최 종
연구보고서

생명공학 기법을 이용하여 Phytoestrogenic Isoflavone을 생산하는 신품종 벼의 개발

Development of new rice, *Oryza sativa*, producing phytoestrogenic isoflavone using biotechnology

연 구 기 관

서울대학교 농업생명과학대학

건국대학교 생명환경과학대학

농 림 부

최 종
연구보고서

생명공학 기법을 이용하여 Phytoestrogenic Isoflavone을 생산하는 신품종 벼의 개발

Development of new rice, *Oryza sativa*, producing phytoestrogenic isoflavone using biotechnology

연 구 기 관

서울대학교 농업생명과학대학

건국대학교 생명환경과학대학

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**생명공학 기법을 이용하여 Phytoestrogenic Isoflavone을 생산하는 신품종 벼의 개발**” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 13일

주관연구기관명: 서울대학교
총괄연구책임자: 김 수 일
세부연구책임자: 김 수 일
연 구 원: 김 송 영
연 구 원: 윤 영 대
연 구 원: 류 현 우
연 구 원: 김 청 세
연 구 원: 정 우 석
협동연구기관명: 건국대학교
협동연구책임자: 안 중 훈
연 구 원: 김 봉 규
연 구 원: 김 대 환

요 약 문

Ⅰ. 제 목

생명공학 기법을 이용하여 Phytoestrogenic Isoflavone을 생산하는 신품종 벼의 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

벼는 현재 주요 식량 작물로서 전 세계에 걸쳐서 재배되고 있다. 벼는 탄수화물을 주로 함유하고 있어서 필수 영양인자들이 부족하다. 따라서, 벼의 영양학적 측면을 늘리기 위한 연구들이 많이 진행되고 있다. 여러 가지 필요한 영양분 주에 콩에서 발견되는 isoflavone인 daidzein과 genistein은 phytoestrogen으로 알려져 있다. 성인 여성에게 soy isoflavone (daidzein 과 genistein)을 2.0mg/kg (체중) 수준에서 투여하고 6.5 시간 뒤 혈장 농도를 측정한 결과 총 isoflavone 함량이 4.4 ± 2.5 μM까지 증가함이 관측되었다. 이는 다시, 체중 50 kg 여성이 콩을 약 50g 섭취하였을 경우 혈장에서 이 정도의 총 isoflavone 농도를 유지하는 것이 된다. In vitro 연구에서 1-10 nM의 genistein으로써 에스트로젠 수용체의 전사능이 유도된다고 밝혀져 있으며 그것으로 인한 여러 생리 활성이 기대된다고 보고되어져 있다. 그러므로 isoflavone을 함유한 음식물의 일상적 섭취활동으로도 생리활성에 필요한 농도의 isoflavone을 유지할 수 있고, 특히 폐경기 여성에게서 나타나는 호르몬과 관련한 여러 병리현상을 예방할 수 있을 것으로 추정해 볼 수 있다. 이와 같은 유추로, IFS로 형질 전환된 벼가 이 정도의 isoflavone을 쌀에 함유한다면 한국인들은 그 주식을 통하여 여성들의 질병을 효과적으로 예방할 수 있을 것이다.

Flavanone에서 isoflavone으로의 전환은 하나의 유전자에 의해 조절되는 것으

로 알려져 있으며 그 유전자에 의하여 발현되는 단백질을 isoflavone synthase (IFS)라 한다. 이 IFS는 지금까지 두과 식물에서만 발견되며 여러 생리활성이 있는 것으로 사료되는 geinistein과 daidzein 등과 같은 isoflavone들을 그에 상응하는 flavone들인 3′,5,7-trihydroxyflavanone (naringenin), 3′,7-dihydroxyflavanone으로부터 만드는데 관계한다. 하지만, 두과 식물을 제외한 식물에서는 isoflavone들이 발견되지 않고 있으며 그 이유는 이 유전자가 존재하지 않기 때문이다.

따라서, 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자를 클로닝하여 이를 다른 식량작물, 특히, 벼에 도입한다면 기존에 있는 벼들이 만들지 못하는 새로운 물질인 isoflavone을 만들어 낼 수 있을 것이다. 이는 기존의 육종 방법으로는 할 수 없는 다른 종의 유전자를 벼에 옮기는 것을 의미한다.

두과작물의 토양근권에서 일어나는 식물 뿌리와 질소고정균간의 상호작용은 먼저 뿌리에서 분비되는 화학물질들의 구조적 특성에 의하여 공생관계의 전 과정이 결정된다. 즉, 두과 작물에만 분비되는 isoflavone, daidzein과 genistein등은 기주 식물로의 질소 고정균의 유도(chemotaxis), 형질전환, 경쟁성 제고, Nod factor 등을 유도하는데 관여한다. 즉, isoflavone은 질소고정균을 유도하는 매개체로써 질소고정균을 끌어들여 두과작물의 생육에 도움을 주는 것이다. 따라서, 기존에 이와 같이 활성물질이 분비되지 않는 벼에 isoflavone 합성 유전자를 도입할 경우, 분비되는 isoflavone들에 의하여 근권 미생물과 벼 뿌리간에 새로운 생리 생화학적 반응을 통하여 벼의 생육뿐만 아니라, 토양의 지력을 향상시킬 것으로 사료된다.

또한, 벼를 비롯한 대두 등에서 발견되는 병원체 저항성 phytoalexin들 중 (iso)flavone 계통 화합물들에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 따라서, isoflavone 합성 유전자의 확보 및 이의 성질 규명은 이들 phytoalexin 합성 경로의 연구에도 이용될 수 있어 병원체 저항성 품종 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 벼에서 isoflavone을 만들어 내기위해서 두과작물에서 isoflavone synthase를 분리하여 그의 성질을 규명하고 이를 벼 형질 전환 벡터에 옮겨서 벼 형질전환을 실시하여 벼에서 isoflavone을 생성하는 것을 최종 목

표로 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 대두에서 isoflavone 합성 유전자를 분리하여 이를 벼에 도입함으로써 생리활성 물질을 생산하는 새로운 품종을 만들어 내고 이를 이용하여 벼의 근권 미생물 상을 개선하여 이들의 생육을 증진시키는데 있다.

첫째, 두과 작물에서 isoflavone 합성 효소 유전자를 분리하였고 그 유전자의 성질을 규명하였으며 벼의 형질전환을 위한 기초 연구를 수행하였다. 세부사항으로는 대두의 각 부분에서 성장시기별 isoflavone량의 조사, 두과작물에서 RT-PCR방법을 이용한 isoflavone 합성 유전자의 클로닝, 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 및 성질 규명, 대두의 각 부분에서 isoflavone 합성 효소 유전자의 발현 조사, Isoflavone 합성 효소의 미생물에서 발현을 위한 벡터 제작, 클로닝된 유전자의 미생물에서의 발현 및 발현된 isoflavone 단백질의 기질 및 생성물 확인, IFS 발현을 위한 벼의 형질전환 벡터 제작, 벼의 형질전환 준비 등을 수행하였다. 두 번째, isoflavone 합성 효소 유전자를 이용한 벼의 형질전환 실험을 수행하였다. 세부 내용으로는 isoflavone 합성 효소 유전자의 벼 도입을 위한 벡터 제작, 제작한 벡터를 이용한 벼 형질 전환, 벼형질전환체의 선발 및 isoflavone 합성 유전자의 발현 검증, 등을 수행하였다. 세 번째로, 벼 형질전환체에서 isoflavone 합성의 검증을 수행하였다. 세부 내용으로는 벼 형질전환체의 종실 부위에서 isoflavone을 추출하여 추출된 isoflavone의 함량을 조사하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과.

가. 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자의 분리 및 성질 규명.

1) IFS-Pd로 명명된 유전자는 1,593 bp의 open reading frame (531 amino acids)을 가지고 있었으며, 58.8 kDa 분자량과 9.17의 pI (isoelectric point)를 갖는 것으로 추측되었다. SignalLP program으로 예측한 결과 signal peptide cleavage site는 24와 25사이의 amino acid (Nielson et al., 1997)로 예상되었으며, blast analysis에서 다른 몇몇 식물의 isoflavone synthase와 높은 homology를 보였다.

2) IFS-Tp로 명명된 유전자는 1,575 bp의 open reading frame (525 amino acids)를 가지고 있었으며, 59.1 kDa 분자량과 8.95의 pI를 갖는 것으로 추측되었다. 다른 IFS 유전자들과도 상당히 높은 수준의 상동성을 보였다.

3) 상기 IFS 유전자를 yeast에서 발현하여 isoflavone의 생성을 확인하였다. 확인된 결과, naringenin으로부터 genistein을 합성하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 유전자를 이용할 경우, flavone 류를 기질로 이용하여 isoflavone으로 전환이 가능한 형질전환된 벼를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

4) Isoflaovne의 효소적 특성을 알아 보기위해 isoflavone synthase를 효모에서 발현하여 여러 기질을 대상으로 생성물을 만드는지 여부를 측정하였다. 그 결과 7-hydroxyflavanone, 5,7-dihydroxyflavanone, 7,4′-dihydroxyflavanone (liquiritigenin), and 5, 7, 4′-trihyrdoxyflavanone(naringenine)를 상응하는 isoflavones으로 전환함을 확인 할 수 있었다.

4) 상기 결과는 *Mol. Cells* 2003 15: 301-306에 개제되었다 (Bong Gyu Kim, Song-Young Kim, Hee Su Song, Chan Lee, Hor-Gil Hur, Su-Il Kim and Joong-Hoon Ahn. Cloning and Expression of the Isoflavone Synthase Gene (IFS-Tp) from Trifolium pratense).

나. 벼의 형질 전환 및 형질전환체의 분석.

1) 벼에서 isoflavone synthase 유전자를 발현하기 위해서 벼 형질 전환 벡터 3종류를 만들었다. 첫 번째 종류는 isoflavone synthase유전자를 maize ubiquitin promoter에 연결하여 모든 조직에서 isoflaovne synthase유전자가 발현하게 하였다. 나머지 두 종류는 glutein promoter를 사용하였는데 이는 종자에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 유전자의 promoter들이다.

2) pMJU-JA6의 형질전환체를 8개를 얻었다. 이를 이용하여 각각의 형질전환체로부터 IFS 유전자가 삽입되었는지 확인한 결과, 8종 중 7종에서 IFS 유전자가 삽입된 것을 확인 할 수 있었으며, 이들 7종을 이용하여 northern blot을 수행한 결과, 모두 IFS가 발현되고 있음을 확인 할 수 있었다. 하지만, 2003년 여름 기상이변으로 말미암은 일조량 부족과 갑작스러운 냉해로 말미암아 병의 생장에 치명적인 악영향으로 벼의 생장이 충분히 이루어지지 않았으며, 또한 종실이 형성되지 않는 쭉정이 상태를 얻었다. 따라서, pMJU-JA6의 형질전환체의 분석을 실시 할 수 없었다. 결과적으로, 새로운 형질전환을 시도해야 했으며, 재 형질전환으로 말이암아, 새로운 형질전환체 15종을 얻어서 이를 PCR을 이용하여 분석하여 본 결과 15종중 4종에서 IFS 유전자를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 상기 4종의 형질전환체를 이용하여 southern blot을 수행한 결과 모두 같은 계통일 것으로 예상되었다. 하지만, 새로운 형질전환체도 종실이 형성되지 않았다.

3) 종자 특이적 프로모터를 이용한 형질전환체도 얻었다. 종자특이적 프로모터 전체 유전자가 삽입되어 있는 형질전환체 (IF) 16종, 부분 유전자가 삽입되어 있는 형질전환체 (IP) 16종, 총 32 종의 형질전환체를 얻었다. PCR을 이용하여 상기 형질전환체의 IFS 유전자 삽입여부를 확인하여 본 결과 모두 IFS 유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 상기 형질전환체를 이용하여 southern blot을 수행한 결과 IF의 경우는 16개의 형질전환체 중 9종에 대하여 IFS 유전자가 삽입

되었음을 확인 할 수 있었고 이 9 종중 단 두 종만이 계통이 다를 것으로 예상되었다. IP의 경우는 16종중 11종이 확인되었으며, 이 중 단 2종만이 다른 계통일 것으로 예상되었다.

4) 종실특이적 프로모터를 포함하고 있는 형질전환체로부터 생성된 종실을 이용하여종실에 isoflavone 류가 생합성 되었는지 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석한 결과, 종실특이적 프로모터 전체가 포함된 형질전환체 (IF)의 종실의 경우는 flavone인 naringenin으로부터 7.2 ㎍/g seed의 isoflavone인 genistein이 생합성된 것을 확인 할 수 있었고, 종실특이적 프로모터 일부가 포함된 형질전환체 (IP) 종실의 경우 6.3㎍/g seed의 isoflavone인 genistein이 생합성된 것을 확인할 수 있었다.

5) 형질전환체의 근권미생물상의 변화에 대하여 조사하여 본 결과 첫 번째로 박테리아류의 경우는 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 박테리아만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 $6\pm3\times10^6$ cfu (colony forming unit)/g wet soil의 박테리아 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $10\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $8.5\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $7\pm3\times10^6$ cfu/g wet soil 의 박테리아 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 박테리아의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 두 번째로 곰팡이류에 대하여 실험한 결과, 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 곰팡이류만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 1×10^5 cfu/g wet soil의 곰팡이류 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 4×10^5 cfu/g wet soil, IF에서는 3×10^5 cfu/g wet soil, IP에서는 6×10^5 cfu/g wet soil 의 곰팡이류 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 곰팡이류의 양이 약

간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 마지막으로, 진균류(actinomycetes)에 대하여 조사하여 본 결과, 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 actinomycetes만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 1×10^6 cfu/g wet soil의 actinomycetes 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 1×10^6 cfu/g wet soil, IF에서는 2×10^6 cfu/g wet soil, IP에서는 2×10^6 cfu/g wet soil 의 actinomycetes 수를 확인 할 수 있었다. 대조구보다 형질전환된 벼에서 약간 증가된 진균류를 확인 할 수 있었다.

6) 형질전환체가 질소고정균에 미치는 영향에 대하여도 살펴보았다. 벼에 IFS 유전자가 삽입되어 발현이 되어 isoflavone 류를 생성하게 되면 질소고정균 상의 변화도 나타날 수 있다. 따라서, 이를 확인하기 위하여 근권내의 질소고정균류의 차이를 살펴본 결과, 대조구에서는 $3\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $18\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $16\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $8\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균을 확일 할 수 있었다. pMJU 백터를 이용한 경우가 질소고정균의 개체수가 가장 많은 것으로 나타났다. 이는 pMJU의 프로모터가 모든 조직에서 발현 될 수 있는 특성을 지닌 것이기 때문에 IFS가 모든 조직에서 발현이 되어 특히 뿌리 조직에서도 발현이 되어 질소고정균류가 근권내에 좀 더 많은 양으로 존재하게 한 것으로 판단된다. 반면에, IF의 경우는 pMJU를 사용하였을 때보다 적은 콜로니가 형성되었으나, IP에 비하여 많은 양이 있는 것으로 확인되었다.

SUMMARY

Title: Development of new rice, *Oryza sativa*, producing phytoestrogenic isoflavone using biotechnology.

1. Cloning of Isoflavone synthase.

PCR strategy was used to clone IFS gene from *Glycine max*, Paldal and *Trifolium pratense*. All the IFS genes in the database were analyzed and the conserved amino acid regions among IFS genes from different sources were found. Based on these genes, two set of primers were designed. RT-PCR was performed with total RNA from 10-days old seedling of *Glycine max*, Paldal and *T. pratense*. About 1.1 kb product was obtained. These clones were subcloned and sequenced. The sequencing results showed the high homology with several *IFS*. To clone the full length cDNA, 3′- and 5′-RACE were performed. The size of the 3′-RACE product was about 550 bp and it contained the translation stop codon. Also, 5′-RACE gave the 450 bp product, which contained the translation initiation codon. The *IFS* full length cDNA from *Glycine max*, Paldal, which named *IFS-Pd,* and *T. pratense*, which was named *IFS-Tp.* The IFS-Pd was consisted of 1,593 bp of open reading frame (531 amino acids; 58.8 kDa; pI = 9.17). The genomic clone of *IFS-Tp* was amplified, subcloned and sequenced. *IFS-Tp* consists of 1,575 bp open reading frame (525 amino acids) whose the predicted molecular weight is 59.1 kDa and pI is 8.95. The genomic and cDNA sequences were entirely collinear with the exception of a 140-bp intron occurring at nucleotides 976 and 1115. Blast analysis showed high homology with several isoflavone synthases from other plants such as *Metidicago truncatula*, *Glycyrrhiza echinata* and *Cicer arietinum*. The identity at the amino acid

level ranges from 75 to 80 %, and the similarity ranges from 92 to 97 %. The high level (95 99%) of similarity among the cloned isoflavone synthases from soybean, white clover, alfalfa and mung bean were also observed. The phylogenic analysis of isoflavone synthase from various plants showed that the isoflavone synthase from red clover is close to that from *Medicago truncatula*.

To know the copy number of *IFS-Tp*, genomic DNA was digested with *EcoR*I and *Hind*III, respectively. The blot was hybridized with a part of *IFS-Tp* cDNA. A single band was observed. It indicated that gene that encodes protein IFS, might be a single copy.

2. Expression of *IFS-Pd* and *IFS-Tp* in the different tissues and stimuli.

Expression of *IFS-Pd* in different tissues was investigated. Total RNA from seed, leave, stem, root, nodule, and flower was isolated separately and RT-PCR was performed. *IFS* was expressed in all tissues but a lot in seed, root, and nodule.

Expression of *IFS* in different tissues was investigated. Total RNA from leave, stem, and root was isolated separately and RT-PCR was performed. *IFS* was expressed at the almost same level in all tissues investigated

The IFS expression upon glutathione treatment was investigated. IFS expression was enhanced by glutathione until 6-hr after treatment. UV treatment also enhances the biosynthesis of flavone since flavonoids generally absorb in the 280-315 nm region and thus are capable of serving as UV protectant. We also investigate the effect of UV on the expression of IFS. UV treatment increased IFS expression. After 6-hr UV-treatment, IFS was expressed at the highest level and its expression was decreased .

3. Expression of *IFS-Pd* and *IFS-Tp* in *S.cerevisiae* andsubstrate specificity.

To know the cloned function of *IFS-Pd* and *-Tp*, we expressed *IFS-Pd* and *-Tp* in *S. cerevisiae* and measured the isoflavone synthase activity with the yeast microsomes, respectively. The existence of IFSs genes in yeast cells transformed with IFSs cDNA was checked with PCR with the primers which soybean and redclover in open reading frames of IFS. Microsomes from a yeast transformant expressing IFSs were incubated with flavanone, naringenine and NADPH. The reaction product showed two peaks on the chiral column with retention time, 21 min and 27 min, respectively. Compared with authentic naringenine and genistein, the peak at 27 min, was corresponded to the genistein biologically produced from naringeine. In addition, UV spectra comparison showed that the compound at 27 min and authentic genistein have the same UV absorption pattern, showing a maximum absorption at 260 nm and a shoulder at 325 nm. Taken together, it indicated that new IFSs encode isoflavone synthase, resulting in catalyzing the formation of genistesin from flavanone naringenine.

The substrate specificity of the expressed protein IFSs, respectively, were tested on nine different flavones. The expressed enzyme could convert 7-hydroxyflavanone, 5,7-dihydroxyflavanone, 7,4′-dihydroxyflavanone (liquiritigenin), and 5, 7, 4′-trihyrdoxyflavanone (naringenine) into the corresponding isoflavones. However, no reaction products were detected in the reaction mixtures when flavone, 5,7-dihydroflavone, and flavanone, 4′-hydroxyflavanone, and 6-hydroxyflavanone were used as substrates.

4. Tansgenic rices expressing isoflavone synthase gene and its analysis.

In order to express IFS in rice, we constructed rice transfomation vectors. Three different promoters were used. The first one is the maize ubiquitin

promoter which is expressed in all the cells (pMJU). The second one is the glutein partial promoter and the third is the glutein full length promter, both of which are known to be expressed in seeds (pCAM-LA). Several fertile trangenic rice plants were produced by co-cultivating embryogenic calli with the Agrobacterium harboring the vectors. The presence of the isoflavone synthase was checked by PCR. Among eight transgenic plants transformed pMJU-JA6 (*IFS-Pd*) with ubiquitin promoter, seven had isoflavone synthase gene. Expression of IFS in the transgenic lines was confirmed by RT-PCR. RT-PCR result shows that *IFS-Pd* was expressed in all 7 transgenic rices. The southern blot analysis was shown that all 7 transgenic rices had a integrated IFS gene and same line. But, bad weather caused transgenic rice not to grow and have empty heads of grain. Therefore, new transformation was performed. new 15 transgenic rice was gained and PCR result showed that only 4 of all 15 have a IFS-Pd gene and southern blot analysis was shown that all 4 were the same line. But, all 4 transgenic rices had empty heads of grain, again. Therefore, 4 transgenic rices were not analyzed for isoflavones. Also, the 16 independent transgenic plants with either partial (IP) or full (IF) length glutein promoter (pCAM-LA-JA7 (*IFS-Tp*)) were investigated whether IFS gene was integrated. PCR result was shown that all 32 transgenic rices which have partial or full promoter have *IFS-Tp* gene. Southern blot analyses were shown that 9 of all 16 kinds of IF were integrated into the rice and 7 transgenic rices integrated IF were the same line but 2 were the others lines. In the case of IP, 11 of all 16 kinds of IP were integrated and 9 were the same line but 2 were the other line.

5. Detection of isoflavones using HPLC system.

The contents of isoflavones from 9 kinds of grain heads from transgenic rice harboring pCAM-LA-JA7-Fp named IF and 11 kinds harboring

pCAM-LA-JA7-PP named IP were analyzed. HPLC analysis was shown that IF biosynthezied isoflavone genistein as much as 7.2㎍/g seed using flavone, naringenin and IP was 6.3㎍/g seed.

6. Analysis of rhizosphere microbes near the transgenic rices.

The contents of bacteria, fungi, and actinomycetes in wet rhizosphere soil near each transgenic rice were investigated. The colony forming unit (cfu) of bacteria was a few increased but the increase amount was very low. The cfu of control was $6\pm3\times10^6$ cfu/g wet soil, pMJU-JA6 was $10\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IF was $8.5\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, and IP was $7\pm3\times10^6$ cfu/g wet soil. The cfu of fungi was few increased and the cfu of control was 1×10^5 cfu/g wet soil, pMJU-JA6 was 4×10^5 cfu/g wet soil, IF was 3×10^5 cfu/g wet soil, and IP was 6×10^5 cfu/g wet soil. The cfu of actinomycetes was few increased and the cfu of control was 1×10^6 cfu/g wet soil, pMJU-JA6 was 1×10^6 cfu/g wet soil, IF was 2×10^6 cfu/g wet soil, and IP was 2×10^6 cfu/g wet soil.

7. Effect of transgenic rice on rhizobia.

The cfu of rhizobia was a few increased in the case of transgenic rice, especially pMJU-JA6. The cfu of control was $3\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil, pMJU-JA6 was $18\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IF was $16\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IP was $8\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil. Because the promoter of pMJU was expressed in all tissues, the cfu of rhizobia from transgenic rice harboring pMJU-JA6 was a lot increased compared with other transgenic rice transformed partial or full glutelin promoter.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 16
Section 1. Purpose and Range of the Research ····· 16
Section 2. Goal and Contents of the Research ····· 20
Literature cited ····· 22
Chapter 2. Cloning and Expression of IFS Genes ····· 25
Section 1. Introduction ····· 25
Section 2. Materials and Methods ····· 27
Section 3. Results and Discussion ····· 30
Section 4. Conclusion ····· 44
Section 5. Literature cited ····· 45
Chapter 3. Transgenic rice and Its Analysis ····· 48
Section 1. Introduction ····· 48
Section 2. Materials and Methods ····· 49
Section 3. Results and Discussion ····· 59
Section 4. Conclusion ····· 85
Section 5. Literature cited ····· 88
Chapter 4. General Conclusion ····· 91

목 차

제 1 장. 서 론 ····· 16
제 1 절. 연구개발의 목적과 범위 ····· 16
제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용 ····· 20
인용문헌 ····· 22
제 2 장. 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자의 분리 및 성질규명 ····· 25
제 1 절. 서 설 ····· 25
제 2 절. 재료 및 방법 ····· 27
제 3 절. 결과 및 고찰 ····· 30
제 4 절. 결 론 ····· 44
인용문헌 ····· 45
제 3 장. 벼의 형질전환 및 형질전환체 분석 ····· 48
제 1 절. 서 설 ····· 48
제 2 절. 재료 및 방법 ····· 49
제 3 절. 결과 및 고찰 ····· 59
제 4 절. 결 론 ····· 85
인용문헌 ····· 88
제 4 장. 종 합 결 론 ····· 91

제 1 장. 서 론

제 1 절. 연구개발의 목적과 범위.

1. 연구개발의 필요성.

가. 연구개발의 필요성.

1) 기술적 측면

식물은 1차 대사작용을 통하여 에너지원과 저장물 그리고 식물 구조물 등을 만들어 낸다. 그러나, 식물이 만드는 여러 생리활성 물질들은 이러한 1차 대사에 의하여 만들어지는 것이 아니라 2차 대사에 의해서 만들어진다. 모든 식물체에 존재하는 2차 대사의 대표적인 예가 flavone 합성경로이다. Flavone 합성경로는 isoflavone과 antocyanin 등의 합성에 관계하는 초기 단계로 식물체에 존재하는 많은 물질들이 이 경로를 통하여 합성된다. 또한, 2차 대사경로는 식물의 성장에 필수적인 1차 대사 경로와는 다르게 식물 의 성장에 필수적인 것이 아니어서 이들의 조절이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한, 이들을 조절하기 위해서는 유전학적, 생화학적, 분자생물학적 연구가 병행되어야 한다.

Flavanone에서 isoflavone으로의 전환은 하나의 유전자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며 그 유전자에 의하여 발현되는 단백질을 isoflavone synthase (IFS)라 한다. 이 IFS는 지금까지 두과 식물에서만 발견되며 여러 생리활성이 있는 것으로 사료되는 geinistein과 daidzein 등과 같은 isoflavone들을 그에 상응하는 flavone 3′,5,7-trihydroxyflavanone (naringenin), 3′,7-dihydroxyflavanone으로 부터 만드는데 관계한다. 하지만, 두과 식물을 제외한 식물에서는 isoflavone들이 발견되지 않고 있으며 그 이유는 이 유전자가 존재하지 않기 때문이다.

따라서, 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자를 클로닝하여 이를 다른 식량 작물, 특히, 벼에 도입한다면 기존에 있는 벼들이 만들지 못하는 새로운 물질인 isoflavone을 만들어 낼 수 있을 것이다. 이는 기존의 육종 방법으로는 할 수 없는 다른 종의 유전자를 벼에 옮기는 것을 의미한다.

콩은 100g 당 약 60-181mg의 phytoestrogen (daidzein과 genistein)을 함유하고 있다. 성인 여성에게 soy isoflavone (daidzein 과 genistein)을 2.0mg/kg (체중) 수준에서 투여하고 6.5 시간 뒤 혈장 농도를 측정한 결과 총 isoflavone 함량이 4.4 ± 2.5 μM까지 증가함이 관측되었다. 이는 다시, 체중 50 kg 여성이 콩을 약 50g 섭취하였을 경우 혈장에서 이 정도의 총 isoflavone 농도를 유지하는 것이 된다. In vitro 연구에서 1-10 nM의 genistein으로써 에스트로젠 수용체의 전사능이 유도된다고 밝혀져 있으며 그것으로 인한 여러 생리 활성이 기대된다고 보고 되어져 있다. 그러므로 isoflavone을 함유한 음식물의 일상적 섭취활동으로도 생리활성에 필요한 농도의 isoflavone을 유지할 수 있고, 특히 폐경기 여성에게서 나타나는 호르몬과 관련한 여러 병리현상을 예방할 수 있을것으로 추정해 볼 수 있다. 이와 같은 유추로, IFS로 형질 전환된 벼가 이 정도의 isoflavone을 쌀에 함유한다면 한국인들은 그 주식을 통하여 여성들의 질병을 효과적으로 예방할 수 있을 것이다.

두과작물의 토양근권에서 일어나는 식물 뿌리와 질소고정균간의 상호작용은 먼저 뿌리에서 분비되는 화학물질들의 구조적 특성에 의하여 공생관계의 전 과정이 결정된다. 즉 두과 작물에만 분비되는 isoflavone, daidzein과 genistein등은 기주 식물로의 질소 고정균의 유도(chemotaxis), 형질전환, 경쟁성 제고, Nod factor 등을 유도하는데 관여한다. 즉, isoflavone은 질소고정균을 유도하는 매개체로써 질소고정균을 끌어들여 두과작물의 생육에 도움을 주는 것이다. 따라서, 기존에 이와 같이 활성물질이 분비되지 않는 벼에 isoflavone 합성 유전자를 도입할 경우, 분비되는 isoflavone들에 의하여 근권 미생물과 벼 뿌리간에 새로운 생리 생화학적 반응을 통하여 벼의 생육뿐만 아니라, 토양의 지력을 향상시킬 것으로 사료된다.

또한, 벼를 비롯한 대두 등에서 발견되는 병원체 저항성 phytoalexin들 중

(iso)flavone 계통 화합물들에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 따라서, isoflavone 합성 유전자의 확보 및 이의 성질 규명은 이들 phytoalexin 합성 경로의 연구에도 이용될 수 있어 병원체 저항성 품종 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

2) 경제·산업적 측면

두과 작물에서 합성되는 isoflavone류인 genistein과 daidzein은 유방암, 골다공증, 심혈관질환 등의 예방에 탁월한 기능을 같고 있는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)으로 알려져 있다. 이들은 대부분 두과 작물, 특히 대두와 red clover로부터 추출물 혹은 분말상으로 가공처리 되어 건강식품으로 시판되고 있다. 또한 이와 유사한 기능을 갖는 화학합성 의약품류인 타목시펜과 랄록시펜 등은 그와 관련한 여러 부작용에도 불구하고 병원에서 고가로 처방되고 있다. 대두의 대부분을 수입에 의존하고 있는 우리 나라에서, 만약 주곡작물인 벼에서 식물성 에스트로젠을 합성하여 이들이 함유된 쌀을 생산할 수 있다면 폐경기 여성에서 보는 여러 병리현상을 예방할 수 있을 뿐만 아니라 수입대체 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

벼농사를 위해서는 질소태 비료인 요소가 상당량 소비된다. 그러므로, 요소비료 사용은 생산원가의 인상과 더불어 토양 산성화를 유발하여 지력을 떨어뜨린다. 두과 작물은 대기 중 질소를 고정시키는 질소고정균의 뿌리혹 생성을 유도하는 isoflavone을 합성하여 토양 근권 미생물의 생육에 도움을 주고 결과적으로 토양의 지력을 향상 시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, isoflavone이 발현된 벼품종 역시 토양 근권 미생물상의 변화 혹은 벼 endophyte들의 생리현상 변화를 통하여 질소태 비료의 시비량을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3) 사회·문화적 측면

국민 소득이 증가함에 따라 식생활에도 변화가 일어나고 있다. 이러한 변화 중에 하나가 건강 식품에 대한 요구이다. 따라서, 식물성 에스트로젠 isoflavone 화합물을 만드는 벼품종을 개발해 낼 수 있으면 이는 국민의 건강 증진과 더불어 새로운 기능성 벼 품종의 재배로 인한 농가 수입의 향상을 기대할 수 있을

것이다.

화학비료는 환경 오염원의 하나로 생각되어 왔다. 특히, 이들의 과량 시용은 토양의 산성화라는 문제를 불러 일으킨다. Isoflavone의 발현을 통하여 벼 근권 미생물 상의 계량을 통해 화학비료의 사용량을 줄인다면 이는 친환경 농업을 지향하는 정부 시책과도 부합할 뿐만 아니라 우리 땅을 보호하는 데도 크게 기여할 수 있을 것이다.

나. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1) 국내외 연구개발내용

Isoflavone은 두과 식물에서 phenylpropanpoid에서부터 합성되는 화합물로 그 구조와 생리적 활성이 다양한 것으로 알려져 있으며 두과 작물에서만 발견되는 것으로 알려져있다. 두과 작물에서 여러 병원체에 항생 효과가 있는 phytoalexin의 합성 또한 이 isoflavone들을 전구 물질로 하여 만들어진다 (Dixon, 1996).

질소고정 미생물은 식물체에서 분비된 isoflavone을 유도체로 하여 Nod factor를 만들어 두과 작물의 선택성을 결정하고 기주식물에 뿌리혹을 효과적으로 형성시킨다 (Phillips, 1992; Peters 1986). 그러므로, 두과작물과 질소고정 미생물간의 공생관계는 식물체에게는 필요한 질소원을 대기로부터 안정하게 공급하고, 토양근권에서는 근권 미생물의 활성을 도와 지력을 증진시키는 이상적 친환경 농법의 전형임이 보고되고 있다. Isoflavone의 생합성은 flavanone 중간체로부터 cytochrom P-450 계통의 isoflavone 합성 효소 (isoflavone synthase)에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 최근 들어, 몇 몇 두과 작물로부터 이 효소 유전자가 클로닝되었다 (Akashi, 1999; Jung, 2000).

Isoflavone 합성 유전자가 존재하지 않는 애기 장대, 담배, 옥수수 등에 그 유전자를 도입한 결과 daidzein이나 genistein과 같은 isoflavone들을 만드는 것이 확인되었다 (Yu 등, 2000).

에스트로젠의 약리작용은 세포내의 유전자 전사를 조절하는 일이다. 대표적 isoflavone 화합물인 daidzein, genistein등은 에스트로젠(estrogenic), 항에스트로

젠(antigiogenic), 항산화(antioxidant), 항암(anticancer) 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(Anderson, 1998; Arora, 1998; Fotsis, 1993; Kirk, 1998; Messina, 1994). 에스트로젠 효과에 의하여 폐경 기 여성에서 관찰되는 골다공증, 심혈관질환등을 예방하며, 항에스트로젠 효과에 의하여 자궁내막암의 발달없이 유방암을 예방하여 준다. 또한, 항산화 효과에 의하여 Alzheimer's disease 등에 의하여 발생되는 뇌손상을 막아주는 역할을 담당한다. 남성들에 의하여 발생되는 전립선암도 예방하여 주는 것으로 보고되고 있다. 특히, daidzin(daidzein의 glucoside conjugate 형태)은 alcohol 중독과 관련이 있는 human aldehyde dehydrogenase type I (ALDH-I)의 강력한 특이적, 비가역적 억제제(inhibitor)임이 밝혀 져 있다.

2) 현 기술상태의 취약성

무엇보다도, 이 유전자를 도입하여 만든 형질 전환된 벼에 대한 보고와 isoflavone 합성 유전자의 발현조절과 관련한 인자에 대한 보고는 아직 없다. 또한, isoflavone 합성 유전 자가 도입된 형질 전환체와 근권 토양 미생물과의 상호작용에 대한 연구 사례는 없다.

따라서, 본 연구에서는 대두에서 isoflavone 합성 유전자를 분리하여 이를 벼에 도입함으로써 생리활성 물질을 생산하는 새로운 품종을 만들어 내고 이를 이용하여 벼의 근권 미생물의 분포 상을 개선하여 이들의 생육을 증진시키는데 있다.

제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

본 연구에서는 대두에서 isoflavone 합성 유전자를 분리하여 이를 벼에 도입함으로써 생리활성 물질을 생산하는 새로운 품종을 만들어 내고 이를 이용하여 벼의 근권 미생물 상을 개선하여 이들의 생육을 증진시키는데 있다.

1. 두과 작물에서 isoflavone 합성 효소 유전자의 분리 및 성질 규명.

가. 대두의 각 부분에서 성장시기별 isoflavone량의 조사.
나. 대두에서 isoflavone 합성 효소 유전자의 분리.
다. 대두의 각 부분에서 isoflavone 합성 효소 유전자의 발현 조사.
라. Isoflavone 합성 효소의 미생물에서 발현을 위한 벡터 제작.
마. Isoflavone 합성 효소의 미생물에서 발현 및 활성 확인.

2. Isoflavone 합성 효소 유전자를 이용한 벼의 형질전환.

가. Isoflavone 합성 효소 유전자의 벼 도입을 위한 벡터 제작.
나. 제작한 벡터를 이용한 벼 형질 전환.
다. 벼 형질 전환체의 선발 및 isoflavone 합성 유전자의 발현 검증.

3. 벼 형질전환체에서 isoflavone 합성의 검증.

가. 벼 형질전환체 각부위에서 isoflavone의 추출.
나. 추출된 isoflavone의 함량 조사.

4. 형질전환체 근권의 미생물상 및 질소고정균상 조사.

가. 형질전환체 근권의 미생물상 조사.
나. 형질전환체가 질소고정균에 미치는 영향을 조사.

인용문헌

Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-I. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. Plant Physiol. **121**, 821-828.

Bradley, J.M. *et al.* (1999) Variation in the ability of the maize *Lc* regulatory gene to upregulate flavonoid biosynthesis in heterologous systems, *Plant Sci.*140, 31-39

Davies, K.M., Bloor, S.J., Spiller, G.B. and Deroles, S.C. (1998) Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*, *Plant J.* 13, 259-266

Dixon, R. A., and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, **7**, 1085 1097.

Dixon, R. A., and Ferreira, D. (2002) Genestein. Phytochem. **60**, 205-211.

Dixon, R.A., and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Sci. **4**, 364-400.

Enkerli, J., Bhatt, G. and Covert, S.F. (1998) Maackiain detoxification contributes to the virulence of *Nectria haematococca* MP VI on chickpea, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 317-326

Grotewold, E. *et al.* (1998) Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors, *Plant Cell* 10, 721-740

Stansfield, I. and Kelly, S. L. (1996) Purification and quantification of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome P450 in Yeast Protocols: *Methods in cell and Molecular Biology*. Evans, I. V. (Eds), pp.355-366Humana press Inc. Totowa, New Jersey.

Heller, W. and Forkmann, G. (1994) Biosynthesis of flavonoids in The Flavonoids. Advances in Research since 1986 Harborne, J. B.(eds), pp. 499-535, Chapman and Hall, London.

Holton, T.A. and Cornish, E.C. (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis, *Plant Cell* 7, 1071-1083

Harbone, J. R. B. and Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. Phytochem. **55**, 481-504.

Ishimi, Y. *et al.* (1999) Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency, *Endocrinology* 140, 1893-1900

Ingham J.L. (1990) A further investigation of phytoalexin formation in the genus *Trifolirum*. Z. Naturforsch. **45**, 829-834.

Jung, W., Yu, O., Lau, S.-M. C., O'Keefe, D.P., Odell, J., Fader G., and McGonigle, B. (2000) Idenfitication and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nature Biotech. **18**, 208-212.

Lee, S., Won, S.-H., Lee, B.-H., Park, H.-D., Chung, W.-I., and J. J. (2002) Genomic cloning and characterization of glutathione reductase gene from *Brassica campestris* var *Pekinensis*. Mol. Cells. **13**, 245 251.

Lewis D. F.V., and Sheridan G. (2001) Cytochromes P450, oxygen, and evolution. The Scientificworld. **1**, 151 167.

Morris, P.F., Bone, E. and Tyler, B.M. (1998) Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates, *Plant Physiol.* 117, 1171-1178

Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E., and Hahlbrock, K.

(2000) UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. **97**, 1903 1907.

Rice-Evans, C.A. and Miller, N.J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, *Biochem. Soc. Trans.* 24, 790-794

Ryan, K.G., Swinny, E.E., Markham, K. R., and Winefield C. (2002) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant Petunia leaves. Phytochem. **59**, 23 32.

Setchell, K.D.R. and Cassidy, A. (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health, *J. Nutr.* 129, 758S-767S

Shimada, N., Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-I. (2000) Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. Plant Sci. **160**, 37-47.

Shure, M., Wessler, S., and Fedoroff, N. (1983) Molecular identification and isolfation of the waxy locus in maize. Cell **35**, 225 - 233.

Tebayashi, S-i., Ishihara, A., and Iwamura, H.(2001) Elicitor-induced changes in isoflavonoid metabolism in red clover roots. J. Exp. Bot. **52**, 681 689.

Winkel-Shirley, B. (2001) It takes a garden. How work in diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. Plant Physi. **127**, 1399-1404.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physio. **126**, 485-493.

제 2 장. 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자의 분리 및 성질규명

제 1 절. 서설

식물은 1차 대사작용을 통하여 에너지원과 저장물 그리고 식물 구조물 등을 만들어낸다. 그러나, 식물이 만드는 여러 생리활성 물질들은 이러한 1차 대사에 의하여 만들어지는 것이 아니라 2차 대사에 의해서 만들어진다. 모든 식물체에 존재하는 2차 대사의 대표적인 예가 flavone 합성경로이다. Flavone 합성경로는 isoflavone과 antocyanin 의 합성에 관계하는 초기 단계로 식물체에 존재하는 많은 물질들이 이 경로를 통하여 합성된다. 또한, 2차 대사경로는 식물의 성장에 필수적인 1차 대사 경로와는 다르게 식물의 성장에 필수적인 것이 아니어서 이들의 조절이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한, 이들을 조절하기 위해서는 유전학적, 생화학적, 분자생물학적 연구가 병행되어야 한다. Flavanone에서 isoflavone으로의 전환은 하나의 유전자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며 그 유전자에 의하여 발현되는 단백질을 isoflavone synthase (IFS)라 한다. 이 IFS는 지금까지 두과 식물에서만 발견되며 여러 생리활성이 있는 것으로 사료되는 geinistein과 daidzein 등과 같은 isoflavone들을 그에 상응하는 flavone들인 3′,5,7-trihydroxyflavanone (naringenin), 3′,7-dihydroxyflavanone으로 부터 만드는데 관계한다. 하지만, 두과 식물을 제외한 식물에서는 isoflavone들이 발견되지 않고 있으며 그 이유는 이 유전자가 존재하지 않기 때문이다. 따라서, 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자를 클로닝하여 이를 다른 식량 작물, 특히, 벼에 도입한다면 기존에 있는 벼들이 만들지 못하는 새로운 물질인 isoflavone을 만들어 낼 수 있을 것이다. 이는 기존의 육종 방법으로는 할 수 없는 다른 종의 유전자를 벼에서 발현 시키는 것이다.

콩은 100 g 당 약 60-181 mg의 phytoestrogen (daidzein과 genistein)을 함유하고 있다. 성인 여성에게 soy isoflavone (daidzein 과 genistein)을 2.0 mg/kg

(체중) 수준에서 투여하고 6.5 시간 뒤 혈장 농도를 측정한 결과 총 isoflavone 함량이 4.4 ± 2.5 μM까지 증가함이 관측되었다. 이는 다시, 체중 50 kg 여성이 콩을 약 50 g 섭취하였을 경우 혈장에서 이 정도의 총 isoflavone 농도를 유지하는 것이 된다. In vitro 연구에서 1-10 nM의 genistein으로써 에스트로젠 수용체의 전사능이 유도된다고 밝혀져 있으며 그것으로 인한 여러 생리 활성이 기대된다고 보고되어져 있다. 그러므로 isoflavone을 함유한 음식물의 일상적 섭취활동으로도 생리활성에 필요한 농도의 isoflavone을 유지할 수 있고, 특히 폐경기 여성에게서 나타나는 호르몬과 관련한 여러 병리현상을 예방할 수 있을 것으로 추정해 볼 수 있다. 이와 같은 유추로, IFS로 형질 전환된 벼가 이 정도의 isoflavone을 쌀에 함유한다면 한국인들은 그 주식을 통하여 여성들의 질병을 효과적으로 예방할 수 있을 것이다. 두과작물의 토양근권에서 일어나는 식물 뿌리와 질소고정균간의 상호작용은 먼저 뿌리에서 분비되는 화학물질들의 구조적 특성에 의하여 공생관계의 전 과정이 결정된다. 즉 두과 작물에만 분비되는 isoflavone, daidzein과 genistein등은 기주 식물로의 질소 고정균의 유도(chemotaxis), 형질전환, 경쟁성 제고, Nod factor 등을 유도하는데 관여한다. 즉, isoflavone은 질소고정균을 유도하는 매개체로써 질소고정균을 끌어들여 두과작물의 생육에 도움을 주는 것이다. 따라서, 기존에 이와 같이 활성물질이 분비되지 않는 벼에 isoflavone 합성 유전자를 도입할 경우, 분비되는 isoflavone들에 의하여 근권 미생물과 벼 뿌리간에 새로운 생리 생화학적 반응을 통하여 벼의 생육뿐만 아니라, 토양의 지력을 향상시킬 것으로 생각된다. 또한, 벼를 비롯한 대두 등에서 발견되는 병원체 저항성 phytoalexin들 중 (iso)flavone 계통 화합물들에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 따라서, isoflavone 합성 유전자의 확보 및 이의 성질 규명은 이들 phytoalexin 합성 경로의 연구에도 이용될 수 있어 병원체 저항성 품종 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

본 연구는 isoflavone합성에 중요 효소인 isoflavone synthase를 클로닝하여 이의 특징을 연구하여 후에 벼의 형질 전환을 하여 isoflavone이 함유된 벼 품종을 육종하려고 하였다.

제 2절. 재료 및 방법

1. 두과작물에서 RT-PCR방법을 이용한 isoflavone 합성 유전자의 클로닝 및 염기 서열 결정.

가. 대두로부터 Isoflavone 합성 유전자 클로닝.

콩으로부터 IFS 유전자를 cloning하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 Ominiscript transcriptase (Qiagen, Gaitherburg, MD, USA), 15 pmol of oligo $(dT)_{15,}$ 그리고 20 U of Rnasin (Promega, Madison, WI, USA)과 total RNA 2 g이 포함된 반응에서 수행되었다. 얻어진 cDNA들을 이용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 통해 IFS 유전자를 얻었다. PCR 수행 방법은 다음과 같다.

사용된 효소 : Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

PCR 반복횟수 : 40 cycles (denaturation : 1 min at 94°C, annealing : 1 min at 55°C, amplification : 1.5 min at 72°C.)

Primers : forward primer → 5′-CGTGAGGAGGAGAAAGAACG-3′

reverse primer → 5′-GCAGGAAACTCACGACAACA-3′

나. Red colver로 부터 Isoflavone 합성 유전자 클로닝.

Red colver로 부터 IFS 유전자를 cloning하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 Ominiscript transcriptase (Qiagen, Gaitherburg, MD, USA), 15 pmol of oligo $(dT)_{15,}$ 그리고 20 U of Rnasin (Promega, Madison, WI, USA)과 total RNA 2 g이 포함된 반응에서 수행되었다. 얻어진 cDNA들을 이용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 통해 IFS 유전자를 얻었다. PCR 수행 방법은 다음과 같다.

사용된 효소 : Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

PCR 반복횟수 : 40 cycles (denaturation : 1 min at 94℃, annealing : 1 min at 55℃, amplification : 1.5 min at 72℃.)

Primers : forward primer → 5′-CTGCAACCATGTTGTTAGAA-3′

reverse primer → 5′-GATTCACACCGTCTCTCAAT-3′

PCR 결과산물은 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)로 삽입되었으며, 이를 RC-IFS로 명명하고 염기 서열을 결정하였다.

2. 대두의 각 부분에서 isoflavone 합성 효소 유전자의 발현 조사.

가. 대두에서 Isoflavone 합성 효소 유전자의 발현 조사.

대두의 각 부분에서의 isoflavone 합성 효소 유전자의 발현을 조사하기 위하여 대두에서 씨, 잎, 줄기, 뿌리, nodule 그리고 꽃 부위를 각각 분리하여 시료를 준비하였고, 이를 Qiagen plant total isolation kit를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 각각 분리한 total RNA를 1.2 % formaldhyde gel에서 전기영동 한 후, 이를 Hybond membrane (Amersham)으로 transfer하고, IFS-PB cDNA를 probe로 하여 northern blotting을 수행하였다. 이때 RNA의 양을 비교하기 위하여 soybean actin gene을 가지고 함께 blotting하였다.

나.Redclover에서Glutathion과UV처리에의한각조직별IFS-TP합성유전자의 발현조사.

래드클로버 종자는 멸균된 filter paper 위에 올려 10일간 생장하게 하였다. 10mM glutathione 1ml을 래드클로버 가 자라고 있는 petri dish에 직접 공급하였다. UV처리는 10일동안 자란 유묘에 UV등 (G10T8 UV light lamp, Sankyo Electric, Japan)이 30 cm정도 떨어지게 설치한 다음 조사하였다. 이렇게 처리된 sample들은 곧바로 액체질소에 얼린 다음 sampling하였으며, 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다. RNA를 분리하여 위에 설명한 방법과 동일하게 RT-PCR을 수행하였다. 각 반응에 사용된 RNA의 양을 정량하기 위하여 actin primer

(Forward primer : 5′GTATGCAAGTGGTCGCACAA-3′ 와 reverse primer : 5′-CTTGCTCATACGGTCTGCAA-3′)을 사용하였다.

3. Isoflavone 합성 효소의 *Saccharomycese cerevisiae*에서 발현을 위한 벡터 제작 및 클로닝된 유전자의 *Saccharomycese cerevisiae*에서의 발현 및 발현된 isoflavone 단백질의 기질 및 생성물 확인.

pBlueScript *Sma*I site (Stratagene, La Jolla, USA)에 들어있는 isoflavone synthase cDNA와 *S. cerevisiae* pYES2 vector (Invitrogen)를 제한효소 *Hin*dIII/*Xba*I으로 처리하여 자른 후 ligation 하였다. 이 vector를 *E. coli* Top10으로 transformation 한 후, *S. cerevisiae*에서 IFS발현을 위해 *S. cerevisiae* INVSc1으로 transformation 하였다.

Transformant들의 선발은 Ura이 없는 mimimum medium에서 실시하였다. Transformants들을 배양한 후 plasmid를 분리하고, PCR를 통해 IFS 유전자의 도입을 확인하였다. Ura selection medium의 조성은 다음과 같다. 6.7 mg/ml yeast nitrogen base without amino acid (Difco), 0.77mg/ml -Ura DO supplement (Clontech), 20 mg/ml glucose.

IFS 의 발현은 -Ura selection 배지에서 30°C, 300 rpm에서 하루동안 배양한 후, 이를 induction 배지로 OD_{600}이 0.5가 되도록 접종하였다. 이를 30°C, 300 rpm에서 하루동안 배양한 후 microsome을 분리하였다.

Transformant에서의 microsomal fraction의 분리는 Yeast Protocols: *Methods in cell and Molecular Biology* edited by Ivor H. Evans. (Humana press Inc. Totowa, New Jersey. 1996. p355-366.)에 소개된 방법으로 수행되었다. 분리한 microsomal fraction에 1 mM NADPH와 200 uM naringenin을 넣은 후, 2시간동안 30℃에서 반응시켰다. 반응액을 3 mL ethyl acetate로 두 번 추출하고, ethyl acetate를 제거하고, 이를 100ul methanol로 용해한 후, HPLC 분석을 하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

HPLC는 Photo Diode Array (PDA) detector를 가진 Varian LC장비를 사용하

였고, 분석을 위해 chral column (sumichiral OA-7000, SCAS, 5um particle size, 4.6 mm x 25mm)을 이용하였다. mobile phase는 50 mM phosphate buffer와 acetonitrile을 사용하였다. (10% acetonitrile at 0 min, 30% acetonitrile at 10 min, 60% acetonitrile at 40 min, 90% acetonitrile at 45 min, 10% acetonitrile at 50 min.) flow rate는 1 ml/min 로 하였고, UV detection은 270 nm에서 하였다.

제 3 절. 결과 및 고찰.

1. Isoflavone 합성 유전자의 클로닝 및 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 및 성질 규명.

가. 대두에서 RT-PCR방법을 이용한 isoflavone 합성 유전자의 클로닝 및 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 및 성질 규명.

Glycine max, Paldal로부터 PCR을 통해 IFS를 cloning하였다. 콩 EST sequence를 조사하여 primer를 합성하였고, *G. max* Paldal에서 분리한 total RNA를 가지고 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과로 약 1.6 kb product를 얻었다 (그림 1). 이 clone을 IFS-Pd로 명명하였다. 이 gene의 sequence 분석을 하였다 (그림 2). IFS-Pd 는 1593 bp의 open reading frame (531 amino acids)을 가지고 있다. IFS는 58.8 kDa 분자량과 9.17의 pI (isoelectric point)를 갖는 것으로 추측된다. signal peptide cleavage site는 24와 25사이의 amino acid (Nielson et al., 1997)로 SignalLP program으로 예측되었으며, blast analysis에서 다른 몇몇 식물의 isoflavone synthase와 높은 homology를 보였다 (그림 2). amino acids 수준에서 단지 세 개의 residue만이 차이를 보였다. soybean isoflavone synthase 2의 140번째 proline residue가 IFS-Pd에서 leucine으로 바뀌었으며, 156번째 threoine는 isoleucine, 그리고 295번째 glutamate 는 lysine으로 바뀌었다.

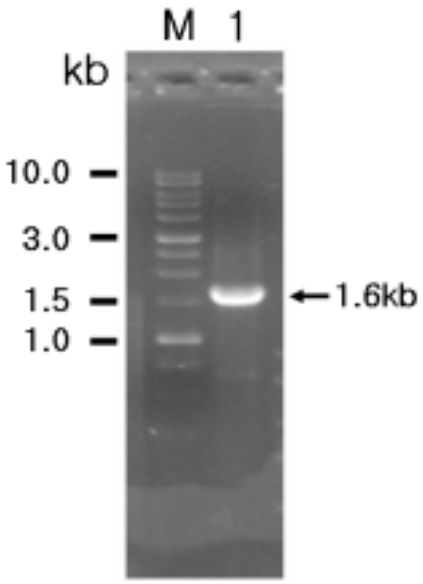


그림 1. *Glycine max* Paldal로부터 Isoflavone synthase 유전자의 클로닝.

Glycine max isoflavone synthase유전자를 클로닝하기 위하여, 다른 식물들의 염기서열을 분석하여 얻어진 두개의 degeneracy primer를 이용하였다. 그 결과 1.6 kb의 PCR 산물을 얻었으며 이를 pGEMT -EASY vector에 삽입하여 염기서열을 분석하였다.

```
IFS1    1 MLLELALGLLVLALFLHLRPTPTAKSKALRHLPNPPSPKPRLPFIGHLHLLKDKLLHYAL
IFS2    1 MLLELALGLLVLALFLHLRPTPTAKSKALRHLPNPPSPKPRLPFIGHLHLLKDKLLHYAL
IFS3    1 MLLELALGLFVLALFLHLRPTPSAKSKALRHLPNPPSPKPRLPFIGHLHLLKDKLLHYAL

IFS1   61 IDLSKKHGPLFSLYFGSMPTVVASTPELFKLFLQTHEATSFNTRFQTSAIRRLTYDSSVA
IFS2   61 IDLSKKHGPLFSLYFGSMPTVVASTPELFKLFLQTHEATSFNTRFQTSAIRRLTYDSSVA
IFS3   61 IDLSKKHGPLFSLSFGSMPTVVASTPELFKLFLQTHEATSFNTRFQTSAIRRLTYDNSVA

IFS1  121 MVPFGPYWKFVRKLIMNDLLNATTVNKLRPLRTQQIRKFLRVMAQGAEAQKPLDLTEELL
IFS2  121 MVPFGPYWKFVRKLIMNDLPNATTVNKLRPLRTQQTRKFLRVMAQGAEAQKPLDLTEELL
IFS3  121 MVPFGPYWKFVRKLIMNDLLNATTVNKLRPLRTQQIRKFLRVMAQSAEAQKPLDVTEELL

IFS1  181 KWTNSTISMMMLGEAEEIRDIAREVLKIFGEYSLTDFIWPLKHLKVGKYEKRIDDILNKF
IFS2  181 KWTNSTISMMMLGEAEEIRDIAREVLKIFGEYSLTDFIWPLKHLKVGKYEKRIDDILNKF
IFS3  181 KWTNSTISMMMLGEAEEIRDIAREVLKIFGEYSLTDFIWPLKYLKVGKYEKRIDDILNKF

IFS1  241 DPVVERVIKKRREIVRRRKNGEVVEGEVSGVFLDTLLEFAEDETMGIKITKDHIKGLVVD
IFS2  241 DPVVERVIKKRREIVRRRKNGEVVEGEVSGVFLDTLLEFAEDETMEIKITKDHIEGLVVD
IFS3  241 DPVVERVIKKRREIVRRRKNGEVVEGEASGVFLDTLLEFAEDETMEIKITKEQIKGLVVD

IFS1  301 FFSAGTDSTAVATEWALAELINNPKVLEKAREEVYSVVGKDRLVDEVDTQNLPYIRAIVK
IFS2  301 FFSAGTDSTAVATEWALAELINNPKVLEKAREEVYSVVGKDRLVDEVDTQNLPYIRAIVK
IFS3  301 FFSAGTDSTAVATEWALAELINNPRVLQKAREEVYSVVGKDRLVDEVDTQNLPYIRAIVK

IFS1  361 ETFRMHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEGALILFNVWQVGRDPKYWDRPSEFRPERFLE
IFS2  361 ETFRMHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEGALILFNVWQVGRDPKYWDRPSEFRPERFLE
IFS3  361 ETFRMHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEGALVLFNVWQVGRDPKYWDRPSEFRPERFLE

IFS1  421 TGAEGEAGPLDLRGQHFQLLPFGSGRRMCPGVNLATSGMATLLASLIQCFDLQVLGPQGQ
IFS2  421 TGAEGEAGPLDLRGQHFQLLPFGSGRRMCPGVNLATSGMATLLASLIQCFDLQVLGPQGQ
IFS3  421 TGAEGEAGPLDLRGQHFQLLPFGSGRRMCPGVNLATSGMATLLASLIQCFDLQVLGPQGQ

IFS1  481 ILKGGDAKVSMEERAGLTVPRAHSLVCVPLARIGVASKLLS
IFS2  481 ILKGGDAKVSMEERAGLTVPRAHSLVCVPLARIGVASKLLS
IFS3  481 ILKGDDAKVSMEERAGLTVPRAHSLVCVPLARIGVASKLLS
```

그림 2. 여러 isoflavone synthases gene들과의 연역된 아미노산 서열의 유사성 비교.

IFS1, *Glycine max,* Paldal로부터 분리된 isoflavone synthase; IFS2, *Glycine max*로부터 분리된 isoflavone synthase 1 (Genbank accession number AF195799); IFS3, *Glycine max*로부터 분리된 isoflavone synthase 2 from (Genbank accession number AF195798).

나. Red clover에서 RT-PCR방법을 이용한 isoflavone 합성 유전자의 클로닝 및 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 및 성질 규명.

래드 클로버에서 Isoflavone 합성유전자를 클로닝하기 위하여, database 상에서 IFS 합성유전자들을 분석하였으며, 이들유전자들에 공통적으로 가지고 있는 아미노산 영역에 바탕하여 두종류의 primer를 제작하여 10일정도 자란 유묘에서 분리한 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 약 1.1 kb의 PCR산물을 얻어 subcloning 하여 염기서열을 결정하였다. 이렇게 결정된 염기서열을 바탕으로 Isoflavone 합성유전자의 전체 염기서열을 얻기 위하여 3′-RACE와 5′-RACE을 실시하였다. 3′-RACE의 결과 약 550 bp의 산물을 얻었으며, stop codon을 포함하고 있었다. 또한 5′-RACE를 실시하여 약 450 bp의 산물을 얻었으며, initiation condon을 포함하고 있었다.이렇게 하여, isoflavone 합성유전자의 전체 염기서열을 얻을 수 있었으며, IFS-Tp라고 명명하였으며, genomic 클론도 증폭하여 subcloning 하여 염기서열을 결정하였다. IFS-Tp 는 1,575 bp의 ORF (525 아미노산)와 분자량은 59.1 kDa로 예측되었으며, pI 는 8.95였다. Genomic 과 cDNA의 염기서열을 비교한 결과 nucleotide의 976과 1,115사이에 140 bp의 인트론을 가지고 있었다. Blast 분석결과 *Metidicago truncatula, Glycyrrhiza echinata, Cicer arietinum*과 같은 IFS 합성유전자와 상당히 높은 유사성을 보였다. 아미노산 레벨에서 약 75-80%의 상동성을 보였으며, 약 92-97%의 유사성을 보였다(그림 3-A). 연관분석에서 redclover IFS는 Metidicago truncatula와 아주 밀접한 연관이 있음을 알 수 있다 (그림 3-B). IFS-Tp 의 copy 수를 결정하기 위하여 genomic DNA을 *Eco*RI 과 *Hin*dIII으로 절단하여 bolt를 실시하였으며 probe은 IFS-Tp cDNA를 사용하였다. blot결과 단일 밴드를 관찰하였다. 이것은 redclover내에 IFS-Tp 유전자가 single copy가 존재하는 것을 알 수 있다 (그림 4).

A

```
Ca      -MRLVEIAVTLVLIALFIHFRPTPTAKSKALRHLPNPPSPKPRLPFVGHLHLLDHPLLHQS 60
Ge       -MLVELAITLLVIALFIHLRPTLSAKSKSLRHLPNPPSPKPRLPFVGHLHLLDKPLLHYS 59
Mt       -MLVELAVTLLVIALFIHLRPTPTAKSKALRHLPNPPSPKPRLPFIGHLHLLDNPLLHHT 59
Tp       -MLLEIAVALLVIALFIYLRPTPTAKSKALRHLPNPPSPKPRLPFIGHLHLLDHPLLHIS 59
           * * *  *  *****  ***  **** *************** ******* ****

Ca       -LIRLGERYGPLYSLYFGSMPTIVASTPDLFKLFLQTHEAVSFNTRFQTSAIRRLTYDNSV 120
Ge       -LIDLSKRYGPLYSLYFGSMPTVVASTPELFKLFLQTHEASSFNTRFQTSAIRRLTYDNSV 119
Tp       -LIRLGERYGPLYSLYFGSMPTVVASTPDLFKLFLQTHEATSFNTRFQTSAIRRLTYDNSV 119
Mt       -LIKLGKRYGPLYTLYFGSMPTVVASTPDLFKLFLQTHEATSFNTRFQTSAISRLTYDNSV 119
          ** *  ****** ******** ***** ********** ********** ********

Ca       -AMVPFAPYWKFIRKLIMNDLLNATTVNKLRPLRSQEIRKVLNVMAKSAQTQEPLNVTEEL 180
Ge       -AMVPFGPYWKFIRKLIMNDLLNATTVNKLRPLRSQEIRKVLRVMAQSAESQVPLNVTEEL 179
Tp       -AMVPFGPYWKFVRKLIMNDLLNATTVNKLRPLRSKEIRKVLNVMANSAETQQPLNITVEL 179
Mt       -AMVPFAPYWKFIRKLIMNDLLNATTVNKLRPLRSREILKVLKVMANSAETQQPLDVTEEL 179
          ***** ***** ********************** ** *** *** **  * **  * **

Ca       -LKWTNSTISRMMLGEAEEIRDIARDVLKIFGEYSLTDFIWPLKKLK-VGKYEKKIEEIFN 239
Ge       -LKWTNSTISRMMLGEAEEIRDIARDVLKIFGEYSLTDFIWPLKKLK-VGQYEKRIDDIFN 238
Tp       -LKWTNSTISTMMLGEAEEVRDIARDVLKIFGEYSVTDFIGPLKIFKKFGNYEQRIDAIFN 239
Mt       -LKWTNSTISTMMLGEAEEVRDIARDVLKIFGEYSVTNFIWPLNKFK-FGNYDKRTEEIFN 238
          ********* ******** ************** * ** **   *  * *      ***

Ca       -RFDPVIEKVIKKRQDVRRRRKERNGELEEGEQ-SVVFLDTLLDFAEDETMEIKITKEQIK 298
Ge       -RFDPVIERVIKKRQEIRKKRKERNGEIEEGEQ-SVVFLDTLLDFAEDETMEIKITKEQIK 297
Tp       -KYDPIIERVIKKRQGIVNKRK--NGEVLVGEEENVVFLDTLLEFAQDETMEIKITKEQIK 297
Mt       -KYDPIIEKVIKKRQEIVNKRK--NGEIVEGEQ-NVVFLDTLLEFAQDETMEIKITKEQIK 295
          ** ** ******     **  ***   **   ******** ** **************

Ca       -GLVVDFFSAGTDSTAVATDWCLSELINNPRVMKKAREEVDSVVGKDRLVDESDIQNLPYI 358
Ge       -GLVVDFFSAGTDSTAVATDWALSELINNPRVFQKAREEIDAVVGKDRLVDEADVQNLPYI 357
Tp       -GLVVDFFSAGTDSTAVATEWTLAELINNPRVLKKAREEVESVVGKDRLVDESDIQNLPYI 357
Mt       -GLVVDFFSAGTDSTAVATEWTLAELINNPRVWKKAQEEIDSVVGKDRLVDESDVQNLPYI 355
          ***************** * * ********  ** **   ********** * ******

Ca       -RAVVKETFRMHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEGALVLFNVWAVGRDPKYWDRPLEFRP 418
Ge       -RSIVKETFRMHPPLPVVKRKCVQECEVDGYVIPEGALILFNVWAVGRDPKYWDRPTEFRP 417
Tp       -RAMVKEVFRLHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEGALILFNVWQVGRDPKYWEKPLEFRP 417
Mt       -RAMVKEVFRLHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEGALILFNVWQVGRDPKYWEKPLEFRP 415
          *  *** ** ***********  ***  ********* ***** ********  * ****

Ca       -ERFLENAG--EGDAGSIDLRGQHFQLLPFGSGRRMCPGVNLATAGMATLLSSVLQCFELQ 476
Ge       -ERFLENVG--EGDQ-AVDLRGQHFQLLPFGSGRRMCPGVNLATAGMATLLASVIQCFDLS 474
Tp       -ERFLENAGVGEGEASSIDLRGQHFTLLPFGSGRRMCPGVNLATAGMATLLSSIIQCFDLQ 477
Mt       -ERFLENASQGEGEAASIDLRGQHFTLLPFGSGRRMCPGVNLATAGMATLLSSIIQCFDLQ 475
          ******    **     ******* ********************** *  *** *

Ca       -VAGPNGQILKGADAKVSMDERPGLTVPRAHNLVCVPLARPGAAAKLLSS 525
Ge       -VVGPQGKILKGNDAKVSMEERAGLTVPRAHNLICVPVARSSAVPKLFSS 523
Tp       -VPGPNGQILKGSDAKVTMDERPGLSVPRAQNLVCVPLARAG-AAKLLSS 525
Mt       -VPGPHGQILKGDDVKVSMDERPGLTVPRAHNLMCVPLARAGVAAKLLS- 523
          * ** * **** * ** * ** ** **** ** *** **     ** *
```

B

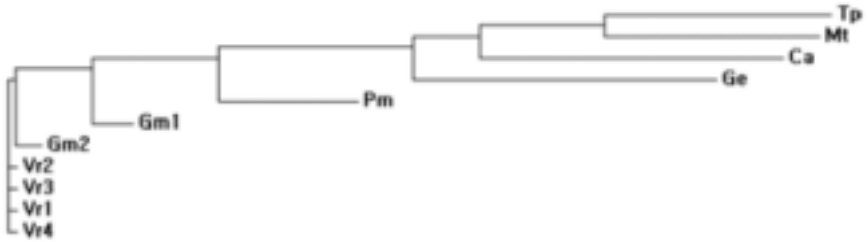


그림 3.. 여러 isoflavone synthases 유전자들과의 아미노산 서열의 유사성 비교. A. 연역된 아미노산 서열 비교. *Trifolium pratense* (Tp, GenBank accession number AY253284), *Metidicago truncatula* (Mt, GenBank accession number AY167424), *Glycyrrhiza echinata* (Ge, GenBank accession number AB023636) and *Cicer arietinum* (Ca, GenBank accession number AJ243804). 상동의 아미노산은 *로 표시하였다. **B. 여러 isoflavone synthase의 Phylogenetic analysis.** Pm, *Pueraria montana* (AF462633). Gm1, (AF195798)과 Gm2, (AF195799)는 Glycine max, Vr1, (AF195806), Vr2, (AF195807), Vr3, (AF195808), 그리고 Vr4 (AF195809) 4가지 모두는 *Vigna radiata*로부터 분리된 IFS.

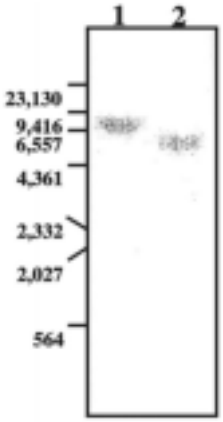


그림 4. IFS-Tp의 DNA blot분석. Red clover genomic DNA는 *Eco*RI (lane 1)과 *Hin*dIII (lane 2)로 자른 후 Hybond N+ membrane에 blot하였으며 *IFS-Tp*의 N-terminal 부분을 이용하여 hybridization 하였다.

2. Isoflavone 합성 유전자의 발현 조사.

가. 대두에서 Isovlavone 합성 유전자의 발현조사.

대두의 각 부위에서의 IFS-Pd의 발현은 RT-PCR에 의해 조사되었다. 씨, 잎, 줄기, 뿌리, nodule 그리고 꽃에서 분리한 total RNA를 전기영동하고, membrane에 transfer 한 후, IFS-Pd를 probe로 하여 bloting하였다. IFS-Pd는 씨, 뿌리, nodule에서 발현되는 것을 확인하였다 (그림 5). 줄기와 잎에서는 발현정도는 적지만 발현이 됨을 알 수 있었다. 가장 높은 발현 수준을 보이는 곳은 뿌리와 nodule로 관찰되었다. 이것은 genistein이나 daidzein같은 isoflavone이 질소고정균과의 상호관련이 있음을 보여준다. 발현된 RNA의 양을 확인하기 위해 콩의 actin 유전자를 함께 bloting하였다.

나. 각 조직별 IFS-Tp 유전자의 발현 양상과 외부자극에 의한 발현양상.

Total RNA는 잎, 줄기, 뿌리에서 각각 분리하여 RT-PCR 방법을 이용하여 IFS 합성 유전자의 발현양상을 조사 하였다. IFS-Tp 유전자의 발현양상은 조사된 모든 조직에서 동일하게 발현되고 있음을 보였다 (그림 6). Elicitor 인 glutathione에 의한 IFS 유전자의 발현양상을 조사하였다. Glutathione을 처리한 후 6시간정도 지난 후부터 IFS 합성유전자의 발현량이 증가하는 것을 보였다 (그림 6). UV 조사 실험에서도 glutathione을 처리하였을 때와 마찬가지로 UV조사 후 6시간에 IFS 합성유전자의 발현량이 최고로 높았다.

3. Isoflavone 합성 효소의 미생물에서 발현을 위한 벡터 제작 및 클로닝된 유전자의 미생물에서의 발현 및 발현된 isoflavone 단백질의 기질 및 생성물 확인.

IFS-Pd와 IFS-Tp의 작용을 알기 위해서, IFS-Pd와 IFS-Pd를 yeast에서 발현하였고 각각의 IFS의 activity는 yeast microsomal fraction을 분리하여 측정하였다. yeast안의 IFS-Pd 와 IFS-Tp 유전자의 형질전환 유무는 plasmid를 분리하여 PCR방법을 이용하여 확인하였다. yeast transformant에서 microsomes을 분

리한 한 다음, naringenin과 NADPH를 넣어 반응액을 조제한 후, 30℃에서 2시간 반응한 후, Ethyl acetate로 반응물을 두 번 추출하여 HPLC통하여 분석한 결과는 그림 7 와 같다. 두 개의 peak가 보여지는데 각각의 retention time은 21분과 28분이였다. 앞쪽 peak는 substrate인 naringenin peak임을 authentic naringenin을 같은 조건에서 분석해 본 결과 알 수 있으며, 두 번째 peak 역시 genistein을 분석해 봄으로써 쉽게 알 수 있었다. 이것은 각 peak의 absorbance scan을 비교함으로써 더 정확하게 알 수 있다 (그림 8). IFS-Pd와 IFS-Tp유전자는 동일한 기능을 하고 있었으며, 이것을 보아 IFS-Pd와 IFS-Tp는 isoflavone synthase를 coding하는 유전자임을 알 수 있었다. yeast에서 발현되 IFS-Pd와 IFS-Tp의 microsomal fraction을 분리하여 위와 같은 반응으로 여러 가지 다른 flavone들에 대한 activity를 확인해 보았다 (표 1). 7-hydroxyflavanone5, 7-dihydroxyflavanone naringenin (5,7,4′-trihydroxyflavanone), liquiritigenin (7,4′-dihydroxyflavanone)이 substrate로 사용되어짐을 알 수 있었다. substrate를 살펴 봄으로써 flavanone의 A ring의 7위치가 IFS 의 작용에 중요한 부분임을 알 수 있었다.

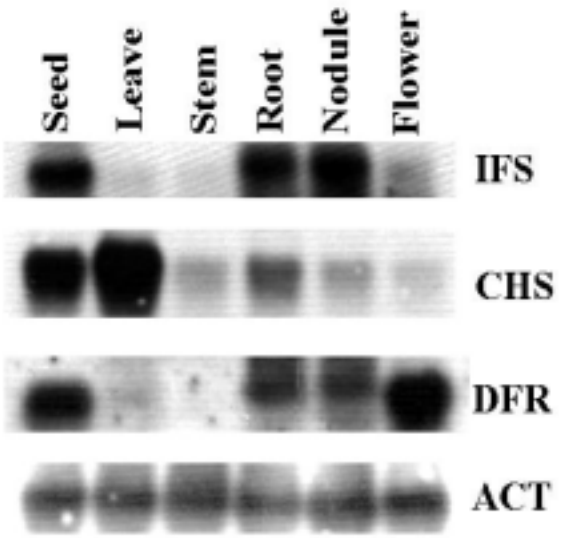


그림 5. IFS-Pd의 조직 특이적 발현 양상 비교.

Total RNA는 seed, flower, leave, stem, nodule과 root에서 분리되었으며, 이는 formaldehyde agarose gel에서 전기영동을 수행한 후 nylon membrane에 blotting 되었다. 이 blot에 IFS cDNA, CHS cDNA, DFR cDNA와 actin cDNA를 각각 probe로서 처리하였다. IFS-Pd는 모든 조직에서 전부 발현되는 것을 알 수 있었으나, seed, root와 nodule에서 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. CHS와 DFR의 경우는 다른 발현 양상을 보였다.

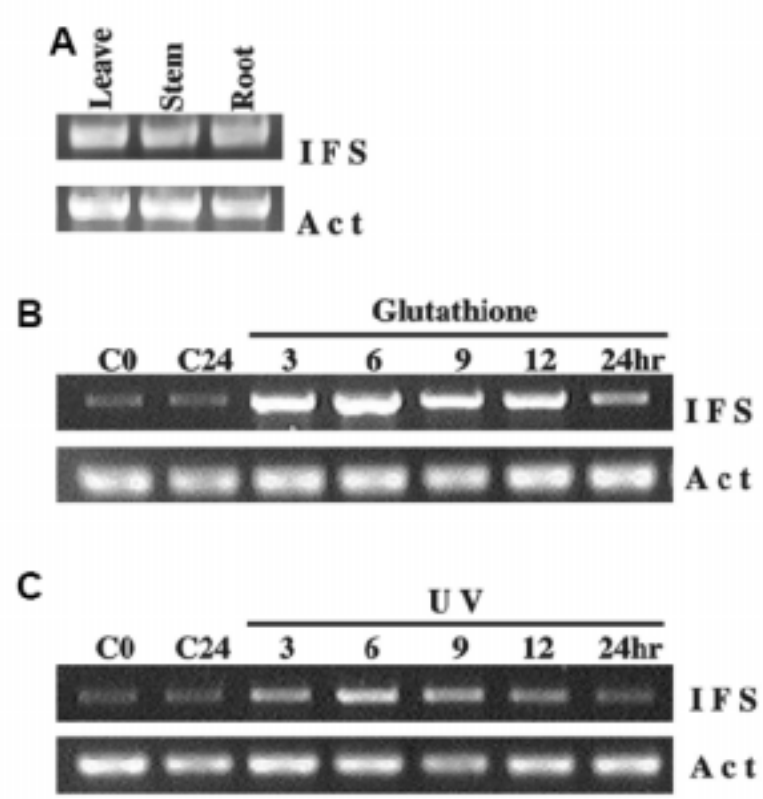


그림 6. IFS-Tp 유전자 RT-PCR 방법을 이용한 분석

A.다른 각각의 조직으로부터발현된 IFS (IFS, isoflavone synthase Tp; Act, actin gene). **B.**Total RNA는 GSH-stimulated seedlings에서 0(C0), 3, 6, 9, 12, 그리고 24 시간 후에 분리되었다. C24는 water-treated 대조구 이다. Total RNA는 24시간 후에 분리되었다. **C.** UV-treated seedling을 수행한 후 0 (C0), 3, 6, 9, 12, 그리고 24 시간 후에 분리된 total RNA. C24 식물은 대조구로서 백색등에서 24시간동안 배양된 후 total RNA를 분리하였다.

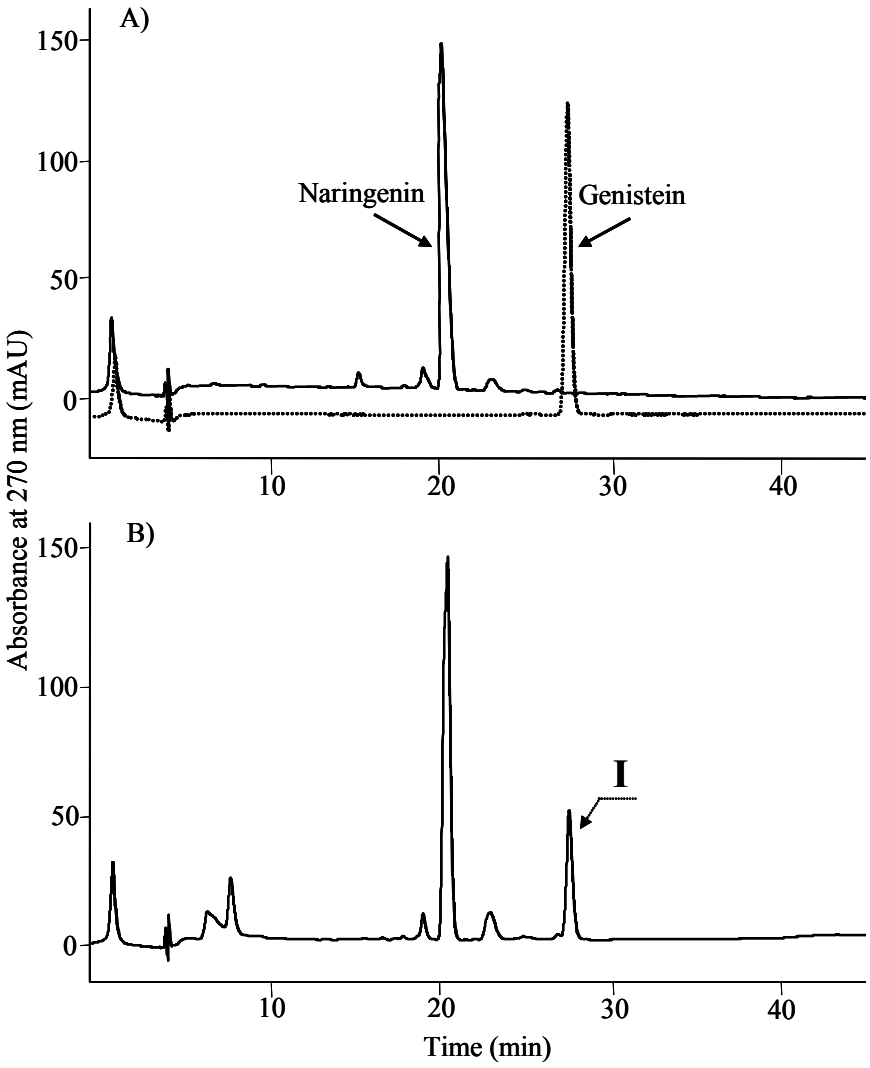


그림 7. Isoflavone synthase (IFS-Pd 혹은 Tp)와 배양 혼합물들의 HPLC elution profiles.

A) genistein (점선)과 isoflavone synthase gene (실선)을 포함하지 않은 *S. cerevisiae* 의 microsomal fraction과 naringenin과 함께 배양하여 얻어진 혼합물의 HPLC 흐름도. B) isoflavone synthase gene (실선)을 포함한 *S. cerevisiae* 의 microsomal fraction과 naringenin과 함께 배양하여 얻어진 혼합물의 HPLC 흐름도.

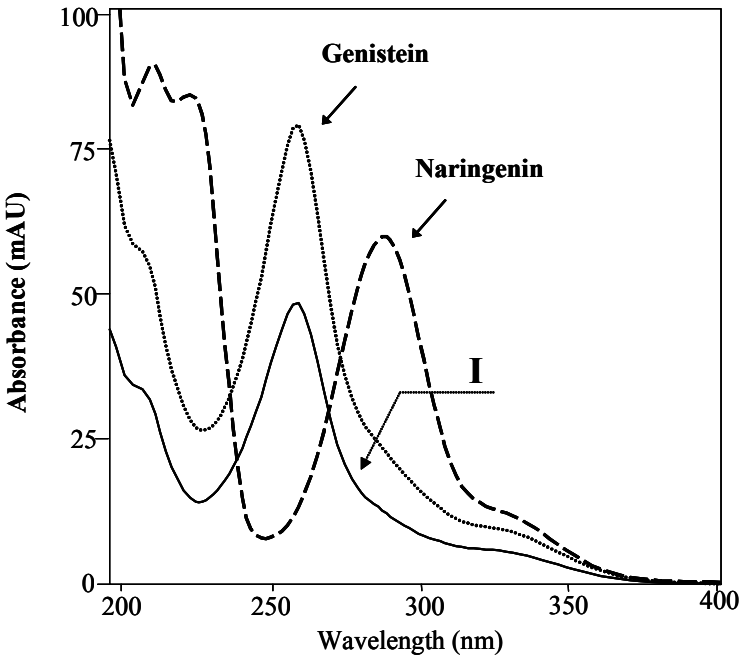


그림 8. Naringenin (굵은 점선), genistein (점선)과 IFS-Pd 혹은 -Tp와 반응하여 새로이 생성된 산물 (실선)의 UV spectra.

Substrate	Biotransformation
Flavone	**X**
5,7-dihydroxyflavone	**X**
flavanone	**X**
7-hydroxyflavanone	**O**
4'-hydroxyflavanone	**X**
6-hydroxyflavanone	**X**
5,7-dihydroxyflavanone	**O**
naringenin	**O**
(5,7,4'-trihydroxyflavanone)	**O**
liquiritigenin	
(7,4'-dihydroxyflavanone)	

(O showed new peaks on the HPLC profile)

표 1. Isoflavone synthase를 포함하고 있는 효모 microsomal fraction의 flavone 류의 전환 산물들.

제 4 절. 결론.

isoflavone을 생성하는 형질전환된 벼를 얻는 것을 최종 목표로 하여, 형질전환에 사용될 isoflavone synthase 유전자를 대두로부터 cloning한 후, 상기 유전자가 활성을 지닌 재조합 형태로 발현이 되어 flavone 류인 기질을 분해하여 isoflavone 류를 합성하는 가를 살펴본 결과는 다음과 같다.

1. IFS-Pd로 명명된 유전자는 1593 bp의 open reading frame (531 amino acids)을 가지고 있었으며, 58.8 kDa 분자량과 9.17의 pI (isoelectric point)를 갖는 것으로 추측되었다. SignalLP program으로 예측한 결과 signal peptide cleavage site는 24와 25사이의 amino acid (Nielson et al., 1997)로 예상되었으며, blast analysis에서 다른 몇몇 식물의 isoflavone synthase와 높은 homology를 보였다.

2. IFS-Tp로 명명된 유전자는 1575 bp의 open reading frame (525 amino acids)를 가지고 있었으며, 59.1 kDa 분자량과 8.95의 PI를 갖는 것으로 추측되었다. 다른 IFS 유전자들과도 상당히 높은 수준의 homology를 보였다. 상기 클로닝된 유전자는 Mol. Cells

3. 상기 IFS 유전자를 yeast에서 발현하여 isoflavone의 생성을 확인하였다. 확인된 결과, naringenin으로부터 genistein을 합성하는 것을 확인하였다. 다라서, 상기 유전자를 이용할 경우, flavone 류를 기질로 이용하여 isoflavone으로 전환이 가능한 형질전환된 벼를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

4. 상기 결과는 *Mol. Cells* 2003 15: 301-306에 개제되었다 (Bong Gyu Kim, Song-Young Kim, Hee Su Song, Chan Lee, Hor-Gil Hur, Su-Il Kim and Joong-Hoon Ahn. Cloning and Expression of the Isoflavone Synthase Gene (IFS-Tp) from Trifolium pratense).

제 5 절. 인용문헌.

Ahn, J. H. and Walton, J. D. (1996) Chromosomal organization of *TOX2*, a complex locus controlling host-selective toxin biosynthesis in *Cochliobolus carbonum*.Plant Cell. **8**, 887- 897.

Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-I. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. Plant Physiol. **121**, 821-828.

Dixon, R. A., and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, **7**, 1085 1097.

Dixon, R. A., and Ferreira, D. (2002) Genestein. Phytochem. **60**, 205-211.

Dixon, R.A., and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Sci. **4**, 364-400.

Stansfield, I. and Kelly, S. L. (1996) Purification and quantification of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome P450 in Yeast Protocols: *Methods in cell and Molecular Biology*. Evans, I. V. (Eds), pp.355-366Humana press Inc. Totowa, New Jersey.

Heller, W. and Forkmann, G. (1994) Biosynthesis of flavonoids in The Flavonoids. Advances in Research since 1986 Harborne, J. B.(eds), pp. 499-535, Chapman and Hall, London.

Harbone, J. R. B. and Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. Phytochem. **55**, 481-504.

Ingham J.L. (1990) A further investigation of phytoalexin formation in the genus *Trifolirum*. Z. Naturforsch. **45**, 829-834.

Jansen, M.A.K., Gaba, V., and Greenberg B.M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends in Plant Sci. **3**, 131 135.

Jung, W., Yu, O., Lau, S.-M. C., O'Keefe, D.P., Odell, J., Fader G., and McGonigle, B. (2000) Idenfitication and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nature Biotech. **18**, 208-212.

Lamb, C. and Dixon, R. A.(1997) The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **48**, 251-275.

Lee, S., Won, S.-H., Lee, B.-H., Park, H.-D., Chung, W.-I., and J. J. (2002) Genomic cloning and characterization of glutathione reductase gene from *Brassica campestris* var *Pekinensis*. Mol. Cells. **13**, 245 251.

Lewis D. F.V., and Sheridan G. (2001) Cytochromes P450, oxygen, and evolution. The Scientificworld. **1**, 151 167.

Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E., and Hahlbrock, K. (2000) UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. **97**, 1903 1907.

Ryan, K.G., Swinny, E.E., Markham, K. R., and Winefield C. (2002) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant Petunia leaves. Phytochem. **59**, 23 32.

Sawada, Y., Kinoshita, K., Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-i. (2002) Key amino acid residues required for aryl migration catalysed by the cytochrome P-450 2-hydroxyisoflavanone synthase. Plant J. **31**, 555-564.

Shimada, N., Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-I. (2000) Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular

characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. Plant Sci. **160**, 37-47.

Shure, M., Wessler, S., and Fedoroff, N. (1983) Molecular identification and isolfation of the waxy locus in maize. Cell **35**, 225 - 233.

Tebayashi, S-i., Ishihara, A., and Iwamura, H.(2001) Elicitor-induced changes in isoflavonoid metabolism in red clover roots. J. Exp. Bot. **52**, 681 689.

Winkel-Shirley, B. (2001) It takes a garden. How work in diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. Plant Physi. **127**, 1399-1404.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physio. **126**, 485-493.

제 3 장. 벼의 형질전환 및 형질전환체의 분석.

제 1 절. 서설.

Flavone은 phenylalanine과 malonyl-CoA를 시작 물질로 하여 생성되는 다양한 구조의 화합물들로 구성되어 있다. 이들은 chalcones, flavones, flavonols, flavandiols, anthocyanins, condensed tannins 등 여섯 개의 subgroup으로 나뉘어진다. 대부분의 식물은 flavone 합성을 통한 anthocyanin까지의 합성 경로를 가지고 있으나 대부분 두과작물에서만 isoflavone합성 경로가 발견된다Isoflavone은 두과 식물에서 phenylpropanpoid에서부터 합성되는 화합물로 그 구조와 생리적 활성이 다양한 것으로 알려져 있으며 두과 작물에서만 발견되는 것으로 알려져있다. 두과 작물에서 여러 병원체에 항생 효과가 있는 phytoalexin의 합성 또한 이 isoflavone들을 전구물질로 하여 만들어진다 (Dixon, 1996). 이러한 isoflavone은 isoflavone synthase라는 하나의 효소에 의해서 tlranfcpdptj 널리 발견되는 naringenin이라는 물질에 의해서 합성되는 것으로 알려져 있다. Isoflavone의 생합성은 flavanone 중간체로 부터 cytochrom P-450 계통의 isoflavone 합성 효소 (isoflavone synthase)에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 최근 들어, 몇 몇 두과 작물로부터 이 효소 유전자가 클로닝되었다 (Akashi, 1999; Jung, 2000). Isoflavone 합성 유전자가 존재하지 않는 애기 장대, 담배, 옥수수 등에 그 유전자를 도입한 결과 daidzein이나 genistein과 같은 isoflavone들을 만드는 것이 확인되었다 (Yu 등, 2000).

Isoflavone과 구조과 유사한 것으로 알려진 생체내의 물질인 에스트로젠은 세포내의 유전자 전사를 조절하는 것으로 알려져 있다. 대표적 isoflavone 화합물인 daidzein, genistein등은 에스트로젠(estrogenic), 항에스트로젠(antigiogenic), 항산화(antioxidant), 항암(anticancer) 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(Anderson, 1998; Arora, 1998; Fotsis, 1993; Kirk, 1998; Messina, 1994). 에스트로젠 효과에 의하여 폐경기 여성에서 관찰되는 골다공증, 심혈관질환등을 예

방하며, 항에스트로젠 효과에 의하여 자궁내막암의 발달없이 유방암을 예방하여 준다. 또한, 항산화 효과에 의하여 Alzheimer's disease 등에 의하여 발생되는 뇌 손상을 막아주는 역할을 담당한다. 남성들에 의하여 발생되는 전립선 암도 예방하여 주는 것으로 보고되고 있다. 특히, daidzin (daidzein의 glucoside conjugate 형태)은 alcohol 중독과 관련이 있는 human aldehyde dehydrogenase type I (ALDH-I)의 강력한 특이적, 비가역적 억제제(inhibitor)임이 밝혀져 있다. 이와 같이 두과 작물에서 합성되는 isoflavone류인 genistein과 daidzein은 유방암, 골다공증, 심혈관질환 등의 예방에 탁월한 기능을 같고 있는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)으로 알려져 있다. 이들은 대부분 두과 작물, 특히 대두와 red clover로부터 추출물 혹은 분말상으로 가공처리 되어 건강식품으로 시판되고 있다. 또한 이와 유사한 기능을 갖는 화학합성 의약품류인 타목시펜과 랄록시펜 등은 그와 관련한 여러 부작용에도 불구하고 병원에서 고가로 처방되고 있다. 대두의 대부분을 수입에 의존하고 있는 우리 나라에서, 만약 주곡작물인 벼에서 식물성 에스트로젠을 합성하여 이들이 함유된 쌀을 생산할 수 있다면 폐경기 여성에서 보는 여러 병리현상을 예방할 수 있을 뿐만 아니라 수입대체 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 isoflavone의 역할을 볼때 isoflavone을 일반 작물 특히 벼에 도입하여 만든다면 그 부가가치는 성인병예방이라는 측면에서 클 것으로 생각된다. 또한, isoflavone의 합성은 isoflavone synthase이라는 단 하나의 유전에 에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 대두에서 isoflavone 합성 유전자를 분리하여 이를 벼에 도입함으로써 생리활성 물질을 생산하는 새로운 품종을 만들어 내고자 한다.

제 2 절. 재료 및 방법.

1. IFS 발현을 위한 벼의 형질전환 벡터 제작.

RT-PCR로 얻은 cDNA를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR에 의해 증폭된 IFS (JA6)는 pGEMT-easy (promega) vector에 cloning 하였다. cloning 된 IFS (JA6)는 *Eco*RⅤ와 *Spe*Ⅰ으로 digestion하여 pBlueScript SK(-) vector에

subcloning 하였다. subcloning 된 IFS를 *Hin*dIII효소로 처리한 다음 Klenow를 사용하여 끝부분을 평활하게 만든다음 *Not* I 으로 절단하여 삽입될 유전자를 준비하였으며, 식물전체에 상당히 높은 양으로 발현할 수 있는 ubiquitin promoter를 가진 pMJU vector의 경우는 *Bam*HI를 처리한 다음 Klenow를 사용하여 끝부분을 평활하게 만든 후 *Not*I으로 절단하여 이를 미리 준비된 IFS 유전자 (JA6)를 서로 연결하여 벼의 형질전환용 vector를 제작하였다.

2. 종자에서 IFS유전자를 발현시키기 위한 벼의 형질전환 벡터 제작.

종자에서 IFS 유전자를 발현시키기 위해 래드클로바에서 클로닝한 RC-IFS (JA7)를 사용하였다. JA7 유전자를 endosperm-specific 프로모터인 glutelin를 가지고 있는 pSEC 19 vector로 클로닝하여 위하여 pSEC 19 vector는 *Bal*II로 digestion 한 다음 klenow 효소를 처리하여 끝부분을 평활하게 하였으며, 두 번째로 *Sac*I 효소로 digestion를 실시하였다. JA7 pSEC 19 vector는 *Eco*RV 효소로 처리한 다음 *Sac*I 효소를 처리하여 pSEC 19 vector과 연결하였다. 이렇게 연결된 plasmid (pSEC19-IFS)를 벼 형질전환용 vector인 pCAM-LA vector에 삽입하기 위하여 두 가지 방법을 사용하였다. 첫 번째는 glutelin 프로모터의 전체 부분 (5kb)을 삽입하였으며, 또 하나는 provitamin A를 rice에 발현시키기 위해 사용하였던 glutelin 프로모터의 partial (약 2kb)를 사용하여 삽입하였다. 첫 번째는 pSEC19-IFS와 pCAM-LA vector를 각각 *Hind*III와 *Sac*I으로 절단하였다. 이렇게 절단된 DNA조각을 연결하여 벼의 형질전환용 vector를 제작하였다. 두 번째는 전체 glutelin 프로모를 가진 벼의 형질전환용 vector에서 *Hin*dIII 와 *Eco*RI으로 절단하여 앞부분을 제거한 다음 이를 klenow 처리하여 양 말단을 평활하게 만들어 서로 연결하여 partial glutelin 프로모터를 가진 벼 형질전환용 vector를 제작하였다.

3. 벼의 형질전환.

가. pMJU vector에 삽입된 IFS를 사용한 벼의 형질전환.

벼 (낙동벼)의 껍질을 벗겨 낸 다음 99% ethanol 로 1분간 표면소독을 한 다음 증류수 2~3회 세척하였다. 2% 치아염소산 나트륨 (NaClO)에 담궈 30분간 shaking하면서 2차 표면소독을 실시하였다. 30분 후 clean bench에서 멸균수로 3~5회 정도 세척을 하였다. 세척이 끝나면 멸균된 filter paper 위에서 표면이 마르도록 충분히 건조하였다. 건조된 종자는 캘러스 유도배지 (2N6 medium)에 치상하여 28℃의 암 상태에서 3주간 배양하였다 (표 1). 3주후 유도된 캘러스는 다시 캘러스 유도배지에서 3일간 전배양을 실시하였다. 전배양한 캘러스를 agrobacterium과 함께 2N6-AS 배지에 치상하여 25℃의 암상태로 3일간 공존배양을 실시하였다. 공존배양한 캘러스를 250 ㎎/ℓ cefotaxime이 첨가된 멸균수로 3~5회 세척하여 agrobacterium을 제균 하였다. 제균한 캘러스는 filter paper 위에서 수분을 제거한 다음 형질전환 캘러스선발배지 (2N6-CP medium)에 치상하여 28℃암상태에서 3주간 배양하였다. 선발된 캘러스는 다시 재분화 유도배지 (MSKS-CP medium)로 옮겨주어 28℃의 밝은 상태에서 배양하였다. 3주후 다시 재분화 식물체형성배지 (MSF-CP)로 옮겨 3주간 28℃에서 배양하여 완전히 식물체를 재생하였다.

나. pCAM-LA (glutelin) vector에 삽입된 IFS를 사용한 벼의 형질전환.

캘러스 유도 방법, 전 배양 및 agrobacterium의 공존배양은 상기의 방법과 동일하게 실하였다. 공존배양한 캘러스를 250 ㎎/ℓ cefotaxime이 첨가된 멸균수로 3~5회 세척하여 agrobacterium을 제균하였다. 제균한 캘러스는 filter paper 위에서 수분을 제거한 다음 1차 형질전환 캘러스선발배지 (2N6-CH1 medium)에 치상하여 28℃암상태에서 10일간 배양하였다. 10일간 배양한 캘러스는 2차 선발배지인 2N6-CH2배지로 옮겨준 다음 3주간 2차 선발을 실시하였다. 이렇게 선발된 캘러스는 다시 재분화 유도배지 (MSKS-CH medium)로 옮겨주어 28℃의 밝은 상태에서 배양하였다. 3주후 다시 재분화 식물체형성배지 (MSF-CH)로 옮겨 3주간 28℃에서 배양하여 완전히 식물체를 재생하였다.

4. 형질전환체의 확인 및 IFS의 발현 검정.

가. pMJU vector에 삽입된 IFS (pMJU-JA6)가 형질전환된 형질전환체의 확인 및 IFS의 발현 검정.

형질전환된 벼의 잎으로 부터 Genomic DNA를 분리하였다 (Qigen plants Genomi kit). IFS의 도입여부는 PCR방법을 이용하여 확인하였다. 또한 IFS 유전자의 발현을 검정하기 위하여 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 Ominiscript transcriptase (Qiagen, Gaitherburg, MD, USA), 15 pmol of oligo $(dT)_{15,}$ 그리고 20 U of Rnasin (Promega, Madison, WI, USA)과 total RNA 2 ug이 포함된 반응에서 수행되었다. 얻어진 cDNA를 사용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 통해 IFS 유전자의 발현을 검정하였다. PCR 수행 방법은 다음과 같다. 사용된 효소는 hot start polymerase (Qiagen, Gaitherburg, MD, USA)이 었으며, 30 cycles (denaturation : 1 min at 94℃, annealing : 1 min at 55℃, amplification : 1.5 min at 72℃)을 수행하였다. 또한, PCR시 사용된 primer는 forward primer (5′-CGTGAGGAGGAGAAAGAACG-3′)과 reverse primer (5′-GCAGGAAACTCACGACAACA-3′)이었다.

형질전환체의 혈통을 확인하기 위하여 각각의 형질전환체의 gDNA를 JA6를 탐침으로 이용하여 southern blot을 수행하였다. 실험방법은 다음과 같다. 벼의 잎을 액체 질소 존재 하에 막자와 막자사발을 이용하여 분쇄 하였다. 분쇄된 시료를 DNeasy® Plant Mini Kit (QUIAGEN 사) 제품을 이용하여 벼의 DNA를 추출하였다. 추출된 각각의 genomic DNA의 농도를 일률적으로 15 mg으로 맞춘 후, 제한효소 *Bam*H1 (TaKaRa 사)을 이용하여 37℃에서 16시간 동안 배양 하여 genomic DNA를 절단하였다. 상기 시료를 0.8% agarose gel 전기영동을 수행한 후 denaturation 용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)을 이용하여 단일 가닥으로 만들었다. 곧바로 이어 중화 버퍼(pH 7.4의 1M Tris-HCl, 1.5M NaCl)를 이용하여 gel을 중화시킨 후 20×SSC 용액을 이용하여 HybonTM-N+ (Amersham 사)에 전이 하였다. JA6의 유전자를 이용하여 DNA와 [α-^{32}P] dCTP를 random priming 방법으로 표지하여 탐침자를 제작하여 PROBER™ (iNtRON 사) 제품으로 정제하였다. Membrane을 68℃의 prehybridization 용액 (6×SSC, 5×Denhardt, 0.5%

SDS)에 넣고, 100 ㎍/ml 연어 정자 DNA를 첨가하여 68℃에서 5시간 동안 교반하며 prehybridization 한 후 단일 가닥의 탐침자를 첨가하여 같은 조건에서 16시간 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 membrane을 2×SSC, 0.5% SDS 용액으로 상온에서 5분간 세척 후, 2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 65℃에서 15분간 두 번 세척하였다. 상기 membrane을 이용하여 X-ray필름에 -20℃에서 감광 하였다.

나. pCAM-LA (glutelin) vector에 삽입된 IFS (pCAM-LA-JA7)에 형질전환된 형질전환체의 확인.

Glutelin full promoter가 삽입되어있는 재조합체 15종과 partial promoter가 삽입되어있는 재조합체 15종을 선별하여 각각을 PCR을 수행하여 IFS (JA6)이 형질전환되었는지를 확인하였다. 사용된 primer는 forward primer (5′-CGTGAGGAGGAGAAAGAACG-3′)과 reverse primer (5′-CGAAGACAAATGGGAGATGA-3′)이 었으며 PCR 조건은 94℃ 1 min, 55℃ 1min, 72℃ 2min, 총 30 cycle을 반복하였다. 얻어진 PCR product는 1.5% agarose gel 전기영동을 수행하여 분석하였다.

형질전환체의 혈통을 확인하기 위하여 각각의 형질전환체의 gDNA를 JA7을 탐침으로 이용하여 southern blot을 수행하였다. 벼의 잎을 액체 질소 존재 하에 막자와 막자사발을 이용하여 분쇄 하였다. 분쇄된 시료를 DNeasy® Plant Mini Kit (QUIAGEN 사) 제품을 이용하여 벼의 DNA를 추출하였다. 추출된 각각의 genomic DNA의 농도를 일률적으로 15 mg으로 맞춘 후, 제한효소 *Bam*H1 (TaKaRa 사)을 이용하여 37℃에서 16시간 동안 배양 하여 genomic DNA를 절단하였다. 상기 시료를 0.8% agarose gel 전기영동을 수행한 후 denaturation 용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)을 이용하여 단일 가닥으로 만들었다. 곧바로 이어 중화 버퍼(pH 7.4의 1M Tris-HCl, 1.5M NaCl)를 이용하여 gel을 중화시킨 후 20×SSC 용액을 이용하여 Hybon™-N+ (Amersham 사)에 전이 하였다. JA7의 유전자를 이용하여 DNA와 [α-^{32}P] dCTP를 random priming 방법으로 표지하여 탐침자를 제작하여 PROBER™ (iNtRON 사) 제품으로 정제 하였다. Membrane을 68℃의 prehybridization 용액 (6×SSC, 5×Denhardt, 0.5% SDS)에 넣고, 100 ㎍

g/ml 연어 정자 DNA를 첨가하여 68℃에서 5시간 동안 교반하며 prehybridization 한 후 단일 가닥의 탐침자를 첨가하여 같은 조건에서 16시간 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 membrane을 2×SSC, 0.5% SDS 용액으로 상온에서 5분간 세척 후, 2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 65℃에서 15분간 두 번 세척하였다. 상기 membrane을 이용하여 X-ray필름에 -20℃에서 감광 하였다.

5. 형질전환체의 종자로부터 isoflavone 함량 검증.

벼 종자는 액체 질소에 넣고, 막자와 사발을 이용하여 미세하고 균일하게 분쇄되었다. 그 분쇄된 벼 종자 2 g을 50 ml 유리병에 넣고 80 % (v/v) methanol 10 ml을 첨가한 후 흔들어 섞어주었다. 80 W에서 10분 동안 고주파 분해가 수행되었고, 37℃에서 16시간 동안 진탕 배양 되었다. 이렇게 진탕 배양된 시료의 불용성 물질은 Whatman No.2 여과 종이를 이용하여 1차 여과되었고, 주사기여과지를 통해 다시 2차 여과 되었다. 이렇게 걸러진 시료에는 speed vacuum을 이용하여 10시간 동안 methanol이 증발되었다. methanol이 모두 증발된 시료에 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) 10 ml를 첨가되었고, celluase 200 units를 첨가되었다. 이것은 37℃에서 다시 16시간 동안 진탕 배양되었다. 배양된 시료는 ethyl acetate 4 ml로 추출하는 과정이 3반복 되었고, 그 후에 ethyl acetate는 증발 되었다. 이렇게 얻어진 시료는 acetonitrile 1 ml로 현탁 후 원심분리 과정을 거쳐서 HPLC 시료로 사용되었다.

준비된 시료와 대조구 (낙동벼, 낙동벼 + 0.5 mM genistein, 낙동벼 + 0.5 mM naringenin, 낙동벼 +naringenin과 genistein의 혼합액 0.5 mM)들은 다음과 같은 조건에서 분석되었다.

이렇게 준비한 시료들의 HPLC profile은 photodiode array(PDA)와 Sumi Chiral OA-7000 column (5 μm particle size, 4.6 mm × 25 cm, Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., Japan)이 장착된 Varian ProStar HPLC (Walnut Creek, C.A.)를 이용하여 분석되었다. HPLC 액체상의 조성은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0) (A)와 100 % acetonitile 용액 (B)로 구성되었다. 용출 방법은 초기에는 A:B의 비율을 90:10 (V/V)으로 컬럼의 평형을 맞

추었고 시작해서 10분 동안 A:B 비율을 70:30 (v/v)으로 용출시킨 후, 40분까지는 동안 40:60 비율을, 최종적으로는 55분까지 10:90 (v/v)이 되도록 전환시켜 주었으며 그 후 5분동안 90:10 (v/v)으로 용출시키는 과정으로 이루어 졌다. 유출속도는 1 ml/min로 유지 하였고, 모든 시료들은 270 nm에서 감시되었고, peak의 UV 스펙트럼은 200 nm에서 400 nm까지 기록되었다.

6. 형질전환체 근권의 미생물상 조사.

가. 박테리아 도말용 배지 준비.

박테리아 도말용 배지는 3 g tryptic soy broth, 15 g agar를 1 L의 멸균수에 녹인 후 autoclave 처리하여, 이것을 중탕기에서 56℃까지 식힌 후 cycloheximide stock 용액 (200 mg/ml) 1 ml을 첨가하고 잘 혼합, 분주하여 준비하였다. 토양의 희석을 위한 0.85 % saline 희석수는 8.5 g NaCl를 1 L의 멸균수에 녹인 후 autoclave 처리하여 준비하였다.

나. 곰팡이 도말용 배지 준비.

곰팡이 도말용 배지는 20 g malt extract, 0.2 g chloramphenicol, 15 g agar를 1 L의 멸균수에 녹인 후 autoclave 처리하고 분주하여 준비하였다.

다. Actinomycetes 도말용 배지 준비.

Actinomycetes 도말용 배지는 0.2 g sodium caseinate, 0.5 g K_2HPO_4, 0.41 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.017 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 15 g agar를 1 L의 멸균수에 녹인 후 pH 6.5로 적정하고 autoclave 처리한 후 분주하여 준비하였다.

라. 각각의 세포 배양 방법.

두 개의 토양 시료를 각각 10g씩 취하여 95ml의 0.85% saline 희석수에 넣은 후, 1ml를 취하여 새로운 9ml의 saline 희석수에 넣어 희석하였다. 이렇게 일련의 10배 희석수를 만들어 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}배의 희석용액을 만들었다. 이중

10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} 배로 희석한 용액에서 0.1ml를 취하여 각 종류의 배지 (박테리아 도말용 배지, 곰팡이 도말용 배지, actinomycete 도말용 배지)에 3번 씩 접종하였다. 접종된 배지들은 모두 상온에서 정치 배양하였으며, 박테리아 도말용 배지와 곰팡이 도말용 배지는 1주일간, actinomycete 도말용 배지는 2주일간 배양하였다. 각 배지에 자란 군락의 개수를 세어 희석 배수의 역수를 곱한 후 시료의 질량으로 나누어 토양 1g당 미생물의 수를 측정하였다.

7. 형질전환체가 질소고정균에 미치는 영향을 조사.

가. 질소 고정균 도말용 배지 준비.

질소 고정균 도말용 배지는 다음과 같은 방법으로 준비되었다. 10 g mannitol, 0.5 g K_2HPO_4, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g NaCl, 0.01 g $CaCO_3$, 0.2 g yeast extract, 15 g agar를 1 L의 멸균수에 녹인 후 autoclave 처리하여, cycloheximide stock 용액 (200 mg/ml) 1 ml을 첨가하고 잘 혼합, 분주하여 준비하였다.

나. 질소고정균 배양 방법.

두 개의 토양 시료를 각각 10g씩 취하여 95ml의 0.85% saline 희석수에 넣은 후, 1ml를 취하여 새로운 9ml의 saline 희석수에 넣어 희석하였다. 이렇게 일련의 10배 희석수를 만들어 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}배의 희석용액을 만들었다. 이중 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} 배로 희석한 용액에서 0.1ml를 취하여 질소 고정균 도말용 배지에 3번 씩 접종하였다. 접종된 배지들은 상온에서 정치 배양하였으며, 질소 고정균 도말용 배지는 3일간 배양하였다. 각 배지에 자란 군락의 개수를 세어 희석 배수의 역수를 곱한 후 시료의 질량으로 나누어 토양 1g당 미생물의 수를 측정하였다.

Medium	Composition
2N6	N6 major salts, N6 minor salts, N6 vitamins, 1g/L casmino acids, 30g/L sucrose, 2mg/L 2,4-D, 2.878mg/L proline, 2g/L Gelite, pH 5.8
AAM	AA salts and amino acids, MS vitamins, 500mg/L casamino acids, 68.5g/L sucrose, 36g/L glucose, 100uM acetosyringone, pH 5.2
2N6-AS	2N6 medium plus 10g/L glucose and 100uM(20mg) acetosyringone, pH 5.2
2N6-CP	2N6 medium plus 250mg/L cefotaxime and 7mg/L phophinotricin, pH 5.8
MSKS-CP	MS salts and MS vitamins, 30g/L sucrose, 30g/L sorbital, 2g/L casamino acid, 11g/L(5mM) MES, 4g/L Gelite, pH5.8, 2mg/L NAA, 1mg/L kinetin, 250mg/L cefotaxime, 7mg/L phosphinotricin
MSF-CP	MS medium plus 250mg/L cefotaxime and 7mg/L phosphinotricin, pH 5.8, 8g/L agar

표 1. pMJU-JA6를 아그로박테리움을 이용하여 낙동벼에 형질전환하기 위하여 사용된 배지의 조성.

Medium	Composition
2N6-CH1	2N6 medium plus 250mg/ℓ cefotaxime and 50mg/ℓ hygromycinep H 5.8
2N6-CH2	2N6 medium plus 250mg/ℓ cefotaxime and 250mg/ℓ hygromycine pH 5.8
MSKS-CH	MS salts and MS vitamins, 30g/L sucrose, 30g/L sorbitol, 2g/L casamino acid, 11g/L (5mM) MES, 4g/L Gelite. pH 5.8, 2mg/L NAA, 1mg/L kinetin, 250mg/L cefotaxime, 250mg/L hygromycine
MSF-CH	'MS medium plus 250mg/L 250mg/L cefotaxime and 250mg/L hygromycine, pH 5.8 8g/L agar

표 2. pCAM-LA-JA7을 아그로박테리움을 이용하여 낙동벼에 형질전환하기 위하여 사용된 배지의 조성.

제 3 절. 결과 및 고찰.

1. 형질전환 벡터 제작 및 식물체로의 도입

가) 형질전환 벡터 제작

Subcloning 된 IFS유전자 (JA6)를 이용하여 벼의 전조직 및 기관에 골고루 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 장점을 가진 ubiquitin 프로모터와 bar gene selection 마커를 가지고 있는 pMJU vector로 IFS 유전자를 도입하기로 결정하였다 (그림 1). IFS의 pMJU 벡터로의 도입여부는 제한효소 *Sma*I과 *Not*I 으로 DNA를 절단하여 확인한 결과 IFS 유전자가 삽입이 되었음을 확인하였다 (그림 2). 이렇게 제작된 vector는 freezer and thaw 방법을 사용하여 Agrobacterium에 도입하여 형질전환에 사용하였다.

나) 벼의 형질전환.

껍질을 벗겨낸 약 100개의 낙동벼를 2N6배지에 치상하여 28℃의 암상태에서 3주간 배양하여 형질전환에 사용하기 위한 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스는 유백색의 캘러스만을 따로 모아 2N6배지에서 3일간 전 배양단계를 거쳐 형질전환에 사용하였다. agrobacterium과 3일간의 공조배양을 거쳐 형질전환 선발배지 (2N6-CP)에 90개의 캘러스를 옮겨 주어 28℃의 암상태에서 3주간 배양하였다. 3주후 40개 정도가 선발배지에서 갈변되지 않고 새로운 생장을 보였으며 (그림 3-C), 나머지의 캘러스는 모두 갈변되거나 생장을 보이지 않았다. 새로운 생장을 보이는 캘러스는 식물체 분화 유도 (MSKS-CP)배지로 옮겨 3주간 배양하였다. 약 2주후부터 캘러스가 연녹색을 보이며 식물체로 분화가 일어나는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 이 배지에서 3주정도 지나면 완전한 식물체로의 재생이 일어나는 것을 관찰 할 수 있으며, 식물체가 완전히 분화하지 않은 캘러스는 MSF-CP배지에 옮겨 주면 약 10일 후부터 식물체가 왕성하게 분화하는 것을 관찰 할 수 있다 (그림 3-D). 분화된 식물체는 배양병으로 옮겨 주었다 (그림 3-E). 배양병에 옮긴 후 2주 정도 지난 식물체는 3일간의 순화를 거쳐 토양에 이식하

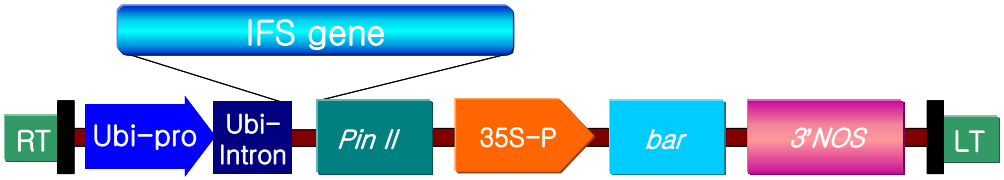


그림 1 . IFS (JA6) 유전자를 벼 형질전환에 사용하기 위하여 선택된 pMJU 백터의 간략도. (Ubi-pro : ubiquitin promoter; Uni-intron : ubiquitin intron; *Pin* II : terminator; 35S-p : 35S promoter; bar : bar gene; 3'NOS : nos-terminator)

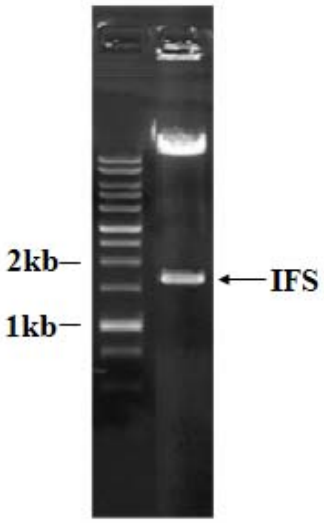


그림 2. IFS (JA6)유전자가 삽입된 pMJU-JA6 recombinant의 1% agarose 전기영동 결과. 상기 재조합체는 *Sma*I/*Not*I으로 잘려졌다.

였다(그림 3-F). 이식한 식물체는 20일 주기로 2-3회 복합비료를 시비하였다.

2. 종자 특이적 프로모터 제작

벼의 종자에서 많은 양의 RC-IFS 유전자를 발현시키기 위하여 full length glutelin 프로모터를 가지고 있는 pSEC19 vector에 RC-IFS를 도입하였다. RC-IFS와 full length glutelin 프로모터 (5kb)를 hygromycine gene selection 마커를 가지고 있는 변형된 pCAM-LA vector에 도입하였다 (그림 4-A). RC-IFS의 변형된 pCAM-LA 벡터로의 도입여부는 제한효소 *Eco*RI(lane 1), *Hin*dIII/*Kpn*I (lane 2) 혹은 *Hin*dIII/*Sac*I (lane 3)으로 DNA를 절단하여 확인하였다 (그림 5-A).

도입된 형질전환벡터를 이용하여 provitamin A 발현에 사용된 partial 프로모터영역 (2kb)만을 사용한 형질전환벡터를 제작하였다 (그림 4-B). partial Glutelin 프로모터와 RC-IFS 유전자의 도입 여부는 제한효소 *Hin*dIII와 *Sac*I으로 DNA를 절단하여 확인하였다 (그림 5-B). 이렇게 제작된 vector는 freezer and thaw 방법을 사용하여 Agrobacterium 에 도입하여 형질전환에 사용하였다.

3. pMJU-JA6가 형질전환된 형질전환체의 확인.

pMJU-IFS construct로 형질전환된 벼에서 Genomic DNA를 분리하여 IFS full length 유전자가 삽입되었는지의 여부를 PCR로 확인하였다. 그 결과 8개의 형질전환체중 7개의 식물체에서 IFS 유전자를 가지고 있음을 확인하였다 (그림 6). 형질전환체의 유전자 copy 수, 같은 형질전환체인지 등을 확인하기 위하여 southern blot을 수행한 결과, PCR로 확인된 7종 모두에서 유전자가 삽입되었음을 확인 할 수 있었고, 이 중 3번으로 명명된 형질전환체만이 다른 형태로 삽입된 형질전환체 임을 확인 할 수 있었다.

4. pMJU-JA6가 형질전환된 형질전환체에서 IFS의 발현검정

3. 에서 확인된 7개의 형질전환된 벼에서 IFS유전자의 발현은 RT-PCR에 의해 조사되었다. 7개의 잎에서 total RNA를 추출하여 발현을 확인하였다 (그림 7).

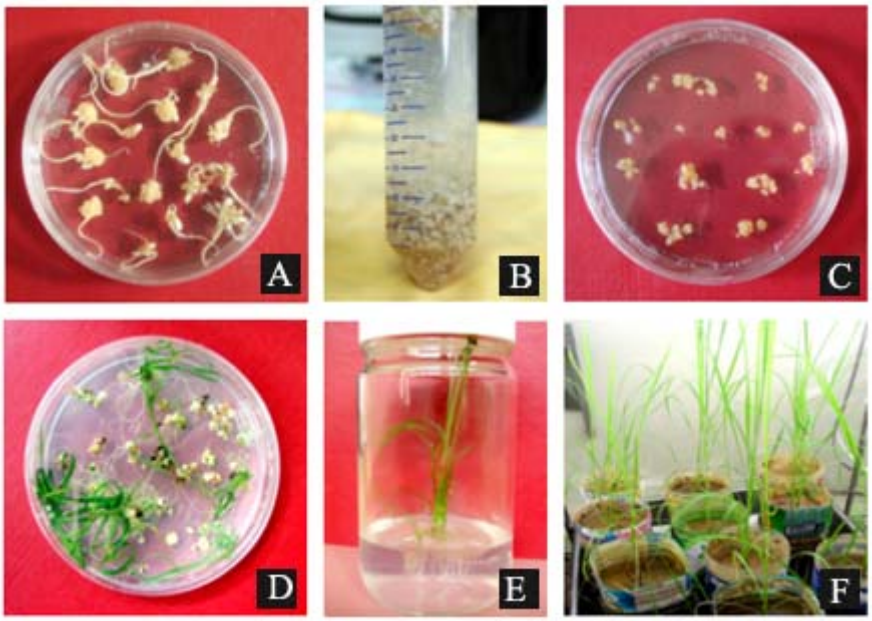


그림 3. 벼 세포로부터 IFS 유전자가 형질전환되어 재생산된 형질전환체의 사진.

A: 낙동벼 (Oryza sativa)로부터 callus의 유도.

B: pMJU-JA6를 함유하고 있는 아그로박테리움을 이용한 callus 감염 사진.

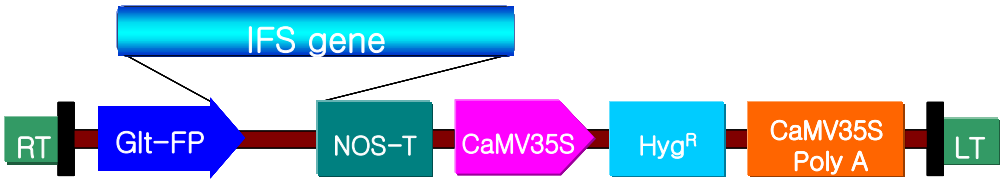
C: Ppt에 저항성을 보이는 형질전환체의 선별.

D: Callus로부터 생성된 ppt에 저항성을 보이며 분화되어 생성된 녹색을 띈 새싹.

E: pMJU-JA6를 함유하고 있는 아그로박테리움을 감염시킨 후 10주 동안 배양된 벼.

F: 형질전환이후 15주후 토양에 직접 옮겨 심어 배양중인 형질전환된 벼.

A



B

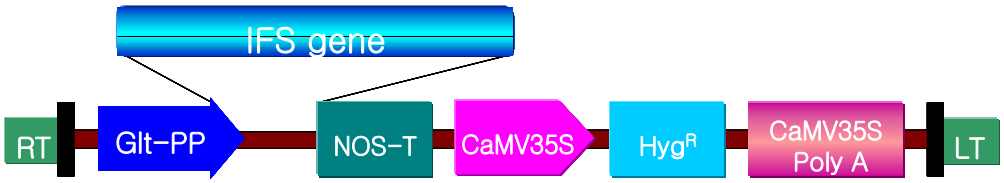


그림 4. IFS (JA7) 유전자를 벼 형질전환에 사용하기 위하여 선택된 pCAM-LA 백터의 간략도. A는 glutelin full promoter가 삽입되어 있는 것이고 B는 glutelin partial promoter가 삽입되어 있는 것이다 (Glt-FP : Glutelin full promoter; NOS-T : NOS-terminator; HygR : hygromycine resistance; CaM35S poly A : 35S terminator).

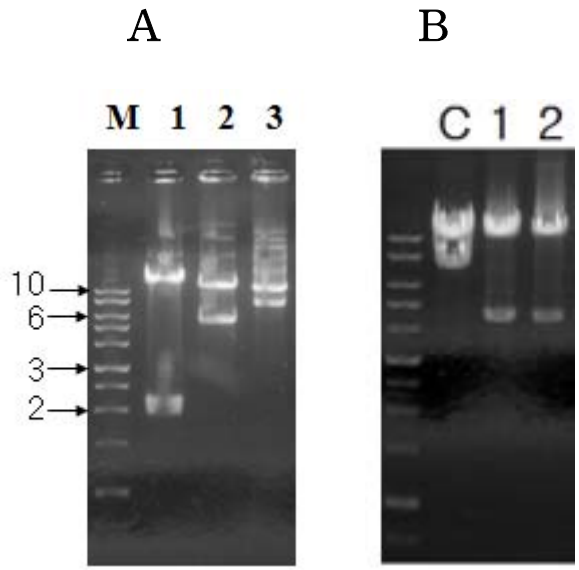


그림 5 . 재조합체 pCAM-LA-JA7의 0.8% agasore gel 전기영동 결과.

A : Glutelin full promoter가 삽입되어 있는 pCAM-LA-JA7

(M: marker 1 : *Eco*RI, 2: *Hin*dIII/*Kpn*I, 3: *Hin*dIII/*Sac*I)

B : Glutelin partial promoter가 삽입되어 있는 pCAM-LA-JA7

(C : control (Glutelin full promoter), 1 and 2 : *Hin*dIII/*Sac*I)

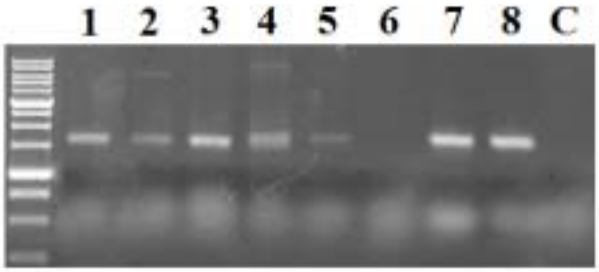


그림 6. pMJU-JA6가 형질전환된 8종의 형질전환체의 PCR 분석 (1.5% agarose gel 전기영동; Line 1-8: 각각의 형질전환체, C; 대조구)

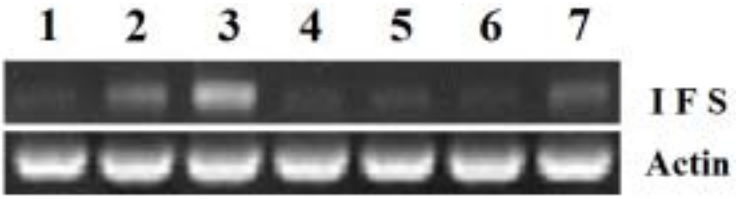


그림 7. RT-PCR을 이용한 pMJU-JA6가 형질전환된 7종의 형질전환체 내의 IFS 발현 분석.

위에서 확인된 7개의 형질전환체들은 발현양에는 차이가 있지만, 모두 IFS유전자를 발현하고 있는 것으로 나타났다. 특히, 3번으로 명명된 형질전환체의 경우 생성된 IFS mRNA의 양이 다른 것에 비하여 많이 발현되는 것을 확인하였다.

5. pCAM-LA-JA7이 형질전환된 형질전환체의 확인.

pCAM-LA-JA7 construct로 형질전환된 벼에서 Genomic DNA를 분리하여 IFS full length 유전자가 삽입되었는지의 여부를 PCR로 확인하였다. Glutelin full promoter (IF)가 삽입되어 있는 16종의 형질전환된 벼 (그림 8), partial promoter (IP)가 삽입되어 있는 16종의 형질전환된 벼 (그림 8)로부터 gDNA를 추출하여, JA7 유전자가 형질전환되었는지를 확인한 결과 IF 16종 (그림 9-A), IP 16종 (그림 9-B) 모두 IFS 유전자 (JA7)이 형질전환되었음을 확인하였다. 또한, 같은 종인지의 여부를 확인하기 위하여 각각의 형질전환체의 gDNA를 분리한 후 이를 이용 southern blot을 수행한 결과, IF의 경우는 15종의 형질전환체 중 유전자가 확인 된 것이 9종이었으며 (그림 10-A), 이 중 9번, 12번의 경우는 다른 계통일 것으로 예상되었다. IP (그림 10-B)의 경우는 16종 중 11종이 확인되었으며, 이 중 5번, 16번의 경우는 다른 계통일 것으로 예상되었다. IF와 IP 두 종류의 형질전환체 모두 PCR에서는 각각 16종 모두 IFS 유전자가 삽입된 것으로 나타났으나, southern blot의 경우는 IF는 9종, IP는 11종만이 나타난 것으로 판단하여 IFS 유전자를 이용한 southern blot에서 유전자가 없는 것으로 나타난 형질전환체의 경우는 제외하였다.

6. pMJU-JA6가 형질전환된 형질전환체의 isoflavone 함량 조사.

2003년의 기상이변으로 인하여 벼의 생육에 치명적인 결함을 초래하였다. 벼의 생육은 정상적인 것으로 보였으나, 일조량의 부족과 갑작스러운 냉해로 말미암아 종실의 맺힘에 있어서 결함을 초래하였다. 즉, 종실의 생성이 일어나지 않고 쭉정이 상태를 형성하였으며, 줄기와 잎도 냉해를 입었다. 따라서, 분석을 할 수 없었다 (그림 11). 그림 11에서 볼 수 있듯이, 잎사귀는 냉해로 말미암아 모두 말라버렸고, 종실또한 일조량의 부족으로 쭉정이 상태를 보였다.

7. pMJU-JA6의 새로운 형질전환 및 형질전환체 확인.

종실이 맺히지 않는 결과로 말미암아, pMJU-IFS construct를 이용하여 새로운 형질전환을 시도하였다. 그 결과, 새로운 형질전환체 15종을 얻었으며, 이 들 각각으로부터 소량의 잎사귀를 채취하여 gDNA를 분리하였다. IFS 유전자가 삽입되었는지의 여부를 PCR로 확인하였다. 그 결과 15개의 형질전환체중 4개의 식물체에서 IFS 유전자를 가지고 있음을 확인하였다 (그림 12-A). 상기 형질전환체의 계통을 확인하기 위하여 southern blot을 수행한 결과 (그림 12-B), 4종 모두 IFS 유전자가 삽입된 것을 확인 할 수 있었으며, 4종이 같은 계통일 것으로 예측되었다.

8. pMJU-JA6가 형질전환된 새로운 형질전환체의 isoflavone 함량 조사.

새로운 형질전환체 4종 (그림 13)에 대하여 분석하고자 하였으나 상기 4종의 형질전환체도 역시 종실을 맺지 못하였다. 온실에서 배양하였고, 벼의 생육에 있어서는 최적의 조건을 맞추어 주었으므로 특별한 문제점은 발견되지 않았다. 하지만, 종실이 맺혀지지 않음으로 isoflavone의 함량분석을 실시 할 수 없었다.

9. pCAM-LA-JA7이 각각 형질전환된 형질전환체의 isoflavone 함량 분석.

종실에서 특이하게 발현되는 프로모터를 가진 pCAM-LA-JA7 (그림 8)이 형질전환된 형질전환체에서 종실이 생성되었다. 생성된 종실을 이용하여 isoflavone의 함량을 분석하였다. 먼저 대조구로서 낙동벼 (그림 14-A), 낙동벼 + 0.5 mM narnigenin (그림 14-B), 낙동벼 + 0.5 mM genistein (그림 15-A), 낙동벼 + 0.5 mM naringenin과 genistein의 혼합액 (그림 15-B)을 이용하여 HPLC를 수행하여 표준화 한 후, IF가 형질전환된 벼 9종류의 종실 (그림 16-A)과 IP가 형질전환된 벼 11종 (그림 16-B)에 대하여 isoflavone인 genistein의 생합성 유무를 각각 조사하였다. IF와 IP 모두 flavone인 naringenin으로부터 isoflavone인 genistein을 모우 생합성하는 것으로 나타났다. 생합성된 genistein의 양은 IF는 7.2 ㎍/g seed, IP는 6.3 ㎍/g seed로 각각 나타났다.

그림 8. pCAM-LA-JA7이 형질전환된 벼 사진 (IF : glutelin full promoter, IP : glutelin partial promoter).

A.

B.

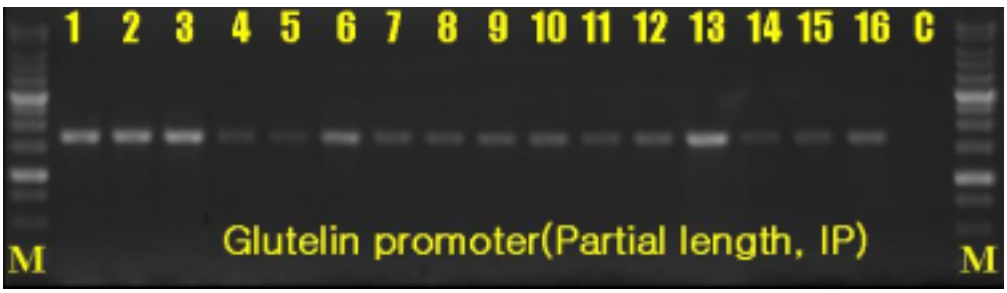
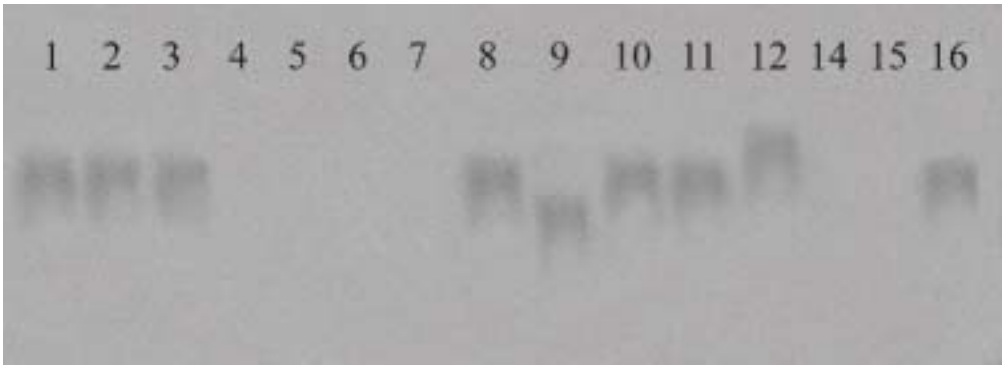


그림 9. pCAM-LA-JA7이 형질전환된 16종의 형질전환체의 PCR 분석 결과 A. Glutelin 전체 promoter가 삽입된 재조합체. B. Glutelin 일부 promoter가 삽입된 재조합체 (1.5% agarose gel 전기영동; Line 1-16: 각각의 형질전환체, C; 대조구, M: morcular weight marker)

A



B

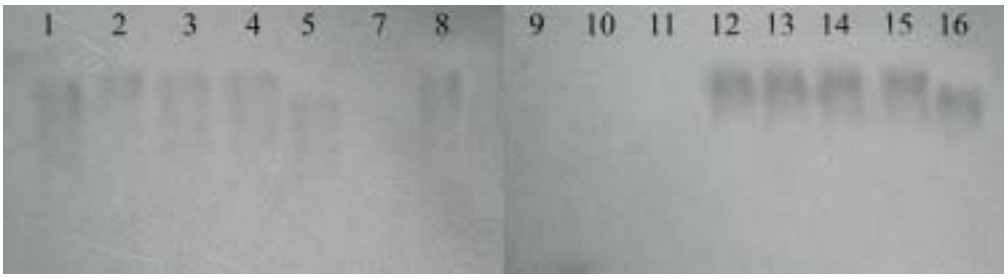


그림 10. pCAM-LA-JA7이 형질전환된 16종의 형질전환체의 Southern blot 분석 결과. A. Glutelin 전체 promoter가 삽입된 재조합체. B. Glutelin 일부 promoter가 삽입된 재조합체.

그림 11. pMJU-JA6가 형질전환된 형질전환체의 종실이 맺힌 후의 사진.

A

B

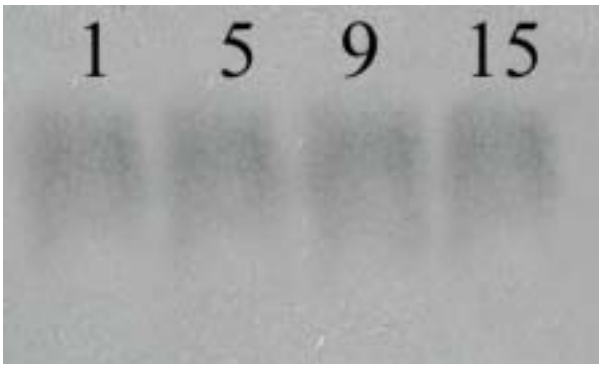


그림 12. pMJU-JA6가 형질전환된 15종의 형질전환체의 PCR 분석 결과 (A) 및 southern blot 수행결과.
(1.5% agarose gel 전기영동; Line 1-15: 각각의 형질전환체, C; 대조구, M: morcular weight marker)

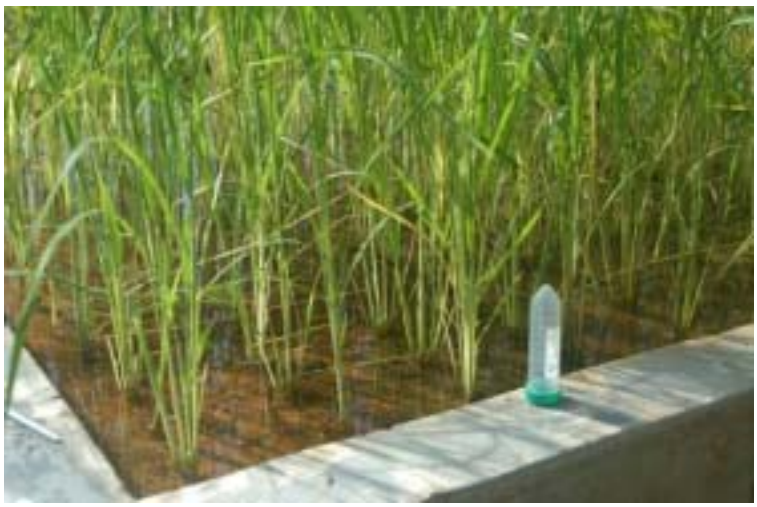
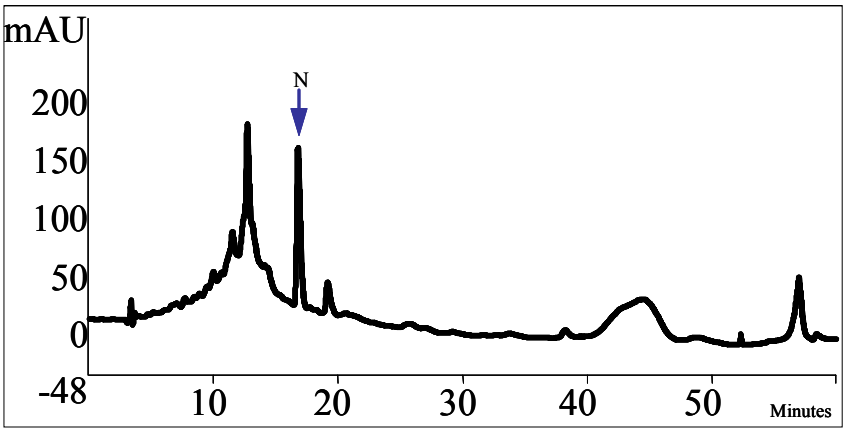


그림 13. pMJU-JA6를 다시 형질전환하여 양육중인 형질전환 벼의 사진.

A



B

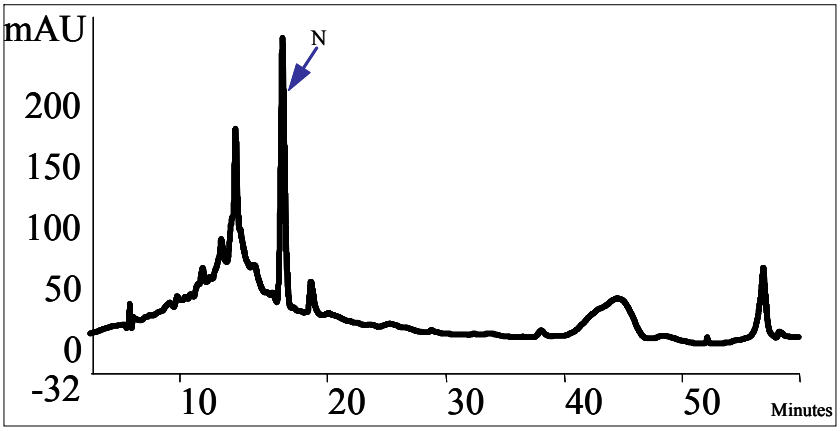
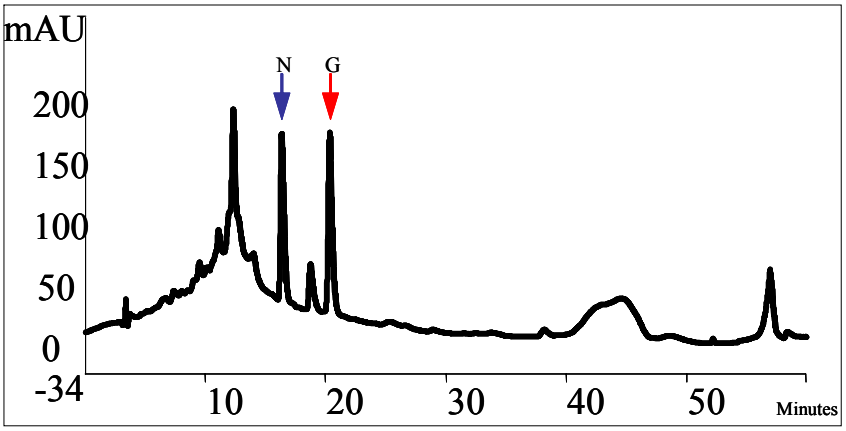


그림 14. 낙동벼 대조구의 HPLC 흐름도.

A) 낙동벼 대조구 종실 자체의 HPLC 흐름도. B) 낙동벼 종실에 internal standard로 0.5 mM genistein을 첨가한 HPLC 흐름도. N은 naringenin을 나타냄.

A



B

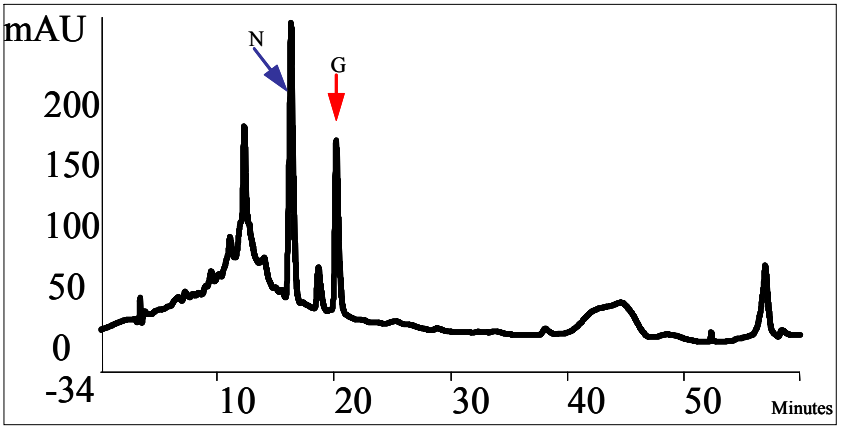
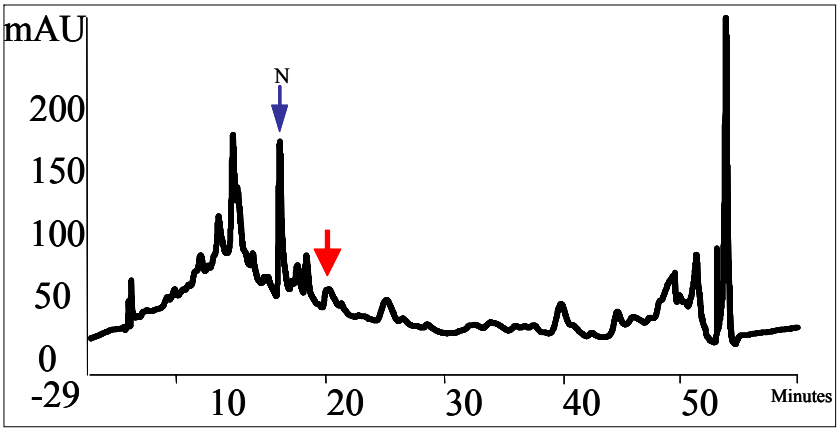


그림 15. 낙동벼 대조구의 HPLC 흐름도.

A) 낙동벼 종실에 internal standard로 0.5 mM naringenin을 첨가한 HPLC 흐름도. B) 낙동벼 종실에 internal standard로 0.5 mM genistein과 0.5 mM naringenin을 첨가한 HPLC 흐름도. N은 naringenin, G는 genistein을 나타냄.

A



B

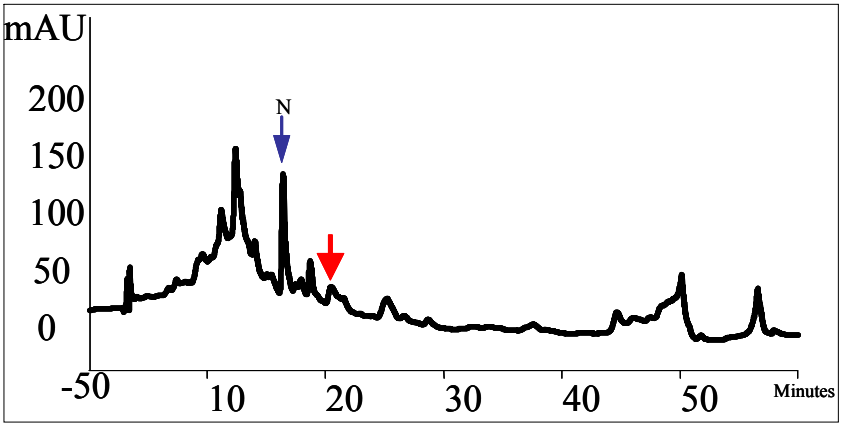


그림 16. 종실특이적 발현 프로모터가 형질전환된 낙동벼의 HPLC 흐름도.
A) IF가 형질전환된 낙동벼의 HPLC 흐름도. B) IP가 형질전환된 낙동벼의 HPLC 흐름도. N은 naringenin, ↓(red-arrow)는 생합성된 물질(genistein으로 추정).

10. 형질전환체 근권 미생물상 조사.

가. 박테리아.

대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 박테리아만을 분리배양하여 본 결과, 그림 17에서 볼 수 있듯이, 대조구에서는 $6\pm3\times10^6$ cfu (colony forming unit)/g wet soil의 박테리아 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $10\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $8.5\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $7\pm3\times10^6$ cfu/g wet soil 의 박테리아 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 박테리아의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다.

나. 곰팡이.

대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 곰팡이류만을 분리배양하여 본 결과, 그림 18에서 볼 수 있듯이, 대조구에서는 1×10^5 cfu/g wet soil의 곰팡이류 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 4×10^5 cfu/g wet soil, IF에서는 3×10^5 cfu/g wet soil, IP에서는 6×10^5 cfu/g wet soil 의 곰팡이류 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 곰팡이류의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다.

다. Actinomycetes.

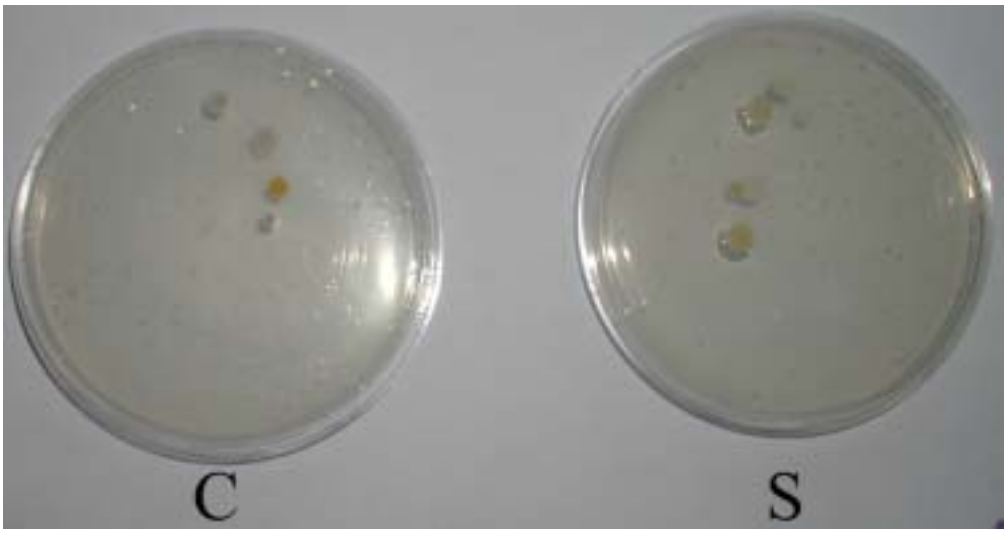
대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 actinomycetes만을 분리배양하여 본 결과, 그림 19에서 볼 수 있듯이, 대조

구에서는 1×10^6 cfu/g wet soil의 actinomycetes 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 1×10^6 cfu/g wet soil, IF에서는 2×10^6 cfu/g wet soil, IP에서는 2×10^6 cfu/g wet soil 의 actinomycetes 수를 확인 할 수 있었다. 대조구보다 형질전환된 벼에서 약간 증가된 진균류를 확인 할 수 있었다.

11. 형질전환체가 질소고정균에 미치는 영향 조사.

벼에 IFS 유전자가 삽입되어 발현이 되어 isoflavone 류를 생성하게 되면 질소고정균 상의 변화도 나타날 수 있다. 따라서, 이를 확인하기 위하여 근권내의 질소고정균류의 차이를 살펴보았다. 그림 20에서 볼 수 있듯이, 대조구에서는 $3\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $18\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $16\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $8\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균을 확일 할 수 있었다. pMJU 백터를 이용한 경우가 질소고정균의 개체수가 가장 많은 것으로 나타났다. 이는 pMJU의 프로모터가 모든 조직에서 발현 될 수 있는 특성을 지닌 것이기 때문에 IFS가 모든 조직에서 발현이 되어 특히 뿌리 조직에서도 발현이 되어 질소고정균류가 근권내에 좀 더 많은 양으로 존재하게 한 것으로 판단된다. 반면에, IF의 경우는 pMJU를 사용하였을 때보다 적은 콜로니가 형성되었으나, IP에 비하여 많은 양이 있는 것으로 확인되었다.

A

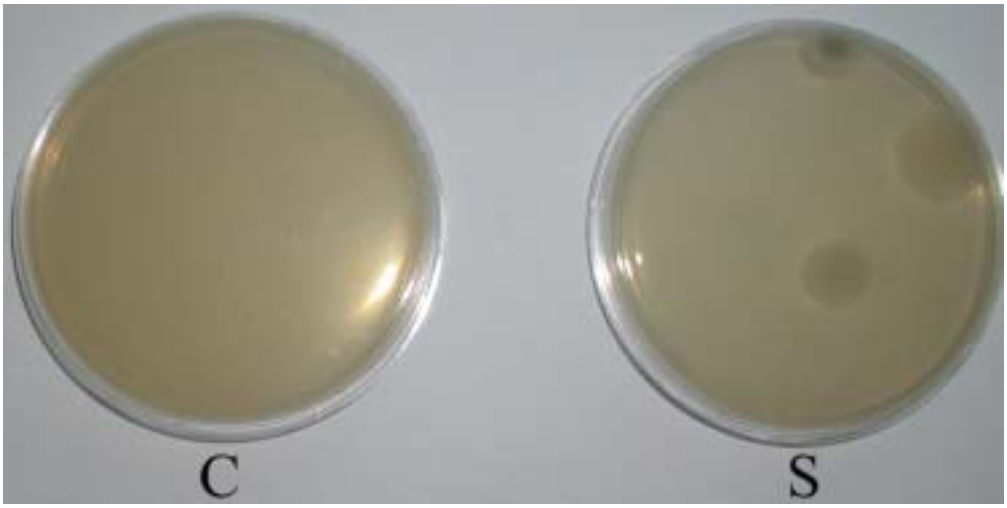


B

	박테리아류 개체수
낙동벼 control	$6\pm3\times10^{6}$ cfu/g wet soil
pMJU-JA6	$10\pm1.5\times10^{6}$ cfu/g wet soil
IF	$8.5\pm1.5\times10^{6}$ cfu/g wet soil
IP	$7\pm3\times10^{6}$ cfu/g wet soil

그림 17. 10^{-5} 희석하여 배양 후 생성된 박테리아류 (A)와 각각의 형질전환체에서 생성된 박테리아류의 평균 개체수 (B). C: 낙동벼 대조구, S: IF가 형질전환된 형질전환체.

A

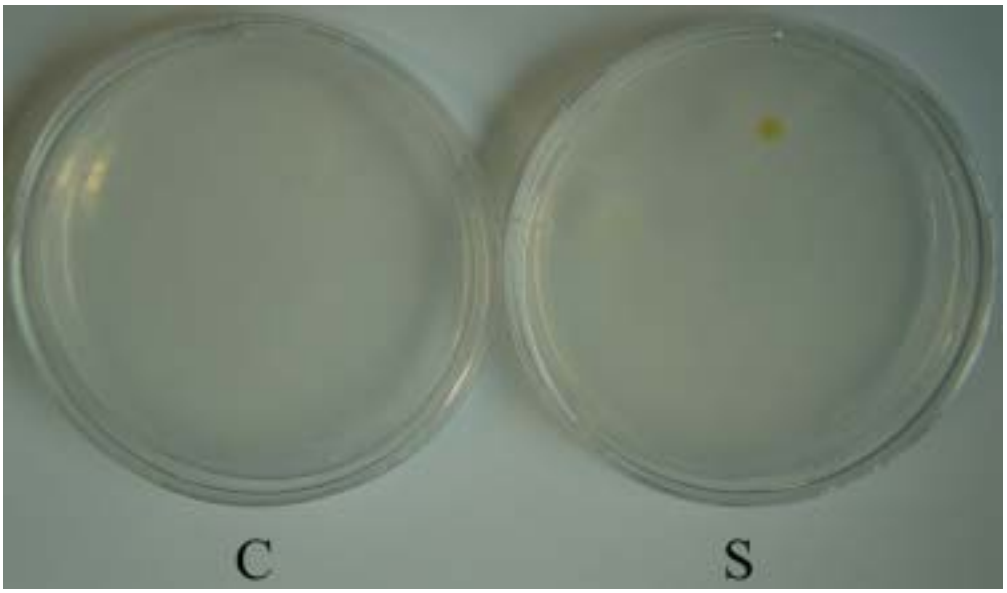


B

	곰팡이류 개체수
낙동벼 control	1×10^5 cfu/g wet soil
pMJU-JA6	4×10^5 cfu/g wet soil
IF	3×10^5 cfu/g wet soil
IP	6×10^5 cfu/g wet soil

그림 18. 10^{-5} 희석하여 배양 후 생성된 곰팡이류 (A)와 각각의 형질전환체에서 생성된 곰팡이류의 평균 개체수 (B). C: 낙동벼 대조구, S: IF가 형질전환된 형질전환체.

A

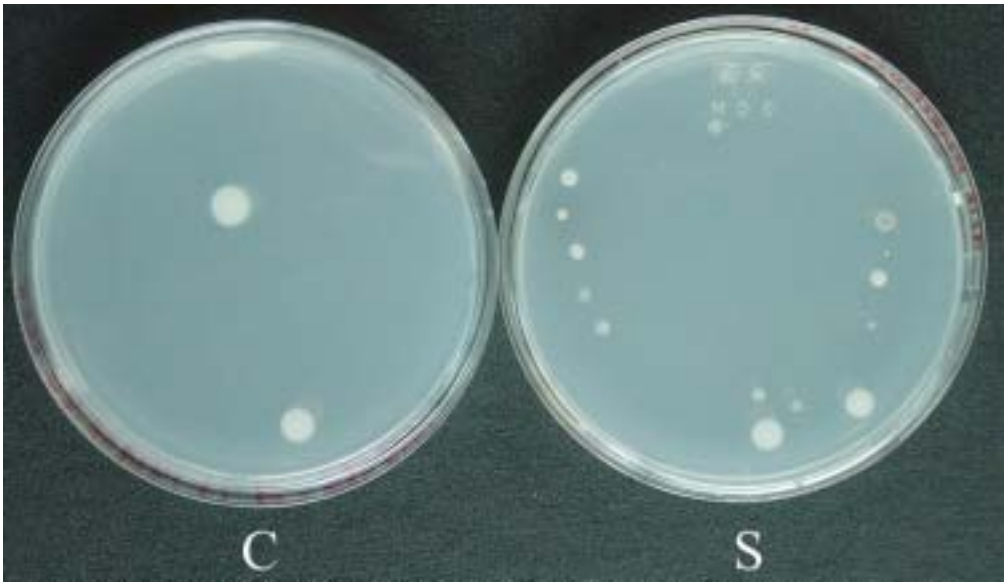


B

	진균류 개체수
낙동벼 control	1×10^{6} cfu/g wet soil
pMJU-JA6	1×10^{6} cfu/g wet soil
IF	2×10^{6} cfu/g wet soil
IP	2×10^{6} cfu/g wet soil

그림 19. 10^{-6} 희석하여 배양 후 생성된 진균류 (A)와 각각의 형질전환체에서 생성된 진균류의 평균 개체수 (B). C: 낙동벼 대조구, S: IF가 형질전환된 형질전환체.

A



B

	질소고정균류 개체수
낙동벼 control	$3\pm1\times10^{6}$ cfu/g wet soil
pMJU-JA6	$18\pm4\times10^{6}$ cfu/g wet soil
IF	$16\pm4\times10^{6}$ cfu/g wet soil
IP	$8\pm1\times10^{6}$ cfu/g wet soil

그림 20. 10^{-6} 희석하여 배양 후 생성된 질소고정균류 (A)와 각각의 형질전환체에서 생성된 질소고정균류의 평균 개체수 (B). C: 낙동벼 대조구, S: IF가 형질전환된 형질전환체.

제 4 절. 결론.

주곡작물인 벼에서 식물성 에스트로젠을 합성하여 이들이 함유된 쌀을 생산할 수 있다면 인간, 특히 여성의 여러 병리현상을 예방할 수 있을 뿐만 아니라, 대두와 같은 식물의 수입대체 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 isoflavone의 역할을 볼때 isoflavone을 일반 작물 특히 벼에 도입하여 만든다면 그 부가가치는 성인병예방이라는 측면에서 클 것으로 생각된다. 따라서, isoflavone synthase 유전자를 벼에 형질전환하여 얻어진 형질전환체의 분석 결과는 다음과 같다.

1. 벼에서 isoflavone synthase 유전자를 발현하기 위해서 벼 형질 전환 벡터 3종류를 만들었다. 첫 번째 종류는 isoflavone synthase유전자를 maize ubiquitin promoter에 연결하여 모든 조직에서 isoflaovne synthase유전자가 발현하게 하였다. 나머지 두 종류는 glutein promoter를 사용하였는데 이는 종자에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 유전자의 promoter들이다.

2. pMJU-JA6의 형질전환체를 8개를 얻었다. 이를 이용하여 각각의 형질전환체로부터 IFS 유전자가 삽입되었는지 확인한 결과, 8종 중 7종에서 IFS 유전자가 삽입된 것을 확인 할 수 있었으며, 이들 7종을 이용하여 northern blot을 수행한 결과, 모두 IFS가 발현되고 있음을 확인 할 수 있었다. 하지만, 2003년 여름 기상이변으로 말미암은 일조량 부족과 갑작스러운 냉해로 말미암아 병의 생장에 치명적인 악영향으로 벼의 생장이 충분히 이루어지지 않았으며, 또한 종실이 형성되지 않는 쭉정이 상태를 얻었다. 따라서, pMJU-JA6의 형질전환체의 분석을 실시 할 수 없었다. 결과적으로, 새로운 형질전환을 시도해야 했으며, 재 형질전환으로 말이암아, 새로운 형질전환체 15종을 얻어서 이를 PCR을 이용하여 분석하여 본 결과 15종중 4종에서 IFS 유전자를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 상기 4종의 형질전환체를 이용하여 southern blot을 수행한 결과 모두 같은 계통일 것으로 예상되었다. 하지만, 새로운 형질전환체도 종실이 형성되지 않았다.

3. 종자 특이적 프로모터를 이용한 형질전환체도 얻었다. 종자특이적 프로모터 전체 유전자가 삽입되어 있는 형질전환체 (IF) 16종, 부분 유전자가 삽입되어있는 형질전환체 (IP) 16종, 총 32 종의 형질전환체를 얻었다. PCR을 이용하여 상기 형질전환체의 IFS 유전자 삽입여부를 확인하여 본 결과 모두 IFS 유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 상기 형질전환체를 이용하여 southern blot을 수행한 결과 IF의 경우는 16개의 형질전환체 중 9종에 대하여 IFS 유전자가 삽입되었음을 확인 할 수 있었고 이 9 종중 단 두 종만이 계통이 다를 것으로 예상되었다. IP의 경우는 16종중 11종이 확인되었으며, 이 중 단 2종만이 다른 계통일 것으로 예상되었다.

4. 종실특이적 프로모터를 포함하고 있는 형질전환체로부터 생성된 종실을 이용하여종실에 isoflavone 류가 생합성 되었는지 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석한 결과, 종실특이적 프로모터 전체가 포함된 형질전환체 (IF)의 종실의 경우는 flavone인 naringenin으로부터 7.2 ㎍/g seed의 isoflavone인 genistein이 생합성된 것을 확인 할 수 있었고, 종실특이적 프로모터 일부가 포함된 형질전환체 (IP) 종실의 경우 6.3㎍/g seed의 isoflavone인 genistein이 생합성된 것을 확인할 수 있었다.

5. 형질전환체의 근권미생물상의 변화에 대하여 조사하여 본 결과 첫 번째로 박테리아류의 경우는 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 박테리아만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 $6\pm3\times10^6$ cfu (colony forming unit)/g wet soil의 박테리아 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $10\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $8.5\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $7\pm3\times10^6$ cfu/g wet soil 의 박테리아 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 박테리아의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서

약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 두 번째로 곰팡이류에 대하여 실험한 결과, 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 곰팡이류만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 1×10^5 cfu/g wet soil의 곰팡이류 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 4×10^5 cfu/g wet soil, IF에서는 3×10^5 cfu/g wet soil, IP에서는 6×10^5 cfu/g wet soil 의 곰팡이류 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 곰팡이류의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 마지막으로, 진균류(actinomycetes)에 대하여 조사하여 본 결과, 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 actinomycetes만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 1×10^6 cfu/g wet soil의 actinomycetes 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 1×10^6 cfu/g wet soil, IF에서는 2×10^6 cfu/g wet soil, IP에서는 2×10^6 cfu/g wet soil 의 actinomycetes 수를 확인 할 수 있었다. 대조구보다 형질전환된 벼에서 약간 증가된 진균류를 확인 할 수 있었다.

5. 형질전환체가 질소고정균에 미치는 영향에 대하여도 살펴보았다. 벼에 IFS 유전자가 삽입되어 발현이 되어 isoflavone 류를 생성하게 되면 질소고정균 상의 변화도 나타날 수 있다. 따라서, 이를 확인하기 위하여 근권내의 질소고정균류의 차이를 살펴본 결과, 대조구에서는 $3\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $18\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $16\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $8\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균을 확일 할 수 있었다. pMJU 백터를 이용한 경우가 개체수가 가장 많은 것으로 나타났다. 이는 pMJU의 프로모터가 모든 조직에서 발현 될 수 있는 특성을 지닌 것이기 때문에 IFS가 뿌리 조직에서도 발현이 되어 질소고정균류가 근권내에서 더 많은 양으로 존재하게 한 것으로 판단된다. 반면에, IF의 경우는 pMJU를 사용하였을 때보다 적은 콜로니가 형성되었으나, IP에 비하여 많은 양이 있는 것으로 확인되었다.

제 5 절. 인용문헌.

Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-I. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. Plant Physiol. 121, 821-828.

Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana. Mol Genet Genomics 267: 730-745

Cho E-M, Okada A, Kenmoku H, Otomo K, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Sassa T, Yajima A, Yabuta G, Mori K, et al (2004) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding ent-cassa-12,15-diene synthase,

Christou, P., Ford, T.L., and Kofron, M. (1991). Genotype-independent stable transformation of rice (*Oryza sativa*) plants. Bio/Technology 9, 957-962.

Dixon, R. A., and Ferreira, D. (2002) Genestein. Phytochem. 60, 205-211.

Dixon, R.A., and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Sci. 4, 364-400.

Edwards, L., Johnston, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 98, 1349.

Harberd, N.P. (2001). Genetic approaches to the understanding of gibberellin-mediated plant growth regulation. In Mechanism of Action of Plant Hormones, K. Palme and J. Schell, eds (New York: Springer-Verlag). (in press).

Harbone, J. R. B. and Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. Phytochem. 55, 481-504.

Jung, W., Yu, O., Lau, S.-M. C., O'Keefe, D.P., Odell, J., Fader G., and

McGonigle, B. (2000) Idenfitication and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nature Biotech. 18, 208-212.

Kato H, Kodama O, Akatsuka T (1995) Characterization of an inducible P450 hydroxylase involved in the rice diterpene phytoalexin biosynthetic pathway. Arch Biochem Biophys 316: 707-712

Lewis D. F.V., and Sheridan G. (2001) Cytochromes P450, oxygen, and evolution. The Scientificworld. 1, 151 167.

Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E., and Hahlbrock, K. (2000) UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 1903 1907.

Maqbool, S.B., and Christou, P. (1999). Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: Analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. Mol. Breed. 5, 471-480.

Ryan, K.G., Swinny, E.E., Markham, K. R., and Winefield C. (2002) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant Petunia leaves. Phytochem. 59, 23 32.

Sakamoto T, KobayashiM, Itoh H, Tagiri A, Kayano T, Tanaka H, Iwahori S, MatsuokaM(2001) Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. Plant Physiol 125: 1508-1516

Sawada, Y., Kinoshita, K., Akashi, T., Aoki, T., and Ayabe, S.-i. (2002) Key amino acid residues required for aryl migration catalysed by the cytochrome P-450 2-hydroxyisoflavanone synthase. Plant J. 31, 555-564.

Shure, M., Wessler, S., and Fedoroff, N. (1983) Molecular identification and isolfation of the waxy locus in maize. Cell 35, 225 - 233.

Stansfield, I. and Kelly, S. L. (1996) Purification and quantification of

Saccharomyces cerevisiae cytochrome P450 in Yeast Protocols: *Methods in cell and Molecular Biology*. Evans, I. V. (Eds), pp.355-366Humana press Inc. Totowa, New Jersey.

Tebayashi, S-i., Ishihara, A., and Iwamura, H.(2001) Elicitor-induced changes in isoflavonoid metabolism in red clover roots. J. Exp. Bot. 52, 681 689.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physio. 126, 485-493.

Winkel-Shirley, B. (2001) It takes a garden. How work in diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. Plant Physi. 127, 1399-1404.

Xu, Y.-L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J.M., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A.D. (1995). The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: Molecular cloning and functional expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6640-6644.

Yu J, Hu S,Wang J,Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, et al (2002) A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica). Science 296: 79-92 Wickham KA, West CA (1992) Biosynthesis of rice phytoalexins: identification of putative diterpene hydrocarbon precursors. Arch Biochem Biophys 293: 320-332

제 4 장 : 종 합 결 론.

벼는 현재 주요 식량 작물로서 전 세계에 걸쳐서 재배되고 있다. 하지만, 벼는 탄수화물을 주로 함유하고 있어서 필수 영양인자들이 부족한 것으로 알려져 있다. 따라서, 벼의 영양학적 측면을 늘리기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 그 중, 여러 가지 필요한 영양분들 중에 콩에서 발견되는 isoflavone인 daidzein과 genistein은 phytoestrogen으로 알려져 있으며 인간, 특히 여성들의 건강과 밀접한 관련을 가지고 있다. 따라서, 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자를 클로닝하여 이를 벼에 도입한다면 기존에 있는 벼들이 만들지 못하는 새로운 물질인 isoflavone을 만들어 낼 수 있을 것으로 판단하여 본 연구에서는 벼에서 isoflavone을 만들어 내기위해서 두과작물에서 isoflavone synthase를 분리하여 그의 성질을 규명하고 이를 벼 형질 전환 벡터에 옮겨서 벼 형질전환을 실시하여 벼에서 isoflavone을 생성하는 것을 최종 목표로 연구를 수행하였다.

가장먼저, 두과 작물에서 isoflavone 합성 유전자의 분리 및 성질 규명을 실시한 결과, 대두 (*Glycine max*, Paldal)로부터 클로닝된 유전자 (*IFS-Pd*로 명명)는 1,593 bp의 open reading frame (531 amino acids)을 가지고 있었으며, 58.8 kDa 분자량과 9.17의 pI를 갖는 것으로 확인되었다. 또한, SignalLP program으로 예측한 결과 signal peptide cleavage site는 24와 25사이의 amino acid (Nielson *et al.*, 1997)로 예상되었으며, blast analysis에서 다른 몇몇 식물의 isoflavone synthase와 높은 homology를 보이는 것으로 보아 IFS 유전자임을 확인하였다. 또한, Redclover로부터 클로닝된 유전자 (*IFS-Tp*로 명명)는 1,575 bp의 open reading frame (525 amino acids)를 가지고 있었으며, 59.1 kDa 분자량과 8.95의 pI를 갖는 것으로 추측되었다. 다른 IFS 유전자들과도 상당히 높은 수준의 상동성을 보이는 것으로 보아 IFS 유전자 임을 확인하였다 **(Genbank Accession Number, AY253284)**. 상기 IFS 유전자 (*IFS-Pd*와 *IFS-Tp*)를 yeast에서 각각 발현하여 isoflavone의 생성을 확인한 결과, naringenin으로부터 genistein을 합성하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 유전자들을 이용할 경우, flavone 류를 기질로 이용하여 isoflavone으로 전환이 가능한 형질전환된 벼를 얻을 수 있을 것으

로 판단되었다. Isoflaovne의 효소적 특성을 알아 보기 위하여 isoflavone synthase를 효모에서 발현하여 여러 기질을 대상으로 생성물을 만드는지 여부를 측정한 결과 7-hydroxyflavanone, 5,7-dihydroxyflavanone, 7,4′-dihydroxyflavanone (liquiritigenin), and 5, 7, 4′-trihyrdoxyflavanone(naringenine)를 상응하는 isoflavones으로 전환함을 확인 할 수 있었다. **상기 결과는 *Mol. Cells* 2003 15: 301-306에 개제되었다 (Bong Gyu Kim, Song-Young Kim, Hee Su Song, Chan Lee, Hor-Gil Hur, Su-Il Kim and Joong-Hoon Ahn. Cloning and Expression of the Isoflavone Synthase Gene (IFS-Tp) from Trifolium pratense).**

상기 IFS 유전자를 이용하여 벼의 형질 전환 및 형질전환체의 분석을 실시하였다. 벼에서 isoflavone synthase 유전자를 발현하기 위해서 벼 형질 전환 벡터 3종류를 만들었다. 첫 번째 종류는 isoflavone synthase 유전자 (*IFS-Pd*)를 maize ubiquitin promoter에 연결하여 모든 조직에서 isoflaovne synthase유전자가 발현하게 하였다 (pMJU-JA6). 나머지 두 종류는 *IFS-Tp* 유전자를 이용하여 glutein promoter를 사용하였는데 이는 종자에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 유전자의 promoter들이다 (pCAM-LA-JA7). pMJU-JA6의 형질전환체를 8개를 얻었다. 이를 이용하여 각각의 형질전환체로부터 IFS 유전자가 삽입되었는지 확인한 결과, 8종 중 7종에서 IFS 유전자가 삽입된 것을 확인 할 수 있었으며, 이들 7종을 이용하여 northern blot을 수행한 결과, 모두 IFS가 발현되고 있음을 확인 할 수 있었다. 하지만, 2003년 여름 기상이변으로 말미암은 일조량 부족과 갑작스러운 냉해로 말미암아 병의 생장에 치명적인 악영향으로 벼의 생장이 충분히 이루어지지 않았으며, 또한 종실이 형성되지 않는 쭉정이 상태를 얻었다. 따라서, pMJU-JA6의 형질전환체의 분석을 실시 할 수 없었다. 결과적으로, 새로운 형질전환을 시도해야 했으며, 재 형질전환으로 말이암아, 새로운 형질전환체 15종을 얻어서 이를 PCR을 이용하여 분석하여 본 결과 15종중 4종에서 IFS 유전자를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 상기 4종의 형질전환체를 이용하여 southern blot을 수행한 결과 모두 같은 계통일 것으로 예상되었다. 하지만, 새로운 형질전환체도 종실이 형성되지 않았다. 종자 특이적 프로모터를 이용

한 형질전환체도 얻었다. 종자특이적 프로모터 전체 유전자가 삽입되어 있는 형질전환체 (IF) 16종, 부분 유전자가 삽입되어있는 형질전환체 (IP) 16종, 총 32종의 형질전환체를 얻었다. PCR을 이용하여 상기 형질전환체의 IFS 유전자 삽입여부를 확인하여 본 결과 모두 IFS 유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 상기 형질전환체를 이용하여 southern blot을 수행한 결과 IF의 경우는 16개의 형질전환체 중 9종에 대하여 IFS 유전자가 삽입되었음을 확인 할 수 있었고 이 9종중 단 두 종만이 계통이 다를 것으로 예상되었다. IP의 경우는 16종중 11종이 확인되었으며, 이 중 단 2종만이 다른 계통일 것으로 예상되었다. 종실특이적 프로모터를 포함하고 있는 형질전환체로부터 생성된 종실을 이용하여종실에 isoflavone 류가 생합성 되었는지 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석한 결과, 종실특이적 프로모터 전체가 포함된 형질전환체 (IF)의 종실의 경우는 flavone인 naringenin으로부터 7.2 ㎍/g seed의 isoflavone인 genistein이 생합성된 것을 확인 할 수 있었고, 종실특이적 프로모터 일부가 포함된 형질전환체 (IP) 종실의 경우 6.3㎍/g seed의 isoflavone인 genistein이 생합성된 것을 확인할 수 있었다. 형질전환체의 근권미생물상의 변화에 대하여 조사하여 본 결과 첫 번째로 박테리아류의 경우는 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 박테리아만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 $6\pm3\times10^6$ cfu (colony forming unit)/g wet soil의 박테리아 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $10\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $8.5\pm1.5\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $7\pm3\times10^6$ cfu/g wet soil 의 박테리아 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 박테리아의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 두 번째로 곰팡이류에 대하여 실험한 결과, 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 곰팡이류만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 1×10^5 cfu/g wet soil의 곰팡이류 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 4×10^5 cfu/g wet soil, IF에서는

3×10^5 cfu/g wet soil, IP에서는 6×10^5 cfu/g wet soil 의 곰팡이류 수를 확인 할 수 있었다. 즉, 대조구에 비해서 형질전환된 벼 근권내에서 곰팡이류의 양이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만, 많은 수의 증가는 확인할 수 없었고, 대조구와 유의성 내에서 약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 마지막으로, 진균류(actinomycetes)에 대하여 조사하여 본 결과, 대조구인 낙동벼, 벼의 모든 곳에서 IFS가 발현되도록 만든 pMJU-JA6가 형질전환된 낙동벼, IF가 형질전환된 낙동벼, IP가 형질전환된 낙동벼의 근권으로부터 actinomycetes만을 분리배양하여 본 결과, 대조구에서는 1×10^6 cfu/g wet soil의 actinomycetes 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 1×10^6 cfu/g wet soil, IF에서는 2×10^6 cfu/g wet soil, IP에서는 2×10^6 cfu/g wet soil 의 actinomycetes 수를 확인 할 수 있었다. 대조구보다 형질전환된 벼에서 진균류의 군체수가 증가됨을 확인 할 수 있었다. 형질전환체가 질소고정균에 미치는 영향에 대하여도 살펴보았다. 벼에 IFS 유전자가 삽입되어 발현이 되어 isoflavone 류를 생성하게 되면 질소고정균 상의 변화도 나타날 수 있다. 따라서, 이를 확인하기 위하여 근권내의 질소고정균류의 차이를 살펴본 결과, 대조구에서는 $3\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균 개체를 확인 할 수 있었으며, pMJU-JA6는 $18\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IF에서는 $16\pm4\times10^6$ cfu/g wet soil, IP에서는 $8\pm1\times10^6$ cfu/g wet soil의 질소고정균을 확일 할 수 있었다. pMJU 백터를 이용한 경우가 질소고정균의 개체수가 가장 많은 것으로 나타났다. 이는 pMJU의 프로모터가 모든 조직에서 발현 될 수 있는 특성을 지닌 것이기 때문에 IFS가 모든 조직에서 발현이 되어 특히 뿌리 조직에서도 발현이 되어 질소고정균류가 근권내에 좀 더 많은 양으로 존재하게 한 것으로 판단된다. 반면에, IF의 경우는 pMJU를 사용하였을 때보다 적은 콜로니가 형성되었으나, IP에 비하여 많은 양이 있는 것으로 확인되었다.

두과 작물과 질소 고정 미생물간의 공생관계는 식물체에게는 필요한 질소원을 대기로부터 안정하게 공급하고, 토양 근권에서는 근권 미생물의 활성을 도와 지력을 증진시키는 이상적 친환경 농법의 전형임이 보고되고 있다. Isoflavone의 생합성은 flavanone 중간체로부터 cytochrom P-450 계통의 isoflavone 합성 효소(isoflavone synthase)에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 무엇보다도, 이 유전

자를 도입하여 만든 형질 전환된 벼에 대한 보고와 isoflavone 합성 유전자의 발현조절과 관련한 인자에 대한 보고는 아직 없다. 또한, isoflavone 합성 유전자가 도입된 형질 전환체와 근권 토양 미생물과의 상호작용에 대한 연구 사례는 없다. 따라서, 본 연구는 대두에서 isoflavone 합성 유전자를 분리하여 이를 벼에 도입함으로써 생리활성 물질을 생산하는 새로운 품종을 만들어 내고 이를 이용하여 벼의 근권 미생물의 분포 상을 개선하여 이들의 생육을 증진시킬 것이다.