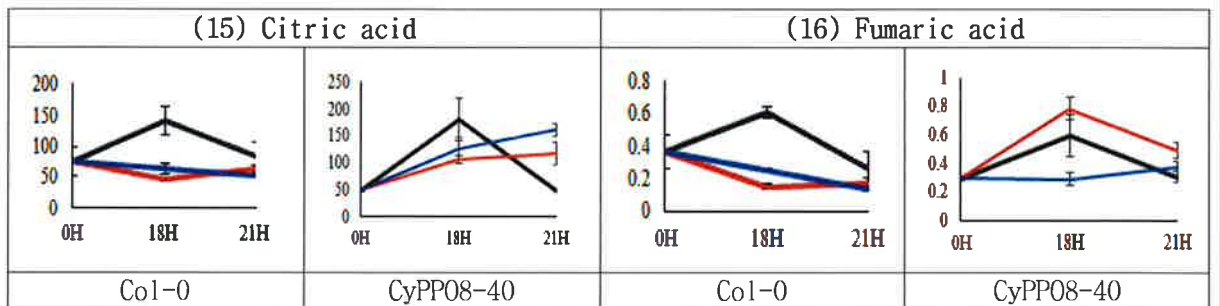




Fructose는 Col-0에서는 모든 시간대에서 모든 처리구가 비슷한 패턴으로 변화했으나, CyPPO8-40에서는 제초제 처리 시 그 함량이 control구보다 증가하였음

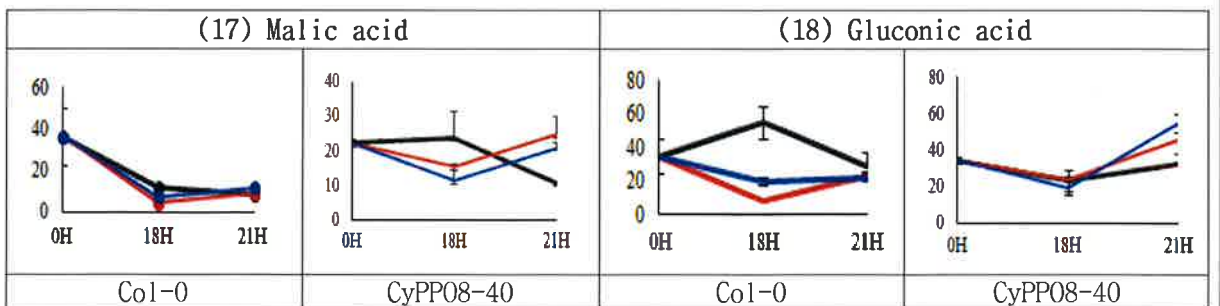
Maltose는 Col-0에서는 tiafenacil 처리 시 서서히 감소하거나 함량에 거의 변화가 없었으나, CyPPO8-40에서는 암 처리에서 급격히 감소한 후, 빛을 처리하면 급격히 다시 그 함량이 증가하였음.

유기산 및 기타 대사 물질의 함량변화를 두 가지 식물체 라인에서 비교함 (15~18)



Citric acid는 제초제 처리 시 Col-0에서는 함량이 약간 감소하거나, 변화가 없었으나, 형질전환체 라인에서는 시간의 경과와 함께 그 함량이 점차적으로 증가하였음.

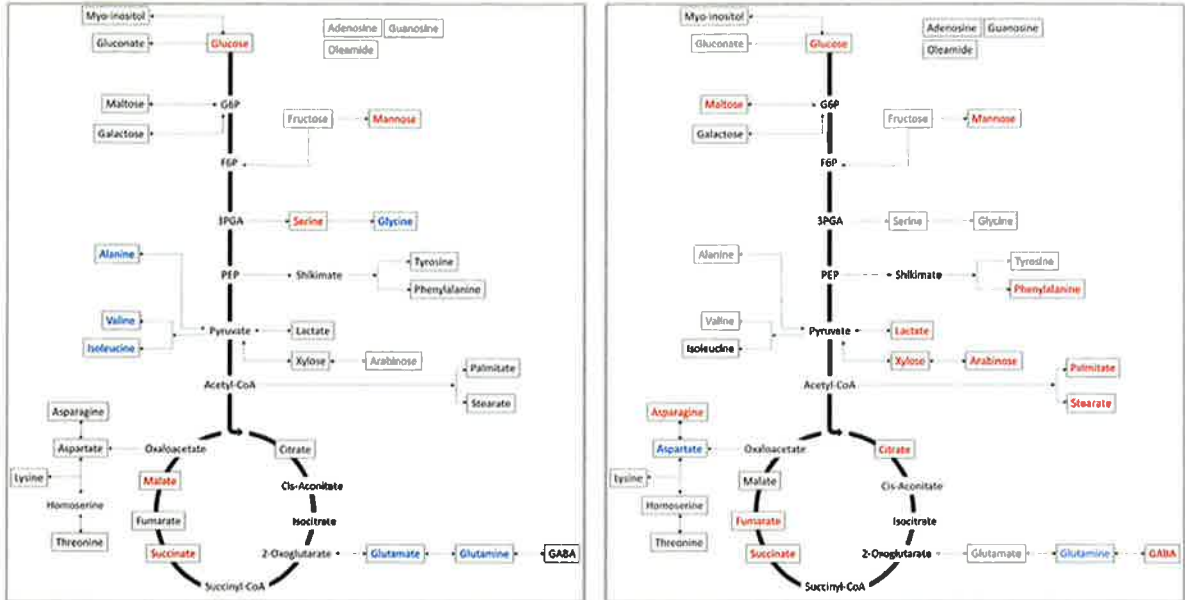
Fumaric acid는 Col-0에서는 tiafenacil 처리 시 급격히 감소하였으며, CyPPO8-40에서는 변화가 없거나 약간 증가하는 경향을 보였음



Malic acid는 Col-0에서는 대조구와 동일한 변화 패턴을 보였으나, CyPPO8-40에서는

대조구와 반대 패턴을 보임

반면, gluconic acid는 Col-0에서는 대조구와 반대로 변하는 패턴을 보였으나, CyPPO8-40에서는 대조구와 비슷하게 변하는 패턴을 보임



A. Col-0

B. CyPPO 8-40 형질전환체

그림 5-15. Tiafenacil 살포 후, 암처리 18시간 + 광처리 3시간 경과 후, Col-0와 CyPPO 8-40 형질전환체의 대사체 변화

Tiafenacil 처리후 암처리 18시간 + 광처리 3시간이 경과한 지점의 식물체를 채취하여 대사체 분석을 수행한 결과, Col-0에서는 검출된 대부분의 물질이 감소하거나 (6개 물질), 증감의 변화가 없는 것으로 나타났으나, CyPPO 8-40 형질전환체 라인에서는 2개의 물질이 감소하였으며, 대부분의 물질이 증가한 것으로 나타남(그림 5-15). 증가된 물질의 대부분은 아미노산 계열의 물질이었음.

위 결과를 바탕으로 다음 실험에서는 암처리와 광처리에 의한 대사체 변화의 증감을 최소화하기 위해 다음 실험은 일반적 애기장대의 생육 조건인 장일 조건에서 수행함.

### (3) 장일조건하에서 tiafenacil 처리시 CyPPO 8-40 형질전환체의 대사체 변화

이용한 식물체 라인은 Col-0와 CyPPO8-40 두 가지 라인을 이용하였으며, 처리구는 다음 <표 5-6>와 같음

앞의 실험에서, 대사체 함량의 변화가 제초제의 효과와 빛에 의한 영향을 구분하기가 모호한 점이 많아, 이번 실험에서는 애기장대의 일반적 일장조건인 16시간(낮)/8시간(밤)의 조건으로 실험을 수행함.



표 5-6. 샘플별 약제 처리 및 광처리 조건

no	Plant Lines	Treatments	Hours				no. of plants /replication
			0hr	12hr	24 hr	48 hr	
1	Col-0	DMSO (10ul / 100ml)	0hr	12hr	24 hr	48 hr	3/3
2		Tiafenacil (1 μM)		12hr	24 hr	48 hr	3/3
3		Saflufenacil (1 μM)		12hr	24 hr	48 hr	3/3
4	CyPPO8-40	DMSO (10ul / 100ml)	0hr	12hr	24 hr	48 hr	3/3
5		Tiafenacil (1 μM)		12hr	24 hr	48 hr	3/3
6		Saflufenacil (1 μM)		12hr	24 hr	48 hr	3/3

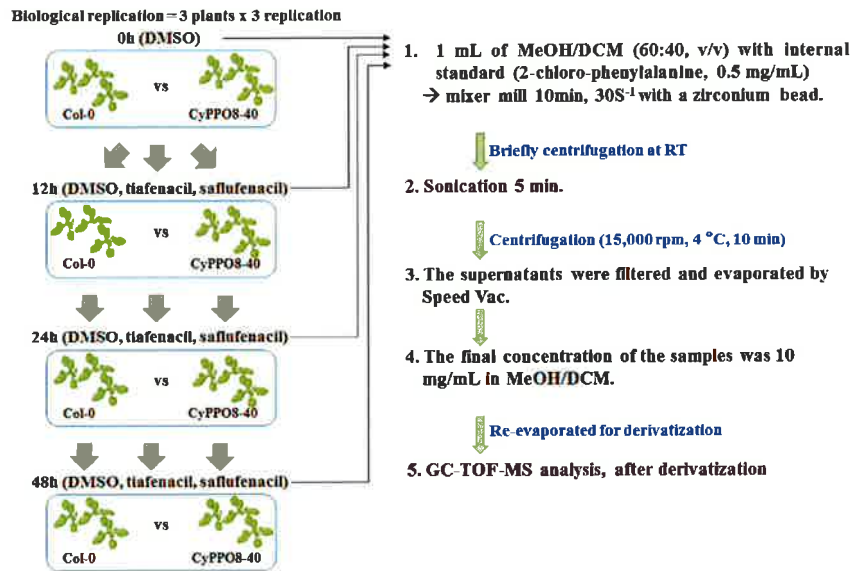


그림 5-16. GC-TOF-MS를 수행하기 위한 대사물질 추출 간략도

대사체 분석을 위한 용매로 메탄올을 사용하였으며, 3개체/반복으로 3반복으로 수행함(그림 5-16).

	0h	12h	24h	48h
Col-0	●	▲	◆	■
	DMSO	▲	◆	■
	Tia	▲	◆	■
		▲	◆	■
		▲	◆	■
		▲	◆	■

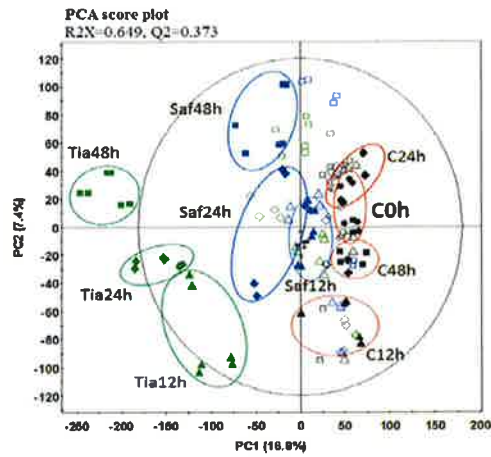


그림 5-17. GC-TOF-MS 수행 후 Col-0에서의 다변량 분석

다변량 분석을 수행한 결과, 각 처리에 따라 3개의 그룹으로 형성되었음(그림 5-17).

1  $\mu\text{M}$  saflufenacil 은 식물체를 완전히 고사시키지 않아 대사계가 대체적으로 정상적인 기능을 수행할 것이라고 예상한 대로, saflufenacil 처리구와 대조구는 서로 가까운 곳에 그룹을 형성하였음. 반면, 식물체가 고사하는 tiafenacil 처리구는 다소 떨어진 곳에 그룹을 형성하였음.

	0h	12h	24h	48h
CyPPO 8-40	○	△	◇	□
	DMSO	△	◇	□
	Tia	△	◇	□
		△	◇	□
		△	◇	□
		△	◇	□

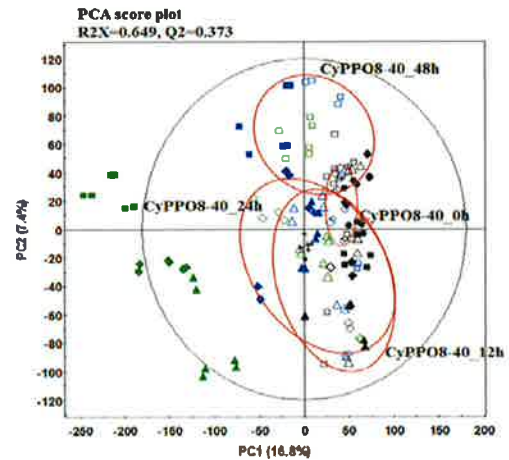


그림 5-18. GC-TOF-MS 수행 후 CyPPO8-40에서의 다변량 분석

형질전환체에서의 대사체 다변량 분석을 수행한 결과, Col-0에서와 같이 대조구와 saflufenacil 처리 그룹이 가까이 형성되었으며, tiafenacil 처리구는 따로 그룹이 형성되었음(그림 5-18).

Col-0에서 유의차가 보인 물질들의 시간에 따른 변화를 형질전환체와 비교함.

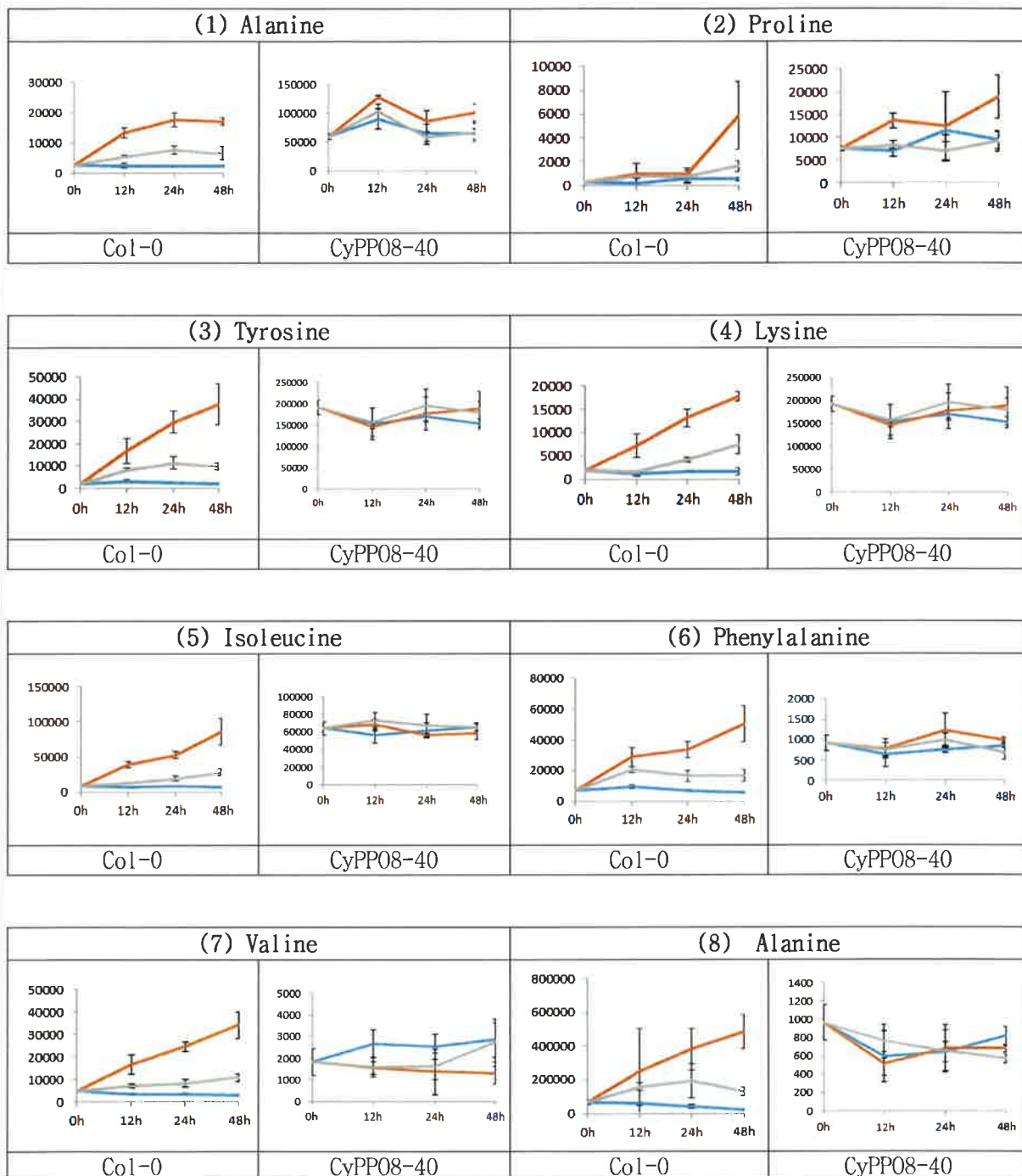


Control (DMSO)

1uM Tiafenacil

1uM Saflufenacil

아미노산 물질들의 함량 변화를 비교함 (1~8)

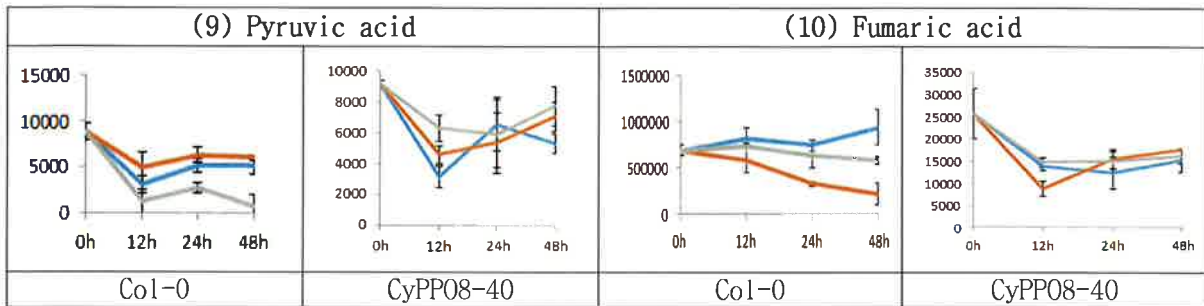


Tyrosine, lysine, alanine, proline, isoleucine, phenylalanine, valine, alanine과 같은 아미노산은 tiafenacil 처리 시, Col-0에서는 더 이상 대사되지 못하고, 식물체의 고사와 함께

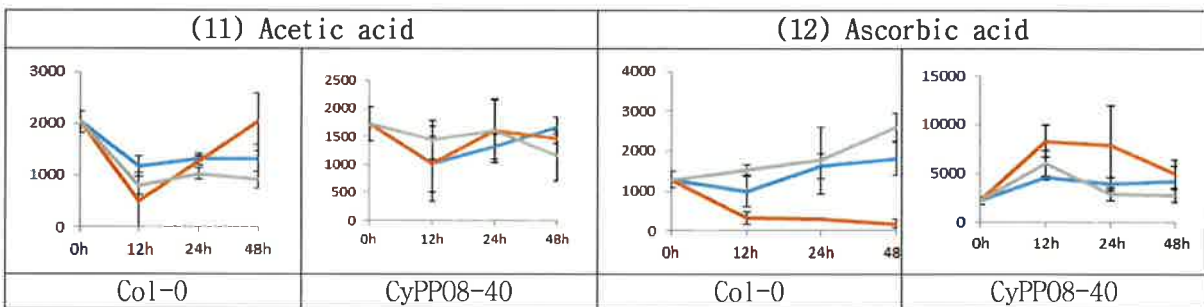


함량이 증가하였으나, 형질전환체에서는 tiafenacil을 처리하지 않은 구에서의 식물체 변화와 거의 비슷하거나, 시간의 경과에 따라 주기적 변화를 보여, 형질전환체에서는 제초제처리를 하여도 아미노산 대사 경로는 크게 영향을 받지 않음이 추측되었음

제초제 처리 이후, 유기산 물질의 함량 변화를 분석함(9~15)

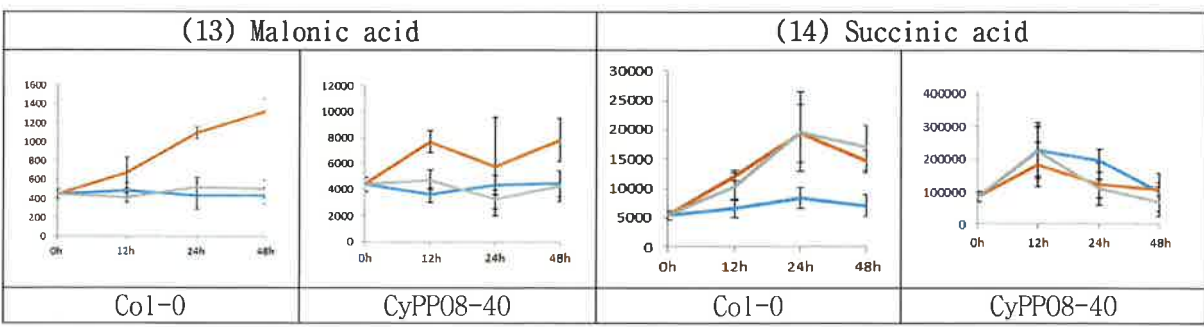


Pyruvic acid와 Fumaric acid는 tiafenacil 처리의 경우 Col-0에서는 식물체의 고사와 함께, 함량이 12시간이 경과한 지점에서 감소한 후, 이후 계속 감소되어진 상태였으나, CyPPO8-40에서는 12시간째 가장 감소한 이후, 함량이 증가하여 식물체의 대사가 지속적으로 진행되고 있음을 보임.

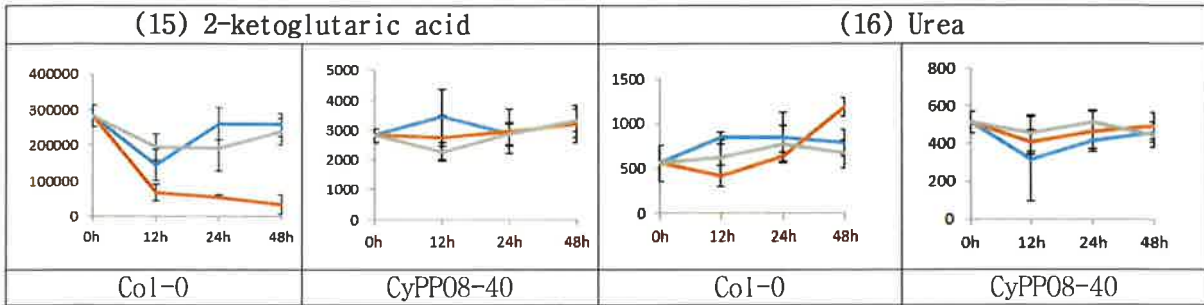


Acetic acid는 Col-0에서는 tiafenacil 처리 시 식물체의 고사와 함께 시간의 경과에 따라 점점 증가하였으나, 형질전환체에서는 시간의 경과와 함께 약간의 증감만을 보였음.

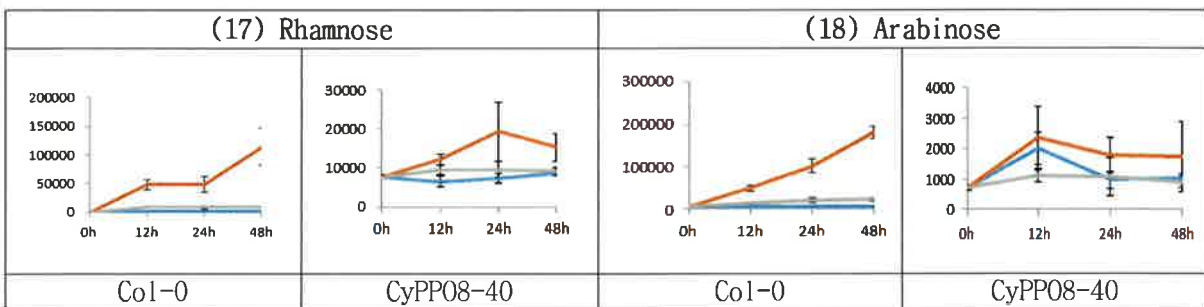
Ascorbic acid는 Col-0에서는 tiafenacil 처리시 식물체의 고사와 함께 시간의 경과에 따라 점점 감소하였으나, 형질전환체에서는 시간의 경과와 함께 약간의 증감만을 보였음



Malonic acid은 tiafenacil 처리 시 식물체의 고사와 함께 함량이 점점 증가되었으나, 형질전환체의 경우는 다소의 함량 변화는 보였으나, 커다란 변화는 보이지 않았음.



2-ketoglutaric acid 는 Col-0에서 시간의 경과와 함께 지속적으로 그 함량이 감소하였으며, 기타 물질로써 urea는 Col-0의 경우, tiafenacil 처리를 하면 시간이 지남에 따라 축적되었음



당류 물질로써 rhamnose와 arabinose는 tiafenacil 처리 시 식물체의 고사와 함께 함량이 점점 증가되었으나, 형질전환체의 경우는 다소의 함량 변화는 보였으나, 커다란 변화는 보이지 않았음. 따라서 식물체의 고사와 함께 이 물질들의 대사계통에 이상이 생기면서 축적되었을 것으로 추측됨.

**다. 장일 조건하에서 tiafenacil 처리시 형질전환체 CyPPO 10F 라인의 대사체 분석**

새로운 형질전환체인 CyPPO 10F 라인을 대상으로 대사체 분석을 수행함. 실험 처리구는 <표 5-7>과 같음.

**표 5-7. 샘플별 약제 처리 및 광처리 조건**

no	Plant Lines	Treatmetns	Hours		no. of plants /replication
1	Col-0	DMSO (10ul / 100ml)	0hr	6 hr	3/3
2		Tiafenacil (5 μM)		6 hr	3/3
3	CyPPO 10F	DMSO (10ul / 100ml)	0hr	6 hr 24 hr	3/3
4		Tiafenacil (5 μM)		6 hr 24 hr	3/3

CyPPO8-40을 대상으로한 대사체 분석시 적용한 약제 처리조건과는 달리, CyPPO 10F $\blacksquare$ 라인은 매우 높은 제초제 저항성을 가지므로, tiafenacil를 5 uM 의 고농도로 처리하였고, 이 농도에서 Col-0는 약제 처리 6시간 후 심한 약해를 보여 장시간 처리가 곤란하며, 샘플링 시 조직의 상태가 CyPPO10F $\blacksquare$ 과 상이함에서 오는 실험오차를 없애기 위해 처리 시간을 6시간으로 단축함.

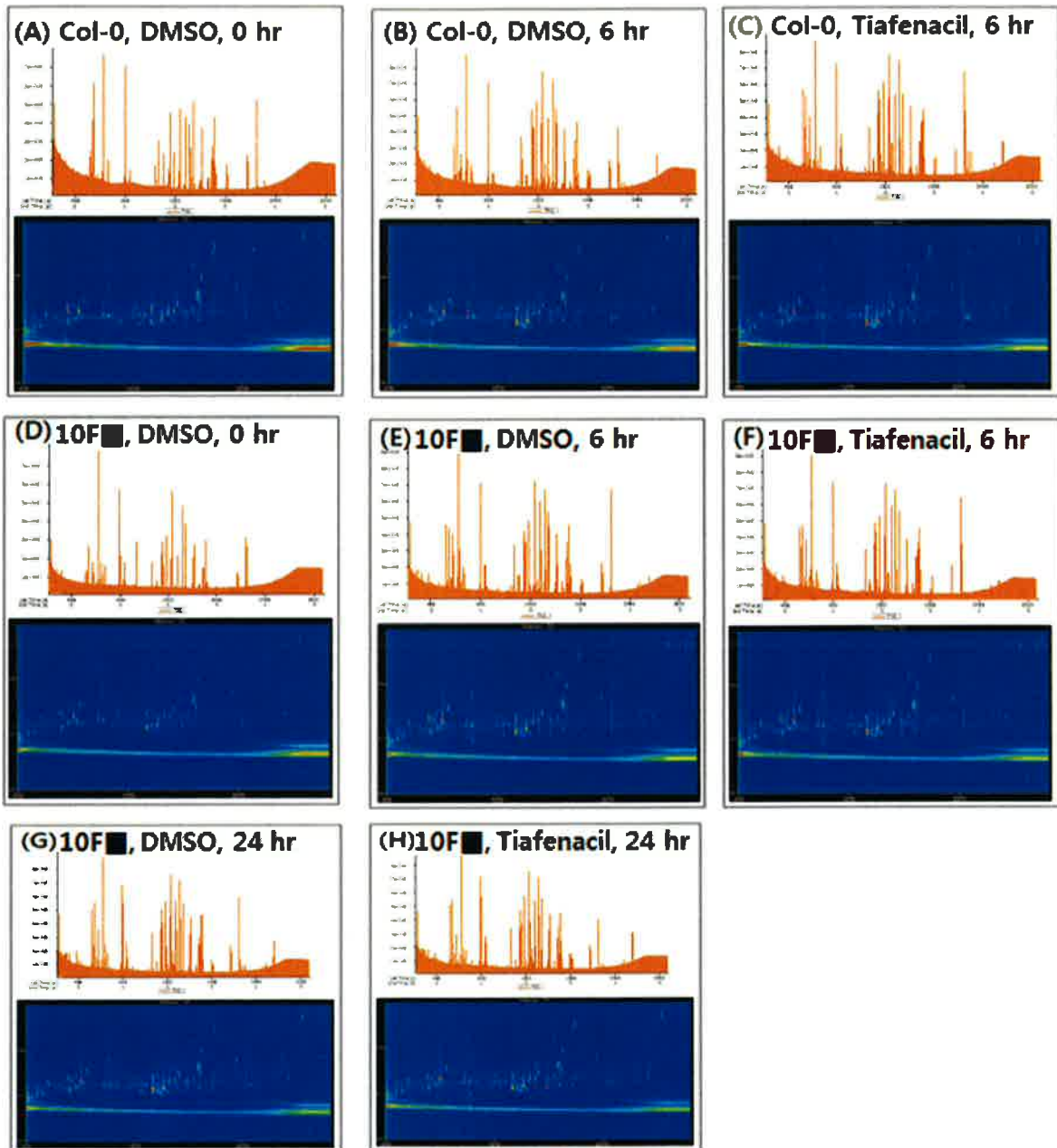


그림 5-19. GC-TOF-MS 분석에 의한 제초제 처리시 비형질전환체와 형질전환체의 대사물질 변화



형질전환체 CyPPO10F■과 비형질전환체에 Tiafenacil 5 uM을 처리하여 대사체 물질을 분석함. 분석 결과를 크로마토그램으로 나타낸 결과, Col-0에서는 6시간 경과 후, DMSO 처리에 비하여 다른 피크 및 점들을 나타냄(그림 5-19).

형질전환체의 경우는, 6시간과 24시간 경과 후, DMSO처리와 tiafenacil 5 uM 처리시 비슷한 피크를 나타냄. GC-TOF-MS 에 의해서 검출된 목록은 총 132개였음(표 5-8).

표 5-8. Col-0와 형질전환체 CyPPO 10F■의 GC-TOF-MS분석에 의해 검출된 물질목록

No.	Compound ID
1	L(+) Lactic acid
2	Oxalic acid
3	L-Leucine
4	L-Leucine(Iso)
5	Glycine
6	L-Serine
7	Niacin
8	L-Threonine
9	Succinic acid
10	Succinamic acid (-3)
11	Nonanoic acid
12	L-Alanine (-2)
13	L-Glutamic acid
14	Gluconolactone (-3)
15	Ribitol
16	(-) Shikimic acid
17	D Mannitol
18	Sucrose
19	Xylitol
20	Inositol
21	Palmitic acid
22	Dulcitol
23	L(-) Arabitol
24	Stearic acid
25	Melibiose
26	D Raffinose
27	D(+) Trehalose
28	L-Tryptophane
29	Myo-Inositol
30	a-Lactose
31	D(+) Cellobiose
32	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1) (CAS)
33	Dodecane (CAS)
34	Octadecane (CAS)
35	Heneicosane (CAS)
36	Pyridine (CAS)

37	Pentadecane
38	Nonane, 4,5-dimethyl- (CAS)
39	Nonadecane (CAS)
40	Nonane (CAS)
41	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)- (CAS)
42	Docosane, 11-decyl- (CAS)
43	Tetradecane (CAS)
44	Phosphoric acid, dioctadecyl ester (CAS)
45	DODECANE
46	PROPANOIC ACID, 2,3-BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER
47	2-METHYL-1,3-PROPANEDIOL 2TMS
48	1-Tridecanol (CAS)
49	Eicosane (CAS)
50	Heptadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- (CAS)
51	Tricosane (CAS)
52	2-Butenedioic acid (E)-, bis(trimethylsilyl) ester (CAS)
53	Heptadecanoic acid, trimethylsilyl ester (CAS)
54	D-GALACTOSE 5TMS
55	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, trimethylsilyl ester (CAS)
56	BUTYL HYDROXY TOLUENE
57	Cyclohexane, decyl- (CAS)
58	Propanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester (CAS)
59	THREONIC ACID,O,O,O,O-TMS
60	Methyl oxamate
61	Pentasiloxane, dodecamethyl- (CAS)
62	ALLOSE PER-TMS
63	Silanol, trimethyl-, benzoate (CAS)
64	3-HYDROXYPYRIDINE 1TMS
65	2,6-di-butyl-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione
66	Pentadecanoic acid, trimethylsilyl ester (CAS)
67	SINAPIC ACID-TMS ETHER
68	Decanoic acid, trimethylsilyl ester (CAS)
69	Cyclopentasiloxane, decamethyl- (CAS)
70	L Rhamnose
71	L-Proline
72	D-Sorbitol
73	Maltose
74	Butanoic acid, 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester (CAS)
75	Heptadecane (CAS)
76	ACETIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER
77	TETRAILOXANE, DECAMETHYL-
78	Pentadecane (CAS)
79	Mannose, 6-deoxy-2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, L- (CAS)
80	Silane, [(1-ethylpentyl)oxy]trimethyl- (CAS)
81	(Z)-Bis-1,2-(trimethylsilyloxy)ethylene
82	3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,9,9-tetramethyl-5,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (R*,S*)-(CAS)
83	Hexanal, 2-ethyl- (CAS)
84	1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro- (CAS)





85	NONANOIC ACID 1TMS
86	Ethanone, 2,2-dimethoxy-1,2-diphenyl- (CAS)
87	rac-(Z)-(1R,2S,3R,4S)-2-Hydroxymethyl-3-(1,6-heptadienyl)bicyclo[2,2,1]heptane
88	Salicylic acid
89	D(+) Mannose
90	Hexadecane (CAS)
91	cis-Ocimene
92	Silane, (1,1-dimethylethoxy)trimethyl- (CAS)
93	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester (CAS)
94	Azulene (CAS)
95	SILANOL, TRIMETHYL-
96	D(-) Arabinose
97	L-Arabinose
98	Undecane (CAS)
99	2-(2-DIMETHYLAMINOETHOXY)ETHANOL
100	2,5,8,11,14-Pentaoxapentadecane (CAS)
101	AZULENE
102	Osmium, [methyl 2-(1,1-dimethylethyl)-4,5-dihydroxy-3-oxazolidinocarboxylato(2-)-O4,O5]dioxobis(pyridine)-, [OC-6-44-[2R-(2?4?5?)]- (CAS)
103	3-Pyridinecarbonitrile (CAS)
104	Cysteine - 2'-Methylhydroquinone complex cpd.
105	L-Aspartic acid
106	Succinamic acid (-2)
107	Propanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester (CAS)
108	SPERMIDINE,N,N,N,N,N-TMS
109	L-Glutamine, tris(trimethylsilyl) deriv. (CAS)
110	Acetic acid, [(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester (CAS)
111	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- (CAS)
112	D Glucose
113	L-Methionine
114	D(-) Fructose
115	L-Tyrosine
116	Octacosane (CAS)
117	Heptadecane, 2,6-dimethyl-
118	D(-) Lyxose
119	UNDECANE, 2,5-DIMETHYL-
120	Hexadecane, 2-methyl- (CAS)
121	Hexane (CAS)
122	Methyl 2,3,6,7-tetradeoxy-2,6-di-C-methyl-?D-altro-octo-1,5-pyranoside
123	Tetracosanoic acid, trimethylsilyl ester (CAS)
124	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (CAS)
125	Phthalic acid, butyl ester, ester with butyl glycolate (CAS)
126	Ethyl (E)-2-acetyl-2-methyl-4-phenylbut-3-enoate
127	Lauric acid
128	D Galactose
129	D-Pinitol
130	2,2-Dideuterio-1-heptanal
131	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS)
132	Cyclohexane, butyl- (CAS)

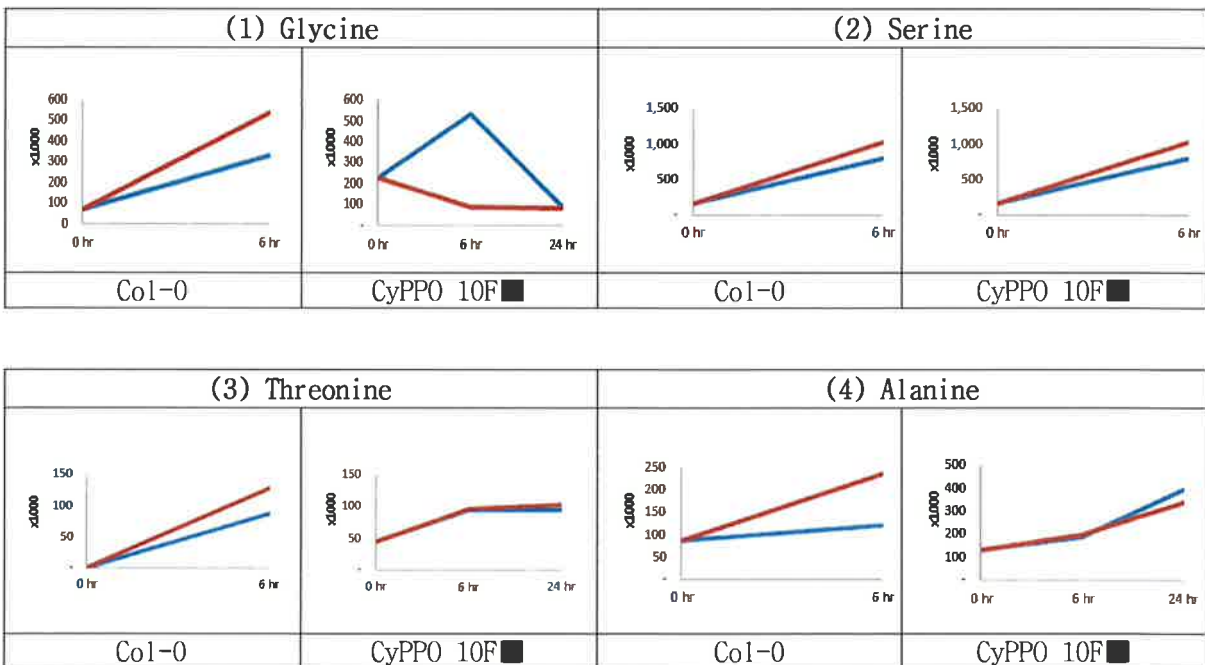
위 결과를 바탕으로 처리별 대사 물질의 증감을 비교함.

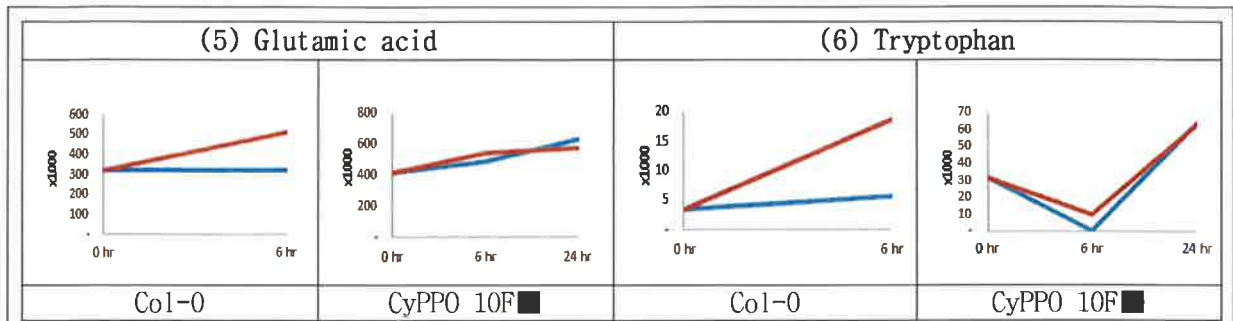
— Control  
— 5 uM Tiafenacil

6가지의 아미노산 물질의 함량 증가를 조사한 결과(1~6), Col-0 에서는 제초제를 처리한 경우, 시간의 경과와 함께 아미노산 물질이 증가하는 경향을 보임. 이것은 아미노산의 대사 계통에 장애가 발생하여 대사 되지 못하기 때문이라고 추측됨.

제초제를 처리한 경우, 형질전환체 CyPPO10F■에서는 Glycine이 6시간 경과 후 증가하고, 24시간에는 다시 감소한 경우를 제외하면, 모두 control구와 유사한 함량 변화의 패턴을 보임.

따라서 형질전환체에서는 5uM의 tiafenacil을 처리하여도, 아미노산 계통 물질의 대사계가 커다란 영향을 받지 않으며 정상적으로 작동하는 것으로 보임.

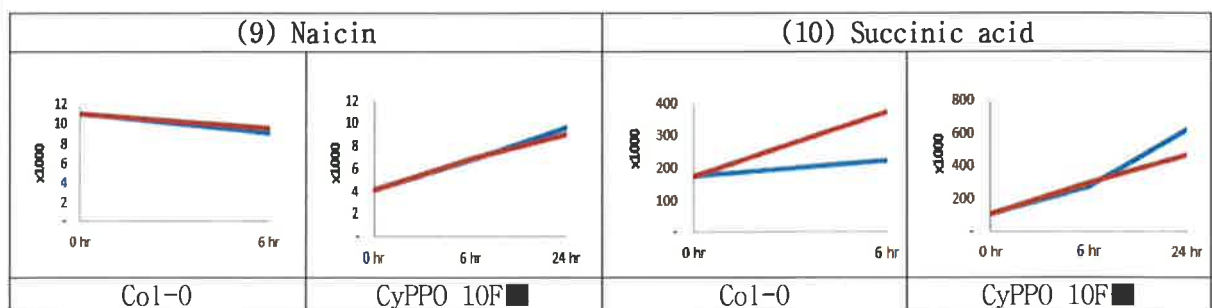
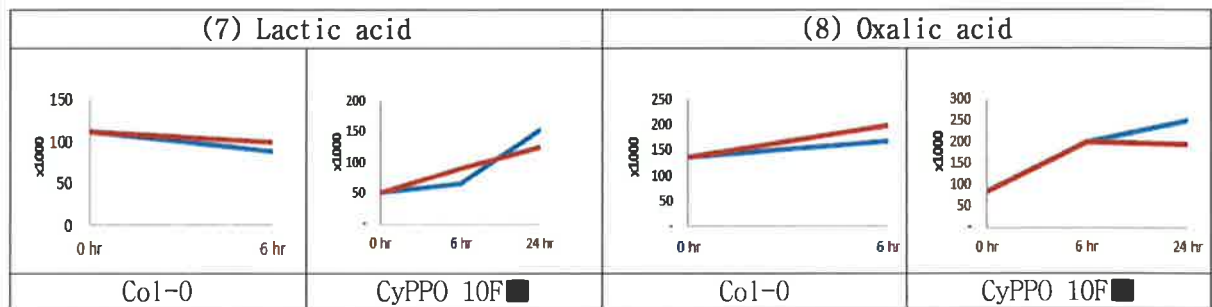


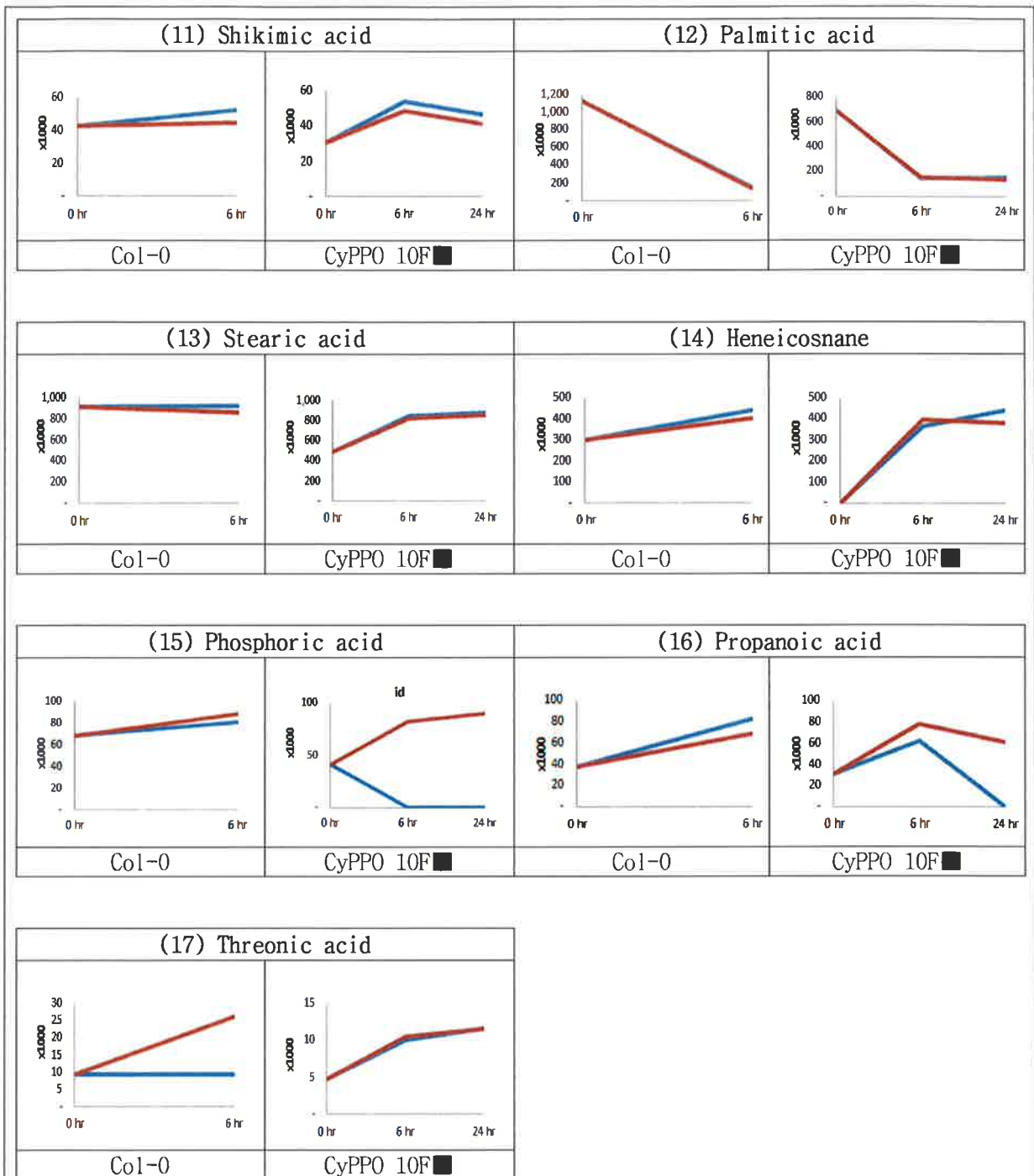


다음으로, 총 11가지의 유기산 물질의 함량 변화를 분석함 (7~17).

대부분의 유기산 물질은 Col-0나 형질전환체에서, control구와 비슷한 경향으로 변화하였음. 단, phosphoric acid는 형질전환체에서 제초제를 처리하면, 6시간 경과 후 control에서는 감소하나, 제초제 처리구에서는 증가하는 반대 경향을 보임.

Threonic acid는 비형질전환체의 경우, 6시간이 지나면 점차 함량이 증가하는 것으로 미루어보아, tiafenacil 처리가 이 물질의 대사에 영향을 미치는 것으로 추측되었음.



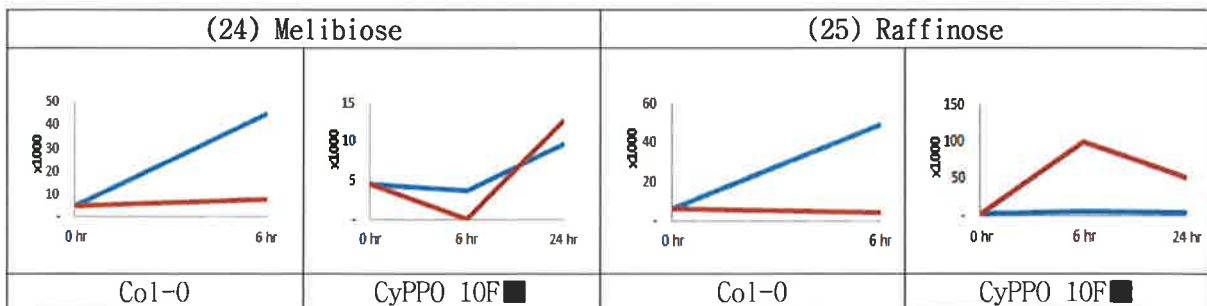
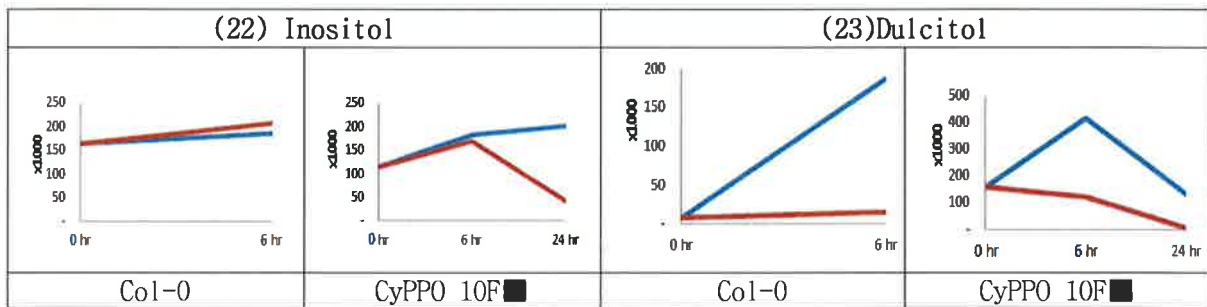
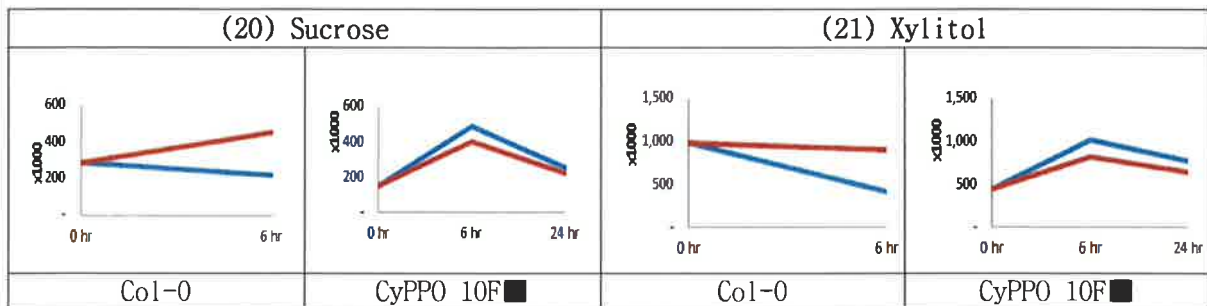
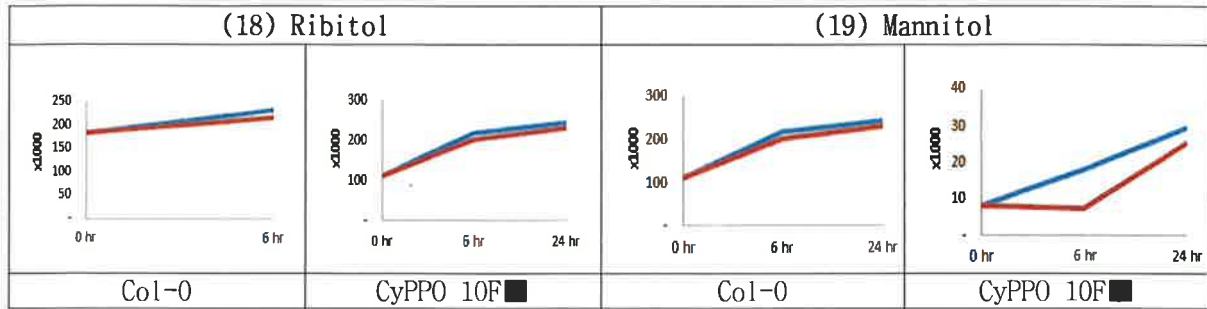


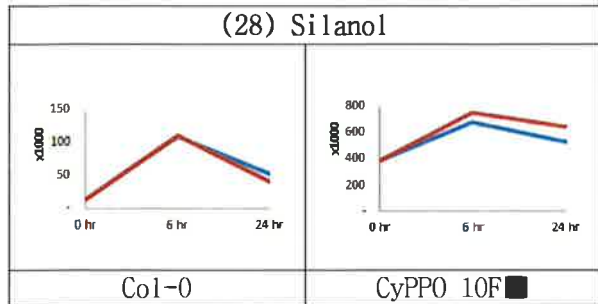
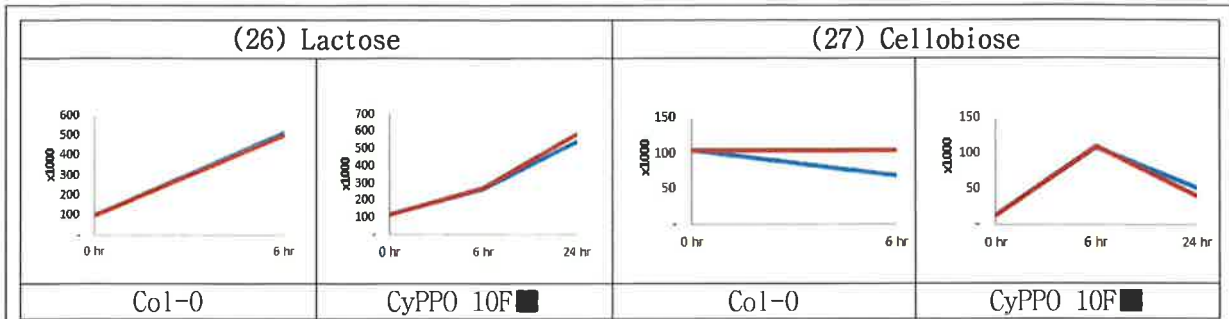
다음으로, 총 22가지의 당류 및 당알코올 대사 물질의 함량 변화를 분석함(18~28).

대부분의 당류 대사 물질들은 제초제 처리를 하여도 control 구에 비교하여 비슷한 변화 양상을 나타냄. 그러나, sucrose와 xylitol은 비형질 전환체에서 제초제를 처리한 경우, 그 함량이 오히려 증가하는 경향을 보여, 대사되지 못하고 있음이 추측되었음.

Dulcitol, melibiose, raffinose 등의 당류 물질은 오히려, 제초제를 처리하면 그 함량이

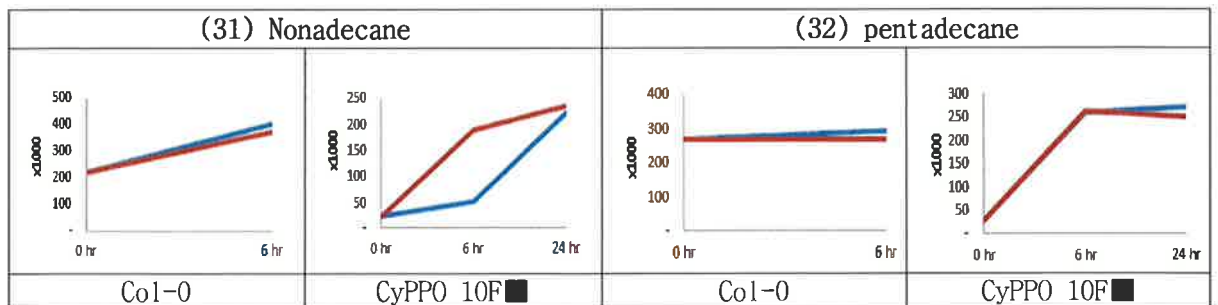
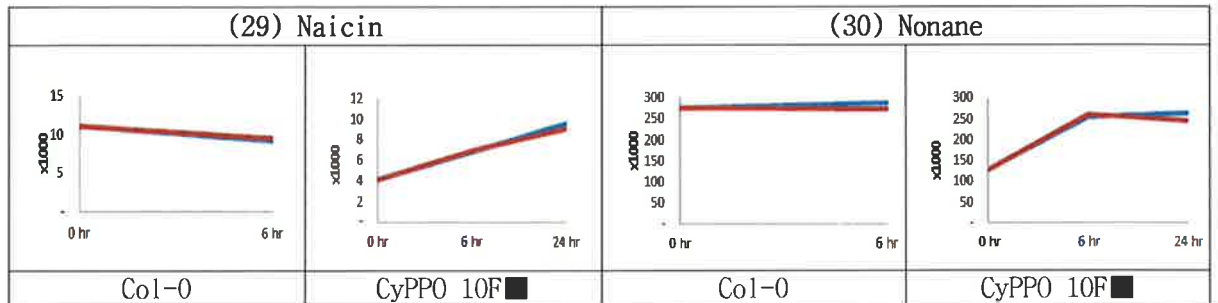
낮은 상태로 남아있어, 생합성 계통이 제초제에 의해 손상되었음이 추측되었음.

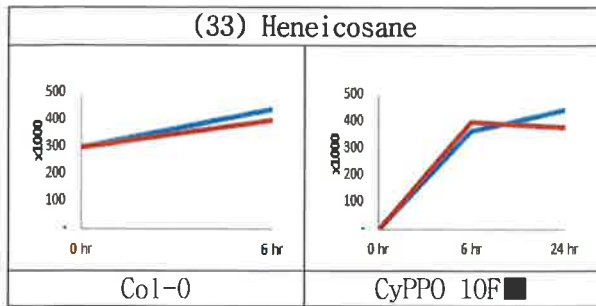




다음으로, 그 밖의 기타 물질의 대사체 함량을 조사함(29~33).

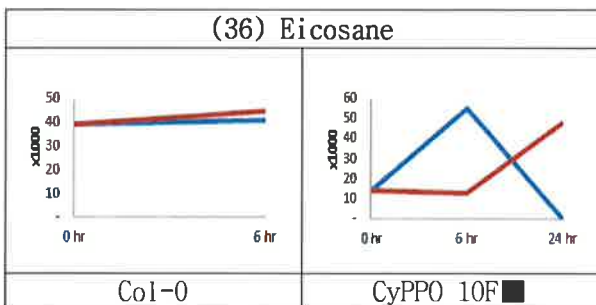
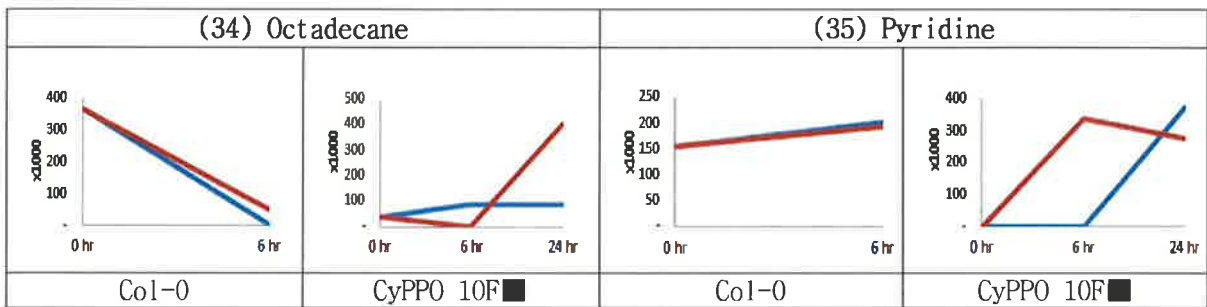
Col-0와 형질전환체 모두에서 다음의 5가지 대사 물질(29~33)은 control구와 비슷한 패턴으로 변하는 것으로 보아 tiafenacil은 이들 물질의 대사 체계에는 영향이 없음이 추측됨





또한, 다음의 세 가지 물질(34~36)은 Col-0에서는 제초제를 처리하여도 그 함량 변화가 대조구와 비슷한 함량 보유 패턴을 보이나, CyPPO10F■에서는 제초제를 처리하는 경우, control 구와 함량 변화가 다름.

이 세가지 물질은 CyPPO10F■의 제초제 저항성과 직접 또는 간접적으로 연관이 있다고 추측됨.



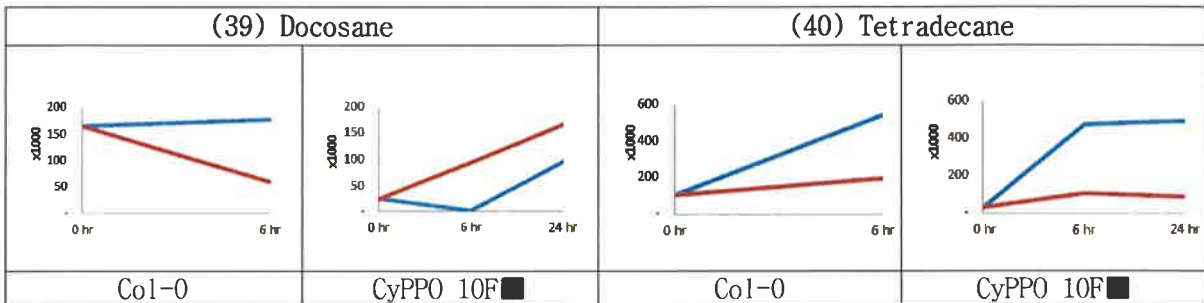
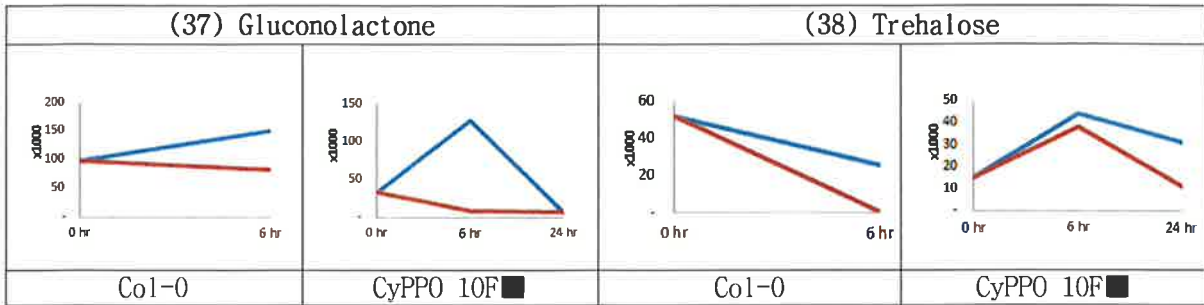
마지막으로, 다음의 4가지 물질 (37~40)은 Col-0의 경우 제초제를 처리하면, 그 함량이 급격히 떨어지거나 변화가 없어, 대조구에 비교하여 낮은 함량을 나타내는 물질들임.

형질전환체에서는 제초제 처리후 시간이 경과함에 따라, 그 함량 변화 패턴이 대조구와 매우 다른 물질이었음.

따라서, CyPPO10F■ 형질전환체에서는 이들 물질의 대사가 제초제 처리에 따라 크게 영향을 받는다고 추측됨. 단, trehalose와 tetradecane는 대조구와 제초제 처리구에서 비슷한

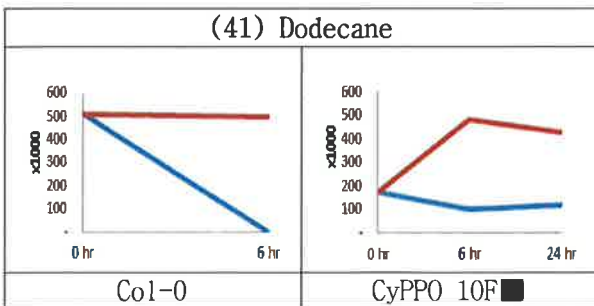


경향으로 그 함량이 변하였으나, 그 함량에는 다소 차이가 있는 물질임



다음의 물질은 Col-0에서는 대조구에서는 오히려 그 함량이 시간이 지남에 따라 감소하나, 제초제 처리를 한 경우 그 함량의 변화가 없어, tiafenacil 이 이 물질의 대사계통에 영향을 주었다고 추측됨.

또한, 형질전환체에서는 제초제 처리후, 6시간이 지나면 급격히 증가하여 대조구와는 다른 변화패턴을 보임에 따라, 이 대사물질 기구는 tiafenacil에 의해 영향을 많이 받는 물질로 추측됨.

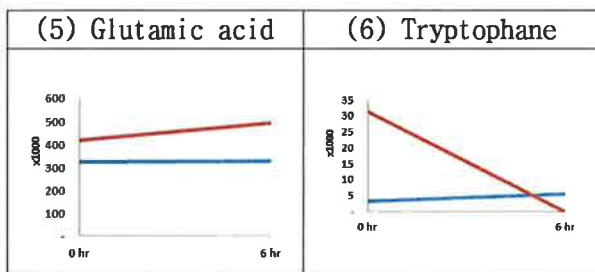
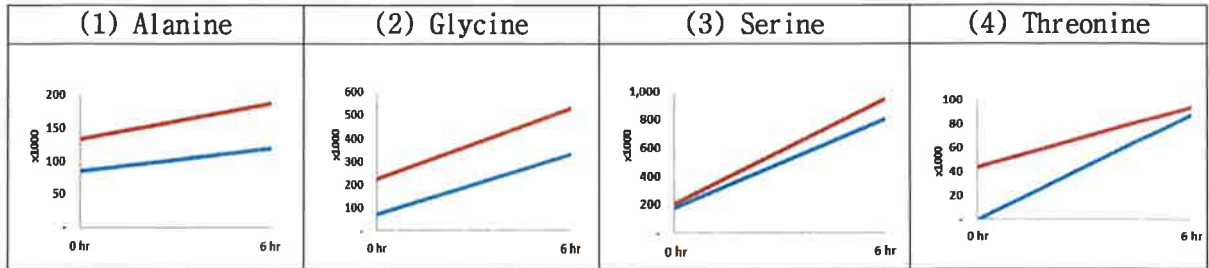


비형질전환체와 형질전환체의 대사의 상이점을 알아보기 위해, DMSO 처리한 후, 6시간 경과후의 대사 물질의 변화를 조사함(1~6).

대부분의 아미노산 물질은 Col-0와 비교하여 패턴의 변화가 유사하였으나, tryptophane은 형질전환체에서 시간이 경과할수록 저하함.

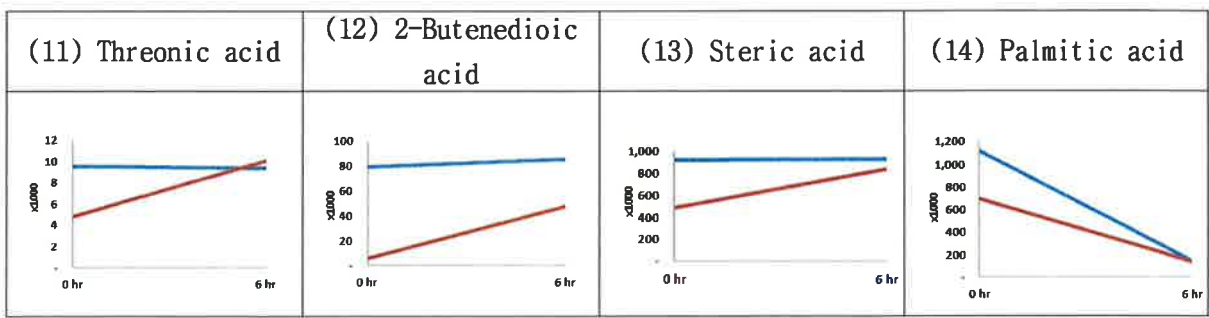
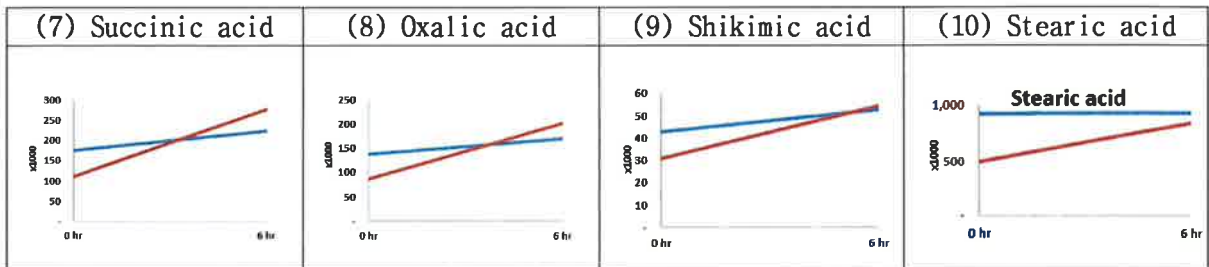


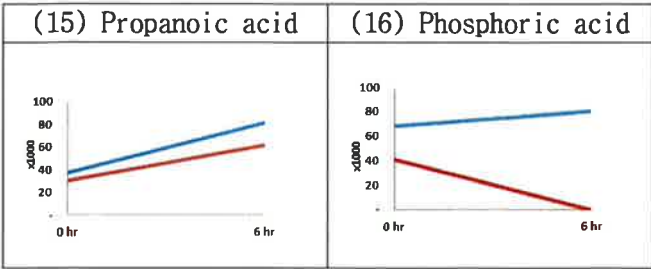
— Col-0  
 — CyPPO10F ■



총 10가지의 유기산 물질의 변화를 분석함 (7~16)  
 결과, 아미노산처럼 대부분의 유기노산 물질들의 변화는 시간의 변화에 따라 비형질전환체와 형질전환체 모두 비슷한 경향을 변함.

phosphoric acid는 다른 유기산과 다르게, Col-0에서는 그 양이 미미하게 증가하나, 형질전환체에서는 오히려 반대로 미미하게 감소하였음.

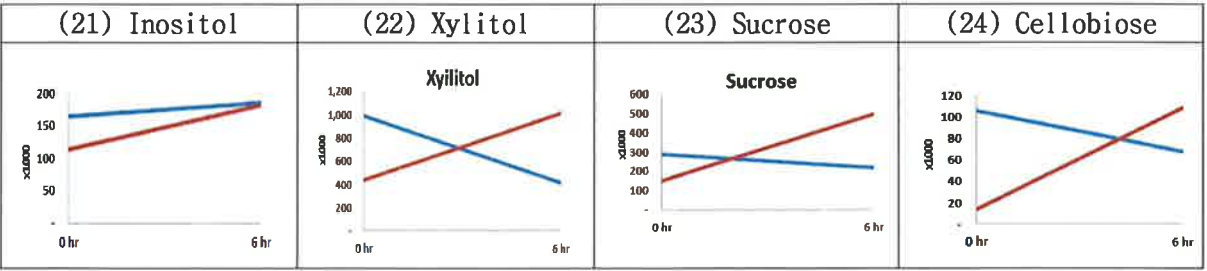
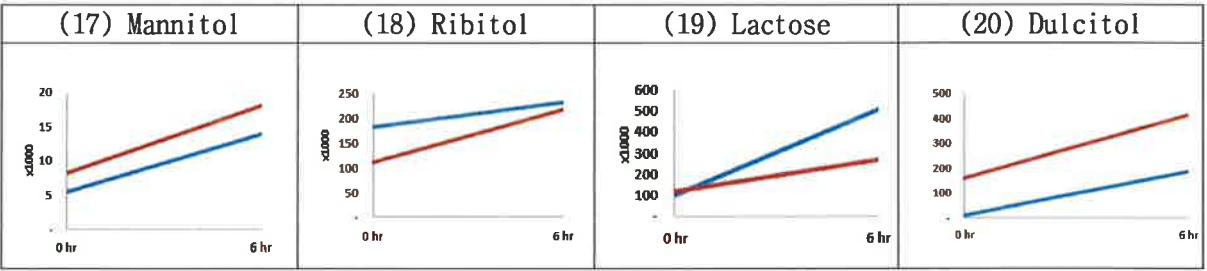


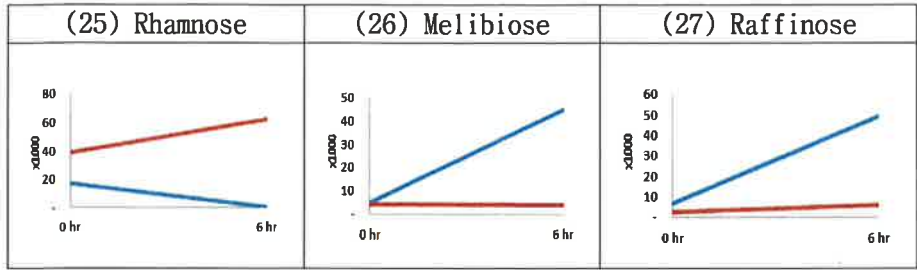


총 11개의 당류 물질의 변화를 분석함 (17~27)  
 중에서, 5개의 (17~21)의 당류 물질은 비형질전환체와 비교하여 그 변화 패턴이 유사하며, 시간의 경과에 따라 그 함량이 점차적으로 증가하였음.

그러나, xylitol, sucrose, cellobiose, rhamnose는 Col-0와 비교하여 반대 방향으로 움직여, 이들 물질은 형질 전환체에 특이적인 대사 경로의 존재가 추측됨.

또한, meliobiose와 raffinose 은 Col-0에서는 그 함량의 변화가 관찰되지 않았으나, 형질전환체에서는 계속하여 증가하여, 이들 당류를 생산하는 대사계가 매우 활발하거나, 대사 속도가 느려 식물체내에 축적되는 것으로 추측됨.

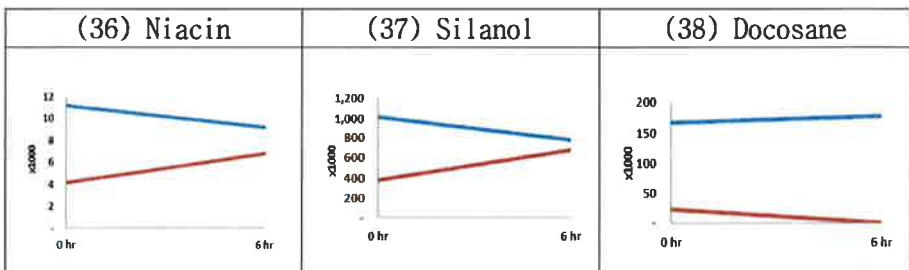
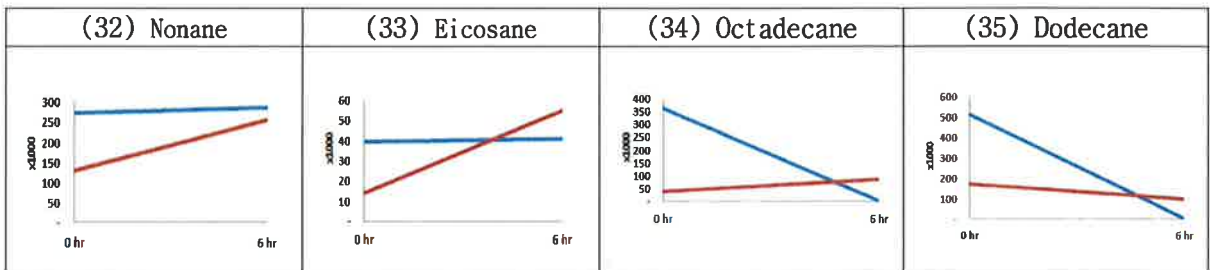
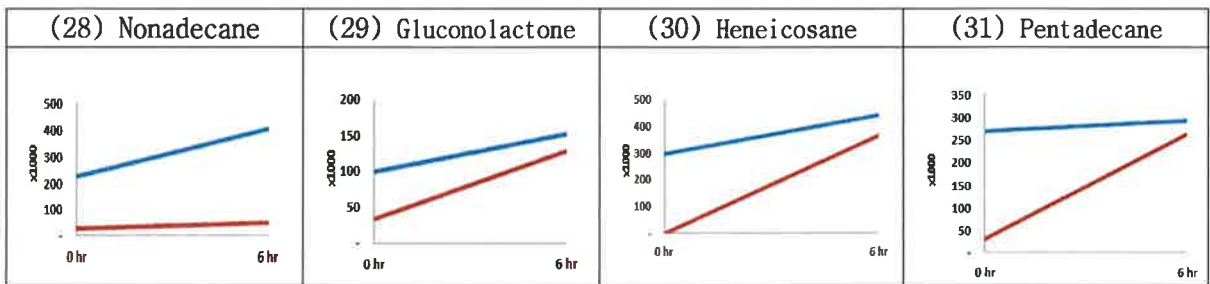




총 11가지의 기타물질의 대사체 함량 변화를 분석함 (28-38)  
 4가지의 물질 (28~31)은 비형질전환체와 형질전환체에서 시간이 지남에 따라, 완만히 증가하는 경향을 보였으며, 비슷한 변화를 보임.

Nonane 과 Eicosane은 비형질전환체에서는 그 함량 변화가 거의 없었으나, 형질전환체에서는 시간의 경과에 따라 증가하는 경향을 보였음.

4가지 물질 octadecane, niacin, silanol등은 시간이 경과함에 따라 Col-0에서는 그 함량이 점차 감소하였으나, 형질전환체에서는 미미하게 증가하였음.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
<b>제 1 절 정성적 목표 및 달성도</b>				
<b>가. 1차년도</b>				
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2014- 2015)	(1세부) 세포막 파괴 제초제 저항성 형질의 개발 및 기술 사업화	제초제 저항성 납세균 PPO 유전자 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BT3(<math>\Delta</math>hemG) 에서 Tiafenacil 저항성 CyPPO 유전자 선발</li> <li>- CyPPO 유전자 애기장대 형질전환체 제조</li> <li>- 형질전환 애기장대 대상 Tiafenacil spray 실험</li> <li>- 제초제 저항성 유전자 3종(CyPPO2, 4, 8) 개발</li> <li>- 제초제 저항성 유전자(CyPPO2, 4, 8) 도입 GM 애기장대의 single, homoline 확보</li> <li>- 제초제 저항성 형질전환체 대상 삽입 유전자 수, 제초제 저항성 조사</li> </ul>
		신규 제초제 저항성 유전자 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 납세균 유래 신규 hemY PPO 유전자 6종 확보</li> <li>- 신규 PPO 유전자의 BT3(<math>\Delta</math>hemG) 내 발현을 위한 construct 제작(pLac::PPO-His)</li> <li>- 신규 PPO 유전자 형질전환된 BT3에서 Tiafenacil 저항성 유전자 4종 확보</li> </ul>
		CyPPO 단백질 분리 정제 및 효소 활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CyPPO 단백질의 대장균내 수용성 발현을 위한 발현벡터, 발현균주 선정</li> <li>- PPO 단백질의 수용성 과발현을 위한 발현온도, 발현시간, IPTG 투입시기 등 최적 조건 확립</li> <li>- Affinity chromatography를 이용한 MBP-PPO 단백질의 분리 정제 조건 확립</li> <li>- CyPPO 단백질의 분리 정제 완료</li> <li>- 기질인 protoporphyrinogen IX 합성 조건 확립</li> <li>- PPO 효소 활성 분석법 확립</li> </ul>
	(위탁과제) Protoporphyrinogen IX oxidase 단백질 구조 연구	PPO 발현 및 순수 분리 정제 조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CyPPO 유전자의 박테리아 발현 시스템을 이용한 정상 발현 조건 및 시스템 확보</li> <li>- CyPPO 단백질들의 순수분리 정제 조건 확립</li> </ul>
	(1협동) PPO의 세포 소기관 이동 관련 유전자 및 제초제 저항성 형질전환체 의 유전체연구	주요작물원형질 체 형질전환 조건 확립	100	- 주요작물 원형질체 분리 효율 최적화 Transfection 효율 최적화 조건 검정
		세포내 소기관별 TP 선정	100	- 엽록체, 미토콘드리아 및 그 외 세포 소기관 target 용 transit peptide(TP) 후보 조사 및 선정(3개의 TP 선정)
		세포 소기관 내 발현 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물 세포 소기관별 또는 dual target이 가능한 protoplast 내 발현을 위한 vector 제작</li> <li>- 세포 소기관 이동 및 발현 여부 확인</li> <li>- Western blot(차별원심분리에 위한 단백질 fraction 및 marker 항체를 이용), 정량 PCR 등의 분자생물학적 분석을 통한 세포소기관 이동 분석</li> </ul>

		2 종류 제초제 (glyphosate, tiafenacil) 저항성 형질 테스트	100	- glyphosate, tiafenacil, glyphosate+tiafenacil 저항성 유전자 (CP4EPSPS, CyPPO, CP4EPSPS+CyPPO) 형질전환용 vector 제작 - 제작된 binary vector의 애기장대 형질전환
(2협동) 제초제 저항성 형질전환체의 생리적 특성 및 대사체 연구		형질전환체의 생리 특성 조사	100	- 애기장대(wild type) 사멸을 위한 Tiafenacil 처리 농도 결정 - 형질전환체의 엽록소 함량, 광합성 속도, 생장곡선, 종자 생산량을 대조군과 비교분석
		PPO 도입 형질전환체의 저항성 기작 및 생리 조사	100	- 식물체 내의 protoporphyrin IX 량 측정 방법 수립 - 비형질전환체와 형질전환 식물체의 protoporphyrin IX 축적량 측정

#### 나. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2015- 2016)	(1세부) 세포막 파괴 제초제저항성 형질의 개발 및 기술 사업화	GM 애기장대에서 남세균 유래 PPO 유전자의 특성 연구	100	- T3 세대, Single copy 개체의 삽입좌 서열 분석(CyPPO2, CyPPO8, MTAtPPO1 형질전환체) - CyPPO2 또는 CyPPO8 vs. CyPPO4 간 제초제 내성 차이 규명
		호열성 남세균 유래 CyPPO 유전자(Cy10, Cy13)의 애기장대 형질전환	100	- 호열성 남세균 유래 CyPPO 유전자 중 BT3에서 제초제 저항성을 보인 4종의 변이 유전자 애기장대 형질전환 - Tiafenacil 저항성 형질전환(T3) 식물체 확보 - 제초제 저항성 평가
		CyPPO 단백질의 kinetics 연구	100	- 제초제 저항성 PPO 단백질 효소 활성 측정 - Tiafenacil 처리에 의한 효소 활성 저해 측정 - 다른 PPO계 제초제에 의한 효소활성 저해 측정 - 신규 발굴된 CyPPO 단백질 생산 및 분리 정제
		CyPPO 단백질의 알러지 motif 조사	100	- 제초제 저항성이 확인된 CyPPO 단백질의 알러지 유발 가능성 조사
		CyPPO 변이체 개발	100	- 제초제 저항성을 보인 CyPPO 10, 13 유전자 대상 아미노산 변이체 제조(저항성 향상 유전자 개발)
		Tiafenacil의 photodynamic herbicide 기전 연구	100	- Tiafenacil 타깃 효소 규명을 위해 tetrapyrrole pathway 상의 대사물질 분석 - Tiafenacil과 다른 PPO 계 제초제 간의 photodynamic herbicide 효과 분석
	(위탁과제) Protoporphyrinogen IX oxidase 단백질 구조 연구	CyPPO 단백질들의 결정화 및 X-ray 회절 데이터 확보	100	- 순수 분리 정제된 단백질의 결정화 조건 탐색 - 확보된 조건에서 단백질 결정의 최적화 실험 수행 - 방사광 가속기를 이용한 CyPPO 단백질의 최적화된 단일 결정의 X-ray 회절데이터 확보
	(1협동) PPO의 세포소기관 이동 관여	기존의 CyPPO8 유전자의 TP 이외의 상이한 cTP	100	- 애기장대 유래 cTP+CyPPO8 유전자 외 다른 3종류의 cTP+CyPPO8 유전자를 도입한 애기장대 형질전환체 제작 및 Tiafenacil 저항성 분석 결과, 기존의 cTP와 유사한 수준의 저항성 보임

유전자 및 제초제 저항성 형질전환체 의 유전체 연구	(chloroplast) & mTP (mitochondria) 도입 애기장대 형질전환체 제작을 통한 Tiafenacil 제초제 저항성 검정		<ul style="list-style-type: none"> <li>- cTP+CyPPO8과 mTP+CyPPO8 도입 애기장대 형질전환체 대상 Tiafenacil 저항성 분석 결과, mTP가 cTP 대비 저항성이 떨어짐을 확인함</li> <li>- chloroplast(cTP)와 mitochondria(mTP) 양쪽 모두에 targeting되는 TP를 가진 애기장대 형질전환체 제작, homoline 선별</li> </ul>	
	cp4EPSPS와 CyPPO8 유전자들을 동시에 도입시킨 애기장대 형질전환체 개발을 통한 2개의 제초제 (glyphosate와 tiafenacil)에 동시 저항성 여부 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glyphosate 저항성 유전자(cp4EPSPS)와 Tiafenacil 저항성 유전자(CyPPO8)의 애기장대 형질전환체 제작, homoline 선별</li> </ul>	
	(2협동) 제초제 저항성 형질전환체 의 생리적 특성 및 대사체 연구	Tiafenacil 처리시 형질전환 애기장대 생리분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiafenacil 처리시 형질전환 애기장대의 엽록소 함량, 광합성 속도, 생장곡선, 종자생산량 분석</li> <li>- 형질전환 애기장대의 metabolite profile 분석</li> </ul>
	PPO 도입 형질 전환체의 저항성 기작 및 생리 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 비형질전환체, 형질전환체 protoporphyrin IX 축적량 측정</li> <li>- 세포내 활성 산소 측정 측정 방법 수립</li> <li>- 형질전환식물체의 활성산소 측정법 확립</li> <li>- 생장, 스트레스 저항성 등의 생리 조사 조건 탐색</li> </ul>	

#### 다. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2016- 2017)	(1세부) 세포막 파괴 제초제저항성 형질의 개발 및 기술 사업화	CyPPO10 변이유전자 도입 애기장대 형질전환체 T3, homo line 확보, 제초제 내성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PPO계 제초제 고내성 유전자 변이유전자 도입 애기장대 T3대상 다수 PPO 계 제초제 저항성 확인</li> </ul>
		CyPPO10 단백질과 Tiafenacil 이외의 PPO계 제초제와의 complex 입체 구조 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Saflufenacil 및 Fomesafen 의 PPO 결합 결정 구조 규명 완료</li> </ul>
		CyPPO 단백질 안전성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2종의 modified PPO 단백질의 열안정성, 인공위액 및 인공장액 분해율, 아급성 동물시험 수행 결과 안전성 기준 통과</li> </ul>



	Tiafenacil 작용기전 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiafenacil 처리시 생리적 반응 분석</li> <li>- PPO 계 제초제 9종의 PPO 억제 효과 비교분석</li> <li>- Tiafenacil 작용기전 규명에 대한 논문투고 (18년 3월 예정, Pesticide Biochemistry and Physiology)</li> </ul>
	CyPPO10, 13 변이 유전자 도입 콩 형질전환체 제작 및 저항성 확인(신규 추가 항목)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 총 7종의 변이체를 대상으로 콩 형질전환체 제작 진행중</li> <li>- 일부 확보된 형질전환체를 대상으로 제초제 저항성 검증</li> </ul>
	CyPPO10 변이 유전자 도입 옥수수 형질전환체 제작 및 저항성 확인(신규 추가 항목)	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PPO계 제초제 고내성 유전자 (5종)를 대상으로 옥수수(inbred line 계통, B104) 형질전환체 제작 진행 중(미국 미주리대 의뢰)</li> <li>- 옥수수 형질전환체 제조에 소요되는 기간은 12~16개월 소요됨(형질전환 종자, T1 seed 기준)</li> <li>- 5종 유전자의 형질전환 제조는 제초제 선별배지에서 재분화 개체가 확보되었음. '18년 하반기에 T1 종자 확보, T1 식물체 대상으로 제초제 내성 수주 실험 예정 임.</li> </ul>
(위탁과제) 제초제 저항성 유채 형질전환체 제작	[위탁연구] 고효율 유채 형질전환 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PPT를 이용한 유채 형질전환 시스템 개발 완료</li> </ul>
	CyPPO10, 13 변이 유전자 도입 유채 형질전환체 생산	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CyPPO10, 13 우수 변이유전자 대상 유채 형질전환체 제작</li> </ul>
	유채 형질전환체 선발, 제초제 내성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 일부 먼저 확보된 형질전환체를 대상으로 유전자 삽입 여부(PCR) 확인 및 제초제 내성 확인</li> </ul>
(1협동) PPO의 세포소기관 이동 관여 유전자 및 제초제 저항성 형질전환체의 유전체 연구	CyPPO10 & CyPPO10_F <sup>■</sup> 형질전환체 전사체 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CyPPO10 및 이의 변이체를 대상으로 5uM Tiafenacil 처리 후 시간대 별 전사체 변화를 비교 분석함</li> </ul>
	CyPPO 유전자의 소기관별(chloroplast, mitochondria, & chloroplast/mitochondria dual targeting) 도입에 따른 제초제 저항성 차이 여부 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- chloroplast, mitochondria, 또는 두 소기관 모두에 targeting 이 가능한 transit peptide(TP)를 도입하여, 소기관별 targeting(CyPPO)에 따른 제초제 내성 성능을 확인하였음. Chloroplast 이동 TP에서는 내성 증진이 확인되었으나, mitochondria, 또는 chloroplast와 mitochondria 양쪽에 targeting 되는 TP가 도입된 형질전환체에서 제초제 내성을 확인할 수 없었음</li> </ul>
	복합 제초제(glyphosate + tiafenacil) 저항성 애기장대 형질전환체 제작 및 복합 제초제 저항성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2종 제초제 내성 유전자를 동시에 도입하여 복합제초제 내성 형질전환체를 확보하였고, 일부 라인에서 두 제초제에 강한 내성을 확인하였음</li> <li>- 제초제 내성 형질 상업화시 복합 제초제 내성 형질로 확장하여 적용이 가능함을 확인함</li> </ul>



	(2협동) 제초제 저항성 형질전환체의 생리적 특성 및 대사체 연구	제초제 저항성 애기장대 형질전환체의 metabolite profile 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1협동의 전사체 분석과 동일한 샘플을 이용하여 상호비교가 가능하도록 실험을 설계함.</li> <li>- CyPPO8 및 이의 변이체를 대상으로 Tiafenacil 및 Saflufenacil 처리에 따른 대사체 변화를 분석함</li> <li>- CyPPO10 및 이의 변이체를 대상으로 Tiafenacil 처리후 시간 경과에 따른 대사체 변화를 분석함</li> </ul>
		CyPPO10 변이유전자 도입 형질전환 애기장대의 농업적 특성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제초제 고내성을 보인 CyPPO10 변이체를 대상으로 생육성, 초장, 엽폭, 엽수, 광합성 효율, 종자 무게 등 농업적 특성을 조사하여, 형질전환체가 외부유전자 도입 여부와 상관없이 정상 생육하는 것을 확인함</li> <li>- 제초제 내성 형질을 도입한 식물체는 제초제 내성 이외에 농업적 특성에 영향을 미치는 것은 나타나지 않은 것으로 판단됨</li> </ul>



## 제 2 절 정량적 연구성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연년연구활동영향)
	특허출원	특허등록	특허등재	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		4논문				학술발표	정채활용	
											SCI	비SCI						
최종목표	3	1		1							4					2		
1차년도	목표	1																
	실적	1									1							
2차년도	목표	1									1					1		
	실적	5									0					0		
3차년도	목표	1	1		1						2					1		
	실적	15	0		0						0					0		
소계	목표	3	1		1						3					2		
	실적	21	0		0						1					0		
합계		21	0		0						1					0		

\*한국특허 OA(official action)진행 중에 있으며 '18년 상반기에 3건이 등록될 것으로 예상함

### 가. 특허출원 내역

번호	특허명	국명	출원			기타
			출원인	출원일	출원번호	
1	프로토포르피린노젠 옥시다아제를 이용한 식물의 제초제 저항성 증진 방법	대한민국	동부팜한농(주)	2014.12.16	10-2014-0181791	
2	프로토포르피린노젠 옥시다아제를 이용한 식물 및/또는 조류의 제초제 저항성 부여 또는 증진 방법	대한민국	동부팜한농(주)	2015.12.16	10-2015-0180467	
3	Methods for conferring or enhancing herbicide resistance on plants and/or alga with protoporphyrinogen oxidase variants	PCT	동부팜한농(주)	2015.12.16	PCT/KR2015/013812	
4	Methods for conferring or enhancing herbicide resistance on plants with protoporphyrinogen oxidase variants	아르헨티나	동부팜한농(주)	2015.12.16	P150104115	



5	프로토포르피리노젠 옥시다아제 변이체 및 이를 이용하는 제초제 내성 부여 및/또는 증진을 위한 조성물 및 방법	대한민국	(주)팜한농	2016.06.16	10-2016-0075357	
6	프로토포르피리노젠 옥시다아제 또는 이의 변이체를 이용하는 제초제 내성 부여 및/또는 증진을 위한 조성물 및 방법	대한민국	(주)팜한농	2016.06.16	10-2016-0075358	
7	프로토포르피리노젠 옥시다아제를 이용한 식물 및/또는 조류의 제초제 저항성 부여 또는 증진 방법	대한민국	(주)팜한농	2016.12.13	10-2016-0169920	
8	프로토포르피리노젠 옥시다아제 또는 이의 변이체를 이용하는 제초제 내성 부여 및/또는 증진을 위한 조성물 및 방법	대한민국	(주)팜한농	2017.06.15	10-2017-0076135	
9	프로토포르피리노젠 옥시다아제 변이체 및 이를 이용하는 제초제 내성 부여 및/또는 증진을 위한 조성물 및 방법	대한민국	(주)팜한농	2017.06.15	10-2017-0076134	
10	METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONFERRING AND/OR ENHANCING HERBICIDE TOLERANCE USING PROTOPORPHYRINOGEN OXIDASE OR VARIANT THEREOF	PCT	(주)팜한농	2017.06.15	PCT/KR2017/006275	
11	VARIANTES DE PROTOPORFIRINÓGENO OXIDASA Y MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA OTORGAR Y/O MEJORAR LA TOLERANCIA A LOS HERBICIDAS UTILIZANDO LAS	아르헨티나	(주)팜한농	2017.06.15	20170101675	
12	Variantes de protoporfirinógeno oxidasa y metodos y composiciones para otorgar y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando las mismas	파라과이	(주)팜한농	2017.06.16	38676/2017	
13	Variantes de protoporfirinógeno oxidasa y metodos y composiciones para otorgar y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando las mismas	우루과이	(주)팜한농	2017.06.16	37.297	
14	Variantes de protoporfirinógeno oxidasa y metodos y composiciones para otorgar y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando las mismas	볼리비아	(주)팜한농	2017.06.16	SP-131-2017	

15	Protoporphyrinogen Oxidase Variants and Methods and Compositions for Conferring and/or Enhancing Herbicide Tolerance Using the Same	파키스탄	(주)팜한농	2017.06.15	344/2017	
16	PROTOPORPHYRINOGEN OXIDASE VARIANTS AND METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONFERRING AND/OR ENHANCING HERBICIDE TOLERANCE USING THE SAME	PCT	(주)팜한농	2017.06.15	PCT/KR2017/006276	
17	MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA OTORGAR Y/O MEJORAR LA TOLERANCIA A LOS HERBICIDAS UTILIZANDO PROTOPORFIRINÓGENO OXIDASA O UNA VARIANTE DE ESTA	아르헨티나	(주)팜한농	2017.06.16	20170101674	
18	Metodos y composiciones para otorgar y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando protoporfirinógeno oxidasa o una variante de esta	파라과이	(주)팜한농	2017.06.16	38684/2017	
19	Metodos y composiciones. para otorgar y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando protoporfirinogeno oxidasa o una variante sw esta	우루과이	(주)팜한농	2017.06.16	37.298	
20	Metodos y composiciones para otorgar y/o mejorar la tolerancia a los herbicidas utilizando protoporfirinógeno oxidasa o una variante de esta	볼리비아	(주)팜한농	2017.06.16	SP-132-2017	
21	Methods and Compositions for Conferring and/or Enhancing herbicide Tolerance Using Protoporphyrinogen Oxidase or Variant Thereof	파키스탄	(주)팜한농	2017.06.15	345/2017	

나. 논문투고 내역

번호	논문명	저널명	저자	호	비고
1	Structure of ginseng major latex-like protein 151 and its proposed lysophosphatidic acid-binding mechanism	Acta Crystallographica Section D	Sun-Hye Choi et al.	71:1039-50	SCI (IF: 2.674)

### 제 3 절 관련분야 기여도

#### 가. 기술적 기여

- 글로벌 농화학 기업들은 기존 glyphosate 또는 glufosinate 제초제 저항성 잡초의 과다 출현 및 제초제 독성으로 GM종자 시장에서의 경쟁력이 불투명해지고 있는 상황에서 GM종자에 도입할 새로운 제초제 내성 형질을 앞 다투어 개발중에 있음.
- 본 과제를 통해 개발한 PPO계 제초제 저항성 형질은 신젠타, BASF, 몬산토 등 글로벌 농화학 기업들이 개발중인 PPO계 제초제 저항성 형질보다 우수한 성능을 보이는 것으로 평가됨(신젠타 2종 PPO계 제초제 내성, 팜한농 5종 PPO계 제초제 내성).
- 따라서 제초제 내성 형질 개발 분야에서 국내 기술 수준을 글로벌 수준으로 끌어 올려 본격적인 기술 경쟁이 가능해짐으로써 국내 농화학 및 종자기업의 해외진출의 성공가능성을 향상시키는데 기여함.
- 식물 형질전환시 선발 마커로 glufosinate 내성 유전자 등을 학계에서 널리 사용하고 있는데, PPO계 제초제 내성 유전자 또한 동일한 용도로 활용이 가능함. 또한 PPO계 제초제가 속효성이기 때문에 형질전환체를 더욱 효과적으로 할수 있을 것으로 기대됨.
- PPO 유전자의 결정구조는 지금까지 단 4건만 보고되어 있고, 더구나 다양한 PPO계 제초제와 결합된 결정구조는 보고가 안 된 것을 감안하면, 본 과제에서 확보한 Tiafenacil, Saflufenacil, Fomesafen과의 결합 구조는 PPO계 제초제 내성 유전자를 개량하거나 아직 연구되지 않은 다른 생물의 PPO를 대상으로 내성 형질을 개발함에 있어서 매우 중요한 정보를 담고 있기 때문에, PPO계 제초제 내성 형질 개발 분야에 크게 기여함.

#### 나. 산업적 기여

- 현재 GM종자 시장에서 제초제 내성 형질이 도입된 종자시장이 2015년 기준 7조원에 이르며, 이에 대한 로열티 규모가 년 2천억 원 수준으로 추정됨.
- 저항성 잡초 문제로 glyphosate 및 glufosinate 대표되는 제초제 내성 형질 비중이 감소하고 PPO계 제초제 내성 형질로 대체될 것으로 전망되며, 이에 따라 PPO계 제초제 내성 형질 시장의 급속한 성장이 예상됨.
- 본 과제에서 확보한 다수 국내의 특허는 현재 GM종자 시장의 대부분을 차지하는 국가를 포함하고 있기 때문에 PPO계 제초제 내성 형질의 사업화에 전략적으로 유용한 자산으로 활용될 수 있음.

- PPO계 제초제 내성 형질의 기술사업화를 예정대로 추진되면 제초제 내성 형질 시장을 선점하여 국가 경쟁력 증대에 기여할 수 있음.
- GM 작물 경작지에서 glyphosate 저항성 잡초의 효과적 방제로 인해 수확량 보존, 영농 비용 절감 및 농업 가능 GM 경작지 유지 효과, 국내수입 사료·가공용 GM 콩, 옥수수 가격 안정에 기여할 수 있음.
- 국내 농생명 분야의 열악한 상황을 해외진출로 극복해야 함을 많은 전문가들이 지적하고 있음을 감안할 때, 제초제 내성 형질 사업 및 더 나아가 해외 GM 종자시장 진출의 성공모델을 만들어 기업들의 농산업 진출과 국내 농생명 바이오 분야의 인력활용도 원할해 질 것으로 기대됨.



## 제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 가. 활용분야

- GM 종자의 비선택성 제초제 내성 형질로 사용가능 (세계 3번째로 개발, 상업적 성능 구현 최초의 비선택성 제초제 내성 형질임).
- 현재 사용되는 비선택성 제초제 4종 중, 2개는 내성 형질이 개발되어 사용되었고, 1종은 맹독성 문제로 사용 규제가 되고 있음. 제초제 내성 형질이 상용화되지 않은 비선택성 제초제는 PPO 계 제초제인 flumioxazin, tiafenacil 임.
- 개발한 PPO계 제초제 내성 형질은 flumioxazin, saflufenacil, tiafenacil과 Diphenylether 계열 PPO 계 제초제(fomesafen, acifluorfen)에도 저항성을 보여, 적용 가능한 파트너 약제의 범위가 넓어 실용 측면에서 큰 장점을 갖고 있음.

### 나. 활용계획

- 본 과제를 통해 확보된 PPO 계 제초제 내성 형질은 현재 콩, 옥수수, 벼, 유채를 대상으로 형질전환체가 확보되고 있으므로, 이에 대한 제초제 내성 성능을 평가하고, 안전성, 생육특성, 도입형질 외 기타 형질변화(조숙성, 수량성 등)에 대한 분석이 추가적으로 필요함
- 형질전환체 작물대상 분석정보를 바탕으로 GM작물 이벤트를 확보하는 데 활용 가능함
- 본 과제에서 확보된 논문 및 특허에 대한 내용을 기술사업화를 위한 자료로 활용 함.
- 사업 1단계는 제초제 내성 형질의 실시권리를 판매하는 기술사업 임. GM 작물인 콩, 옥수수, 캐놀라 재배에서 원치 않는 잡초방제 기술로 특허 Licensing Out을 진행 함.
- 사업 2단계는 제초제 내성 형질을 탑재한 콩 이벤트를 개발하여 이벤트 소재사업 추진에 활용 함. 미국 GM콩 종자시장은 31억\$ 규모이며 종자회사 중 20%가 글로벌 회사로부터 제초제 내성 콩 이벤트를 매입하여 자체 germ line 계통과 교배하여 콩 종자사업을 진행하고 있음 (미국 재배되는 콩 중 GM콩 종자는 95% >).
- 사업 3단계는 개발된 제초제 저항성 형질을 탑재한 이벤트를 개발하여 글로벌 회사와 합작사업 형태로 해외에서 GM 종자사업 진출에 활용함.

## 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
○ 해당사항 없음.	

## 제 7 장 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안 등급 분류	보안	일반	
		○	
결정 사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음		



## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

## 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p><b>가. 1세부: ㈜팜한농</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술적 위험요소 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험 기기 및 시험재료 사용에 따른 위험성 발생 가능성 있음</li> </ul> </li> <li>○ 안전관리대책               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Eye shower, 안전, 구급용품 보관함 설치</li> <li>- 정기 안전교육 실시(1회/분기)</li> <li>- MSDS 자료 보관함</li> <li>- 하론소화기 실험실내 배치</li> <li>- 작 실험실 별 실험실 안전수칙 게시 및 보건점검/상담 실시(1회/월)</li> <li>- 실험실내 작업시 보호안경, 보호장갑, 실험복 착용</li> <li>- 가스누출 장치 설치 및 정기 점검</li> <li>- LMO 생물안전관리 책임자 교육 이수 및 참여연구원 국가안전관리본부 교육 이수</li> </ul> </li> </ul> <p><b>나. 1협동: 서울대학교 차세대융합기술연구원</b></p> <p>1. 안전점검 및 정밀안전진단</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주기적인 일상점검 및 안전점검을 실시하여 안전성 확보               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일상 점검 : 매일 실시, 연구실 상시 안전순찰 점검 시</li> </ul> </li> <li>○ 연구실 안전점검 실시               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연간 1회 이상 의무적으로 반드시 실시</li> <li>- 점검대상: 주관 및 참여기관의 사무실을 제외한 실험실습실</li> <li>- 안전진단 실시 후 반드시 진단결과에 의거 문제부문에 대한 보완설치</li> </ul> </li> <li>○ 연구실 정밀안전진단 실시               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2년에 1회 이상 의무적으로 반드시 실시</li> <li>- 점검대상: 주관 및 참여기관의 사무실을 제외한 실험실습실</li> <li>- 안전진단 실시 후 반드시 진단결과에 의거 문제부문에 대한 보완설치</li> </ul> </li> </ul> <p>2. 안전교육</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 참여연구원의 교육훈련               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 매년 1회 이상 실험실습실 안전교육 실시</li> <li>- 정밀안전진단 점검결과를 바탕으로 교육 실시</li> </ul> </li> <li>○ 안전사고 대비 및 대응에 대한 교육 및 조치요령에 관한 지침 보유               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 안전사고 예상되는 부분 즉시 개선 보완</li> </ul> </li> <li>○ 실험실 안전수칙 제작 부착               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험실 안전수칙 게시판을 제작하여 안전수칙이 없는 실험실에 부착</li> <li>- 보호의 착용, 가스마스크 착용 등 안전 관련 스티커 부착</li> <li>- 위험 실험 장비 및 유독 물질 보관함 시건 장치</li> </ul> </li> <li>○ 기타 연구실 안전 환경 조성에 필요한 물품 구입 및 용역 위탁</li> </ul> <p><b>다. 2협동: 충북대학교</b></p> <p>1. 실험실 안전 점검 체계 및 실시</p>		

1) 연구실 안전 점검 체계 및 실시: 생물관련 실험실로 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화 실시하고 있음

## 2. 실험실 안전교육 훈련

1) 개요: 실험실의 안전을 확보하고 당사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고 또한 연구실 안전 환경 조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이 공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강하고 있음

2) 교육대상: 교수, 대학원생, 참여 학부생 등

3) 교육내용: 실험실의 소방, 전기, 기계, 가스, 위생, 화공 분야별 안전 점검내용

4) 교육구분: 교육 방법 - 연간 2회의 출석교육 및 사이버교육 실시

특별교육: 해당기관 자체교육 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

## 3. 보험가입 현황

1) 학교 경영자배상 책임보험 가입: 동부화재

- 학교시설배상책임 : 학교가 소유/사용/관리하는 시설이나 학교업무 수행으로 발생한 우연한 사고로 인하여 학교측이 부담하여야할 법률상 배상책임 보상

① 대인배상 1인당 1억원한도, 1사고당 30억원한도 (자기부담금 10만원)

② 대물 1사고당 3천만원한도 (자기부담금 10만원)

- 교내외 치료비 : 교내 및 교외교육시 사고에 설정된 금액한도 내에서 보상

① 1인당 5백만원한도, 1사고당 5백만원한도

2) 연구실안전공제보험:

- 학부생과 대학원생 등 연구활동종사자가 연구실에서 발생한 사고로 부상, 질병, 신체장애, 사망 등의 신체상 손상을 입었을 때.

- 사망 1인당 1억원, 후유장애시 급수에 따라 1억-625만원 보상

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일		
1	특허	METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONFERRING AND/OR ENHANCING HERBICIDE TOLERANCE USING PROTOPORPHYRINO GEN OXIDASE OR VARIANT THEREOF	(주)팜한농	발명	PCT		2017.06.15		
2	특허	PROTOPORPHYRINO GEN OXIDASE VARIANTS AND METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONFERRING AND/OR ENHANCING HERBICIDE TOLERANCE USING THE SAME	(주)팜한농	발명	PCT		2017.06.15		
3	특허	PROTOPORPHYRINO GEN OXIDASE VARIANTS AND METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONFERRING AND/OR ENHANCING HERBICIDE TOLERANCE USING THE SAME	(주)팜한농	발명	아르헨티나		2015.12.16		
4	특허	Methods for conferring or enhancing herbicide resistance on plants and/or alga with protoporphyrinogen oxidase variants	(주)팜한농	발명	PCT		2015.12.16		
5	특허	Methods for conferring or enhancing herbicide resistance on plants with protoporphyrinogen oxidase variants	(주)팜한농	발명	아르헨티나		2015.12.16		

## 제 11 장 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음.	

## 제 12 장 참고문헌

코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"><li>○ Boyes, D. C.; Zayed, A. M.; Ascenzi, R.; McCaskill, A. J.; Hoffman, N. E.; Davis, K. R.; Görlach, J. (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis. <i>Plant Cell</i> 13 (7), 1499 LP-1510.</li><li>○ Jung HI, Kuk YI (2007) Resistance Mechanism Protoporphyrinogen Oxidase(PROTOX) Inhibitor-resistant Transgenic Rice <i>J. Plant Biol</i> 50(5)586-594</li><li>○ Kato, K.; Tanaka, R.; Sano, S.; Tanaka, A.; Hosaka, H. (2010) Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 107 (38), 16649-16654.</li><li>○ Witkowski, D. A.; Halling, B. P. (1989) Inhibition of Plant Protoporphyrinogen Oxidase by the Herbicide Acifluorfen-Methyl. <i>PLANT Physiol.</i> 90 (4), 1239-1242.</li></ul>	

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.