

발간 등록 번호

11-1541000-001439-01

일반과제(o)

과제번호 109106-3

천연고무를 생산하는 산업용 민들레 개발

Development of Dandelion as an Industrial
Crop Producing Natural Rubber

한국생명공학연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “천연고무를 생산하는 산업용 민들레 개발” 과제에 관한 연구보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 유 병 태

연 구 원 : 정 지 열

연 구 원 : Sandeep Tata

위탁연구기관명 : 고려대학교

위탁연구책임자 : 신 정 섭

연 구 원 : 최 준 영

요 약 문

I. 제 목

천연고무를 생산하는 산업용 민들레 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물 유용자원물질 천연고무를 생산하는 민들레 산업작물을 발굴 개발하여 농가소득 작물로 활용하고 또한 천연고무 수입 의존도를 낮출 뿐아니라 합성고무 원료인 석유사용을 줄여 국가 저탄소 녹색성장을 이룩하고자 한다. 본 연구는 기 구축된 민들레 형질전환 기술을 바탕으로 추진하는 개발 중간단계로서 민들레의 천연고무 생산성 향상 및 질적 향상을 위하여 천연고무 생합성 유용유전자 발굴과 형질전환 민들레 제조 등이 주요 연구내용이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 천연고무 생산 민들레 후보품종 수집 : 한국에 자생하는 민들레와 세계적으로 천연고무 대체작물로 주목받고 있는 러시아 민들레 (*Taraxacum kok-saghyz*)의 종자를 수집하여 천연고무 특성을 분석하였다.
2. 천연고무 생합성에 관련된 기능성 유전자 발굴 : 천연고무의 질적 양적 향상을 가져오는 기능성 유전자를 BT, IT, NT의 첨단 융복합 기술을 활용하여 민들레와 고무나무에서 분리 및 동정하였다.
3. 기능성 유전자를 민들레에 형질전환 : 천연고무의 질과 생산성을 높이는 유용 유전자를 민들레에 형질전환 하였다.
4. 형질전환 민들레에서 천연고무 형질검정: 기능성 유전자를 도입하여 질적 양적으로 목표 하는 형질이 나타나는 지를 천연고무를 추출하여 검정하였다.
5. 민들레 재배농가 및 산업체와 연계: 발굴한 민들레를 실제 농가 소득작물로 개발하기 위해 민들레 대량재배 단지 농업인뿐만 아니라 본 과제 성과물을 활용할 산업체(동일고무벨트-주)와 연계하여 연구를 수행하였다.
6. Latex-specific promoter 발굴: 천연고무가 생성되는 latex조직에 특이적으로 발현하는 유전자의 promoter를 분리하여 PCT 특허출원을 하였고 및 조직 특이적 유전자도입에 활용할 것이다.
7. Latex 조직에서 발현하는 유전자 Sequence 대량 database 구축: 서울대 NICEM과 생명연 내부기기를 사용하여 천연고무 관련 유전자 정보 총 10G 이상의 database를 구축하였다.

IV. 연구개발결과

1. 도입한 러시아 민들레의 국내 재배 및 천연고무 분석

- 국외로부터 러시아 민들레 (*Taraxacum koksaghyz*) 도입, 재배, 수확하여 천연고무 추출 및 특성 분석
 - 1) 천연고무 수확을 위한 야생 민들레의 대량재배 및 수확 고무분석
 - 2) 현재 우리나라에서는 없는 러시아 민들레를 도입하여 대량재배를 수행 (종자관리소와 협의하에)
- 자생민들레 천연고무 성분 과 비교분석
 - 1) 수확한 서양민들레와 러시아 민들레에서 천연고무 성분추출
 - 2) 천연고무 함량을 측정하고 기타 건물당 또는 개체당 함량비교

2. 천연고무 생합성/ 민들레 생육활성에 관련된 유용 유전자 분리

- 천연고무 생합성 관련한 유전자 분리 및 동정: 1차년도에 분리한 단백질의 peptide 정보를 기반으로 full gene sequence 정보를 얻어내고 cloning하여 재조합 단백질을 만들어 냄.
- Rubber particle 분리 및 천연고무 생합성 in vitro assay: Washed rubber particles 이 용하여 천연고무 생합성 in vitro assay를 수행
- 민들레 복합내성 및 생육기능 향상 유전자 분리 및 동정 (국내기후와 토양 조건에 적응능력을 증진시키기 위하여): 천연고무 생산을 증가시키는 유용유전자를 발견하기 위하여 민들레생육을 촉진하는 유전자 발굴 및 활용 (PCT 특허 출원)

3. 민들레 형질전환체 제조 및 재배

- 민들레 천연고무 생합성 관련 유전자 형질전환체 제조
 1. Latex 조직 특이적 유전자 발현 프로모터 발굴 (PCT 특허 출원)
 2. 민들레에 천연고무 생합성 관련 유전자를 도입하여 신기능 민들레 형질전환체 제조
- 천연고무함량을 높이고 또한 생육활성을 촉진하는 유전자를 도입한 형질전환체 제조: 민들레에 생육활성촉진 관련 유전자를 도입하여 신기능 민들레 형질전환체를 제조함.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 천연고무를 민들레에서 생산하여 수입의존도를 줄이고 현 천연고무 작물 *Hevea*의 allergy 유발 결점을 보완하는 고부가가치 무-알레르기 천연고무의 생산에 활용할 계획이다.
- 실용성이 매우 높은 천연고무 유전자들에 대한 특허권을 확보하고 품종개발에 활용한다.
- 산업체와 연계하여 민들레 천연고무 공정 기반기술을 개발함으로써 산업작물로 재배 생산 및 민들레 천연고무의 산업화를 이룩할 계획이다. 현재 동일 고무벨트 (주)와 성과물 이전 계약을 체결하였고 제조한 GM 러시아민들레는 상기 기업체가 인수하여 활용할 계획이다.

SUMMARY

I. Title of the Study

Development of dandelion as an industrial crop producing natural rubber

II. Objectives and Significance of the Study

>The objective of this project was to develop an industrial crops producing natural ruuber by genetic manipulation and to reduce dependency of our country on income of natural rubber from other countries.

>Our main contents is that we aim to generate GM russian dandelion plants which have improved production and quality of natural rubber based on our established transformation protocols.

III. The Scope of the Study

1. Import of Russian dandelion seeds
2. Identification of functional genes related to rubber biosynthesis and production
3. Transformation of dandelion plants with functional genes
4. Validation of phenotypes of transformant dandelion plants
5. Connected studies with farmers and industry
6. Identification of latex-specific promoter
7. Construction of database for RNA sequence information from latex-tissues

IV. Results and Application

1. Cultivation of Russian dandelion plants and natural rubber analysis
 - Import of Russian dandelion, cultivation, harvest, extraction of natural rubber, and analysis of natural rubber properties.
 - Comparison of natural rubber properties with native dandelion plants
2. Isolation of functional genes related to biosynthesis of natural rubber and growth of dandelion plants
 - Isolation of functional genes related to natural rubber biosynthesis
 - Seperation of rubber particles and In vitro assay of rubber biosynthesis
 - Functional genes related to improvement of abiotic and biotic stress resistances

3. Generation of GM dandelion plants and its cultivation

- Generation of transformant dandelion plants that contain functional genes related to natural rubber biosynthesis
- Generation of transformant dandelion plants that contain functional genes related to increase rubber content and improved growth rate.

V. Application of outcomes

- The technology we develop will be applied to production of natural rubber with improved quality without allergy problem and to reduce our dependency on import of natural rubber from other countries.
- We will file patent application for valuable functional genes related to rubber production and biosynthesis and utilize them to molecular breeding.
- By collaborating with industrial partner, we aim to put our outcomes into real practice so that our GM dandelion is cultivated and harvested for natural rubber production. The GM dandelion plants will be transferred to Dongil Rubber Belt Co. who has contracted with us by MOU.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Preface	1
Summary (in Korean)	2
Summary	5
Contents	7
Contents (in Korean)	8
Chapter 1. Introduction	9
Chapter 2. Current Status of Technique Development	11
Section 1. Developmental status in Korea	11
Section 2. Direction for industrial application	11
Section 3. 3P analysis and future plan	12
Chapter 3. Research Contents and Results	14
Section 1. Approach methods	14
Section 2. Research contents and methods	15
Section 3. Russian dandelion: Import, cultivation	16
Section 4. Isolation of Functional genes	18
Section 5. Generation of trasgenic dandelion plants.....	23
Section 6. Properties of trasgenic dandelion plants.....	34
Section 7. Isolation of latex-specific promoter	36
Section 8. Biomass increase by GGPS.....	38
Section 9. Connection with Farmers.....	39
Chapter 4. Achievement and Contribution	40
Chapter 5. Outcomes and future use.....	41
Section 1. Utilization and Plan	41
Section 2. Plan for further use	41
Section 3. Expected achievement	41
Chapter 6. Information obtained	42
Chapter 7. References.....	43

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	5
CONTENTS	7
목차	8
제 1 장 연구개발 과제의 개요	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 1 절 천연고무 생산 및 시장현황	11
제 2 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과	11
제 3 절 3P 분석을 통한 향후 계획	12
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	14
제 1 절 이론적 실험적 접근 방법.....	14
제 2 절 연구범위에 따른 연구수행 내용 및 방법.....	15
제 3 절 러시아 민들레 도입 재배, 천연고무 추출 및 특성분석.....	16
제 4 절 천연고무 생합성에 관련된 유용 유전자 분리.....	18
제 5 절 천연고무 생합성 유전자 도입 민들레 형질전환체 제조.....	23
제 6 절 형질전환 민들레에서 천연고무 형질검정.....	34
제 7 절 Latex 조직 특이적 발현 프로모터 발굴.....	36
제 8 절 천연고무 생산증대를 위한 바이오매스 증가 촉진연구.....	38
제 9 절 민들레 재배농가와 연계연구.....	39
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도	40
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	41
제 1 절 연구성과 활용실적 및 계획.....	41
제 2 절 활용방안	41
제 3 절 기대성과	41
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	42
제 7 장 참고문헌	43

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

식물 유용자원물질 천연고무를 생산하는 민들레 산업작물을 발굴 개발하여 농가소득 작물로 활용하고 또한 천연고무 수입 의존도를 낮출 뿐아니라 합성고무 원료인 석유사용을 줄여 국가 저탄소 녹색성장을 이룩하고자 한다. 본 연구는 기 구축된 민들레 형질전환 기술을 바탕으로 추진하는 개발 중간단계로서 민들레의 천연고무 생산성 향상 및 질적 향상을 위하여 천연고무 생합성 유용유전자 발굴과 형질전환 민들레 제조 등이 주요 연구내용이다.

2. 천연고무 생산작물 개발의 필요성

석유자원의 고갈에 따른 합성고무 한계뿐만 아니라 최근에 대두되고 있는 저탄소 녹색성장을 위한 방안으로 천연고무 생산 작물개발이 미국과 유럽에서 커다란 이슈가 되고 있다. 개발도상 국가들의 경제 성장으로 천연자원의 소비가 늘고 있으며, 자동차 타이어와 다른 고무제품의 수요도 꾸준히 늘어나고 있다. 이에 따라 합성고무는 물론 천연고무 값도 가파르게 치솟고 있어서 다른 물가에도 영향을 미치고 있다. 천연고무 값은 2004년 이후 4배 이상 올랐다. (2008년 기준) 그럼에도 불구하고 천연고무 생산은 *Hevea* 고무나무 한 종에만 의존하고 있으며, 언제든지 병에 의하여 천연고무 생산이 중단되어 전 세계의 경제에 치명적인 타격을 줄 수 있는 위험성이 내재되어 있다.

기존 *Hevea* 나무의 심각한 allergy 유발 단점을 개선하며 또한 한 작물에만 의존함으로써 발생하는 위험성을 극복할 수 있을 것으로 미국과 유럽 그리고 우리나라를 포함한 세계 여러 나라 전문가와 정책자들이 공통적으로 인식하고 있다. 최근 천연고무 대체작물개발을 미국 USDA 및 NSF에서는 미래전략과제로 선정하여 오하이오 대학과브릿지스톤-쿠퍼타이어(주) 산 학연 연구팀에 300만불 (42억원)의 연구비를 지원하였으며, 또한 유럽에서는 EU-PEARLS (EU-based Production and Exploitation of Alternative Rubber and Latex Sources) project라는 이름으로 130억원의 연구비를 투자하였다.

우리나라는 연간 400,000톤 이상의 천연고무를 쓰고 있는데 전량을 수입하고 있다. 따라서 직접투자 등 천연고무를 안전하게 확보할 방법을 강구하고 석유 기반의 합성 고무에 대한 의존성을 줄여야 한다. 고무나무 대체 작물을 개발하기 위해서는 한국산 민들레의 육종과 형질전환 등으로 우리 토양과 기후 조건에 맞으며 생산량이 우수하고 병충해에 강한 작물을 찾아내어 종자를 개량해야한다. 그리고 유전 공학 등의 상대적으로 발달된 생물공학 기술을 이용하여 고무나무를 대체할 수 있는 새로운 품종의 작물을 개발하려는 노력을 추진해 나가야 할 것이다. 천연고무 대체 작물은 농민들에게도 고부가가치 품종으로 재배될 수 있을 것이다.

3. 천연고무 생산 민들레 산업작물로의 개발 적합성

민들레가 천연고무 함량이 높고 단위면적당 생산량이 많아 미국과 유럽 및 러시아에서 천연고무 생산 대체작물로서 개발되어 오고 있다. 미국 천연고무 연구팀은 러시아민들레 뿌리에서 10~20%의 천연고무 성분을 추출하였다고 발표 하였다. 뿐만 아니라 몇 년에 걸쳐 재배하여야 하는 *Hevea* 목본에 비하여 재배기간이 짧다. 우리나라에서는 민들레가 건강에 유익하다는 인터

넷, 방송 매체의 보도에 따른 소비자들의 관심 고조되어 가고 있다. 자연적으로 자라고 있는 야생민들레를 무작위 채취하여 건강식품으로 활용하고 있어 야생 민들레의 급격한 감소를 야기시키고 있다. 우리나라 일부 지역에서 민들레의 대량 재배단지를 조성하여 농가소득화를 기하고 있으나 좀 더 민들레 활용범위를 첨단기술로 다변화시켜 농가 고부가가치 경제작물로의 개발이 필요하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 천연고무 생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내에서 민들레 생산 천연고무 사용제품은 전무한 실정이다.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 러시아 민들레(Russian dandelion)는 구소련에서 천연고무 자원을 개발하려는 전략적 계획을 진행하는 도중에 카자흐스탄에서 확인되었으며, 세계 2차대전 당시 구소련에서 민들레 고무를 사용하여 전차 및 트럭의 타이어를 제조하였다.(출처 : Whaley, W.G., and Bowen, J.S. (1947) Russian dandelion (Kok-Saghyz). An emergency source of natural rubber. (Washington D.C.: United States Department of Agriculture).)

○ 미국 오하이오 대학에서 러시아 민들레 중 10~20%의 천연고무 추출성공을 하였으며, 2년내 상용화 예정이다. 민들레 고무는 브리지 스톤에서 품질 면에서 고무나무에서 생산된 고무와 동일하다고 발표하였다.

(출처

http://www.global-autonews.com/board/view.php3?table=bd_parts&gubun=1&page_num=5&idx=375&key=)

제 2 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 천연고무는 40,000가지 이상의 제품에 쓰이는데, 여기에는 400종 이상의 의료 장치, 수술용 장갑, 항공기용 타이어, 자동차 타이어와 셀 수 없는 공업 및 상용 제품에 상용화가 가능하다. 2008년 천연고무 수입금액 1조2천억원(수입량 41만톤/년)에 이르는데, 민들레 고무는 5% 정도인 약 585억원(2만톤/년)의 대한 수입대체효과가 예상된다.

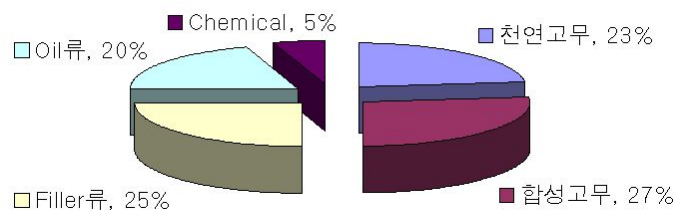


그림 1. 타이어 중 원재료 사용 비율

표 1. 국내 천연고무 용도별 사용 비중(대한타이어공업협회)

구 분	자동차용 타이어	기타 타이어(이륜차 등)	기타
천연고무 사용비중	63%	12%	25%

※ 천연고무 수입금액/수입량 : 한국 무역협회 통계 참조

※ 타이어 중 천연고무 사용량 : 26만톤(2007년, 대한타이어공업협회 통계 참조)

2. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	개발후 5차년도 (2017년)	개발후 7차년도 (2019년)	개발후 10차년도 (2022년)
직접 경제효과 (수입대체)	11,700 (1%)	35,100 (3%)	58,500 (5%)
경제적 파급효과	5,850	17,550	29,250
부가가치 창출액	133,300	400,000	666,700
합 계	150,850	452,650	754,450

※ 직접 경제효과 : 천연고무 1~5% 수입대체 비용

※ 경제적 파급효과 : 농가소득(제품의 30% 농민 인건비, 20% 토지 이용료)

※ 부가가치 창출액 : 타이어 연간생산량(85,753,000본) * 평균 천연고무 사용량(3Kg) * 수입대체(%) * 타이어평균가격(10만원/본)

제 3 절 3P(특허,논문,제품) 분석을 통한 향후 계획

1. 특허분석 측면

○ 기존 특허는 천연고무 생합성 pathway에 관련된 일반 유전자 분리에 치중되어 있으며, 천연고무 생합성 핵심효소인 중합효소가 밝혀져 있지 않기 때문에 본 연구과제에서는 천연고무 생합성 핵심 유전자 분리 동정 방향으로 연구를 추진하였으며 유용 유전자 특허 등을 국내 및 국외에 출원하였음

○ 기존에는 *Hevea*를 중심으로 천연고무 특성분석 및 실용화 기반기술이 개발되어 졌으나

본 연구과제에서는 대체 고무작물인 민들레에서 추출한 천연고무의 실용화를 위한 특성 분석 및 기반기술을 개발하여 특허를 출원하였음

- 아직까지 천연고무 생산 형질전환체에 대한 특허가 미비한 실정이라 본 연구과제에서는 형질전환체 제조를 통한 천연고무 생산성 증대 및 질적 향상 기술개발에 대한 특허를 출원을 준비하고 있음

2. 논문분석 측면

- 기존 논문은 천연고무 생합성 관련 유전자를 분리 동정한 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 천연고무 생합성 핵심 유전자를 분리 동정하는 방향으로 연구를 추진하여 “천연고무 생합성 핵심유전자 분리 동정” 논문 등을 국제 학술지 등에 투고하려고 준비 중
- 지금까지 대부분의 유전자 분리는 *Hevea*에서 하여 왔으나 본 연구과제에서는 민들레의 latex에서 발현하는 천연고무 생합성 유전자를 분리하여 대량 sequencing 하였음
- 기존에는 Guayule를 대체고무 작물로의 개발을 연구한 논문이 주를 이루었으나 본 연구과제에서는 민들레를 대체 고무생산 작물로 개발하는 연구논문을 발표하였음

3. 제품 및 시장분석 측면

- 지금까지 대부분의 천연고무 자원은 *Hevea*에서 확보하였으나, 언제 어느 때에 질병으로 인하여 생산이 중단되어 전 세계의 경제에 큰 타격을 입힐지를 모르기 때문에, 본 연구과제에서는 천연고무 대체작물 개발 방향으로 연구를 추진하여 천연고무 생산 민들레 신품종 등을 생산하여 국내 및 국외에 공급할 계획임
- 국내 및 국외시장 분석결과 석유자원에서 만들어 진 합성고무 제품의 생산 및 판매가 주를 이루고 있으나, 현재 석유자원의 고갈과 고유가 시대로 인하여 자원 확보 한계점에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 식물유래 천연고무 생산증대 및 대체 천연고무작물 개발 방향으로 연구를 추진하여 질적으로 향상된 천연고무를 생산하여 국내뿐만 아니라 국외의 시장에도 진출할 수 있을 것임.
- 기존에는 연간 1.2조원에 달하는 천연고무 원료를 전적으로 수입에만 의존하였으나 국내 재배가 가능한 대체 고무작물을 개발함으로써 일정부분 국내 자원에서 충당하여 10년 후 5% 수입대체를 달성함으로써 7천억원의 종합적인 산업화 경제효과를 창출할 것으로 예상됨 (상기한 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과 table 참조).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 실험적 접근방법

1. 관련유전자 선별 및 염기서열 분석

민들레 및 Hevea 고무나무의 latex 조직내에서 특이적으로 발현하는 고무 생산성 관련 유전자를 분리하기 위하여 cDNA library screening과 PCR 방법을 이용한다. 본 연구팀에서 확보한 internal amino acid sequence 정보를 이용하여 degenerate primer를 제작하여 PCR에 이용하며 선별된 유전자의 염기서열은 Automatic DNA Sequencer를 이용하여 분석하였다.

2. 재조합 단백질의 발현, 정제 및 역가 측정

민들레와 Hevea 고무나무에서 고무생합성에 관련된 것으로 여겨지는 고무중합효소의 재조합 단백질을 발현 분리하기 위하여 *E. coli* 발현 벡터와 *Pichia* 발현 벡터를 사용한다. 해당 유전자를 PCR방법으로 확보하여 적당한 제한효소를 이용하여 벡터에 클로닝한 후 *E. coli*나 *Pichia*에 transformation하여 단백질을 발현시켰다. 발현된 재조합 단백질은 His-tag, Strep-tag, GST-tag 등을 이용하여 분리 정제한 후 그 효소 역가를 측정하였다.

3. *In vitro* rubber biosynthesis assay

E. coli 및 yeast로부터 분리한 재조합 단백질의 고무 생합성 여부를 조사하기 위하여 실험관 내에서의 고무 생합성 실험을 시행하였다. 재조합 단백질을 효소원으로 하여 반응용기에 [¹⁴C]-IPP와 FPP를 첨가하여 효소반응을 시킨 다음 생합성된 고무를 benzene으로 추출하거나 0.02 μm filter를 이용하여 여과한 다음 남아있는 ¹⁴C의 양을 측정하여 생합성 된 고무의 양을 조사하였다. 아울러 생합성된 고무의 분자량은 GPC 및 reverse-phase TLC를 이용하여 측정하였다.

4. 전기영동을 통한 고무생합성 단백질의 분리 및 동정

고무입자에 결합하여 있는 단백질을 조사하기 위하여 민들레와 Hevea 고무나무의 latex와 washed rubber particle을 detergent buffer (0.1% Triton X-100, 1% SDS)와 혼합하여 상온에서 약 30 분 동안 방치한 후 SDS-12% PAGE를 이용하여 단백질을 분리 동정하였다. 특정 단백질의 펩타이드 서열 규명을 위하여 SDS-PAGE로 분리한 단백질을 PVDF 막으로 옮긴 후 해당 밴드를 잘라내어 펩타이드 서열을 규명한다. 펩타이드 서열 규명은 기초과학지원연구소 서울분소의 Procise Protein Sequencing System (Applied Biosystems)을 이용하여 시행하였다.

5. 대상작물의 형질전환 및 생성산물 분석

대상작물의 효과적인 형질전환을 위하여 시료의 생리적 상태, *Agrobacterium*의 종류 및 induction 조건, 형질전환 후 transgene의 발현, 시료로 사용되는 조직의 종류 등 여러 가지 조건을 최적화하여 천연고무 핵심유전자의 형질전환을 시도하였다. 식물 형질전환은 관련 유전자를 포함하는 binary vector를 *Agrobacterium tumefaciens*에 이식한 다음, 이 박테리아를 식물체의 옆조직이나 Primordial leaf/apical meristem에 접종하여 형질전환을 시도한다. 본 연구팀이 이미 확립한 민들레

형질전환 기술을 이용하여 model 식물체 민들레에 이식시킨 후 형질전환된 민들레에서 천연고무의 생합성 여부를 조사 하였다 (NMR, GPC 이용). 형질전환 식물체를 여러 세대 재배하면서 관련 유전자의 발현 안정성과 고무 생합성의 상관관계를 조사하였다.

6. 미생물을 이용한 생합성

고무중합효소의 기능을 조기에 규명하고 미생물을 이용한 고무 및 isoprenoids 생산 가능성을 조사하기 위하여 관련 유전자를 미생물에 발현시켰다. 대장균은 pSE420 벡터를 이용하여 이들 유전자를 동시에 발현시키고, 효모는 pESC 벡터를 이용하여 관련 유전자를 동시에 발현시켰다. 미생물을 배양하여 생성 산물을 추출한 다음 NMR, HPLC, GPC를 이용하여 해당 물질을 분석하였다.

7. 고무생산 작물의 해부학적인 특징과 고무의 분포

식물체 줄기의 해부학적인 특징과 고무의 분포를 광학현미경과 전자현미경(SEM)으로 조사하였다. 식물체 줄기의 관찰용 시료 제작은 식물체의 줄기로부터 5 x 5 x 5mm 크기의 목편을 제작한 다음, 4% gluteraldehyde + 1% paraformaldehyde (in 0.1 M cacodylate buffer)로 실온에서 4시간 고정시켰다. 이어alcohol 계열로 순차 탈수 시킨 뒤 critical point drying을 실시하였다. Ion sputter를 사용하여 시료의 표면을 gold coating한 후, 주사형 전자현미경 (Hitachi S-2400)을 사용하여 관찰하였다.

8. Latex 조직에서 발현하는 유전자 대량 Sequencing : 서울대 NICEM과 생명연 내부기기를 사용하여 총 10G 이상의 database를 구축하였다.

제 2 절 연구범위에 따른 연구수행 내용 및 방법

연구 범위	구체적인 내용	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)
□ 도입한 러시아 민들레의 국내 재배 및 천연고무 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 러시아 민들레 국내 반입 <ul style="list-style-type: none"> - 국립종자관리소에 신고 및 허가받음 - 전남 장성 민들레 재배농가 ○ 러시아 민들레의 수확 및 천연고무 추출 분석 	카작스탄에서 자생하는 러시아 민들레를 독일 협력 연구자로부터 구입하여 국내 민들레 재배농가와 협력하여 러시아 민들레의 대량 재배하였다. 수확 건조한 sample에서 고무를 분석하였다.

<p>□ 천연고무 생합성에 관련된 유용 유전자 분리</p>	<p>○ 천연고무 생합성 과정에서 중요한 key step의 조절을 위한 천연고무 생합성 관련 유전자 분리 및 동정</p> <p>○ 천연고무 생합성에 관련한 유용 유전자를 선별하기 위하여 latex 조직이 많이 있는 뿌리와 꽃대에서 RNA를 추출하여 EST seq 읽음 (서울대 NICEM / 생명연 유전체 분석팀에 의뢰하여 수백만개를 확보)</p>	<p>Hevea 고무나무와 러시아인 민들레의 latex 조직내에서 고무중합효소 유전자 후보의 DNA sequence를 찾기 위하여 EST seq을 수백만개 이상을 읽었다 (서울대 NICEM과 생명연 유전체분석팀에 의뢰). 이미 확보한 peptide seq 정보를 이용하여 match되는 DNA를 확보하고 이를 이용하여 full seq를 읽어 내었다.</p>
<p>□ 민들레 생육활성에 관련된 유용 유전자 분리</p>	<p>○ 천연고무 생산회로에 있는 유전자 중 식물체 생육도 함께 촉진하는 기능이 있는 유전자를 담배/민들레 형질전환체를 이용하여 탐색함 (유용유전자 특허출원을 목표로 함)</p>	<p>척박한 지역에서 재배를 가능하게 하고 민들레 고무생산을 증가시키는 목표를 달성하기 위하여 민들레 생육과 기타 복합내성을 촉진하는 유용유전자를 탐색하였다.</p>
<p>□ 민들레 형질전환체 제조 및 재배</p>	<p>○ Latex-specific promoter 발굴 및 활용 (특허 출원을 목표로 함)</p> <p>○ 천연고무 생합성 관련 유전자 (FPS) 도입 형질전환체 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 선별 및 증식 - 온실 재배 (8개월 이상) <p>○ 도입유전자 유전자 발현 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - real time PCR 발현 분석 <p>○ Sample 수확/고무분석 (3차년에 실시)</p>	<p>천연고무 생합성에 관련된 isoprenoid biosynthesis pathway의 key 효소 중 하나인 FPS 유전자를 민들레에 형질전환하였다.</p> <p>여러 독립된 형질전환체 lines을 확보하여 재배하였다.</p> <p>도입유전자의 발현과 도입 copy수를 파악하기 위하여 재배 형질전환체에서 유전자 분석을 수행하였다.</p>

제 3 절 러시아 민들레도입, 재배, 천연고무 추출 및 특성 분석

한국에 자생하는 민들레와 세계적으로 천연고무 대체작물로 주목받고 있는 해외 민들레의 종자를 수집하여 천연고무 특성을 분석하였다.

1. 국외로부터 러시아 민들레 도입, 재배, 및 수확

러시아 민들레 (*Taraxacum koksaghyz*)는 카작스탄이 원산지로서 2차대전 당시 러시아에서 천연고무생산을 위하여 대량재배 하여 전차바퀴를 만들었던 역사가 있다. 전쟁이후 대량재배가 중단되 더 이상의 고무를 채취하지 않았다. 카작스탄 등 여러 나라에 수소문하였으나 씨앗을 구입할 수가 없었다. 마침 EU-Framework project로 ‘러시아 민들레에서 천연고무

생산기술개발이 진행되고 있다는 정보를 입수하고 과제책임자와 접촉하여 독일 Dr. Prufer로부터 씨앗을 분양받게 되었다. 국내 반입한 종자는 국립종자관리소에 신고하여 허가를 취득한 후 전남 장성 민들레 재배농가에 협약 재배를 시작하였다. 일부는 한국생명공학연구원 오창캠퍼스 부지에서 재배되었다. 수확 후 지상부와 지하부로 구분한 다음 건조한 후 마쇄하였다. 마쇄한 sample은 thimber paper tube에 일정량 (20g dry wt) 넣고 soxhlet evaporator에서 solvents을 사용하여 천연고무를 추출하였다.



그림 2. 러시아 민들레의 국내재배(왼쪽)와 채취한 민들레 잎과 뿌리 sample(오른쪽)

2. 천연고무 분석: 러시아 민들레에서 고무를 추출한 결과를 아래의 Table 1 and 2에 제시하였다.

러시아 민들레와 자생 민들레의 잎 조직에서는 고무함량이 큰 차이가 없었지만 뿌리 조직에서는 러시아 민들레에서 자생민들레에 비하여 약 3배 정도 고무함량이 높았다. 앞으로 고무생합성 관련 유전자를 동정하여 러시아 민들레에 도입함으로써 고무생산량을 15% 이상 증가시키고자 한다. 계속하여 분석 반복수도 증가시켜 최소한 5반복을 수행할 계획이다.

Table 2. 러시아 민들레와 자생 민들레의 잎 조직에서의 고무함량 비교

	Amount of rubber in 20g of leaf tissue(after acetone precipitation)	% rubber after acetone precipitation(pure state)	Amount of rubber in 20g of leaf tissue(after nitrogen evaporation)	% rubber after nitrogen evaporation(impure state)	% yield from the impure rubber
Russian dandelion leaf1	0.24g	1.2%	0.57g	2.85%	42%
Russian dandelion leaf2	0.33g	1.6%	0.60g	3.0%	55%
Average(Russian dandelion)	0.28g	1.4%	0.58g	2.9%	48.5%
Yellow dandelion leaf1	0.27g	1.3%	0.56g	2.8%	48.2%
yellow dandelion leaf2	0.34g	1.7%	0.56g	2.8%	60%
Average(yellow dandelion)	0.30g	1.5%	0.56	2.8%	54.1%

Table 3. 러시아 민들레와 자생 민들레의 뿌리 조직에서의 고무함량 비교

	Amount of rubber in 20g of root tissue(after acetone precipitation)	% rubber after acetone precipitation(pure state)	Amount of rubber in 20g of root tissue(after nitrogen evaporation)	% rubber after nitrogen evaporation(impure state)	% yield from the impure rubber
Russian dandelion root1	0.11g	0.55%	0.18g	0.9%	61.1%
Russian dandelion root2	0.20g	1.0%	0.48g	2.4%	41.66%
Average(Russian dandelion)	0.15g	0.77%	0.33g	1.65%	51.38%
Yellow dandelion root1	0.05g	0.25%	0.14g	0.7%	35.7%
yellow dandelion root2	0.04g	0.20%	0.13g	0.65%	30.7%
Average(yellow dandelion)	0.045g	0.22%	0.13g	0.67%	33.2%

제 4 절 천연고무 생합성에 관련된 유용 유전자 분리 :

1. Latex에서 천연고무 생합성 관련 단백질 분리

- Latex에서 rubber particle를 분리한 다음 rubber particle에 붙어있는 단백질들을 detergent를 사용하여 떼어 내었다. 그 단백질 중에 천연고무 생합성과 관련된 단백질을 분리하기 위하여 여러 가지 다른 column을 사용하였다. Gel chromatography로 단백질 크기별로 분리하고 ion exchange column을 거쳐 몇 개의 단백질만 남을 때까지 고무 생합성 in vitro activity assay에서 activity를 추적하여 좁혀갔다.

- 몇 개의 단백질을 전기영동으로 분리하여 partial amino acid를 확보하였다.

2. Latex에 발현하는 RNA 추출 및 EST seq 분석

천연고무 생합성 관련 유전자의 분리를 용이하기 위하여 러시아 민들레와 Hevea 식물체로부터 Latex를 추출 수확하였다. Latex에서 발현하는 RNA를 추출하여 수백만개의 EST sequence를 서울대 NICEM 및 생명연 유전체분석팀에 의뢰하여 읽었다.

가. 러시아 민들레의 뿌리조직 : 600백만 이상의 EST sequences 읽음

나. 러시아 민들레의 꽃대 : 300백만 이상의 EST sequences 읽음

다. Hevea의 Latex : 600백만 이상의 EST sequences 읽음

라. Hevea의 새잎조직 : 300백만 이상의 EST sequences 읽음

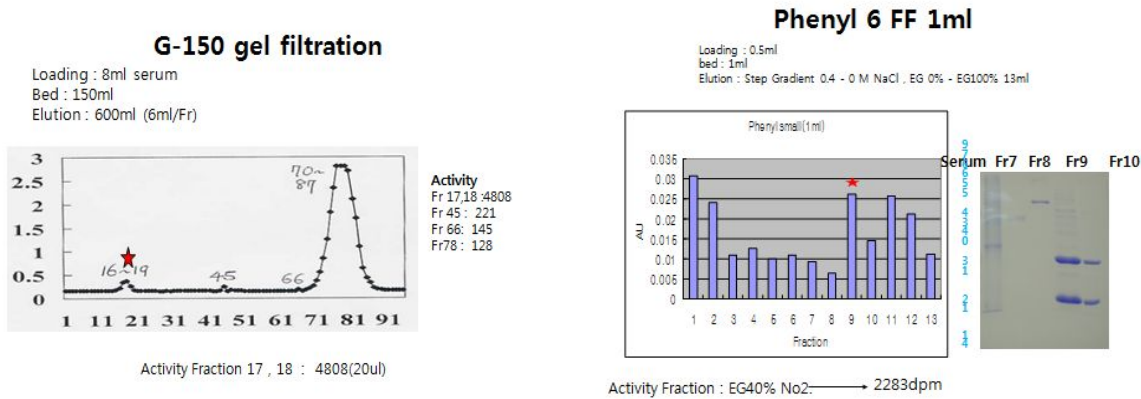


그림 3. 단백질 분리 및 동정

3. 확보한 천연고무 생합성 관련 단백질의 peptide amino acid sequence를 바탕으로 full sequence 읽음: 0000bp 가량의 pep16 유전자를 확보하였다. Motif 분석 결과를 아래에 첨부한다.

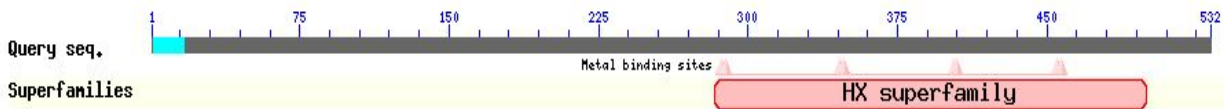


그림 4. 천연고무 생합성 관련 유전자의 분리 및 Motif 분석.

4. 재조합 단백질 이용한 천연 고무 생합성 in vitro assay

가. 고무생합성 in vitro assay 시스템은 다음과 같이 구축하였다.

- A. Latex에서 rubber particle 분리
- B. Rubber particle washing with a detergent (Triton X-100)
- C. Washed rubber particle + FPP + [14C]IPP + Mg²⁺ + sample in Rxn buffer

나. 고무생합성 in vitro assay 시스템 최적화.

고무중합효소의 특성을 이해하기 위해 고무중합효소의 활성에 영향을 미치는 다양한 인자들 예를 들면 Mg²⁺, FPP, Buffer 등의 조건을 다르게 하여 가장 이상적인 고무생합성 in vitro assay 조건을 찾고자 하였다. 다양한 조건을 실험한 결과를 아래의 그림 1 에서 그림 6에 제시하였다. 고무중합효소의 활성에 중요한 인자인 Mg²⁺은 1 mM의 농도에서 가장 활성이 높았고 고무합성 반응을 위한 기질인 FPP는 1 ~ 10 μM에서 높은 활성을 관찰할 수 있었다 (그림 1). 고무생합성을 위한 반응시간은 4시간에서 24시간까지 거의 일직선 형태로 고무합성이 증가하였고 고무합성에 방해가 될 수 있는 인산화 효소를 억제하는 KF는 고무합성효소의 활성에 거의 영향을 끼치지 않았다 (그림 2). 또한 단백질 reducing agent로 알려진 β-mercaptoethanol 과 DTT를 다양한 농도로 처리했을때 고무

합성효소의 활성에 변화가 없었다 (그림 3). 막단백질을 분리할 때 쓰이는 Tx-100과 SDS 등의 계면활성제가 고무중합효소의 활성에 미치는 영향은 계면활성제의 농도가 증가할수록 급격히 고무중합효소의 활성이 감소함을 알 수 있었다 (그림 4). 또한 buffer가 고무중합효소의 활성에 미치는 영향을 실험했을 때에는 Tris buffer가 phosphate buffer 보다 더 높은 고무중합효소의 활성을 보였다 (그림 5). 기존에 Mg^{2+} 보다 고분자 long-chain 고무합성을 촉진한다고 알려진 (Bernardo et al., 2005) Mn^{2+} 의 고무합성효소의 활성에 미치는 영향을 조사했을 때 같은 처리농도에서 Mn^{2+} 이 Mg^{2+} 보다 약 50% 낮은 활성을 보였다 (그림 5). 지금까지의 결과를 토대로 고무합성효소의 활성을 조사하기 위한 최적화된 in vitro assay 조건을 그림 6에 제시하였다. Mg^{2+} 대신 Mn^{2+} 을 사용한 Long-chain 고분자 고무합성을 위한 조건도 함께 그림 6에 제시하였다. 최적화된 조건을 이용해 고무합성효소의 활성을 조사하였을 때 약 40% 이상의 IPP incorporation을 얻을 수 있었다.

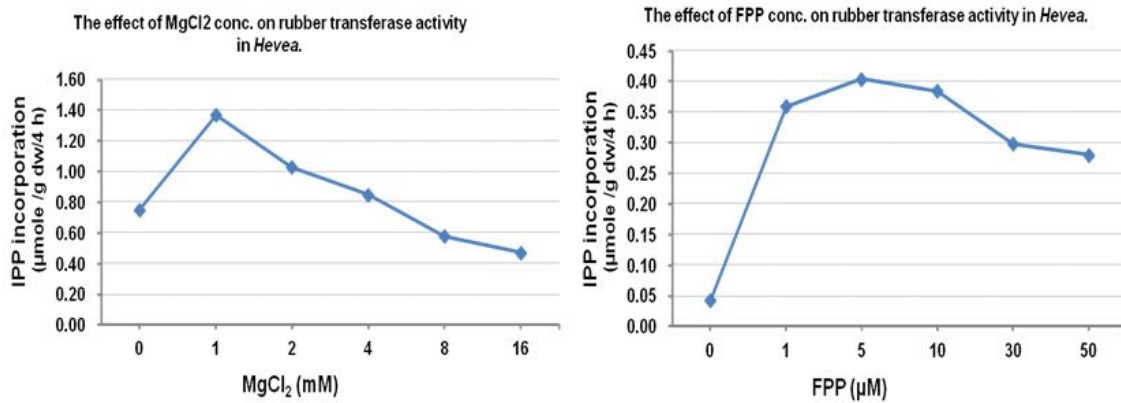


그림 5. Mg^{2+} and FPP 의 농도에 따른 고무합성효소의 활성 변화.

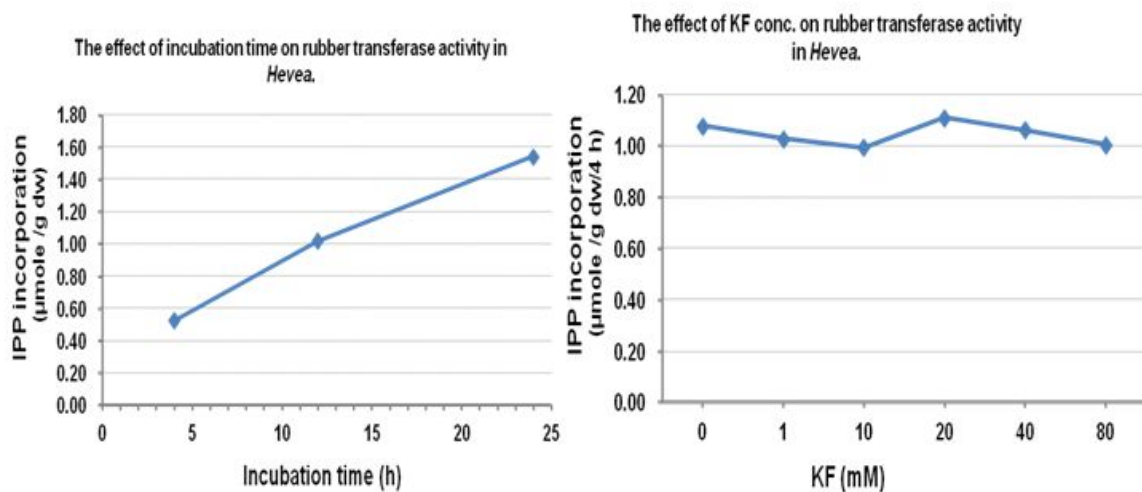


그림 6. 반응시간과 KF의 농도에 따른 고무합성효소의 활성 변화.

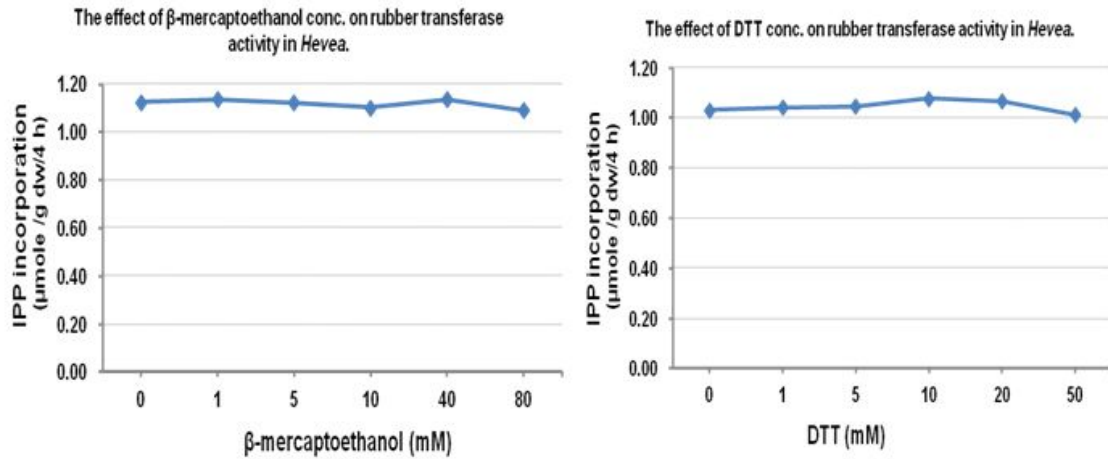


그림 7. β -mercaptoethanol 과 DTT의 농도에 따른 고무합성효소의 활성 변화.

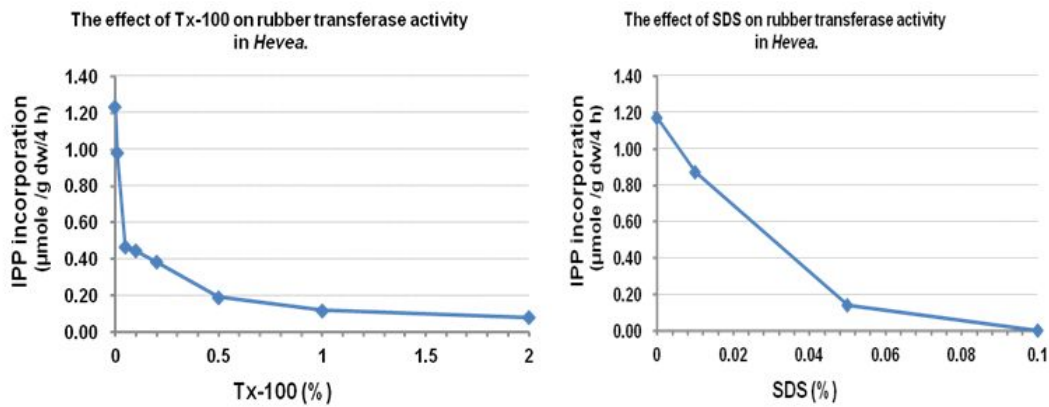


그림 8. Tx-100 과 SDS의 농도에 따른 고무합성효소의 활성 변화.

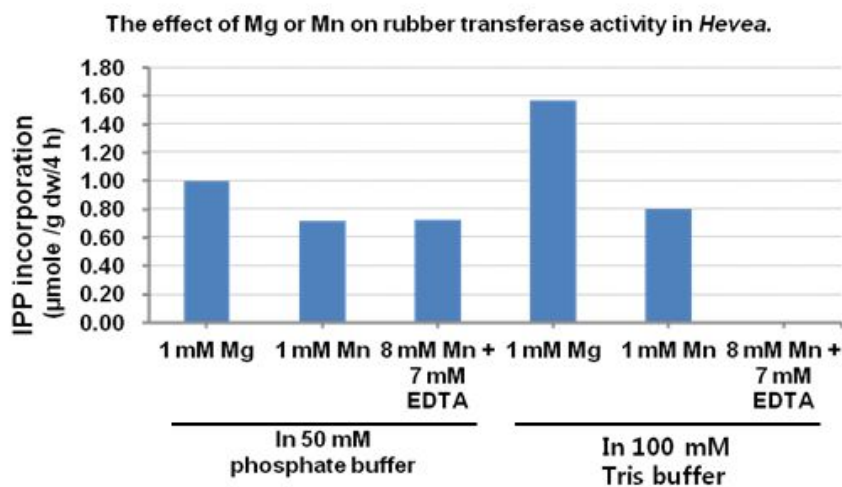


그림 9. Mg^{2+} 과 Mn^{2+} 의 활성 비교와 buffer의 구성에 따른 고무합성효소의 활성 변화.

최적화된 in vitro assay 조건	Long chain rubber 분자 생성을 위해 최적화된 in vitro assay 조건
Reaction Mixture Composition	Reaction Mixture Composition
100 mM Tris Buffer (pH7.5)	100 mM Tris Buffer (pH7.5)
1 mM MgCl ₂	1 mM MnSO ₄
40 mM KF	40 mM KF
1.5 μM FPP	1.5 μM FPP
40 mM β-mercaptoethanol	40 mM β-mercaptoethanol
Washed Rubber Particles (WRP) : 0.25 mg	Washed Rubber Particles (WRP) : 0.25 mg
50 μM [1- ¹⁴ C]IPP (2.1 GBq/mmol)	50 μM [1- ¹⁴ C]IPP (2.1 GBq/mmol)
Final volume: 50 μL, 30 °C, 4 hrs	Final volume: 50 μL, 30 °C, 4 hrs

그림 10. 최적화된 고무 중합효소 In vitro assay 조건.

5. 민들레 고무함량 증가 및 생육촉진을 함께 가져오는 유전자 분리 및 동정
 러시아 민들레를 척박한 토양(Marginal land)에서도 생육이 가능하도록 천연고무 생산을
 증가할 뿐아니라 생육까지도 촉진시키는 유용 유전자의 분리를 목표로 하였다.

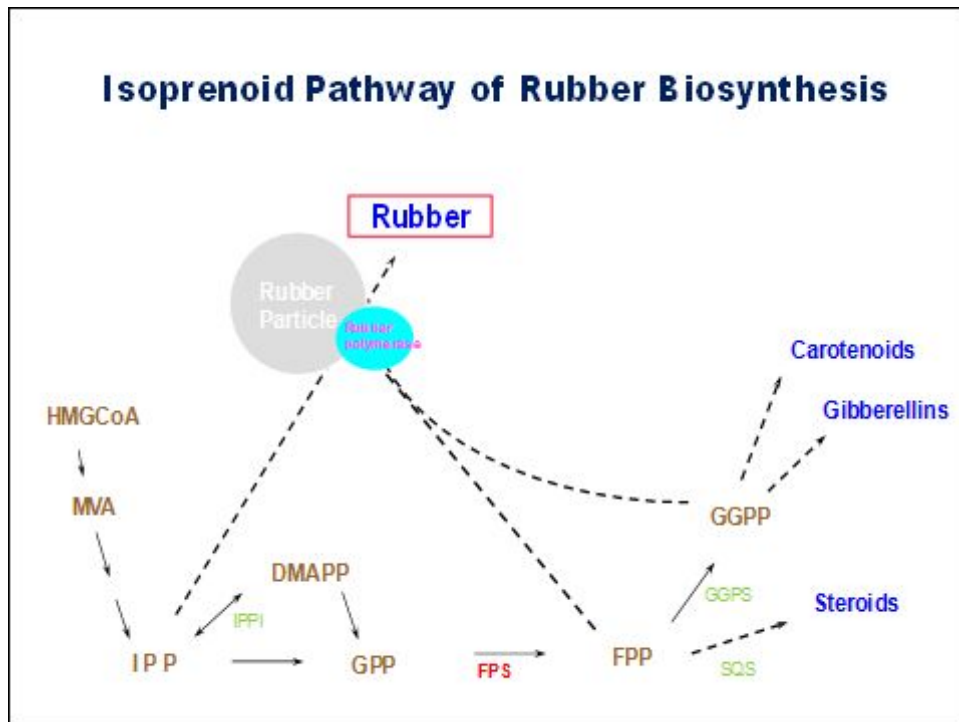


그림 11. 천연고무 생합성 회로 (Biosynthesis pathway of natural rubber)

- FPS 유전자는 상기한 그림에서와 같이 천연고무 생합성 과정에서 key enzyme일 뿐 아니라 생육도 촉진시키는 유용 유전자이다.

- FPS 유전자를 Guayule에서 분리 (GFPS로 명명)하여 러시아 민들레에 형질전환하였다. 현재 생육활성 촉진현상을 확인하였으며 고무함량 분석이 완료되면 특허출원을 고려하고 있다.
- 그 다음 단계에 있는 GGPS 유전자도 생육을 촉진하는 기능이 있음을 발견하고 한국특허를 출원하였다. (한국특허 출원번호 10-2010-0098072, 2010년 10월 8일)

제 5 절 천연고무 생합성 유전자 도입 민들레 형질전환체 제조

민들레의 형질전환체 개발을 위한 식물체 재분화 조건을 확립하고, 확보된 식물체 재분화 기술을 바탕으로 형질전환의 효율에 커다란 요인으로 알려진 다양한 *Agrobacterium tumefaciens* strain과 형질전환 벡터를 사용하여 형질전환의 효율을 극대화시키며, 이를 바탕으로 천연고무 생합성 관련 유전자가 도입된 민들레 식물체를 생산하고자 한다.

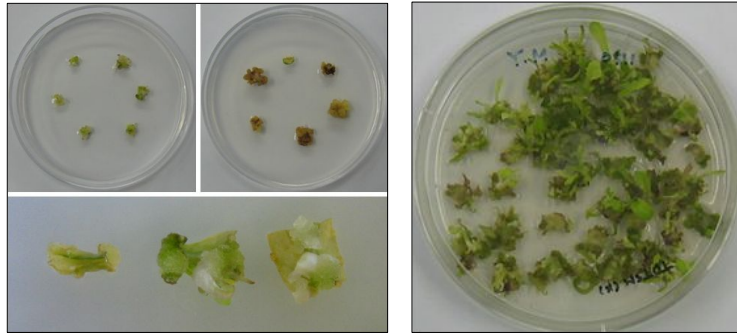
1. 민들레 재생 및 형질전환 기반조건 확립

가. 종자 발아 및 무균상태 배양: 서양(노랑), 흰(토종), 러시아 민들레의 종자를 확보하여 무균상태에서 종자발아 시켜 기내 식물체를 확보하였음. 또한 온실에서 재배하여 3종류 민들레의 생장을 비교 하였으며, 종자들을 확보하였다.



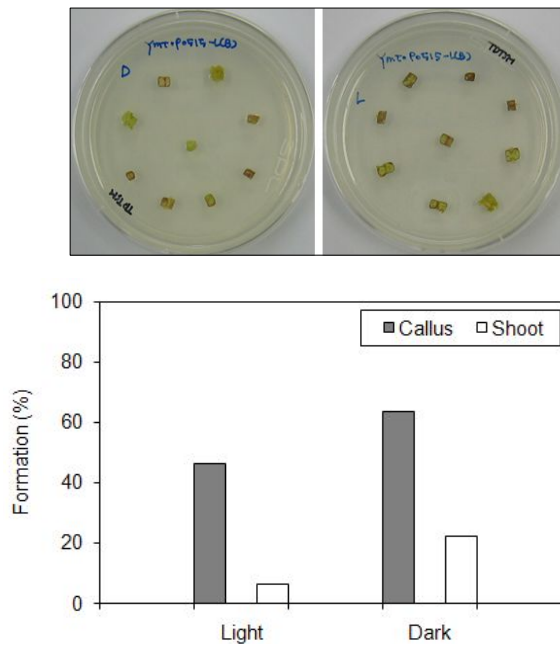
<그림 12. 서양(노랑), 흰, 러시아 민들레 온실 재배(위) 및 기내배양 모습(아래)>

나. 절편체로부터의 callus 유도 및 신초 재생: 잎 절편체로부터의 신초 재생에 있어서 주요 요인인 절편체 부위, 성장조절제, 초기 배양환경의 최적 조건을 확립하였다. 잎의 줄기 부위부터 4등분으로 절단하여 실험한 결과 잎의 모든 부분에서 좋은 재생율을 보였다.



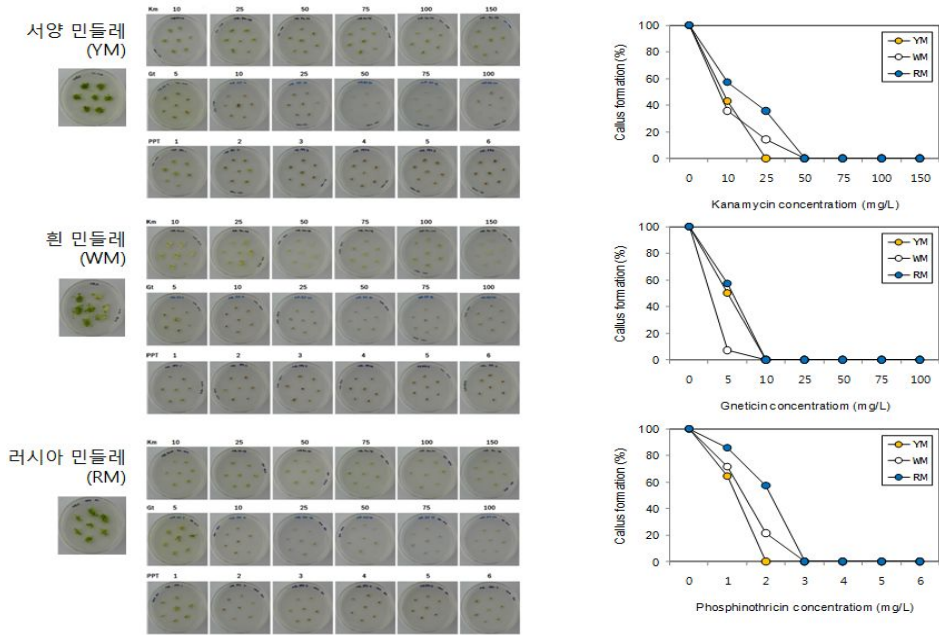
<그림 13. 잎 절편체 부위별 신초 재생>

또한 초기 배양 환경을 암배양 3주 후 명배양과 계속적인 명배양으로 달리하여 실험한 결과 암배양 3주 후 명배양한 절편체에서의 신초 재생율이 22.2%로 계속 명배양한 절편체의 신초 재생율 6.3%보다 높게 나타났다.



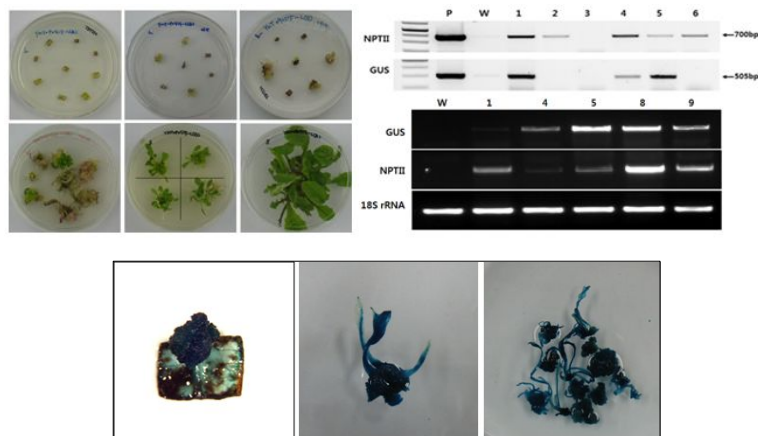
<그림 14. 배양 환경에 따른 신초 재생>

다. 형질전환체 선발을 위한 항생제 종류 및 농도 규명: 효율적인 형질전환체의 선발을 위해 kanamycin, geneticin 그리고 PPT의 적정 농도를 결정하였다. kanamycin 50 mg/L, geneticin 10 mg/L, PPT 3 mg/L 이상에서 절편체로부터 캘러스가 형성되지 않았다. 이를 바탕으로 pBI121:GUS를 이용하여 서양(노랑), 흰, 러시아 민들레에 형질전환을 수행할 때 안전 농도로 kanamycin 100 mg/L를 사용하여 형질전환 절편체를 선발하였다.

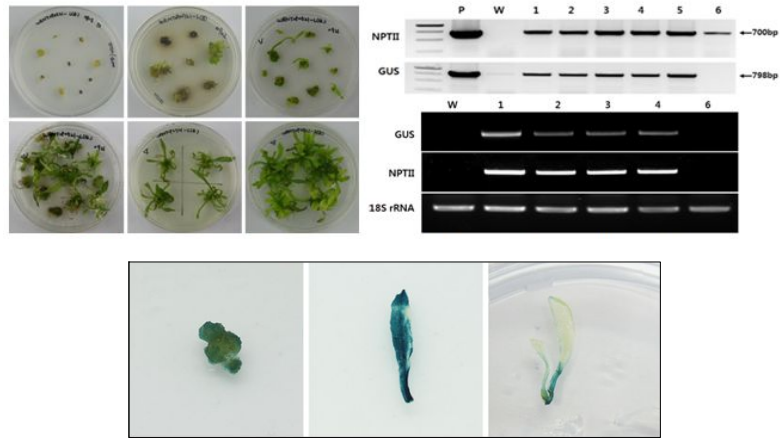


<그림 15. 서양(노랑), 흰, 러시아 민들레 항생제 종류 및 농도 규명>

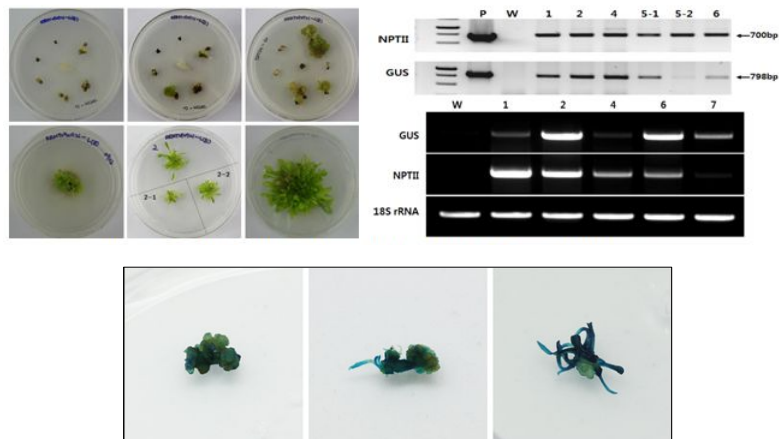
라. 35Sp:GUS 형질전환체 분석: 서양(노랑), 흰(토종), 러시아 민들레에 35Sp:GUS를 도입한 형질전환체의 gDNA를 simple method 방법으로 추출하여 NPTII primer (F: 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' and R: 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3')와 GUS primer (F: 5'-GGGCAGGCCAGCGTATCG-3' and 5'-CCTTCACCCGGTTGCCAG-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다. NPTII와 GUS 유전자 모두 도입된 line들을 선별하여 RT-PCR 분석을 통해 유전자 발현을 확인하였다. 또한 GUS 분석을 통하여 GUS 유전자가 식물체 genomic DNA에 안정적으로 삽입되었음을 확인하였다.



<그림 16. 서양(노랑) 민들레 형질전환 과정 및 형질전환체 분석>



<그림 17. 흰 민들레 형질전환 과정 및 형질전환체 분석>



<그림 18. 러시아 민들레 형질전환 과정 및 형질전환체 분석>

마. RT-PCR를 통해 유전자의 발현이 확인된 3개 line, vector 도입된 mock line 과 wild-type 들은 고무합성 분석과 후대 종자 수확을 위해 각각 증식시킨 다음 뿌리를 유도 하였다. 발근된 식물체들은 순화과정을 거쳐 활착시킨 후 온실에서 재배하여 순차적으로 종자를 수확하였다.



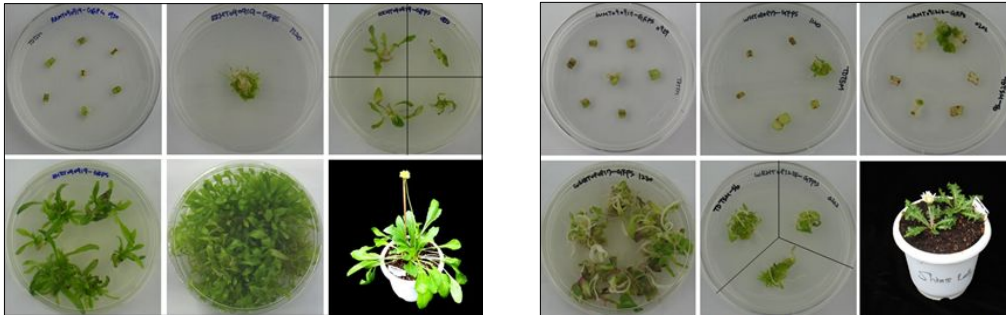
<그림 19. 종자 수확>

2. 천연고무 생합성 관련 유전자 형질전환체 제조

가. 35Sp:GFPS 도입 러시아 & 흰 민들레 형질전환체 생산

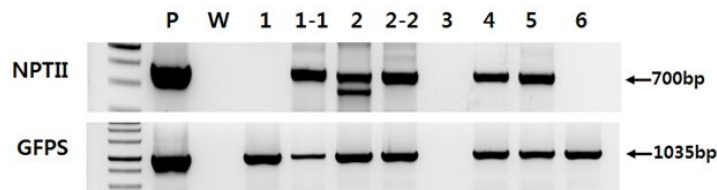
(1) 확보된 효율적인 호르몬 및 항생제 농도를 사용하여 러시아 & 흰 민들레에 형질전환

하였다. 형질전환 절편체에서 형성된 캘러스로부터 신초가 유도 되었으며, 유도된 신초들은 각각의 line 번호를 붙여 신초 신장배지에서 신초들을 신장시켰다. 신장된 신초들은 유전자의 발현 및 도입 여부를 확인하기 위해 증식시켰다.

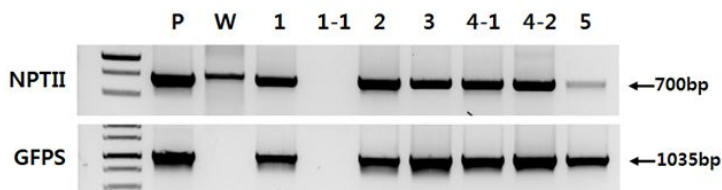


<그림 20. GFPS 도입 러시아 민들레 (왼쪽) & 흰 민들레 (오른쪽) 형질전환 과정>

(2) 항생제가 첨가된 재생배지에서 선발된 신초들을 대상으로 gDNA를 simple method 방법으로 추출하여 NPTII primer와 GFPS primer (5'- and 5'-)을 이용하여 PCR 분석을 하였다. NPTII와 GFPS 유전자가 모두 도입된 러시아 & 흰 민들레 형질전환체 4개의 line 들을 선발하였다.

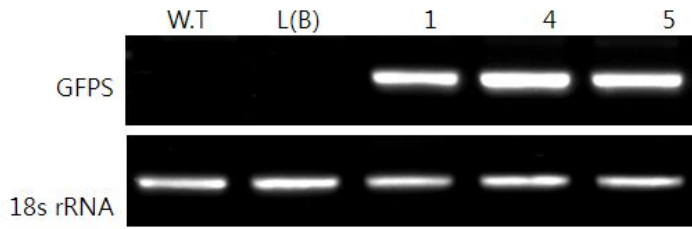


<그림 21. GFPS 도입 러시아 민들레 PCR 분석>



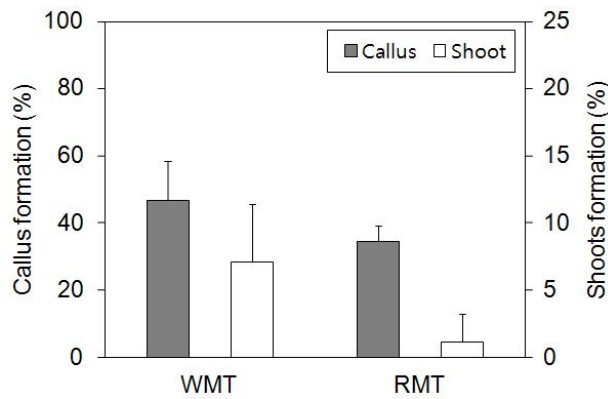
<그림 22. GFPS 도입 흰 민들레 PCR 분석>

(3) PCR 분석을 통하여 NPTII와 GFPS 유전자 모두 도입됨을 확인된 러시아 민들레 3개의 line, vector 도입된 mock line과 wild-type들은 RNA를 분리하여 RT-PCR 하였다. GFPS 유전자가 도입된 형질전환체 line #1, #4와 #5의 RT-PCR 분석을 통하여 유전자의 발현 정도를 확인한 결과 vector 도입된 mock line과 wild-type에서는 GFPS 유전자가 발현되지 않았고, GFPS 유전자가 도입된 형질전환체 3개 line 모두 GFPS 유전자가 발현됨을 확인 하였다.



<그림 23. GFPS 도입 러시아 민들레 RT-PCR 분석>

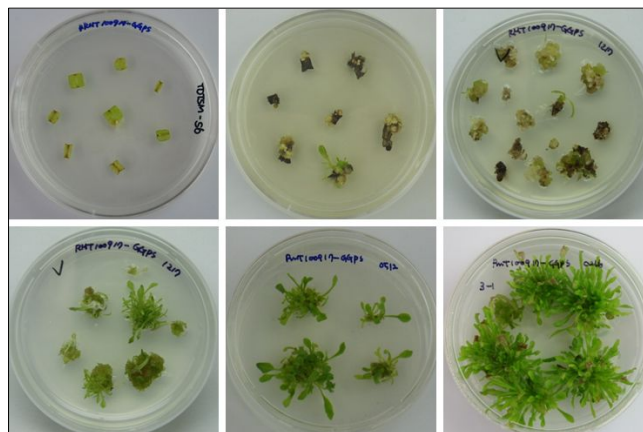
(4) RT-PCR 분석을 기반으로 GFPS 도입 흰 민들레 (WMT)와 러시아 민들레 (RMT)의 형질전환 캘러스 형성은 각각 46.8%와 34.6%이며, 식물체 재생 효율은 각각 7.1%과 1.2%로 나타났다.



<그림 24. GFPS 도입 흰 민들레 & 러시아 민들레 형질전환 효율>

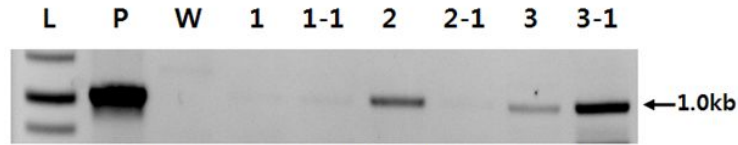
나. 35S:GGPS 도입 러시아 민들레 형질전환체 생산

(1) GGPS 유전자를 이용하여 러시아 민들레에 형질전환 하였다. 항생제 첨가된 신초 재생배지에서 형질전환 절편체를 선발하였고, 선발된 절편체에서 형성된 캘러스로부터 신초가 유도됨을 확인하였다. 유도된 신초들은 각각의 line 번호를 붙여 신초 신장배지에서 신초들을 신장시켰으며 신장된 신초들은 분석을 위해 증식시켰다.



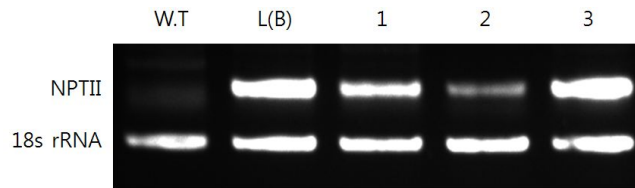
<그림 25. GGPS 도입 러시아 민들레 형질전환 과정>

(2) 항생제가 첨가된 재생배지에서 선발된 싌초들을 대상으로 gDNA를 simple method 방법으로 추출하여 NPTII primer와 GGPS primer (F: 5'- and)를 이용하여 PCR 분석을 하였다. GGPS 유전자가 식물체 genomic DNA에 안정적으로 삽입된 line을 선발하여 증식시켰다.



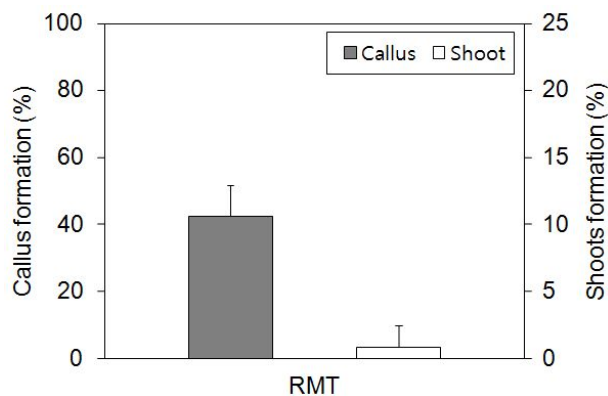
<그림 26. GGPS 도입 러시아 민들레 PCR 분석>

(3) PCR 분석을 통하여 NPTII와 GGPS 유전자 모두 도입됨을 확인된 러시아 민들레 3개의 line, vector 도입된 mock line과 wild-type들은 RNA를 분리하였으며, NPTII primer를 이용하여 RT-PCR 하였다. GGPS 유전자가 도입된 형질전환체 line #1, #2와 #3의 RT-PCR 분석을 통하여 유전자의 발현을 확인한 결과 wild-type에서는 NPTII 유전자가 발현되지 않았고, GGPS 유전자가 도입된 형질전환체 3개 line과 vector 도입된 mock line 모두 NPTII 유전자가 발현됨을 확인하였다.



<그림 27. GGPS 도입 러시아 민들레 RT-PCR>

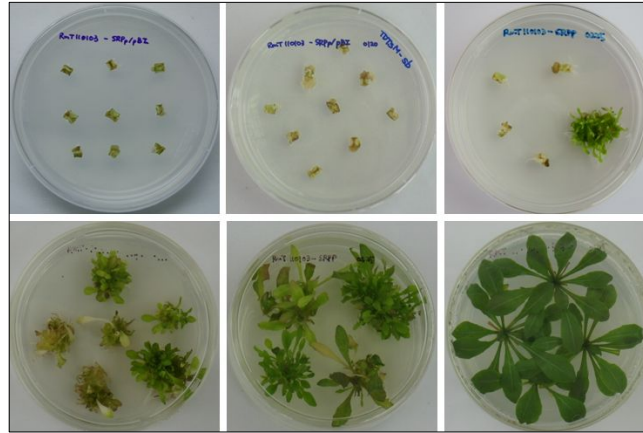
(4) RT-PCR 분석을 기반으로 GGPS 유전자 도입 러시아 민들레의 형질전환 효율은 0.9%로 나타났다. Line이 고정된 식물체들은 후대 분석과 종자수확을 위해 온실에서 재배하였다.



<그림 28. GGPS 도입 러시아 민들레 형질전환 효율>

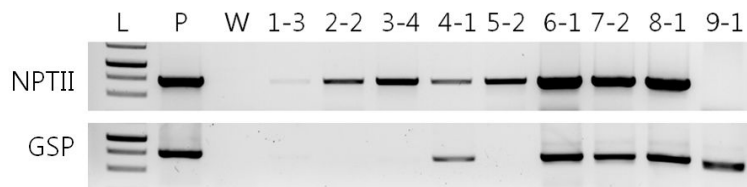
다. SRPPp:GUS 도입 러시아 민들레 형질전환체 생산

(1) 러시아 민들레에 SRPPp:GUS 유전자를 도입하여 항생제 첨가된 배지에서 절편체를 선발하였고, 유도된 싹초들은 분석을 위해 증식시켰다.



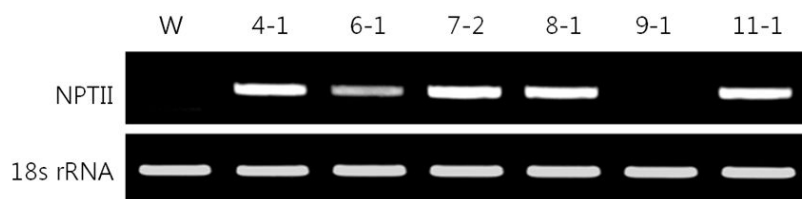
<그림 29. SRPPp:GUS 도입 러시아 민들레 형질전환 과정>

(2) 항생제가 첨가된 재생배지에서 선발된 싹초들을 대상으로 gDNA를 simple method 방법으로 추출하여 NPTII primer와 SRPPp primer (F: 5'-)를 이용하여 PCR 분석을 하였다. 유전자가 식물체 genomic DNA에 안정적으로 삽입된 형질전환체 6개 line을 선별 하였다.



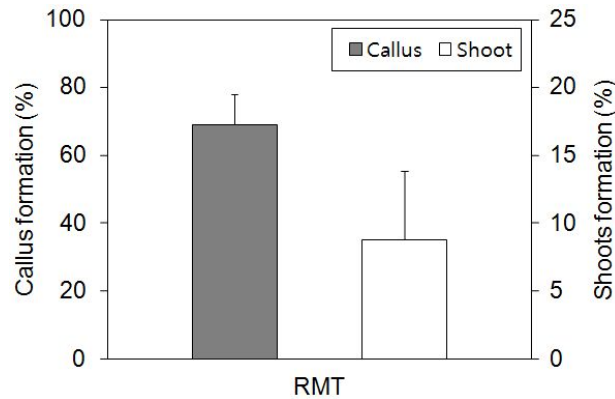
<그림 30. SRPPp:GUS 도입 러시아 민들레 PCR 분석>

(3) PCR 분석을 통하여 NPTII 유전자와 SRPPp 도입이 확인된 러시아 민들레 6개의 line 과 wild-type들은 RNA를 분리하였으며, NPTII primer를 이용하여 RT-PCR 하였다. SRPPp가 도입된 형질전환체 line #4-1, #6-1, #7-2, #8-1, #9-1와 #11-1의 PCR 분석을 통하여 유전자의 발현을 확인한 결과 wild-type 에서는 NPTII 유전자가 발현되지 않았고, SRPPp가 도입된 형질전환체 5개 line에서 NPTII 유전자가 강하게 발현됨을 확인하였다.



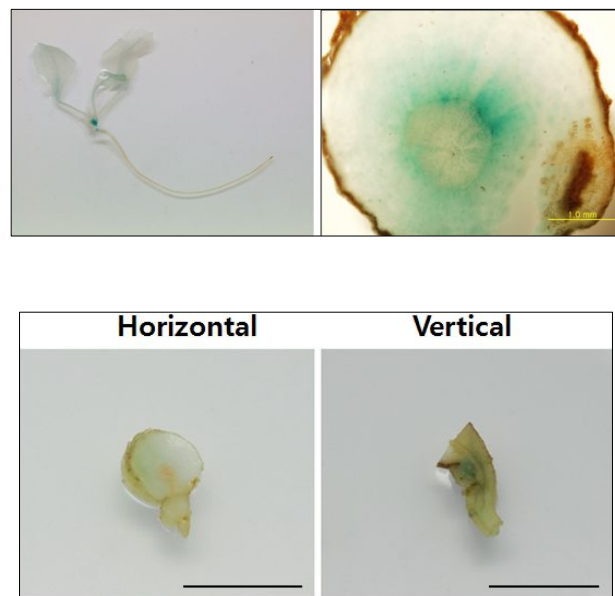
<그림 31. SRPPp:GUS 도입 러시아 민들레 RT-PCR 분석>

(4) RT-PCR 분석을 기반으로 SRPPp:GUS 유전자 도입 러시아 민들레의 형질전환에서 캘러스 형성 효율은 69.2%, 신초 재생효율은 8.8%로 나타났다. Line이 고정된 식물체들은 후대 분석과 종자수확을 위해 온실에서 재배하였다.



<그림 32. SRPPp:GUS 도입 러시아 민들레 형질전환 효율>

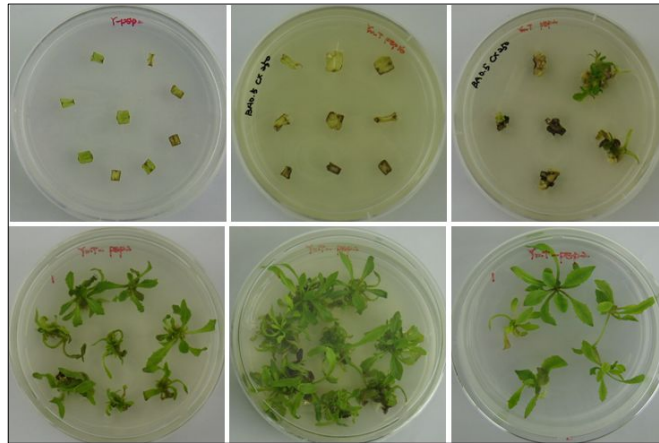
(5) SRPPp 도입된 형질전환체의 GUS 분석을 실시하였다. 계대배양 3주된 식물체와 온실에서 키운 8주된 식물체 뿌리의 GUS 분석결과 및, 뿌리에서 GUS 발현이 나타났으며, 뿌리의 횡, 종단면 모두 GUS 발현이 나타남을 확인하였다.



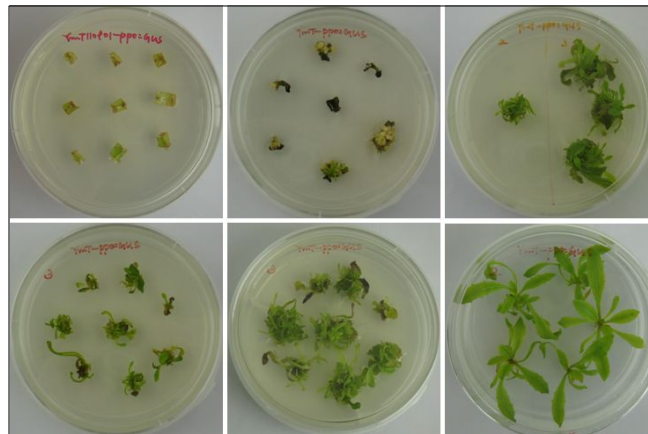
<그림 33. SRPPp:GUS 도입 러시아 민들레 GUS 분석>

라. PPOp:PEP16 & PPOp:GUS 도입 러시아 & 서양(노랑) 민들레 형질전환

(1) PPOp:Pep16는 러시아와 서양(노랑) 민들레에 PPOp:GUS는 서양(노랑) 민들레에 형질전환을 실시하였다. 항생제가 포함된 신초 재생배지에서 형질전환 절편체를 선발하였고, 선발된 절편체에서 신초를 유도하였다.

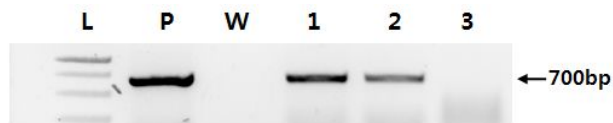


<그림 34. PPOp:PEP16 도입 서양(노랑) 민들레 형질전환 과정>

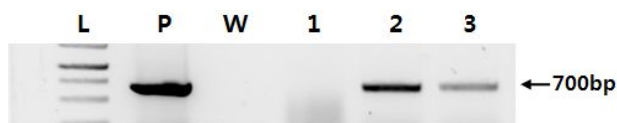


<그림 35. PPOp:GUS 도입 서양(노랑) 민들레 형질전환 과정>

(2) PCR 분석을 통하여 유전자가 식물체 genomic DNA에 안정적으로 삽입된 형질전환체 line을 선별하였다.

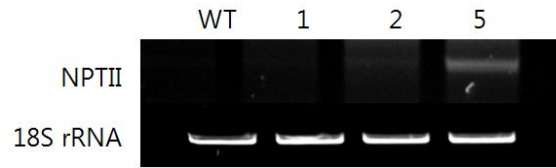


<그림 36. PPOp:PEP16 도입 서양(노랑) 민들레 PCR 분석>

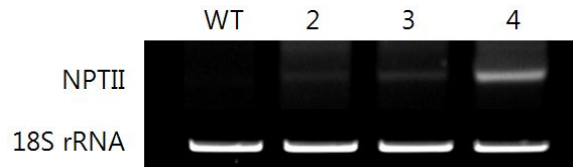


<그림 37. PPOp:GUS 도입 서양(노랑) 민들레 PCR 분석>

(3) PCR 분석을 통하여 선별된 line을 RT-PCR 분석을 통하여 유전자의 발현을 확인하였다.



<그림 38. PPOp:PEP16 도입 서양(노랑) 민들레 RT-PCR 분석>



<그림 39. PPOp:GUS 도입 서양(노랑) 민들레 RT-PCR 분석>

3. 연구결과에 대한 고찰

가. 민들레 재생 및 형질전환 기반조건 확립

- (1) 서양(노랑) 민들레, 흰(토종)민들레, 러시아 민들레 절편체로부터의 효율적인 callus 유도 및 신초 재생을 위한 주요 요인인 절편체 부위, 성장조절제, 초기 배양환경의 최적 조건을 확립하였음.
- (2) 효율적인 형질전환 선발을 위한 항생제 종류 및 농도를 규명하였음.

나. 천연고무 생합성 관련 유전자 형질전환체 제조

- (1) 기 확립된 효율적인 형질전환 방법을 바탕으로 천연고무 생합성 관련 유전자 GFPS, GGPS, SRPPp과 PEP16 도입 형질전환체를 생산하였음.
- (2) 고 발현 형질전환체를 선별하고, 선정하여 계통을 확보하였음.

다. 연구결과의 기여

- 민들레 재분화 및 형질전환 시스템 확립은 서양(노랑) 민들레 뿐 아니라 자생(흰) 및 러시아 민들레의 형질전환체의 생산을 가능하게 하였음
- 효율적인 민들레 형질전환 확립은 다른 유용 유전자의 도입을 가능하게 고부가가치 민들레 형질전환체 개발 또는 2차 대사산물 및 의약품 대량 생산 기술 개발에 이용할 수 있음
- 또한 천연고무 생합성 관련 유전자를 민들레에 도입한 대체고무 작물을 개발하여 이를 고무생산량 증가에 기여할 수 있음

제 6 절 형질전환 민들레에서 천연고무 형질검정

기능성 유전자를 도입하여 질적 양적으로 목표하는 형질이 나타나는지를 천연고무를 추출하여 검정하였다.

EXPRESSION PATTERN IN TRANSGENIC G-FPS RUSSIAN DANDELION

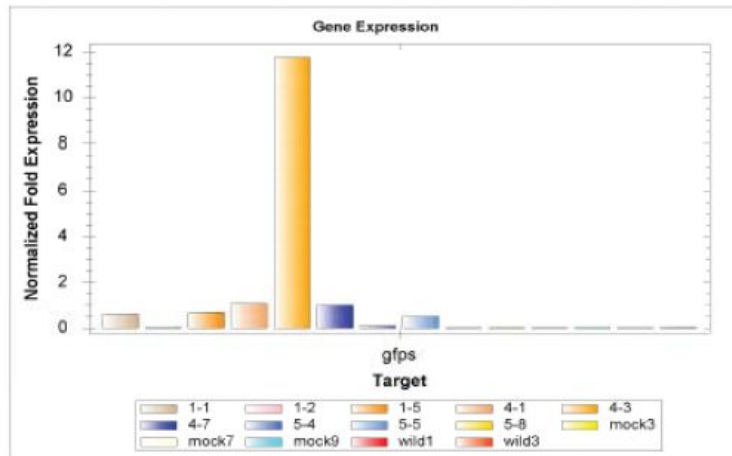


그림 40. 형질전환 러시아 민들레에서 도입 유전자 (G-FPS) 발현 정도

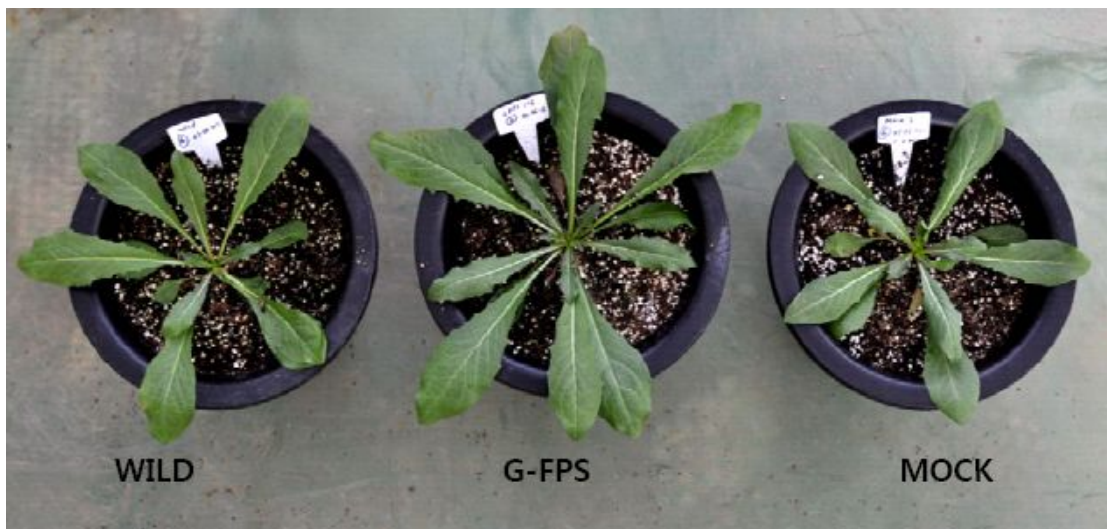


그림 41. 형질전환 러시아 민들레에서 성장촉진 현상



그림 42. G-FPS 형질전환 러시아 민들레에서 증가된 바이오매스

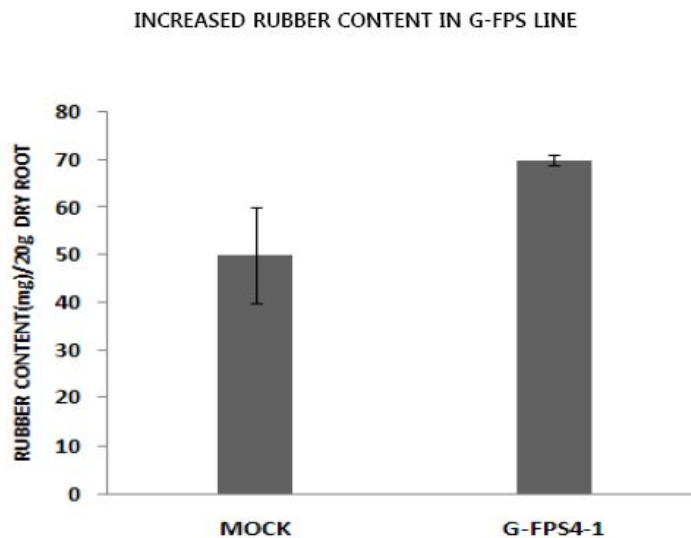


그림 43. G-FPS 형질전환 러시아 민들레에서 증가된 고무생산량

- G-FPS 형질전환 민들레 식물체를 온실에서 10개월간 재배하면서 GUS mock 형질전환체와 비교하여 성장속도 바이오매스 증가등을 조사하였다. 상기한 그림과 같이 성장 속도와 지상부 바이오매스가 대조구에 비하여 훨씬 증가하였다.

- G-FPS 형질전환체를 10개월 후 수확한 후 천연고무를 추출하여 대조구와 그 함량을 조사하였다. 그림에 보인 것처럼 다양한 변이 중에 약 20%의 고무함량이 증가된 line를 확보할 수가 있었다. 다음 세대에 까지 고무함량의 증가가 유지되는지 검정할 계획이다.

- G-FPS 형질전환체 이외에도 GGPS 및 Pep16 형질전환체 러시아 민들레가 제조되었으며 현재 온실에서 재배 중에 있다. 10개월 후에 수확하여 천연고무 함량의 조사를 계속 진행할 계획이다.

제 7 절 Latex 조직 특이적 발현 프로모터 발굴

천연고무가 생성되는 latex조직에 특이적으로 발현하는 유전자의 promoter를 분리하여 특허 출원을 하였고 및 조직특이적 유전자도입에 활용하고자 한다.

1. Latex-specific 발현 유전자 발굴 (SRPP)

-Latex에서 고무가 생성되기 때문에 Latex에 새로운 유전자의 발현을 유도하는 것이 매우 중요한 기술이다. Latex-specific 발현 promoter 발굴이 본 연구과제의 핵심부분이 되는 이유가 여기에 있다. Latex에 abundantly expressing하는 SRPP가 과연 latex에 특이적으로 발현하는지를 먼저 조직내 immuno-blot assay를 실시하였다.

-Assay 결과 SRPP 유전자가 Latex 조직에 특이적으로 발현하는 것을 알고 SRPP promoter region을 Genome walking 기법으로 cloning하였다.

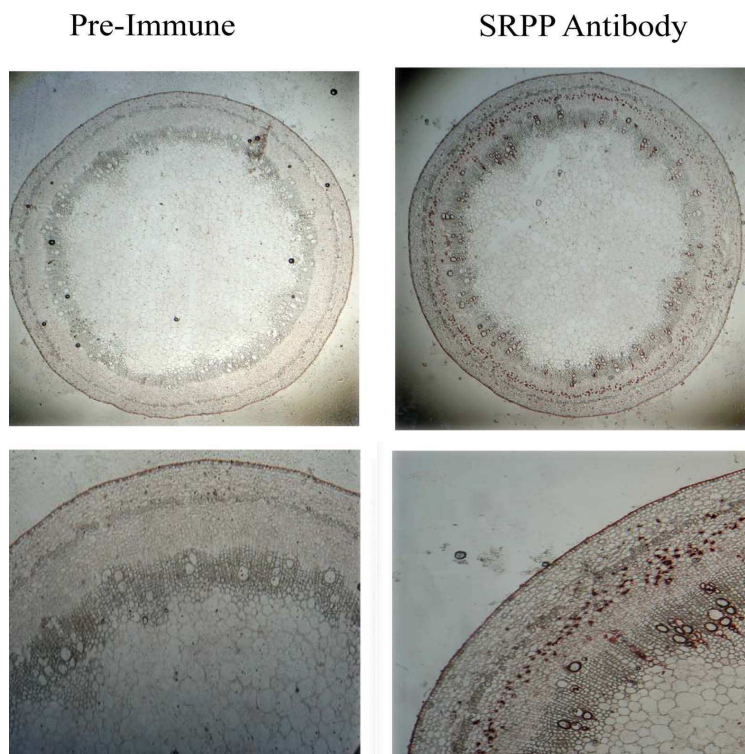


그림 44. Laticiferous tissue-specific expression of SRPP.

2. SRPP 유전자의 Promoter sequence 분리

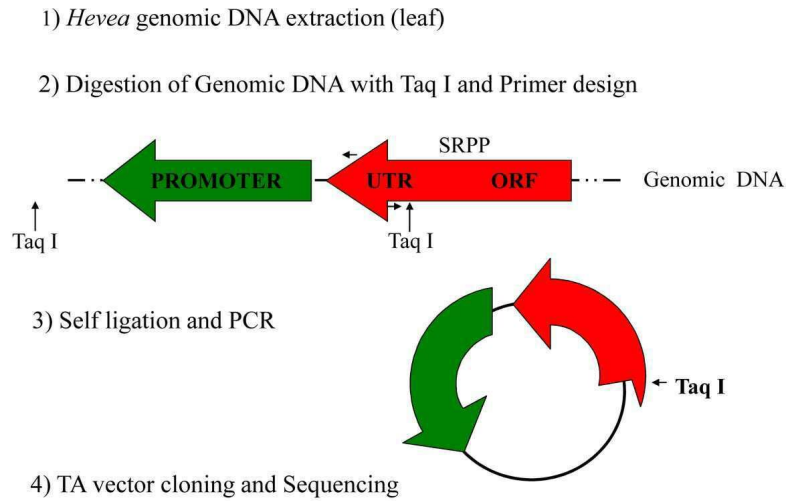


그림 45. promoter 분리과정의 도식화.

- *Hevea*의 latex 조직 특이적으로 발현하는 SRPP 유전자의 promoter region을 cloning하여 Promoter-GUS vector에 넣어 러시안 민들레에 형질전환한 다음 민들레 Latex 조직에서도 조직 특이적으로 발현하는 프로모터인지를 확인하고 있다.
- 상기한 결과는 PCT특허를 2011년에 출원하였으며 SCI 저널 (*Industrial Crops and Products*)에 Accepted 되었다. (PCT 출원번호: PCT/KR2011/007492)

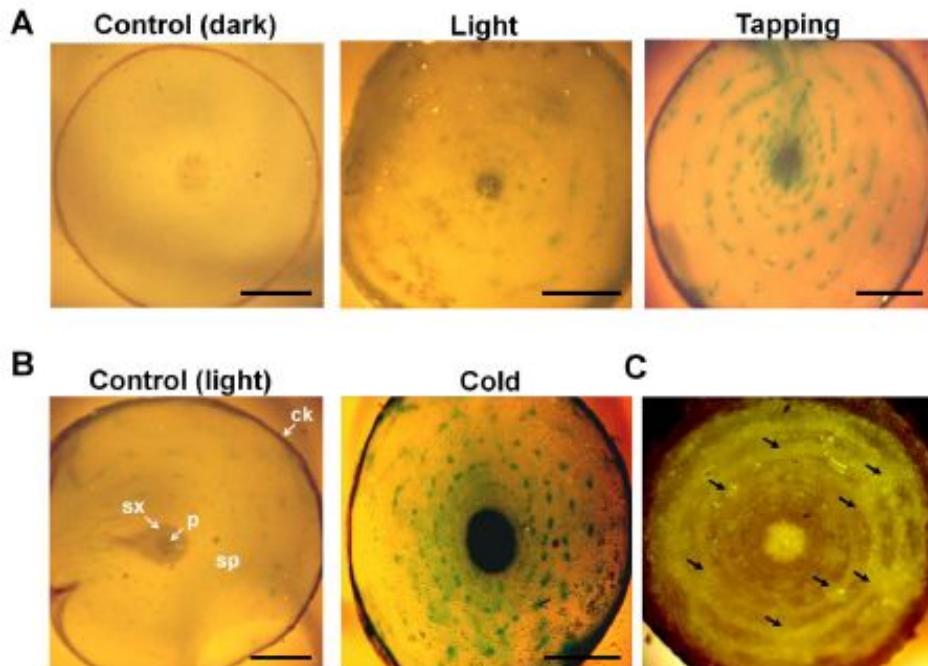


그림 46. SRPPpromoter::GUS 형질전환체 지하부에서 Latex 특이적 GUS 발현과 환경영향

제 8 절 천연고무 생산증대를 위한 바이오매스증가 촉진연구

국내 재배와 조건불리 지역에서의 재배를 가능하게 하기 위하여 복합내성 및 생육을 촉진하는 기능을 가진 유전자를 규명하고 특허출원과 함께 민들레 형질개선에 활용하고자 하였다.

지상부 바이오매스 증가를 유도하는 기능성 유전자 발굴 한국특허출원 (2011년 10월)
(PCT 출원번호 PCT/KR2011/007351)

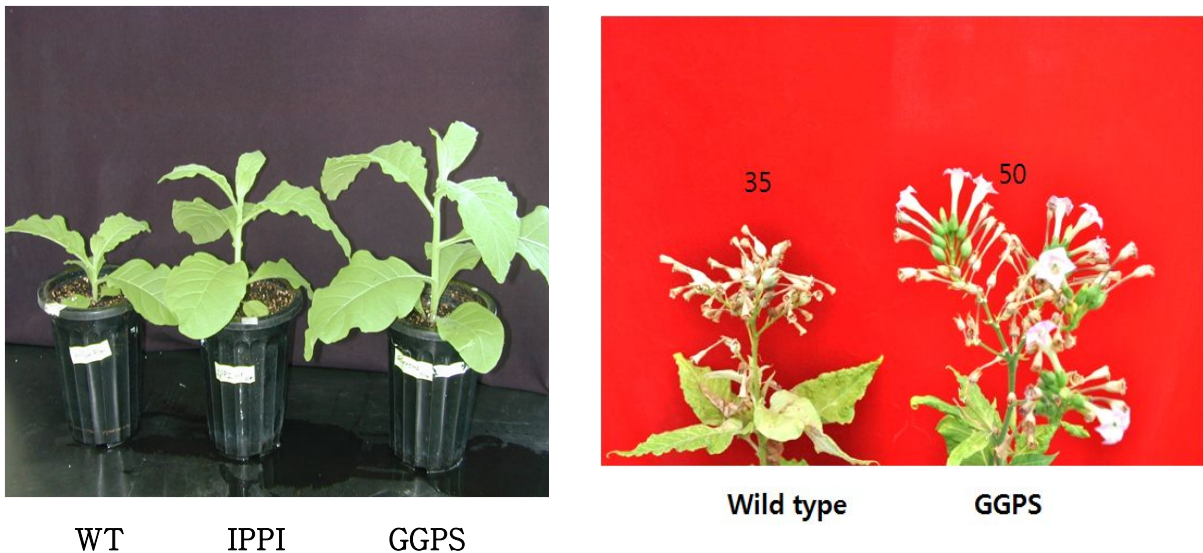
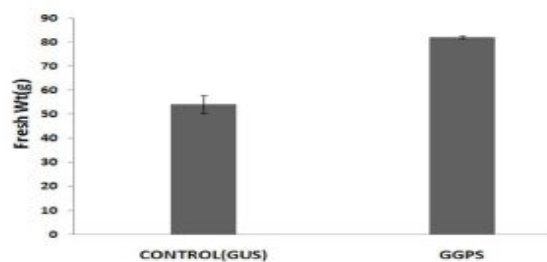
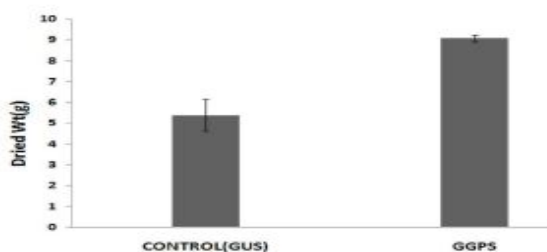


그림 47. GGPS 유전자 형질전환체에서 Biomass 증가가 빨라지고 꽃수가 증가되는 현상

【도 3】



【도 4】



48. GGPS 유전자 형질전환체에서 Biomass 증가

제 9 절 민들레 재배농가와 연계연구

발굴한 민들레 품종을 실제 농가 소득작물로 개발하기 위하여 민들레 대량재배 단지 농업인과 연계하여 연구를 수행함으로써 현장 실용화를 모색하였다.



그림 49. 전남 장성에 있는 민들레 재배농가와 계약재배 현장

상기한 그림은 전남 장성에 있는 민들레 재배농가와 협력하여 러시아민들레를 계약재배하고 수확하는 사진이다. 계절별로 정기적으로 방문하여 관리하며 일정량을 채취하여 가져와서 뿌리의 바이오매스와 천연 고무 함량을 측정하였다. 한국 자생 민들레인 노랑민들레도 함께 채취하여 천연고무 함량을 비교하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제의 성공적인 수행은 현재 천연고무 국내 수입량 연간 1.2조억원 (08년)에 대한 일부의 수입대체 효과를 가져 올 것으로 기대된다. 뿐만아니라 천연고무 생산 민들레를 국내 재배생산을 함으로서 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이다. 고갈되어 가고 있는 석유자원을 보존함과 동시에 이에서 만드는 합성고무를 줄임으로서 전 세계적으로 주안점을 두고 있는 이산화탄소 배출 억제효과를 가져와 저탄소 녹색성장을 이룩할 수 있을 것이다.

1. 석유자원에서 만드는 합성고무를 줄임으로서 저탄소 녹색성장(친환경)을 이룩할 수 있다.
2. 현재 천연고무 국내 수입량이 연 1.2조억원(08년)인데 이에 대한 수입대체 효과가 있다.
3. 이미 축적된 국내 기술력과 특허권을 잘 활용함으로서 미국과 유럽을 추월할 수 있다.
4. 천연고무 대체작물 개발에 선두우위를 점함으로서 기술과 특허실시권을 수출할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과 활용실적 및 계획

연구성과물 GM러시안민들레를 국내 고무회사인 동일고무벨트(주)에서 인수하기로 하였으며 이를 위하여 양 기관간 MOU를 체결하였다. 이를 위하여 형질전환체에서 합성한 천연고무의 품질평가 및 재배관련 연구결과를 얻기 위하여 지속적인 연구를 수행할 것이다.

“자세한 내용은 별첨 [연구결과 활용계획서]를 참조”

제 2 절 활용방안

1. 유용성이 매우 높은 천연고무 유전자들에 대한 특허권을 확보하였으므로 이러한 유전자들을 품종개발에 활용할 계획이다.
2. 천연고무를 민들레에서 생산하여 수입의존도를 줄이고 현 천연고무 작물 *Hevea*의 allergy 유발 결점을 보완하는 고부가가치 무-알레르기 천연고무의 생산에 활용할 계획이다.
3. 민들레 천연고무의 특성분석을 통하여 확립된 기초정보 및 기반기술이 민들레에서 생산한 천연고무의 실용화 공정기술 개발에 초석으로 활용될 것이다.
4. 향후 GM민들레의 품종화를 위하여 한국생명공학연구원 내에 설치되어 있는 바이오평가센터와 협력하여 야외재배인증을 위한 LMO 안전성평가를 수행할 것이다.

제 3 절 기대성과

1. 기술적 측면
 - 가. 국내 기술력과 경험을 축적함으로써 미국과 유럽에 기술동등 또는 우위를 이룩할 수 있는 발판을 마련하게 되었다.
 - 나. 천연고무 대체작물 개발에 선두우위를 점하여 기술과 특허 실시권을 수출할 예정이다.
2. 경제·산업적 측면
 - 가. 민들레의 국내 재배생산을 통하여 농가 소득증대에 기여할 것으로 기대된다.
 - 나. 천연고무 국내 수입량 연 1.2조억원에 대한 일부 수입대체 효과를 가져 올 것으로 기대된다.
 - 다. 합성고무 원료인 석유자원의 소비를 줄임으로서 친환경 저탄소 녹색성장을 이룩할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

□ 대부분의 천연고무가 얻어지는 동남아시아의 고무나무들은 균에 감염되어 사용이 어려워지고 있어 독일, 러시아, 미국 등은 고무나무 대신 러시아 민들레와 같은 다른 자원으로부터의 고무를 생산하는 연구를 진행하고 있다.

□ 농작물에 함유되고 있는 탄수화물의 에너지 자원화는 세계 각지에서 행해지고 있다. 향후 10년 동안 미국이 현재 서남아시아와 베네수엘라에서 수입하는 원유량을 10% 이상 감축하고, 2012년까지 재생 가능 에너지로 전력의 10%, 2025년까지 25%를 생산한다는 비전도 제시했다. 이를 위해 10년간 1500억 달러(약 222조)를 에너지 효율과 재생 가능 에너지에 투자한다고 하였다.

□ 브리지스톤 코퍼레이션은 고품질의 천연고무를 생산하는 상업적으로 이용 가능한 재생 자원이자 파라 고무나무를 대체하는 자원으로 과울레(Guayule)을 개발하기 위한 광범위한 연구 프로젝트에 대한 계획을 발표하였다.

□ 듀폰사는 미생물 발효를 통해 고분자 물질을 직접 생산할 수 있는 미생물 안에 에너지원으로 축적되는 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)라는 폴리에스터가 플라스틱에서 고무에 이르는 여러 성질을 가진 고분자를 생산하는 연구를 수행하여 상업용 생산을 추진하고 있다.

□ 영국은 앞으로 10년간 8조원을 대체 에너지 개발에 투입하겠다고 밝혔으며, 버클리대에 5천억원을 지원하여 바이오에너지연구소를 설립했다.

제 7 장 참고문헌

Bae T.W, Park H.R., Kwak Y.S., Lee H.Y. and Ryu S.B. (2005) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 80:51-57

Bernardo M. T. da Costa, Jay D. Keasling, and Katrina Cornish (2005) Regulation of Rubber Biosynthetic Rate and Molecular Weight in *Hevea brasiliensis* by Metal Cofactor. Biomacromolecules 6: 279-289

van beilen J.B and Poirier Y. (2007) Establishment of new crops for the production of natural rubber. Trends Biotechnol. 25(11):522-529

Hayashi Y. (2009) Production of natural rubber from para rubber tree. Plant Biotechnol. 26:67-70

Sando T, Hayashi T, Takeda T, Akiyama Y, Nakazawa Y, Fukusaki E, Kobayashi A. 2009. Histochemical study of detailed laticifer structure and rubber biosynthesis-related protein localization in *Hevea brasiliensis* using spectral confocal laser scanning microscopy. Planta 230:215-225

Wahler, D., Gronover, C.S., Richter, C., Foucu, F., Twyman, R.M., Moerschbacher, B.M., Fischer, R., Muth, J., Pruber, D., 2009. Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. Plant physiol. 151:334-346.

주 의

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