

최 중

연구보고서

GOVP1200102452

632.18
L2937

건답직파 재배 적합형 벼 분자 육종

Development of transgenic rice plants tolerant to
drought and high dense planting

명 지 대 학 교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “건담직파 재배 적합형 벼 분자 육종” 과제 (세부 과제 “밀식 및 내도복성 다수확 벼 품종개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12월 일

주관연구기관명 : 명지대학교

총괄연구책임자 : 김 주 곤

세부연구책임자 : 김 주 곤

연 구 원 : 최 양 도

연 구 원 : 김 정 호

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 김 인 수

요 약 문

I. 제 목

건답직파 재배 적합형 벼 분자육종

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리나라의 벼 육종기술은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전재료를 보유하고 있으나 농업적으로 중요한 유전특성 (내도복성, 내한발성)의 유전자 분리 개발 및 품종육성은 미흡하다. 따라서 쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경제 및 대외 경쟁력을 고려하였을 때 기존의 우량품종에 환경저항성과 관련된 유전자들을 도입한 벼 품종개발로 환경 독립적 농업개발이 요구된다. 또한 농촌인구의 고령화와 노동력부족에 대처하기 위해 실시 예정인 벼 직파 재배법에 적합한 제초제 저항성, 한발 저항성 및 밀식 재배형 품종개발이 시급한 상태이다. 이러한 신행질 작물의 출현은 유전자원의 확보 및 새로운 유전자원의 개발에 크게 의존하고 있어 이의 관련 유용 유전자원의 개발 또한 매우 시급한 당면 과제이다.

현재 영농비 및 노동력 절감을 위하여 우리나라 벼의 직파 면적이 늘고 있고 2-3년 내에 전면확대 될 가능성이 높아서 예전보다 밀식 재배 품종 및 고르지 못한 우리나라 기후 환경중 한발에 저항성을 갖는 벼 개발의 필요성이 증대되고 있다. 그러나 밀식 재배는 식물의 도장, 클로로필 함량의 감소 및 통풍 저해 등으로 인한 수확량의 감소와 더불어 키가 커짐으로 인한 도복 문제 등이 제기될 우려가 있다.

또한 국가경제 발전에 따른 국민소득 수준의 향상으로 식료품에 대한 소비자의 기호도가 다양화되고, 재배농민 또한 고소득 작물을 선호하고 상대적으로 소득이 낮은 벼농사를 기피하고 있다. 국외적으로는 WTO체제의 출범에 따른 농·축·수산물의 수입 개방화 등 여러 가지 여건들이 우리 농업을 어렵게 하고 있으며, 쌀 시장 개방에 따른 국민 경제적 파급효과는 매우 다방면으로 진행될 것으로 예측되는 데 농가소득의 지속적 감소는 결국 농업기반 상실 가능성이 우려된다. 이에 주곡작물인 벼 재배에 국제경쟁력을 키우는 것은 국가의 전략적 측면에서도 매우 중요하므로, 한발에 저항적이고 밀식 재배가 가능한 신품종 개발로 농민의 노동력 절감 및 생산량 증대를 통하여 농업 국가 경쟁력 향상 및 국가 농업기반을 강화시킬 수 있다.

형질전환 식물체를 이용한 외래 유전자의 발현 및 이를 이용하여 새로운 형질을 가진 식물체를 개발하는 것은 차세대 농업의 성공여부를 좌우할 중요한 기술로 부각되고 있으며, 기존의 노동집약적이고 장시간의 연구가 요구되는 육종연구와 상호보완적인 벼 형질전환 기술의 개발이 가능하여 전통적인 육종연구의 시간과 노력이 절감되고 따라서 신품종 개발에 의한 농업 생산성이 향상 될 것이다.

국제화 개방화시대의 한국농업의 위기를 효과적으로 대처하고 다가오는 21세기 선진국 시대의 농업의 위상을 정립하기 위한 방법으로 전통적인 농업생산 기술에 유전공학적 기법을 접목시킴으로써 새로운 형태의 고생산성 농업을 창출해낼 수 있을 것으로 기대된다.

농업적으로 유용한 유전자 개발에 의해 국내 고유 유용 유전자의 지적 소유권의 확보 및 이로부터 개발되는 고유 신품종 벼 품종의 개발 및 보호가 가능하게 되며, 유용 유전자 도입에 의한 직파재배적합형 형질전환작물의 개발은 안전한 식량공급과 생산성 제고에 크게 기여함으로써

서 보다 쾌적하고 안락한 생활을 가져다 줄 것으로 생각된다. 직파재배 적합형 형질전환작물의 개발은 또한 국내 농업이 존폐의 위기를 맞고 있는 열악한 상황에서 농산물의 부가가치를 높일 뿐 아니라 생산비 및 노동력 절감으로 살기 좋은 농촌건설에 일익을 담당할 것이다.

이에 본 연구에서는 유전공학적인 방법으로 trehalose 생합성 관련 외래 유전자를 벼 식물체 내로 발현시켜 trehalose를 생합성시킴으로써 내한발성 벼 품종을 개발하고 식물이 자연광을 받아서 식물 종자의 발아·생장, 클로로필에 의한 광합성·개화·결실 등 수백 가지의 광형태 형성을 관장하고 있는 광수용체인 피토크롬을 벼에 형질전환시켜 밀식재배와 내도복성을 가진 다수확 품종을 육성하는 등 현 우리나라 미래 환경농업에 적합한 직파재배적합형 벼 품종을 개발하여 농촌진흥청으로 하여금 다른 장려품종으로의 확산 보급케 함으로서 전천후 농업 및 수도생산성 증대에 크게 기여하는 것을 최종목표로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 우리의 주곡작물인 벼를 대상으로 현재 추진중인 수도직파재배법에 적합한 밀식재배저항성과 고르지 못한 우리나라 기후환경 중 한발에 대해서 저항성을 갖는 벼 개발을 목표로 밀식재배저항성 (Phytochrome)유전자와 한발저항성 (Trehalose synthase/phosphatase fusion gene)유전자를 미생물 혹은 식물에서 개발하였다. 이들을 특성에 맞는 벼 유전자 프로모터 프로모터(Act1, rbcS, ABA-inducible, chloroplast transit peptide 등)에 연결하여 *Agrobacterium*을 이용, 벼에 형질전환하여 다수의 형질전환체를 선발하였다. 선발마커로 사용한 제초제 저항성 유전자(bar)를 이용 형질전환체들의 도입유전자 발현

을 1차적으로 확인하였고 도입유전자의 존재 및 발현을 분자수준에서 확인하여 다음세대로의 유전양상을 검색한 후 생물검정을 거쳐서 연구 목표를 달성하였다.

본 연구에서는 연구 자원의 고유성 확보를 위하여 우선 벼에 건조 저항성을 부여하기 위한 유전 자원개발을 목표로 대장균 trehalose 생합성 유전자 분리하였다. 대장균 trehalose 생합성 유전자는 두 개의 유전자로 구성되어 있는데, 형질 전환된 벼 내에서 이들 유전자의 발현 효율을 증진시키기 위하여 두 개의 유전자를 융합하여 하나의 융합유전자를 제조하고, 그 특성을 규명하였으며 새로운 trehalose 생합성 유전자도 탐색, 분리하였다. *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822)으로부터 trehalose 생합성에 관여하는 BvMTSase, BvMTHase 두 개의 유전자를 분리하여 그 특성을 규명하였으며, 이들 유전자의 발현 효율을 증진시키기 위하여 두 개의 유전자를 융합하여 하나의 융합유전자를 제조하고, 그 특성을 규명하였다. 또한 이용이 증가하고 있는 trehalose의 산업적 대량생산이 가능하게 하기 위하여 내열성 균주인 *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49426) 으로부터 trehalose 합성 유전자 (SaMTH, SaMTH) 를 분리하여 그 특성을 규명하였으며, 산업적 생산의 효율을 증가시키기 위해 SaMTH 융합효소를 조제하여 효소활성 및 특성을 규명하였다. 기존의 식물유전공학적 도입 유전자 발현방법의 틀을 벗어나 보다 안정적이고 향상된 도입 유전자발현 시스템 개발을 목표로 벼 rbcS 프로모터-transit peptide를 이용한 도입유전자 염록체 내 발현 시스템을 개발하여 염록체에 유전자 산물의 축적을 유도함으로써 고전적인 세포질 발현에 비해 도입 유전자의 발현이 약 20배가 향상된 결과를 확인하였으며 이러한 도입유전자 염록체 내 발현은 전체 용해성 단백질에 약 10%를 상회하는 발현 향상의 결과를 가져왔다. 본 연구에서 개발된

한발저항성 및 밀식재배적합형 수도품종 과 고유 유전자원 및 발현 시스템은 전천후 농업 및 수도생산성 증대에 크게 기여할 것으로 기대되며 다음과 같은 구체적인 세부연구를 토대로 성공적으로 연구를 수행하였다.

- 한발저항성 유전자 (trehalose synthase gene) 개발
- 한발저항성 유전자 (trehalose synthase gene) 벼 형질전환
- 밀식재배 저항성 유전자 (phytochrome gene) 벼 형질전환
- 엽록체 내 유전자 발현 시스템 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

IV-1. 한발저항성 유전자 (trehalose synthase gene) 개발

본 연구에서는 대장균의 trehalose 6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자 염기 서열을 근거로 polymerase chain reaction (PCR) 을 실시하여 *otsA* 와 *otsB* 유전자를 증폭시킨 후 pUC18 vector 에 cloning 하였다. 대장균 (MC1061 strain) genomic DNA 를 분리하여 제한 효소 Hind III 로 절단한 후 2.9 kb band 를 분리하여 partial genomic DNA 유전자 은행을 제조하였다. 이 genomic DNA 유전자 은행에서, 앞에서 분리한 PCR clone 을 probe 로 사용, screening 을 실시하여 *otsA* 와 *otsB* 의 gDNA clone 들을 선별하였다. 선별한 유전자들은 최종적으로 염기서열 및 효소활성을 측정함으로써 확인하였다.

유전자재조합 기술을 이용하여 TPS 와 TPP 유전자를 하나의 유전자

로 재조합하고, 이로부터 발현되는 재조합 융합효소단백질 (TPSP) 이 trehalose 를 효과적으로 합성하는지를 측정하였다. 재조합된 융합단백질 유전자를 대장균에서 대량 발현시키고, 발현된 재조합 융합효소단백질 (TPSP) 을 순수분리하였다. UDP-glucose (UDPG) 와 glucose-6-phosphate (G6P)를 기질로 사용하여 trehalose 합성을 검정하고, 각각의 효소단백질 (TPS, TPP) 과 재조합 효소단백질 (TPSP) 의 기질 (UDPG, G6P 및 T6P) 에 대한 K_m 및 V_m 을 측정하여 재조합효소단백질 (TPSP) 이 trehalose 합성효율을 효과적으로 증진시키는 것을 확인하였다.

본 연구의 고유성을 확보하기 위하여 다른 세균으로부터 trehalose 생합성과 관련된 다양한 효소들의 관련 유전자를 탐색, 분리하였다. 먼저 염기서열이 알려져 있는 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 로부터 trehalose 생합성 유전자를 분리하고 이를 probe 로 이용하여 *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 같은 종류의 trehalose 생합성 유전자가 존재함을 확인하였으며, *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 trehalose 생합성 효소 (BvMTSase, BvMTHase) 유전자를 분리하고, 그 특성을 규명하였다. 본 연구에서는 브레비박테리움 (*Brevibacterium helvolum* ATCC 11822) 으로부터 두가지 trehalose 생합성 관련 효소유전자를 분리하였다. 첫번째 유전자는 구조유전자 부분이 2,328bp인 *Brevibacterium maltooligosyltrehalose synthase* (BvMTSase) 유전자이고, 두번째 유전자는 구조유전자 부분이 1,767bp 인 *Brevibacterium maltooligosyl trehalose trehalohydrolase* (BvMTHase) 유전자이다. BvMTSase 및 BvMTHase 유전자의 발현효율을 증가시키기 위하여 두 개의 유전자 (BvMTSase 와 BvMTHase) 를 융합한 새로운 융합유전자 (BvMTSHase) 를 조제하였다. 두 개의 유전자를 PCR 을

이용하여 site-directed mutagenesis를 실시하고, 유전자재조합 방법을 이용하여 하나의 유전자로 제조하였고, 이로부터 합성되는 trehalose 생합성효소를 하나의 융합효소 (BvMTSHase) 로 조제하였다. 이 융합효소단백질은 말토올리고실trehalose 합성 및 가수분해 반응을 동시에 할 수 있는 융합효소단백질이다.

본 연구에서는 현재 산업적으로 사용범위가 급격히 증가하고 있는 trehalose 의 대량생산을 위해 내열성 균주로부터 trehalose 생합성 효소 유전자를 분리하고, 이를 이용한 trehalose 의 대량생산 기술을 개발하였다. 내열성 MTS 및 MTH 효소를 이용한 trehalose 생산 개발을 위하여 *Sulfolobus acidocaldarius* 내열성 균주로부터 trehalose 생합성 효소 (SaMTS, SaMTH) 유전자를 탐색 분리하였다. 또한 SaMTS 및 SaMTH 유전자의 발현효율을 증가시키기 두 개의 유전자를 융합한 새로운 융합 유전자를 유전자조작법에 의해 합성하였고, 그로부터 발현되는 새로운 trehalose 생합성 융합효소단백질 (SaMTSH) 을 조제하였다. 이 내열성 융합효소단백질은 말토올리고실trehalose 합성 및 가수분해 반응을 70°C 의 고온에서 동시에 할 수 있는 융합효소단백질이다. 이 융합유전자를 발현벡터에 재조합한 후, 대장균에서 과다발현하고 재조합 융합효소단백질을 순수 분리하여 이들이 말토올리고당 및 전분으로부터 trehalose를 생산하는 효소로 작용함을 확인하였다.

IV-2. 한발저항성 유전자 (trehalose synthase gene) 벼 형질전환 본

연구에서는 대장균 Trehalose-6-phosphate synthase (TPS)와 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP)를 fusion시킨 trehalose-6-phosphate synthase-phosphatase (TPSP) 유전자를 대장균에서 발현시킨 결과 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 유전자만

발현시킨 것에 비해 대장균 내에 trehalose 축적량이 30배 이상 훨씬 높은 것으로 밝혔다. 따라서 본 연구에서는 한발저항성 유전자가 도입된 벼 개발을 목표로 trehalose synthase-phosphatase fusion 유전자 (TPSP gene)를 항시발현 프로모터(*Ubi I*), ABA-유도 프로모터에 연결, 벼에 형질전환시킴으로서 Trehalose synthase 유전자만을 과량 발현시켰을 때 관찰되었던 독성장애에 대비하고 또한 형질전환 식물의 생육 및 수확량에 대한 효과를 최소화하는 방향으로 연구의 방향을 맞추었다. 또한 벼종자에서 높은 수준으로 유전자 발현을 유도하는 것으로 본 연구진에 의해 자체개발된 SbeI(starch branching enzyme) 프로모터에 TPSP fusion 유전자를 연결하여 벼에 형질전환하여 벼 종자내에 높은 수준으로 trehalose가 축적될 것으로 기대되며, *Arabidopsis* Sen1 프로모터에 TPSP fusion 유전자를 연결하여 형질전환된 벼 식물이 건조를 포함한 각종 stress를 받았을 경우 벼 잎 조직에서 높은 수준으로 유도, 발현될 것으로 기대된다. 제작된 운반체들은 *Agrobacterium*내로 도입되었고 형질전환체의 도입 유전자 확인 및 발현 분석을 완료하였고 벼 잎 조직 및 종자에서 당분석을 실시하여 높은 수준의 trehalose가 축적됨을 확인하였다. TPSP fusion 유전자가 도입된 다수의 형질전환체들은 도입 유전자의 다음 세대로의 전이 및 종자확보를 위해 포장에 전개하여 다수의 한발 저항성 유전 자원을 확보하였다.

IV-3. 밀식재배 저항성 유전자 (phytochrome gene) 벼 형질전환

Phytochrome 유전자 삽입 및 발현이 확인된 형질전환 벼 개체를 대상으로 종자를 수확하였다. 다음 해에 실험실에서 형질전환 종자를 발아시킨 후 온실에 이식하고 식물체가 성숙단계에 왔을 때 각각 종자 유래의 식물체 중 하나를 골라서 제초제 저항성으로 도입 유전자의 존

재를 일차 확인하였다. Southern-blot 방법으로 분자생물학적 유전자를 확인함으로써 다음 세대로의 유전자 전이가 안정되게 일어나는지를 확인하였으며, Western blot 방법으로 도입유전자의 발현 및 발현 수준을 확인함으로써 다음 세대로의 유전자 전이 및 발현이 안정되게 유지되는지를 확인하였다. 도입 유전자의 다음 세대로의 전이 및 발현이 확인된 개체로부터 다음 세대(T2)에서의 생물 검정을 위하여 다량의 종자를 확보하였다. 형질전환된 식물체의 특징은 야생종에 비해 phytochrome A 발현 정도가 높으며, 그에 따른 생리적인 변화를 나타내었다. Plant height, culm length and panicle length가 야생종에 비해 감소했으며, 각 개체당의 씨앗 무게는 증가하였다. 유전자 이식법을 이용한 식물 형질 전환 연구의 활성화가 될 것이며, 벼 형질전환 기술 확립으로 형질전환에 필요한 운반체 및 프로모터를 국내에서 확보하여 이용할 수 있게 되며, 벼 형질전환을 보완, 또는 병행하여 더욱 효율적인 벼 형질전환 기술의 선도적 개발이 이루어지게 된다. 또한 본 연구 결과에서 얻어지는 밀식재배 저항성 벼는 농민의 노동력 절감 및 생산량 증대를 통하여 농업 국가 경쟁력 향상 및 국가 농업기반 강화에 크게 기여할 것이다. 안정성 등을 검토한 후 곧 바로 종자 증식 및 현장 보급이 가능하다. 그러나 벼는 현행법상 기업화가 허용되지 않는 것으로 알고 있으므로 농촌진흥청과 협조하여 농민에게 현장 보급이 가능한 방안을 강구해야할 것이다. 본 연구의 벼 형질전환 방법은 제초제에 저항성을 갖는 품종, 다수확 품종, 유용 물질을 많이 함유하는 품종 등 우수한 특성을 갖게 되는 벼를 개발하는데 응용될 수 있다.

IV-4. 엽록체 내 유전자 발현 시스템 개발

본 연구에서는 GFP를 *rbcS* 프로모터 및 *rbcS* transit peptide (Tp)

를 이용하여 벼 엽록체(chloroplast)내에 발현, 엽록체에 유전자 산물의 축적을 유도함으로써 trehalose synthase 유전자와 같이 세포질 내에 발현시 식물체 생장에 나쁜 영향이 염려되는 것의 문제점을 피하는데 사용코자 하였고 또한 광합성 관련 유전자 등 엽록체에서 기능을 하는 유전자 형질전환 연구에 이용코자 하였다. 이러한 연구는 도입유전자의 발현 산물을 엽록체 내에 축적함으로써 단백질의 안정성 및 발현량을 세포질에 위치 시켰을 때 보다 향상된 결과를 예측, 대량 발현코자 하는 유전자의 발현에 이용하여 새로운 유전공학적 대량 발현 시스템을 개발하고자 하였다. 연구결과 얻어진 형광 엽록체 벼는 엽록체를 미토콘드리아 및 다른 세포내 소기관들과 구별하여 쉽게 관찰할 수 있기 때문에 엽록체 내 유전자 산물의 축적은 물론 식물 엽록체의 생리 및 발달단계별 형태연구에 이용하고자 하였다.

본 연구에서는 GFP 유전자를 이용하여 벼 조직배양의 기술 습득 및 활용을 통하여 효율적인 벼 형질전환기술을 확립하였고 GFP의 엽록체 내 발현을 위한 GFP 함유 벼 형질전환용 운반체(pSB-RTG)를 제작, *Agrobacterium*내로 도입, 확인하였으며 벼 형질전환의 기술 축적과 형질전환의 효율증대로 인해 다수의 형질전환체를 확보, 제초제 저항성 검증을 통하여 형질전환체의 제초제 저항성을 입증하였다. 또한 온실에서 성장중인 엽록체 내 GFP 발현 형질전환체는 잎의 모양, 색깔, 성장 속도등 외형적으로 유전자가 도입되지 않은 벼와 전혀 다를 바 없이 정상적인 성장상태를 보였다. 형질전환체의 단백질 발현 분석을 통하여 엽록체 내 발현시 세포질 발현에 비해 약 20배 향상된 발현 효율을 보였으며 이는 전체용해성 단백질의 10% 이상을 상회하는 것으로 나타났다. 또한 confocal microscopy 관찰을 통하여 GFP의 세포내 분포 및 발현정도를 캘러스 및 벼 잎 조직에서 관찰하였으며 Southern 분석을 통

하여 도입 유전자(GFP)가 안정하게 벼 식물체로 도입되었음을 확인하였고 Northern 분석을 통하여 단백질 발현뿐만 아니라 전사단계에서도 GFP 유전자의 발현이 세포질 발현에 비해 약 10배 이상 향상되어있음을 확인하였다. 이러한 엽록체 내 발현 시스템 개발은 지금까지 식물유전 공학에 주로 사용하는 도입유전자의 세포질 내 발현 시 나타나는 문제점들을 해결할 수 있을 것으로 본다. 즉, 본 시스템은 발현수준이 낮음으로 인하여 표현형이 불확실한 경우 혹은 세포질 내 발현 시 나타나는 독성장애 등을 극복할 수 있는 대체방안으로 이용될 수 있어서 앞으로 도입 유전자를 높은 수준으로 안전하게 발현시키는 데 유용할 것으로 기대한다.

S U M M A R Y

(영문요약문)

1. Isolation, characterization and identification of new genes for trehalose synthesis

To isolate a gene for trehalose 6-phosphate synthetase (TPS) and for trehalose 6-phosphate phosphatase (TPP), a *E. coli* genomic DNA library was prepared and a genomic clones for TPS and TPP were isolated by using PCR amplified probe on the basis of EMBL database. A bifunctional fusion enzyme (TPSP) has been designed by fusion of genes for TPS and TPP. The fusion enzyme catalyzes the sequential reaction in which the formation of T6P followed by dephosphorylation leading to the synthesis of trehalose. The fused chimeric gene was over-expressed in *E. coli* and purified to near homogeneity. The fusion enzyme shows kinetic advantages in that the initial velocity to produce trehalose from UDP-glucose and glucose-6-phosphate is faster than that of a mixture of equimolar amounts of individual enzyme. The K_m values of the fusion enzyme for both substrates were smaller and the k_{cat} values were higher than those for the native enzymes resulting in the increase of the catalytic efficiency, k_{cat}/K_m , upto 50%.

A DNA fragment encoding two enzymes leading to trehalose biosynthesis, maltooligosyltrehalose synthase (BvMTSase) and

maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (BvMTHase), has been cloned from non-pathogenic bacteria, *Brevibacterium helvolum*. Open reading frames for the two proteins are 2,331 and 1,770 bp long, respectively, overlapping by four nucleotides. Recombinant BvMTSase, BvMTHase, and their fusion gene BvMTSHase constructed by the insertion of an adenylate in the overlapping region were expressed in *E. coli*. Purified BvMTSase proteins catalyzed the conversion of maltopentaose to maltotriosyltrehalose that was further hydrolyzed by BvMTHase proteins to produce trehalose and maltotriose. The enzymes shortened maltooligosaccharides by two glucose units per each cycle of the sequential reactions to release trehalose. Maltotriose and maltose were not catalyzed further, thus were respectively remained in the reactions depending on the substrates of odd or even number of glucose units. The bifunctional in-frame fusion enzyme, BvMTSHase, catalyzed the sequential reactions more efficiently than equimolar mixture of the two individual enzymes, presumably through a proximity effect between the catalytic sites of the enzymes. The recombinant enzymes produced trehalose from soluble starch, an abundant natural source for the trehalose production. Addition of α -amylase in the enzyme reaction dramatically increased the trehalose productivity by partial hydrolysis of the starch, hence providing more reducing ends accessible for the BvMTSase catalytic sites.

Two genes encoding maltooligosyltrehalose synthase (SaMTS) and

maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (SaMTH) were isolated from a hyperthermophilic microorganism, *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49462). ORFs of the SaMTS and SaMTH genes are 2,163 and 1,671 bp long and encode 720 and 556 amino acid residues, respectively. A bifunctional fusion enzyme (SaMTSH) was constructed through the gene fusion of SaMTS and SaMTH. Recombinant SaMTS, SaMTH, and SaMTSH fusion enzyme were overexpressed in *E. coli* BL21. SaMTS and SaMTH produced trehalose and maltotriose from maltopentaose in a sequential reaction. SaMTSH fusion enzyme catalyzed the sequential reaction in which the formation of maltotriosyltrehalose was followed by hydrolysis leading to the synthesis of trehalose and maltotriose. The SaMTSH fusion enzyme showed the highest activity at pH 5.0-5.5 and 70-75°C. SaMTS, SaMTH, and SaMTSH fusion enzyme were active in soluble starch, which resulted in the production of trehalose.

2. Transgenic rice plants expressing trehalose synthase/phosphatase fusion gene

The trehalose-6-phosphate synthase (THS) together with trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) are enzymes responsible for the synthesis of a disaccharide called trehalose. Trehalose is proposed to protect the proteins and membranes within plant cells during desiccation processes. Recently, tobacco and potato plants

transformed with the *THS* gene synthesized trehalose and produced desiccation tolerance in the plants. However, the transgenic plants were severely stunted. In our study, to develop a drought tolerant transgenic rice by expressing a *E. coli THS/TPP* fusion gene (TPSP) in a secure and regulated manner, we have inserted the fusion gene under the control of several regulatory sequences including the maize ubiquitin promoter, the barley ABA-inducible promoter, the rice *rbcS* promoter/chloroplast targeting signal for sequestering TPSP in chloroplast. Several fertile transgenic rice plants were produced by co-cultivating embryogenic calli with the *Agrobacterium* harboring the vectors. Southern blot analysis of primary transformants resulted in distinct band patterns, indicating that all the transformants had been generated by independent integration events. Northern blot analysis demonstrated that expression of TPSP transgene was observed in all of the lines, but expression levels varied in different lines. Trehalose was accumulated up to 0.1% of fresh weight in leaves and seeds of some of the transgenic plants

3. Transgenic rice plants overexpressing the phytochrome A gene to suppress shade-avoidance response

Plants standing densely and within a vegetation canopy exhibit shade-avoidance response (SR) in searching of light sources by stem elongation. SR that exhibits stimulation of elongation

growth, acceleration of flowering and reduced chlorophyll synthesis is modulated by the antagonistic response plant red/far-red light photoreceptors of phytochrome A and phytochrome B. Phytochromes sense intensity, duration and ratio of red (R) and far-red (FR) lights and mediate the SR mainly by their ratio. Since the ratio of FR to R decreases under canopy, the over-expression of phytochrome A that responds to FR light will bring an effect to suppress SR.

To suppress SR in rice and eventually to obtain planting density-tolerant transgenic plants, we overexpressed the *Arabidopsis* phyA cDNA (*PHYA*) by using of two expression vectors *ubi-PHYA* and *rbcS-PHYA* driven by maize *ubi-1* promoter and rice *rbcS* promoter, respectively. Several lines of transgenic plants were produced by co-cultivating of *Agrobacterium* containing the vectors with embryogenic rice calli. Stable integration and expression of transgenes were demonstrated by Southern- and Western-blot analysis of the transformants in the R0 and/or R1 generations. The transformants exhibited the phenotypical differences in plant height and culm length under white light and in cotyledon growth under FR light compared to nontransgenic rice plants. The inheritance of transgenes of each line was detected by genetic analysis of R1 and/or R2.

Thirteen lines (U1-U13) that were transformed with *Ubi-PHYA* were chosen and analyzed by Southern- and Western-blot experiments. Our analyses revealed that transgene copy numbers

varied from 1 to 4 and the 13 plants were grouped into five independent lines, as judged by transgene copy numbers and Southern hybridization patterns. Of those plants, the lines U4, U7, U12 and U13 contained a single copy of *PHYA* and the transgene was expressed at very high levels. Expression levels of the transgene in dark-adapted plants were comparable to that of the endogenous *PHYA* in etiolated rice seedlings, indicating 50-100 fold overexpression. The lines U3, U5, U8, U9 and U11 also contained a single copy of the transgene, but expression levels of the gene were low.

Several transgenic rice plants were produced by *Agrobacterium*-mediated rice transformation. The introduced phytochrome was efficiently expressed in *ubi-PHYA* and *rbcS-PHYA* transgenic rice plants and its expression level was 3 to 10 times higher than WT rice plants, as judged by western blot analysis of dark-adapted green leaves and etiolated rice seedlings.

Plant height, culm length, and panicle length of transgenic rice plants (R1) grown in rice field were shorter than those of WT rice plants by about 70 to 90%. Coleoptile elongation of transgenic rice seedlings (R1) was suppressed under FR radiation, but not significantly under R radiation. This phenomenon is proportionally related to transgene expression level, suggesting that the transgenic rice has marked effects to suppress SR. The suppression of SR in rice will lead to reduce the lodging damage and eventually increases the quality and productivity of crops in

intensive production systems.

The seed weight per grain and total seed weight per tiller increase of the transgenic rices increase over the wild types, while the tiller number and the grain fertility of the transgenic rices decrease compared to the wild types. Although the overall crop yields need to be analyzed by further cultivation in the rice field, the U2 homoline and several U lines are likely to be good candidates for the breeding of density-tolerant and high yield lines.

4. Development of a high-level expression system using a chloroplast targeting signal in transgenic rice plants

In order to develop a high-level expression system in transgenic rice, we inserted a synthetic gene (*sgfp*) encoding a modified form of the green fluorescent protein (GFP) into expression vectors. Two expression vectors, *rbcS-sgfp* for an untargeted and *rbcS-Tp-sgfp* for a chloroplast targeted expression, were constructed to compare expression levels in transgenic plants. To study mechanisms underlying the regulation of transgene expression by the *Tp* sequence, we mutated the sequence (*mTp*) in such a way that it can no longer localize fused heterologous proteins into plastids, while it retains identical nucleotide

sequence to its wild type. The *mTp* was fused to the *sgfp* gene and linked to the rice *rbcS* promoter, generating an expression vector, *rbcS-mTp-sgfp*. Several transgenic plants were produced for each construct by the *Agrobacterium*-mediated method. Transgenic plants were identified by herbicide resistance test and genomic Southern blot analysis. Confocal microscopic analyses demonstrated that GFP fluorescence in the *rbcS-Tp-sgfp*-transformed lines was specifically localized within chloroplasts, whereas the fluorescence was detected within cytoplasm and nucleoplasm in the *rbcS-mTp-sgfp*- and *rbcS-sgfp*-transformed lines. Northern blot analysis indicated that mRNA levels are very different in transgenic lines, depending on the types of the *Tp* sequence employed. Transcript levels of *rbcS-Tp-sgfp*-transformed lines are 10 fold higher than those of either *rbcS-mTp-sgfp*- or *rbcS-sgfp*-transformed lines, whereas levels of the last two are comparable. Levels of sGFP accumulation are also correspondingly higher in *rbcS-Tp-sgfp*-transformed lines than those of the other two, as examined by immunoblot analyses using anti-GFP antibodies. Thus, increase in levels of sGFP accumulation appears to reflect increase in mRNA levels, which is caused by the presence of the functional *rbcS* transit peptide. These results suggest that a functional *rbcS* transit peptide enhances transgene expression in addition to target of the gene products into chloroplasts.

The levels of *sgfp* expression were about 0.5% of the total soluble protein in mature leaf tissues of the

rbcS-sgfp-transformed lines. In contrast, expression levels were markedly increased in mature leaf tissues of the *rbcS-Tp-sgfp*-transformed lines, yielding about 10% of the total soluble protein. N-terminal sequencing of the localized GFPs revealed that the Tp-GFP fusion protein was correctly processed during import to non-green plastids, as well as to chloroplasts. Thus, our results demonstrate that GFP can be produced at high levels and localized in specific subcellular spaces of transgenic plants, providing a high-level expression system for general use in rice, an agronomically important cereal.

CONTENTS

(영 문 목 차)

1. Introduction

- 1) Purpose of research
- 2) Survey of related work
- 3) Major goal and scope of research

2. Isolation, chracterization and identification of new genes for trehalose synthesis

- 1) Introduction : State of the Art
- 2) Methods
 - (1) Molecular cloning of the genes for TPS and TPP from *E. coli*
 - (2) Construction of plasmid for rice transformation
 - (3) Increasement of trehalose synthesis by TPSP fusion enzyme
 - a. Characterization of biochemical properties of TPS, TPP and TPSP
 - b. Trehalose synthesis by TPS, TPP and TPSP *in vitro*
 - c. Trehalose synthesis by TPS, TPP and TPSP *in vivo*
 - (4) Isolation of new genes for trehalose synthesis
 - a. Molecular cloning of the genes for BvMTase and BvMTHase
 - b. Construction of a fusion gene for BvMTSHase fusion enzyme
 - c. Expression of BvMTSase, BvMTHase and BvMTSHase in *E. coli*

- d. Trehalose synthesis using maltooligosaccharides
- e. Trehalose synthesis using starch
- (5) Isolation of new genes for trehalose synthesis from thermophilic microorganism
 - a. Genomic DNA isolation from *Sulfolobus acidocaldarius*
 - b. Molecular cloning of the genes for SaMTS and SaMTH
 - c. Expression of thermostable SaMTS, SaMTH and SaMTSH in *E. coli*
 - d. Trehalose synthesis by SaMTS, SaMTH and SaMTSH

3) Results

- (1) Molecular cloning of the genes for TPS and TPP from *E. coli*
- (2) Construction of plasmid for rice transformation
- (3) Increase of trehalose synthesis by TPSP fusion enzyme
 - a. Characterization of biochemical properties of TPS, TPP and TPSP
 - b. Trehalose synthesis by TPS, TPP and TPSP *in vitro*
 - c. Trehalose synthesis by TPS, TPP and TPSP *in vivo*
- (4) Isolation of new genes for trehalose synthesis
 - a. Molecular cloning of the genes for BvMTase and BvMTHase
 - b. Expression of BvMTase, BvMTHase and BvMTSHase in *E. coli*
 - c. Substrate specificity of BvMTase and BvMTHase
- (5) Increase of trehalose synthesis by BvMTSHase fusion enzyme
 - a. Construction of a fusion gene for BvMTSHase fusion enzyme
 - b. Expression of BvMTSHase in *E. coli*

- c. Trehalose synthesis by BvMTSHase fusion enzyme
- d. Trehalose synthesis using starch
- (6) Isolation of new genes for trehalose synthesis from thermophilic microorganism
 - a. Molecular cloning of the genes for SaMTS and SaMTH
 - b. Construction of a fusion gene for SaMTSH fusion enzyme
 - c. Expression of thermostable SaMTS, SaMTH and SaMTSH in *E. coli*
 - d. Trehalose synthesis by SaMTS, SaMTH and SaMTSH
 - e. Trehalose synthesis using starch
- (7) References

3. Transgenic rice plants expressing trehalose synthase/phosphatase fusion gene

- 1) Introduction : State of the Art
- 2) Methods
 - (1) Costruction of Ti-based vectors for rice transformation
 - (2) Co-integration of plant expression vectors to pSB1 in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404
 - a. Triparental mating
 - b. Preparation of pSB1 and co-integrated vector DNAs from *A. tumefaciens* LBA4404
 - c. Restriction analysis of co-integrated vectors
 - (3) *Agrobacterium*-mediated rice transformation
 - a. Callus induction

- b. *Agrobacterium* culture
 - c. Co-cultivation of scutarium-derived calli with *A. tumefaciens* LBA4404
 - d. First selection of herbicide resistant calli on 2N6-CP
 - e. Second selection of herbicide resistant calli on N6-7-CP
 - f. Regeneration of herbicide resistant calli on MS-CP medium
- (4) Herbicide resistance test of transgenic rice plants
- (5) Genomic Southern-blot analysis of transgenic rice plants
- a. Rice genomic DNA isolation
 - b. Genomic Southern-blot
- (6) Northern-blot analysis of transgenic rice plants
- a. Total RNA isolation
 - b. Northern blot
- (7) Measurement and quantitative analysis of trehalose from TPSP-transformed rice plants

3) Results

- (1) Rice transformation vectors for expression of *E. coli* TPSP
- a. Construction of pSBU-TPSP for constitutive expression of TPSP
 - b. Construction of pSB109-TPSP and pSB109-GFP for ABA-inducible expression of TPSP and GFP, respectively.
 - c. Construction of pSB-SbeTPSP for seed specific expression of TPSP
 - d. Construction of pSB-SaiTPSP for stress-inducible expression of TPSP

- (2) Co-integration of plant expression vectors to pSB1 in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and its analysis
- (3) *Agrobacterium*-mediated rice transformation
- (4) Genomic Southern-blot analysis of TPSP-transformed rice plants
- (5) Northern-blot analysis of TPSP-transformed rice plants
- (6) Measurement and quantitative analysis of trehalose from TPSP-transformed rice plants

4. Transgenic rice plants overexpressing the phytochrome A gene to suppress shade-avoidance response

1) Introduction : State of the Art

2) Methods

- (1) A Phytochrome gene and its cloning
- (2) *Agrobacterium*-mediated rice transformation
 - a. Construction of Ti-based vectors for rice transformation
 - b. Rice transformation and regeneration
- (3) Southern- and Northern-blot analysis of transgenic rice plants
 - a. Genomic Southern-blot
 - b. Northern-blot
- (4) Progeny analysis of transformants and bioassay

3) Results

- (1) A Phytochrome gene and its cloning
 - a. Phytochrome A gene

- b. Construction of intermediate vectors
 - a) Construction of pSBR1
 - b) Construction of pAP3.7-N and pPP800-N
 - c) Construction of pSBR800
- C. *Agrobacterium*-mediated rice transformation
 - a) Construction of Ti-based vectors for rice transformation
(pSB3.7 and pSBR3.7)
 - b) Rice transformation
- (2) Herbicide resistance test of transgenic rice plants
- (3) Western-blot analysis of transgenic rice plants
- (4) Southern-blot analysis of transgenic rice plants
- (5) Physiological properties of *ubi-PhyA*-transformed rice plants
- (6) Fertility (R_1) of transgenic rice plants
- (7) Transformants analysis of R_1 generation
 - a. Properties of transformants under the red- and far red lights
 - b. Segregation of R_1 generation by the herbicide test
- (8) Expression analysis of transformants in R_1 generation
- (9) Growth of *ubi-PhyA*- and *rbcS-PhyA*-transformed rice plants
- (10) Physiological properties of transformants expressing the phytochrome
- (11) Cross of transformants
- (12) Field test of *ubi-PhyA*- and *rbcS-PhyA*-transformed rice plants
- (13) Physiological properties of transformants expressing the phytochrome in field

(14) Discussion

5. Development of a high-level expression system using a chloroplast targeting signal in transgenic rice plants

1) Introduction : State of the Art

2) Methods

(1) Construction of Ti-based vectors for a chloroplast targeted and for an untargeted expression of sGFP

a. Construction of Ti-based vector for an untargeted expression of sGFP (pSB-RG)

b. Construction of Ti-based vector for a chloroplast targeted expression of sGFP (pSB-RTG)

a) Isolation of rice rbcS promoter-transit peptide sequence

b) Construction of translationally fusion vectors containing the rice rbcS promoter-Tp sequence linked to the sGFP gene and its sequence analysis

c) Construction of pSB-RTG for chloroplast targeted expression of sGFP

c. Construction of expression vector for underlying the regulation of transgene expression by the *Tp* sequence

a) PCR amplification of modified *Tp* sequence by the frame-shift mutation

b) Construction of pSB-RmTG containing the rice rbcS

promoter-mTp sequence linked to the sGFP gene and its
sequence analysis

(2) Co-integration of plant expression vectors to pSB1 in
Agrobacterium tumefaciens LBA4404

a. Triparental mating

b. Preparation of pSB1 and co-integrated vector DNAs from *A.*
tumefaciens LBA4404

c. Restriction analysis of co-integrated vectors

(3) *Agrobacterium*-mediated rice transformation

(4) Herbicide resistance test of transgenic rice plants

(5) Genomic Southern-blot analysis of transgenic rice plants

a. Rice genomic DNA isolation

b. Genomic Southern-blot

(6) Visualizing sGFP in transgenic rice plants by confocal laser
scanning microscopy (CLSM)

(7) Northern-blot analysis of transgenic rice plants

a. Total RNA isolation

b. Northern blot

(8) Western-blot analysis of transgenic rice plants

a. Protein extraction

b. Western-blot

3) Results

(1) Construction of Ti-based vectors for a chloroplast targeted
and for an untargeted expression of sGFP

a. Construction of Ti-based vector for an untargeted expression

- of sGFP (pSB-RG)
- b. Construction of Ti-based vector for a chloroplast targeted expression of sGFP (pSB-RTG)
 - c. Construction of expression vector for underlying the regulation of transgene expression by the Tp sequence
 - a) PCR amplification of modified Tp sequence by the frame-shift mutation
 - b) Comparisons of nucleotide and deduced amino acid sequence between transit peptide and modified transit peptide, and their hydrophobicity
 - c) Construction of pSB-RmTG containing the rice rbcS promoter-mTp sequence linked to the sGFP gene and its sequence analysis
- (2) Co-integration of plant expression vectors to pSB1 in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and its analysis
 - (3) *Agrobacterium*-mediated rice transformation
 - (4) Phenotypic analysis of herbicide (Basta) resistance in R₀ transgenic rice plants
 - (5) Genomic Southern-blot analysis of *sgfp*-transformed rice plants
 - (6) Subcellular localization of sGFP in transgenic rice plants
 - a. Visualizing sGFP in transgenic rice calli by CLSM
 - b. Visualizing sGFP in leaf cells of transgenic rice plant expressing chloroplast targeted- and untargeted sGFP by CLSM
 - (7) Northern-blot analysis of *sgfp*-transformed rice plants
 - (8) Comparison of expression levels in transgenic plants

(9) Expression analysis of sGFP in transgenic rice plants

- a. sGFP expression in different lines of the chloroplast-targeted and untargeted-expression in transgenic rice plants
- b. Comparison of sGFP expression levels between cytosol expression and chloroplast targeted expression
- c. N-terminal sequence analysis of the chloroplast targeted sGFP

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 개발의 필요성
2. 국내외 관련 기술의 현황과 문제점
3. 연구개발의 목적과 범위

제 2 장 한발 저항성 유전자 개발

제1절 서 설 (연구개발의 목적 및 중요성)

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 대장균 trehalose 생합성 유전자 분리 및 특성 규명
2. 핵 형질전환용 유전자 운반체 제작
3. 대장균 trehalose 생합성 유전자 발현 효율 증진
 - 가. TPS, TPP 및 TPSP 효소활성도 측정
 - 나. 당 분석 및 정량
 - 다. 대장균내의 Trehalose 양 분석
4. 한발 저항성 고유 유전자의 분리
 - 가. *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 Trehalose 합성 유전자의 분리
 - 나. BvMTSHase 융합효소 유전자 제조

- 다. 대장균에서의 BvMTSase, BvMTHase 및 BvMTSHase 융합유전자의 발현 및 순수분리
- 라. BvMTSase, BvMTHase 및 BvMTSHase 융합효소단백질을 이용한 trehalose 합성 및 기질특이성
- 마. 전분으로부터의 trehalose 합성
- 5. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 분리 및 특성 규명
 - 가. *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49426) 의 배양 및 게놈 DNA 분리
 - 나. *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49426) 으로부터 trehalose 합성 유전자의 분리
 - 다. 내열성 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 융합단백질 효소의 대장균에서 대량 발현 및 분리
 - 라. 내열성 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 융합단백질 효소의 활성 검정

제3절 연구개발결과

- 1. 대장균 trehalose 생합성 유전자 분리 및 특성 규명
- 2. 핵 형질전환용 유전자 운반체 제작
- 3. 대장균 trehalose 생합성 유전자 발현 효율 증진
 - 가. 융합단백질 TPSP에 의한 Trehalose 합성
 - 나. 융합단백질 TPSP 의 반응속도상수
 - 다. 대장균 내에서의 Trehalose 생산효율 검정
- 4. 한발 저항성 고유 유전자의 분리
 - 가. *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 Trehalose 합성 유전자의 분리
 - 나. 대장균에서의 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자의 발현 및 순수분리
 - 다. BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질을 이용한 trehalose 합성 및

기질 특이성

5. 한발 저항성 고유 유전자의 발현 효율 증진
가. 융합단백질 BvMTSHase 에 의한 Trehalose 합성
나. 대장균에서의 BvMTSHase 융합유전자의 발현 및 순수분리
다. BvMTSHase 융합효소단백질을 이용한 trehalose 합성 및 기질 특이성
라. 알파-아밀라제를 이용한 전분으로부터의 trehalose 합성 효율 증대
6. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 분리 및 특성 규명
가. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 분리
나. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자의 융합
다. 대장균에서의 SaMTH, SaMTH 및 SaMTSH 유전자의 발현 및 순수 분리
라. SaMTH, SaMTH 및 SaMTSH 효소단백질을 이용한 trehalose 합성
마. 전분으로부터의 trehalose 합성
7. 참고문헌

제 3 장 한발저항성 유전자 벼 형질전환

제1절 서 설 (연구개발의 목적 및 중요성)

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작
2. 제작 운반체의 *Agrobacterium* 내로의 도입 및 확인
가. Triparental mating 방법
나. Co-integration된 플라스미드 DNA 분리

- 다. Co-integration된 플라스미드 DNA의 제한효소 절단확인
- 3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환
 - 가. 캘러스 준비
 - 나. 균주준비
 - 다. Co-cultivation
 - 라. 1차 선발
 - 마. 2차 선발
 - 바. 재분화
- 4. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정
- 5. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석
 - 가. 벼 genomic DNA의 분리
 - 나. Genomic Southern-blot
- 6. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석
 - 가. Total RNA 의 분리
 - 나. Northern blot
- 7. TPSP 유전자 벼 형질전환체의 trehalose 분석 및 정량

제3절 연구개발결과

- 1. 한발저항성 벼 개발을 위한 형질전환용 유전자 운반체
 - 가. 항시 발현 프로모터(Ubi-1)를 이용한 운반체 제작(pSBU-TPSP)
 - 나. ABA-유도 프로모터를 이용한 운반체 제작(pSB109-TPSP, pSB109-GFP)
 - 다. 종자 특이적 발현 유도 프로모터를 이용한 운반체 제작 (pSB-SbeTPSP)
 - 라. 노화 및 스트레스 발현 유도 프로모터를 이용한 운반체 제작 (pSB-SaiTPSP)

2. 제작 운반체의 *Agrobacterium* 내로의 도입 및 확인
3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환
4. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석
5. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석
6. TPSP 유전자 형질전환체 trehalose 분석 및 정량
7. 연구성과

제 4 장 밀식재배저항성 유전자 벼형질전환

제1절 서 설 (연구개발의 목적 및 중요성)

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 피토크롬 유전자 준비 및 cloning
2. 벼 형질전환
 - 가. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작
 - 나. 벼 형질전환 및 식물체 재분화
3. 형질전환 식물체내 도입 유전자 분석
 - 가. Southern blot 방법
 - 나. Northern blot 방법
4. 형질전환 벼 후대 및 생물검정

제3절 연구개발 결과

1. 밀식재배 저항성 유전자 분리 및 운반체 제작
 - 가. 밀식재배 저항성 유전자 확보
 - 나. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작
 - 1) pSBR1 제작

2) pAP3.7-N, pPP800-N 제작

3) pSBR800 제작

다. *Ubi-1*, *rbcS* 프로모터를 이용한 밀식재배 저항성 유전자의 벼
형질전환

1) 벼 형질전환용 운반체 제작 (pSBU3.7, pSBR3.7)

2) 밀식재배 저항성 유전자 형질전환

2. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정
3. 형질전환체의 단백질 발현 분석
4. 형질전환 벼의 Southern 분석
5. 피토크롬(*ubi-PhyA*) 형질전환체의 표현형질의 생리적 특성
6. 피토크롬이 도입된 벼 *ubi-PhyA1*와 *rbcS-PhyA*의 R1 종자 확보
7. R1세대에서 형질전환체의 분석
 - 가. 적색광 원적색광 처리하에서 형질전환체의 특성
 - 나. 제초제 저항성 검증을 통한 R1 세대 형질전환체의 분리비
8. R_i 세대에서 피토크롬 형질전환체의 발현 분석
9. *ubi-PhyA*, *rbcS-PhyA* 형질전환체 육성
 - 가. 씨앗 발아(發芽)
 - 나. 핀셋 파종(播種) 및 육묘(育苗)
 - 다. 모내기
10. 피토크롬 형질전환체의 표현형질과 생리적 특성
11. 형질전환 벼의 교배
12. 형질전환체의 포장 전개
 - 가. *PhyA* 형질전환 벼의 제초제 저항성 검증을 통한 homo, hetero, recessive line 선발
 - 나. 씨앗 발아

- 다. 핀셋 파종 및 육모
- 라. 모내기
- 마. 출수일 확인
- 13. Phytochrome 형질 전환체의 표현형질과 생리적 특성 분석
 - 가. Ubi-line의 표현형질의 생리적 특징
 - 나. rbcS-line의 표현형질의 생리적 특징
 - 다. 밀식 재배와 동일한 환경조건에서 형질전환체의 생리적 특성 분석
 - 1) Shade avoidance response 실험준비
 - 가) Homo, hetero, recessive line 선별 및 발아
 - 나) 차광막 설치
 - 다) 결과
- 14. 고찰
- 15. 연구성과

제 5장 엽록체 내 유전자 발현 시스템 개발

제1절 서 설 (연구개발의 목적 및 중요성)

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 엽록체내 발현 운반체 제작 및 세포질 발현 운반체 제작
 - 가. GFP의 세포질 발현용 운반체 (pSB-RG) 제작
 - 나. 엽록체(chloroplast) 발현용 운반체 (pSB-RTG) 제작
 - 1) 벼 rbcS 프로모터-transit peptide sequence의 분리
 - 2) 벼 rbcS 프로모터-transit peptide와 sGFP의 연결 및 연결부위의 염기서열 확인

- 3) 엽록체 발현용 GFP유전자 함유 운반체 제작 (pSB-RTG)
 - 다. rbcS Tp 특성 규명을 위한 운반체 제작
 - 1) rbcS Tp sequence 돌연변이체 (mTp)의 합성
 - 2) mTp가 도입된 벼 형질전환용 운반체 제작
2. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입 및 확인
 - 가. Triparental mating 방법
 - 나. Co-integration된 플라스미드 DNA 분리
 - 다. Co-integration된 플라스미드 DNA의 제한효소 절단확인
3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환
4. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정
5. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석
 - 가. 벼 genomic DNA의 분리
 - 나. Genomic Southern-blot
- 6 Confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 이용한 GFP의 발현 및 세포내 분포 관찰
7. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석
 - 가. Total RNA 의 분리
 - 나. Northern blot
8. 형질전환체의 단백질 발현 분석
 - 가. 용해성 단백질 추출 및 정량
 - 나. Western-blot 분석

제3절 연구개발결과

1. 엽록체내 발현 운반체 제작 및 세포질 발현 운반체 제작
 - 가. GFP의 세포질 발현용 운반체(pSB-RG) 제작
 - 나. 엽록체(chloroplast) 발현용 운반체 제작 (pSB-RTG)

- 다. rbcS Tp 특성 규명을 위한 운반체 제작
 - 1) rbcS Tp sequence 돌연변이체 (mTp)의 제작
 - 2) rbcS Tp 돌연변이체 (mTp)의 hydrophobicity 분석
 - 3) mTp 도입 벼 형질전환용 운반체 제작
- 2. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입 및 확인
- 3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환
- 4. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정
- 5. GFP 도입 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석
- 6. GFP의 세포내 분포 및 조직별 발현 관찰
 - 가. GFP가 도입된 형질전환 캘러스의 Confocal Microscopy 관찰
 - 나. GFP가 도입된 형질전환 벼 엽조직의 Confocal Microscopy 관찰
- 7. GFP 도입 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석
- 8. 발현 산물의 정량적 분석
- 9. 엽록체 내 도입유전자의 단백질 발현 분석
 - 가. GFP의 세포질 및 엽록체 내 발현 비교 분석
 - 나. 발현 단백질의 정량적 비교 분석
 - 다. 엽록체 내 targeting된 GFP의 N-말단 아미노산 서열 분석
- 10. 참고문헌
- 11. 연구성과

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경제 및 대외경쟁력을 고려할 때 쌀 생산의 국제 경쟁력 강화가 매우 중요하다. 또한 농업생산 여건이 자원 위주에서 기술위주의 농업으로 바뀌어감에 따라 농업의 노동 생산성 향상과 기술개발의 방향이 최소의 비용으로 최대의 효과를 이룰 수 있는 적정기술개발이 이루어져야 한다.

식물에 있어서는 획기적인 형질전환 기법의 확립과 함께 현재 유전 공학 기술로 1993년까지 전 세계적으로 생산된 800여종의 신형질 작물이 포장시험 실시 중이며 일부는 이미 상품화가 되었고 (Beck and Ulrich, 1993a), 상품화된 예로는 저장성이 향상된 토마토를 들 수 있는데, 이 토마토는 저장 혹은 유통기간이 길어져도 항상 신선도가 유지되기 때문에 식탁을 한층 더 즐겁게 해 줄 뿐 아니라 같은 생산량으로 훨씬 높은 수익성이 기대된다 (Beck and Ulrich, 1993b).

우리나라 벼 육종은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전자원을 보유하고 있으나 농업적으로 중요한 유전특성 (내도복성, 내한발성)의 유전자 분리 개발 및 품종육성은 미흡하다. 따라서 쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경제 및 대외 경쟁력을 고려하였을 때 기존의 우량품종에 환경저항성과 관련된 유전자들을 도입한 벼 품종개발로 환경 독립적 농업개발이 요구된다. 또한 농촌인구의 고령화와 노동력부족에 대처하기

위해 실시 예정인 벼 직파 재배법에 적합한 제초제 저항성, 한발 저항성 및 밀식 재배형 품종개발이 시급한 상태이다. 이러한 신행질 작물의 출현은 유전자의 확보 및 새로운 유전자의 개발에 크게 의존하고 있어 이의 관련 유용 유전자의 개발 또한 매우 시급한 당면 과제이다.

50여년 전까지만 해도 식물이 여러 가지 약재의 주 공급원으로 사용되다가 현재는 유기화학의 발전으로 제약회사에서 합성약품이 대량으로 쏟아져 나오고 있다. 최근에는 식물체를 생체 반응기로 활용하여 생물활성 물질 및 의약품 등의 유용물질을 대량생산하는 기술이 개발되고 있는데, 이것이 실용화 될 경우에는 현재의 농업생산력에 일대 변혁이 가능할 것으로 기대된다. 한 예로, 전염병 백신유전자를 바나나에 도입함으로써 바나나를 먹으면 전염병에 대한 면역이 생기고 따라서 AIDS바이러스가 오염돼 있을지도 모르는 겁나는 주사로부터 우리가 해방될 수도 있을 가능성을 제시하고 있다 (Moffat, 1995). 다른 예로는 설당을 많이 먹었을 때 치아를 파괴시키는 *Streptococcus mutans*의 surface antigen에 대한 분비항체(secretory antibody)를 식물에 발현시키는 데 성공하였으며, 분비항체는 네 개의 독립된 단백질로 구성되어 있기 때문에 항체유전자 네 개를 서로 다른 담배식물체에 발현시킨 후 육종학적 방법으로 한 개의 식물체로 모아서 동시에 발현시킨 결과 완전한 분비항체가 만들어졌다 (Ma et al., 1995). 이와 같이 작물에 외래유전자를 도입함으로써 환경저항성, 재배 적합형 품종을 개발하고 고가의 의약품 및 생리활성 물질을 대량생산, 이용하는 방법은 기존의 방법보다 비용이 적게 들고, 농업생산성을 극대화하는 데 크게 기여하게 될 전망이다. 현재 영농비 및 노동력 절감을 위하여 우리나라의 벼의 직파 면적이 늘고 있고 2-3년 내에 전면확대 될 가능성이 높아서 예전보다 밀식 재배 품종의 필요성이 증대되고 있다. 그러나 밀식 재배는 식물의

도장, 클로로필 함량의 감소 및 통풍 저해 등으로 인한 수확량의 감소와 더불어 키가 커짐으로 인한 도복 문제 등이 제기될 우려가 있다. 이에 본 연구에서는 유전공학적인 방법으로 식물이 자연광을 받아서 식물 종자의 발아·성장, 클로로필에 의한 광합성·개화·결실 등 수백 가지의 광형태형성을 관장하고 있는 광수용체인 피토크롬을 벼에 핵에 형질 전환시켜서 밀식재배와 내도복성을 가진 다수확 품종을 육성하고자 한다.

피토크롬을 담배나 형질전환하여 과량으로 발현시키면 밀식 재배를 할 경우에도 키가 작고 클로로필의 함량이 많고 생장이 좋은 식물체를 재배할 수 있었다 (Harry Smith, presented at Eur. Symposium on Photomorphogenesis in Plants, Barcelona, Spain, July 9-13, 1995; Jordan *et al.*, 1995). 아직까지 피토크롬을 단자엽 식물에 형질전환시켜서 형질전환체를 개발한 예는 보고되지 않고 있으나, 외국에서 시도되고 있는 것으로 알려지고 있다. 국내에서는 벼를 포함한 주곡작물은 형질전환기술의 부족이 신형질 품종육종에 장애가 되나, 유전공학 기법에 의한 벼의 신품종 개발 기술을 확보하는 것은 또한 다른 단자엽 식물체의 형질전환에 파급효과가 매우 크다.

벼 형질전환 기술이 확립되면 재래 육종법과 상호보완적인 연구가 가능하여 전통적인 육종연구의 시간과 노력의 절감에 상당히 기여할 것으로 기대되며, 최근 발달한 유전자 전입에 의한 형질 전환 기술은 세균, 곰팡이 및 바이러스 병 등에 저항성을 보이는 작물, 전분 함량 및 조성이 변화된 감자, 지방산의 조성이 변화된 유채, 쉽게 물러지지 않는 토마토 등의 육성을 가능하게 하고 있다.

현재까지 환경 변화에 따라 유도 발현되는 유전자를 전입 발현시켜서 외부 변화에 대해 저항성을 갖는 식물의 육성을 시도하였으나 그 효

과는 그리 만족스럽지가 못하였다. 그 이유는 대부분의 경우 환경 변화에 따라 유도 발현되는 유전자들의 기능을 확실하게 모르는 상태에서 시도 되었기 때문으로 사려된다. 따라서 본 연구에서는 trehalose synthase 와 같이 trehalose 생합성 기능이 확실히 알려진 유전자를 이용하여 한발 저항성 품종을 육성하고자 한다. 특히 벼는 탄수화물 대사가 지극히 왕성하며 이당류 trehalose 생합성을 위한 전구체의 공급이 유리한 것으로 사려되므로 여러가지 바람직한 특성을 가지고 있어서 값비싼 trehalose 를 대량으로 값싸게 생산하기 위한 생체반응기로 매우 적합한 식물로 인식된다.

기존의 식물 유전공학에 의한 벼 형질전환은 세포질 발현에 있어서 발현산물의 불안정성과 낮은 발현으로 목표하는 표현형을 기대하기 어려우나 엽록체 내에 유전자 산물을 축적하는 기술을 개발함으로써 국제적으로 도입유전자 발현 기술에 선도적 위치에 설 수 있을것으로 예상된다.

2) 경제·사회적 측면

쌀은 우리국민의 주식이며, 생계농이라는 특징을 가지고 있는 한국농가의 중심소득원이 되고 있다. 쌀생산은 대부분의 농촌지역의 경제를 뒷받침하는 중심산업 구실을 하고 있다.

벼농사는 고용 효과면에서 국민경제에 중요한 몫을 차지하고 있는 산업부문이다. 즉 2백 20만명 정도의 노동력 고용, 전체 경제활동 인구의 12% 수준이며 총 농림수산업 취업자의 65%에 해당한다. 만약, 벼농사가 포기된다면 이들 대부분이 농업 숙련자이기는 하지만 대체하여 한계노동력을 고용할 수 있는 산업이 없으며 대부분 실업자가 될 것이다. 최근 국가경제 발전에 따른 국민소득 수준의 향상으로 식료품에 대한

소비자의 기호도가 다양화되고, 재배농민 또한 고소득 작물을 선호하고 상대적으로 소득이 낮은 벼농사를 기피하고 있다. 또한 국외적으로는 WTO체제의 출범에 따른 농·축·수산물의 수입 개방화 등 여러 가지 여건들이 우리 농업을 어렵게 하고 있으며, 쌀 시장 개방에 따른 국민 경제적 파급효과는 매우 다방면으로 진행될 것으로 예측되는 데 농가소득의 지속적 감소는 결국 농업기반 상실 가능성이 우려된다. 앞으로 예견되는 남북한 통일시대를 대비하여 주곡작물인 벼 재배에 국제경쟁력을 키우는 것은 국가의 전략면에서도 매우 중요하므로, 밀식 재배 및 한발 재배가 가능한 신품종 개발로 농민의 노동력 절감 및 생산량 증대를 통하여 농업 국가 경쟁력 향상 및 국가 농업기반을 강화시킬 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

우리의 식문화는 쌀을 중심으로 발전해온 쌀의 문화이며, 논농사와 쌀은 우리의 문화와 전통풍습에 중요한 역할을 해 왔다. 쌀 농사는 홍수를 방지하며, 수자원을 함양하고 자연환경과 국토를 관리하는 엄청난 크기의 공익적 기능도 수행하고 있다. 따라서 벼농사는 자연환경의 보존기능과 전통문화의 존속이라는 다양한 공익적 기능을 가지고 있다. 또한 식물 유전공학적인 첨단기술을 도입하여 재도약의 발판을 세울 수 있으며, WTO체제에 대비하여 우리의 첨단기술을 갖는 것은 사회 전반적인 파급효과에도 영향을 주게 된다. 따라서 첨단기술에 의해서 개발되는 신품종에 대한 특허 및 소유권을 확보하여 기술 자신감을 키워 나가야 한다.

우리나라는 UR로 대표되는 농수산물 수출입 시장의 전면 개방, 농촌 인구의 고령화, 타산업대비 저부가가치, 농촌생활환경의 상대적 낙후 등으로 인하여 매우 어려운 상황에 직면해 있다. 그러므로 형질전환 식

물체를 이용한 외래 유전자의 발현 및 이를 이용하여 새로운 형질을 가진 식물체를 개발하는 것은 차세대 농업의 성공여부를 좌우할 중요한 기술로 부각되고 있으며, 기존의 노동집약적이고 장시간의 연구가 요구되는 육종연구와 상호보완적인 벼 형질전환 기술의 개발이 가능하여 전통적인 육종연구의 시간과 노력이 절감되고 따라서 신품종 개발에 의한 농업 생산성이 향상 될 것이다.

우리나라의 고르지 못한 기후환경속에서 한발에 의한 수도생산력피해의 심각성과 농산폐기물(벼짚)을 이용한 고부가가치의 Trehalose 생산이 가능해 졌을 때 경제 산업적인 효과는 짐작하기 어려울 정도로 클 것으로 사료되고 현재 우리나라의 농촌노동력의 부족과 농업생산성 저하를 극복하기 위하여 2-3년내에 실시할 예정인 수도 직파재배법에 적합한 phytochrome 유전자 도입에 의한 밀식재배용 품종개발은 수도생산성 제고 및 부족한 노동력에 의한 효율적인 농업수행을 가능하게 할 것이며, 국제화 개방화시대의 한국농업의 위기를 효과적으로 대처하고 다가오는 21세기 선진국 시대의 농업의 위상을 정립하기 위한 방법으로 전통적인 농업생산 기술에 유전공학적 기법을 접목시킴으로써 새로운 형태의 고생산성 농업을 창출해낼 수 있을 것으로 기대된다.

농업적으로 유용한 유전자 개발에 의해 국내 고유 유용 유전자의 지적 소유권의 확보 및 이로부터 개발되는 고유 신형질 벼품종의 개발 및 보호가 가능하게 되며, 유용 유전자 도입에 의한 직파재배적합형 형질 전환작물의 개발은 안전한 식량공급과 생산성 제고에 크게 기여함으로써 보다 쾌적하고 안락한 생활을 가져다 줄 것으로 생각된다. 직파재배적합형 형질전환작물의 개발은 또한 국내 농업이 존재의 위기를 맞고 있는 열악한 상황에서 농산물의 부가가치를 높일 뿐 아니라 생산비 및 노동력 절감으로 살기 좋은 농촌건설에 일익을 담당할 것이다.

2. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1) 피토크롬과 밀식재배와의 관계

피토크롬은 식물이 자연광을 받아서 식물 종자의 발아·생장, 클로로필에 의한 광합성·개화·결실 등 수백가지의 광형태형성을 관장하는 광수용체로서 같은 식물체에 A, B, C등의 여러 종류가 있으며 각각 서로 다른 기능을 가지고 있다 (Smith, 1995; Parker and Song, 1995). 그 중에서 밀식 재배와 내도복성은 phyA와 phyB가 조절하는 것으로 알려져 있다 (Quail *et al.*, 1995; Yanovsky *et al.*, 1995).

피토크롬의 작용은 빛의 세기 (low fluence response, very low fluence response, high irradiance response) 및 R(적색광, 660 nm)/FR(원적색광, 730 nm)의 비율 (이것은 적색광흡수 피토크롬인 Pr형과 원적색광 피토크롬인 Pfr형의 생성비율)에 의해서 조절된다. 그 중에서 R/FR이 가장 중요한 요소가 된다 (Quail, 1994). 특히 밀식 재배의 경우에는 아래 그림에서 보는 바와 같이 주위에 있는 식물체가 적색광을 흡수함으로써 인하여 R/FR의 양이 감소하고 따라서 Pfr/P_{total}의 양이 급속하게 감소하게 된다. 식물체는 이 R/FR의 비율로서 밀식과 그늘짐을 감지하여 생장 및 생리를 조절하게 된다.

R가 FR보다 상대적으로 많은 자연광하에서는 phyB의 Pfr형이 생리적인 조절을 하여 정상적인 식물체를 유지시키나, 식물이 그늘이 지면 클로로필에 의해서 적색광을 흡수함으로써 인해서 그 아래는 상대적으로 원적색광 (FR)의 양이 많아지며, 이때는 phyA가 식물의 정상적인 상태가 되도록 한다. 그러나 phyA는 빛에 의하여 감소하므로 상대적으로 많아진 phyB에 의해서 조절 받게된다. 즉 FR의 빛을 받아 PrB의 형태가 많아지고 자엽하축 (hypocotyl)과 줄기의 도장을 저해하는 PfrB의 감소로

인하여 자엽하축과 줄기는 도장을 하게된다 (Quail *et al.*, 1995).

2) 피토크롬 형질전환 식물체

피토크롬 A 유전자는 귀리, 옥수수, 쌀, 박 (cucurbita), 감자와 콩에서 알려져 있고, 피토크롬 B 유전자는 쌀, 감자, 콩과 애기장대 (*Arabidopsis*) 에서 알려져 있으며, 피토크롬 C, D, E 유전자는 애기장대에서 알려져 있다 (Parker and Song, 1995; Clack *et al.*, 1994; Furuya, 1993).

자연광하에서 피토크롬의 과량발현은 FR에 의한 피토크롬 B (PrB)의 활성을 극복하고, 그늘짐을 피하는 현상을 억제함으로써 자엽하축의 신장을 억제하고 de-etiolation 및 녹색화 (greening)을 촉진시킨다.

피토크롬 과량발현의 특성과 범위는 종 및 그의 재배종 (cultivar)에 따라 다양하게 나타난다 (Nagatani *et al.*, 1991). 이러한 다양성으로 인하여 피토크롬의 과량발현 방법을 농업적으로 이용하는데는 대상 식물의 선택이 어렵고 일반적인 방법의 적용이 힘들다. 최초로 쌍자엽 식물인 담배에 귀리 피토크롬 A를 도입하여 5~20배정도 피토크롬 A의 발현을 증가 시켰으며 (Keller *et al.*, 1989), 귀리 피토크롬 A의 과량발현은 줄기 신장 (stem elongation)의 저해와 엽록소의 증가, 끝눈우성 (apical dominance)의 감소 및 잎의 노화방지 효과가 나타났으나 (Keller *et al.*, 1989; Cherry *et al.*, 1991), 꽃 피는 시기 및 종자의 수확량에는 변함이 없었다.

피토크롬 A 과량발현의 가장 큰 특징이 왜소현상 (dwarfism)이며 야생종에 비해서 형질전환된 식물체의 크기가 4배나 감소하였다. 귀리 피토크롬 A의 과량발현으로 형질전환된 담배 잎에서 야생종에 비해서 2배 이상의 단백질을 함유하고 있었으며, 광합성에 관여하는 효소의 양이

증가되었다. 그러나 이산화탄소 고정 (CO_2 fixation)은 증가되지 않았다 (Sharkey *et al.*, 1991). 벼 피토크롬 A를 담배 (cv. SR1)에 도입시켰을 때 자엽하층의 신장을 저해하고, *cab* 유전자의 circadian 조절을 변화시키며 (Kay *et al.*, 1989; Nagatani *et al.*, 1991), 귀리 피토크롬 A를 토마토 (*Lycopersicon esculentum*, cv. CF36)에 형질전환시켰을 때 담배에서와 유사한 표현형질을 보이며, 피토크롬 A의 양이 2-20배 정도 증가하였다 (Boyl and Ruail 1989; Cherry and Vierstra, 1994). 단자엽 식물의 피토크롬 A의 양이 다른 식물 (쌍자엽 식물)에 비해서 매우 적기때문에 도입된 외부 피토크롬의 과량발현에 의한 효과를 더 높일 수 있다.

Robson *et al* (1996. 8, Biotechnology 14, 995-998)등은 귀리의 피토크롬A 유전자를 담배식물체에 도입발현 시킨 결과 형질전환 담배 식물체의 성장특성이 대조구와는 매우 다르게 shade avoidance가 억제되고 밀식으로 재배했을 때도 키가 작고 단단한 모양을 유지하는 결과를 보여 주었다. 즉, 원적외선을 조사하였을 때 옷자람현상(shade avoidance)이 나타나지 않았고 밀식으로 재배했을 때도 internode길이가 짧은 전형적인 왜소성장 특성을 보였다.

본 연구에서 계획 추진중인 밀식재배 저항성 벼 개발에서는 애기장대 유래의 피토크롬A를 확보하였고, 담배식물체가 아닌 벼에 도입 발현 시키고자 하기 때문에 이것 역시 연구의 독창성이 유지되면서 밀식재배 저항성 벼개발의 최종목표 달성확률이 매우 높아졌다.

3) 벼 형질전환 연구

총 200억 원의 예산으로 1991년 말부터 시작된 일본의 7개년 벼 게놈연구는 최근의 연구결과 약 10,000개 유전자의 정보를 밝혀내었고,

1,500여 개의 표지유전자를 개발하여 벼 유용 유전자의 이용개발에 선도적 역할을 수행하고 있어서 벼의 분자생물학적인 정보가 다른 주곡작물에 비해 훨씬 많이 축적되어 있다.

벼 형질전환에 사용되는 기술은 현재 유전자 총 (Particle Gun) 이 용법이 널리 사용되고 있으며 (Kim et al, 1994) 최근에 *Agrobacterium* 을 이용하는 방법이 개발되고 있어서 (Hiel et al, 1994) 형질전환기술이 비교적 용이하다. 벼 형질전환 기술이 보급되면서, Bt toxin 유전자 (Fujimoto et al, 1993) 혹은 Protease inhibitor 유전자 (Ray Wu et al, 1994)를 이용한 내충성 벼, chitinase 유전자 도입에 의한 내병성 벼 (Lin et al, 1995) 및 제초제 저항성 벼 (Kim et al, 1994) 등이 개발되어 포장 시험중에 있다. 특히 단자엽과 쌍자엽 식물간의 유전자 조절 기작이 서로 상이함으로 단자엽에서 발현 활성이 높은 Actin과 rbcS promoter, CaMV 35S promoter 및 최근 강력한 활성을 갖는 것으로 알려진 AMT (adenine methyltransferase) promoter를 사용한다.

유전자 전입 발현에 의한 식물 형질 전환 방법이 1983년부터 개발되어 1986년부터 포장 실험이 실시된 작물의 경우 92년 말 현재 14 개국에서 860 건에 이르고 있으나 (Beck and Ulrich, 1993), 대부분 유채, 토마토, 감자 등 쌍자엽 식물에 국한되어 있으며 주요 곡물인 밀, 옥수수, 벼 등 단자엽 식물의 경우는 매우 제한적이다 (McElroy and Brettell, 1994).

4) Trehalose 생합성 관련 효소 유전자 연구

최근 이당류 trehalose 가 세포에게 탁월한 건조 저항성을 부여하는 것으로 알려져 있고 따라서 본 연구에서는 trehalose 를 생합성하는 trehalose synthase 의 유전자를 찾아서 벼 식물체 내로 이식 발현시켜

내한발성 벼 품종을 육성하는 데 목표를 두고 있다.

Trehalose (α -D-glucopyranosyl-[1-1]- α -D-glucopyranose) 는 곤충, 세균, 곰팡이, 버섯, 효모 그리고 일부 식물체 등에서 발견되는 비환원성 이당류이다 (Elbein 1974). trehalose 는 환원성 탄수화물의 저장 형태이기도 하지만 주로 영양분의 고갈, 고온, 건조, 산소 결핍, 삼투압 등 다양한 종류의 바람직하지 못한 물리적 화학적 외부 충격에서 비롯되는 나쁜 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 여겨진다 (Eleutherio et al., 1993). 특히 *Myrothamus flabellifolia* 와 같은 사막 식물이 건기에 거의 말라 죽은 상태로 있다가 비가 오기만 하면 기적같이 다시 살아날 수 있는 것은 바로 trehalose 때문인 것으로 알려졌다 (Bianchi et al., 1993; Drennan et al., 1993).

Trehalose 는 건조 과정에서 단백질과 세포막의 인지질과 수소 결합을 하여 세포 구조를 그대로 유지하게 해 주며 식품의 경우 고유의 풍미, 색상, 질감 등을 유지할 수 있게 한다 (Crowe et al., 1984). 따라서 건조 식품의 경우 색과 풍미를 보존하는 식품 첨가제로서 이용할 수 있을 뿐만 아니라 가용 수분을 감소시킴으로써 식품의 저장성을 향상시킬 수 있기도 한다 (Kidd and Devorak, 1994). 이러한 trehalose 는 버섯을 포함한 미생물 그리고 일부 식물체에서 높은 수준으로 발현이 되는데 이외에도 trehalose 는 질소 고정 근류균이 형성한 두과 식물의 뿌리 혹에서도 다량 존재하는 것으로 알려졌다 (Mueller et al., 1994). 따라서 식물 혹은 미생물 등에서 trehalose 생합성 관련 효소 유전자를 분리한 후 유전자 이식 발현에 의해 trehalose 의 발현 수준을 높이면 가뭄에 대한 작물의 내성이 증가할 것으로 기대하고 있으며 (Kidd and Devorak, 1994) 실제로 최근에 모델 식물인 담배의 경우 이러한 사실이 증명되었다 (PCT WO 95/01446). Holmstrom et al(1996.8,

Nature 379, 683-684)등은 효모의 한발저항성(trehalose-6-phosphate synthase, TPS1)유전자를 담배식물체에 도입 발현을 시킨결과 담배 잎 조직에서 trehalose합성이 0.8-3.3 mg/g dry leaf수준으로 (대조구는 0.06mg/g dry leaf) 크게 향상되었으며 유전자 도입 담배잎을 분리하여 건조기에서 수분을 잃어버리는 정도를 측정한 결과 대조구에 비해 훨씬 적은 수준으로 나타났고 또한 한발피해를 준 다음 회복정도도 현저하게 차이가 남을 관찰할 수 있었다.

본 과제에서 계획 추진한 한발저항성 벼 개발에서는 대장균 유래의 한발저항성(trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene) 유전자를 분리 사용하고 있고 담배식물체가 아닌 벼에 도입, 발현시키 고자 하기 때문에 연구의 독창성이 유지되면서 최종목표 달성확률이 매우 높아질 것으로 생각 된다.

3. 연구개발의 목적과 범위

본 연구에서는 우리의 주곡작물인 벼를 대상으로 현재 추진중인 수도 적파재배 적합형인 밀식재배저항성과 고르지 못한 우리나라 기후환경 증 한발에 대해서 저항성을 갖는 벼 개발을 목표로 밀식재배저항성 (Phytochrome)유전자와 한발저항성(Trehalose synthase)유전자를 미생물 혹은 식물에서 개발하고 이들을 벼 유전자 프로모터에 연결하여 벼 핵과 엽록체에 유전자총을 이용 형질전환 시킨 후 형질전환체를 선발 도입유전자의 존재 및 발현을 확인하고 도입유전자의 다음세대로의 유전양상을 검색한 후 생물검정을 거쳐서 연구목표를 달성하고 이어서 개발된 환경저항성 및 밀식재배적합형 수도품종을 농촌진흥청으로 하여금 보급케 함으로서 전천후 농업 및 수도생산성 증대에 크게 기여하고자 아래와 같은 구체적인 추진전략으로 본 연구를 수행하였다.

- 벼에 피토크롬 A 유전자를 과량으로 발현시키는 품종을 만들어서

벼를 밀식 재배하더라도 내도복성을 갖고 수확량을 증대 시킬수 있는 품종, 즉 식물의 광형태형성을 관장하는 피토크롬의 유전자를 변형시켜서 밀식재배에서도 키가 작고 잎의 클로로필 함량이 증가하여 광합성 능력이 향상된 내도복 밀식재배 저항성 품종을 유전공학적인 방법으로 육성 하고자 하였다.

- Trehalose 생합성 관련 외래 유전자를 벼 식물체 내로 이식 발현시켜 trehalose를 생합성시킴으로써 그 결과 얻어지는 내한발성 벼 품종을 육성하고자 하였다.

- 주곡 작물인 벼를 대상으로 세포질 및 엽록체내에 농업적으로 유용한 유전자를 도입 발현시키는 방법을 확립함으로써 작물 형질전환 기술의 국내 기술 기반을 구축할 뿐만 아니라 타 작물에 응용할 수 있는 토대를 마련코자 하였다.

제 2 장 한발 저항성 유전자의 개발

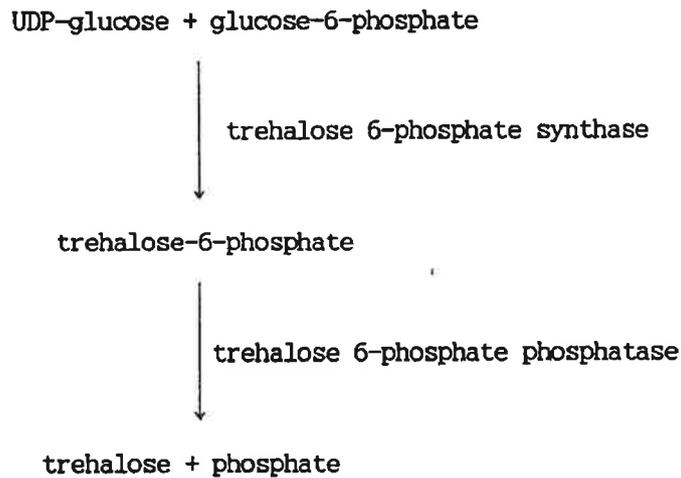
제1절 서 설 (연구개발의 목적 및 중요성)

본 연구의 목적은 trehalose 생합성 관련 외래 유전자를 벼 식물체 내로 이식 발현시켜 trehalose 를 생합성시킴으로써 내한발성 벼 품종을 육성하고 직파재배 적합형 품종을 개발하는 것을 목적으로 한다.

Trehalose (α -D-glucopyranosyl-[1-1]- α -D-glucopyranose) 는 곤충, 세균, 곰팡이, 버섯, 효모 그리고 일부 식물체 등에서 발견되는 비환원성 이당류이고, 감미도는 설탕의 45% 정도이다 (Elbein 1974). Trehalose 는 환원성 탄수화물의 저장 형태이기도 하지만 주로 영양분의 고갈, 고온, 건조, 산소 결핍, 삼투압 등 다양한 종류의 바람직하지 못한 물리적 화학적 외부 충격에서 비롯되는 나쁜 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Eleutherio et al., 1993). Trehalose 는 건조 과정에서 단백질과 세포막의 인지질과 수소 결합을 하여 세포 구조를 그대로 유지하게 해 주며 식품의 경우 고유의 풍미, 색상, 질감 등을 유지할 수 있게 한다 (Crowe et al., 1984). 따라서 건조 식품의 경우 색과 풍미를 보존하는 식품 첨가제로서 이용할 수 있을 뿐만 아니라 가용 수분을 감소시킴으로서 식품의 저장성을 향상시킬 수 있기도 하다 (Kidd and Devorak, 1994). Trehalose 는 세포에게 탁월한 건조 저항성을 부여하는 것으로 알려져 있으므로, 식물 혹은 미생물 등에서 trehalose 생합성 관련 효소 유전자를 분리한 후 유전자 이식 발현에 의해 trehalose 의 발현 수준을 높이면 가뭄에 대

한 작물의 내성이 증가할 것으로 기대하고 하고 있다 (Kidd and Devorak, 1994).

Trehalose 는 UDP-glucose 와 glucose-6-phosphate 가 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 에 의해 축합되어 trehalose-6-phosphate 가 생기고 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) 의 작용으로 trehalose 가 생기는 경로가 대장균과 효모를 중심으로 가장 많이 연구가 되었다.

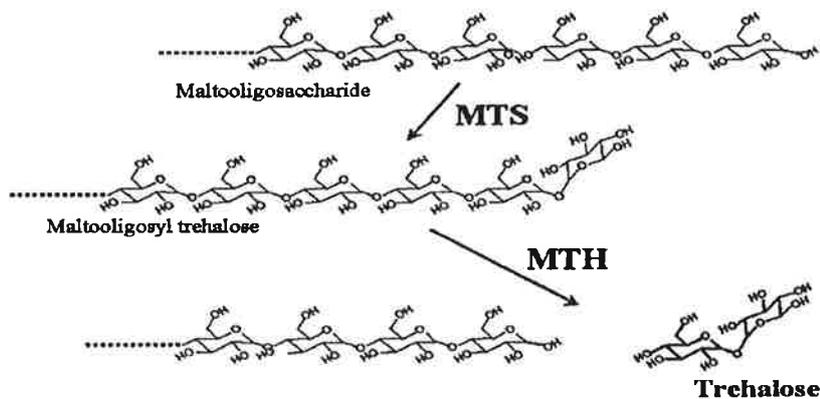


따라서 본 연구에서는 trehalose 를 생합성하는 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 및 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) 의 유전자를 대장균으로부터 분리하였고, 벼의 핵과 엽록체 형질 전환을 통해 탄수화물 대사가 왕성한 벼에 이식 발현시키고자, 이들 유전자를 벼 형질 전환에 알맞게 재조합하였다. 또한 TPS 및 TPP 유전자의 발현효율을 증가시키기 위하여 TPS 및 TPP 의 두가지 유전자를 유전자재조합 기술을 이용하여 하나의 유전자로 재조합하고, 이로부터 발현

되는 재조합 효소단백질 (TPSP) 이 trehalose 를 효과적으로 합성하도록 하였다. 이는 trehalose 합성에 두 개의 효소를 이용하는 것보다는 하나의 효소를 이용함으로써 trehalose 합성효율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 목표를 달성하기 위하여 두 개의 유전자를 유전자재조합 기술을 이용하여 하나의 유전자로 접합하고, 대장균에서 대량 발현시켰다. 발현된 재조합효소단백질 (TPSP) 을 순수분리한 후 UDP-glucose (UDPG) 와 glucose-6-phosphate (G6P) 를 기질로 사용하여 trehalose 합성을 검정하고, 각각의 효소단백질 (TPS, TPP) 과 재조합 효소단백질 (TPSP) 의 기질 (UDPG, G6P 및 T6P) 에 대한 K_m 및 V_m 을 측정하여 재조합효소단백질 (TPSP) 이 trehalose 합성효율을 효과적으로 증진시키는지 측정하였다.

본 연구의 고유성을 확보하기 위하여 다른 세균으로부터 trehalose 생합성과 관련된 새로운 유전자를 탐색, 분리하였다. DNA sequence 및 amino acid sequence data base 검색결과, *Mycobacterium tuberculosis* 균주는 *Rhizobium* 및 *Arthrobacter* 의 trehalose 합성 유전자와 매우 유사한 염기서열을 가지는 유전자를 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. *Rhizobium* 및 *Arthrobacter* 속 미생물은 amylose 환원성 말단의 glucose 사이의 α -1,4 결합을 α , α -1,1 결합으로 전이시키는 효소 maltooligosyltrehalose synthase (MTS)와 amylose 말단에 생긴 α , α -1,1 결합을 한 두개의 glucose 단위를 가수분해하는 maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (MTH) 2 가지 효소에 의해 trehalose를 생합성하는 것으로 알려져 있다. (Kizawa *et al.*, 1995; Maruta *et al.*, 1995). DNA 및 amino acid sequence data base 검색 결과, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 의 경우 MTS 및 MTH 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, *Brevibacterium helvolum* (ATCC

11822), *Cellulomonas* sp. (ATCC 21712) 등도 이와 같은 trehalose 생합성 경로에 의해 trehalose를 생산하는 것으로 알려져 있다 (Maruta et al., 1996).



따라서 본 연구에서는 먼저 염기서열이 알려져 있는 *Mycobacterium tuberculosis*로부터 trehalose 생합성 유전자를 분리하고 이를 probe로 이용하여 *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 trehalose 생합성 유전자인 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자를 분리하고 각각의 유전자의 구조 및 염기서열을 결정하였다. 분리한 각각의 유전자를 대장균에서 발현시키고 BvMTSase 및 BvMTHase 효소 단백질을 순수 분리한 후, 각각의 효소에 대한 trehalose 합성경로 및 기질특이성을 규명하였다. 또한 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자의 발현효율을 증가시키기 위하여 두 개의 유전자 (BvMTSase 와 BvMTHase) 를 융합한 새로운 융합유전자를 유전자조작법에 의해 합성하였고, 그로부터 발현되는 새로운 trehalose 생합성 융합효소단백질 (BvMTSHase) 을 조제하였다. 이

융합효소단백질은 말토올리고실trehalose 합성 및 가수분해 반응을 동시에 할 수 있는 융합효소단백질이다. 이 융합유전자를 발현벡터에 재조합한 후, 대장균에서 과다발현하고 재조합 융합효소단백질을 순수 분리하여 이들이 말토올리고당 및 전분으로부터 trehalose를 생산하는 효소로 작용함을 확인하였다. 본 연구에서 합성한 융합유전자 및 그로부터 번역되어 생성되는 융합효소단백질은 자연에 존재하지 않는 새로운 것이고, 기존에 보고된 두가지 효소를 이용하여 trehalose를 생합성하는 효소와는 다른, 두가지 반응을 동시에 할 수 있는 하나의 새로운 융합효소단백질이다.

최초의 trehalose 생산은 효모 균체에서 추출하는 방법으로 생산하였는데, 가격이 kg 당 200 달러 이상의 고가이어서 사용량이 제한적이었다. trehalose 제조 방법은 효모 균체에서 추출하는 방법, 아미노산 생산균을 이용한 발효법, 효소를 사용하는 효소법 (Nakata *et al.*, 1995a, b) 등을 들 수 있으며, 최근에는 이러한 효소 유전자를 사탕무 우 등 작물에 이식 발현시켜 생산하는 방법 등이 있다. 그러나 최근 일본의 하야시바라사에서 효소법을 이용한 대량생산이 가능해지면서 가격이 kg 당 4 달러 정도로 싸졌다. 따라서 trehalose는 최근 올리고당과 함께 설탕 대체 감미료로 그 사용량이 급격히 증가하고 있다. 현재 일본 하야시바라에서 이루어지는 trehalose의 산업적 생산은 내열성 균주로부터 분리한 내열성 trehalose 생합성 효소를 이용한 효소법으로 이루어지고 있고 (Nakata *et al.*, 1995a, b). 이와 같은 내열성 효소를 이용한 생물전환기술의 개발로 trehalose를 저렴한 가격으로 대량생산하고 있다. 일본의 Hayashibara 사에서 개발한 방법은 *Sulfolobus* 속의 내열성 균주로부터 MTS 와 MTH 2 가지 효소를 분리하여 이를 이용한 공정을 개발하였다 (Kizawa *et al.*, 1995; Maruta *et al.*, 1995; Nakada

et al., 1995a, b).

지금까지 알려진 trehalose 생합성 관련 내열성 효소는 대부분 *Sulfolobus* 속의 극한 미생물에서 분리되었으며, *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* 및 *S. shibatae* 에서 각각 trehalose 생합성 관련 내열성 효소 유전자 (MTS, MTH)가 분리되었다 (Kobayashi *et al.*, 1996a,b, Isabella *et al.*, 1998). 본 연구에서도 내열성 MTS 및 MTH 효소를 이용한 trehalose 생산 개발을 위하여 *Sulfolobus acidocaldarius* 내열성 균주로부터 trehalose 생합성 효소 (SaMTS, SaMTH) 유전자를 탐색 분리하였다. 또한 연구의 고유성 및 SaMTS 및 SaMTH 유전자의 발현효율을 증가시키기 두 개의 유전자를 융합한 새로운 융합유전자를 유전자조작법에 의해 합성하였고, 그로부터 발현되는 새로운 trehalose 생합성 융합효소단백질 (SaMTSH) 을 조제하였다. 이 내열성 융합효소단백질은 말토올리고실trehalose 합성 및 가수분해 반응을 동시에 할 수 있는 융합효소단백질이다. 이 융합유전자를 발현벡터에 재조합한 후, 대장균에서 과다발현하고 재조합 융합효소단백질을 순수 분리하여 이들이 말토올리고당 및 전분으로부터 trehalose를 생산하는 효소로 작용함을 확인하였다.

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 대장균 trehalose 생합성 유전자 분리 및 특성 규명

Trehalose synthase 유전자에 대한 연구는 대장균과 효모를 중심으로 가장 많이 연구가 되었다. 본 연구에서는 대장균의 trehalose 6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자 염기 서열 (Kaasen et al. 1994) 을 근거로 polymerase chain reaction (PCR) 을 실시하여 *otsA* 와 *otsB* 유전자를 증폭시킨 후 pUC18 vector 에 cloning 하였다. 대장균 (MC1061 strain) genomic DNA 를 분리하여 제한 효소 Hind III 로 절단한 후 2.9 kb band 를 분리하여 partial genomic DNA 유전자 은행을 제조하였다. 이 genomic DNA 유전자 은행에서, 앞에서 분리한 PCR clone 을 probe 로 사용, screening 을 실시하여 *otsA* 와 *otsB* 의 gDNA clone 들을 선별하였다. 선별한 유전자들은 최종적으로 염기서열 및 효소활성을 측정함으로써 확인하였다.

2. 형질전환용 유전자 운반체 제작

분리한 대장균의 trehalose 6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자의 ORF를 벼 핵 형질 전환용 운반체 (pIP850)에 재조합 시켰다. 이 운반체의 특징은 벼 actin 프로모터를 함유하고 있기 때문에 외래유전자를 벼 전조직 및 기관에 골고루 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 장점을 갖고 있다. 대장균으로부터 분리한 *otsA* 와 *otsB* 유전자를 각각 pIP850 의 multicloning site 에 삽입하여, 벼 actin promoter-*otsA*-NOS terminator 와 벼 actin promoter-*otsB*- NOS terminator 로 구성되어 있는 운반체를 각각 재조합 하였다. 유전자 조작방법을 이용하여 두가지 운반체를 하나의 운반

체로 재조합하고, 하나의 운반체로부터 trehalose 6-phosphate synthase (otsA) 와 trehalose-6-phosphate phosphatase (otsB) 가 발현되도록 하였다.

3. 대장균 trehalose 생합성 유전자 발현 효율 증진

유전자를 유전자재조합 기술을 이용하여 TPS 와 TPP 유전자를 하나의 유전자로 재조합하고, 이로부터 발현되는 재조합 효소단백질 (TPSP) 이 trehalose 를 효과적으로 합성하는지를 측정하였다. 재조합된 융합 단백질 유전자를 대장균에서 대량발현시키고, 발현된 재조합효소단백질 (TPSP) 을 순수분리하였다. UDP-glucose (UDPG) 와 glucose-6-phosphate (G6P) 를 기질로 사용하여 trehalose 합성을 검정하고, 각각의 효소단백질 (TPS, TPP) 과 재조합 효소단백질 (TPSP) 의 기질 (UDPG, G6P 및 T6P) 에 대한 K_m 및 V_m 을 측정하여 재조합효소단백질 (TPSP) 이 trehalose 합성효율을 효과적으로 증진시키는지를 측정하였다.

가. TPS, TPP 및 TPSP 효소활성도 측정

TPS 효소활성도는 기질로서 UDPG 와 G6P 로부터 T6P 생산에 따른 기질 G6P 의 감소되는 양을 측정하여 분석하였다. 반응 혼합물로는 완충 용액으로서 33mM Tris-HCl/pH7.5, 2.5mM $MgCl_2$, 10mM 2-mercaptoethanol 조건에서 10mM G6P 와 5mM UDPG 를 포함한다. TPP 효소활성도는 기질로서 T6P를 포함하며 반응 조건은 TPS 효소 활성도와 같다. 그리고 두 반응 모두 37℃ 에서 10분 또는 60분간 반응후 100℃ 에서 3분간 끓여서 반응을 중지시켰다. Trehalose 와 G6P양은 thin layer chromatography (TLC) 또는 high-pH ion chromatography (HPIC)

에 의해서 분석, 정량하였다.

나. 당 분석 및 정량

당 분석은 TLC 또는 HPIC에 의해서 이행하였다. TLC 경우 각각 반응 후 반응물의 3 μ l를 TLC를 이용하여 분석하였다. 전개용매는 n-butanol: ethanol: H₂O를 5:3:2로 포함한 용액을 이용하였으며 20% 황산을 이용하여 발색시켰다. 당 정량은 DX500 HPIC 시스템에서 Carbo-Pak PA1 column을 이용하였다. Column으로부터 당의 용출은 150mM NaOH 용액에서 0-250mM NaOAc의 농도기울기를 이용하여 30분간 용출하였으며, 용출되는 당은 ED 40 electrochemical detector로 검정하였다.

다. 대장균내의 Trehalose 양 분석

대장균 내에서의 용합단백질의 효소 활성도를 측정하기 위해서 각각 pRSETB (control), pRTPS (TPS), pRTPP (TPP) 그리고 pRTPSP (TPSP) 플라즈미드로 대장균을 형질전환하고, 대장균내에서 trehalose 합성 양을 측정하였다. 각각의 형질전환된 대장균 BL21을 항생제 ampicillin을 포함한 5ml LB 배지에서 배양온도 20 $^{\circ}$ C에서 15시간 배양후 500 μ l를 새로운 50ml LB 배지에 접종하고 590nm에서의 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양하였다. 이후 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)를 최종농도로 0.5mM이 되게 첨가하여 20 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양하였다. 배양액 1ml를 취한 후 원심분리에 의해서 대장균세포를 침전시키고 200 μ l 증류수에 현탁한 후 20 초씩 3번 초음파처리를 하여 분쇄하였다. 12000g에서 15분간 원심분리한 후 상정액을 취하여 HPIC와 TLC로 분석하였다.

4. 한발 저항성 고유 유전자의 분리

Trehalose synthase 유전자에 대한 연구는 대장균과 효모를 중심으로 가장 많이 연구가 되었다. 본 연구에서도 대장균의 trehalose 6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자를 분리하고, 이들 유전자의 ORF를 베타 핵형질 전환용 운반체 (pIP850) 에 재조합 시켰다. 본 연구의 고유성을 확보하기 위하여 다른 세균으로부터 trehalose 생합성과 관련된 다양한 효소들의 관련 유전자를 탐색, 분리하였다. DNA sequence 및 amino acid sequence data base 검색결과, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 균주는 maltooligosyl trehalose synthase (MTS) 와 maltooligosyl trehalose trehalohydrolase (MTH) 에 의해 maltodextrin 으로부터 trehalose를 생합성하는 유전자를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822), *Cellulomonas* sp. (ATCC 21712) 등도 이와 같은 trehalose 생합성 경로에 의해 trehalose를 생산하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 먼저 염기서열이 알려져 있는 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 로부터 trehalose 생합성 유전자를 분리하였다. 그러나 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 는 병원성 균주이므로, 이 유전자를 직접 식물체에 도입하지는 않고 다른 균주로부터 trehalose 생합성 유전자를 분리하는데 probe 로 사용하였다. 이를 probe 로 이용하여 *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 같은 종류의 trehalose 생합성 유전자가 존재함을 확인하였으며, *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 trehalose 생합성 효소 (BvMTSase, BvMTHase) 유전자를 분리하고, 그 특성을 규명하였다.

가. *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 Trehalose 합성 유전자의 분리

Brevibacterium 게놈 DNA로부터 trehalose 합성효소 유전자를 분리
에 이용되는 probe는 기존에 분리한 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
의 trehalose 합성효소 유전자를 이용하였다. *Brevibacterium* 의 게놈
DNA로부터 trehalose 합성효소 유전자를 분리하기 위하여,
Brevibacterium 의 게놈 DNA를 제한효소로 절단하고, 아가로스 겔 전기
영동한 다음, *Mycobacterium* 으로부터 분리한 trehalose 합성효소 유
전자 DNA 단편을 probe 로 이용하여 Southern blot 분석을 실시하여
trehalose 합성 유전자의 일부를 분리하였다. 전체 유전자를 분리하기
위하여, 분리한 일부 유전자를 probe 로 사용하고 Southern blot 분석
을 실시하여 *Brevibacterium* 의 trehalose 합성 유전자 전체를 분리하
였다. 분리한 유전자를 pUC18에 삽입하여 제한효소 지도를 작성하고 염
기서열을 결정하였다.

나. BvMTSHase 융합효소 유전자 제조

본 연구에서는 브레비박테리움 (*Brevibacterium helvolum* ATCC
11822) 으로부터 두가지 trehalose 생합성 관련 효소유전자를 분리하였
다. 첫번째 유전자는 구조유전자 부분이 2,328bp인 브레비박테리움 말
토올리고실 trehalose 합성효소 (*Brevibacterium maltooligosyl*
trehalose synthase: BvMTSase) 유전자이고, 두번째 유전자는 구조유전
자 부분이 1,767bp 인 브레비박테리움 말토올리고실trehalose 가수분해
효소 (*Brevibacterium maltooligosyl* trehalose trehalohydrolase:
BvMTHase) 유전자이다. BvMTSase 및 BvMTHase 유전자의 발현효율을 증
가시키기 위하여 두 개의 유전자 (BvMTSase 와 BvMTHase) 를 융합한 새
로운 융합유전자 (BvMTSHase) 를 조제하였다. 두 개의 유전자를
polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 site-directed

mutagenesis를 실시하고, 유전자재조합 방법을 이용하여 하나의 유전자로 제조하였고, 이로부터 합성되는 trehalose 생합성효소를 하나의 융합효소 (BvMTSHase)로 조제하였다. 이 단백질은 말토올리고실trehalose 합성 및 가수분해 반응을 동시에 할 수 있는 융합효소단백질이다.

다. 대장균에서의 BvMTSase, BvMTHase 및 BvMTSHase 융합유전자의 발현 및 순수 분리

분리한 유전자로부터 번역되는 BvMTSase 및 BvMTHase 두가지 효소단백질을 이용하여 trehalose 를 합성할 수 있는지 확인하기 위하여 각각의 구조유전자 부분을 분리하고 대장균에서의 발현벡터인 pRSET 플라스미드에 삽입하여 pRBvMTS 및 pRBvMTH 를 제조하였다. 또한 융합유전자로부터 번역되는 BvMTSHase 융합효소단백질을 이용하여 trehalose를 합성할 수 있는지 확인하기 위하여 융합유전자의 구조유전자 부분을 분리하고 대장균에서의 발현벡터인 pRSET 플라스미드에 삽입하여 pRBvMTSH 발현벡터를 제조하였다. 이렇게 제조된 각각의 재조합 플라스미드로 대장균 BL21을 형질전환시키고, 12시간 배양한 후, IPTG 를 최종농도 1mM 이 되도록 첨가하고 4시간 더 배양하여 각각의 효소단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 각각의 효소단백질은 Ni²⁺-NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수분리하였다. 각각의 발현된 효소단백질을 순수 분리한 후 trehalose 합성능을 검정하였다.

라. BvMTSase, BvMTHase 및 BvMTSHase 융합효소단백질을 이용한 trehalose 합성 및 기질특이성

순수 분리한 BvMTSase, BvMTHase 및 BvMTSHase 융합효소단백질의 trehalose 합성능 및 기질 특이성을 알아보기 위하여 여러가지 말토올

리고당을 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 조건하에서 여러가지 말토올리고당을 1mM의 농도로 첨가하고 각각 500ng의 순수분리한 효소를 첨가하여 전체 반응 부피를 50ul로 하였다. 이를 37℃에서 1시간 반응시키고, 95℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 생성된 trehalose 는 TLC 또는 HPIC 방법에 의해서 분석, 정량하였다.

마. 전분으로부터의 trehalose 합성

전분을 기질로 이용하여 trehalose를 합성할 수 있는지 알아보기 위하여 수용성 전분(soluble starch)을 기질로 사용하고 반응시간을 24시간까지 연장하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 조건하에서 1% 수용성 전분을 기질로 첨가하고 순수 분리한 각각의 효소를 1μg을 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 37℃에서 24시간까지 반응시키고, 95℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 또한 전분으로부터 trehalose의 생산 효율을 높이기 위하여 수용성 전분(soluble starch)에 알파-아밀라제(α -amylase)를 처리하고 반응시간을 24시간까지 연장하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 조건하에서 1% 수용성 전분을 기질로 첨가하고 0.05단위의 알파-아밀라제, 순수분리한 융합효소(BvMTSHase)를 1μg을 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 37℃에서 24 시간까지 반응시키고, 95℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 생성된 trehalose는 얇은막크로마토그래피 방법 및 HPIC 방법에 의해 확인하였다.

5. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 분리 및 특성 규명

본 연구에서는 현재 산업적으로 사용범위가 급격히 증가하고 있는

trehalose 의 대량생산을 위해 내열성 균주로부터 trehalose 생합성 효소 유전자를 분리하고, 이를 이용한 trehalose 의 대량생산 기술을 개발하였다. 최초의 trehalose 생산은 효모 균체에서 추출하는 방법으로 생산하였는데, 가격이 kg 당 200 달러 이상의 고가이어서 사용량이 제한적이었다. 그러나 최근 내열성 균주로부터 분리한 내열성 trehalose 생합성 효소를 이용한 효소법을 이용한 대량생산이 가능해지면서 가격이 kg 당 4 달러 정도로 싸졌다. 본 연구에서도 내열성 MTS 및 MTH 효소를 이용한 trehalose 생산 개발을 위하여 *Sulfolobus acidocaldarius* 내열성 균주로부터 trehalose 생합성 효소 (SaMTS, SaMTH) 유전자를 탐색 분리하였다. 또한 SaMTS 및 SaMTH 유전자의 발현효율을 증가시키기 두 개의 유전자를 융합한 새로운 융합유전자를 유전자조작법에 의해 합성하였고, 그로부터 발현되는 새로운 trehalose 생합성 융합효소단백질 (SaMTSH) 을 조제하였다. 이 내열성 융합효소단백질은 말토올리고실 trehalose 합성 및 가수분해 반응을 동시에 할 수 있는 융합효소단백질이다. 이 융합유전자를 발현벡터에 재조합한 후, 대장균에서 과다발현하고 재조합 융합효소단백질을 순수 분리하여 이들이 말토올리고당 및 전분으로부터 trehalose를 생산하는 효소로 작용함을 확인하였다.

가. *Sulfolobus acidocaldarius*(ATCC 49426)의 배양 및 게놈 DNA 분리
내열성미생물 *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49426)는 ATCC에서 분양받았으며, ATCC *Sulfolobus media* #1723 을 이용하여 75℃, 호기적인 조건에서 4-5일 배양하였다.

Sulfolobus acidocaldarius (ATCC 49426)의 게놈 DNA는 Charbonnier 등의 방법 (Charbonnier et al., 1995) 에 따라 분리하였다. 500 ml 의 *S. acidocaldarius* 배양액을 원심분리하여 (6,000 rpm, 10분) 미생물

균체를 회수하였다. 8 ml 의 TNE 용액 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA / pH 7.5) 을 가하여 현탁한 후, 1 ml 의 10% N-lauroylsarcosine을 가하고 천천히 혼합하였다. 1 ml 의 10% SDS 를 가하여 혼합한 후 0.5 ml 의 proteinase K 용액 (20 mg/ml)을 첨가하고 50℃에서 3 시간 반응하였다. 반응이 끝난 후 phenol/chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 용액으로 3번 추출하고, 2배 부피의 에탄올 을 가하여 게놈 DNA를 침전시켰다. 분리된 DNA를 500 ul TE 용액에 혼 탁한 후 RNaseA를 첨가하여 37℃에서 30분 반응하였다. 반응이 끝난 후 phenol/ chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액으로 3번 추출하고, 에탄올을 가하여 게놈 DNA를 침전시켰다.

나. *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49426) 으로부터 trehalose 합성 유전자의 분리

S. acidocaldarius (ATCC 49426) 게놈 DNA로부터 trehalose 합성효 소 유전자를 분리하기 위하여, *Sulfolobus* 속 균주에서 분리된 MTS 및 MTH 유전자에 공통적으로 나타나는 염기서열 부분을 이용하여 primer를 제작하였다. 이를 이용하여 PCR 반응을 실시하고, 증폭된 DNA 단편을 probe 로 이용하여 Southern blot 분석을 실시한 후, *S. acidocaldarius* (ATCC 49426) 로부터 trehalose 합성 유전자를 분리하 였다. 분리한 유전자를 pUC18에 삽입하여 제한효소 지도를 작성하고 염 기서열을 결정하였다.

다. 내열성 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 융합단백질 효소의 대장균에서 대량 발현 및 분리

분리한 각각의 내열성 효소 유전자 및 융합유전자의 구조유전자부분

을 대장균 발현벡터 pRSET plasmid 에 삽입하여 각각의 재조합 효소단백질의 발현을 유도하고, 순수 분리하여 효소의 활성을 검정하였다. 분리한 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 (SaMts, SaMth) 및 SaMTSH 융합단백질 효소의 활성을 검정하기 위해 이 유전자를 대량생산 할 수 있도록 T7 promoter 와 재조합한 DNA 를 *E. coli* BL21 에 형질전환하고 BL21 transformants 를 ampicillin을 포함한 LB 배지에서 흡광도가 0.7-0.9 에 도달할 때까지 배양하였다. 최종 농도가 1 mM 이 되게 IPTG 를 첨가 후 4시간 동안 더 배양하였다. *E. coli* 는 원심분리하여 수거된 후 5 ml/g이 되게 lysis buffer A (6 M guanidine hydrochloride, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris, 0.02 M β-mercaptoethanol, pH8.0)를 섞어 주고 sonication한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 효소활성을 검정하고 순수분리를 수행하였다. 순수분리를 위해서는 nickel-NTA-agarose affinity resin에 상등액을 처리한 후 칼럼 부피 10 배액의 buffer D (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris, 0.02 M β-mercaptoethanol, pH6.3)와 칼럼부피 5 배액의 buffer E (조성은 buffer D와 동일, pH4.5)로 순차적으로 재조합 단백질을 용출하였다.

라. 내열성 SaMts, SaMth 및 SaMTSH 융합단백질 효소의 활성 검정

순수 분리한 SaMts, SaMth 및 SaMTSH 융합단백질 효소의 trehalose 합성능 및 기질 특이성을 알아보기 위하여 여러가지 말토올리고당을 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시하였다. 반응조건은 20mM sodium acetate 완충용액 (pH 5.5) 조건하에서 여러가지 말토올리고당을 1mM의 농도로 첨가하고 각각 500ng의 순수 분리한 효소를 첨가하여 전체 반응 부피를 50ul로 하였다. 이를 75℃에서 1시간 반응시키고 TLC 방법과 HPIC 방법에 의해 trehalose 합성을 확인하였다.

제3절 연구개발결과

1. 대장균 trehalose 생합성 유전자 분리 및 특성 규명

본 연구에서는 대장균 균주 MC1061 의 *otsA/B* 유전자를 polymerase chain reaction 을 이용하여 PCR clone 을 분리하였다. 기존에 밝혀져 있는 trehalose-6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자 염기 서열 (Kaasen et al. 1994) 로 부터 N-terminal 과 C-terminal 부위의 oligonucleotide 를 합성하였다. N-terminal oligonucleotide 의 5' 위치에는 start codon 인 ATG 바로 앞에 EcoRI 제한효소 절단부위를 삽입하여 cloning 에 편리하도록 제작 하였다. 합성된 oligonucleotide 를 primer 로 사용하여 polymerase chain reaction 을 실시하고 *otsA* 와 *otsB* 유전자를 증폭시킨 후 pUC18 vector 에 cloning 하였다. 분리한 PCR clone 이 *otsA/B* 유전자인지 확인하기 위하여 양쪽 절단면으로부터 부분적으로 염기서열을 결정 한 결과, 분리한 PCR clone 은 *otsA/B*임을 확인할 수 있었다. 분리한 PCR clone 을 probe 로 사용하여 대장균 (MC1061 strain) genomic Southern blot 을 실시한 결과, 약 2.9 kb Hind III 절편 내에 trehalose 합성 유전자가 존재함을 알 수 있었다. 이 결과를 기준으로하여 대장균의 genomic DNA 를 제한 효소 Hind III 로 절단한 후 2.9 kb DNA band 를 분리하여 partial genomic DNA 유전자 은행을 제조하였다. 이 genomic DNA 유전자 은행에서, 앞에서 분리한 PCR clone 을 probe 로 사용, screening 을 실시하여 *otsA* 와 *otsB* 의 gDNA clone 들을 선별하였다 (그림 1). 선별한 유전자는 부분 염기서열을 결정하여 확인하였다. 대장균으로부터 분리한 2.9 kb Hind III 절편 내에는 trehalose 합성 유전자 (*otsA/B*) 가 동시에 존재함을 알 수 있었고, *otsA* 와 *otsB* 유전자

가 일부 overlapping 되어있는 operon 의 형태로 존재함을 알 수 있었다.

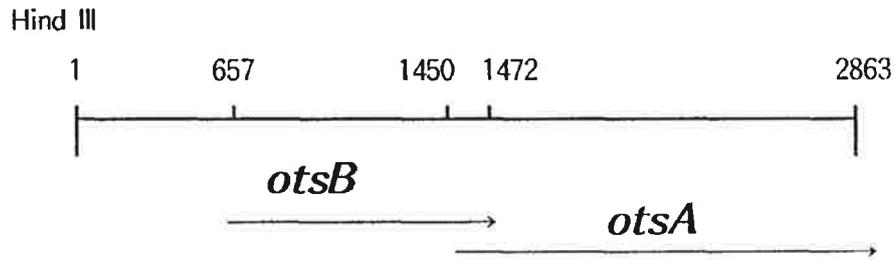


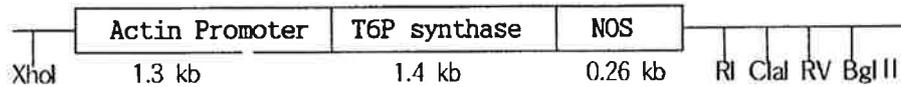
그림 1. Structure of 2.9 kb Hind III fragment carrying the *otsA/B* genes. *otsA* gene corresponds to the second ORF from nucleotide 1450 to 2871 and *otsB* gene the first ORF from 675 to 1472.

2. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작

분리한 대장균의 trehalose 6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자의 ORF를 전부 포함하는 DNA 절편을 벼 핵 형질 전환용 운반체 (pIP850)에 재조합 시켰다. 형질전환용 재조합 유전자는 형질 전환 방법에 따라 달라지는데 입자총에 의한 벼 형질전환 경우에는 CaMV 혹은 actin promoter 와 발현 효율을 향상시키기 위한 intron 부위, 목표 외래 유전자의 ORF, 전사 종결 부위 등으로 구성된다. 벼 핵 형질 전환용 운반체 (pIP850) 의 특징은 벼 actin 프로모터를 함유하고 있기 때문에 외래유전자를 벼 전조직 및 기관에 골고루 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 장점을 갖고 있다. 대장균으로부터 분리한 2.9 kb Hind III 절편 내에는 trehalose 합성 유전자 (*otsA/B*) 가 동시에 존재함을 알 수 있었다. 이들 유전자는 *otsA* 와 *otsB* 유전자가 일부 overlapping 되어있는 operon 의 형태를 존재하므로, 다른 식물체로의 형질전환시 각각의 유전자에 대한 promoter 와 terminator 를 가지도록 유전자 재조합을 실시하였다. *otsA* 와 *otsB* 유전자를 각각 분리한 후, pIP850 의 multicloning site 에 삽입하여, 벼 actin promoter-*otsA*-NOS terminator (pIP850THS) 와 벼 actin promoter-*otsB*-NOS terminator (pIP850THP) 로 구성되어 있는 운반체를 각각 재조합 하였다 (그림 2).

하나의 운반체로부터 trehalose 6-phosphate synthase (*otsA*) 와 trehalose-6-phosphate phosphatase (*otsB*) 가 동시에 발현되도록 하기 위하여, 유전자 조작방법을 이용하여 두가지 운반체를 하나의 운반체로 재조합하였다 (pIP850THSP, 그림 3). 각각의 유전자는 모두 벼 actin promoter 와 NOS terminator 를 포함하고 있다.

(1) pIP850THS



(2) pIP850THP

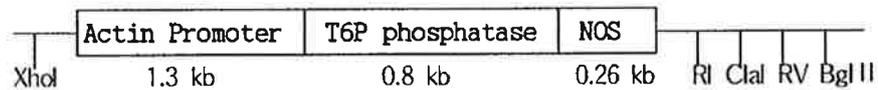
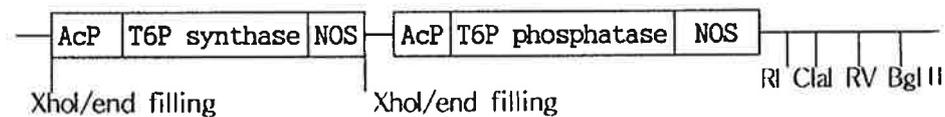


그림 2. Construction of rice transformation vectors carrying *E. coli* trehalose-6-phosphate synthase (*otsA*) gene and T6P phosphatase (*otsB*) gene. (1) pIP850THS : Trehalose-6-phosphate synthase (*otsA*) gene in pIP850. (2) pIP850THP : T6P phosphatase (*otsB*) gene in pIP850



(pIP850THSP)

그림 3. Construction of rice transformation vectors carrying *E. coli* trehalose-6-phosphate synthase (*otsA*) gene and T6P phosphatase (*otsB*) gene (pIP850THSP). The 2.95 kbp fragment of pIP850THS digested with XhoI and Clal was isolated and treated with Klenow fragment to make blunt end. The pIP850THP vector was digested with XhoI and treated with Klenow fragment to make blunt end. Two blunt-ended DNA fragments were ligated and constructed pIP850THSP.

3. 대장균 trehalose 생합성 유전자 발현 효율 증진

가. 융합단백질 TPSP에 의한 Trehalose 합성

두 개의 연속적인 반응을 이행하는 융합단백질의 이점을 이용하기 위해서 대장균의 TPS와 TPP 유전자를 융합하여 TPST 융합단백질을 제조하였다. 이를 대장균에서 대량 발현시키고 98% 이상의 순수한 단백질을 분리한 후, TPSP에 의한 trehalose 합성 활성도를 측정하였다. 그림 4의 A의 lane 9와 B의 TPSP에서 나타낸 것처럼 융합단백질인 TPSP는 G6P와 UDPG를 기질로 이용하여 trehalose를 생산할 수 있음을 확인하였다. 이 결과는 융합단백질인 TPSP가 기능적으로 기질인 G6P와 UDPG로부터 T6P를 생산하고, T6P로부터 trehalose를 생산하는 두 개의 연속적인 반응을 촉매함을 증명한다. 한편 각각의 TPS와 TPP 단백질 역시 활성도를 측정하였는데 TPS 경우 기질로서 G6P와 UDPG로부터 T6P를 생산하고 TPP 경우 T6P로부터 trehalose를 생산함을 알 수 있었다 (그림 1, lane 6과 7). 그리고 TPS와 TPP 단백질을 혼합하여 반응한 경우 두 효소의 연속적인 반응에 의하여 G6P와 UDPG로부터 trehalose를 생산함을 알 수 있었다 (그림 4, A의 lane 8과 B의 TPS/TPP). 이에 따른 반응속도를 측정한 결과, G6P와 UDPG로부터 trehalose를 생산하는 속도는 융합단백질인 TPSP 효소를 이용한 경우가 TPS와 TPP 단백질 각각을 혼합하여 반응한 경우보다 더 빠름을 알 수 있었다 (그림 5와 6).

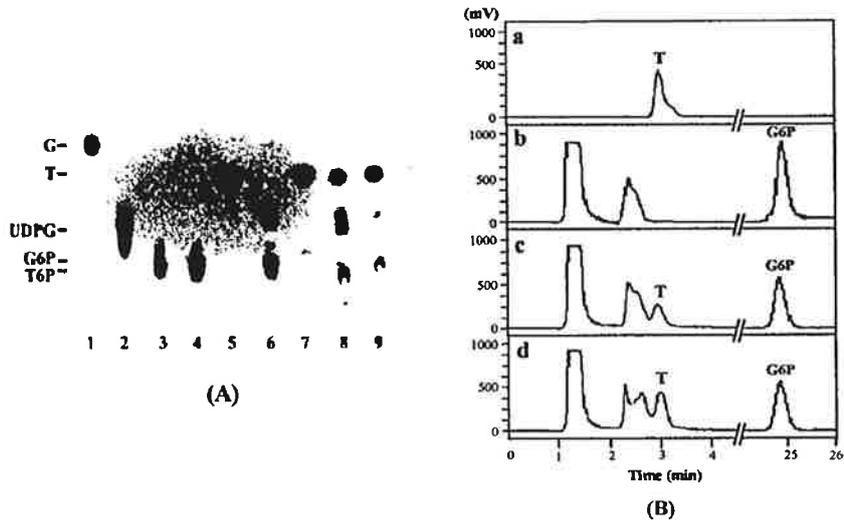


그림 4. Analysis of reaction products of the fusion protein TPSP. Purified recombinant enzymes indicated (10 pmole each) were incubated at 37°C for 60 min in a volume of 100 μ l of reaction mixture containing 10mM T6P or 7.5mM G6P and 15mM UDPG as substrates. Reaction product was analyzed by Silica gel TLC (A) and HPIC (B).

[A] lanes 1-5 : 2 μ g of each standard, glucose (G), (UDPG), (G6P), (T6P) and trehalose (T), respectively. lanes 6-9 : 3 μ l of reaction products of TPS from UDPG and G6P, of TPP from T6P, of TPS and TPP mixture from UDPG and G6P and of TPSP from UDPG and G6P, respectively. Identify of each spot is indicated on the left.

[B] HPIC chromatogram.

a : A of 52.5ng of standard trehalose. b,c : Control and reaction products of TPS and TPP mixture from G6P and UDPG after 0 and 40 min of incubation, respectively. d : Reaction products of TPSP from G6P and UDPG after 40 min of incubation.

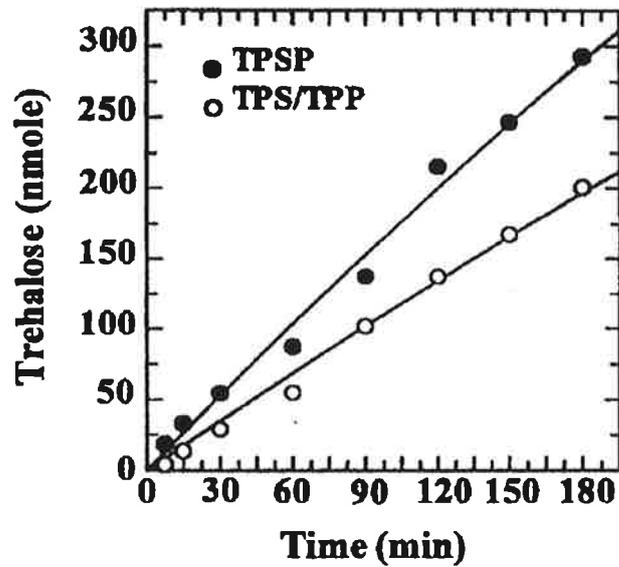


그림 5. Time course of trehalose production from UDPG and G6P by TPSP.

A 10 pmoles of TPSP (●) or TPS/TPP (○) was incubated at 37°C in a final volume of 100 μ l of the reaction mixture containing 33mM Tris-HCl/pH7.4, 2.5mM MgCl₂, 15mM UDPG and 7.5mM G6P. Aliquots (10 μ l) were withdrawn at the indicated time points and quantitated by HPIC.

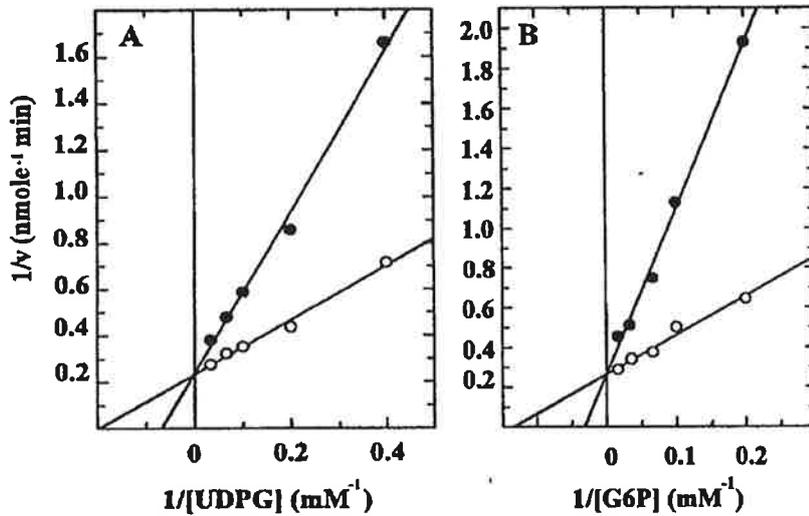


그림 6. Initial velocities of the couple reactions by the bifunctional fusion enzyme, TPSP, and mixture of individual enzymes, TPS and TPP.

Double-reciprocal plot of the initial velocity at various concentrations of UDPG against 30mM G6P. Reactions involving the TPSP fusion enzyme (●) and TPS and TPP mixture (○) are shown (left side). Double-reciprocal plot of the initial velocity at various concentrations of G6P against 15mM UDPG (right side).

나. 융합단백질 TPSP 의 반응속도상수

융합단백질 TPSP의 효소학적인 성질을 규명하기 위해서 반응속도를 측정하였다. 이들 값은 오차 범위 한도 내에서 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 구하였다. 융합단백질의 연속적인 두 반응은 각각을 분리하여 측정할 방법이 없기 때문에 TPS 효소의 활성도는 반응이 진행됨에 따른 기질 G6P 의 감소되는 양을 HPIC 로 측정하여 분석하였다. 그 결과 기질인 UDPG 와 G6P 에 대한 TPSP 효소의 K_m 값은 TPS 효소의 K_m 값보다 각각 20.2%, 6.6% 낮았으며 기질인 UDPG 와 G6P 에 대한 TPSP 효소의 V_m 값은 TPS 효소의 V_m 값보다 각각 18.6%, 7.7% 높았다. 그리고 기질인 T6P 에 대한 TPSP와 TPP 효소의 T6P 분해 속도를 측정한 결과, TPSP 효소의 K_m 값이 TPP 효소의 K_m 값보다 20.8% 낮았으며 V_m 값은 TPP 효소의 V_m 값보다 21.7% 높았다. 한편 두가지 효소의 연속 반응에 대한 전체 반응 속도 상수를 조사한 결과 UDPG 와 G6P 에 대한 TPSP 효소의 K_m 값이 TPS/TPP 두 효소의 혼합상태의 K_m 값보다 각각 24.2%, 24.2% 낮았으며 UDPG 와 G6P 에 대한 TPSP 효소의 V_m 값은 TPS/TPP 두 효소의 혼합상태의 V_m 값보다 각각 16.5%, 12.5% 높았다. 또한 융합단백질에 의한 전체 반응효율 (k_{cat})을 V_m/K_m 값에 의하여 계산한 결과 TPS/TPP 두 효소의 혼합상태보다 융합단백질이 약 49.5-64.5% 더 효율적임을 알 수 있었다. 이상의 결과는 융합단백질인 TPSP 효소가 TPS/TPP 두 효소의 혼합상태보다 trehalose 생산에 더 효과적임을 나타내고, 이는 두 번째 반응의 기질로서 첫 번째 반응 산물을 이용하는 서로 다른 두 효소의 근접효과에 기인하는 것으로 해석할 수 있다.

다. 대장균 내에서의 Trehalose 생산효율 검정

대장균 내에서의 용합단백질의 효소 활성도를 측정하기 위해서 각각 pRSETB (control), pRTPS (TPS), pRTPP (TPP) 그리고 pRTPSP (TPSP) 플라스미드로 대장균을 형질전환하고, 대장균내에서 trehalose 합성 양을 측정하였다. 그 결과 pRSETB, pRTPS 그리고 pRTPP 플라스미드로 형질전환된 대장균은 IPTG 처리와 무관하게 trehalose 가 검정되지 않았다. 그러나 pRTPSP 플라스미드로 형질전환된 대장균내에서는 IPTG를 처리하지 않는 경우 약 8mg/ml 정도 trehalose 양이 검정되었으며 IPTG를 처리하고 3시간 후에는 약 24mg/ml 정도의 trehalose가 검정되었다 (그림 7). 이 결과는 용합 단백질이 대장균 내에서 대사 중간물질로부터 trehalose 합성을 촉매함을 증명하며, 다른 생체 내에서도 trehalose의 생산효율을 증진시킬 수 있는 가능성을 제시한다.

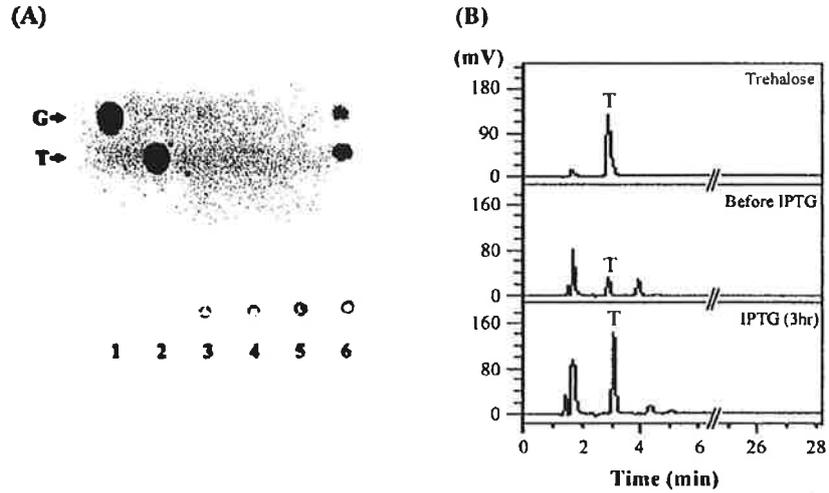


그림 7. *In vivo* synthesis of trehalose by overexpression of the bifunctional fusion enzyme, TPSP. *E.coli* harbouring plasmid, pRSETB, pRTPS, pRTPP or pRTPSP, was induced with 0.5mM IPTG for 3hr and lysed by sonication.

(A) A 5 μ l each of supernatant sample was spotted onto TLC and analyzed. lanes 1 and 2 indicate glucose (G) and trehalose (T), respectively. lane 3 : pRSETB; lane 4 : pRTPS; lane 5 : pRTPP; lane 6 : pRTPSP.

(B) HPIC chromatogram.

Trehalose : 110 ng of standard trehalose

Before IPTG : sample before IPTG treatment

IPTG (3hr) : sample after IPTG treatment for 3hr

Five microliters of the cultured cells was analyzed.

4. 한발 저항성 고유 유전자의 분리

본 연구의 고유성을 확보하기 위하여 다른 세균으로부터 trehalose 생합성과 관련된 다양한 효소들의 관련 유전자를 탐색, 분리하였다. *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 에 trehalose 생합성 유전자가 존재함을 확인하였으며, *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 trehalose 생합성 효소 (BvMTSase, BvMTHase) 유전자를 분리하고, 그 특성을 규명하였다.

가. *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 으로부터 Trehalose 합성 유전자의 분리

본 연구에서는 먼저 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 의 trehalose 생합성 유전자를 polymerase chain reaction 을 이용하여 PCR clone 을 분리하였다. 기존에 밝혀져 있는 *M. tuberculosis* H37Rv 의 유전자 염기 서열 (Philipp et al. 1996) 로 부터 oligonucleotide 를 합성하여 이를 primer 로 사용하고 polymerase chain reaction 을 실시하여 trehalose 생합성 유전자의 일부를 증폭시킨 후 pUC18 vector 에 cloning 하였다. 분리한 PCR clone 이 trehalose 생합성 유전자인지 확인하기 위하여 양쪽 절단면으로부터 부분적으로 염기서열을 결정 한 결과, 분리한 PCR clone 은 *M. tuberculosis* H37Rv의 trehalose 생합성 유전자임을 확인할 수 있었다.

Brevibacterium 으로부터 trehalose 합성효소 유전자를 분리하기 위하여 기존에 분리한 *M. tuberculosis* H37Rv 의 trehalose 합성효소 유전자를 probe 로 이용하였다. *Brevibacterium* 게놈 DNA를 BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI 및 PstI 각각의 제한효소로 절단하고, 아가로스 겔 전기영동한 다음, ³²P가 표지된 *Mycobacterium* 의 trehalose 합성 효

소 유전자 DNA 단편을 probe 로 이용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 EcoRI으로 절단한 경우 약 4.3kbp 크기의 DNA 단편이 probe DNA와 혼성화되었다 (그림 8). 4.3kbp 크기의 EcoRI DNA 단편을 분리하고 이를 EcoRI으로 절단한 플라스미드 pUC18에 삽입하였다. 이렇게 제조된 재조합 플라스미드로 대장균 MC1061을 형질전환시킨 다음, 콜로니혼성화를 실시하여 양성을 나타내는 대장균을 선별하였으며, 이들 대장균으로부터 플라스미드를 분리하여, 제한효소지도를 작성하고 염기서열을 결정하였다. 전기 EcoRI DNA 단편을 pBvR4.3이라 명명하였다. 염기서열을 결정하여본 결과, pBvR4.3은 trehalose 합성효소 유전자의 5' 부위 일부분만을 포함하고 있었다. 전체 유전자를 분리하기 위하여 다른 제한효소로 처리한 DNA를 이용하여 Southern blot 분석을 실시한 결과, SalI으로 절단한 경우 약 6.0kbp 크기의 DNA 단편이 probe DNA와 혼성화되었다. 6.0kbp 크기의 SalI DNA 단편을 분리하고 이를 SalI으로 절단한 플라스미드 pUC18에 삽입하였다. 이렇게 제조된 재조합 플라스미드로 위에서 기술한 것과 같은 콜로니혼성화를 실시하여 양성을 나타내는 대장균을 선별하였으며, 이들 대장균으로부터 플라스미드를 분리하여, 제한효소지도를 작성하고 염기서열을 결정하였다. 분리한 SalI DNA 단편을 pBvS6.0이라 명명하였다. 염기서열을 결정하여본 결과, pBvS6.0은 pBvR4.3의 3' 부위의 약 1kbp 정도가 겹치며 trehalose 합성효소 유전자의 3' 부위를 전부 포함하고 있었다.

상기에서 분리한 pBvR4.3 및 pBvS6.0에 해당하는 DNA 단편의 상대적인 위치 및 제한효소 지도는 그림 9에 나타내었다. 그림 9에서, E는 EcoRI, S는 SalI, B는 BamHI, H는 HindIII의 제한효소 절단부위를 각각 나타내며, 화살표는 염기서열이 결정된 DNA 단편 및 서열결정의 방향을 나타낸다.

전체 trehalose 합성 유전자의 염기서열 및 이로부터 번역되는 아미노산 서열을 그림 10에 나타내었다. 그림 10에서, 밑줄친 부분은 ribosome 결합부위, 그림자 부위는 알파-아밀라제 계통의 효소에서 공통적으로 발견되는 아미노산 서열, (*)는 번역종결부위를 각각 나타낸다. 그림 10에서 보듯이, 염기서열을 결정한 DNA 단편의 크기는 4,715bp이며, 두 개의 trehalose 합성 관련효소를 암호화하고 있다. 첫 번째 유전자는 구조유전자 부분이 2,328bp인 브레비박테리움 말토올리고실trehalose 합성효소 (Brevibacterium maltooligosyltrehalose synthase: BvMTSase) 유전자이고, 이로부터 번역되는 브레비박테리움 말토올리고실trehalose 합성효소 (BvMTSase) 는 아미노산 776개로 구성된 약 85.8kDa의 분자량을 갖는 단백질이다. 이 효소는 말토올리고당 (maltooligosaccharide) 의 환원말단에 존재하는 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 $\alpha(1\rightarrow1)$ 글리코시딕 결합으로 전환시켜 말토올리고실 trehalose (maltooligosyltrehalose) 를 생성한다. 두 번째 유전자는 구조유전자 부분이 1,767bp 인 브레비박테리움 말토올리고실trehalose 가수분해효소 (Brevibacterium maltooligosyltrehalose trehalohydrolase: BvMTHase) 유전자이고, 이로부터 번역되는 브레비박테리움 말토올리고실trehalose 가수분해효소 (BvMTHase) 는 아미노산 589개로 구성된 약 64.2kDa의 분자량을 갖는 단백질이다. 이 효소는 BvMTSase에 의해 생성된 말토올리고실trehalose의 말토올리고실 부위와 trehalose 부위간의 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 가수분해시켜 포도당의 단위가 2개 적어진 말토올리고당과 trehalose 를 생성한다. BvMTSase 유전자의 3' 말단은 BvMTHase 유전자의 5' 말단과 1개의 nucleotide 가 겹쳐진 유전자 구조를 가지고 있으며, 이러한 구조는 두 개의 유전자가 operon 구조를 이루고 있을 가능성이 있다.

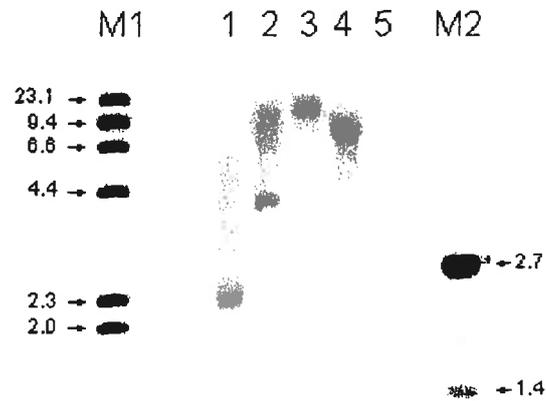


그림 8. Genomic Southern blot analysis of *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) for maltooligo-syltrehalose synthase (BvMTSase) and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (BvMTHase) genes. Each genomic DNA was digested with restriction enzymes, separated by 0.8% agarose gel electrophoresis, transferred onto nylon membrane and probed with pMtK5.5, the genomic clone containing the genes for MTSase and MTHase of *M. tuberculosis*.

Lane M1 : lambda DNA digested with *HindIII*

Lanes 1-5 : *B. helvolum* genomic DNA digested with *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI* and *PstI*, respectively.

Lane M2 : pUC18 DNA digested with *EcoRI* and *HinfI*

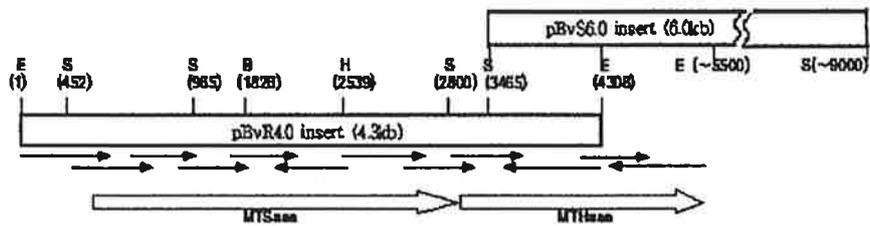


그림 9. Restriction enzyme map of pBvR4.3 and pBvS6.0

These clones contain full-length ORF of BvMTSase and BvMTHase genes (thick arrows). The thin arrows represent sequenced regions and directions. Abbreviations used in this figure: E, *EcoRI*; S, *SalI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*.

나. 대장균에서의 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자의 발현 및 순수분리

분리한 유전자로부터 번역되는 BvMTSase 및 BvMTHase 두가지 효소단백질을 이용하여 trehalose 를 합성할 수 있는지 확인하기 위하여 각각의 유전자를 대장균에서 발현시키고, 발현된 두가지 효소단백질을 순수분리한 후 trehalose 합성능을 검정하였다. 각각의 구조유전자부분을 분리하고 대장균에서의 발현벡터인 pRSET 플라스미드에 삽입하였다. 이렇게 제조된 각각의 재조합 플라스미드로 대장균 BL21을 형질전환시키고, 12시간 배양한 후, IPTG 를 최종농도 1mM이 되도록 첨가하고 4시간 더 배양하여 각각의 효소단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 각각의 효소단백질은 Ni^{2+} -NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리하였다. 그림 11은 발현된 효소단백질을 SDS-PAGE 전기영동하여 확인한 결과이다. 그림 8의 M은 단백질분자량마커이고, C는 control 실험으로서 pRSET 플라스미드만을 포함하는 대장균으로부터 전체 단백질을 추출하고 SDS-PAGE 전기영동한 결과이다. 그림 11의 1, 3은 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자를 포함하는 pRMTS 및 pRMTH 플라스미드를 대장균에서 유도발현시키고, 각각 전체 단백질을 추출하여 SDS-PAGE 전기영동한 결과이며, 그림 11의 2, 4는 발현된 각각의 효소단백질을 Ni^{2+} -NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리한 결과이다. 그림 11에서 보듯이 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자를 포함하는 pRMTS 및 pRMTH 플라스미드를 대장균에서 유도 발현시킨 경우, BvMTSase 및 BvMTHase 효소는 특이적으로 다량 발현되었으며 발현된 각각의 효소단백질은 Ni^{2+} -NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 98% 이상 순수 분리하였다 (그림 11, lane 2, 4).

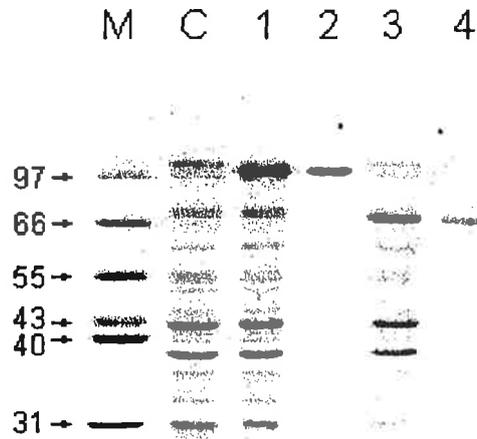


그림 11. Expression and purification of BvMTSase and BvMTHase in *E. coli*.

The ORFs of pBvMTSase and pBvMTHase were introduced into pRSETB *E. coli* expression vector and induced by adding 1mM IPTG at 37°C for 4 hours. Protein extracts prepared by sonication in SDS-PAGE loading buffer were analyzed by 12.5% SDS-PAGE and stained by Coomassie Blue. BvMTSase and BvMTHase were purified by Ni²⁺-NTA chromatography. The molecular weights of recombinant BvMTSase and BvMTHase are in agreement with the predicted value from their deduced amino acids.

Lane M: Molecular weight marker

Lane C : crude extract of *E. coli* BL21 harboring pRSETB

Lane 1 : crude extract of *E. coli* BL21 harboring pRBvMTSase

Lane 2 : purified BvMTSase by Ni²⁺-NTA chromatography

Lane 3 : crude extract of *E. coli* BL21 harboring pRBvMTHase

Lane 4 : purified BvMTHase by Ni²⁺-NTA chromatography

다. BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질을 이용한 trehalose 합성 및 기질 특이성

순수 분리한 BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질의 trehalose 합성능 및 기질 특이성을 알아보기 위하여 여러가지 말토올리고당을 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액 (pH 7.0) 조건하에서 여러가지 말토올리고당을 1mM의 농도로 첨가하고 각각 500ng의 순수분리한 효소를 첨가하여 전체 반응부피를 50ul로 하였다. 이를 37℃에서 1시간 반응시키고, 95℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다.

그림 1-12는 말토펜타오스 (maltopentaose, G5) 를 기질로 사용하고 BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질을 처리하여 trehalose 합성을 실시한 후 합성된 trehalose 를 HPIC 방법에 의해 확인한 결과이다. 그림 12의 A는 말토펜타오스에 BvMTSase 를 반응시킨 후의 HPIC 분석결과이고, 그림 12의 B는 말토펜타오스에 BvMTHase 를 반응시킨 후의 결과이다. 그림 12의 C는 말토펜타오스에 BvMTSase과 BvMTHase를 모두 반응시킨 후 HPIC 방법에 의해 분석한 결과이다. 그림 12의 A에서 보듯이 말토펜타오스에 BvMTSase를 반응시켰을 때, 1 시간 후 말토펜타오스 (G5) 의 약 80%가 말토티리오실trehalose (maltotriosyltrehalose: G3-T)로 전환되었음을 확인하였다. 그러나 말토펜타오스에 BvMTHase를 반응시켰을 때, 이 효소는 말토펜타오스와 직접적으로는 반응하지 않았다 (그림 12, B). 말토펜타오스에 BvMTSase와 BvMTHase를 모두 반응시킨 경우, 말토펜타오스는 trehalose 와 말토티리오스 (maltotriose, G3) 로 100% 전환되었다 (그림 12, C). 이상의 결과를 종합하여보면, BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질은 말토펜타오스에 작용하여 trehalose 를 효과적으로 생산할 수 있음을 나타낸다.

순수 분리한 BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질의 기질 특이성을 알아보기 위하여 여러가지 말토올리고당을 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시하였다. 그림 13은 여러 가지 말토올리고당을 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시한 후 TLC 방법에 의해 trehalose 합성을 확인한 결과이다. 그림 13의 1은 기준물질로서 trehalose (trehalose, T), 말토티리오스 (maltotriose, G3), 말토테트라오스 (maltotetraose, G4), 말토펀타오스 (maltopentaose, G5), 말토흡사오스 (maltohexaose, G6), 말토펀타오스 (maltoheptaose, G7) 의 혼합물이다. 그림 13의 2부터 8까지는 각각 말토티리오스, 말토테트라오스, 말토펀타오스, 말토흡사오스, 말토펀타오스, 말토올리고당 혼합물 및 수용성 전분을 기질로 사용하여 trehalose 합성실험을 실시한 결과이다. 그림 13에서 보듯이 5개 이상 홀수개의 포도당 단위로 되어있는 말토올리고당들은 최종 반응물이 trehalose 와 말토티리오스 (G3) 이며 (그림 13, lane 4, 6), 말토티리오스는 더 이상 가수분해되지 않았다 (그림 13, lane 2). 6개 이상 짝수개의 포도당 단위로 되어있는 말토올리고당들은 최종 반응물이 trehalose 와 말토테트라오스 (G4) 이며 (그림 13, lane 3, 5), 말토테트라오스를 장시간 반응하였을 경우 소량만이 trehalose 와 말토스 (maltose) 로 전환되었다. 그러나 전분을 기질로 사용하여 같은 반응조건에서 trehalose 합성을 실시한 결과는 trehalose 의 생성이 매우 낮은 수준이었다 (그림 13, lane 8).

본 연구의 결과 분리한 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자는 *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822) 에서 trehalose 합성 효소를 암호화하는 유전자이고, BvMTSase 및 BvMTHase 효소단백질은 말토올리고당으로부터 trehalose 를 합성하는 효소임을 증명하였다. BvMTSase 는 말토올리고당의 환원말단에 존재하는 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 $\alpha(1$

→1)글리코시딕 결합으로 전환시켜 말토올리고실 trehalose (maltooligosyltrehalose) 를 생성하는 효소이고, BvMTHase는 BvMTSase 에 의해 생성된 말토올리고실trehalose의 말토올리고실 부위와 trehalose 부위간의 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 가수분해시켜 포도당의 단위가 2개 적어진 말토올리고당과 trehalose 를 생성하는 효소이다. BvMTSase 및 BvMTHase 유전자와 그로부터 번역되어 생성되는 효소 단백질 (BvMTSase 및 BvMTHase) 은 기존에 보고된 trehalose 합성 효소와는 다른 새로운 것으로 본 연구를 통하여 분리된 고유의 trehalose 생합성 유전자이다.

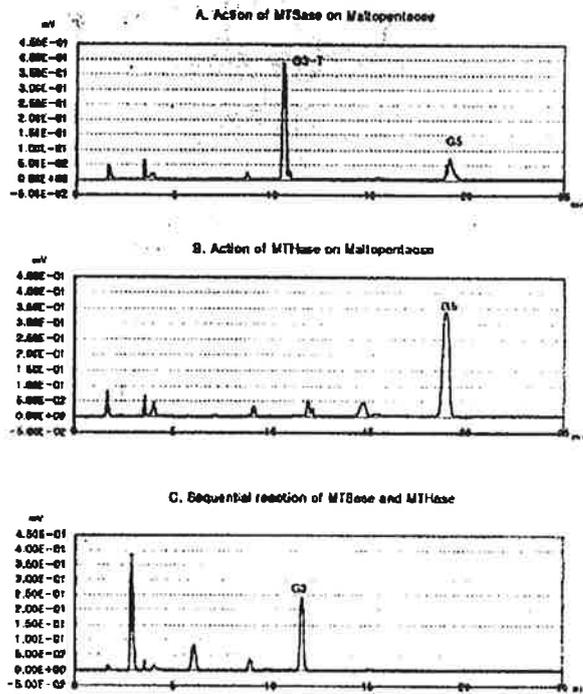


그림 12. HPIC profiles of the products by BvMTSase and BvMTHase on maltopentaose

A : the action pattern of BvMTSase on maltopentaose (G5).

Maltopentaose was converted to maltotriosyltrehalose (G3-T).

B : the action pattern of BvMTHase on maltopentaose (G5).

BvMTHase did not act on maltopentaose by itself.

C : the action pattern of BvMTSase and BvMTHase on maltopentaose (G5). Trehalose and maltotriose (G3) were produced by the conjugated reaction of BvMTSase and BvMTHase

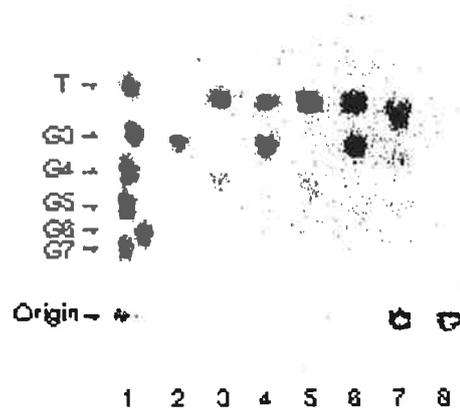


그림 13. Substrate specificity of BvMTSase and BvMTHase. Several maltooligosaccharides and soluble starch were incubated with BvMTSase and BvMTHase at 37°C for an hour and analyzed by thin layer chromatography.

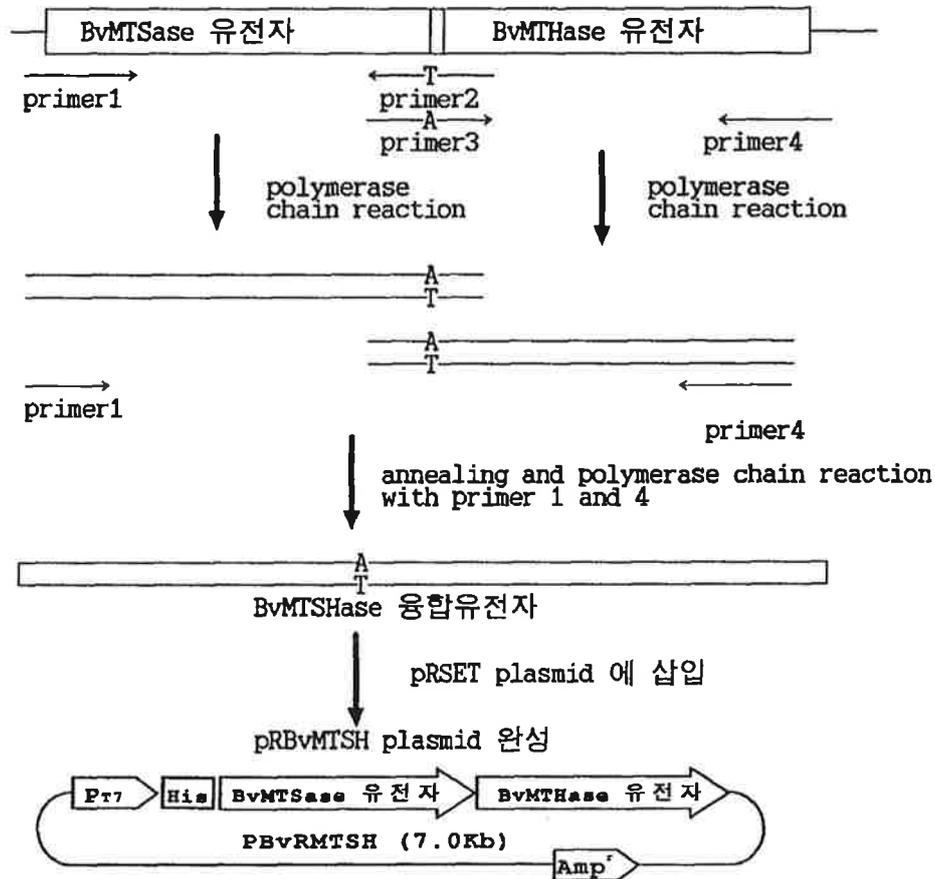
Lane 1: Authentic trehalose (T) and maltooligosaccharides mixture (G3, maltotriose; G4, maltotetraose; G5, maltopentaose; G6, maltohexaose; G7, maltoheptaose). Lanes 2-8: Reaction products by the BvMTSase and BvMTHase with maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooligosaccharide mixture and soluble starch as a substrate, respectively

5. 한발 저항성 고유 유전자의 발현 효율 증진

가. 융합단백질 BvMTSHase 에 의한 Trehalose 합성

두 개의 연속적인 반응을 이행하는 융합단백질의 이점을 이용하기 위해서 BvMTSase 와 BvMTHase 유전자를 융합하여 BvMTSHase 융합단백질을 제조하였다. 그림 14는 BvMTSase 및 BvMTHase 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 및 유전자 재조합 기술을 이용하여 하나의 BvMTSHase 융합 유전자를 제조하는 과정을 나타낸 것이다. BvMTSase 및 BvMTHase 유전자는 1개의 염기가 중첩되어 있는 유전자 구조를 가지고 있는데, 이 유전자를 발현시키면 BvMTSase 효소단백질은 단백질로서 발현이 가능하나, BvMTHase 효소단백질은 전혀 다른 단백질이 만들어지고, 또한 중간에서 단백질 합성이 끝나는 불완전한 효소단백질이 합성된다. 그러므로 각각의 유전자를 분리하여 각각의 효소단백질을 제조해야 하는 어려움이 있다. 두 개의 유전자가 중첩되지 않는 하나의 융합유전자로 제조하기 위하여 그림 14에 나타낸 것과 같은 oligonucleotide primer를 합성하고, PCR 방법을 이용하여 A 염기가 하나 더 삽입된 융합유전자를 제조하였다. BvMTSHase 융합유전자는 BvMTSase 유전자의 번역종결부위가 없어지고 BvMTSase 의 마지막 아미노산 다음에 BvMTHase 유전자의 번역개시부위가 연결되어 있는 융합유전자의 구조를 가진다. 그림 15는 제조된 BvMTSHase 융합유전자의 염기서열 및 그로부터 번역되는 아미노산 서열을 나타낸다. 본 발명에서 제조한 trehalose 생합성 효소 융합유전자의 구조유전자 부분은 4,095bp이며, 두 개의 효소 단백질이 융합된 형태로 암호화하고 있다. 융합유전자의 첫번째 유전자 부위는 BvMTSase 유전자 부분이고, 두번째 유전자 부위는 BvMTHase 유전자이다. 이로부터 번역되는 융합효소단백질은 말토올리고실trehalose

합성가수분해효소(BvMTSHase)이며, 아미노산 1,365개로 구성된 약 150kDa의 분자량을 갖는 융합효소단백질이다.



primer 1 : 5'-GCGATATCATGAAGACTCCGGTCTCCAC-3'
 primer 2 : 5'-CAAGGTCATIGCCTTTTC-3'
 primer 3 : 5'-GAAAAGGCAATGACCTTG-3'
 primer 4 : 5'-TTAAGCTTCAGGACTTGAGGACCG-3'

그림 14. Strategy for the cloning of a BvMTSHase fusion gene by two step PCR and the nucleotide sequences of 4 primers using two step PCR.

```

1 500150020003000400050006000700080009001000110012001300140015001600170018001900200021002200230024002500260027002800290030003100320033003400350036003700380039004000410042004300440045004600470048004900500051005200530054005500560057005800590060006100620063006400650066006700680069007000710072007300740075007600770078007900800081008200830084008500860087008800890090009100920093009400950096009700980099001000001000002000003000004000005000006000007000008000009000010000011000001200000130000014000001500000160000017000001800000190000020000021000002200000230000024000002500000260000027000002800000290000030000031000003200000330000034000003500000360000037000003800000390000040000041000004200000430000044000004500000460000047000004800000490000050000051000005200000530000054000005500000560000057000005800000590000060000061000006200000630000064000006500000660000067000006800000690000070000071000007200000730000074000007500007600007700007800007900008000008100008200008300008400008500008600008700008800008900009000009100009200009300009400009500009600009700009800009900010000010100010200010300010400010500010600010700010800010900011000011100011200011300011400011500011600011700011800011900012000121000122000123000124000125000126000127000128000129000130001310001320001330001340001350001360001370001380001390001400014100014200014300014400014500014600014700014800014900015000151000152000153000154000155000156000157000158000159000160001610001620001630001640001650001660001670001680001690001700017100017200017300017400017500017600017700017800017900018000181000182000183000184000185000186000187000188000189000190001910001920001930001940001950001960001970001980001990002000201000202000203000204000205000206000207000208000209000210002110002120002130002140002150002160002170002180002190002200022100022200022300022400022500022600022700022800022900023000231000232000233000234000235000236000237000238000239000240002410002420002430002440002450002460002470002480002490002500025100025200025300025400025500025600025700025800025900026000261000262000263000264000265000266000267000268000269000270002710002720002730002740002750002760002770002780002790002800028100028200028300028400028500028600028700028800028900029000291000292000293000294000295000296000297000298000299000300030100030200030300030400030500030600030700030800030900031000311000312000313000314000315000316000317000318000319000320003210003220003230003240003250003260003270003280003290003300033100033200033300033400033500033600033700033800033900034000341000342000343000344000345000346000347000348000349000350003510003520003530003540003550003560003570003580003590003600036100036200036300036400036500036600036700036800036900037000371000372000373000374000375000376000377000378000379000380003810003820003830003840003850003860003870003880003890003900039100039200039300039400039500039600039700039800039900040004010004020004030004040004050004060004070004080004090004100041100041200041300041400041500041600041700041800041900042000421000422000423000424000425000426000427000428000429000430004310004320004330004340004350004360004370004380004390004400044100044200044300044400044500044600044700044800044900045000451000452000453000454000455000456000457000458000459000460004610004620004630004640004650004660004670004680004690004700047100047200047300047400047500047600047700047800047900048000481000482000483000484000485000486000487000488000489000490004910004920004930004940004950004960004970004980004990005000501000502000503000504000505000506000507000508000509000510005110005120005130005140005150005160005170005180005190005200052100052200052300052400052500052600052700052800052900053000531000532000533000534000535000536000537000538000539000540005410005420005430005440005450005460005470005480005490005500055100055200055300055400055500055600055700055800055900056000561000562000563000564000565000566000567000568000569000570005710005720005730005740005750005760005770005780005790005800058100058200058300058400058500058600058700058800058900059000591000592000593000594000595000596000597000598000599000600060100060200060300060400060500060600060700060800060900061000611000612000613000614000615000616000617000618000619000620006210006220006230006240006250006260006270006280006290006300063100063200063300063400063500063600063700063800063900064000641000642000643000644000645000646000647000648000649000650006510006520006530006540006550006560006570006580006590006600066100066200066300066400066500066600066700066800066900067000671000672000673000674000675000676000677000678000679000680006810006820006830006840006850006860006870006880006890006900069100069200069300069400069500069600069700069800069900070007010007020007030007040007050007060007070007080007090007100071100071200071300071400071500071600071700071800071900072000721000722000723000724000725000726000727000728000729000730007310007320007330007340007350007360007370007380007390007400074100074200074300074400074500074600074700074800074900075000751000752000753000754000755000756000757000758000759000760007610007620007630007640007650007660007670007680007690007700077100077200077300077400077500077600077700077800077900078000781000782000783000784000785000786000787000788000789000790007910007920007930007940007950007960007970007980007990008008010008020008030008040008050008060008070008080008090008100081100081200081300081400081500081600081700081800081900082000821000822000823000824000825000826000827000828000829000830008310008320008330008340008350008360008370008380008390008400084100084200084300084400084500084600084700084800084900085000851000852000853000854000855000856000857000858000859000860008610008620008630008640008650008660008670008680008690008700087100087200087300087400087500087600087700087800087900088000881000882000883000884000885000886000887000888000889000890008910008920008930008940008950008960008970008980008990009009010009020009030009040009050009060009070009080009090009100091100091200091300091400091500091600091700091800091900092000921000922000923000924000925000926000927000928000929000930009310009320009330009340009350009360009370009380009390009400094100094200094300094400094500094600094700094800094900095000951000952000953000954000955000956000957000958000959000960009610009620009630009640009650009660009670009680009690009700097100097200097300097400097500097600097700097800097900098000981000982000983000984000985000986000987000988000989000990009910009920009930009940009950009960009970009980009990001000100100010020001003000100400010050001006000100700010080001009000101000101100010120001013000101400010150001016000101700010180001019000102000102100010220001023000102400010250001026000102700010280001029000103000103100010320001033000103400010350001036000103700010380001039000104000104100010420001043000104400010450001046000104700010480001049000105000105100010520001053000105400010550001056000105700010580001059000106000106100010620001063000106400010650001066000106700010680001069000107000107100010720001073000107400010750001076000107700010780001079000108000108100010820001083000108400010850001086000108700010880001089000109000109100010920001093000109400010950001096000109700010980001099000110001101000110200011030001104000110500011060001107000110800011090001110001111000111200011130001114000111500011160001117000111800011190001120001121000112200011230001124000112500011260001127000112800011290001130001131000113200011330001134000113500011360001137000113800011390001140001141000114200011430001144000114500011460001147000114800011490001150001151000115200011530001154000115500011560001157000115800011590001160001161000116200011630001164000116500011660001167000116800011690001170001171000117200011730001174000117500011760001177000117800011790001180001181000118200011830001184000118500011860001187000118800011890001190001191000119200011930001194000119500011960001197000119800011990002000200100020020002003000200400020050002006000200700020080002009000201000201100020120002013000201400020150002016000201700020180002019000202000202100020220002023000202400020250002026000202700020280002029000203000203100020320002033000203400020350002036000203700020380002039000204000204100020420002043000204400020450002046000204700020480002049000205000205100020520002053000205400020550002056000205700020580002059000206000206100020620002063000206400020650002066000206700020680002069000207000207100020720002073000207400020750002076000207700020780002079000208000208100020820002083000208400020850002086000208700020880002089000209000209100020920002093000209400020950002096000209700020980002099000210021010002102000210300021040002105000210600021070002108000210900021100021110002112000211300021140002115000211600021170002118000211900021200021210002122000212300021240002125000212600021270002128000212900021300021310002132000213300021340002135000213600021370002138000213900021400021410002142000214300021440002145000214600021470002148000214900021500021510002152000215300021540002155000215600021570002158000215900021600021610002162000216300021640002165000216600021670002168000216900021700021710002172000217300021740002175000217600021770002178000217900021800021810002182000218300021840002185000218600021870002188000218900021900021910002192000219300021940002195000219600021970002198000219900022002201000220200022030002204000220500022060002207000220800022090002210002211000221200022130002214000221500022160002217000221800022190002220002221000222200022230002224000222500022260002227000222800022290002230002231000223200022330002234000223500022360002237000223800022390002240002241000224200022430002244000224500022460002247000224800022490002250002251000225200022530002254000225500022560002257000225800022590002260002261000226200022630002264000226500022660002267000226800022690002270002271000227200022730002274000227500022760002277000227800022790002280002281000228200022830002284000228500022860002287000228800022890002290002291000229200022930002294000229500022960002297000229800022990003000300100030020003003000300400030050003006000300700030080003009000301000301100030120003013000301400030150003016000301700030180003019000302000302100030220003023000302400030250003026000302700030280003029000303000303100030320003033000303400030350003036000303700030380003039000304000304100030420003043000304400030450003046000304700030480003049000305000305100030520003053000305400030550003056000305700030580003059000306000306100030620003063000306400030650003066000306700030680003069000307000307100030720003073000307400030750003076000307700030780003079000308000308100030820003083000308400030850003086000308700030880003089000309000309100030920003093000309400030950003096000309700030980003099000400040010004002000400300040040004005000400600040070004008000400900040100040110004012000401300040140004015000401600040170004018000401900040200040210004022000402300040240004025000402600040270004028000402900040300040310004032000403300040340004035000403600040370004038000403900040400040410004042000404300040440004045000404600040470004048000404900040500040510004052000405300040540004055000405600040570004058000405900040600040610004062000406300040640004065000406600040670004068000406900040700040710004072000407300040740004075000407600040770004078000407900040800040810004082000408300040840004085000408600040870004088000408900040900040910004092000409300040940004095000409600040970004098000409900050005001000500200050030005004000500500050060005007000500800050090005010005011000501200050130005014000501500050160005017000501800050190005020005021000502200050230005024000502500050260005027000502800050290005030005031000503200050330005034000503500050360005037000503800050390005040005041000504200050430005044000504500050460005047000504800050490005050005051000505200050530005054000505500050560005057000505800050590005060005061000506200050630005064000506500050660005067000506800050690005070005071000507200050730005074000507500050760005077000507800050790005080005081000508200050830005084000508500050860005087000508800050890005090005091000509200050930005094000509500050960005097000509800050990006000600100060020006003000600400060050006006000600700060080006009000601000601100060120006013000601400060150006016000601700060180006019000602000602100060220006023000602400060250006026000602700060280006029000603000603100060320006033000603400060350006036000603700060380006039000604000604100060420006043000604400060450006046000604700060480006049000605000605100060520006053000605400060550006056000605700060580006059000606000606100060620006063000606400060650006066000606700060680006069000607000
```

나. 대장균에서의 BvMTSHase 융합유전자의 발현 및 순수분리

융합유전자로부터 번역되는 BvMTSHase 융합효소단백질을 이용하여 trehalose를 합성할 수 있는지 확인하기 위하여 융합 유전자를 대장균에서 발현시키고, 발현된 융합 효소단백질을 순수 분리한 후 trehalose 합성능을 검정하였다. 융합유전자의 구조유전자부분을 분리하고 대장균에서의 발현벡터인 pRSET 플라스미드에 삽입하였다. 이렇게 제조된 재조합 플라스미드(pRBvMTSH)로 대장균 BL21을 형질전환시키고, 12시간 배양한 후, IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)를 최종농도 1mM이 되도록 첨가하고 4시간 더 배양하여 융합 효소단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 융합 효소단백질은 Ni²⁺-NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수분리하였다. BvMTSHase 융합유전자를 포함하는 pRBvMTSH 플라스미드를 대장균에서 유도발현시킨 경우, BvMTSHase 융합 효소단백질은 특이적으로 다량 발현되었으며 발현된 융합효소단백질은 Ni²⁺-NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수분리가 가능하였다.

다. BvMTSHase-융합효소단백질을 이용한 trehalose합성 및 기질 특이성

순수 분리한 BvMTSHase 융합 효소단백질의 trehalose 합성능 및 기질 특이성을 알아보기 위하여 여러가지 말토올리고당을 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 조건하에서 여러가지 말토올리고당을 1mM의 농도로 첨가하고 500ng의 순수분리한 효소를 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 37℃에서 1시간 반응시키고, 95℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 5개 이상 홀수개의 포도당 단위로 되어있는 말토올리고당은 최종 반응물이 trehalose와 말토트리오스(G3)이며, 말토트리오스는

더 이상 가수분해되지 않았다. 6개 이상 짝수개의 포도당 단위로 되어 있는 말토올리고당은 최종 반응물이 trehalose와 말토테트라오스(G4)이며, 말토테트라오스를 장시간 반응하였을 경우 소량만이 trehalose와 말토스(maltose)로 전환됨을 알 수 있었다.

라. 알파-아밀라제를 이용한 전분으로부터의 trehalose합성 효율 증대
전분을 기질로 이용하여 trehalose를 합성할 수 있는지 알아보기 위하여 수용성 전분(soluble starch)을 기질로 사용하고 반응시간을 24시간까지 연장하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 조건하에서 1% 수용성 전분을 기질로 첨가하고 순수분리한 융합효소 (BvMTSHase)를 1 μ g을 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간까지 반응시키고, 95 $^{\circ}$ C에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 그림 16은 24시간 반응 후 반응물을 HPIC 방법에 의해 합성된 trehalose를 확인하고 합성된 trehalose의 양을 정량한 결과이다. 그림 16에서 보듯이 24시간 반응 후에 전분의 약 30%가 trehalose로 전환되었음을 확인하였다.

전분으로부터 trehalose의 생산 효율을 높이기 위하여 수용성 전분(soluble starch)에 알파-아밀라제(α -amylase)를 처리하고 반응시간을 24시간까지 연장하였다. 반응조건은 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 조건하에서 1% 수용성 전분을 기질로 첨가하고 0.05단위의 알파-아밀라제, 순수분리한 융합효소(BvMTSHase)를 1 μ g을 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24 시간까지 반응시키고, 95 $^{\circ}$ C에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 알파-아밀라제를 첨가하고 24시간까지 trehalose 합성반응을 진행하였을 경우 반응시간에 따라 전분으로부터 합성되는 trehalose의 양이 알파-아밀라제를 첨가하지 않은 경우

에 비하여 월등히 증가됨을 확인하였다. 그림 17은 알파-아밀라제를 처리하여 반응한 후 반응물을 HPIC 방법에 의해 합성된 trehalose를 확인하고 합성된 trehalose의 양을 정량한 결과이다. 그림 17에서 보듯이 24시간 반응 후에 전분의 약 70%가 trehalose로 전환되었음을 확인하였고, 알파-아밀라제를 첨가하지 않은 경우에 비하여 약 230% 이상의 trehalose 전환 효율이 증가하였다.

그러므로 본 연구에서 사용한 BvMTSHase 융합 효소단백질을 이용하면 BvMTSase 및 BvMTHase 각각의 효소를 이용하는 경우에 비하여 trehalose를 한번의 반응으로 효과적으로 생산할 수 있다. 또한 수용성 전분을 알파-아밀라제 효소로 먼저 처리하여 말토올리고당으로 전환한 후 이를 기질로 사용하면, trehalose의 생산효율을 2배 이상 증가시켜서 trehalose를 대량 생산할 수 있을 것이다.

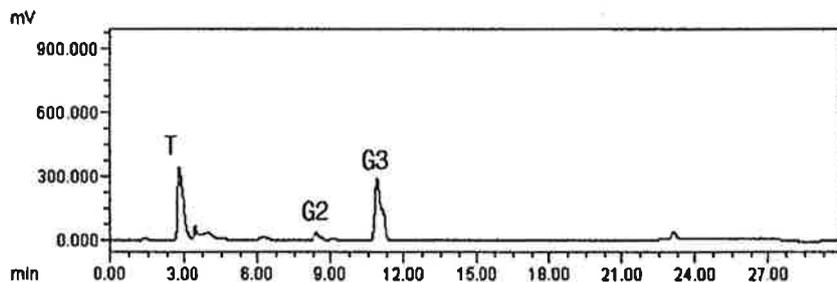


그림 16. Trehalose production from starch by BvMTSHase fusion enzyme.

Soluble starch (1% solution) was incubated with 1 μ g of BvMTSHase fusion enzyme at 37°C for 24hr. The reaction product was analyzed by HPIC.

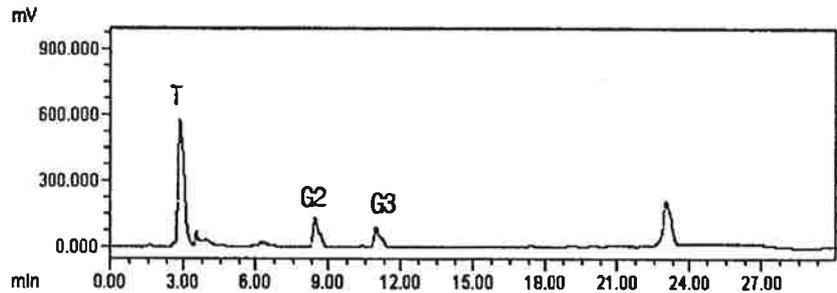


그림 17. Trehalose production from starch by BvMTSHase fusion enzyme and α -amylase. Soluble starch (1% solution) was incubated with μ g of BvMTSHase fusion enzyme and 0.05 unit α -amylase at 37°C for 24hr. The reaction product was analyzed by HPLC.

6. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 분리 및 특성 규명

가. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자 분리

지금까지 알려진 trehalose 생합성 관련 내열성 효소는 대부분 *Sulfolobus* 속의 극한 미생물에서 분리되었으며, *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* 및 *S. shibatae* 에서 각각 trehalose 생합성 관련 내열성 효소 유전자 (MTS, MTH)가 분리되었다 (Kobayashi *et al.*, 1996a,b, Isabella *et al.*, 1998). 따라서 본 연구에서는 trehalose 생합성 관련

내열성 효소 유전자가 아직 분리되지 않은 *S. acidocaldarius* 의 다른 strain (ATCC 49426)으로부터 효소 활성을 검정하고 해당 유전자를 분리하였다. 본 연구에서는 기존에 분리된 *S. acidocaldarius* (ATCC 33909)의 내열성 MTS/MTH 유전자의 염기서열로부터 ORF 부위의 N-말단 부위에 해당하는 primer를 합성한 후, PCR 방법에 의해 증폭되는 유전자 (1kbp)를 분리하였고, 부분적으로 염기서열을 결정하였다. 그 결과 PCR 방법에 의해 증폭된 1kbp 유전자의 염기서열은 *S. acidocaldarius* (ATCC 33909)의 MTS 유전자의 N-말단 부위와 98% homology를 나타냈고, 따라서 이 유전자는 *S. acidocaldarius* (ATCC 49426) 의 MTS 유전자의 일부임을 확인하였다. 증폭된 1kbp 유전자를 probe로 사용하여 MTS 및 MTH 전체 유전자를 분리하기 위하여 genomic Southern blot을 실시하고 그 결과를 그림 18에 나타내었다. 이 결과로부터 1kbp 유전자와 혼성화를 이루는 DNA를 분리한 후, partial genomic library를 조제하고, colony hybridization 방법에 의하여 *S. acidocaldarius* (ATCC 49426) 의 MTS 및 MTH 유전자를 분리하였다. 분리한 MTS 및 MTH 유전자의 ORF 염기서열을 그림 19와 20에 나타내었다. 그림 19에 나타낸 유전자는 구조유전자 부분이 2,168bp인 *S. acidocaldarius* (ATCC 49426) 의 MTS 유전자이고, 이로부터 번역되는 SaMTS 는 아미노산 720개로 구성된 약 84.8kDa의 분자량을 갖는 단백질이다. 이 효소는 말토올리고당 (maltooligosaccharide) 의 환원말단에 존재하는 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 $\alpha(1\rightarrow1)$ 글리코시딕 결합으로 전환시켜 말토올리고실 trehalose (maltooligosyltrehalose) 를 생성한다. 그림 20에 나타낸 유전자는 구조유전자 부분이 1,671bp 인 *S. acidocaldarius* (ATCC 49426) 의 MTH 유전자이고, 이로부터 번역되는 SaMTH 는 아미노산 557개로 구성된 약 64.4kDa의 분자량을 갖는 단백질이다. 이 효소는 SaMTS에 의해 생성된

말토올리고실trehalose의 말토올리고실 부위와 trehalose 부위간의 α (1→4) 글리코시딕 결합을 가수분해시켜 포도당의 단위가 2개 적어진 말토올리고당과 trehalose 를 생성한다. SaMTS 와 SaMTH 유전자의 염기 서열을 기존에 분리된 Sulfolobus 속 내열성 균주의 MTS, MTH 유전자와 비교한 결과, *S. acidocaldarius* (ATCC 33909) 와는 각각 99.8%, 99.9% 의 유사도를 나타냈고, *S. solfataricus* KM1 과는 각각 64.3%, 66.4% 의 유사도를 나타내었다.

M 1 2 3 4 5

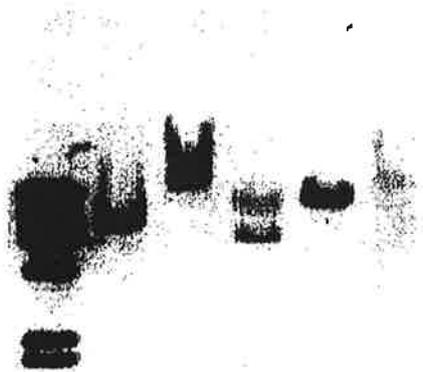


그림 18. Genomic Southern blot analysis of *S. acidocaldarius* (ATCC 49426). Each genomic DNA was digested with restriction enzymes, separated by 0.8% agarose gel electrophoresis, transferred onto nylon membrane and probed with 1Kbp PCR product, the DNA fragment containing the partial gene for MTS of *S. acidocaldarius* (ATCC 49426). Lane M : lambda DNA digested with *Hind*III, Lanes 1-5 : *S. acidocaldarius* (ATCC 49426) genomic DNA digested with *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I and *Xba*I, respectively.

```

1  ATG ACA TCA ACC TAC AGA TTA CAG TTA AAT AAG AAT TTT AAT TTT GGT GAC GTA ATC GAT AAC CTA TGG TAT TTT AAG GAT 84
1  N : S A T V R L Q L M K N F R F G D V I D N L W Y F K D 78
85  TTA GGA GTT TCC CAT CTC TAC CTC TCT CCT GTC TTA ATG GCT TCG CCA GGA AAT AAC CAT GGG TAC GAT GTA ATA GAT CAT TCA 168
29  L G V S H L Y L S P V L H A S P S S N H G Y D V I D H S 56
169  AGC ATA AAC GAT GAA CTT GGA GAG AAA GAA TAC AAG AGA TTA ATA GAG ACA GCT CAT ACT ATT GGA TTA GGT ATT ATA CAG 252
57  R : K D E L G G E K E Y R R L I E T A W T I G L G I I Q 84
263  GAC ATA GTA CCA AAT CAC ATG GCT GTA AAT TCT CTA AAT TGG CGA CTA ATG GAT GTA TTA AAA ATG GGT AAA AAG AGT AAA TAT 336
85  D I V P N H M H A V N S L M W R L H D V L K H G K K S X Y 112
337  TAT ACB TAC TTT GAC TTT CTC CCA GAA GAT GAT AAG ATA GSA TTA CCC ATA TTA GGA GAA GAT TTA GAT ACA GTU ATA AGT AAA 420
113  Y T Y F D F P P E D D K ; R L P I L G E D L D T V I S K 140
421  GAT TTA TTA AGA ATA GAA GAT GGA GAT GAA TAT TTT CTA GAA TAT TTT AAA TGG AAA CTT CTT CTA ACA GAG GTT GGA AAT 504
241  F L L K I V K D G D E Y F L E Y F K M K L P L T E V D N 168
505  GAT ATA TAC GAC ACT TTA CAA CAG AAT TAT ACC CTA ATG TCT TGG AAA AAT CTT CTT GAC TAT GAA CAA TTT CTC GAT GTT 568
160  D I Y D T L Q K O K Y T L H S M K M P P S Y R R F P D V 196
540  AAT ACT TTA ATA GGA GTA AAT GTC GAA AAA GAT CAC GTT TTT CAA GAG TCC CAT TCA AAG ATC TTA GAT TTA GAT GTT GAT GGC 672
197  N T L J G D V N V E K D N V F Q E S H S K I L D L D V D O 224
679  TAT AGA ATT GAT CAT ATT GAT GGA TTA TAT GAT CCT GAG AAA TAT ATT AAT GAC CTA AAG TCA ATA ATT AAA AAT AAA ATA ATT 756
225  Y R I D H : D G L Y D P E K Y I H D L R S I I K M K I J 252
757  ATT GTA GAA AAA ATT CTC GGA TTT CAG GAG GAA TTA AAA TTA AAT TCA GAT GGA ACT ACA GGA TAT GAC TTC TTA AAT TAC TCC 840
253  I V E E T L D F Q E E L K L N S D G T Y G V D F L N Y S 280
841  AAC TTA CTA TTT AAT TTT AAT CAG ATA ATG GAC AAT ATA TAT GAG AAT TTC ACA GCG GAG AAA ATA TCT ATA AGT GAA AAT 924
281  R L I F N P K G K I M D S I Y E H F T A E K I S I S E S 308
925  ATA AAG AAA ATA AAA GCG CAA ATA AAT GAT GAG CTA TTT AAT TAT GAA GTT AAA AGA TTA CCA TCA CAA CTA GGA ATT AOC TAC 1008
309  I K K T K A Q I : D E L F S Y E Y K R L A S Q L D I S Y 336
1090  GAT ATA TTA AGA GAT TAC CTT TCT THT ATA GAT GTC TAC AGA ACT TAT GCT AAT CAG ATT GTA AAA GAG TGT GAT AAG ACC AAT 1092
337  D I L R D Y L S C I D V Y R T Y A N Q I Y E E C D K T W 364
1093  GAG ATA GAG GAA CCA ACC AAA AGA AAT CCA GAG GCT TAT ACT AAA TTA CAA CAA TAT ATG CCA GCA GTA TAC GCT AAA GCT TAT 1176
305  E : E E A T K R K P E R Y T K L Q Q V H P A V Y A K A Y 392
1171  GAA GAT ACT TTC CTT CTT AGA TAC AAT AGA TTA ACA TCC ATA AAT GAG GCT GGA ACC GAT TTA CAA TAT TAT AAG ATA TCG CTT 1260
793  E D T P L F R V K R L : S I M E V R S D L R Y Y K I S P 420
1261  GAT CAG TTT CAT GTA TTT AAT CAA AAA CAA AGA GGA AAA ATC ACA CTA AAT GCG ACT AOC ACA CAT GAT ACT AAG TTT AAT GAA 1344
421  D Q P H Y F K G Q K R R G K I T L W A T S T H D T K P S E 448
1345  GAT GTA AAG ATG AAA ATA ACT GTA TTA AAT GAA TTT CTT GAA GAA TGG AAA AAT AAG GTC GAG GAA TGG CAG AAT ATC ATA AAT 1428
449  D V R H K I S V L S E F P Z E W K N K V E E W H S I T W 476
1429  CCA AAG GTA TCA AGA AAT GAT GAA TAT AGA TAT CAG GAT TTA GTG GGA AAT TTT TAT GAG GAA TTC TCT AAT GAT TTT AAG 1512
477  P E V R R M D E Y R Y Q V L V G S P Y E G P S M D P R 504
1513  GAG AGA ATA AAG CAA CAT ATG ATA AAA AAT GTC AGA GAA GCT AAG ATA AAT ACC TCA TGG AGA AAT CAA AAT AAA GAT TAT GAA 1596
505  E R I K Q H M I K S V R E A E I N T S M R W Q M E E Y E 532
1597  AAT AGA GTA ATG GAA TTA GTG GAA GAA ACT TTT ACC AAT AAG GAT TTT ATT AAA AAT TTC ATG AAA TTT GAA AAT AAG ATA AGA 1680
533  K B V M E L V R K T F T M K D F I K S P H X F E E E I R 560
1681  AGC GTA AAG ATG AAT GAC AOC TTA TCT TTT GTC GCA TTA AAA ATT ATG TCA GCG GAT ATA CTT GAT TTT TAT CAG GGA ACA GAA 1764
561  R Y D H I K S L S L V A L E I N S A S I P D P Y D O T E 588
1765  ATA TGG CAA TAT TTA CTT ACA GAT CCA AAT AAC AGA GTC CCA GTG GAT TTT AAG AAA TTA CAC GAA ATA TTA GAA AAA TCC AAA 1848
549  I W R Y L L Y D P D W D V F V D P E R L H E I L E R S K 616
1849  AAA TTT GAA AAA AAT ATG TTA AAT TTT ATG GAC GAT GGA AGA AAT AAG ATG TAT TTA ACA TAT AAG CTT TTA TCC CTA AGA AAA 1932
617  K F E K W N L E K N D D G R I K H V L T Y K L L S L R K 644
1933  CAG TTC GCT GAG GAT TTT TTA AAT GAC GAT AAG GAA TTA AAT GAT CTA GAA GAA GAA CTA TGT GGT TTT AAT AAT TTT AAC AAA 2016
645  Q L A K D F I X R E Y F S L D L E E G L C G F I R P H K 672
2017  ATT TGG GTA ATA ATA AAA ACC AAG GAA AAT GCT AAT TAC AAA LTH AAA CTT GAA GAG GAA GCA ATT TAC ACA GAT GTA TTH ACA 2100
673  L V I I E T K G S V K Y K L K L E E R I Y T D V L T 700
2101  GGA GAA GAA ATT AAA AAA GAT GTA CAG ATT AAT GAG CTA CCT AAG ATA CTA GTT AGA ATG TAA 2163
701  R E E I K K E V Q J W E L P R J L V R H * 721

```

그림 19. Nucleotide and deduced amino acid sequence of maltotigosyltrehalose synthase (SaMTS) from hyperthermophilic microorganism, *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49462). The nucleotide sequence of SaMTS shows 99.8% homology with that of *S. acidocaldarius* ATCC 33909 (GenBank accession D83245), and 64.3% with that of *S. solfataricus* KM1 (GenBank accession D64128).

```

1 ATG TTT TCG TTC GGT GGA AAT ATT GAA AAA AAT AAA GGT ATC TTT AAG TTA TGG GCA CTT TAT GTT AAT AGT GTT AAG CTG AAG 54
: N P S P G D N I E K H K E I P K L M A P Y V H S V K L K 28
85 TTA AGC AAA AAA CTT ATT CCA ATG GAA AAA AAC GAT GAG GGA YTT TTC GAA GTA GAA ATA GAC GAT ATC GAG GAA AAT TTA ACC 158
29 L S K K L I P H E K N D P G F F E V E I D D I E E H L Y 56
169 TAT TCT TAT ATT ATA GAA GAT AAG AGA GAG ATA CCT GAT CCC GCA TCA CBA TAT CAA CCT TTA GGA GTT CAT GAC AAA TCA CAA 252
57 Y S V T I E D E R E I P D P A S N Y G P L G V H D K S D 84
263 CTT ATA GGA ACA GAT TAT CAG ATT CTT GAC CTT GGA AAA GTA AAA ATA GAA GAT CTA ATA ATA TAT GAA CTC CAC GTT GGT ACT 336
85 L I R T D V Q I L D L G R V K I E D L I T I Y E L H V G T 112
337 TTT TTC CAA GAA GGA AAT TTC AAA GGA GTA ATA GAA AAG TTA GAT TAC CTC AAG GAT CTA GGA ATC ACA GGA ATT GAA CTG ATG 420
113 F S Q E S W F K D V I E K L D V L K D L G B T T B T I E L H 140
421 CCT GTG GCA CAA TTT CCA GAA AAT ADA GAT TGG GGA TAC GAT GGT GTT TTT CTA TAC GCA GTT CAA AAT ACT TAT GGC GGA CCA 504
141 P V A Q F P G N R D W G Y D G V P L Y A V Q M T Y H G P 168
505 TGG GAA TTG GCT AAG CTA GTA AAC GAG GCA CAT AAA AGG GGA ATA GCC GTA ATT TGG GAT GTT GTA TAT AAT CAT ATA GGT CCT 588
169 M E L A K L V H E A H K R D I A V I L D V Y V M H I S P 196
589 GAG GGA AAT TAC CTT TTA GGA TTA GGT CCT TAT TTT TCA GAC AGA TAT AAA ACT CCA TGG GGA TTA ACA TTT AAT TTT GAT GAT 672
197 E G W V L L G L G L O P V F S D R Y K T P M G L T P N F D D 224
673 AAG GGA TGT GAT CAA GTT AGA AAA TTC ATT TTA GAA AAT GTC GAG TAT TGG TTT AAG ACC TTT AAA ATC GAT GGT CTG AGA CTG 756
225 R G C D Q V R K F I L E W V E Y H P E Y F E I D G L R L 252
757 GAT GCA GTT CAT GCA ATT TTT GAT AAT TCG CTT AAG CAT ATC CTC CAA GAG ATA GCT GAA AAA GCG CAT CAA TTA GGA AAA TTT 840
263 D A V H A I J P D M S P K N I L Q E I A E K A M Q L R K F 280
841 GTT ATT CTT GAA AAT GAT TTA AAT GAT CCA AAA ATA GTA AAA GAT GAT TGT GGA TAT AAA ATA GAT GCT CAA TGG GTT CAC GAT 924
281 V I A E S D L H D F K T V E D D C O Y E I D A Q W V D D 308
925 TTC CAC CAC GCA GTT CAT GCA TTC ATA ACA AAA GAA GAT TAT TAC CAG GAT TTT GGA AGG ATA GAA GAT ATA GAG AAA 1008
309 F N H A V H A F I T R E E K D Y V D D F G R I E D I E E 336
1009 ACT TTT AAA GAT GTT TTT GTT TAT GAT GGA AAG TAT TCT AGA TAC AGA GAA ACT CAY GGT CCT GTA GAT GAT CTT CCA 1092
337 T F K D V F V F V D B K Y S R Y R S K T H Q A F V B D L P 364
1093 CCA GGT AAA TTT GTA GTC TTC ATA CAA AAT CAC GAT CAA GTA GGA AAT AGA GAA AAT GGG GGA AGA CTT TTC ATA TTA AAC GAT 1176
365 P R K F V F V F I Q N H D G V G N R O N G E R L S I L T D 392
1177 AAA AGC ACA TCT CTT ATG GCA GCC ACA CTA TAT ATA CTC TCA CCG TAT ATA CCG CTA ATA TTT ATG GCG GAG GAA TAT TAT GAG 1260
393 K T T Y L H A A T L Y I L S P V I P L I P N G E E Y Y E 420
1261 ACC AAT CCT TTT TTC TTC TCT GAT TTC TCA AAG CCC GTA TTA ATT AAG GGT GTT AGA GAA GGT AGA CTA AAG GAA AAT AAT 1344
421 T K P F F F P S D P S D P V L I K G V R E S R L K E N H 448
1345 CAA ATG ATA GAT CCA CAA TCT GAG GAA GCG TTC TTA AAG AAT AAA CTT TCA TGG AAA ATT GAT GAG GAA GTT TTA GAT TAT TAT 1428
449 Q H I D P Q S E E A F L E S K L S W K I D E E V L D Y Y 476
1429 AAA CAA CTG ATA AAT ATC AGA AAG AGA TAT AAT AAT TGT AAA AGG GTA AAG GAA GTT AAG AGA GAA GCG AAC TGT ATT ACT TGG 1512
477 K D L I M I R K R Y M K C K R V K E V R R E G W C I T L 504
1513 ATC ATG GAA AAA ATA GGA ATA ATT GCA TCG TTT GAT GAT ATT GTA ATT TCT AAA ATT ACA GGT AAT TTA CTT ATA GGC ATA 1596
505 I H E K I B I J A S F D D I V I N S K I T B H L L I G I 532
1597 GAA TTT CCG AAA AAA TTG AAA AAA GAT GAA TTA ATT AAG GTT AAC AGA GGT GTT GCG GTA TAT CAA TTA GAA TGA 1671
533 S F P K K L K K D E L I K V N R G V G V Y Q L E 557

```

그림 20. Nucleotide and deduced amino acid sequences of maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (SaMTH) from hyperthermophilic microorganism, *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC 49462). The nucleotide sequence of SaMTH shows 99.9% homology with that of *S. acidocaldarius* ATCC 33909 (GenBank accession D83245), and 66.4% homology with that of *S. solfataricus* KM1 (GenBank accession D64130).

나. 내열성 trehalose 생합성 효소 유전자의 융합

두 개의 연속적인 반응을 이행하는 융합단백질의 이점을 이용하기 위해서 SaMTS 와 SaMTH 유전자를 융합하여 SaMTSH 융합단백질을 제조하였다. 그림 21는 SaMTS 및 SaMTH 유전자를 PCR 및 유전자 재조합 기술을 이용하여 하나의 SaMTSH 융합 유전자를 제조하는 과정을 나타낸 것이다. 본 연구에서 제조한 내열성 trehalose 생합성효소 융합유전자의 구조유전자 부분은 3,831bp이며, 두 개의 효소 단백질이 융합된 형태로 암호화하고 있다. 융합유전자의 첫번째 유전자 부위는 SaMTS 유전자 부분이고, 두번째 유전자 부위는 SaMTH 유전자이다. 이로부터 번역되는 융합효소단백질은 말토올리고실trehalose 합성가수분해효소(SaMTSH)이며, 아미노산 1,277개로 구성된 약 150kDa의 분자량을 갖는 융합효소단백질이다.

다. 대장균에서의 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 유전자의 발현 및 순수분리

분리한 유전자로부터 번역되는 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 융합유전자를 이용하여 trehalose 를 합성할 수 있는지 확인하기 위하여 각각의 유전자를 대장균에서 발현시키고, 발현된 각각의 효소단백질을 순수 분리한 후 trehalose 합성능을 검정하였다. 각각의 구조유전자부분을 분리하고 대장균에서의 발현벡터인 pRSET 플라스미드에 삽입하였다. 이렇게 제조된 각각의 재조합 플라스미드로 대장균 BL21을 형질전환시키고, 12시간 배양한 후, IPTG 를 최종농도 1mM이 되도록 첨가하고 4시간 더 배양하여 각각의 효소단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 각각의 효소단백질은 Ni²⁺-NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리하였다. SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 유전자를 포함하는 pRSaMTS, pRSaMTH 및 pRSaMTSH 플라스미드를 대장균에서 유도 발현시킨 경우, SaMTS,

SaMTH 및 SaMTSH 효소는 특이적으로 다량 발현되었으며 발현된 각각의 효소단백질은 Ni²⁺-NTA-agarose 흡착 겔 크로마토그래피를 이용하여 98% 이상 순수 분리하였다.

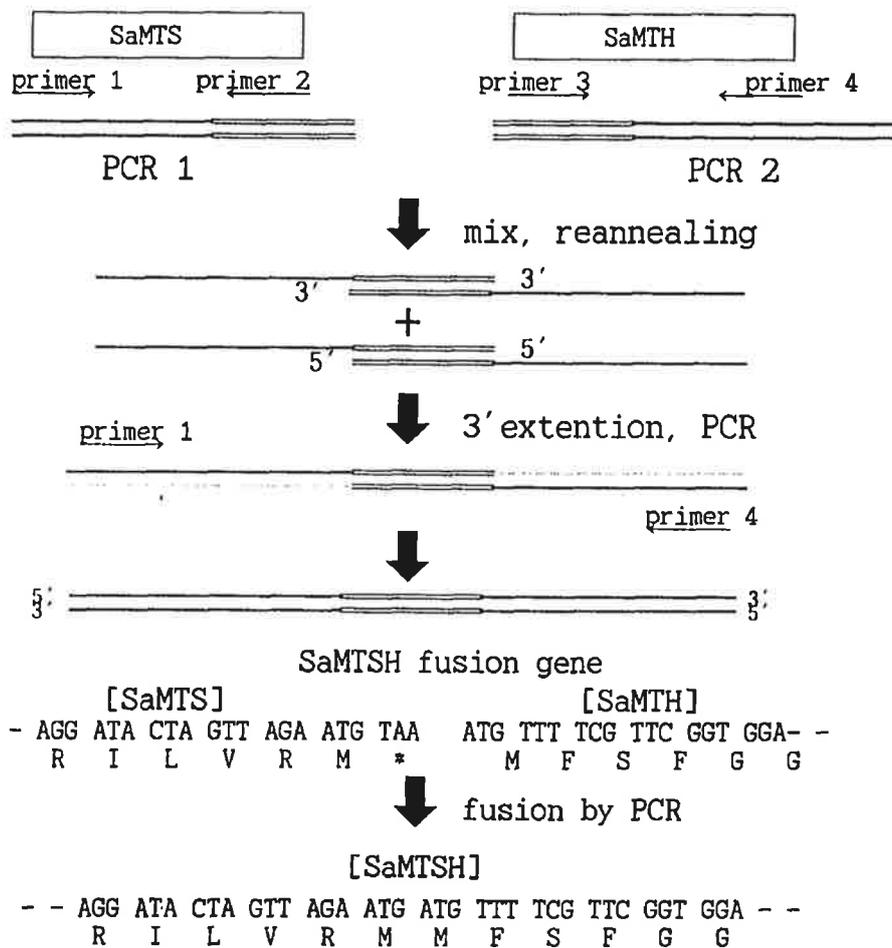


그림 21. Strategy for the cloning of a SaMTSH fusion gene through two step PCR and DNA sequence of the fused region of SaMTH and SaMTS.

라. SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 효소단백질을 이용한 trehalose 합성

순수 분리한 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 효소단백질의 trehalose 합성 농도를 알아보기 위하여 말토펜타오스 (maltopentaose, G5)를 기질로하여 trehalose 합성실험을 실시하였다. 반응조건은 20mM McIlvaine 완충용액 (pH 5.5) 조건하에서 말토펜타오스를 5mM의 농도로 첨가하고 각각 1 pmole의 순수분리한 효소를 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 70℃에서 1시간 반응시키고, 100℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다.

그림 22는 말토펜타오스를 기질로 사용하고 SaMTS, SaMTH 및 SaMTSH 효소단백질을 처리하여 trehalose 합성을 실시한 후 합성된 trehalose를 HPIC 방법에 의해 확인한 결과이다.

그림 22의 A는 기준물질로서 글루코스 (glucose, G1), 말토스 (maltose, G2), trehalose (trehalose, T), 말토티리오스 (maltotriose, G3), 말토테트라오스 (maltotetraose, G4), 말토펜타오스 (maltopentaose, G5) 이다. 그림 22의 B는 plasmid를 포함하지 않는 대장균 BL21 의 전체 단백질 추출물을 이용하여 말토펜타오스와 반응한 것으로, 말토펜타오스는 전혀 다른 형태로 전환되지 않았음을 알 수 있다. 그림 22의 C는 말토펜타오스에 SaMTS 와 SaMTH 를 모두 반응시킨 후 HPIC 방법에 의해 분석한 결과이다. 그림 22의 C에서 보듯이 말토펜타오스는 trehalose 와 말토티리오스 (maltotriose, G3) 로 전환됨을 알 수 있었다. 그림 22의 D는 말토펜타오스에 SaMTSH 융합효소와 반응시킨 후 HPIC 방법에 의해 분석한 결과이다. 그림 22의 D에서 보듯이 말토펜타오스는 trehalose 와 말토티리오스 (maltotriose, G3) 로 전환됨을 알 수 있었고, 따라서 두 개의 연속적인 반응을 이행하는 하나의 융합단백질로서 작용함을 확인하였다.

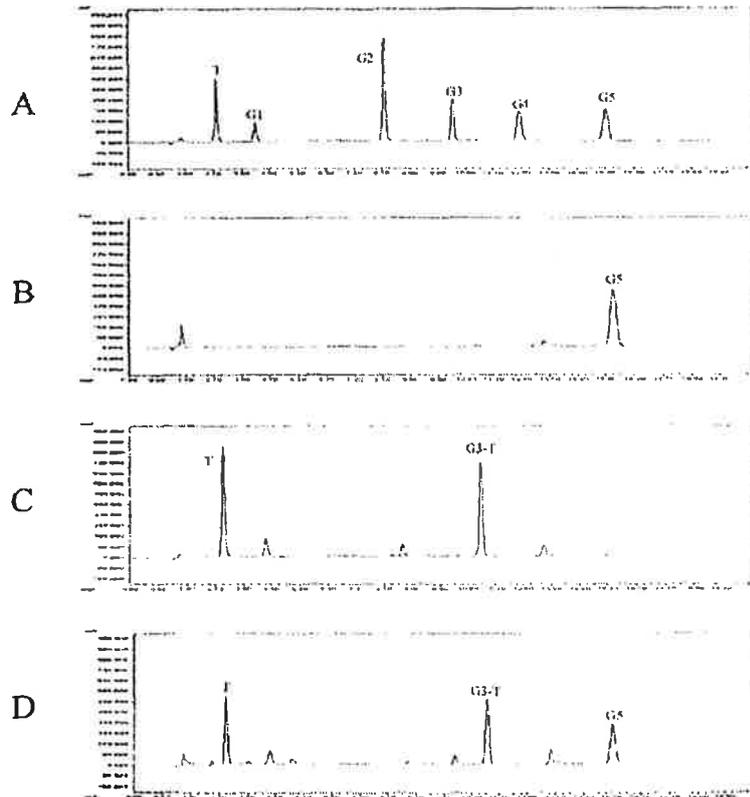


그림 22. HPIC analysis of reaction products obtained from maltopentaose through the enzyme activity of recombinant SaMTS, SaMTH, and SaMTSH. (A) HPIC chromatogram of standard carbohydrates. G5, G3, G3T, G2, G1, and T denote maltopentaose, maltotriose, maltotriosyltrehalose, maltose, glucose, and trehalose, respectively. A 5 mM of maltopentaose was incubated at 70°C for 30 min with *E. coli* BL21 total protein extract (B), 1 pmole of each recombinant enzymes, SaMTS and SaMTH (C), SaMTSH fusion enzyme (D).

마. 전분으로부터의 trehalose 합성

전분을 기질로 이용하여 trehalose를 합성할 수 있는지 알아보기 위하여 수용성 전분(soluble starch)을 기질로 사용하고 반응시간을 24시간까지 연장하였다. 반응조건은 20mM McIlvaine 완충용액 (pH 5.5) 조건하에서 1% 수용성 전분을 기질로 첨가하고 순수분리한 SaMTS/SaMTH 혼합효소와 SaMTSH 융합효소를 각각 1 pmole을 첨가하여 전체 반응부피를 100ul로 하였다. 이를 70℃에서 24시간까지 반응시키고, 100℃에서 10분동안 처리하여 반응을 종결하였다. 그림 23A 는 SaMTS/SaMTH 혼합효소와 전분을 24시간 반응 후 반응물을 HPIC 방법에 의해 합성된 trehalose를 확인하고 합성된 trehalose의 양을 정량한 결과이고, 그림 23B 는 SaMTSH 융합효소와 전분을 24시간 반응 후 반응물을 HPIC 방법에 의해 합성된 trehalose를 확인하고 합성된 trehalose의 양을 정량한 결과이다. 그림 23A 에서 보듯이 24시간 반응 후에 전분의 약 18.1% 가 trehalose로 전환되었음을 확인하였으며, 융합효소를 사용하여 반응한 경우 약 15.9% 가 trehalose로 전환되었음을 확인하였다. 이 경우에는 알파-아밀라제 등 다른 효소는 처리하지 않았으므로 trehalose로의 전환이 적었던 것으로 추정된다. 따라서 내열성 융합효소를 이용하여 전분으로부터 trehalose를 대량 생산할 수 있는 가능성을 제시한다.

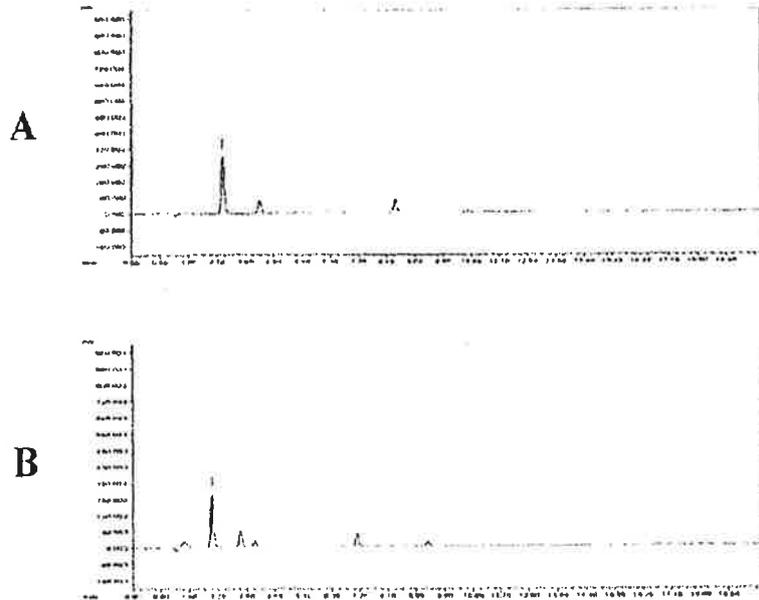


그림 23. Trehalose production from starch by SaMTS, SaMTH, and SaMTSH.

Soluble starch (1% solution) was incubated with 1 pmole of each crude SaMTS and SaMTH mixture (A), and SaMTSH fusion enzyme (B) at 70 °C for 24 h. The reaction products were analyzed through HPIC.

7. 참고문헌

- Charbonnier, F., P. Forterre, G. Erauso and D. Prieur. 1995. Purification of plasmids from thermophilic and hyperthermophilic archaea. In: *Archaea, A Laboratory manual. Thermophiles.* pp87-90. CSH laboratory Press.
- Crowe, J. H. and L. M. Crowe. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* 223: 701-703.
- Elbein, A. 1974. The metabolism of α, α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 227-256.
- Eleutherio, E. C. A., P. S. Araujo and A. D. Panek. 1993. Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* 30: 591-596.
- Isabella, D. L., A. Morana, A. Ottombrino, S. Fusco, M. Rossi and M. Rosa. 1998. Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch. *Extremophiles* 2: 409-416
- Kassen, I., J. McDougall and A.-R. Strom. 1994. Analysis of the *otsA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology for the *otsA* and *otsB* proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* 145: 9-15.
- Kidd, G. and J. Devorak. 1994. Trehalose is a sweet target for agrobiotech. *Biotechnology* 12: 1328-1329.
- Kitamoto, Y., H. Akashi, H. Tanaka and N. Mori. 1988. α

-Glucose-1-phosphate formation by a novel trehalose phosphorylase from *Flammulina velutipes*. *FEMS Microbiol. Letters* 55: 147-150.

Kizawa, H., K. Miyagawa and Y. Sugiyama. 1995. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Micrococcus varians*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(10): 1908-1912.

Kobayashi, K., M. Kato, Y. Mirua, M. Kettoku, T. Komeda and A. Iwamatsu. 1996a. Gene analysis of trehalose-producing enzymes from hyperthermophilic archaea in *Sulfolobales*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1720-1723

Kobayashi, K., M. Kato, Y. Mirua, M. Kettoku, T. Komeda and A. Iwamatsu. 1996b. Gene cloning and expression of new trehalose-producing enzymes from hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1882-1885

Maruta, K., T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1995. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(10): 1829-1834.

Nakada, T., K. Maruta, K. Tsusaki, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1995a. Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(12): 2210-2214.

Nakada, T., K. Maruta, H. Mitsuzumi, M. Kubota, H. Chaen, T.

Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1995b. Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(12): 2215-2218

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. *A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Streeter, J. 1985. Accumulation of α, α -trehalose by rhizobium bacteria and bacterioids. *J. Bacteriol.* 164: 78-84.

8. 연구성과

가. 학회 발표 : 8 건

Lim, Jae-Yun, Sung Soon Park, Jong Tae Song, Jae Sung Lee, Heun Uk Kim and Yang Do Choi. Molecular characterization of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase gene from *Brassica campestris* ssp *pekinensis*. in: '96 Agricultural Biotechnology Symposium on the Biopesticides for Crop Protection.

Jae Sung Lee, Sung Soon Park, Chung Ho Kim and Yang Do Choi. Molecular cloning of a gene for trehalose-6-phosphate synthase from *Escherichia coli* and its expression. in: '96 Proc. Mol. Biol. & Genet.

Seo Hak Soo, Chae Keun, Lim Jae-Yoon, Kim Chung Ho, Kim Ju Kon,

Lee Jong Seob and Choi Yang Do. Characterization of a bifunctional fusion enzyme between trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. in: '98 Proc. Mol. Biol. & Genet.

Kim Yonghwan, Kwon Taekeun, Choi Yangdo, Kim Jukon and Kim Chungho. Molecular cloning and characterization of maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase genes from *Brevibacterium helvolum*. in: '98 Proc. Mol. Biol. & Genet.

Kim Yong Hwan, Chung Ho Kim, Ju Kon Kim, Jong Seob Lee and Yang Do Choi. Production and Characterization of Maltooligosyltrehalose synthase-trehalohydrolase Bifunctional Fusion Enzyme. in: '99 Agricultural Biotechnology Symposium

Kim Yong Hwan, Chung Ho Kim, Ju Kon Kim, Jong Seob Lee and Yang Do Choi. Characterization of Maltooligosyltrehalose synthase/trehalohydrolase Bifunctional Fusion Enzyme. in: '99 Proc. Mol. Biol. & Genet.

Kim Yong Hwan, Chung Ho Kim, Ju Kon Kim, Jong Seob Lee and Yang Do Choi. Construction and Characterization of Maltooligosyltrehalose synthase-trehalohydrolase Bifunctional Fusion Enzyme. in: '99 한국 농화학회 추계학술발표회

Seo, Ju Seok, Chun Kyun Jung, Sung Soon Park, Yang Do Choi, Ju Kon Kim and Chung Ho Kim, Trehalose synthesis by Bifunctional Fusion Enzyme between Maltooligosyltrehalose synthase and Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase of *Sulfolobus acidocaldarius*. in: 2000 Proceedings of the Commemorative International Symposium for the 40th Aniversary of KSACB

나. GenBank database 에 유전자 염기서열 등록 : 1 건

Title : Maltooligosyltrehalose synthase/trehalohydrolase encode proteins for trehalose production in *Brevibacterium helvolum*

Definition : *Brevibacterium helvolum* maltooligosyltrehalose synthase (BTREY) and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (BTREZ) genes

GenBank database accession number : AF039919.

다. 특허출원 2건

명 칭 : 신규한 트레할로스 생합성효소유전자 및 이를 이용한 트레할로스의 생산방법

출원번호 : 98-20710

출원일자 : 1998, 6, 3

명 칭 : 신규한 트레할로스 생합성효소 융합유전자와 융합효소단백질
및 이를 이용한 트레할로스의 생산방법
출원번호 : 10-1999-0028783
출원일자 : 1999, 7, 15

제 3 장 한발 저항성 유전자 벼 형질전환

제1절 서 설

Trehalose는 세포에게 탁월한 건조 저항성을 부여하는 것으로 알려져 있고, 식물 혹은 미생물 등에서 trehalose 생합성 관련 효소 유전자를 분리한 후 유전자 이식 발현에 의해 trehalose 의 발현 수준을 높이면 가뭄에 대한 작물의 내성이 증가할 것으로 기대하고 하고 있다 (Kidd and Devorak, 1994). 또한 trehalose 는 건조 과정에서 단백질과 세포막의 인지질과 수소 결합을 하여 세포 구조를 그대로 유지하게 해 주며 식품의 경우 고유의 풍미, 색상, 질감 등을 유지할 수 있게 한다 (Crowe et al., 1984). 따라서 건조 식품의 경우 색과 풍미를 보존하는 식품 첨가제로서 이용할 수 있을 뿐만 아니라 가용 수분을 감소 시킴으로서 식품의 저장성을 향상시킬 수 있기도 하다 (Kidd and Devorak, 1994). Trehalose 는 UDP-glucose 와 glucose- 6-phosphate 가 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 에 의해 축합되어 trehalose-6-phosphate 가 생기고 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) 의 작용으로 trehalose 가 생기는 경로가 대장균과 효모를 중심으로 가장 많이 연구가 되었다.

본 연구에서는 대장균 Trehalose-6-phosphate synthase (TPS)와 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP)를 fusion시킨 trehalose-6-phosphate synthase-phosphatase (TPSP)유전자를 대장균에서 발현시킨 결과 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 유전자만 발현시킨 것에

비해 대장균 내에 trehalose 축적량이 30배 이상 훨씬 높은 것으로 밝혀졌다. 따라서 trehalose-6-phosphate synthase-phosphatase (TPSP) 유전자를 이용, 운반체를 제작, 형질전환을 수행하였다.

식물은 가뭄, 냉해, 빛, 상처등의 환경적 stress들을 직접 받게된다. 이때, 식물은 stress에 적응하거나 또는 stress에 관계된 유전자들을 발현하게 된다. 이러한 여러 stress가 왔을 때 식물체내 식물호르몬 abscisic Acid(ABA) 농도증가가 수반되고 ABA증가에 따라 ABA유도 단백질들의 발현이 대폭 증가하게 된다. 이때, 이런 ABA 호르몬에 의해 여러 유전자들이 유도될 수 있는 것은 유도되는 유전자들의 프로모터 내에 ABA-responsive complex (ABRC)로 불리는 cis-acting element가 관여하는 것으로 알려져 있다. ABA에 의해 유도되는 유전자 중 HVA22라 불리는 보리 유래의 유전자는 프로모터 내에 ABRC를 갖고 있으며 이것은 그 유전자의 Intron과 함께 보리 aleurone세포를 이용한 transient expression실험에서 ABA 처리시 유전자 발현을 130배 증가시키는 것으로 보고 되었다(Shen and Ho, 1995, Plant Cell 7, 295-307). 본 연구에서는 HVA22 promoter내 ABRC와 actin promoter 의 basal region 그리고 HVA22 intron을 연결한 hybrid promoter를 이용, 한발저항성 fusion 유전자(trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase gene)에 연결한 운반체 제작을 완료하였다. 또한 위 hybrid promoter가 형질전환 벼 식물체내에서 목표로 하는 ABA유도성 및 조직특이성의 변화를 주는지 여부를 확인하기 위하여 동일한 프로모터를 GFP에 연결 promoter기능검색 실험을 병행하였다. 또한 벼종자에서 높은 수준으로 유전자 발현을 유도하는 것으로 본 연구진에 의해 자체개발 된 Sbel(starch branching enzyme) 프로모터에 TPSP fusion 유전자를 연결하여 형질전환 벼 종자 내에 높은 수준으로 trehalose가 축적될 것으로 기대되며, TPSP fusion

유전자를 *Arabidopsis* Sen1 프로모터에 연결하여 형질전환 벼 식물이 건조를 포함한 각종 stress를 받았을 경우 벼 잎 조직에서 높은 수준으로 유도, 발현될 것으로 기대되는 운반체를 각각 제작하여 *Agrobacterium*내로 도입하였고 이중 먼저 수행된 pSB109-TPSP와 pSB109-GFP 형질전환체의 도입유전자 확인 및 발현분석을 완료하였다.

형질전환된 pSB109-TPSP와 pSB109-GFP 형질전환체의 TPSP 도입유전자를 확인하였고, 도입유전자 확인 및 발현분석을 실시한 pSB109-TPSP와 pSB109-GFP 형질전환체의 전체적 발현분석 및 pSB109-TPSP와 pSB109-GFP 형질전환체로부터 채종한 R1세대를 현재 온실에서 생육중에 있다. 항시발현 프로모터(*Ubi 1*)에 TPSP가 연결된 pSB-UTPSP, 벼의 seed에서 높은 수준으로 발현시키는 *Sbe1* 프로모터에 TPSP가 연결된 pSB-SbTPSP, 식물이 stress를 받았을 경우 벼 잎 조직에서 높은 수준으로 유도, 발현되는 *Arabidopsis* Sen1 프로모터에 TPSP가 연결된 pSB-SaTPSP 운반체를 벼에 형질전환하여 R0세대를 온실에서 생육중에 있다. 현재까지 49개체의 형질전환체를 확보, 제초제 저항성 검증 실시하였고, 성숙된 벼 형질전환체의 벼 잎으로부터 genomic DNA 및 RNA를 분리하여 Southern 분석을 통하여 도입 유전자(TPSP)를 확인하였고 Northern 분석을 통하여 전사단계에서의 TPSP 유전자의 발현을 확인하였으며 벼 잎 조직 및 종자에서 당분석을 실시하여 높은 수준의 trehalose가 축적됨을 확인하였다.

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작

분리한 대장균의 trehalose 6-phosphate synthase (TPS, *otsA*) 와 phosphatase (TPP, *otsB*) 유전자의 ORF를 fusion한 TPSP 유전자 (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene)를 벼에 형질전환하기 위한 운반체를 제작하였다. 벼 형질전환을 위한 운반체는 Super binary vector system을 이용하였고 모체가 되는 plasmid는 pSB11으로서 right border (BR)와 left border (BL) sequence내에는 selectable marker로써 제초제 저항성 유전자인 bar gene이 CaMV 35S promoter와 NOS (nopaline synthase) terminator에 연결되어 있다. TPSP 유전자는 PINII(protease inhibitor II) terminator를 함유하고 있으며 다양한 promoter를 연결하여 운반체를 제작하였다. 항시발현 프로모터(*Ubi 1*)에 TPSP가 연결된 pSB-UTPSP, 벼의 seed에서 높은 수준으로 발현시키는 *Sbel* 프로모터에 TPSP가 연결된 pSB-SbTPSP, 식물 호르몬인 ABA에 의해 유도되는 프로모터에 TPSP가 연결된 pSB-109TPSP, 식물이 stress를 받았을 경우 벼 잎 조직에서 높은 수준으로 유도, 발현되는 *Arabidopsis* Sen1 프로모터에 TPSP가 연결된 pSB-SaTPSP등을 제작하여 벼 형질전환에 이용하였다.

2. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입 및 확인

가. Triparental mating 방법

벼 형질전환용 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입은 intermediate vector (pSB11)를 가지고 있는 *E. coli* DH5 α 와 acceptor vector(pSB1)를 가지고 있는 *Agrobacterium* LBA4404사이에 conjugal strain인

E. coli HB101 (pRK2013)을 통해 운반체를 전달하는 triparental mating 방법으로 수행하였다.

Triparental mating에 앞서 각각의 균주를 양호한 상태로 사용하기 위해 DH5 α (pSBG700)를 LB + spectinomycin 50ug/ml(LBS) 고체배지, HB101(pRK2013)을 LB + kanamycin 50ug/ml(LBK) 고체배지에 각각 도말하여 37°C 배양기에서 하룻동안 배양하였고 LBA4404(pSB1)는 AB + tetracyclin 10ug/ml(ABT)고체배지에 도말한후 28°C 배양기에서 3일 동안 배양하였다. Triparental mating을 위해 nutrient agar고체배지에 맨 먼저 LBA4404(pSB1)를 도말하고 그 위에 HB101(pRK2013)을 도말한후 마지막으로 DH5 α (pSBG700)를 도말 하여 세 균주를 잘섞어준 다음 28°C 배양기에서 하룻동안 배양하였다. 그후 섞여있는 세 가지 균주를 AB + spectinomycin 50ug/ml + tetracyclin 10ug/ml(ABST) 액체배지 400ul에 녹인 후 ABST고체배지에 도말 하고 28°C배양기에서 3일 동안 배양한 후 배지 위에 형성된 단일 콜로니를 새로운 ABST고체배지에 옮겨주었다. 두번 계대배양후 최종적으로 형성된 단일 콜로니 8개를 확보하고 핵형 질전환용 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입후 co-integration을 확인하는 실험을 실시하였다.

나. Co-integration된 플라스미드 DNA 분리

Plasmid DNA의 분리를 위해 빠르고 손쉬운 mini-prep방법을 사용하였다 (Li et al. 1995). ABST 고체배지에서 배양중인 단일콜로니를 취해 YEP + spectinomycin 50ug/ml + tetracyclin 10ug/ml(YEPST) 액체배지 5 ml에 접종한 후 28°C, 200 rpm으로 2일 동안 진탕 배양하였다. 그 후 4°C 4000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 통해 세포 덩어리를 얻은 다음 세포용해를 위해 Sol'n I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0,

10mM EDTA) 200ul와 10mg/ml lysozyme 20ul를 넣고 용해시켰다. Sol'n II (0.2N NaOH, 1% SDS) 400ul를 첨가하고 잘 섞어준 다음 얼음에서 15분 동안 반응시킨 후 Sol'n III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, H₂O 28.5ml) 300ul 넣고 섞은 후 얼음에서 30분 동안 두었다. 4℃, 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 약 700ul의 상등 액을 취한 다음 페놀용액(pH 8.0) 400ul를 첨가하여 2분간 섞어주고 chloroform : isoamylalcohol(24:1)을 동량 넣어준 후 2분간 더 섞어주고 위와 동일한 조건에서 원심분리를 실시하여 상등 액을 500ul 취하였다. -20℃에 보관중인 isopropanol을 500ul 첨가하고 -20℃ 냉동실에 1시간 동안 DNA를 침전시킨 다음 14,000 rpm으로 10분간 원심분리를 통해 DNA를 얻어낸 후 TE (pH8.0) 용액 60 ul에 녹였다.

다. Co-integration된 플라스미드 DNA의 제한효소 절단확인

Agrobacterium 내에서 co-integration된 운반체의 확인을 위해, 분리해낸 플라스미드 DNA를 제한효소 Sal I 으로 절단한 후 비교 분석하였다. 대조구로는 pSB1을 따로 분리하여 제한효소 Sal I으로 절단한 것을 사용하였다. Sal I으로 절단된 pSB1과 cointegrate에서 생성되는 DNA 단편을 비교하므로써 두 플라스미드가 *Agrobacterium* 내에서 cointegration되었음을 증명하였다. 이때 cointegrate된 운반체에서는 5.3kb band가 사라지고 7.3kb와 3.1kb band가 새로 생김을 확인함으로써 제작 운반체의 *Agrobacterium* 내로의 도입을 확인하였다.

3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환

본 연구의 수행시 사용한 벼 형질전환 배양배지의 종류 및 조성은 표 1에 명시하였다.

표 1. Media for rice transformation.

Medium	Composition
AAM	AA salts and amino acids, MS vitamins, 500 mg/L casamino acids, 68.5 g/L sucrose, 36 g/L glucose, 100 uM acetosyringone, pH 5.2
N6-7-CP	N6 major salts, N6 minor salts, N6 vitamins, 2 g/L casamino acids, 20 g/L sucrose, 30 g/L sorbitol, 1 mg/L, 2,4-D, 0.5 mg/L 6-benzyladenine, 7 mg/L phosphinotricin, 250 mg/L cefotaxime, 2 g/L Gelrite, pH 5.8
MS-CP	MS salts, MS vitamins, 100 g/L myo-inositol, 30 g/L sucrose, 1 mg/L NAA, 2 mg/L Kinetin, 3g/L Gelrite, pH 5.8
2N6	N6 major salts, N6 minor salts, N6 vitamins, 1 g/L casamino acids, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L Gelrite, pH 5.8
2N6-AS	2N6 medium plus 10 g/L glucose and 100 uM acetosyringone, pH 5.2
2N6-CP	2N6 medium plus 250 mg/L cefotaxime and 7 mg/L phosphinotricin, pH 5.8

가. 캘러스 준비

*Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환에 필요한 재료로서는 scutellum으로부터 유기된 캘러스가 가장 효율적인것으로 알려져 있다 (Hiei et al, 1994). 따라서 scutellum으로부터 캘러스를 유기하기 위하여 벼 품종으로는 낙동벼(*Oryza sativa*, cv Nakdongbyo)를 사용하였다. 형질전환에 앞서 우선 벼 종자로부터 형질전환의 재료인 캘러스를

얻어내기 위해 실험당 약 200개의 종자의 껍질을 벗겨내고 멸균된 삼각플라스크에 담아 70% 에탄올 100ml을 부어 1분간 세게 흔들어 씻어준 후 20% 락스 100ml를 넣고 120rpm의 진탕기 위에서 1시간 소독한 다음 멸균수로 5-6회 씻어내었다. 멸균된 종자를 2N6 캘러스 유기 배지에 치상하고 25℃ 배양기에서 3주간 암배양하였다. 3주후 scutella로부터 유기된 캘러스를 새로운 2N6고체배지로 계대배양하였고 옮긴지 4일된 캘러스가 형질전환에 사용되었다.

나. 균주준비

Co-cultivation시 *Agrobacterium*의 농도는 $3-5 \times 10^9$ cell/ml일때 형질전환이 가장 효율적인 것으로 알려져있다. (Hiei et al, 1994) *Agrobacterium*의 농도가 10^9 cells/ml이 되도록 하기 위해 LBA4404(pSB11)를 10개의 ABST고체배지에 도말한 다음 28℃ 배양기에서 3일 동안 배양한 후 약 스폰으로 잘 긁어모아 모두 취하여 AAM 액체배지 30ml에 녹인 다음 사용하였다. 이는 spectrophotometer로 측정한 결과 0. D₆₀₀에서 1.8-2.0을 나타냈다.

다. Co-cultivation

4일 계대후 왕성하게 분열한 캘러스를 직경 1-2mm 정도의 크기로 자른 뒤 *A. tumefaciens* LBA4404(pSBG700)가 녹아있는 있는 AAM 액체배지에 3분 동안 담근 후 2N6-AS고체배지 한 plate당 50개씩 co-cultivation하여 25℃ 배양기에서 3일 동안 암배양하였다.

라. 1차 선발

3일 동안 co-cultivation한 후 캘러스로부터 *Agrobacterium*을 분리

해 내기 위해 *Agrobacterium* 치사항생제인 cefotaxime(250mg/l)이 들어 있는 멸균수에 담구어 씻어내고 형질전환된 캘러스를 선발하기 위해 2N6-CP 1차선발 고체배지에 옮겨 25℃ 배양기에서 3주 동안 암배양하였다.

마. 2차 선발

1차 선발된 캘러스를 N6-7-CP 2차 선발 고체배지로 옮겨 25℃ 배양기에서 10일 동안 암배양하였다.

바. 재분화

2차 선발 배지에서 하얗고 왕성하게 자란 캘러스 만을 선발하여 재분화 배지인 MS-CP로 옮겨 28℃ 배양실에서 명배양으로 재분화를 유도하였다. 재분화된 벼 식물체는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 주어 1주일간 길이 성장 및 뿌리 성장을 촉진 시켰으며 온실에 옮겨 생육하였다.

4. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정

본 연구에서는 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자를 사용하였기 때문에 일반적인 항생제 저항성 유전자와는 달리 조직배양시 캘러스 수준에서의 선발뿐만 아니라 형질 전환된 식물체 수준에서도 선발할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 실험실에서는 실험실에서 선발되어 재분화된 벼 식물체를 온실에서 약 한 달간 키운 후 제초제 저항성 검정을 실시하였다. 형질 전환된 벼 식물체의 제초제 저항성을 검정하기 위해 시증에서 판매중인 제초제인 Basta용액을 0.5%로 200배 희석하여 사용하였다. 대조구로는 형질 전환시키지 않은 낙동벼를 사용하였

다. 검정하고자 하는 잎의 끝을 하얀 색 물감으로 표시한 다음 0.5% Basta용액을 잎의 전면, 후면에 골고루 바른 후 1주일 뒤에 관찰한 결과 대조구는 잎이 갈색으로 마르고 시든 반면 형질전환체는 아무런 변화를 관찰 할 수 없었고 본래의 초록색 잎을 유지하였다.

5. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석

형질전환 벼 식물체 내에 TPSP 유전자 도입 확인 및 도입된 유전자 수(copy number)를 알아보기 위해 southern 분석을 수행하였다.

가. 벼 genomic DNA의 분리

온실에서 성장중인 벼 식물체로부터 준비한 0.5g의 잎조직을 액체질소에 얼린 다음 막자사발과 봉을 이용하여 마쇄하고 식물 genomic DNA 분리 용액인 DNAzol[®]ES(Molecular Research Center, Inc., DN128)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 마쇄된 벼조직에 guanidine-detergent lysing 용액 1.5 ml을 첨가하고 5분간 상온에서 잘 섞어주었다. Chloroform 1.5ml을 첨가하여 20초간 vortexing하고 12,000g, 10분간 원심분리하여 상등액을 취했다. 상등액에 1.5ml의 에탄올을 첨가하여 genomic DNA의 침전을 유도하고 5,000g로 4분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 genomic DNA pellet만을 얻었다. 멸균수 150ul를 첨가하여 genomic DNA를 녹이고 guanidine-detergent lysing 용액과 에탄올이 1 : 0.75 volume 섞여있는 용액 1.5 ml 첨가하고 5,000g로 4분간 원심분리후 상등액을 제거하였다. 95% 에탄올 1.5ml을 첨가하여 5,000g로 4분간에 genomic DNA를 washing하였다. DNA pellet을 말린다음 8mM NaOH 50 ul 첨가하여 genomic DNA를 녹이고 0.1M HEPES 6ul를 첨가하여 pH를 8.0으로 맞추었다.

나. Genomic Southern-blot

Fluorometer(Hoefer)를 이용하여 genomic DNA를 정량하고 5ug의 genomic DNA를 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 100V로 8시간 전기영동하였다. 전기영동후 아가로스 젤을 0.25 N HCl에 15분간 shaking하여 depurination하고 0.4 N NaOH에 15분간 shaking하여 denaturation하였다. Capillary transfer 방법으로 아가로스젤로부터 Hybond N+ membrane(amersham)에 0.4N NaOH로 12시간 베틀 genomic DNA를 전이하고 membrane을 2X SSC(20X SSC:175.3g NaCl, 88.2g sodium citrate, pH 7.0)에 10분간 중화시켰다. 베틀 genomic DNA가 전이된 membrane을 hybridization 용액 (0.5 M Na₂PO₄, pH 7.2, 1 % Bobine Serum Albumin, 7 % Sodium Dodecyl sulfate, 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 3시간 동안 pre-hybridization시킨 후, 방사선 동위원소로 표지된 TPSP 유전자를 probe로 사용하여 65℃에서 12시간 hybridization 반응하였다. TPSP 유전자에 의해 hybridization된 membrane을 washing 용액 (1차: 2X SSC, 0.1% SDS, 2차: 1X SSC, 0.05% SDS, 3차: 0.5X SSC, 0.05% SDS)을 사용하여 비특이성 결합을 제거하고 -70℃에서 x-ray film으로 감광하여 발현을 관찰하였다.

6. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석

가. Total RNA 의 분리

실험에 사용할 기구는 1회용 튜브 및 팁을 가압 멸균하여 사용하고, 유리 용기 및 막자사발은 200℃ 건열 멸균하고 사용할 모든 시약은 0.1% diethyl pyrocabonate (DEPC)로 처리하여 고압멸균하거나 0.1% DEPC 처리하고 고압멸균한 증류수로 제조하여 사용하였다.

Total RNA의 분리는 Chomczynski와 Sachhi의 acidic phenol 방법에 따라 수행하였다. 약 2-3g의 식물 조직을 액체 질소에 얼린다음 막자사발을 이용하여 마쇄하고 10ml의 추출 완충용액을 (4M guanidinium isothiocyanate, 25mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% sarkosyl)을 첨가

한 후 잘 섞어주었다. 1ml의 sodium acetate pH 4.0을 첨가하고 섞어준 다음 10ml의 물로 포화시킨 phenol을 넣고 잘 섞어준 후 2ml의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 첨가하여 섞어주고 5,000g에서 10분간 원심 분리한 후, 상등액을 취하였다. 동량의 isopropanol을 넣고 잘 섞어준 후, -20℃에서 1시간 이상 방치한 후 4℃에서 10,000g로 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 500 μ l의 DEPC를 처리한 증류수로 침전물을 녹였다. 동량의 4M LiCl을 넣은 후 4℃에서 1시간 이상 방치하고 14,000g에서 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 취한 침전물을 70%의 냉각된 ethyl alcohol로 씻어준 뒤 건조시켰다. 적정량의 DEPC 처리수를 첨가하여 잘 녹여준 뒤, 농도와 순도를 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

나. Northern blot

위에서 분리한 total RNA의 10 μ g을 iodoacetamide (0.084g/100ml)가 함유된 1.2 % 아가로스 겔에 전기영동하고 Southern-blot에서 언급한 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Hybond-N+; Amersham)에 전이시켰다. Membrane의 pre-hybridization, hybridization 및 washing은 위에서 언급한 Southern-blot가 동일한 방법으로 수행하였다.

7. TPSP 유전자 벼 형질전환체의 trehalose 분석 및 정량

TPSP 유전자가 도입된 형질전환 벼의 잎 조직과 종자에 실제로 trehalose가 축적되는 것을 HPIC (high-pH ion chromatography)를 이용하여 분석하였다. 같은 성장 상태에 있는 형질전환 벼 식물체 및 형질전환 되지 않은 벼 식물체로부터 준비한 0.5g의 잎조직 및 종자를 액체 질소에 얼린 다음 막자사발과 봉을 이용하여 마쇄하고 600 μ l의 H₂O에 넣고 1시간 녹인 후 4℃, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 약 300 μ l의 상등액을 취했다. 이중 100 μ l의 상등액을 900 μ l의 H₂O에 희석한

후 0.45 μ m 필터를 이용하여 용출하였고 이를 DX500 HPIC 시스템에서 Carbo-Pak PA1 column을 이용하여 정량하였다. Column으로부터 당의 용출은 150mM NaOH 용액에서 0~250mM NaOAc의 농도기울기를 이용하여 30분간 용출하였으며, 용출되는 당은 ED 40 electrochemical detector로 검정하였다. Trehalose 측정량을 정량하기 위해서 standard로 각각 500ng, 1000ng, 1500ng, 2000ng 들어있는 trehalose를 이용하여 $Y=0.231X + 0.0946$ 식을 얻었다. Trehalose pick가 맞는가를 확인하기 위하여 형질전환 되지 않은 벼의 잎조직에 2000ng의 trehalose를 넣고 분석한 결과 trehalose pick가 2분 24초~48초 사이에 나타나는 것을 확인하였다.

제3절 연구개발 결과

1. 한발저항성 벼 개발을 위한 형질전환용 유전자 운반체

본 연구진에 의해서 대장균 Trehalose-6-phosphate synthase (TPS)와 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP)를 fusion시킨 trehalose-6-phosphate synthase-phosphatase (TPSP) 유전자를 대장균에서 발현시킨 결과 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 유전자만 발현시킨 것에 비해 대장균 내에 trehalose 축적량이 30배 이상 훨씬 높은 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 Trehalose synthase-phosphatase fusion 유전자(TPSP gene)를 한발저항성 벼 개발을 위한 유전자로 이용하였다.

가. 항시 발현 프로모터(Ubi-1)를 이용한 운반체 제작(pSBU-TPSP)

pSBU-TPSP는 Maize ubi-1 프로모터와 Maize Adh1 intron가 연결된 fusion promoter에 대장균으로부터 분리한 TPSP 유전자가 연결되어 있으며 terminator로서는 *PinII* terminator를 사용하였고 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 CaMV 35S 프로모터와 *NOS* terminator에 연결되어 있다 (그림 1A). 이 운반체의 특징은 항시 발현하는 벼 actin 프로모터보다 훨씬 발현이 좋은 Maize ubi-1/ubi1 intron fusion promoter를 함유하고 있기 때문에 외래유전자를 벼 전 조직 및 기관에 골고루 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.

Maize ubi-1/Adh1 intron 프로모터-TPSP 유전자 함유 운반체를 제작하기 위해 TPSP 유전자는 본 연구에서 이미 제작된 pSB109-TPSP로부터 분리하여 제작 완성후, TPSP 유전자 및 Ubi-1 프로모터-TPSP 유전자 연결

부위의 염기서열을 확인 하였다.

나. ABA-유도 프로모터를 이용한 운반체 제작(pSB109-TPSP, pSB109-GFP)

HVA22 promoter내 ABRC와 actin promoter 의 basal region 그리고 HVA22 intron을 연결한 hybrid promoter를 제작, 한발저항성 fusion유전자 (trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase gene)에 연결한 운반체 제작하였다(그림 1B). Actin basal region을 사용한 이유는 HVA22 유전자가 보리종자에서만 발현되기 때문에 조직특이성을 바꿔서 벼의 전 조직에서 발현될 수 있고 특히 가뭄이 왔을 때만 발현이 유도되도록 하기 위함이다. 이렇게 제작된 hybrid promoter가 형질전환 벼 식물체 내에서 목표로 하는 ABA유도성 및 조직특이성의 변화를 주는지 여부를 확인하기 위하여 동일한 프로모터를 sGFP에 연결, pSB109-GFP를 제작, promoter기능검색 실험을 병행하고 있다(그림 1C).

이러한 운반체는 pSBU-TPSP를 포함한 여러 운반체 제작 및 형질전환 실험에 대한 보완연구로서 pSBU-TPSP는 TPSP 유전자가 옥수수 Ubi1 promoter에 연결되어 있으며 형질전환 벼 식물체내 전 조직에서 항시 발현되기 때문에 식물의 생육과 발달에 영향을 줄 수도 있어서 이 경우에 대비하고 또한 필요할 때만(한발이 있을 경우) 도입유전자를 높은 수준으로 발현시킴으로서 항시 발현했을 때와는 달리 식물체 자체의 에너지소비를 줄여 줌으로써 혹시 생길지도 모르는 형질전환 벼의 수량 감소등의 가능성을 줄여 주기 위한 것이다.

다. 종자 특이적 발현 유도 프로모터를 이용한 운반체 제작
(pSB-SbeTPSP)

종자 특이적 발현 유도 프로모터인 벼 Sbe 1 프로모터는 벼의 seed에서 전분을 만드는 starch branching enzyme의 promoter로써 외래유전자를 벼 seed에서 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 프로모터로써 본 연구에서는 이러한 종자 특이적 발현 유도 프로모터를 TPSP유전자에 연결, 벼 형질전환에 사용함으로써 seed에 많은양 축적된 trehalose를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. pSB-SbeTPSP는 rice Sbe1 프로모터에 대장균으로부터 분리한 TPSP 유전자가 연결되어 있으며 terminator로서는 *PinII* terminator를 사용하였고 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 CaMV 35S 프로모터와 *NOS* terminator에 연결되어있다 (그림 1D).

벼 Sbe1 프로모터-TPSP 유전자 함유 운반체를 제작하기 위해 벼 Sbe1 프로모터는 명지대 남 백희 교수 실험실에서 제작된 벼 Sbe1 프로모터가 함유된 pBSBEPRO플라스미드를 확보하여 벼 Sbe1 프로모터를 분리, 이용하였다. 분리된 Sbe 1 프로모터를 TPSP유전자 함유 운반체로 도입하여 pSB-SbeTPSP를 제작하였고 TPSP유전자 및 Sbe-1 프로모터-TPSP유전자 연결부위의 염기서열을 확인 하였다.

라. 노화 및 스트레스 발현 유도 프로모터를 이용한 운반체 제작 (pSB-SaiTPSP)

*Arabidopsis*로부터 분리된 노화 및 스트레스 발현 유도 프로모터인 Sen1 프로모터는 정상적 성장상태의 식물에서는 발현을 유도하지 않고, 식물이 스트레스를 받을 시에만 특이적으로 잎 조직에서 높은 수준으로 발현을 유도하는 프로모터로써 본 연구에서는 이러한 스트레스 발현 유도 프로모터(Sen 1)를 도입함으로써 독성 장애를 보이는 한발 저항성 유전자를 벼 잎 조직에서 높은 수준으로 유도, 발현시킬 수 있을 것으

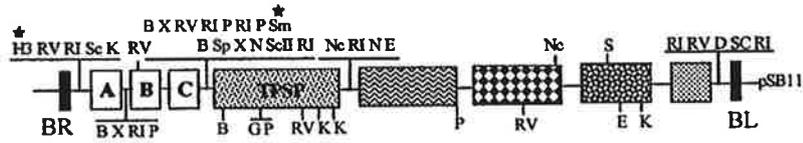
로 기대한다. 일반적으로 쌍자엽의 프로모터가 단자엽 식물에서는 발현 수준이 낮기 때문에 본 연구에서는 쌍자엽인 *Arabidopsis*의 Sen1 프로모터에 단자엽인 벼의 intron부분을 연결시킨 fusion 프로모터를 사용해 TPSP유전자가 높은수준으로 발현될것으로 기대한다. pSB-SaiTPSP는 *Arabidopsis* Sen1 프로모터에 rice Act1 intron이 연결되어 있고 대장균으로부터 분리한 TPSP 유전자가 연결되어 있으며 terminator로서는 *PinII* terminator를 사용하였고 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 CaMV 35S 프로모터와 *NOS* terminator에 연결되어있다.

Arabidopsis Sen1 프로모터-rice Act1 intron-TPSP 유전자 함유 운반체를 제작하기 위해 벼 Sen1 프로모터는 부산대 이 춘환 교수 실험실에서 제작된 *Arabidopsis* Sen1 프로모터가 함유된 pBI-ASRIPdI플라스미드를 확보하여 *Arabidopsis* Sen1 프로모터를 분리, 이용하였다. 분리된 Sen 1 프로모터를 TPSP유전자 함유 운반체로 도입하여 pSB-SaiTPSP를 제작하였고(그림 1E) TPSP유전자 및 Sen-1 프로모터-TPSP유전자 연결부위의 염기서열을 확인하였다. .

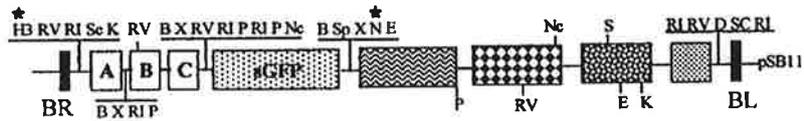
2. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입 및 확인

최종적으로 제작된 한발저항성 유전자(TPSP) 함유 운반체들은 triparental mating 방법에 의해 *Agrobacterium*내로 도입되었고 mini-prep방법에 의해 플라스미드 DNA를 분리했으며 *Agrobacteria*내에서 co-integration된 운반체의 확인을 위해, 분리해낸 플라스미드 DNA를 제한효소 Sal I 으로 절단한 후 pSB1과 cointegrate에서 생성되는 DNA단편을 비교하므로써 cointegration되었음을 증명하였다. 이때 cointegrate에서는 5.3kb band가 사라지고 7.3kb와 3.1kb band의 생성으로 cointegration이 예상대로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

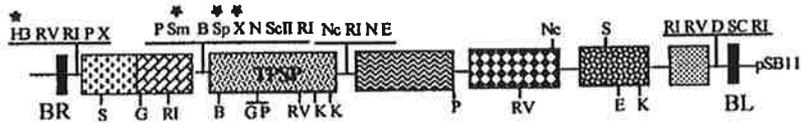
(A) pSB109-TPSP



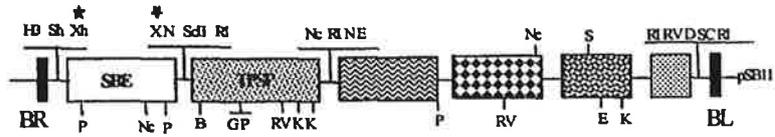
(B) pSB109-GFP



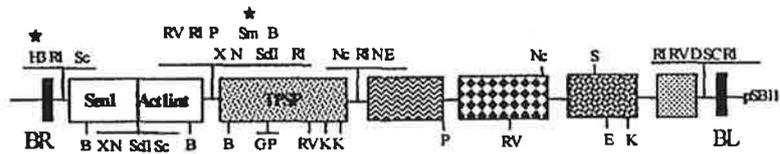
(C) pSB-UTPSP



(D) pSB-SbeTPSP



(E) pSB-SaiTPSP



- | | | | |
|----------------------------|--|-------------------------------|---|
| A | ABRC1 of barley HVAZ2(0.18kb) | B | Rice Act1 basal promoter (0.18kb) |
| C | Intron1-exon2-intron2of barley HVAZ2(0.18kb) | TPSP | <i>E. coli</i> trehalose synthase / phosphatase fusion gene |
| sGFP | sGFP coding(0.7 kb) | Maize ubi-1 promoter (1.0 kb) | |
| Maize ubi-1 intron (1.0kb) | | SenI | Arabidopsis sen1 promoter (2.0 kb) |
| Act1int | Rice Act1 intron (0.5 kb) | SBE | Rice Sbe1 promoter (2.0 kb) |
| 3' <i>PtdI</i> (1.0 kb) | | 35 S promoter (0.74 kb) | |
| 3' NCS (0.59 kb) | bar coding region (0.59 kb) | 3' NCS (0.28 kb) | |

그림 1. 다양한 한발저항성 유전자 함유 운반체

3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환

벼 형질전환은 *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환 방법으로 수행하였다. pSB109-TPSP의 경우는 총 1502개, pSB-UTPSP의 경우는 총 1687개, pSB-SaTPSP의 경우는 총 1732개, pSB-SbTPSP의 경우는 총 1916개, pSB109-GFP의 경우는 총 1822개의 캘러스를 형질전환 시켰다(표 1-1). pSB109-TPSP의 경우 총 1502개의 캘러스중 738개, pSB-UTPSP의 경우는 총 1687개의 캘러스중 826개, pSB-SaTPSP의 경우는 총 1732개 캘러스중 887개, pSB-SbTPSP의 경우는 총 1916개 캘러스중 908개, pSB109-GFP의 경우 총 1822개의 캘러스중 595개의 캘러스를 선발하였는데 이것은 각각 49%, 49%, 51%, 47%, 33%의 1차 선발 결과를 나타내었다. 10일후 1차 선발된 738개(pSB109-TPSP), 826개(pSB-UTPSP), 887개(pSB-SaTPSP), 908개(pSB-SbTPSP), 595개(pSB109-GFP)의 캘러스 중 하얗고 왕성하게 분얼한 328개(pSB109-TPSP), 393개(pSB-UTPSP), 446개(pSB-SaTPSP), 221개(pSB-SbTPSP), 369개(pSB109-GFP)의 캘러스를 선발하였다. 이는 최초 사용된 캘러스에 대해 각각 22%, 23%, 24%, 23%, 20%의 2차 선발결과이다. 2차 선발 배지에서 하얗고 왕성하게 자란 embryogenic 캘러스만을 선발하여 재분화 배지인 MS-CP로 옮겨 28℃ 배양실에서 12시간 간격으로 명배양/암배양으로 재분화를 유도하였다. 1,2차 선발 모두 마친 328개(pSB109-TPSP), 393개(pSB-UTPSP), 417개(pSB-SaTPSP), 446개(pSB-SbTPSP), 369개(pSB109-GFP)의 캘러스가 MS-CP 재분화 배지로 옮겨졌고 재분화가 유도되었다. 재분화는 제조제 성분인 phosphinotricin이 4ug/ml 들어있는 배지에서 실시한 결과 14개(pSB109-TPSP), 3개(pSB-UTPSP), 5개(pSB-SaTPSP), 4개(pSB-SbTPSP), 23개(pSB109-GFP)의 벼가 재분화 되었고 재분화 된 개체는 MS0배지에 옮겨 10일간 배양한 뒤 토양이 있는 용기로 옮겨주었고 2주뒤 온실로

옮겨 생육 중에 있다(표 2).

표2. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice.

Plasmids	Experiments	Co-cultivation	First selection	Second selection	Regeneration
pSB109-TPSP	7	1502	738	328	14
pSB-UTPSP	8	1687	826	393	3
pSB-SaTPSP	8	1732	887	417	5
pSB-SbeTPSP	8	1916	908	446	4
pSB109-GFP	8	1822	595	369	23

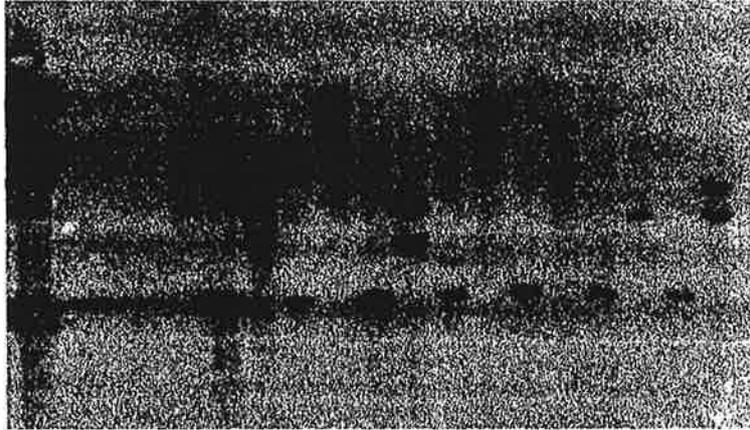
4. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석

형질전환된 벼 식물체 내에 TPSP 유전자와 GFP 유전자의 도입 확인 및 도입된 유전자수(copy number)를 알아보기 위해 southern 분석을 수행하였다. 도입 유전자 확인 및 유전자 수를 알아보기 위한 기본전략으로 ①도입 유전자 확인은 도입 유전자만을 선택적으로 절단할 수 있는 제한효소를 이용하였고 ②도입된 유전자수는 운반체 내에 도입 유전자를 포함하는 단일 절단 부위만을 가지는 효소 자리를 이용하였다. TPSP 유전자의 세포질 발현(pSB109-TPSP)의 경우는 TPSP 유전자 확인을 위하여 벼 genomic DNA를 제한효소 EcoRI으로 절단하였고 도입된 TPSP 유전자의 수의 확인은 제한효소 NcoI을 이용하여 절단하였다. 항시 발현

(pSB-UTPSP)의 경우는 TPSP 유전자 확인을 위하여 벼 genomic DNA를 제한효소 EcoRI으로 절단하였고 도입된 TPSP 유전자의 수의 확인은 제한효소 SacI을 이용하여 절단하였고, 벼 종자내 다량 발현(pSB-SbeTPSP)의 경우는 TPSP 유전자 확인을 위하여 벼 genomic DNA를 제한효소 EcoRI으로 절단하였고 도입된 TPSP 유전자의 수의 확인은 제한효소 SaiI을 이용하여 절단하였고, stress 유도 발현(pSB-SaiTPSP)의 경우는 TPSP 유전자 확인을 위하여 벼 genomic DNA를 제한효소 EcoRI으로 절단하였고 도입된 TPSP 유전자의 수의 확인은 제한효소 SaiI을 이용하여 절단하였다. GFP의 세포질 발현(pSB109-GFP)의 경우, GFP 유전자 확인은 BamHI, 유전자수의 확인은 SpeI을 각각 사용하였다. 도입된 GFP 유전자에 대한 probe는 TPSP와 GFP유전자 함유 운반체인 pSB109-TPSP와 pSK-sGFP를 각각 EcoRI+PstI과 PstI으로 절단하여 각각 1.4kb의 TPSP 유전자 단편과 0.7 kb의 GFP 유전자 단편을 이용하였다. 도입 유전자에 대한 결과를 비교 분석해 보면, 그림 2 에서 보는 바와 같이(그림 2A) pSB109-TPSP형질전환체의 경우, 모든 line에서 TPSP 유전자의 도입되었음을 확인 하였고 N(NcoI)에서 알 수 있듯이 T1,T3 line은 1개, T2, T4line은 두 개의 TPSP 유전자가 도입되었음을 알 수 있었다. pSB109-GFP 형질전환체의 경우도(그림 2B) 모든 line에서 도입 유전자를 확인 하였고 S(SpeI)에서 보듯이 도입된 유전자 수(copy number)가 매우 다양함을 알 수 있다. 한 개의 GFP 유전자가 도입된 경우(A3, A5, A8, A9)부터 2개(A1), 3개(A2), multi copy(A4, A7)등 매우 다양하게 GFP 유전자가 도입 되어 있음을 알 수 있다. pSB-UTPSP 형질전환체의 경우(그림 2C), pSB-SbeTPSP 형질전환체의 경우(그림 2D), pSB-SaTPSP 형질전환체의 경우(그림 2E)의 경우도 모든 line에서 도입 유전자를 확인하였고, 도입된 유전자 수(copy number)가 매우 다양함을 알 수 있다.

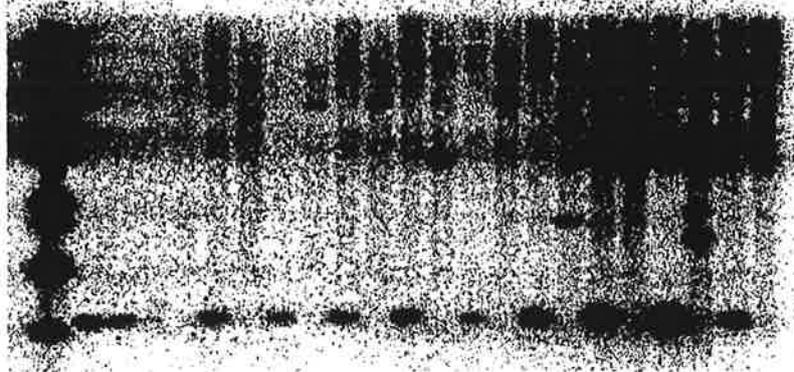
(A) pSB109-TPSP

NC H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11
M 5X 3X 1X RI RI Ne RI Ne RI Ne RI Ne RI Ne RI Ne RI Ne

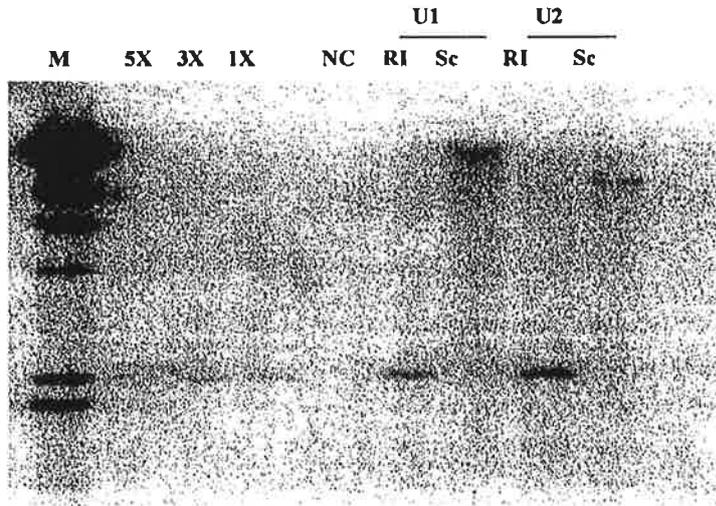


(B) pSB109-GFP

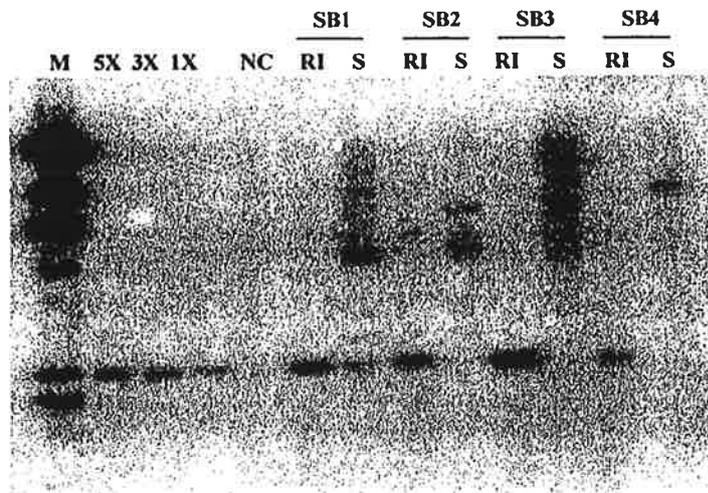
A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18
M 5X 3X 1X NC B Sp B Sp



(C) pSB-UTPSP



(D) pSB-SbcTPSP



(E) pSB-SaTPSP

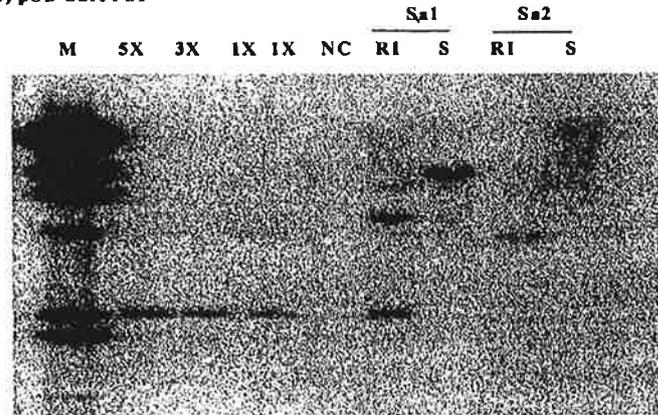


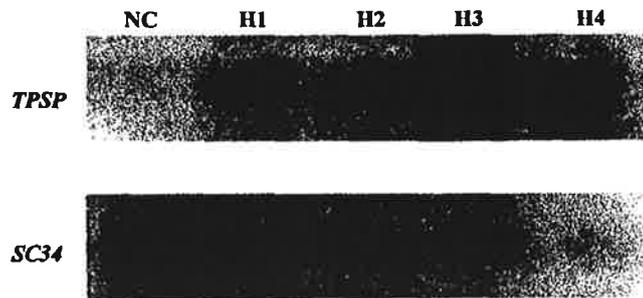
그림 2. Southern blot analysis of (A) pSB109-TPSP , (B) pSB109-GFP, (C) pSB-UTPSP, (D) pSB-SbeTPSP and (E) pSB-SaTPSP-transformed rice plants .

5. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석

형질전환 벼 식물체 내에 TPSP와 GFP 유전자의 전사 단계에서의 발현 수준을 알아보기 위해 Northern-blot 분석을 실시하였다. 같은 성장 상태에 있는 형질전환 벼 식물체 및 형질전환 되지 않은 벼 식물체로부터 준비한 0.1g의 잎조직을 액체질소에 얼린 다음 막자사발과 봉을 이용하여 마쇄한 후 guanidium isothiocyanate를 이용 total RNA를 추출하였다. 흡광도로 RNA농도를 측정하고 RNA 10ug을 iodoacetamide (0.084g/100ml)가 들어있는 아가로스 젤에 전기영동한 다음 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Hybond-N+; Amersham)으로 RNA를

전이시킨 후 Southern 분석시 사용했던 1.4kb의 TPSP 유전자 산물과 0.7 kb의 GFP 유전자 산물을 probe로 사용하여 위에서 언급한 Southern 분석과 동일한 방법으로 probing하였다. 또한 전체 RNA가 일정하게 같은 수준으로 발현했는가를 확인하기 위하여 TPSP 유전자산물과 GFP 유전자산물을 probe로 사용한 filter를 deprobing 용액($0.01 \times$ SSC, $0.1 \times$ SDS)에 넣고 10분간 끓여 deprobing한 후 식물세포내에서 일정한 수준으로 발현하는 tumor suppressor cDNA(SC34)로 probing한 결과 전체 RNA의 발현수준은 일정한 수준으로 발현하였음을 확인하였다. 전사 단계에서의 TPSP 유전자와 GFP의 발현 수준을 비교 분석해 보면, TPSP 유전자 발현의 경우 대조구에서 관찰된 TPSP 전사 산물은 없었으며 형질 전환체(H1-H4)에서는 서로다른 수준의 전사산물이 검출 되었다(그림 3A). GFP 발현의 경우도 대조구에서 관찰된 GFP 전사 산물은 없었으며 형질전환체(A1-A9)에서는 서로다른 수준의 전사산물이 발현 되었다(그림 3B). 따라서 TPSP와 GFP 전사산물은 서로 다른 형질전환체내에서 매우 다른 수준으로 발현하고 있음을 확인하였다(그림 3).

(A) pSB109-TPSP



(B) pSB109-GFP

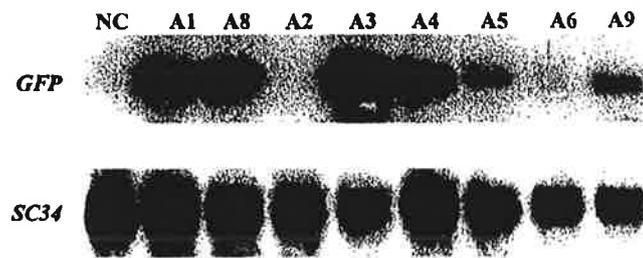


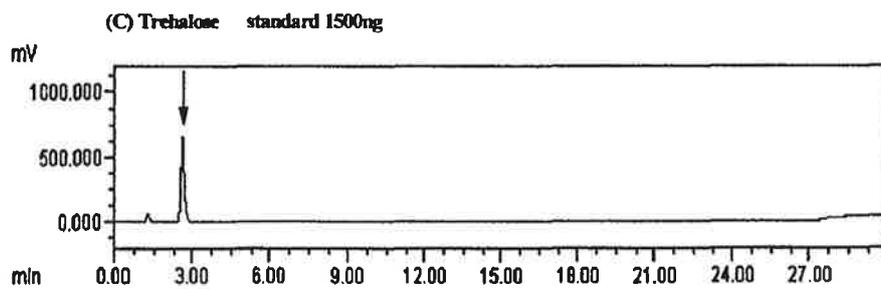
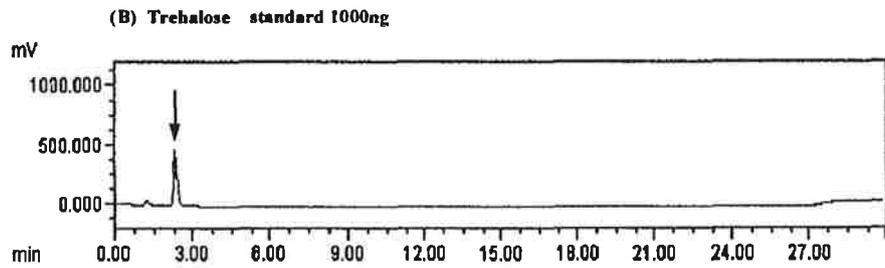
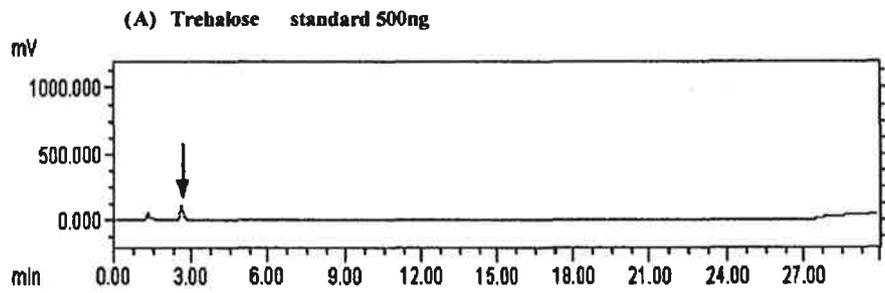
그림 3. Northern blot analysis of pSB109-TPSP (A) and pSB109-GFP (B)

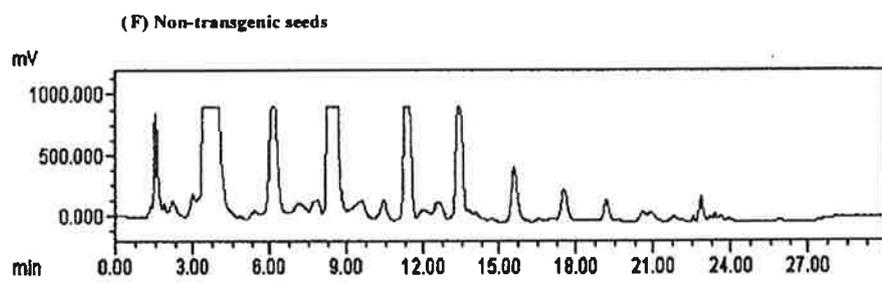
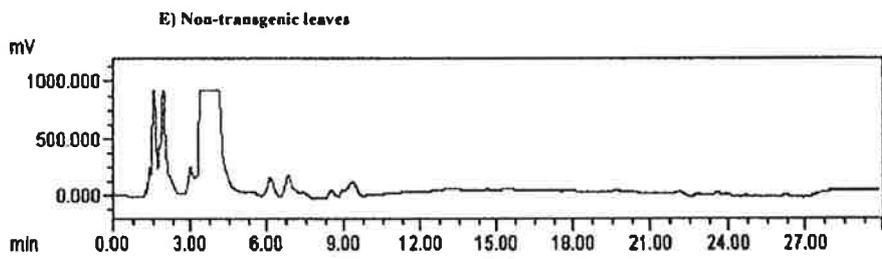
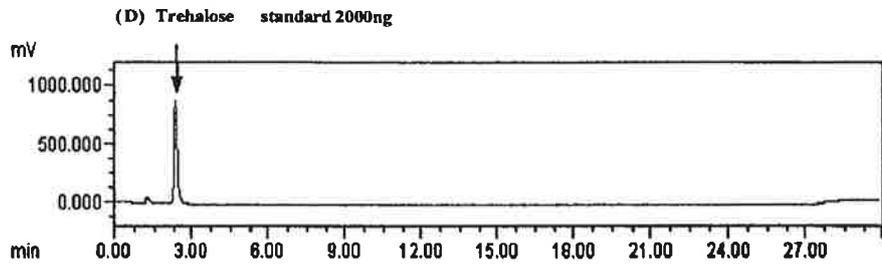
6. TPSP 유전자 형질전환체 trehalose 분석 및 정량

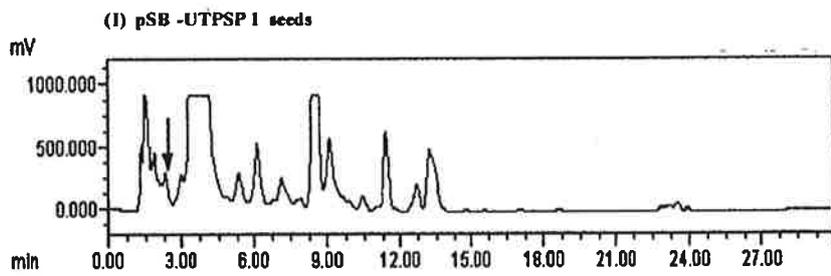
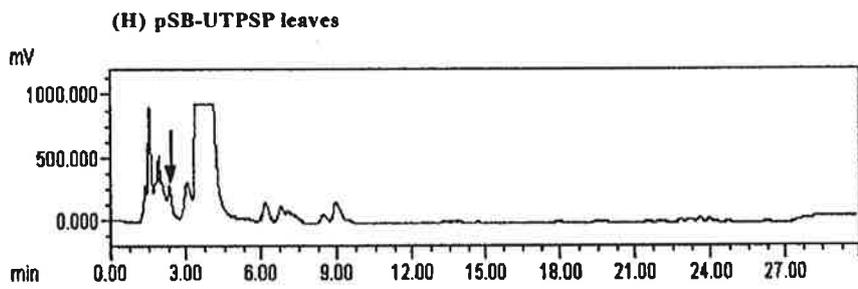
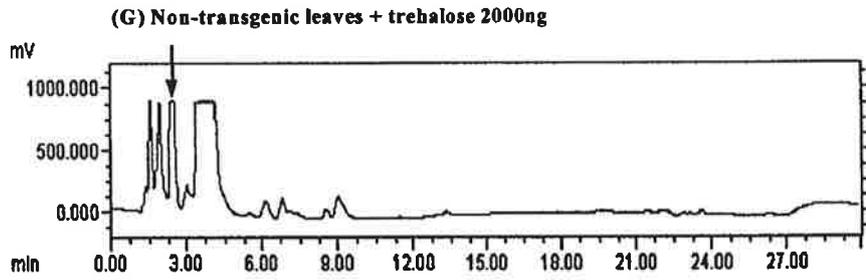
TPSP 유전자가 도입된 형질전환 벼의 잎 조직과 종자에 실제로 trehalose가 축적되는 것을 HPIC (high-pH ion chromatography)를 이용

하여 분석하였다. 같은 성장 상태에 있는 형질전환 벼 식물체 및 형질 전환 되지 않은 벼 식물체로부터 준비한 0.5g의 잎조직 및 종자로부터 추출된 당을 DX500 HPIC 시스템에서 Carbo-Pak PA1 column을 이용하여 정량하였다. Column으로부터 당의 용출은 150mM NaOH 용액에서 0~250mM NaOAc의 농도기울기를 이용하여 30분간 용출하였으며, 용출되는 당은 ED 40 electrochemical detector로 검정하였다. Trehalose 측정량을 정량하기 위해서 standard로 각각 500ng, 1000ng, 1500ng, 2000ng 들어있는 trehalose(그림 4A, B, C, D)를 이용하여 $Y = 0.231X + 0.0946$ 식을 얻었다. Trehalose pick가 맞는가를 확인하기 위하여 형질전환 되지 않은 벼의 잎조직에 2000ng의 trehalose를 넣고 분석한 결과 trehalose pick가 2분 24초~48초 사이에 나타나는 것을 확인하였다(그림 4G). HPIC를 이용하여 당분석을 한 결과 pSB-UTPSP 형질전환체의 잎 조직 및 종자와 pSB-SbeTPSP 형질전환체의 잎 조직 및 종자에서 trehalose pick가 높게 나타남을 확인하였고(그림 4H, I, J, K, L, M, N, O) pSB109-TPSP, pSB-SaTPSP 형질전환체의 잎 조직 및 종자에서 trehalose pick가 나타남을 확인하였다(그림 4P, R, S, T). 특히 pSB-UTPSP 1 형질전환체의 잎 조직 및 종자와 pSB-SbeTPSP 1 형질전환체의 잎조직에서 HPIC를 이용하여 정량된 값인 3.6, 3.3, 2.3을 각각 대입한후 희석배수를 곱한 결과 각각의 전체중량이 558mg, 511mg, 425mg당 558 μ g, 550 μ g, 376 μ g의 trehalose가 측정됨을 알 수 있고 이는 전체중량의 0.1%, 0.11%, 0.09%를 차지하는 것을 알 수 있었다. 이는 기존에 감자와 담배 형질전환체에서 보고 되었던 것에 비해 10배가 향상된 결과이고 trehalose 생합성 유전자의 식물체 내 대량발현시 야기되었던 성장 저해 및 종자 수확량에는 전혀 영향을 주지 않았음을 확인하였다. 그러나 pSB-RTSP 형질전환체의 잎 조직에서는 trehalose pick가 나타나지 않았다. 이는

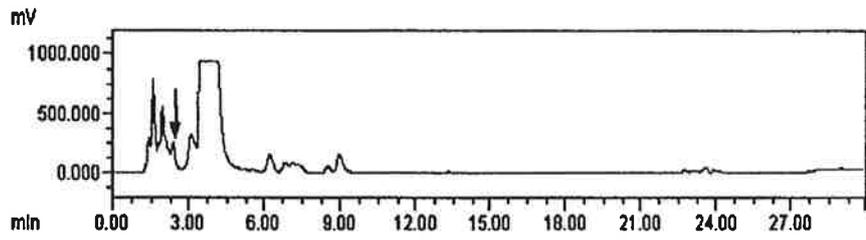
trehalose 합성시 필요한 UDP-Glucose가 엽록체내에는 없다는 것을 알 수 있다(그림 4Q).



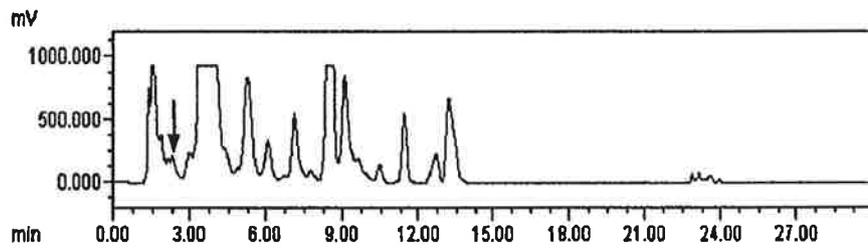




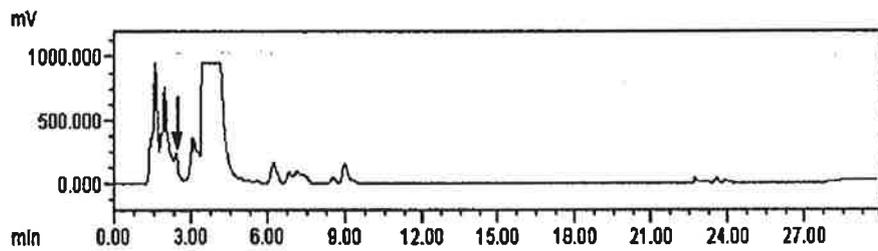
(J) pSB -UTPSP 2 leaves

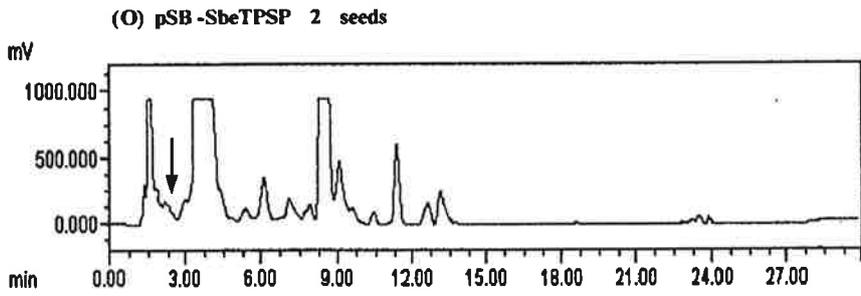
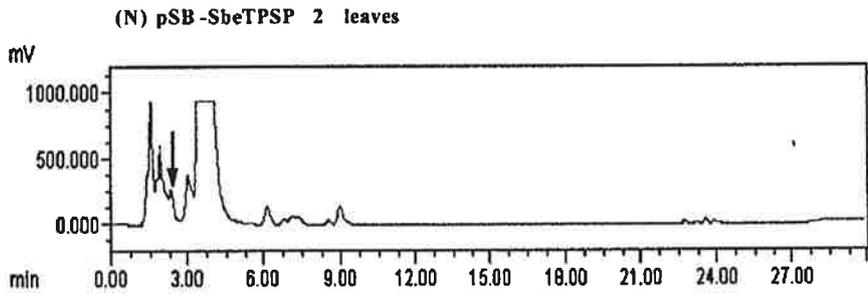
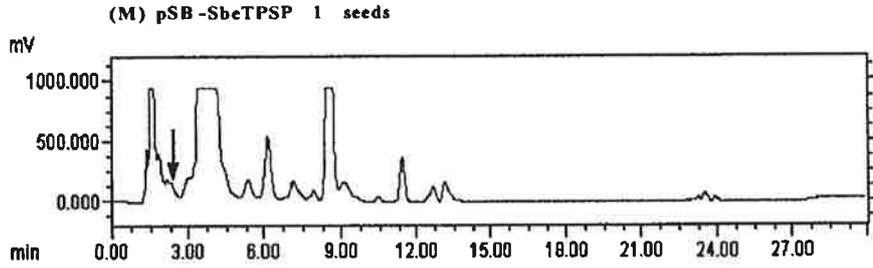


(K) pSB -UTPSP 2 seeds

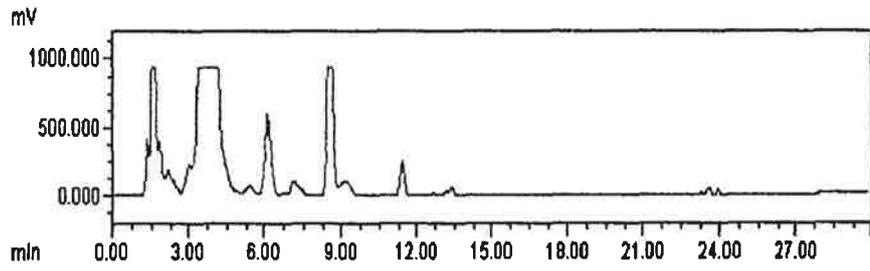


(L) pSB -SbeTPSP 1 leaves

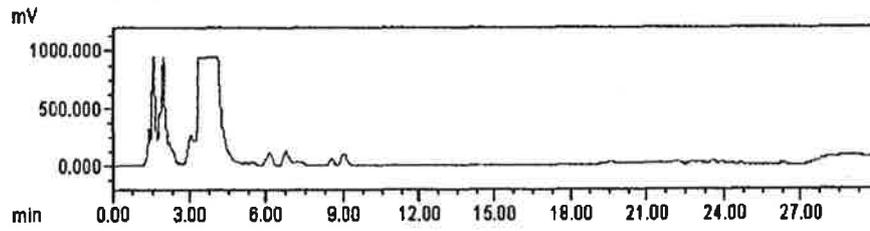




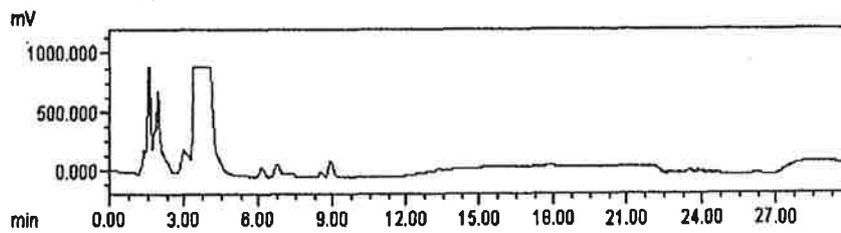
(P) pSB-SaiTPSP 2 seeds



(Q) pSB-RTSP 4 leaves



(R) pSB-Sai 2 leaves



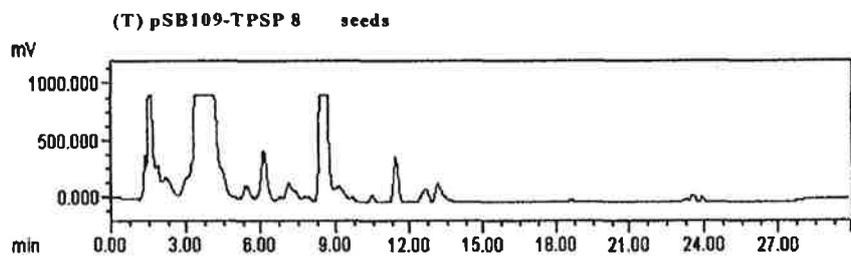
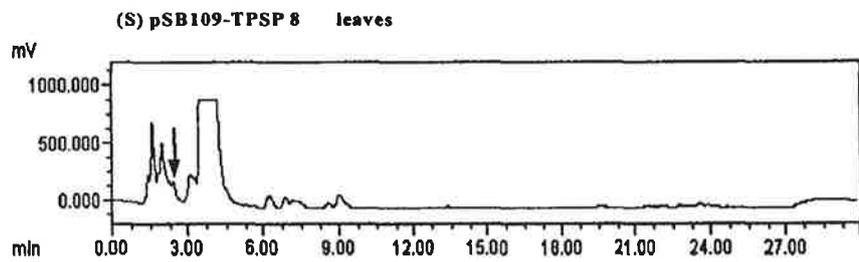


그림 4. TPSP 형질전환 식물체내 당 분석

7. 한발저항성 유전자 도입 형질전환체의 유전자원확보

한발저항성 유전자가 도입된 다수의 형질전환체로부터 R₁ 종자를 확보하고 후대 생물검정을 위한 유전 자원을 확보하고자 포장에 전개하여 제초제 저항성 검정을 통하여 후대 유전자 도입 형질전환체 R₂ 세대의 종자를 확보하였다 (표 3). 확보된 R₂ 세대의 종자는 후대 생물검정을 위한 시료로 사용될 예정이다.

표 3. 포장 전개후 확보된 R₂ 종자 현황

Plasmids	Line	R1 seed	R2 seed
pSB109-TPSP	1	79	154
	2	17	112
	3	34	135
	4	23	125
	5	30	136
	6	57	154
	7	117	164
	8	75	143
	9	54	146
pSB-UTPSP	1	21	146
	2	45	136
pSB-SaiTPSP	1	81	165
	2	10	153
	3	9	140
pSB-SbeTPSP	1	67	134
	2	21	143
	3	35	132
	4	42	121

8. 연구 성과

가. 국외학술지 논문발표

Kim, Y H., Kwon, T. K., Park, S., Seo, H. S., Cheong, J.-J., Kim, C. H., Kim, J.-K., Lee, J.-S., and Choi, Y. D. (2000) Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, in press. (November, 2000).

Seo, H. S., Y. J. Koo, J. Y. Lim, J. T. Song, C. H. Kim, J.-K. Kim, J. S. Lee and Y. D. Choi. (2000) Characterization of a bifunctional fusion enzyme between trehalose 6-phosphate synthetase and trehalose 6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2484-2490.

나. 국외 학술대회 발표

포스터 발표(국외)

Choi, W.-B., Kim, C. H., Jang, I.-C., Seo, H. S., Choi, Y.-D., Nahm, B. H. Kim, Ju-Kon (1999) *E. coli* trhalose synthase/phosphatase fusion gene expression in transgenic rice. The International Program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24, poster.

다. 국내 학술대회 발표

주제강연(국내)

Choi, W.-B., Kim, C. H., Jang, I.-C., Seo, H. S., Choi, Y.-D., Nahm, B. H. Kim, Ju-Kon (1999) Increase in Levels of Trehalose Accumulation in Transgenic Rice Plants. '99 한국농화학회 추계학술발표회 초청강연, 전남대학교, 1999. 10.29.

Choi, W.-B., Kim, C. H., Jang, I.-C., Seo, H. S., Choi, Y.-D., Nahm, B. H. Kim, Ju-Kon (1999) Expression of E. coli trehalose synthase/phosphatase fusion gene in transgenic rice. '99 한국농화학회 춘계학술대회, 춘천 두산리조트, 1999. 5. 20-21, 구두발표.

Seo, Hak Soo, Lim, J. Y., Koo Y. J., Kim, C. H., Kim, J.-K., Lee, J. S., Choi, Y. D. (1999) Characterization of a fusion enzyme between trehalose 6-phosphate synthetase and trehalose 6-phosphate phosphatase. '99 한국농화학회 춘계학술대회, 춘천 두산리조트, 1999. 5. 20-21, 구두발표.

Wu, R and Kim J.- K. (1997) Strategies for producing transgenic plants that give durable protection against insect pests or diseases and show significant tolerance to drought, high salt, or low temperature. 한국농화학회 기조강연, 1997. 10.19, 서울대 농생대.

포스터발표(국내)

Kim, Y.-H., Kim, C. H., Kim, Ju-Kon, Lee, J. S., Choi, Y. D. (1999) Construction and characterization of maltooligosyltrehalose synthase-trehalohydrolase bifunctional fusion enzyme. '99 한국농화학회 추계학술대회, 전남대학교, 1999.

10.29, 포스터.

Choi, W.-B., Kim, C. H., Jang, I.-C., Seo, H. S., Choi, Y.-D., Nahm, B. H. Kim, Ju-Kon (1999) Transgenic rice plants expressing trehalose synthase/phosphatase fusion gene accumulate trehalose at high levels. '99 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울교육문화회관, 1999. 10.25-26, 포스터.

Kim, Y.-H., Kim, C. H., Kim, Ju-Kon, Lee, J. S., Choi, Y. D. (1999) Construction and characterization of maltooligosyltrehalose synthase-trehalohydrolase bifunctional fusion enzyme. '99 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울교육문화회관, 1999. 10.25-26, 포스터.

Choi, W.-B., Kim, C. H., Jang, I.-C., Seo, H. S., Choi, Y.-D., Nahm, B. H. Kim, Ju-Kon (1999) Trehalose synthase-phosphatase fusion gene in transgenic rice. 제 13회 식물생명공학심포지움, 서울대학교 문화관, 1999. 7. 15-16, 포스터.

Choi, W.-B., Kim, C. H., Jang, I.-C., Seo, H. S., Choi, Y.-D., Nahm, B. H. Kim, Ju-Kon (1998) Expression of trehalose synthase gene in transgenic rice for drought resistance. '98 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울대학교 문화관, 1998. 10.22-24, 포스터.

제 4 장 밀식재배저항성 유전자 벼형질전환

제1절 서 설 (연구개발의 목적 및 중요성)

본 연구에서는 주곡 작물인 벼에 피토크롬 A 유전자를 과량으로 발현시키는 품종을 만들어서 벼를 밀식 재배하더라도 내도복성을 갖고 수확량을 증대시킬 수 있는 품종을 유전공학적인 방법으로 육종하고자 하였다. 즉 식물의 광형태 형성을 관장하는 피토크롬의 유전자를 변형시켜서 밀식재배에서도 키가 작고 잎의 클로로필 함량이 증가하여 광합성 능력이 향상된 내도복성 밀식재배 저항성 품종을 육종하고자 하였다.

광형태형성을 관장하는 광수용체인 피토크롬을 벼에서 과량으로 발현시킴으로써 밀식재배시 내도복성을 갖고 수확량을 증대시킬 수 있는 품종을 유전공학적인 방법으로 육종하고자 *Arabidopsis* 피토크롬 유전자 (*phyA*)를 벼의 *rbcS* 프로모터와 옥수수 *ubiquitin1* 프로모터를 연결시켜 벼 형질전환용 운반체인 pSBR3.7과 pSBU3.7을 각각 제조합시켜 완성하였다. 이 운반체에 포함된 벼 *rbcS* 프로모터는 광합성이 가장 활발하게 일어나는 벼의 잎 조직에서 피토크롬을 조직 특이적으로 높은 수준의 발현을 유도하는 특징을 갖고 있으며 옥수수에서 분리된 *Ubi-1* 프로모터는 자체의 exon과 intron이 연결되어 있으며 외부 환경적인 요인(특히 빛)에 관계없이 단자엽 식물의 전조직에서 강력하게 피토크롬을 발현할 수 있는 특징을 가지고 있다. 이 운반체들은 제초제 저항성 유전자를 포함하고 있기 때문에 형질전환시 선발마커로뿐 아니라, 식물체로 성장한 후 제초제 저항성은 제초제로 다른 잡초를 비선택적으로 제거할 수 있어 실제 농업에 적용되었을 때 이용성이 높을 것이다. 특

히, 건담 직파재배시 생기는 잡초 제거에 이용성이 아주 높을 것으로 생각되어진다. 이는 노동력 절감과 수확량 증대를 가지고 올 것이다.

본 연구에서는 *Arabidopsis* 피토크롬 유전자 (*phyA*)를 벼의 *rbcS* 프로모터와 옥수수의 *ubiquitin1* 프로모터를 연결시켜 벼 형질 전환용 운반체인 pSBR3.7과 pSBU3.7을 제작, *Agrobacterium*내로 도입, 확인하였으며 벼 형질전환의 기술 축적과 형질전환의 효율증대로 인해 다수의 형질전환체를 확보, 제초제 저항성 검증을 통하여 형질전환체의 제초제 저항성을 입증하였다. 이와 같은 결과를 토대로 본 연구에서는 형질전환체들의 단백질 발현 분석을 통하여 PhyA 유전자의 발현을 확인하였고 성숙된 벼 형질전환체의 벼 잎으로부터 genomic DNA 및 RNA를 분리하여 Southern 분석을 통하여 도입 유전자(PhyA)를 확인하였다. 또한 수확기에 있는 *Ubi-PHYA* 형질전환 벼의 간장 (culm length) 및 수장 (plant height)을 측정하여 형질전환체의 표현형질의 생리적 특성을 규명하였다.

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 피토크롬 유전자 준비 및 cloning

단자엽 식물 형질전환 vector의 조제 및 형질 전환에는 Nebraska 대학 식물병리학과와 Center for Biotechnology의 Dr. Mitra 교수와 협력할 것이며, 식물 광형태형성 연구분야의 선두 그룹인 미국 California 대학 Berkeley의 Peter Quail의 실험실과 연계하여 연구하고 초청하여 평가를 받을 예정에 있다. 일본 Hitachi연구소의 피토크롬 대가인 Furuya 박사의 자문을 받을 것이며, 이미 cloning된 완두 피토크롬 cDNA의 사용을 허가받았다.

완두 피토크롬 cDNA는 Dr. Masaki Furuya (Hitachi Advanced Research Lab.)로부터 사용허가를 받았으며, 대두 피토크롬의 cDNA는 경희대학교 한태룡교수로부터 사용허가를 받았다. 귀리의 피토크롬 A는 Dr. Peter H. Quail (University of California, Berkeley)에게 사용을 협의할 것이며, 새로운 식물체에서 몇가지 피토크롬 유전자를 cloning 한다.

Promotor는 현재 본 연구집단에서 사용되고 있는 *rbcS* promoter를 갖는 pBY605RR을 사용한다. 형질전환후 1차 선발은 매개체에 삽입된 *bar* gene에 의해서 일어나는데 이것은 bialaphos나 glufosinate ammonium와 같은 제초제에 저항성을 갖고 있다.

mRNA processing과 translocation을 증가 시키기 위하여 피토크롬 유전자내에 *adh* (maize alcohol dehydrogenase 유전자)의 1번 intron을 삽입하여 매개체를 구성하며, 매개체의 구성은 3개의 promoter와 *adh* 1번 intron을 삽입한것과 삽입하지 않은것의 피토크롬 유전자로 구성되어 하나의 피토크롬 유전자 당 6개의 매개체가 구성되어 형질전환에 이

용될 것이다.

2. 벼 형질전환

가. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작

분리된 Phytochrome를 각각 항시발현과 엽조직 특이 발현을 유도하기 위하여 pBY605 운반체 혹은 Agrobacterium 용 운반체에 제한효소 절단 및 접합 방법으로 삽입할 예정이다.

선발마커는 제초제 저항성 유전자 phosphinotricin acetyltransferase gene (bar)을 35S promoter와 연결 동일한 plasmid 상에 위치시킨 것을 사용할 것이다.

나. 벼 형질전환 및 식물체 재분화

성숙종자(낙동벼)의 껍질을 벗긴후 70% 에탄올과 20% 클로락스를 이용하여 멸균시키고 2N6배지에 치상한다. 3주 배양후 캘러스가 유도된 종자를 다시 2N6배지에 계대 배양하여 4일간 기른 후 형질전환에 바로 이용한다.

왕성하게 자라고 있는 캘러스를 운반체를 갖고 있는 Agrobacterium tumefaciens LBA4404용액에 약 3분간 담근 후에 2N6 고체배지 상에서 3일 동안 공동 배양한다. 공동 배양후 캘러스들을 cefotaxime(250 mg/l)이 들어 있는 멸균수에 씻은 후 2N6-CP 배지에서 암상태에서 3주간 배양한다. 배지에서 왕성하게 자라는 캘러스 잘게 잘라서(1-2 mm) N6-7-CP 배지에서 다시 10일간 암상태에서 배양한다. 앞의 배지에서 자란 캘러스들을 재분화 배지(N6S3-CP)에서, 2000룩스의 빛을 쬐이면서 배양한다. 재분화된 식물체를 약 10 cm 되었을 때 포트에 옮겨서 온실에서 재배한다.

3. 형질전환 식물체내 도입 유전자 분석

가. Southern blot 방법

형질전환체의 엽조직으로부터 DNA분리, southern blot 방법으로 유전자 삽입 유무를 확인한다.

형질전환식물의 전 DNA를 Phenol 추출법(Kim et al, 1994)에 의해 분리 정제한다. DNA 10-20 μ g을 두개의 제한 효소로 절단하는 데, 이 때 한 개는 Phytochrom 유전자만을 운반체에서 잘라내는 효소를 선정하고 다른 한 개는 운반체내 절단부위가 한 개 이하인 효소를 선정하여 사용한다. 따라서 외래 유전자만을 절단하는 효소로는 형질전환에 사용된 유전자가 형질전환 과정에서 변화되지 않고 형질전환체에 원래형태로 유지되는 지를 알 수 있고, 운반체내 절단부위가 한 개 혹은 없는 효소로는 도입된 유전자의 copy number를 알 수 있게 됨으로서 transgene의 삽입여부 뿐만 아니라 형질전환체내의 존재양상을 알 수 있게 된다.

나. Northern blot 방법

기관별로 분리된 전체 RNA를 이용하여 Northern blot 방법으로 그들의 조직 특이성을 분석할 수 있다. 이는 발현 분석이 완료된 유용 유전자 중 일부를 probe로 사용하여 각 조직에 대한 in-situ hybridization 방법으로 조직별, 세포 부위별 발현을 분석하는 것이다.

외래 유전자 도입이 확인된 형질전환 벼 식물체의 도입 유전자의 발현을 확인하기 위해서 확보된 phytochrom e단백질에 대한 항체를 이용하여 형질전환 벼 엽조직에서 추출된 단백질을 대상으로 immunoblot 실험을 수행한다.

Phytochrome 유전자 삽입이 확인된 개체중에서 종자를 얻을 수 있

는 것을 각각 10개체를 선택하여 엽조직으로부터 단백질을 추출한다. 추출된 단백질은 SDS-PAGE에서 전기 영동한 후 PVDF막에 옮기고 삽입 유전자 유래 단백질의 존재를 각각의 단백질에 선택적으로 반응하는 위에서 준비된 항체와 반응을 시킴으로서 각각 삽입 유전자 발현 정도를 확인한다.

4. 형질전환 벼 후대 및 생물검정

Phytochrome 유전자 삽입 및 발현이 확인된 형질전환 벼 개체를 대상으로 종자를 수확한다. 다음 해에 실험실에서 형질전환종자를 발아시킨 후 온실에 이식하고 식물체가 성숙단계에 왔을 때 각각 종자 유래의 식물체 중 하나를 골라서 엽조직에 페인트로 표시한 후 Barstar 1%를 붓으로 칠하여 제초제 저항성으로 도입 유전자의 존재를 일차 확인한다.

위에서 사용한 같은 Southern Blot 방법으로 분자생물학적 유전자를 확인함으로써 다음 세대로의 유전자 전이가 안정되게 일어나는지를 조사한다. 또한 위에서 사용한 Western blot방법으로 도입유전자의 발현 및 발현수준을 확인함으로써 다음세대로의 유전자 전이 및 발현이 안정되게 유지되는지를 조사한다.

도입유전자의 다음세대로의 전이 및 발현이 확인된 개체로부터 다음세대(T2)에서의 생물검정을 위하여 다량의 종자를 확보한다.

Phytochrome 유전자 도입 벼의 경우도 같은 방법으로 온실에서 형질전환종자를 발아시킨 후 모종을 만들고 이것들을 온실에서 밭식으로 이식하여 식물체가 중간성숙단계에 왔을 때 형질전환 되지 않은 벼와의 차이점을 관찰 데이터화한다. 이때 고려하게 될 표현형으로는 잎의 엽록소 (chlorophyll) 함량 측정, 형질전환체의 높이를 야생주

(wild-type)와 비교하여 키가 작은 형질을 나타내는 개체를 선발, 형질 전환체를 야생주와 비교하여 생리적으로 특이한 개체 선발, Blue acetate지 등으로 인위적인 그늘을 만들어 주어 적색광의 함량을 줄이고 상대적으로 원적색광의 양을 증가 시켜 그늘을 피하는 (shade-avoidance mechanism)현상을 극복하는 개체를 선발한다.

제3절 연구개발 결과

1. 밀식재배 저항성 유전자 분리 및 운반체 제작

피토크롬 A 유전자를 분리 확보하여 형질전환용 운반체를 제작하기 위한 1차년도 연구는 *Arabidopsis*의 피토크롬 A 유전자 (phyA)를 확보하고, 벼 핵형질전환용 운반체를 제작 완료함으로써 2차년도 벼형질전환에 연구에 이용할 수 있도록 하였다.

가. 밀식재배 저항성 유전자 확보

밀식재배 저항성 유전자로 *Arabidopsis* 피토크롬을 확보하여 사용하였다. 완두의 피토크롬 A 유전자 (phyA)는 pBluescript의 BamHI과 EcoRI 제한효소 부위에 cloning된 pPP800 plasmid를 일본의 Masaki Furuya group으로부터, 또한 *Arabidopsis*의 피토크롬 A 유전자 (phyA)는 pBluescript의 EcoRI과 ClaI 제한효소 부위에 cloning된 pAP3.7 plasmid를 미국의 California, Berkeley에 있는 Plant Gene Expression Center의 Peter H. Quail group으로부터 확보하여 사용하였다.

나. 벼 형질전환용 유전자 운반체 제작

1) pSBRI 제작

피토크롬을 엽조직에서 효율적으로 발현시키기 위해서 *rbcS* 프로모터를 제초제 저항성 유전자를 기본 선택 marker로 가지고 있는 *Agrobacterium*을 이용한 핵 형질전환체인 pSB105에 삽입시켰다. 우선 이를 위하여 *rbcS* 프로모터를 포함하고 있는 pRN72와 pSB105 plasmid DNA를 각각 준비한 후, pRN72 plasmid를 제한효소 *Bam*HI과 *Xba*I를 처리한 후 LMG(low-melting agarose gel)로부터 *rbcS* 프로모터 부분인

1.3kb *Bam*HI-*Xba*I DNA 단편을 분리하였다. 또한 pSB105 plasmid를 동일한 제한효소로 연속 처리하고 에탄올 침전을 통해 pSB105 plasmid DNA 단편을 분리하여 1.3kb *Bam*HI-*Xba*I DNA 단편과 연결반응을 시킨 후, electroporator를 이용하여 *E. coli* DH5 *a*에 형질전환 시켰다. 이를 spectinomycin이 포함되어 있는 LB 배지에 도말한 후 배양기에 12-14시간 정도 배양하고 여기에서 나온 단일 colony들은 액체배지에 다시 배양하여 miniprep하여 새롭게 만들어진 plasmid를 분리하였다. 새롭게 만들어진 plasmid DNA를 확인하기 위하여 제한효소 *Sma*I을 이용하여 제한효소 절단 분석을 실시하여 1.1kb와 9.0kb를 확인할 수 있었으며 이를 pSBR1이라 명명하였다.

2) pAP3.7-N, pPP800-N 제작

pSBR1 plasmid의 *rbcS* 프로모터와 *Pin*II terminator 사이에 있는 단일 제한효소 *Xba*I과 *Not*I 부위 사이에 *Arabidopsis*와 완두의 피토크롬 A 유전자를 삽입시키기 위해서는 *Arabidopsis*와 완두의 피토크롬 A 유전자가 cloning되어 있는 pAP3.7와 pPP800 plasmid에 새로운 제한효소 *Not*I 부위를 만들 필요가 있었다. 따라서 피토크롬 A 유전자의 3' 말단 부위에 *Not*I 제한효소 부위가 포함되어 있는 3' Adaptor(그림참조)를 pAP3.7과 pPP800 plasmid의 MCS(multi cloning site)에 있는 제한효소 *Cla*I과 *Sal*I 부위 사이에 연결반응을 통해 삽입시켜 새로운 *Not*I 부위를 만들고 이를 각각 pAP3.7-N와 pPP800-N라 명명하였다.

3) pSBR800 제작

pPP800-N에 제한효소 *Xba* I과 *Not* I을 동시에 처리하여 LMG를 통해 3.6kb인 완두의 피토크롬 A 유전자만을 분리하여 pSBR1에 제한효소 *Xba*

I과 *Not I*을 처리하고 에탄올 침전을 시켜 분리한 DNA 단편과 연결반응을 시켰다. 이를 electroporator를 이용하여 *E. coli* DH5a에 형질전환시키고 miniprep하여 제한효소 절단 분석을 통해 새롭게 형성된 plasmid에 피토크롬 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다. 이렇게 형성된 plasmid를 pSBR800이라 명명하였다.

다. *Ubi-1*, *rbcS* 프로모터를 이용한 밀식재배 저항성 유전자의 벼 형질전환

옥수수에서 분리된 *Ubi-1* 프로모터와 벼에서 분리된 *rbcS* 프로모터는 여러 식물체에서 발현이 높게 되는 프로모터로 알려져 있다. 특히, 외부 환경적인 요인에 관계없이 단자엽 식물의 전조직에서 강력하게 발현하는 프로모터이다. 피토크롬을 환경적인 요인(특히 빛 조건)의 변화에 영향을 받지 않으면서 벼의 전조직에서 발현시키기 위해서 옥수수의 *Ubi-1* 프로모터와 벼의 *rbcS* 프로모터를 각각 이용한 운반체를 제작하였다.

1) 벼 형질전환용 운반체 제작

가) pSBU3.7

Arabidopsis 피토크롬 유전자가 들어 있는 pAP3.7-N 플라스미드로부터 제한효소 *XmaI*으로 반응시킨 후 에탄올 침전을 통해 절단된 DNA 단편들을 새롭게 정제하고, 절단된 DNA 단편은 다시 *NotI*으로 반응시킨 후 low melting agarose에서 3.7 kb의 *XmaI*-*NotI* DNA 단편인 피토크롬 A 유전자만을 분리하였다. 이렇게 분리한 3.7kb *XmaI*-*NotI* 피토크롬 A 유전자는 pSBU2.0에 제한효소 *SmaI*과 *NotI*을 각각 처리하고 에탄올 침전을 시켜 분리한 DNA 단편과 연결반응을 시킨 후 electroporator를 이

용하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시키고 miniprep하여 제한효소 절단 분석을 통해 새롭게 형성된 plasmid에 피토크롬 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다. 이렇게 형성된 plasmid를 pSBU3.7이라 명명하였다.

나) pSBR3.7

앞에서와 같이 분리된 피토크롬 A 유전자는 pSBR1에 제한효소 XmaI 과 NotI을 각각 처리하고 에탄올 침전을 시켜 분리한 DNA 단편과 연결 반응을 시킨 후 electroporator를 이용하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시키고 miniprep하여 제한효소 절단 분석을 통해 새롭게 형성된 plasmid에 피토크롬 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다. 이렇게 형성된 plasmid를 pSBR3.7이라 명명하였다.

2) 밀식재배 저항성 유전자 형질전환

광형태형성을 관장하는 광수용체인 피토크롬을 벼에서 과량으로 발현시킴으로써 밀식재배시 내도복성을 갖고 수확량을 증대시킬 수 있는 품종을 유전공학적인 방법으로 육종하고자 *Arabidopsis*와 완두의 피토크롬 유전자 (*phyA*)를 벼의 *rbcS* 프로모터와 옥수수의 *ubiquitin1* 프로모터를 연결시켜 벼 핵 형질 전환용 운반체인 pSBR3.7, pSBU3.7을 각각 재조합시켜 완성하였다 (그림 1). 이 운반체에 포함된 벼 *rbcS* 프로모터는 광합성이 가장 활발하게 일어나는 벼의 잎 조직에서 피토크롬을 조직 특이적으로 높은 수준의 발현을 유도하는 특징을 갖고 있으며 옥수수에서 분리된 *Ubi-1* 프로모터는 자체의 *exon*과 *intron*이 연결되어 있으며 외부 환경적인 요인(특히 빛)에 관계없이 단자엽 식물의 전조직에서 강력하게 피토크롬을 발현할 수 있는 특징을 가지고 있다. 이 운반체에 제초제 저항성 유전자를 포함하고 있기 때문에 핵 형질전환시

선발표지로서 뿐만 아니라, 식물체가 어느 정도 성장하였을 때도 선발 표지로 사용할 수 있으며, 또한 실제 농업에 적용되었을 때 형질전환체는 제초제에 대한 저항성을 가지고 있어 그 경제적 가치(노동력 절감)를 높일 수 있을 것이다.

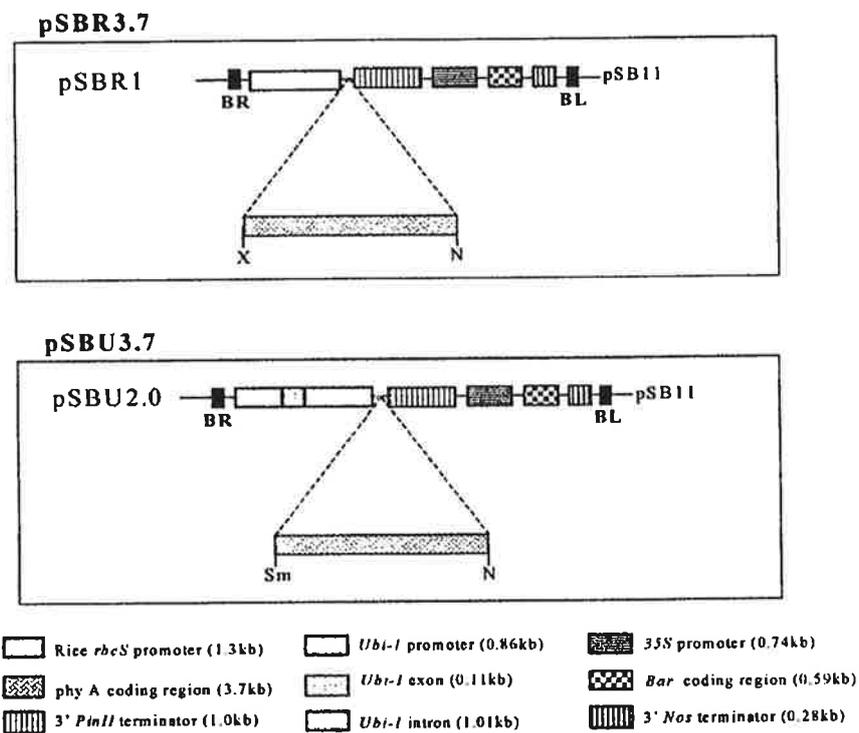


그림 1. Schematic diagrams of the strategy of the construction of pSBR3.7 and pSBU3.7. pSBR3.7 and pSBU3.7 are the expression vectors to express *phytochrome* driven by *rbcS* promoter and *ubi-1* promoter in rice plant.

가. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환

위에서 완성된 운반체를 이용한 형질전환 실험은 1, 2차 선발배지를 모두 거쳐 왕성하게 자란 캘러스를 250 mg/l cefotaxime과 4 mg/l phosphinotricin이 포함된 N6S3-CP 재분화 배지로 옮겨 16/8시간의 광주기로 25℃ 항온 배양실에서 재분화를 유도하여, 98개체의 rbcS-PhyA 형질전환체와 13개의 ubi-PhyA 형질전환체를 확보하였다 (표 1).

표 1. Efficiency of rice transformation by *A. tumefaciens*.

Plasmids	Experiments	Number of		Plants produced	Herbicide		
		scutellum-derived calli				medium	plants
		Produced	BarR cells on regeneration				
First selection	Second selection						
ubi-PhyA	1	135	75(55%)	37(27%)	1	1	
	2	200	104(52%)	58(29%)	1	1	
	3	131	59(34%)	23(18%)	3	3	
	4	123	45(36%)	36(29%)	2	2	
	5	555	165(30%)	85(15%)	6	6	
		1144	448(39%)	239(21%)	13	13	
rbcS-PhyA	1	204	130(64%)	30(15%)	39	39	
	2	250	131(52%)	50(20%)	33	33	
	3	295	159(54%)	63(21%)	46	46	
		749	420(56%)	143(19%)	98	98	

3. 형질전환된 형질전환체의 분석

가. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정

본 연구에서는 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자를 사용하였기 때문에 일반적인 항생제 저항성 유전자와는 달리 형질전환 실험에서 조직 배양시 캘러스 수준에서의 선발뿐만 아니라 형질 전환된 식물체 수준에서도 선발할 수 있는 장점을 가지고 있어 실험실에서 선발되어 재분화된 벼를 온실에서 한 달간 키운 후 제초제 저항성 검정을 실시하였다. 형질 전환된 벼 식물체의 제초제 저항성을 검정하기 위해 시중에서 판매중인 제초제인 Basta를 0.5%(V/V)로 희석하여 사용하였다. 대조구로는 형질 전환시키지 않은 낙동벼를 사용하였다. 검정하고자 하는 잎의 끝을 하얀 색 물감으로 표시한 다음 0.5% Basta를 잎의 전면, 후면에 골고루 바른 후 1주일 뒤에 관찰한 결과 대조구는 잎이 갈색으로 마르고 시든 반면, 형질전환체는 아무런 변화를 관찰 할 수 없었고 본래의 초록색 잎을 유지하였다 (그림 2).

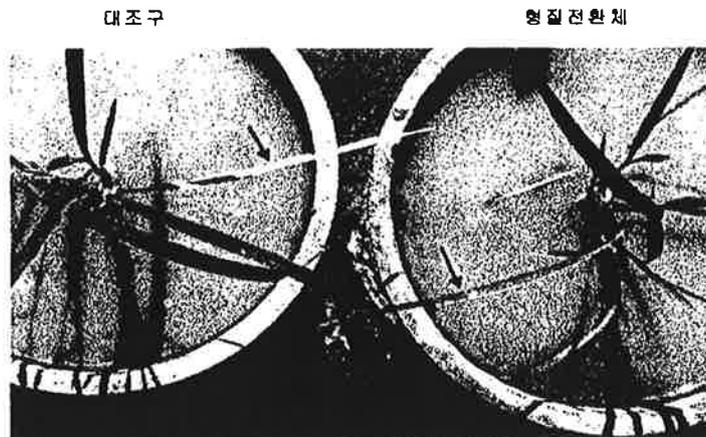


그림 2. Test of Herbicide resistance of transgenic line.

4. 형질전환체의 단백질 발현 분석

형질전환체의 피토크롬의 발현양상을 western 분석으로 확인하였다. 피토크롬이 형질전환된 벼를 2일 동안 암 처리였으며 이때 대조구로 미형질전환체도 같은 조건에서 암처리 하였다. 각각의 시료 0.5g의 잎을 액체질소에 얼린 다음 막자사발에서 마쇄 한 후 1.5ml의 추출 완충액을 이용하여 단백질 추출하였다. 산성단백질 및 핵산을 제거하기 위하여 얼음속에서 1시간 동안 rocking 하였고 4℃ 11,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 각각의 단백질 100ug을 7% SDS-PAGE에서 전기영동하였다. 이 후 PVDF membrane(Milipore Cat#IPVH 00010, 0.45mm)으로 transfer 하기 위해 electroblotter (Hoefer Cat#TE22)를 이용하여 150mA에서 3시간 동안 electroblotting 하였다. 양성대조구로는 야생형의 벼 씨앗을 7일간 호르몬이 없는 MS배지에서 키운 다음 위와 같은 방법으로 추출하여 사용하였다. Immunodetection 을 위해 사용한 primary antibody는 단자엽과 쌍자엽 피토크롬을 동시에 인식하는 073D와 단자엽 피토크롬만 인식하는 1.9B5A(미국 캘리포니아 대학(Berkeley)의 Peter Quail 교수로부터 분양)를 사용하였고 secondary antibody는 Immuno-Star Anti-Mouse Detection Kit(Bio-Rad Cat#170-5010)를 구입하여 alkaline phosphatase가 달린 Anti-Mouse antibody를 사용하여 x-ray 필름에 발광시켜 관찰하였다. 073D의 antibody를 이용한 단백질 발현 분석결과 양성 대조구에서는 120kDa의 단백질이 관찰되었고 음성대조구에서는 관찰된 단백질 band는 희미하게 120kDa의 단백질이, 형질전환 식물체에서는 line 4, 7, 12, 13에서 118kDa Arabidopsis 피토크롬의 발현 수준이 높게 나타났으며 반면, line 1, 2, 3, 5, 8, 9, 11에서는 발현 수준이 낮게 나타났다 (그림 3). 그러나 line 6, 10에서는 피토크롬의 발현이 확인되지 않았다. 또

한 이들의 발현이 arabidopsis의 피토크롬임을 확인하기 위해서 monocot/dicot을 모두 인식하는 antibody를 사용한 실험에서는 양성대조구에서만 단백질을 확인할 수 있었다. 이로부터 형질전환 벼에서는 효과적으로 arabidopsis의 피토크롬이 효과적으로 발현됨을 알 수 있었다. 위와 같은 실험 결과로 ubi-phyA으로 연결된 pSBU3.7 운반체의 형질전환체에서 효과적으로 발현되었다.

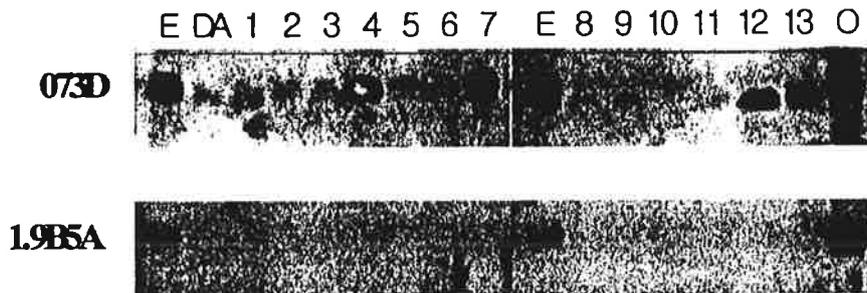


그림 3. Immunoblot analysis of phytochrome extracted from WT and R0 transgenic rice.

- E : Etiolated rice seedlings (7 days)
- DA : Dark-adapted non-transgenic rice (2 days)
- 1-13 : Dark-adapted transgenic rice (2 days)
Indicates U1-U13 line of *ubi-PHYA* transgenic rice
- O : Purified oat phytochrome A

5. 형질전환 벼의 Southern 분석

13개의 ubi-PhyA 형질전환 벼의 Southern 분석 방법과 동일하게 26개의 rbcS-PhyA 형질전환체를 Southern 분석을 수행하였다. 형질전환체 및 비형질전환체로부터 준비한 0.5 g의 잎조직을 액체질소에 얼린 다음 막자사발과 봉을 이용하여 마쇄하고 식물 genomic DNA 분리 용액인 DNAzol[®]ES (Molecular Research Center, Inc., DN128)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 10 ug의 DNA에 EcoRI과 KpnI 제한효소를 각각 사용한 효소 반응액을 37℃ 배양기에서 12시간 반응시켜 완전히 절단시킨후 이를 1% agarose gel에서 30V, 13시간 동안 전기영동시켜 분리 시켰다. 분리된 DNA 단편을 포함하고 있는 gel에 HCl 처리 및 NaOH 처리를 한 후 알칼리 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Hybond-N+; Amersham)으로 전위시킨 후, 2X SSC 용액에서 평형시킨후 salmon sperm DNA가 들어 있는 prehybridization 용액에서 3시간 동안 prehybridization시킨 후, *Arabidopsis* 피토크롬 유전자의 5' 말단 1.1kb의 DNA 조각에 Ladderman[™] labeling kit (Takara)를 사용하여 [32P]dCTP로 labelling한 DNA probe를 prehybridization 용액에 첨가하여 48시간 동안 hybridization 시켰다. Hybridization된 membrane을 세척용액으로 2회에 걸쳐 세척하고 X-ray film에 노출시켰다.

이 결과 모든 형질전환체에서 3.1 kb 분리대가 관찰되는 것으로 보아 *Arabidopsis*의 피토크롬이 도입된 것으로 나타났다. rbcS-PhyA 형질전환체들 중 R47, R71, R73, R79, R80, R81등은 1 copy의 피토크롬이 R84, R85, R43, R45, R35 등은 2-3 copy의 피토크롬이 삽입되었으며, R4, R5, R6 등에서는 rearrange된 것으로 보였다 (그림 4).

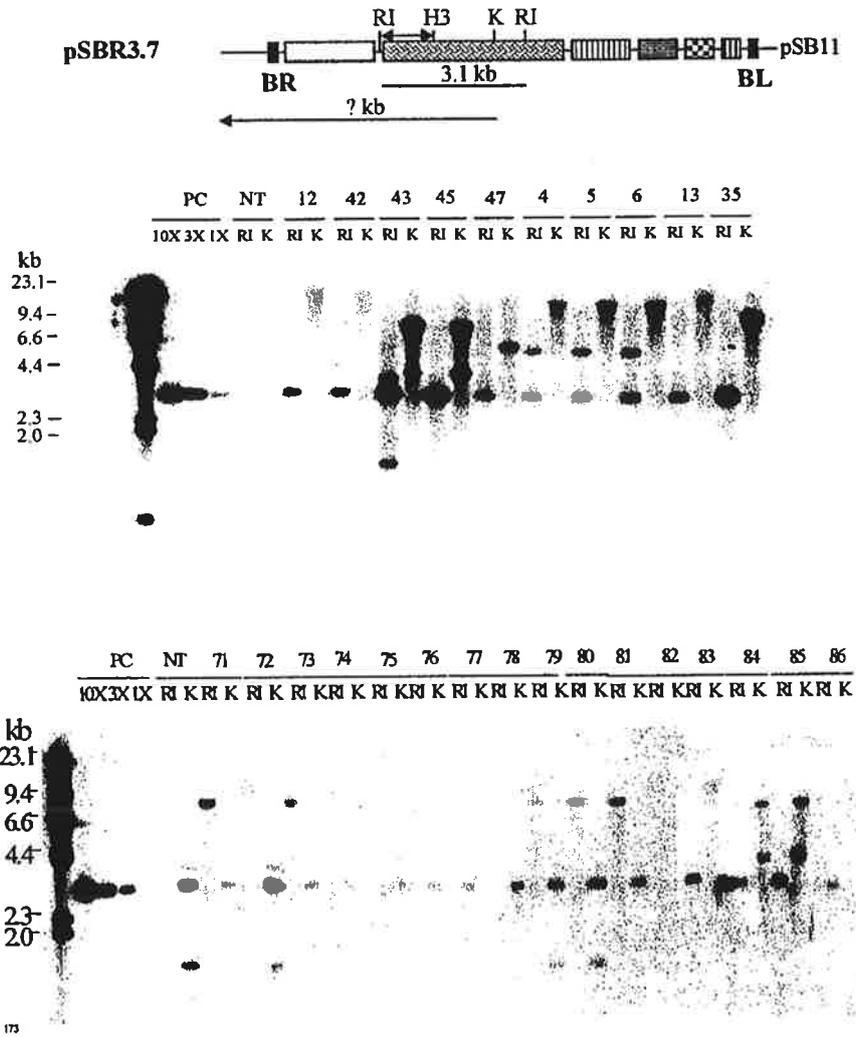


그림 4. Southern-hybridization analysis of RO *rbcS*-PhyA transgenic rice plants.

6. 피토크롬(ubi-PhyA) 형질전환체의 표현형질의 생리적 특성

여러 피토크롬 형질전환체들에서 나타나는 가장 일반적인 표현형의 차이는 형질전환체의 키가 작아지는 현상이 여러 형질전환체를 통해 보고된바 있다. 본 연구에서도 이런 특성을 관찰하고자 수확기에 있는 ubi-PhyA 형질전환 벼의 간장 (culm length) 및 수장 (plant height)을 측정하였다. 피토크롬의 발현이 높을수록 수장 및 간장의 길이가 짧게 나타났다. Southern 분석 결과로부터 분류한 group 별로 수장 및 간장을 나타낸 결과에서 보면 Western 분석 결과에서 피토크롬 발현이 높은 집단에서 길이의 감소의 정도가 크게 나타남을 알 수 있었다.

7. 피토크롬이 도입된 벼 ubi-PhyA1와 rbcS-PhyA의 R₁ 종자 확보

ubi-PhyA와 rbcS-PhyA의 형질전환 벼로부터 R₁ 종자를 채종하였으며 (표 2-1, 2-2), 이들 종자 중 채종수, 발현량 등이 우수한 line들을 골라 발아 후 육묘하였다.

표 2-1. Summary of expression level and copy number of *PHYA* transgene, herbicide resistance and seed recovery of ubi-*PhyA* transformants.

ubi- <i>PhyA</i> Transformant	PHYA transgene (R0)		Herbicide resistance in R1		Seed	
	Expression	Copy #	R	S	R1 generation	R2 generation
U1	+	2	18	10	>100	15 >100
U2	+	M*	15	3	>100	
U3	+	1	16	6	35	
U4	+	1			2	
U5	+	1			10	
U6	ND	M			0	
U7	+++	1	14	4	25	7
U8	++	1			1	
U9	+	1			16	
U10	ND**	M			0	
U11	+	1			15	
U12	+++	1			4	
U13	+++	1	16	4	>100	8

* Multicopy gene integrated

** ND ; not detected

표 2-2. Summary of expression level and copy number of *PHYA* transgene, and seed recovery of *rbcS-PhyA* transformants.

rbcS-PhyA Transformant	PHYA transgene (R0)		Seed	rbcS-PhyA Transformant	PHYA transgene (R0)		Seed
	Expression	Copy #	R1 generation		Expression	Copy #	R1 generation
R4		1-2	45	R75		NE	
R5		1-2		R76		NE	40
R6		1-2		R77		NE	
R12		NE*	90	R78		NE	8
		**					
R13		NE	55	R79		1	
R35		2	20	R80		1	12
R42		NE	90	R81		1	
R43		M*	73	R82		NE	
R45		M	50	R83		2	
R53	+		25	R85		2	
R55	+		100	R86		NE	
R71		1	16	RR1	ND*		171
				2	*		
R72		1	20	RR1	++		221
				5			
R73		1		RR1	++		150
				6			
R74		NE	30	RR2	ND		212
				5			
R47	++	1	264	R84		2	

* Multicopy gene integrated

** ND ; not detected

*** NE ; not estimated

8. R1세대에서 형질전환체의 분석

가. 적색광 원적색광 처리하에서 형질전환체의 특성

피토크롬 형질전환체는 dwarfism, 즉 절간 신장, 개화시기 조절, 노화지연 등 여러 현상들의 변화에 대한 연구가 이미 여러 식물체에서 보고되어 있다. 본 연구결과 획득된 *ubi-PhyA* 형질전환체에 대한 dwarfism을 관찰하기 위해 적색광 및 원적색광의 빛 파장과 양을 조절할 수 있는 상자를 제작하여 형질전환된 씨앗의 발아시 빛에 대한 떡잎의 성장을 대조구와 비교하여 알아보았다.

이 결과 피토크롬이 형질전환체에서 떡잎의 길이가 대조구에 비해 적색광 및 원적색광의 처리 모두에서 줄어들었고, 원적색광의 처리에서 길이의 성장 정도 차이가 크게 나타났다.

나. 제초제 저항성 검증을 통한 R1 세대 형질전환체의 분리비

은실로 옮긴 몇몇 *ubi-PhyA* 및 *rbcS-PhyA* 형질전환 벼에 제초제 검증을 통해 R1 세대에서 분리비를 보았다 (Table 2-1, 2-2). 확인된 개체수의 결과에 의하며 1 copy 형질전환체에서 3:1의 분리비를 보였다. 이는 당해 연도 포장에 전개된 형질전환체의 분리비를 관찰하므로써 더욱 확실한 결과를 볼 수 있을 것이다.

9. R1 세대에서 피토크롬 형질전환체의 발현 분석

R1 씨앗에서 형질전환 피토크롬의 발현 정도를 확인하기 위해서 Western 분석을 수행하였다. 피토크롬 발현이 우수하게 보인 몇 line과 야생형의 벼 씨앗을 껍질을 벗겨내고 소독을 한후 4 mg/l phosphinotrisin이 들어있는 MS배지에 치상을 하고 암상에서 7일간 키운 후 유묘를 잘라서 western 분석을 수행하였다. 각각의 시료 0.5 g의

있을 막자사발에서 액체질소로 급냉시켜 마쇄한 후 1.5 ml의 추출 완충액 [67 mM Tris-HCl (pH8.3), 93 mM (NH₄)₂SO₄, 7 mM Na₄EDTA, 20 mM sodium metabisulfite, 33% ethylene glycol, 0.1% (w/v) polyethyleneimine, 4 mM PMSF, 1 ug/mL leupeptin]을 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 시료는 얼음 속에서 1시간 동안 rocking 하였고, 4℃ 11,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 각각의 단백질 100 µg을 7% SDS-PAGE에서 전기영동하고, PVDF membrane (Milipore Cat#IPVH 00010, 0.45 mm)으로 transfer하기 위해 electroblotter (Hoefer Cat#TE22)를 이용하여 150 mA에서 3시간 동안 electroblotting 하였다. Immunodetection을 위해 사용한 일차 항체는 단자엽과 쌍자엽 피토크롬을 동시에 인식하는 073D와 단자엽 피토크롬만 인식하는 1.9B5A를 미국 캘리포니아 대학 (Berkeley)의 Peter Quail 교수로부터 분양을 받아 사용하였고, 이차 항체는 Immuno-Star Anti-Mouse Detection Kit (Bio-Rad Cat#170-5010)를 구입하여 alkaline phosphatase가 달린 Anti-Mouse antibody를 사용하여 x-ray 필름에 발광시켜 관찰하였다.

이 결과 비형질전환 벼에서 보다 형질전환체에서 피토크롬의 발현이 높게 관찰되었다. 특히 U13, U1의 ubi-PhyA와 R15, R16, R47의 rbcS-PhyA 형질전환체에서 도입된 피토크롬이 높게 발현되고 있다 (그림 5). 또한 단자엽/쌍자엽 피토크롬 모두에 특이적으로 반응하는 073D mAb와 단자엽 피토크롬에만 특이적으로 반응하는 1.9B5A mAb의 반응 결과 높게 발현되는 피토크롬은 *Arabidopsis*의 피토크롬이 높게 발현되는 것으로 나타났다.

10. ubi-PhyA, rbcS-PhyA 형질전환체 육성

가. 씨앗 발아(發芽)

각 line 당 30여개의 씨앗을 Petridish에서 25℃ 배양기에서 하루 동안 체중 시킨 후 3MM paper를 깔 petridish로 옮겨 2일간 발아를 유도하였다 (표 3).

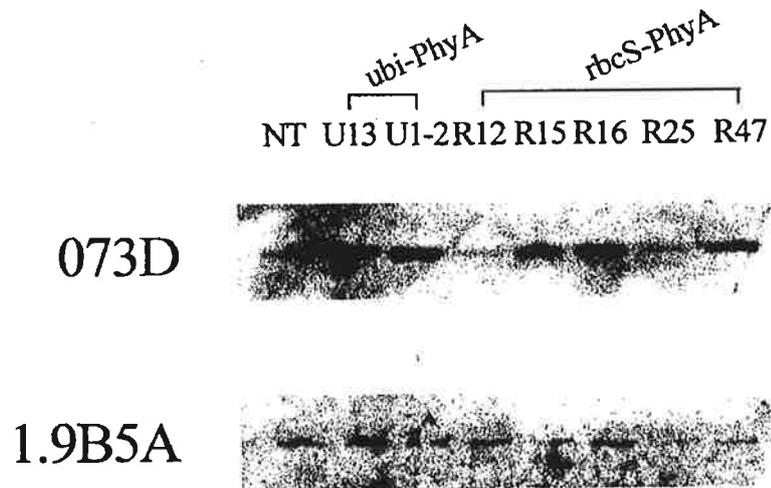


그림 5. Western Blot Analysis of ubi-PhyA and rbcS-PhyA transformants in R1 generation.

NT: etiolated nontransgenic rice seedlings

U : etiolated ubi-PhyA rice seedlings

R : etiolated rbcS-PhyA rice seedlings

073D : monocot/dicot phytochrome reactive monoclonal antibody

1.9B5A : monocot phytochrome reactive monoclonal antibody

표 3. Planning of transplanting ubi-PhyA and rbcS-PhyA transformants in rice field and pots.

ubi-PhyA						rbcS-PhyA					
R1 generation			R2 generation			R1 generation			R1 generation		
Field	U1	20	Field	U1-1	20	Field	R71	16	Pot	R77	5
	U2	20		U1-2	20		R72	20		R78	8
	U3	20		U1-3	20		R74	20		R80	12
	U13	20		U1-4	20		R76	20	Field	R1	20
Pot	U1	10		U1-6	20		R79	20		R2	20
	U2	10		U1-7	20		R82	20		R5	20
	U3	10		U1-8	20		R4	20		R8	20
	U5	2		U2-1	20		R12	20		R9	20
	U13	10		U2-2	20		R13	20		R12	20
				U2-3	20		R42	20		R13	20
				U2-4	20		R43	20		R15	20
			Pot	U3-1	3		R45	20		R16	20
				U3-6	1		R47	20		R25	20
				U7-1	3		R52	20		R26	20
				U7-2	4		R53	20		R32	20
				U13-1	4		R54	20			
				U13-4	4		R55	20			

* Total number of transplanted seeds

1) Rice field

ubi-PhyA : 15개체 x 20 = 300 seeds

rbcS-PhyA: 29개체 x 20 = 580 seeds

2) Pot

ubi-PhyA : 61 seeds

rbcS-PhyA: 25 seeds + 145 seeds (29개체 x 5 seeds) = 170 seeds

나. 핀셋 파종(播種) 및 육묘(育苗)

발아된 유묘를 6×12의 흠이 있는 육묘판에 수도용 흠을 채운 후 물을 충분히 적시어 흠이 다져지게 하였다. 각 흠 당 9개의 씨앗을 핀셋을 이용하여 옮겨 심었다. 심겨진 씨앗은 온실에서 3주간 키운 후 온실 밖으로 옮겨 1주간 더 키운 후 모내기에 적합한 크기의 육묘로 키웠다 (그림 6).

다. 모내기

어린 묘를 경북대학교 포장에 30×17 cm 간격으로 각각 한 포기씩 모내기를 하였다. 각 line당 20개의 묘를 개체 하나씩 심었고, 20개에 못미치는 경우에는 자도를 심어 환경적 변이를 최소화였다 (그림 6B). 또한 각 line 당 4-5 개의 묘를 분석을 위해 포트에 심어 두었다 (그림 6C).

11. 피토크롬 형질전환체의 표현형질과 생리적 특성

여러 피토크롬 형질전환체들에서 나타나는 가장 일반적인 표현형의 차이는 형질전환체의 키가 작아지는 현상이 보고된바 있다. 이와 같은 현상이 피토크롬 형질전환 벼에서도 잘 나타나고 있다. 본 연구에서도 이런 특성을 관찰하고자 수확기에 있는 ubi-PhyA, rbcS-PhyA 형질전환 벼의 culm length, panicle length 및 plant height를 측정하였다. 대략적으로 발현율이 높은 U13, U3 line과 R15 line에서 비형질전환체의 70-90% 정도의 plant height를 보였다. 또한 키가 작아지는 현상은 피토크롬의 발현이 높을수록 크게 나타나는 것으로 보아 피토크롬의 발현 양과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다(그림 7, 8, 표 4).

또한 형질전환체의 출수시기가 늦어지고 옆면적의 증가 현상을 보였

다. 특히 U13 line은 2주, U3은 5일, 나머지 line에서는 2-4일 정도로 출수 시기가 늦게 나타났다. 이 또한 피토크롬 형질전환체에서 나타나는 개화시기 변화와 관계있는 현상으로 여겨진다. U13, U7, U3 line에서 옆 면적의 증가를 관찰할 수 있었다.

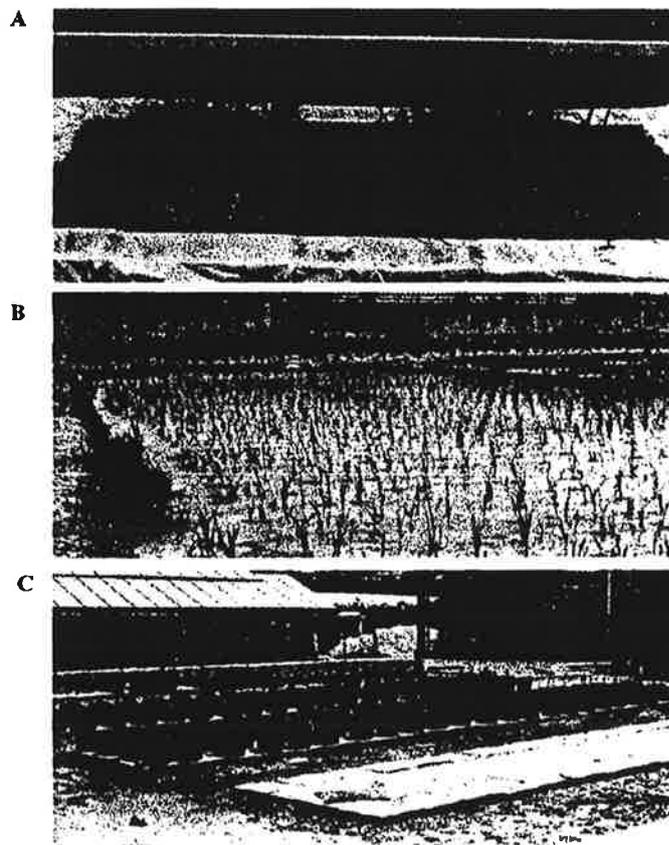


그림 6. Transgenic plants transplanted in rice field and pots.
 A. One month-old transgenic rice plants transplanted in rice seedbeds. B. Transgenic rice plants transplanted in rice field. C. Transgenic rice plants transplanted in pots.

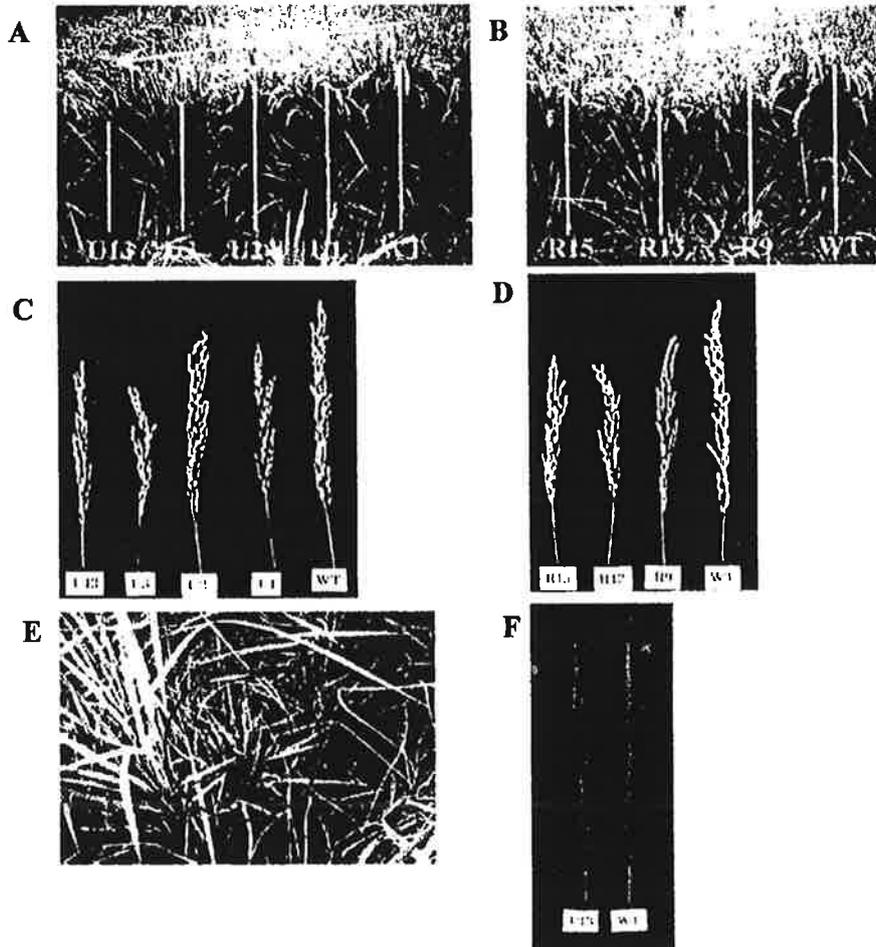


그림 7. Phenotypic traits of transgenic rice plants.

A and B : *ubi-PHYA* and *rbcS-PHYA* transgenic rice plants
(R1 generation) in rice field

C and D : Panicles of *ubi-PHYA* and *rbcS-PHYA* transgenic riceplants

E : U13 *ubi-PHYA* line

F : flag leaves from U13 *ubi-PHYA* line and WT

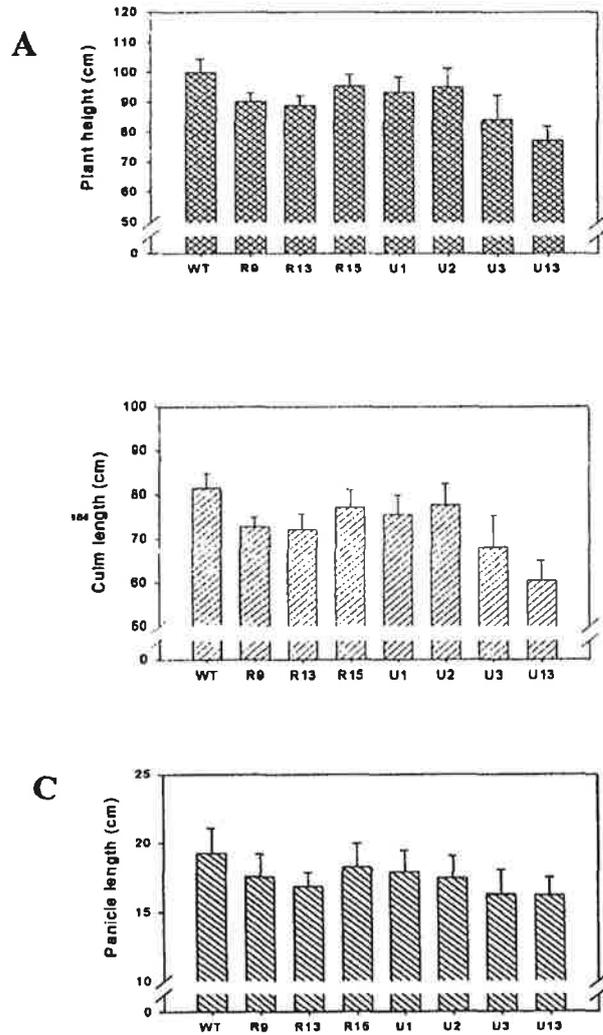


그림 8. Plant height, culm length and panicle length of transgenic rice plant (R1 generation) grown in rice field.

표 4. Summary of *ubi*-PHYA and *rbcS*-PHYA transformants.

Transformant	PHYA transgene (R ₀)		Herbicide resistance in R ₁		Ratio of transgenic rice plants to WT plant		
	Expression level	Copy number	R	S	Culm length	Panicle length	Plant height
U1	+	2	22	4	0.93	0.96	0.93
U2	+	M*	22	4	0.95	0.94	0.95
U3	+	1	12	3	0.83	0.87	0.84
U13	+++	1	12	2	0.74	0.91	0.77
R9	ND**	ND	25	4	0.89	0.92	0.90
R13	++	2	23	3	0.88	0.73	0.89
R15	++	1	19	6	0.94	1.01	0.95

12. 형질전환 벼의 교배

형질전환시 나타날 수 있는 여러 변이는 제외시키고 새로이 도입되어 발현된 피토크롬의 성질만을 나타내는 벼를 만들기 위해서 교배는 필수적이다. 이를 위해 출수시기의 낙동벼의 영으로부터 제웅을 하고 형질전환벼의 수술을 이용하여 교배를 시켰다. 이 중 R47과 R9 line의 9, 25개의 교배립을 얻었다 (그림 9).

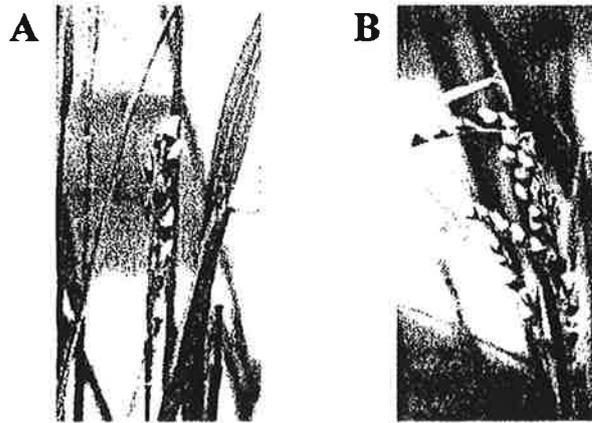


그림 9. Rice seeds produced by backcross.

A. rbcS-PhyA (R47), B. rbcS-PhyA(R9)

13. 형질전환체의 포장 전개

가. PhyA 형질전환 벼의 제초제 저항성 검증을 통한 homo, hetero, recessive line 선발

수확한 씨앗을 제초제가 함유된 배지에 치상하여 발아 및 성장 상태를 관찰하여 Homo, hetero, recessive Line 선발하였다 (표 4). 이 결과와 4차년도 형질전환체의 결과를 바탕으로한 data 분석 결과, transgene copy 수가 적고 (1-2 copy), 발현율인 높은 형질전환체로 ubi-PhyA line에서는 U1, U2, U3, U7, U13 line을 선택하였고, rbcS-PhyA line에서는 R12, R13, R16, R47, R73, R74 line을 선택하였으며 각각의 line에 대하여 Homo, Hetero, recessive를 선발하여 포장 전개하였다 (표 5).

나. 씨앗 발아

각 line 당 50여개의 씨앗을 culture tube에서 하루동안 체중시킨 후 3MM paper가 깔려진 petridish로 옮겨 2일간 발아를 유도하였다.

다. 핀셋 파종 및 육모

발아된 유모를 6×12의 홈이 있는 육모판에 수도용 흙을 골고루 채운 후 물을 충분히 뿌려 흙을 다졌다. 각 홈 당 9개의 씨앗을 핀셋을 이용하여 옮겨 심은 후 온실에서 3주간 키웠다. 3주간 온실에서 자란 모를 야외 환경에 적응하도록 온실 밖에서 1주간 더 키웠으며, 모내기 에 적합한 크기의 모를 얻을 수 있었다.

라. 모내기

어린 묘를 경북대학교 내에 위치한 논에 각 Line당 한 포기씩 22개체를 30× 17cm 간격으로 포장 전개하였다. 그리고, 22개체가 안되는 line은 자도를 심어 환경적 변이를 최소화하였다.

마. 출수일 확인

모내기 10주 후 형질전환체와 비형질전환체의 출수일(Heading time)을 확인하였다. 형질전환체가 비형질전환체 보다 부분적으로 3-2일 출수 시기가 빨리 나타났다. 특히 U3, R47, R74 line에서 3일 빠른 출수일이 보였지만 각 line이 모두 피는 시기는 비형질전환체와 같이 하였다. U13, U1, U7, R12, R13, R16, R72 line에서는 비형질전환체와 같은 시기의 출수일이 나타났으며, U2 line은 2일 늦게 나타났으며, 특히 multi copy인 U13 line의 경우 비형질전환체보다 2일 늦게 출수일이 나타났으며, 모든 개체가 출수되는 시기는 비형질전환체 뿐만 아니라 다

른 형질전환체보다 30일 늦게 나타났다.

표 4. Selection of Homo, Hetero and Recessive lines by Herbicide Test

Transformant		Herbicide resistance		비교*
		R	S	
U1	A	39	3	H
	F	38	4	H
	O	23	9	R
	S	38	4	H
U2	A	42	0	H
	K	42	0	H
	Q	7	35	R
R13	F	31	11	h
	H	38	4	H
R16	A	41	1	H
	F	38	4	H
	S	38	4	H
R47	D	42	0	H
	R	19	24	R
R72	A	40	2	H
	I	40	2	H
	L	42	0	H
R74	H	41	1	H
	K	41	1	H

* 전체 42개 중 저항성을 나타내는 씨앗 수가 38~42 개 (H : homo), 30~37 개 (h : hetero), 0~29 개 (R : Recessive)로 함

표 5. Planning of transplanted of the ubi-PhyA and rbcS-PhyA transformants in rice field

Line	Homo	Hetero	Recessive	Total(50 Line)
WT				6
4 ⁺ (U3)		G, O ⁺		2
5(U13)		F, R, Q		3
6(U1)	A, F, S	R3	O	5
7(U3)		J, K, L		3
7(U13)		O, P, Q		3
15(U2)	A, S, K		Q	4
18(U7)		Q, S		2
19(R72)	A	K	C	3
20(R74)	D, K, H		I	4
32(R47)	A, D	C	G	4
43(R12)	A, E	F	G	4
44(R13)	A, H		R	3
46(R16)	A, F, S		E	4

14. Phytochrome 형질 전환체의 표현형질과 생리적 특성 분석

지금까지 알려진 Phytochrome 형질전환체들에서 나타나는 일반적인 표현형질의 생리적 특징은 형질 전환체의 키가 작아진다는 것이다. 4차년도 연구에서와 같이 이런 형질 전환체의 특성을 관찰하고, 이렇게 상대적으로 줄어든 키가 생산량에 미치는 영향을 알아보기 위해 ubi-PhyA, rbcS-PhyA 형질전환 벼의 plant height, culm length, panicle length 및 각각의 line에서 500 seed weight, tiller 수, total weight(각각 line의 전체 seed weight), seed number/tiller를 산출하여 생산량(Yield)과의 관계를 분석하였다.(표 6, 7, 8, 9)

가. Ubi-line의 표현형질의 생리적 특징

Ubi-line의 표현형질의 생리적 특징은 비형질전환체와 비교하였을 때 Plant height와 culm length가 72~89%로 감소되었으며, 특히 Phytochrome의 발현율이 높은 U3, U13 Line은 plant height에서 각각 73%, 88% 그리고 culm length에서 각각 72%와 76%로 같은 ubi-line의 다른 형질전환체보다(90~94%) 키가 작아지는 현상을 볼 수 있었다(표 6, 그림 10). 또한 panicle length도 감소되었다(그림 12A). 포장된 벼의 제초제 저항성 검증을 통해 그 분리비를 알아보았다. Homo line에서는 전체 저항성이 나타났으며, hetero line과 recessive line에서는 3:1과 1:1의 분리비가 나타났다(표 6).

Grain weight와 tiller 수를 조사한 결과 특히 U3의 7J line에서 tiller number가 21개로 비형질전환체의 14.3개 보다 많은 것을 볼 수 있었으며, U1과 U2 line(60 line: 14.5, 15A: 17.4)에서 약간의 증가를 보였다. 그리고 500개 씨앗의 무게는 대부분의 ubi-line에서 증가했으며, U3 line (13.602g)은 비형질전환체(12.094g)보다 1.5g 더 많이 나

왔다 (표 7). 그리고, 형질전환체의 seed size를 비형질전환체와 비교하였을 때 크게 증가된 것으로 나왔다. 특히 U3 line이 가장 크게 증가되었다 (그림 13).

표 6. Plant height, culm length and panicle length of the Ubi-transgenic rice (R3 generation) grown in rice field

Line	Herbicide test	Plant height (cm)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Ratio of Tansgenic rice to Wild type			
					Plant height	Culm length	Panicle length	
WT	- - - -	93.87	73.34	20.55	100	100	100	
U1	6A(H)	+ + + +	89.03	71.03	18	94.84	96.85	87.59
	60(R)	- - + +	85.82	68.09	17.59	91.42	92.84	85.60
U2	15A(H)	+ + + +	84.99	67	17.96	90.54	91.36	87.49
	15Q(R)	+ + + +	86.13	67.3	18.8	91.75	91.76	91.48
	4G(h)	- + + +	69.32	52.82	16.5	73.85	72.02	80.29
U3	40(h)	- + + +	73.81	57.48	16.33	78.63	78.37	79.46
	7J(h)	- + + +	83.23	65.8	17.43	88.67	89.72	84.82
U13	5Q(h)	- + + +	76.35	56.631	20.04	81.34	76.78	97.52

표 7. Tiller number, weight of 500 seeds, seed number per tiller of the Ubi - transgenic rice(R3 generation) grown in rice field

Line	Grain Weight					
	Tiller number	500 seeds weight(g)	Weight/ Tiller	Seed num/ Tiller	Seed num/ 포기	
WT	14.3	12.094	2.19	90.54	1337.0	
U1	6A(H)	14.2	11.958	1.93	80.70	1122.0
	60(R)	14.5	12.051	1.47	60.99	782.5
U2	15A(H)	17.4	12.647	1.70	67.21	1164.0
	15Q(R)	14.7	12.7	1.95	76.77	1136.2
	4G(h)	10	13.602	1.08	41.34	498.5
U3	40(h)	14	13.533	1.34	49.50	779.6
	7J(h)	23	12.645	1.41	55.75	1083.4
U13	10Q(h)	13.4	12.650	0.87	34.39	446.6

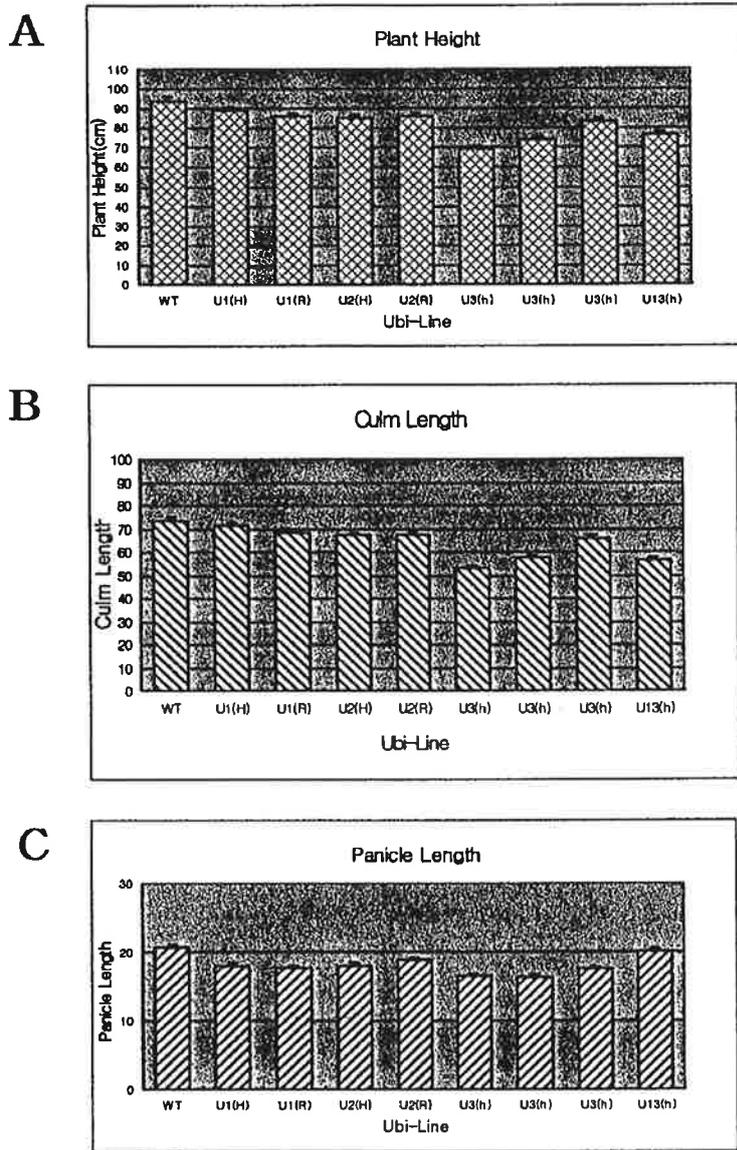


그림 10. Plant height, culm length and panicle length of the Ubi-transgenic rice(R3 generation) grown in rice field

나. rbcS-line의 표현형질의 생리적 특징

rbcS-line의 표현형질의 생리적 특징은 ubi-line에서 보여진 plant height와 culm length의 줄어듦이 비교적 작았지만, 비형질전환체와 비교하였을 때 plant height와 culm length가 90-97%로 감소하였다. 특히 R12, R13, R72의 Homo line에서 비형질전환체의 90-92%크기로 나타났다 (표 8, 그림 11). rbcS-line의 panicle length는 homo line에서는 비형질전환체와 비교적 같은 크기로 나타났으며, hetero 및 recessive line에서는 감소되었다 (그림 12B). 그리고, ubi-line에서와 마찬가지로 포장된 상태의 벼에 제초제 저항성 검증을 통하여 그 분리비를 알아본 결과 Homo line에서는 각 line의 전 개체에서 제초제 저항성이 있는 것으로 확인되었으며, hetero line은 3:1의 비율로 나타났으며, recessive line에서는 각 line의 전 개체에서 제초제 저항성을 발견할 수 없었다 (표 8). 형질전환체의 grain weight와 tiller 수를 조사하였으며, rbcS 전체 line에서 비형질전환체의 tiller number보다 적은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 500개 seed weight의 경우 비형질전환체(12.094g)보다 많이 나왔으며, seed weight/tiller, seed number/tiller 조사 결과 R12, R13, R16, R47, R72, R74 line에서 한 tiller 당 seed weight가 모두 증가 한 것을 볼 수 있었고, 전반적으로 Homo line에서 나타났다. 그리고, 모든 rbcS-line에서 비형질전환체 보다 seeds size가 더 크게 나타났으며, 특히 R12, R42, R72의 seeds이 비형질전환체 보다 더 큰 seeds size를 나타내었다 (Fig. 14). R12의 Homo line과 R47의 Homo 및 recessive line은 비형질전환체(90.54개)의 seeds number/tiller을 비교하였을 때 각각 102.85개, 95.96개, 96.66개로 더 많이 나타났다. 그러나 포기 당 seed number는 wild type과 비교하였을 때 더 많은 수를 보이는 line은 나타나지 않았다 (표 9).

표 8. Plant height, culm length and panicle length of the rbcS-transgenic rice (R3 generation) grown in rice field

Line	Herbicide test	Plant height	Culm length	Panicle length	Ratio of Tansgenic rice to Wild type			
					Plant height	Culm length	Panicle length	
WT	- - - -	93.87	73.34	20.55	100	100	100	
R12	43E(H)	+ + + +	88.12	67.56	20.56	93.87	92.12	100
	43F(h)	- + + +	85.38	66.33	19.26	90.96	90.44	93.72
	43G(R)	- - - -	88.97	69.5	19.74	94.78	94.76	96.06
R13	44H(H)	+ + + +	87.54	68.1	19.44	93.26	92.86	94.66
	44R(R)	- - - -	87.91	68.97	18.94	93.65	94.04	92.17
R16	46S(H)	+ + + +	94.93	74.24	20.96	101.1	101.2	100.7
	46E(R)	- - - -	91.3	71.3	19.99	97.26	97.22	97.27
R47	32D(H)	+ + + +	95.74	74	20.93	102.0	100.9	101.8
	32C(h)	+ + - -	94.62	74.91	19.71	100.8	102.1	95.91
	32G(R)	- - - -	90.86	71.1	19.77	96.79	96.95	96.20
R72	19L(H)	+ + + +	87.11	67.52	19.58	92.80	92.06	95.28
	19K(h)	- + + +	86.76	67.73	19.03	92.43	92.35	92.6
	19C(R)	- - - -	91.88	73.09	20.17	97.88	99.66	98.15
R74	20K(H)	- + + +	90.8	71.5	19.3	96.73	97.49	93.92
	20I(R)	- + + +	89.31	70.36	18.95	95.14	95.94	92.21

표 9. Tiller number, weight of 500 seeds, seed number per tiller of the rbcS-transgenic rice(R3 generation) grown in rice field

Line	Grain Weight					
	Tiller number	500 seeds	Weight/ Tiller	Seed num/ Tiller	Seed num/ 포기	
WT	14.25	12.094	2.19	90.54	1337.0	
R12	43E(H)	11.93	13.077	2.69	102.85	1205.9
	43F(h)	11.13	13.264	2.12	79.92	888.1
	43G(R)	11.69	13.172	2.25	85.41	1001.0
	44H(H)	13.25	13.293	2.19	82.37	1076.5
R13	44R(R)	14.09	13.073	1.94	74.20	1056.4
	46S(H)	11.73	12.712	2.26	88.89	1039.6
R16	46E(R)	13.25	12.309	2.04	82.87	1094.3
	32D(H)	12.56	12.818	2.46	95.96	1194.8
R47	32C(h)	13.45	13.131	2.35	89.48	1187.6
	32G(R)	12.90	12.363	2.39	96.66	1238.8
R72	19L(H)	14.25	12.622	2.18	86.36	1303.3
	19K(h)	13.00	13.630	2.24	82.17	1078.5
	19C(R)	13.31	12.715	1.80	70.78	991
R74	20K(H)	12.71	13.067	2.24	85.71	1101.6
	20I(R)	12.54	13.478	1.97	73.08	1019.1

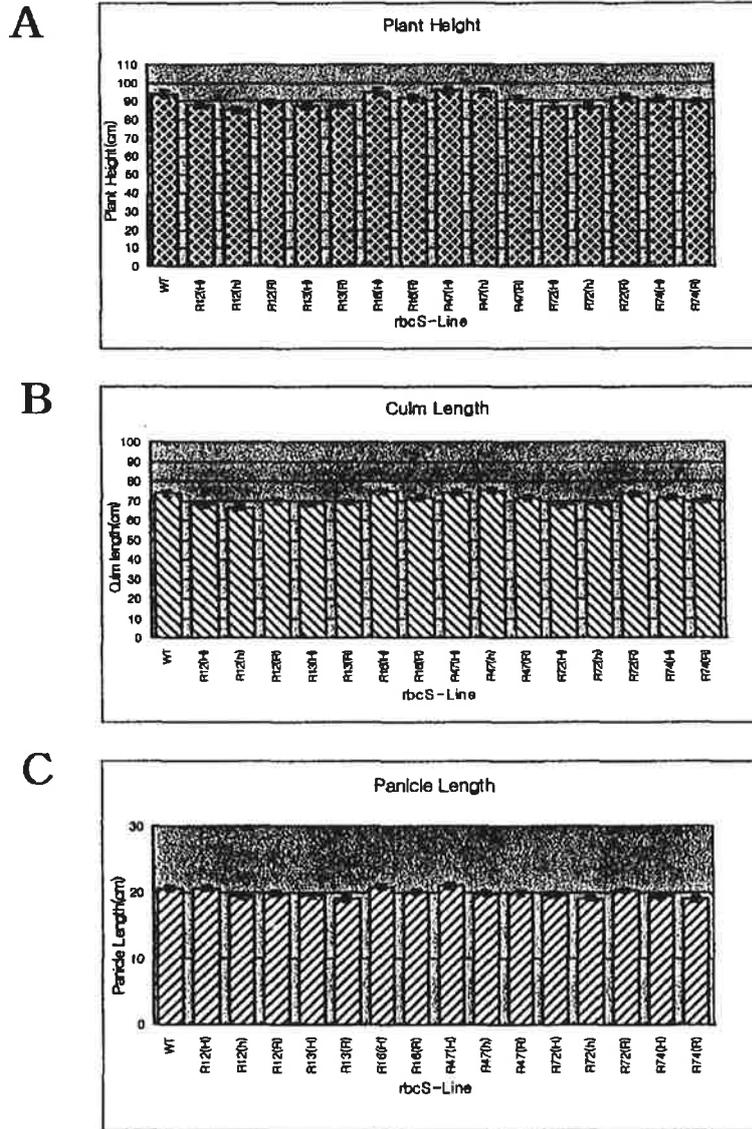


그림 11. Plant height, culm length and panicle length of the rbcS-transgenic rice(R3 generation) grown in rice field

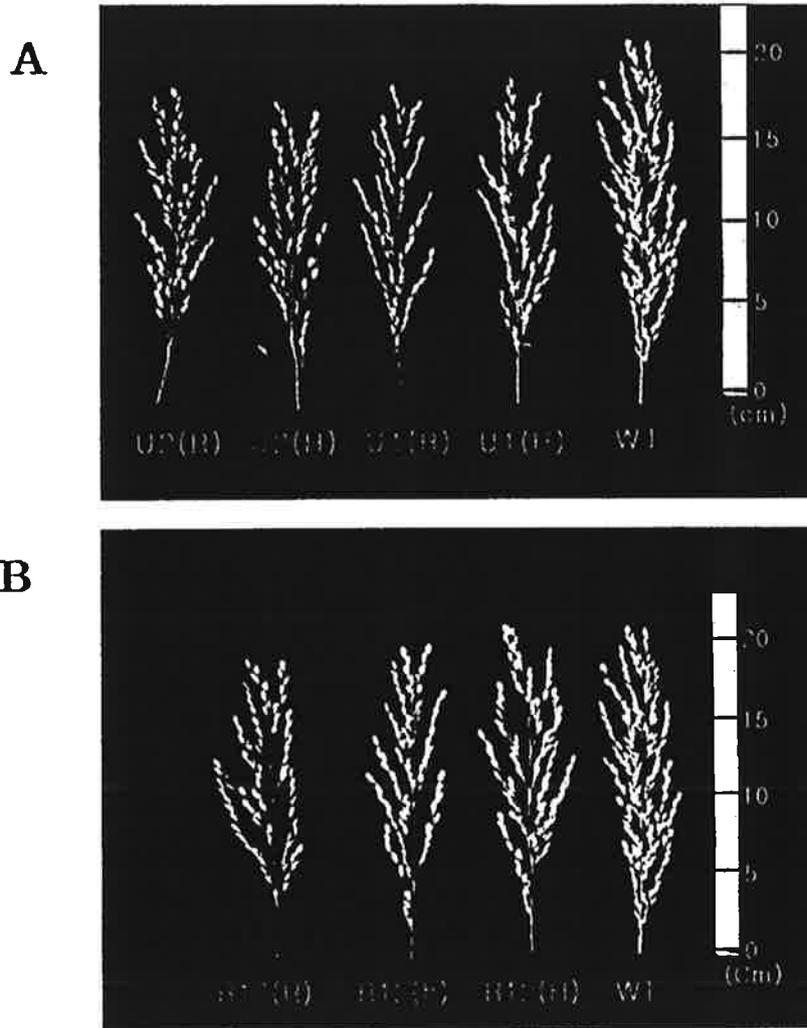


그림 12. Panicles of transgenic rice plants

A: Ubi-PhyA line (H: homo, R: recessive)

B: rbcS-PhyA line (H: homo, h: hetero, R: recessive)

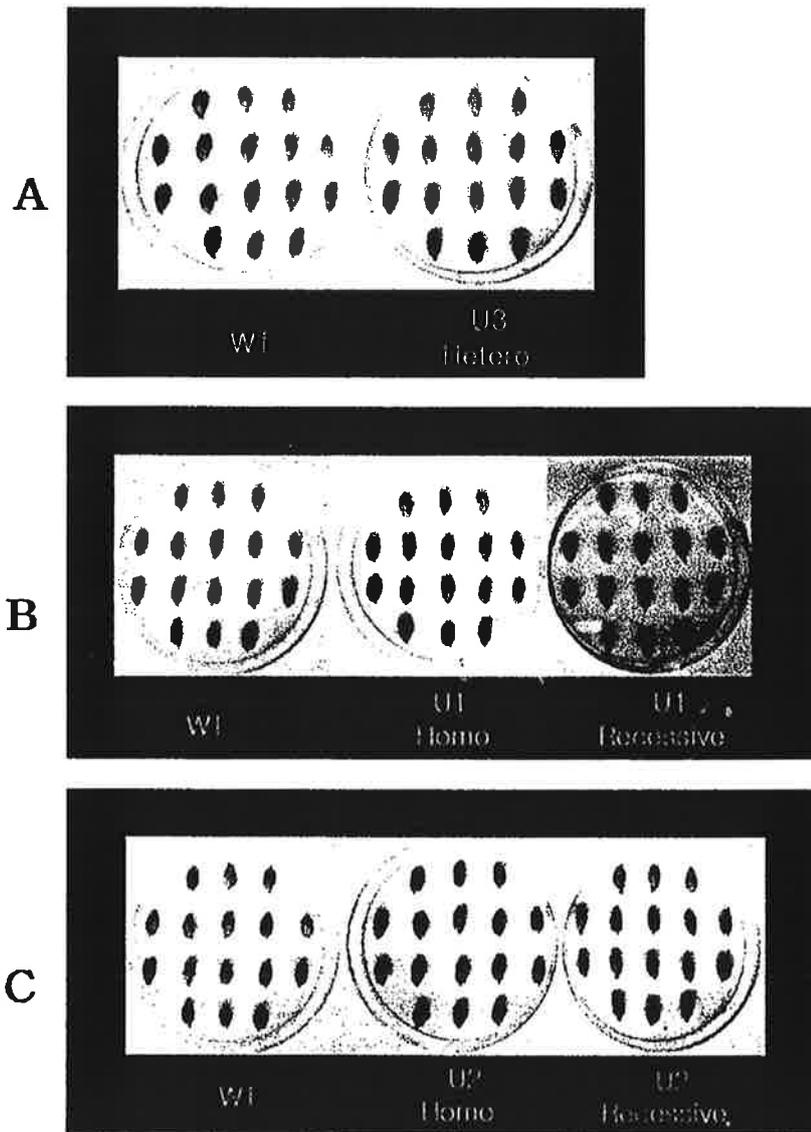


그림 13. Comparison of ubi-transgenic rice with wild type seeds size

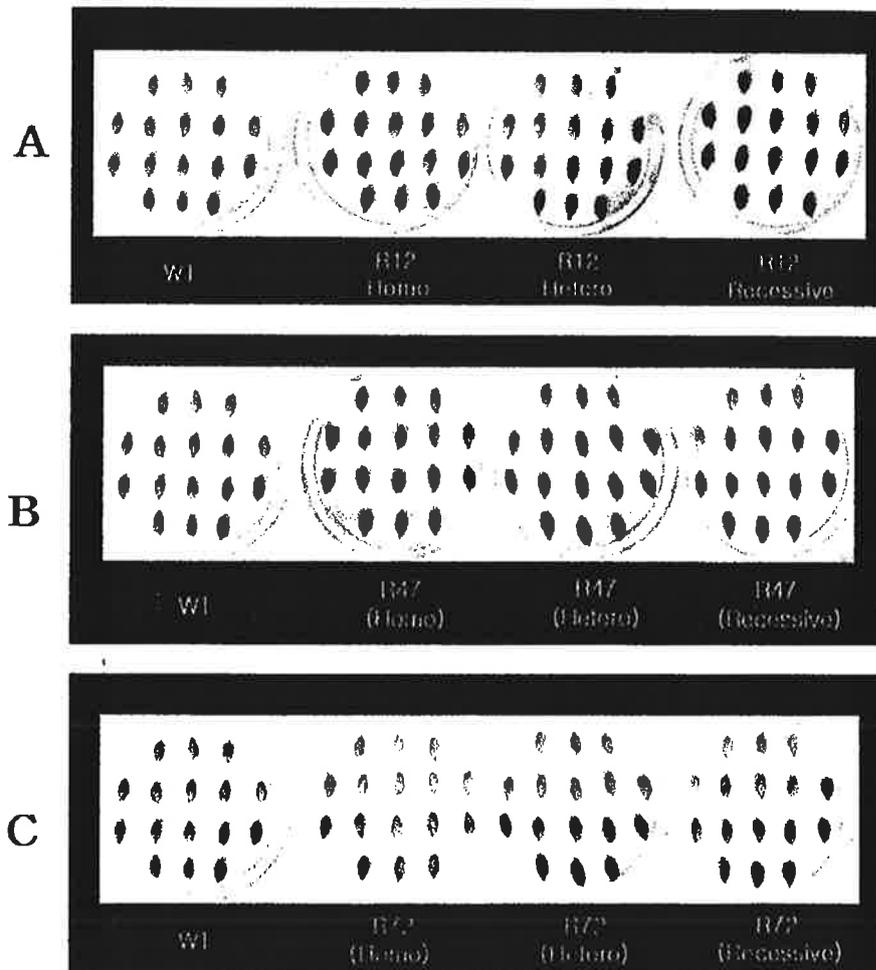


그림 14. Comparison of *rbcS*-transgenic rice with wild type seeds size

다. 밀식 재배와 동일한 환경조건에서 형질전환체의 생리적 특성분석 식물체들을 밀식 재배하였을 경우 이웃하는 식물체에서 반사되거나 투과되어 나온 장파장(FR)들의 증가로 인하여 R light/FR light의 비율이 감소하게 되는데, 이러한 환경적 변화는 피토크롬에 의해 인지되며, 식물체들이 웃자라게 되는 signal source로서 작용한다. 피토크롬 A를 과량발현시켰을 때 이러한 식물체의 신장이 억제되며, 웃자람이 방지된다. 본 실험은 피토크롬을 과량 발현시킨 형질전환 벼를 밀식 재배하였을 때와 동일한 환경조건을 인위적으로 조성하여 형질전환 벼의 생리적 특징을 관찰하는데 그 목적이 있다.

1) Shade avoidance response 실험준비

가) Homo, hetero, recessive line 선별 및 발아

포장전개를 위해 선별된 Homo, hetero, recessive line을 선택하여 화분에 옮겨 심은 뒤 설치된 장치 안에서 생리적 특징을 관찰하였다.

나) 차광막 설치

경북대학교 내에 위치한 온실 안에 가로(2.5m)×세로 (1m)×높이 (1.5m)의 차광막에 FR light가 방출되는 형광등을 설치하였으며, 다른 하나는 차광막만 존재하는 상태로 두었고, 또 다른 하나는 차광막을 설치하지 않은 태양광 상태로 두어 대조구로 관찰하였다 (Fig 15).

다) 결과

그림 15A의 경우 야생종의 성장율이 형질전환체 homo, hetero line의 성장을 보다 높게 나타냈다. 그러나, 형질전환체의 recessive line에서 야생종보다 더 높은 성장율을 나타냈다. 대조군으로서 그림 15B는

야생종의 성장률이 가장 높게 나타났으며 키 또한 가장 컸다. 그리고, 그림 15C의 경우에서도 마찬가지로 야생종의 성장률이 가장 컸으며, plant height 또한 가장 컸다.

피토크롬 형질전환체의 경우 일반적인 생리적 특징으로 비형질전환체의 plant height 및 culm length의 성장이 억제된다. 앞서 실험한 결과 밀식재배하였을 때와 동일한 환경을 조성한 상황에서 비형질전환체의 plant height의 성장률이 형질전환체보다 더 높게 나타났기 때문에 밀식 재배시 더 많은 환경적 영향을 받게 될 것으로 생각된다.

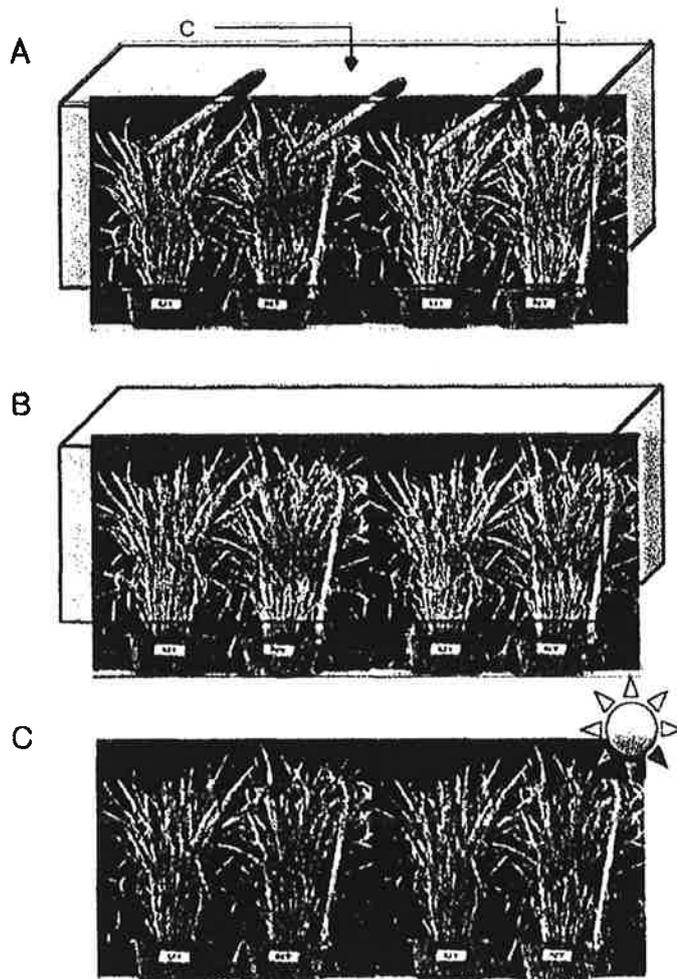


그림 15. Investigation of shade avoidance response by canopy
 A: canopy and FR light rich lamp, B: only canopy, C: only sun
 light, c: canopy, L: FR light rich lamp

15. 고찰

본 연구에서는 수도직파재배 적합형인 밀식 재배 저항성을 갖는 벼 개발을 목표로 밀식 재배 저항성 유전자 (Phytochrome)를 식물에서 개발하고 이들을 벼 유전자 프로모터에 연결하여 벼 핵에 형질전환 시킨 후 형질전환체를 선발 도입유전자의 존재 및 발현을 확인하였고 도입유전자의 다음세대로의 유전양상의 검색과 생물검정을 통해 최종 연구 목표를 달성하였다.

이에 본 연구에 대한 결과를 구체적으로 분석 정리하면 다음과 같다. 우선 밀식 재배 저항성 유전자로 *Arabidopsis*의 피토크롬 A 유전자 (*phyA*)를 확보하였다. 핵 형질전환용 유전자 운반체 제작을 위해 각각 다른 프로모터를 사용하였다. 하나는 벼에서 분리된 *rbcS* 프로모터로써 광합성이 가장 활발하게 일어나는 벼의 잎 조직에서 피토크롬을 조직 특이적으로 높은 수준의 발현을 유도하는 특징을 갖고 있으며, 또 다른 하나는 옥수수에서 분리된 *Ubi-1* 프로모터로 자체의 exon과 intron이 연결되어 있으며, 외부 환경적인 요인 (특히 빛)에 관계없이 단자엽 식물의 전조직에서 강력하게 피토크롬을 발현할 수 있는 특징을 가지고 있다. 이들 각각의 프로모터를 제초제 저항성 유전자를 선택 marker로 가지고 있는 운반체에 삽입하였다. 그 결과 *rbcS* 프로모터를 이용한 pSBR1과 *ubi-1* 프로모터를 이용한 pSBU2.0운반체를 제작하였다. 분리한 피토크롬 A 유전자를 pSBR1과 pSBU2.0 각각에 삽입하여 최종적으로 벼 핵형질전환용 운반체인 pSBU3.7과 pSBR3.7을 제작하여 *Agrobacterium*을 이용한 벼 형질전환을 달성하였다. 우선 pSBR3.7을 통해 만들어진 형질전환체는 'R' line으로 명명하였고, pSBU3.7을 통해 만들어진 것은 'U' line으로 명명하였다.

형질전환된 벼의 분자유전학적 분석을 통해 각 line의 특징들을 구

명하였다. U-line의 특징은 피토크롬 A의 발현 정도가 R-line에 비해 상대적으로 높으며, copy number은 1~2로 나타났다. 이들의 culm length, panicle length 및 plant height는 야생종에 비해 약 15% 정도 감소하며, R-line보다 높은 비율로 감소하였다. 그리고, 이 U-line의 seed weight에서 seed 하나의 크기는 야생종에 비해 크며, 무게도 야생종에 비해 증가하였지만, 임실율이 낮아 전체 생산량은 감소하였다. U-line에는 형질전환된 피토크롬의 발현 정도와 copy number가 다른 U1(발현정도:1, copy number:2), U2(발현정도:1, copy number: multicopy), U3(발현정도:1, copy number:1), U13(발현정도:3, copy number:1) line이 있으며 U1, U2는 homo line, U3, U13 line은 hetero line이다. 우선 homo line의 키는 hetero line 보다 약 10cm 크며, seed weight도 적었다. 특히 U2 line이 U1 line에 비해 한 개체 당 tiller 수도 증가하였고, plant height도 더 작아졌으며 상대적인 seed weight가 증가되었다. Hetero line에서 U3 line이 피토크롬의 발현 정도가 3배나 큰 U13보다 plant height와 culm length의 감소 비율이 높아 훨씬 키가 작지만 seed weight는 U line에서 상대적인 값이 가장 높게 나타났다. 즉 U line에서 homo line보다 hetero line에서 plant height, culm length가 줄어들게 되는 생리적 특성과 seed weight의 증가가 높게 나타났다. 그러나 생산량에 있어서 hetero line의 임실율이 낮아서 homo line의 생산량이 훨씬 높게 나타났다.

따라서 U1, U2의 homo line이 훨씬 유용하다. 이들 line은 야생종에 비해 plant height와 culm length가 모두 감소하며, 상대적인 seed weight도 증가한다. 비록 다른 line에 비해 그 비율이 낮지만, 임실율이 높기 때문이다.

rbcS 프로모터를 이용한 R-line의 homo line에서 R12, R13, R72

line은 plant height와 culm length가 많이 감소하였으며, 상대적인 seed weight는 증가되었다. 반면 R16, R47 line은 plant height와 culm length에 큰 변화가 없으며, 오히려 상대적인 seed weight는 감소되었다. 특히 R12, R72의 hetero line에서는 plant height와 culm length의 감소비율이 높아 키가 가장 작고, 상대적인 seed weight는 증가되었다. 그리고 R line의 하나의 tiller에 대한 seed weight는 야생종보다 많았다. 그러나 야생종에서 한 개체에 분화되는 tiller 수가 약 1-2개 정도 많기 때문에 한 개체에 대한 seed weight는 야생종이 더 많아 R line의 생산량은 야생종에 비해 낮게 나타났다. 이러한 결과는 R line에서는 U line에 비해 피토크롬의 발현 정도가 낮고 생리적인 특성의 변화가 작지만, 상대적인 seed weight가 증가되었음을 알 수 있다. 그리고 U line에 비해 입실율이 높다.

위의 내용을 정리하여 보면 다음과 같다. 서로 다른 프로모터를 사용한 R-line과 U-line에서 U-line이 피토크롬의 발현 정도가 높으며 그에 따른 plant height, culm length 및 panicle length가 더 많이 감소되었다. 특히 hetero line에서 큰 차이를 보이거나 입실율이 낮아 실제적인 생산량은 줄어들었다. 반면에 homo line은 hetero line에 비해 키에 대한 감소 비율은 낮지만 입실율이 높아 생산량에는 큰 효과를 주고 있다. 따라서 homo line인 U2 line이 유용한 종자로서 사용할 수 있다. 반면 R line은 피토크롬의 발현 정도가 그리 높지는 않으나 상대적인 seed weight는 증가되었다. 이는 프로모터에 의한 발현량의 정도가 벼의 신장 억제 효과를 가져 왔지만, 피토크롬의 증가된 발현량에 따라 입실율이 감소하여 생산량 증가에 역기능을 미친다는 결론을 예견할 수 있다. 따라서 형질전환된 피토크롬의 발현량이 상대적으로 적은 rbcS 프로모터를 이용한 R-line의 생산량은 야생종과 비교하였을 때 Tiller

당 seed weight 및 seed 수는 많았지만, 포기 당 tiller 수가 적었기 때문에 생산량이 적었다. 하지만 그 차이는 매우 작았다. 이것은 형질 전환벼가 내도복성 유전자를 포함한 밀식재배 저항성을 가지고 있기 때문에 단위 면적당 심을 수 있는 개체수를 비형질전환체보다 더 많이 증가시키더라도 밀식에 따르는 환경적 영향(R/FR light의 비율감소로 인한 웃자람)의 정도가 비형질전환체보다 적다는 것을 실험을 통해서 밝혔으며, 포기 당 tiller 수가 적어 생산량이 미비하게 적어진 것 밀식에 따르는 포기수의 증가를 통해 충분히 극복할 수 있다.

본 연구에서는 유전공학적인 방법으로 식물의 피토크롬 유전자를 벼에 형질전환시켜서 밀식재배 적합형 및 한발 저항성 벼를 개발하여 생산성을 높이고 키를 작게 하며 다수확 내도복성 품종을 개발을 달성하였다.

또한 밀식 재배 가능한 신품종 개발로 노동력 절감 및 생산량 증대를 통하여 농민의 소득 증대 및 국가 농업기반 강화할 수 있으며, 주곡 식물을 분자수준에서 조작할 수 있게 됨에 따라 다른 식물체의 형질전환에 파급 효과가 클 것으로 기대된다. 벼 형질전환 연구를 위한 기본 기술 및 체제를 근거로 핵 형질전환 기술을 개발하고 이 기술의 빠른 국내 정착화와 다양한 유용 작물에의 광범위한 응용연구로 이 분야의 선두주자가 될 수 있을 것으로 기대된다.

16. 연구성과

가. 국외 학술대회 발표

포스터 발표(국외)

Garg, A. K., Kim, J.-K., Wu, R. (1999) Genetic engineering of indica rice for increased harvest index through light-regulated expression of a heterologous phyA gene. The International program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24, poster.

Kong, S.-G., Jang, I. C., Kim, J.-K., Kim, I.-S. (1999) Transgenic rice plants overexpressing *Arabidopsis* phyA gene to suppress shade avoidance response. The International Program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24, poster

나. 국내 학술대회 발표

포스터발표(국내)

Kwak S.-G., Kong S.-G and Kim I.-C (1999) Red and far-red light effects on protein phosphorylation in Phytochrome-transgenic rice plant. '99 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울 교육문화회관, 1999. 10. 25-26, 포스터.

Kong, S.-G., Jang, I.-C., Kim, J.-K. and Kim I.-S (1998) Transgenic rice plants overexpressing the *Arabidopsis* Phytochrome A gene. '98 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울대학교 문화관, 1998. 10.22-24, 포스터.

제 5 장 엽록체 내 유전자 발현시스템 개발

제1절 서 설

본 연구에서는 GFP를 벼 *rbcS* 프로모터 및 *rbcS* transit peptide (Tp)를 이용하여 벼 엽록체(chloroplast)내에 발현, 엽록체에 유전자 산물의 축적을 유도함으로써 Trehalose synthase 유전자와 같이 세포질 내에 발현시 식물체 성장에 나쁜 영향이 염려되는 것의 문제점을 피하는데 사용코자 하였고 또한 광합성 관련 유전자 등 엽록체에서 기능을 하는 유전자 형질전환 연구에 이용코자 하였다. 이러한 연구는 도입유전자의 발현 산물을 엽록체 내에 축적함으로써 단백질의 안정성 및 발현 양을 세포질에 위치 시켰을 때 보다 향상된 결과를 예측, 대량 발현 코자 하는 유전자의 발현에 이용하여 새로운 유전공학적 대량 발현 시스템을 개발하고자 하였다. 연구결과 얻어진 형광 엽록체 벼는 엽록체를 미토콘드리아 및 다른 세포내 소기관들과 구별하여 쉽게 관찰할 수 있기 때문에 엽록체 내 유전자 산물의 축적은 물론 식물 엽록체의 생리 및 발달단계별 형태연구에 이용가치가 있을것으로 예상된다.

Green fluorescent protein(GFP)은 Jellyfish *Aequorea victoria*로부터 분리된 것으로 238개의 아미노산으로 구성되어있고 분자량이 27 kDa인 monomer이며 ultra violet 또는 blue light에서 그린 빛의 형광을 나타내는 특징을 가지고 있다. 야생형의 GFP는 395 nm의 빛을 최적으로 흡수하며 509 nm의 형광 빛을 발산한다. 이러한 빛은 GFP내의 세개의 아미노산으로 구성된 chromophore로부터 비롯되며

Ser65-dehydroTyr66-Gly67이 환상구조를 형성하고있다. GUS(β -glucuronidase), LUC(luciferase), LacZ(β -galactosidase), CAT(chloramphenicol acetyl transferase)등 기존에 많이 쓰이던 reporter 들은 결과의 관찰을 위해서는 기질이나 조요소를 필요로 하는 반면 GFP는 기존의 reporter와는 달리 기질이나 조요소를 필요로 하지 않고 단지 UV나 blue light상에서 쉽게 결과를 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있으며 또한 다른 reporter로는 가능하지 않은 핵에서 발현된 단백질의 이동 경로와 세포 내에서의 위치, 바이러스의 식물체 내로의 감염 경로 및 분포 등을 쉽게 관찰할 수 있으며 세포뿐만 아니라 개체를 살아있는 상태로 분석할 수 있는 장점을 가지고 있어 최근 새로운 reporter로써 많이 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 외래 유전자의 엽록체내 발현을 위한 시스템을 개발코자 벼 형질전환에 있어서 형질전환체의 형질전환 여부를 식물체뿐만 아니라 캘러스 상태에서 쉽게 관찰할 수 있도록 하기 위해 GFP를 reporter로 사용하고 선발 유전자인 제초제 저항성 유전자를 함께 도입함으로써 기존의 형질전환체의 선별방법과 비교하여 보다 향상되고 효율적이며 확실한 결과를 예측하는데 역점을 두었다. 본 연구에 사용된 GFP유전자는 야생형을 변화시켜 동물 또는 식물에 도입시킬수 있도록 아미노산 합성에 대한 코돈 사용을 변형하여 합성한 것이며 또한 chromophore를 형성하는 세 개의 아미노산 중 65번째 Serine을 Threonine으로 치환함으로써 야생형 GFP보다 형광강도가 6배가 향상된 synthetic GFP(sGFP)를 사용하였다.

본 연구에서는 GFP를 벼 rbcS 프로모터 및 transit peptide를 이용하여 벼 세포질(cytoplasm)과 엽록체(chloroplast)에 각각 발현시킴으로서 1차적으로는 *Agrobacterium*에 의한 벼 형질전환 기술을 확립하고

또한 세포질뿐만 아니라 엽록체에 유전자 산물의 축적을 유도함으로써 기존의 세포질 발현과의 발현량을 비교 분석하고 광합성 관련 유전자등 엽록체에서 기능을 하는 유전자 형질전환 연구에 이용코자 하였다. 또한 rbcS Tp sequence에 의한 엽록체내 발현 및 발현 축적의 기작을 검증코자 들연변이 시킨 rbcS Tp sequence를 제작 벼에 형질전환하여 rbcS Tp sequence에 의한 엽록체내 targeting 및 발현 축적의 원인을 밝히고자 하였다.

제2절 연구개발 내용 및 방법

1. 엽록체내 발현 운반체 제작 및 세포질 발현 운반체 제작

본 연구에서 사용하는 모든 유전자는 pSB11의 left border와 right border내에 제작되었다.

가. GFP의 세포질 발현용 운반체(pSB-RG) 제작

선발 마커로써 제초제 저항성 유전자를 가지고 있는 pSB105에 벼 rbcS 프로모터-sGFP 유전자를 도입하여 pSB-RG를 제작하였다.

나. 엽록체(chloroplast) 발현용 운반체 제작

1) 벼 rbcS 프로모터-transit peptide sequence의 분리

벼 rbcS 유전자를 가지고있는 운반체인 pRR1은 미국 코넬대 Dr. Ray Wu 실험실로부터 분양 받아 사용하였다. 벼 rbcS 프로모터-transit peptide의 분리를 위해 pRR1으로부터 PCR을 실시하였다. pRR1에서 rbcS의 5'프로모터 지역에 22개의 염기로 구성된 primer(P_B)를 제작하였고 rbcS의 첫 번째 exon-intron 연결부위에 제한효소 NcoI의 인식부위를 추가로 첨가한 29개의 염기로 구성된 다른 하나의 primer(P_N)를 제작한 다음 PCR을 실시하여 약 1.5kb의 DNA를 증폭시켰다

2) 벼 rbcS 프로모터-transit peptide와 sGFP의 연결 및 연결부위의 염기서열 확인

벼 rbcS 프로모터-transit peptide와 sGFP의 연결을 위해 PCR로 증폭한 1.5kb의 DNA 단편과 sGFP 유전자를 포함하고 있는 운반체인 pSK-sGFP를 각각 제한효소 BamHI과 NcoI으로 함께 절단하였다. 절단된

PCR산물은 low-melting agarose gel을 통해 1.5kb의 band를 분리해내어 정제한 다음 pSK-sGFP에 연결반응을 실시하여 pSK-RTG를 제작하였다. 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

3) 엽록체 발현용 GFP유전자 함유 운반체 제작 (pSB-RTG)

pSK-RTG로부터 rbcS 프로모터-transit peptide-sGFP 부분을 제한효소 BamHI과 NotI을 이용하여 절단하였으며 선발 마커로써 제초제 저항성 유전자를 가지고 있는 pSB105 에 연결반응하여 엽록체 발현용 GFP유전자 함유 운반체인 pSB-RTG를 제작하였다.

다. rbcS Tp 특성 규명을 위한 운반체 제작

1) rbcS Tp sequence 들연변이체 (mTp)의 합성

mTP의 합성을 위해 rbcS-Tp-sgfp가 연결되어있는 pSK-RTG를 주형으로 사용하였고 PCR을 위한 primer 제작 시 forward primer에는 Tp sequence의 번역 시작점으로부터 5번째 위치에 염기 G를 첨가하고 reverse primer에는 GFP 번역 시작점으로부터 Tp sequence쪽으로 8번째 염기 T를 제거함으로써 단백질 발현 시 fusion되는 GFP의 정상적인 발현에는 전혀 이상이 없도록 코돈 사용을 고려하여 제작하였고 PCR을 통하여 약 150 kb의 DNA 단편을 증폭하고 이를 mTp로 명명하였다.

2) mTp가 도입된 벼 형질전환용 운반체 제작

PCR에 의해서 증폭된 DNA 단편과 rbcS 프로모터-Tp가 위치한 pET-RT를 각각 제한효소 PstI과 NcoI으로 절단한 다음 pET-RT의 Tp sequence 대신 mTp를 위치시켜 pET-RmT를 제작하였다. RbcS 프로모터-mTp-sgfp를 연결하기 위해 pSK-RTG를 제한효소 BamHI과 NcoI으로 절단하여 rbcS 프로모터-Tp를 제거하고 그 자리에 pET-RmT로부터 rbcS-mTp를 위치시켜

pSK-RmTG를 제작하였고, 그 후 벼 형질전환용 운반체로써 선발마커로 35S 프로모터-bar-3' nos가 위치되어 있는 pSB105에 rbcS 프로모터-mTp-sgfp를 위치시켜 최종 운반체 pSB-RmTG를 제작, 완성하여 염기서열 확인분석을 통하여 Tp sequence내의 염기 G의 첨가와 T의 제거를 통한 Tp 돌연변이체 (mTp)의 염기서열을 정확히 확인하였다.

2. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입 및 확인

가. Triparental mating 방법

벼 형질전환용 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입은 intermediate vector (pSB11)를 가지고 있는 *E. coli* DH5 *a*와 acceptor vector(pSB1)를 가지고 있는 *Agrobacterium* LBA4404사이에 conjugal strain인 *E. coli* HB101 (pRK2013)을 통해 운반체를 전달하는 triparental mating 방법으로 수행하였다.

Triparental mating에 앞서 각각의 균주를 양호한 상태로 사용하기 위해 DH5 *a* (pSBG700)를 LB + spectinomycin 50ug/ml(LBS) 고체배지, HB101(pRK2013)을 LB + kanamycin 50ug/ml(LBK) 고체배지에 각각 도말하여 37℃ 배양기에서 하룻동안 배양하였고 LBA4404(pSB1)는 AB + tetracyclin 10ug/ml(ABT)고체배지에 도말한후 28℃ 배양기에서 3일 동안 배양하였다. Triparental mating을 위해 nutrient agar고체배지에 맨 먼저 LBA4404(pSB1)를 도말하고 그 위에 HB101(pRK2013)을 도말한후 마지막으로 DH5 *a* (pSBG700)를 도말 하여 세 균주를 잘섞어준 다음 28℃ 배양기에서 하룻동안 배양하였다. 그후 섞여있는 세 가지 균주를 AB + spectinomycin 50ug/ml + tetracyclin 10ug/ml(ABST) 액체배지 400ul에 녹인 후 ABST고체배지에 도말 하고 28℃배양기에서 3일 동안 배양한 후 배지 위에 형성된 단일 콜로니를 새로운 ABST고체배지에 옮겨주었다.

두번 계대배양후 최종적으로 형성된 단일 콜로니 8개를 확보하고 핵형 질전환용 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입후 co-integration을 확인 하는 실험을 실시하였다.

나. Co-integration된 플라스미드 DNA 분리

Plasmid DNA의 분리를 위해 빠르고 손쉬운 mini-prep방법을 사용하였다 (Li et al. 1995). ABST 고체배지에서 배양중인 단일콜로니를 취해 YEP + spectinomycin 50ug/ml + tetracyclin 10ug/ml(YEPST) 액체배지 5 ml에 접종한 후 28℃, 200 rpm으로 2일 동안 진탕 배양하였다. 그 후 4℃ 4000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 통해 세포 덩어리를 얻은 다음 세포용해를 위해 Sol'n I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA) 200ul와 10mg/ml lysozyme 20ul를 넣고 용해시켰다. Sol'n II (0.2N NaOH, 1% SDS) 400ul를 첨가하고 잘섞어준다음 얼음에서 15분 동안 반응시킨후 Sol'n III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, H₂O 28.5ml) 300ul 넣고 섞은 후 얼음에서 30분 동안 두었다. 4℃, 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 약 700ul의 상등 액을 취한 다음 페놀용액(pH 8.0) 400ul를 첨가하여 2분간 섞어주고 chloroform : isoamylalcohol(24:1)을 동량 넣어준후 2분간 더 섞어주고 위와 동일한 조건에서 원심분리를 실시하여 상등 액을 500ul 취하였다. -20℃에 보관중인 isopropanol을 500ul 첨가하고 -20℃ 냉동실에 1시간동안 DNA를 침전시킨다음 14,000 rpm으로 10분간 원심분리를 통해 DNA를 얻어낸 후 TE (pH8.0) 용액 60 ul에 녹였다.

다. Co-integration된 플라스미드 DNA의 제한효소 절단확인

*Agrobacterium*내에서 co-integration된 운반체의 확인을 위해, 분리

해낸 플라스미드 DNA를 제한효소 Sal I 으로 절단한 후 비교 분석하였다. 대조구로는 pSB1을 따로 분리하여 제한효소 Sal I으로 절단한 것을 사용하였다. Sal I으로 절단된 pSB1과 cointegrate에서 생성되는 DNA단편을 비교하므로써 두 플라스미드가 *Agrobacterium*내에서 cointegration 되었음을 증명하였다. 이때 cointegrate된 운반체에서는 5.3kb band가 사라지고 7.3kb와 3.1kb band가 새로 생김을 확인함으로써 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입을 확인하였다.

3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환

본 연구의 수행시 사용한 벼 형질전환 배양배지의 종류 및 조성은 제 2장의 표 1 에 명시하였고 벼 형질전환에 대한 실험 방법은 제 2장의 제2절 연구개발 내용 및 방법 연구 수행 방법에 명시한 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

4. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정

본 연구에서는 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자를 사용하였기 때문에 일반적인 항생제 저항성 유전자와는 달리 조직배양시 캘러스 수준에서의 선발뿐만 아니라 형질 전환된 식물체 수준에서도 선발할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 실험실에서는 실험실에서 선발되어 재분화된 벼 식물체를 온실에서 약 한 달간 키운 후 제초제 저항성 검정을 실시하였다. 형질 전환된 벼 식물체의 제초제 저항성을 검정하기 위해 시중에서 판매중인 제초제인 Basta용액을 0.5%로 200배 희석하여 사용하였다. 대조구로는 형질 전환시키지 않은 낙동벼를 사용하였다. 검정하고자 하는 잎의 끝을 하얀 색 물감으로 표시한 다음 0.5% Basta용액을 잎의 전면, 후면에 골고루 바른 후 1주일 뒤에 관찰한 결

과 대조구는 잎이 갈색으로 마르고 시든 반면 형질전환체는 아무런 변화를 관찰 할 수 없었고 본래의 초록색 잎을 유지하였다.

5. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석

형질전환 벼 식물체 내에 도입 유전자 확인 및 도입된 유전자수 (copy number)를 알아보기 위해 southern 분석을 수행하였다.

가. 벼 genomic DNA의 분리

온실에서 성장중인 벼 식물체로부터 준비한 0.5g의 잎조직을 액체질소에 얼린 다음 막자사발과 봉을 이용하여 마쇄하고 식물 genomic DNA 분리 용액인 DNAzol[®]ES(Molecular Research Center, Inc., DN128)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 마쇄된 벼조직에 guanidine-detergent lysing 용액 1.5 ml을 첨가하고 5분간 상온에서 잘 섞어주었다. Chloroform 1.5ml을 첨가하여 20초간 vortexing하고 12,000g, 10분간 원심분리하여 상등액을 취했다. 상등액에 1.5ml의 에탄올을 첨가하여 genomic DNA의 침전을 유도하고 5,000g로 4분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 genomic DNA pellet만을 얻었다. 멸균수 150ul를 첨가하여 genomic DNA를 녹이고 guanidine-detergent lysing 용액과 에탄올이 1 : 0.75 volume 섞여있는 용액 1.5 ml 첨가하고 5,000g로 4분간 원심분리후 상등액을 제거하였다. 95% 에탄올 1.5ml을 첨가하여 5,000g로 4분간에 genomic DNA를 washing하였다. DNA pellet을 말린다음 8mM NaOH 50 ul 첨가하여 genomic DNA를 녹이고 0.1M HEPES 6ul를 첨가하여 pH를 8.0으로 맞추었다.

나. Genomic Southern-blot

Fluorometer(Hoefer)를 이용하여 genomic DNA를 정량하고 5ug의 genomic DNA를 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 100V로 8시간 전기영동하였다. 전기영동후 아가로스 젤을 0.25 N HCl에 15분간 shaking하여 depurination하고 0.4 N NaOH에 15분간 shaking하여 denaturation하였다. Capillary transfer 방법으로 아가로스젤로부터 Hybond N+ membrane(amersham)에 0.4N NaOH로 12시간 베틀 genomic DNA를 전이하고 membrane을 2X SSC(20X SSC:175.3g NaCl, 88.2g sodium citrate, pH 7.0)에 10분간 중화시켰다. 베틀 genomic DNA가 전이된 membrane을 hybridization 용액 (0.5 M Na₂PO₄, pH 7.2, 1 % Bobine Serum Albumin, 7 % Sodium Dodecyl sulfate, 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 3시간 동안 pre-hybridization시킨 후, 방사선 동위원소로 표지된 GFP 유전자를 probe로 사용하여 65℃에서 12시간 hybridization 반응하였다. GFP 유전자에 의해 hybridization된 membrane을 washing 용액 (1차: 2X SSC, 0.1% SDS, 2차: 1X SSC, 0.05% SDS, 3차: 0.5X SSC, 0.05% SDS)을 사용하여 비특이성 결합을 제거하고 -70℃에서 x-ray film으로 감광하여 발현을 관찰하였다.

6. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석

가. Total RNA 의 분리

실험에 사용할 기구는 1회용 튜브 및 팁을 가압 멸균하여 사용하고, 유리 용기 및 막자사발은 200℃ 건열 멸균하고 사용할 모든 시약은 0.1% diethyl pyrocabonate (DEPC)로 처리하여 고압멸균하거나 0.1% DEPC 처리하고 고압멸균한 증류수로 제조하여 사용하였다.

Total RNA의 분리는 Chomczynski와 Sachhi의 acidic phenol 방법에 따라 수행하였다. 약 2-3g의 식물 조직을 액체 질소에 얼린다음 막자사

발을 이용하여 마쇄하고 10ml의 추출 완충용액을 (4M guanidinium isothiocyanate, 25mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% sarkosyl)을 첨가한 후 잘 섞어주었다. 1ml의 sodium acetate pH 4.0을 첨가하고 섞어준 다음 10ml의 물로 포화시킨 phenol을 넣고 잘 섞어준 후 2ml의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 첨가하여 섞어주고 5,000g에서 10분간 원심 분리한 후, 상등액을 취하였다. 동량의 isopropanol을 넣고 잘 섞어준 후, -20℃에서 1시간 이상 방치한 후 4℃에서 10,000g로 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 500 ul의 DEPC를 처리한 증류수로 침전물을 녹였다. 동량의 4M LiCl을 넣은 후 4℃에서 1시간 이상 방치하고 14,000g에서 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 취한 침전물을 70%의 냉각된 ethyl alcohol로 씻어준 뒤 건조시켰다. 적정량의 DEPC 처리수를 첨가하여 잘 녹여준 뒤, 농도와 순도를 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

나. Northern blot

위에서 분리한 total RNA의 10ug을 iodoacetamide (0.084g/100ml)가 함유된 1.2 % 아가로스 젤에 전기영동하고 Southern-blot에서 언급한 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Hybond-N+; Amersham)에 전이시켰다. Membrane의 pre-hybridization, hybridization 및 washing은 위에서 언급한 Southern-blot가 동일한 방법으로 수행하였다.

7. 형질전환체의 단백질 발현 분석

형질전환체의 단백질 발현을 관찰하기 위해 형질 전환된 캘러스와 형질 전환된 벼 식물체로부터 단백질을 분리해 낸 후 western분석을 실시하였다.

가. 용해성 단백질 추출 및 정량

형질전환된 캘러스와 잎을 액체질소에 얼린 다음 탁자사발에서 같은 후 추출 용액 TEN buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 30 mM NaCl, 2 mM PMSF) 500ul를 각각 넣고 얼음 위에서 1시간동안 단백질 추출반응을 실시한 후 4℃ 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 대조구로는 형질전환하지 않은 낙동벼 캘러스 및 잎을 사용하였다. 추출된 단백질은 Bradford 용액에 넣어 흡광도 595 nm에서 O.D를 측정하고 bovine serum albumin으로 측정한 standard curve를 이용하여 정량하였다.

나. Western-blot 분석

위에서 분리된 용해성 단백질을 15% SDS-PAGE에서 40mA로 약 1시간 전기 영동하였다.

PVDF membrane (Milipore Cat# IPVH 00010, 0.45 mm)으로 단백질을 전이하기 위해 semi-dryblot (Phamacia)을 이용하여 15 V에서 1시간 동안 blotting하였고 단백질이 전이된 membrane을 blocking buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, 2.5% (w/v) Bovine Serum Albumin)에 넣고 1시간 반응하였다. Blocking buffer를 제거하고 membrane을 GFP 항체가 첨가된 incubation buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, 1% (w/v) Bovine Serum Albumin)에서 12시간 반응하였다. Alkaline phosphatase가 연결되어 있는 2차 항체가 첨가된 incubation buffer에서 1시간 반응하고 washing buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20)로 비특이성 결합을 제거한 후 NBT와 BCIP를 이용한 색깔반응

으로 membrane 상에 GFP의 발현을 관찰하였다.

8 Confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 이용한 GFP의 발현 및 세포내 분포관찰

본 연구에서는 기존에 형광현미경 하에서 관찰하기 어려웠던 GFP의 세포 내에서의 분포를 관찰하기 위해서 세포질 내에 발현시킨 GFP 및 엽록체로 targeting시킨 GFP를 관찰하기 위해 대전 기초과학 지원 연구소의 CLSM (Carl Zeiss LSM410)을 사용하였다.

제3절 연구개발 결과

1. 엽록체내 발현 운반체 제작 및 세포질 발현 운반체 제작

본 연구에 사용된 기본적인 운반체(pSB11) 및 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pSB1)는 일본 Komari group으로부터 분양받아 사용하였다. 이 운반체의 특징으로 acceptor 운반체인 pSB1은 *Agrobacterium*뿐만 아니라 *E. coli*에서도 복제할 수 있는 복제 origin을 가지고 있으며 tetracycline 저항성 유전자를 포함하고 Vir B, C, G를 과량 발현하도록 고안된 운반체로 LBA4404내에 상주하는 플라스미드이고 intermediate 운반체 pSB11은 *E. coli*에서만 복제할 수 있는 복제 origin과 spectinomycin 저항성 유전자를 포함하는 super binary 운반체 시스템으로 기존의 운반체들에 비해 보다 향상된 것이다.

본 연구에서 사용하는 모든 유전자는 pSB11의 left border와 right border내에 제작되었다.

가. GFP의 세포질 발현용 운반체(pSB-RG) 제작

pSB-RG는 벼 *rbcS* 프로모터에 sGFP 유전자를 연결한 운반체로써 terminator로서는 *PinII* terminator를 사용하였으며 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자를 CaMV 35S 프로모터와 *NOS* terminator에 연결하였다 (그림 3A). pSB-RG는 벼 *rbcS* 프로모터를 사용하여 빛에 의해 GFP의 발현을 유도할 수 있으며 엽록체 내 발현용 운반체인 pSB-RTG (*rbcS*-Tp-sgfp)와의 발현량을 비교 분석하기 위해 제작되었다. 제초제 저항성 유전자(*bar* gene)를 선발마커로 사용되었기 때문에 형질전환 식물체를 만든 다음에 온실이나 포장에서 형질전환 식물체를 쉽게 구별할 수 있어서 후대육종 및 포장시험에 매우 유용하게 이

용될 수 있는 장점을 갖고 있다.

나. 엽록체(chloroplast) 발현용 운반체 제작 (pSB-RTG)

RuBisCo (Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase)는 광합성 중에 CO₂를 D-glucose로 변환하는 칼빈 회로에서 최초 CO₂를 잡는 효소로써 이 효소는 CO₂가 공유결합을 형성하는데 도입되는 것을 촉매하고 이와 동시에 일어나는 5탄당인 Ribulose 1,5-diphosphate가 2분자의 3-phosphoglycerate로 분해되는 것을 촉매한다. 이 효소는 8개의 큰 소단위체(rbcL)와 8개의 작은 소단위체(rbcS)로 구성되어 있으며 식물에서 큰 소단위체의 유전자는 엽록체에 존재하고 발현되며 작은 소단위체의 유전자는 핵에 존재하며 세포질에서 발현된 후 엽록체로 이동, 큰 소단위체와 결합하여 RuBisCo를 형성한다. 이때 작은 소단위체가 엽록체로 이동할때는 47개의 아미노산으로 구성되고 N-말단에 연결되어있는 transit peptide(Tp)에 의해서 이동되며 엽록체의 stroma에 축적된다.

본 연구에서는 핵에서 발현하는 단백질이 엽록체로 전달, 엽록체 내 축적여부를 관찰하기 위해 벼 rbcS 프로모터 및 Tp sequence에 sGFP를 연결하여 사용하였다. 이때 Tp 와 sGFP유전자는 번역과정에서 한 개의 단백질로 만들어 질 수 있도록 translational fusion방법으로 연결하였다. 벼 rbcS 프로모터 및 유전자를 가지고있는 pRR1으로부터 PCR을 통해 약 1.5 kb의 rbcS-Tp를 분리하여 선발 마커로써 제초제 저항성 유전자를 가지고 있는 pSB105 에 연결하여 엽록체 발현용 GFP유전자 함유 운반체인 pSB-RTG를 제작하였다 (그림 3C). 이 운반체는 translational fusion vector로써 두 부위의 아미노산이 연결되도록 고안된 것으로 실험 과정중 DNA수준에서 염기서열 하나의 오류가 발생하더라도 아미노산 수준에서는 완전히 예상치 않은 결과를 초래할 수 있기 때문에 transit

peptide와 sGFP사이의 연결부위를 중심으로 염기서열 분석실험을 실시하였다. 염기서열 확인을 위한 실험은 Sanger염기서열 방법을 이용하였으며 sGFP의 시작 코돈으로부터 3'쪽으로 60 base 떨어진 지점에 17개의 염기로 구성된 primer(5'GCCGTTACGTCGCCGT3')를 제작, 이용하였다. 염기서열 분석결과 transit peptide와 sGFP의 연결부위 및 transit peptide의 DNA 수준에서뿐만 아니라 아미노산 수준에서 모두 예상한대로 제작되었음을 확인할 수 있었다

다. rbcS Tp 특성 규명을 위한 운반체 제작

1) rbcS Tp sequence 돌연변이체 (mTp)의 제작

며 rbcS Tp sequence 돌연변이체를 만들 때 고려해야될 사항으로 첫째, Tp sequence를 돌연변이화 하더라도 번역단계에서 fusion되어 합성되는 GFP의 아미노산 합성 코돈에는 전혀 영향을 주지 말아야 하며 둘째, DNA 수준에서의 변형시 mTp sequence내에 번역 종결 코돈이 형성되지 말아야 하고 셋째로 돌연변이화 하더라도 발현되는 mTp의 전체 단백질 특성이 야생형의 Tp와 큰 차이가 없어야 한다는 점이다. 이러한 점에 착안을 두어 rbcS Tp sequence 돌연변이체 (mTp)의 제작은 PCR 기법을 이용한 frame-shift mutation 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 하나의 염기를 Tp sequence의 시작 부위에 첨가 혹은 제거함으로써 전체 염기서열의 shift로 인해 유도되는 아미노산이 전체적으로 변화하게 하도록 하는 방법으로 염기의 첨가 혹은 제거 시 돌연변이화 하고자 하는 부위에 번역 종결 코돈의 생성 유무를 확인하여야 한다. 본 연구에서 염기 제거에 의한 frame-shift mutation법은 예상되는 mTp sequence 중간에 번역 종결 코돈의 생성을 확인하였기 때문에 종결 코돈이 생성되지 않음이 확인된 염기 첨가에 의한 frame-shift mutation법을 이용

하였고 그로부터 야기되는 염기서열 및 아미노산의 조성은 그림 1에 나타내었다.

<i>rbcS</i> TP	ATG GCC CCC TCC GTG ATG GGG TCG TCG GCC ACC ACC GTC GCT CCG TTC CAG	51
	Met Ala Pro Ser Val Met Ala Ser Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro Phe Gln	17
<i>rbcS</i> mTP	ATG GGC CCG CTC CGT GAT GGC GTC GTC GGC CAC CAC CGT CCG TOC CTT CCA	51
	Met Gly Pro Leu Arg Asp Gly Val Val Gly His His Arg Arg Ser Leu Pro	17
	GGG CTC AAG TCC ACC GGC GGC ATG CCG GTC GCC CGC CGC TCC GGC AAC TCC	102
	Gly Leu Lys Ser Thr Ala Gly Met Pro Val Ala Arg Arg Ser Gly Asn Ser	34
	GGG GCT CAA GTC CAC CGC CGG CAT GGC CGT CCG CCG CCG CTC CGG CAA CTC	102
	Gly Ala Gln Val His Arg Arg His Ala Arg Arg Pro Pro Leu Arg Gln Leu	34
	AGC TTC GGC AAC GTC AGC AAT GGC GGC AGG ATC AGG TGC ATG CAG GCC ATG	150
	Ser Phe Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Met Gln Ala Met	50
	CAG CTT CCG CAA CGT CAG CAA TGG CCG CAG GAT CAG GTG CAG CAG GCC ATG	150
	Gln Leu Arg Gln Gln Trp Arg Gln Asp Gln Asp Gln Val Gln Gln Ala Met	50

→ *sgfp*

그림 1. Frame-shift mutation에 의해 유도되는 mTp의 염기 및 아미노산 서열

2) *rbcS* Tp 돌연변이체 (mTp)의 hydrophobicity 분석

Frame-shift mutation법으로 Tp 돌연변이체 (mTp)를 만들게 되면 한 개의 염기 삽입에 의해 전체 아미노산의 변화가 야기된다. 이때 mTp sequence로부터 유도된 아미노산의 분포 및 전체 단백질의 hydrophobicity를 조사하기 위하여 PROSIS 프로그램을 이용하였다. 분석 결과 mTp의 hydrophobicity는 Tp의 hydrophobicity와 비교하여 큰 변화가 없음을 확인하였다(그림 2).

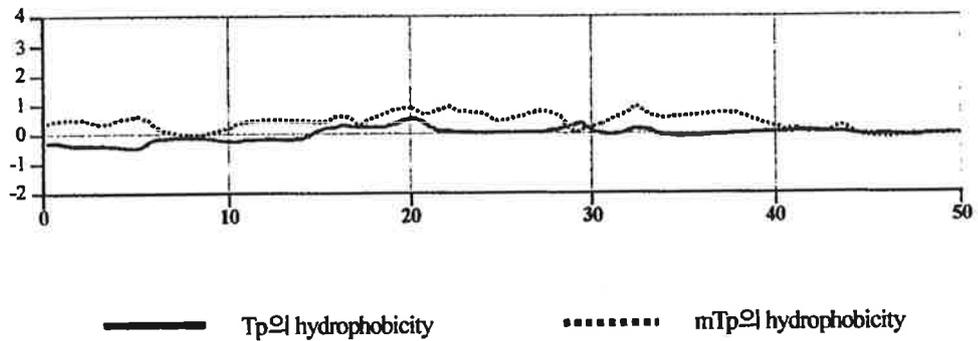


그림 2. 벼 rbcS Tp와 mTp의 hydrophobicity 비교 분석

3) mTp 도입 벼 형질전환용 운반체 제작

mTP의 합성을 위해 forward primer에는 Tp sequence의 번역 시작점으로부터 5번째 위치에 염기 G를 첨가하고 reverse primer에는 GFP 번역 시작점으로부터 Tp sequence쪽으로 8번째 염기 T를 제거함으로써(그림 3-2) 단백질 발현 시 fusion되는 GFP의 정상적인 발현에는 전혀 이상이 없도록 코돈 사용을 고려하여 제작하여 PCR을 통해 약 150 kb의

mTp DNA 단편을 증폭하고 이를 벼 형질전환용 운반체로써 선발 마커인 제초제 저항성 유전자(35S 프로모터-bar-3' nos)를 가지고 있는 pSB105에 rbcS 프로모터-mTp-sgfp를 최종 연결하여 엽록체 발현용 GFP유전자 함유 운반체인 pSB-RmTG를 제작하였으며 (그림 3) 염기서열 확인분석을 통하여 Tp sequence내의 염기 G의 첨가와 T의 제거를 통한 Tp 들연변이체 (mTp)의 염기서열을 정확히 확인하였다.

2. 제작 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입 및 확인

제작된 GFP 유전자 함유 운반체들은 triparental mating 방법에 의해 *Agrobacterium*내로 도입되었고 mini-prep방법에 의해 플라스미드 DNA를 분리했으며 *Agrobacterium*내에서 co-integration된 운반체의 확인을 위해, 분리해낸 플라스미드 DNA를 제한효소 Sal I 으로 절단한 후 pSB1과 cointegrate에서 생성되는 DNA단편을 비교하므로서 두 플라스미드가 *Agrobacterium*내에서 cointegration되었음을 증명하였다. 이때 cointegrate에서는 5.3kb band가 사라지고 7.3kb와 3.1kb band가 새로 생김을 확인함으로서 cointegration이 예상대로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

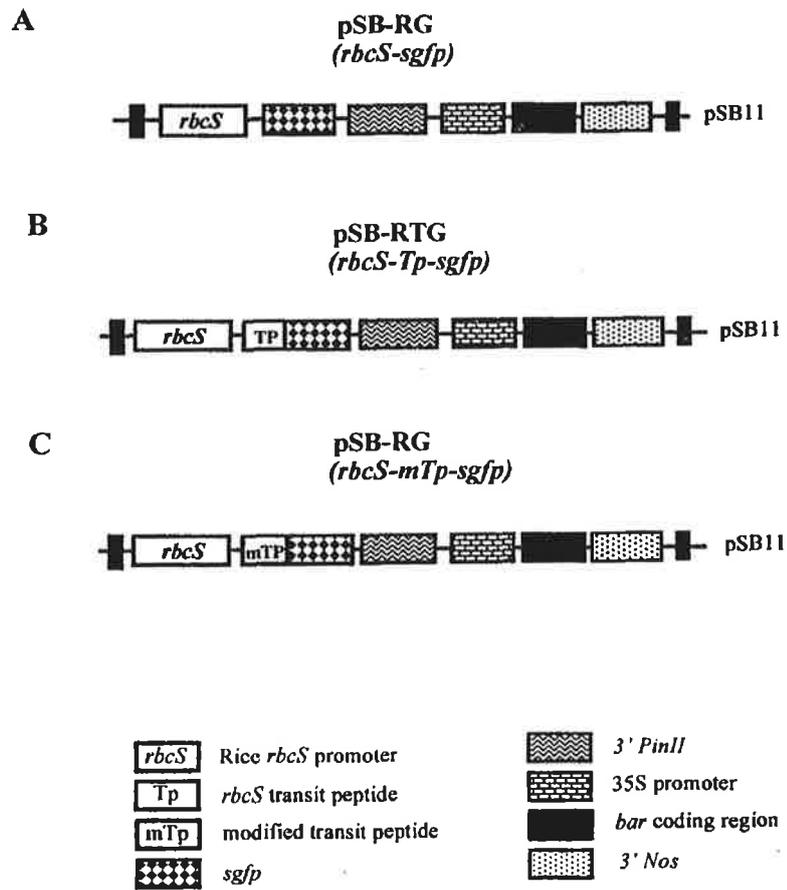


그림 3. 엽록체내 GFP발현 및 세포질 발현용 운반체

3. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환

벼 형질전환은 *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환 방법으로 수행하였다. pSB-RG의 경우는 총 1850개, pSB-RTG의 경우는 총 850개, pSB-RmTG의 경우는 총 890개의 캘러스를 형질전환 시켰다(표 1). pSB-RG의 경우 총 1850개의 캘러스중 1005개, pSB-RTG의 경우는 총 850개의 캘러스중 513개, pSB-RmTG의 경우는 총 890개 캘러스중 565개의 캘러스를 선발하였는데 이것은 각각 54%, 60%, 63%의 1차 선발 결과를 나타내었다. 10일후 1차 선발된 1005개(pSB-RG), 513개(pSB-RTG), 565개(pSB-RmTG)의 캘러스 중 하얗고 왕성하게 분열한 450개(pSB-RG), 224개(pSB-RTG), 252개(pSB-RmTG)의 캘러스를 선발하였다. 이는 최초 사용된 캘러스에 대해 각각 24%, 26%, 28%의 2차 선발결과이다. 2차 선발 배지에서 하얗고 왕성하게 자란 embryogenic 캘러스만을 선발하여 재분화 배지인 MS-CP로 옮겨 28℃ 배양실에서 12시간 간격으로 명배양/암배양으로 재분화를 유도하였다. 1,2차 선발 모두 마친 450개(pSB-RG), 224개(pSB-RTG), 252개(pSB-RmTG)의 캘러스가 MS-CP 재분화 배지로 옮겨졌고 재분화가 유도되었다. 재분화는 제초제 성분인 phosphinotricin이 4ug/ml 들어있는 배지에서 실시한 결과 40개(pSB-RG), 11개(pSB-RTG), 12개(pSB-RmTG)의 벼가 재분화 되었고 재분화 된 개체는 MS0배지에 옮겨 10일간 배양한 뒤 토양의 있는 용기로 옮겨주었고 2주 뒤 온실로 옮겨 생육 중에 있다(표 2).

표2. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice

Plasmids	Experiments	Co-cultivation	First selection	Second selection	Regeneration
pSB-RG	8	1850	1005	450	40
pSB-RTG	4	850	513	224	11
pSB-RmTG	4	890	565	252	12

4. 형질전환된 벼 식물체의 제초제 저항성 검정

본 연구에서는 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자를 사용하였기 때문에 일반적인 항생제 저항성 유전자와는 달리 조직배양시 캘러스 수준에서의 선발뿐만 아니라 형질 전환된 식물체 수준에서도 선발할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 실험실에서는 실험실에서 선발되어 재분화된 벼 식물체를 온실에서 약 한 달간 키운 후 제초제 저항성 검정을 실시하였다. 형질 전환된 벼 식물체의 제초제 저항성을 검정하기 위해 시증에서 판매중인 제초제인 Basta용액을 0.5%로 200배 희석하여 사용하였다. 대조구로는 형질 전환시키지 않은 낙동벼를 사용하였다. 검정하고자 하는 잎의 끝을 하얀 색 물감으로 표시한 다음 0.5% Basta용액을 잎의 전면, 후면에 골고루 바른 후 1주일 뒤에 관찰한 결과 대조구는 잎이 갈색으로 마르고 시든 반면 형질전환체는 아무런 변화를 관찰할 수 없었고 본래의 초록색 잎을 유지하였다.

5. 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 확인 및 분석

형질전환 벼 식물체의 도입유전자 확인 및 도입된 유전자수 (copy number)를 알아보기 위해 southern 분석을 수행하였다. pSB-RG가 도입된 형질전환체는 GFP 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 벼 genomic DNA를 제한효소 XbaI으로 절단하였고 도입된 GFP 유전자의 수의 확인은 제한효소 SpeI을 이용하여 절단하였으며 pSB-RTG와 pSB-RmTG가 각각 도입된 형질전환체는 GFP 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 벼 genomic DNA를 제한효소 PstI으로 절단하였고 도입된 GFP 유전자의 수의 확인은 제한효소 KpnI을 이용하여 절단하였다. 도입된 GFP 유전자에 대한 probe는 GFP유전자 함유 운반체인 pSK-sGFP를 PstI으로 절단하여 0.7 kb의 GFP 유전자 단편을 사용하였다. 도입 유전자에 대한 결과를 비교 분석해 보면, pSB-RG가 도입된 형질전환체의 경우 그림 4A의 X(XbaI)에서 보듯이 분석된 line 모두 GFP 유전자의 도입을 확인하였고 Sp(SpeI)에서 알 수 있듯이 line 1,2는 1 copy, line 3, 5는 2 copy, line 6는 3 copy 및 line 4는 4 copy의 GFP 유전자가 도입되었음을 알 수 있다. pSB-RTG가 도입된 형질전환체의 경우는 P(PstI)과 K(KpnI)의 결과에서 보듯이 분석된 2 line 모두 1copy가 도입되었음을 확인할 수 있었다 (그림 4B). pSB-RmTG가 도입된 형질전환체의 경우는 그림 4C의 P(PstI)의 결과에서 보듯이 분석된 line 모두 GFP 유전자의 도입을 확인하였고 K(KpnI)에서 알 수 있듯이 1 copy에서 3copy까지 GFP 유전자가 도입되었음을 알 수 있다.

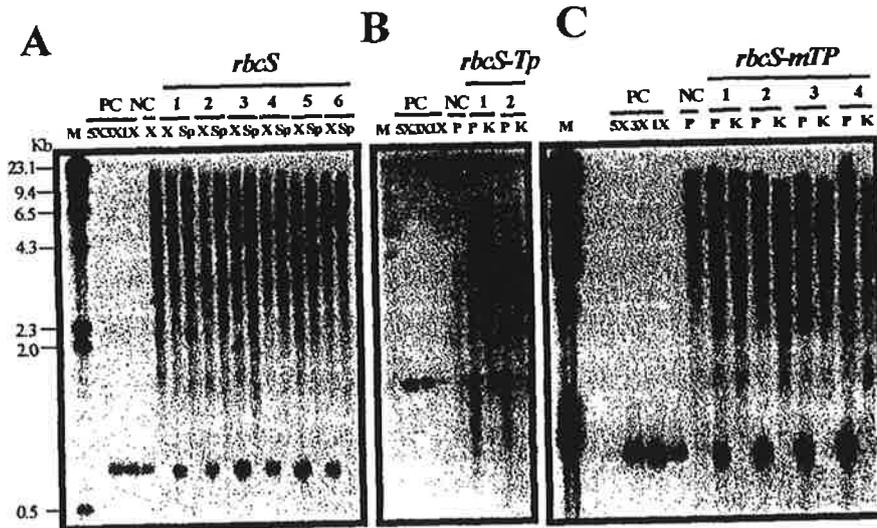


그림 4. Southern blot analysis of (A) pSB-RG , (B) pSB-RTG, (C) pSB-RmTG-transformed rice plants .

6. GFP의 세포내 분포 및 조직별 발현 관찰

본 연구에서는 기존에 형광현미경 하에서 관찰하기 어려웠던 GFP의 세포내에서의 발현 양상을 관찰하기 위해서 세포질 내에 발현시킨 GFP(pSB-RG) 및 엽록체 내로 발현시킨 GFP(pSB-RTG)를 관찰하고 mTp를 도입한 형질전환 벼의 세포 내 발현 부위 및 발현 수준을 조사하기 위해 CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)을 사용하였다.

가. GFP가 도입된 형질전환 캘러스의 Confocal Microscopy 관찰

rbcS 프로모터에 GFP를 연결하여 발현시킨 벼 캘러스의 경우 그림 5에서 보는 바와 같이 green channel (그림 5B 좌)에서 방사된 형광이 관찰되었으며 형질전환 되지 않은 캘러스의 경우는 형광이 관찰되지 않았다(그림 5A 좌). GFP를 세포질에 발현시킨 캘러스의 경우 focal plane이 세포표면을 포착했을 때는 초록형광이 세포외곽에 전체에 분포하고 세포단면부위가 포착된 캘러스의 경우는 세포외곽에 GFP가 발현하고 있음을 알 수 있다. 이는 세포내에는 주로 vacuole과 organelle이 차지하고 있기 때문이고 한 세포내의 세포질은 주로 세포 외곽을 차지하고 있음을 알 수 있다. 일반적으로 rbcS 프로모터는 green tissue에서만 작용하는 프로모터로 알려져 있지만 본 연구에 의하면 캘러스 조직에서도 다량 발현하고 있음이 관찰되었다. 이러한 형광 이미지를 light-microscope상에서 관찰한 이미지(그림 5A, B 우)를 관찰해 보면 세포의 모양을 정확히 알 수 있다.

나. GFP가 도입된 형질전환 벼 엽조직의 Confocal Microscopy 관찰

GFP가 엽록체 내 발현 또는 세포질 내 발현된 형질전환체중 같은 성장 단계에 있는 벼 식물체 잎의 엽병(blade) 부분을 CLSM으로 관찰한 결과를 살펴보면, 잎 조직중 엽육 세포(mesophyll cell) 관찰되었으며 GFP를 엽록체 내로 발현시킨 경우 (rbcS-Tp-sgfp) 그림 6 rbcS-Tp 에서와 같이 green channel (D), red channel (좌 E) 모두 방사된 형광으로부터 세포의 윤곽 및 세포내부의 엽록체들이 관찰되었다. green channel에서 방사된 형광은 red channel에서 방사된 형광부와 일치하였다. 이것은 엽록체로부터 green과 red 형광이 유래되었기 때문이고 따라서 GFP가 정확히 엽록체 내에 위치하고 있음을 알 수 있다. 즉,

GFP를 엽록체 내로 발현시킨 결과로부터 엽록체의 모양이 관찰되었고 성숙한 잎의 세포내에는 주로 엽록체가 자리잡고 있음을 알 수 있다. 그림 6F의 경우는 green channel과 red channel을 합친 이미지로 엽록체 내의 두 이미지가 합쳐져 연두색의 형광을 나타내었다. 이것은 GFP가 정확히 엽록체로 축적된 것을 입증하는 것으로 엽록체의 chlorophyll로부터 나오는 red 형광과 엽록체로 축적된 GFP로부터 나오는 green 형광이 서로 합쳐진 결과로써 연두색의 형광을 띤다.

세포질로 GFP를 발현시킨 경우는 그림 6 rbcS 에서 보듯이 green channel (A) 에서 GFP가 발현되는 것을 알 수 있고 red channel(B)의 경우 엽록체의 엽록소에 의해 autofluorescence인 red 형광이 나타나고 있는 것을 관찰할 수 있으며 green channel과 red channel을 합친 C의 경우를 보면 green 형광과 red 형광이 각기 다른 위치에서 나타나고 있는 것을 알 수 있다. 이는 엽록체의 엽록소로부터 나오는 red 형광과 GFP의 green 형광의 위치가 불일치 하는 것으로 즉, GFP가 세포질에 위치하고 있음을 알 수 있는 결과이며 더불어서 엽록세포는 세포질이 차지하고 있는 공간보다 엽록체가 차지하고 있는 공간이 훨씬 많고 나머지는 vacuole 이 차지하고 있음을 알 수 있다. 엽록체가 세포내에서 차지하는 공간이 많다는 사실은 엽록세포에서 엽록체 내 발현시에 높은 수준의 발현을 보인 것과 무관하지 않은 것으로 생각된다. 반면에 mTp sequence를 GFP 유전자에 연결하여 형질전환한 경우(rbcS-mTp-sgfp)를 보면 세포질 발현과 비슷한 양상을 보이고 있으며 발현양에서 다소 차이가 있으나 세포질내 및 핵내에 GFP가 위치하고 있음이 관찰되었다(그림 6G, H, I). 이는 본 연구에서 Tp특성 분석을 위해 돌연변이화한 mTp는 frame-shift mutation에 의해 아미노산 서열이 wild type Tp와 크게 바뀐 결과로 예상되며 본 연구에서 증명한 엽록체내에 targeting시

cleavage 되는 Tp의 47Cys와 48Met이 mTp의 47Val과 48Gln으로 바뀌어서 더 이상 엽록체로 targeting 하지 못하고 세포질내 위치하거나 일부는 핵내에 위치하고 있음을 알수있다. 대조구로써 사용된 야생벼의 경우에 있어서는 green channel에서 관찰된 형광은 없었다.

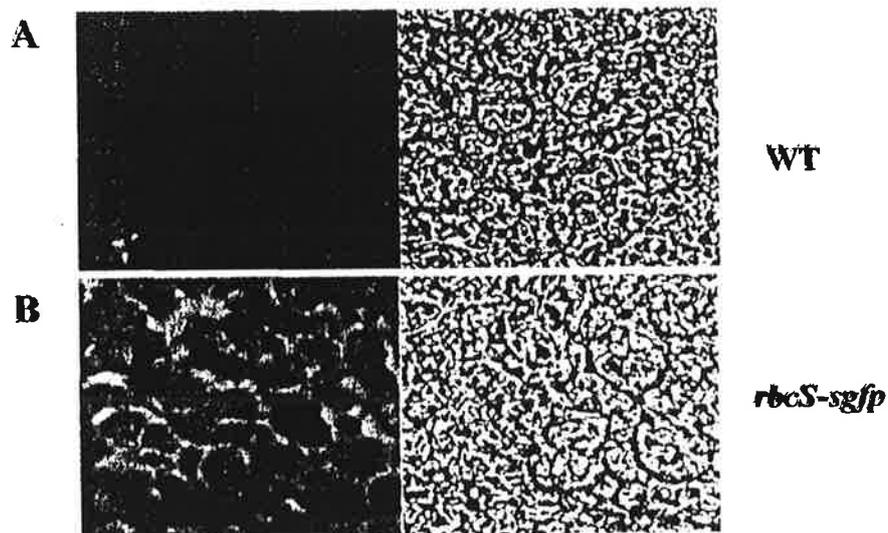


그림 3-5. 형질전환 벼 캘러스의 CLSM관찰

WT: wild type callus, *rbcS-sgfp*: *rbcS* promoter-GFP 유전자도입 형질 전환 캘러스

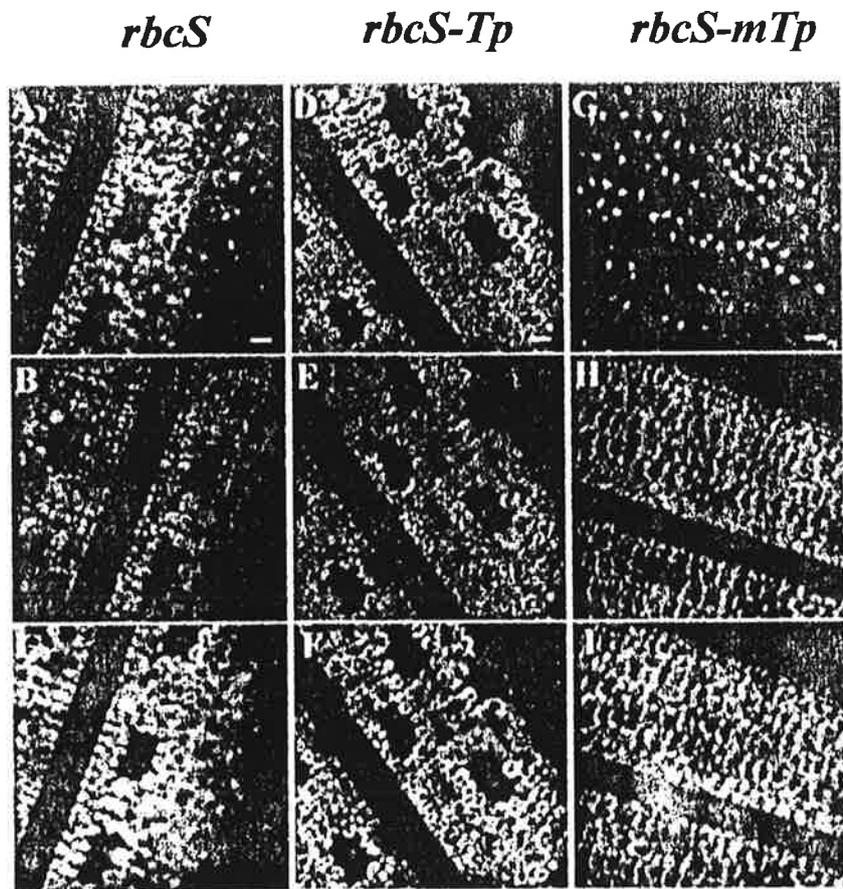


그림 3-6. GFP가 도입된 형질전환 벼 잎의 CLSM 관찰

7. 형질전환 벼 식물체 내 도입유전자 발현 분석

rbcS-sgfp, *rbcS-mTp-sgfp* 및 *rbcS-mTp-sgfp*가 각각 도입된 형질전환 벼 식물체 내에 GFP 유전자의 전사 단계에서의 발현 수준을 알아보기 위해 Northern-blot 분석을 실시하였다. 대조구로써는 형질전환하지 않은 벼 잎을 사용하였고 *rbcS* 프로모터-Tp-GFP의 도입으로 GFP가 엽록체 내 발현(*rbcS*-Tp)된 벼 잎과 Tp를 도입하지 않고 *rbcS* 프로모터만을 이용하여 GFP를 세포질에 발현(*rbcS*, *rbcS-mTp*)시킨 벼 잎으로 부터의 전사단계에서의 발현을 비교 분석하였다. 전체 RNA 10ug을 iodoacetamide (0.084g/100ml)가 들어있는 아가로스 젤에 전기영동한 다음 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Hybond-N+; Amersham Pharmacia)으로 RNA를 전이시킨 후 Southern 분석 시 사용했던 0.7 kb의 GFP 유전자를 probe로 사용하였다. 또한 전체 RNA가 일정하게 같은 수준으로 발현했는가를 확인하기 위하여 GFP 유전자산물을 probe로 사용한 filter를 deprobing 용액(0.01× SSC, 0.1× SDS)에 넣고 10분간 끓여 deprobing한 후 벼 *rbcS* 유전자로 probing한 결과 전체 RNA의 발현수준은 일정한 수준으로 발현하였음을 확인하였다. 전사 단계에서의 GFP 발현 수준을 비교 분석해 보면 (그림 7), Tp에 의한 엽록체 내 발현의 경우 (*rbcS*-Tp) 매우 높은 수준의 전사산물이 발현되었지만 *mTp*가 도입된 경우 (*rbcS-mTp*)는 발현 수준은 세포질 발현(*rbcS*)과 비슷하게 발현되는 것으로 나타났다.

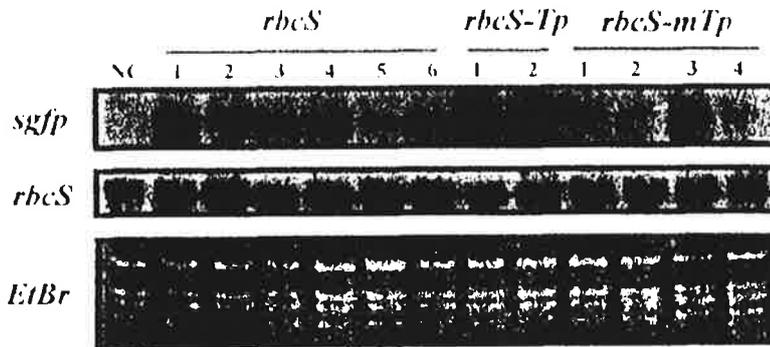


그림 7. Northern-blot을 통한 도입 유전자 발현 분석

8. 발현 산물의 정량적 분석

전사수준에서 발현된 발현산물의 양을 정량적으로 정확히 분석하기 위해 Phospho-Image analyzer(FLA 3000, Fuji)를 이용, 방사능 검출방법에 의한 정량법을 이용하였다. Phospho-Image analyzer의 원리는 방사능 혹은 형광에 의해서 표식된 시료를 phospho crystal층이 덮여있는 Imaging Plate(IP)에 노출시킴으로써 시료에 표식되어 있는 방사능이 방출하게 되면 IP의 phospho crystal이 방출된 에너지를 받아 들뜨게 되고 이를 FLA3000의 레이저가 검출, 분석하게 된다. 이러한 원리으로써 발현된 발현산물의 양을 정확히 정량할 수 있고 시료 상호간의 발현 차이를 수치화 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이러한 Phospho-Image analyzer를 이용하여 그림 6의 결과를 정량적으로 분석한 결과를 보면

GFP의 엽록체 발현의 경우 세포질 발현(*rbcS*)에 비해 약 10배(*rbcS*-Tp)의 발현증가를 보였고 Tp의 돌연변이체가 도입된 경우(*rbcS*-mTp) 비슷한 발현율을 보였다(그림 8).

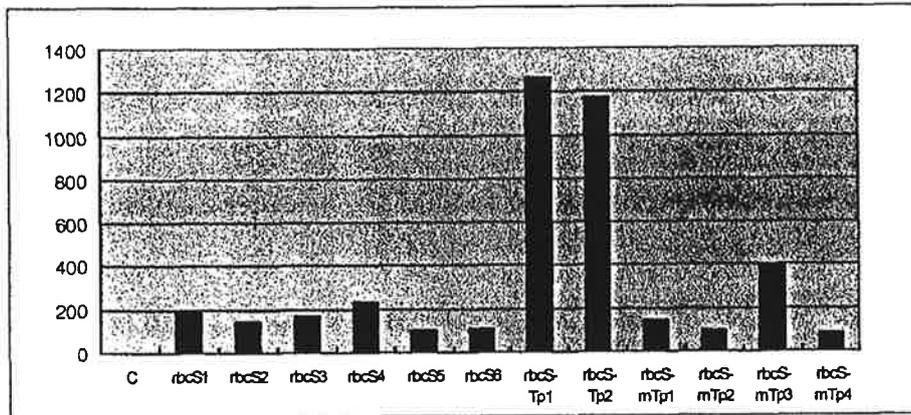


그림 8. Phospho-Image analyzer를 이용한 발현 산물의 정량적 분석

C, Control; RG, *rbcS*; RTG, *rbcS*-Tp; RmTG, *rbcS*-mTp

9. 엽록체 내 도입유전자의 단백질 발현 분석

도입 유전자의 단백질 발현을 확인하기 위해 형질전환체의 잎을 0.2g 확보하여 액체질소에 얼린 다음 막자사발에서 마쇄 한 후 0.5ml의 추출 완충액을 이용하여 단백질을 추출하였다. 음성 대조구로는 형질전환하지 않은 낙동벼의 잎으로부터 추출해낸 단백질을 사용하였고 양성 대조구로는 순수 분리된 야생형의 GFP(CLONTECH)를 사용하였다. 15% SDS-PAGE를 실시한 후 antibody를 이용하여 immuno-detection 하였다.

이때 사용한 primary antibody는 야생형의 GFP에 대한 primary antibody(CLONTECH)를 사용하였고 secondary antibody는 GAR-AP(Bio-Rad)를 사용하여 color reagent(NBT, BCIP)로 색깔 반응하여 관찰하였다.

가. GFP의 세포질 및 엽록체 내 발현 비교 분석

GFP 유전자가 도입된 형질전환체 (rbcS, rbcS-Tp, rbcS-mTp)의 단백질 발현 분석을 위해 형질 전환된 벼 식물체의 잎으로부터 단백질을 추출해 낸 후 western분석을 실시하였다. 단백질 발현 분석결과 양성 대조구에서는 27 kDa의 단백질이 관찰되었고(PC, 그림 9A) 음성 대조구에서는 관찰된 단백질 band는 없었으며(NC, 그림 9A) 형질 전환체 잎의 경우 양성 대조구와 동일한 27 kDa의 단백질이 뚜렷하게 관찰되었다 (rbcS1-6, rbcS-Tp1-2, rbcS-mTp1-4, 그림 9A). 세포질 발현(rbcS1-6, 그림 9A)과 엽록체 내 발현(rbcS-Tp1-2, 그림 9A)의 경우를 비교해 본 결과, 전사단계에서의 발현과 마찬가지로 단백질 발현 수준에 있어서도 세포질 발현에 비해 엽록체 내 발현이 현저하게 높음이 관찰되었다. 그리고 Tp 특성규명을 위해 제작한 mTp를 도입한 벼 잎의 경우는 (rbcS-mTp) 단백질 수준에서는 발현이 현저히 낮음이 관찰되었다. 이는 wild type의 Tp를 아미노산 수준에서 완전히 변형하여 더 이상 엽록체로 targeting 되지 못하기 때문에 세포질내에서 매우 불안정한 단백질로 존재하고 있다고 사료된다. GFP 유전자가 도입된 형질전환체 (rbcS, rbcS-Tp, rbcS-mTp)의 단백질 100ug의 동량을 UV light하에서의 발현을 관찰해보면 그림 9B에서 보는 바와같이 엽록체 발현의 경우 (rbcS-Tp1-2, 그림 9B) UV light하에서 GFP 과량 발현에 의한 초록형광이 뚜렷히 관찰되었다.

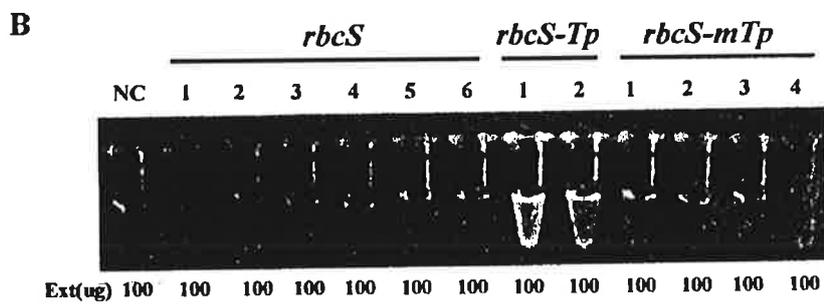
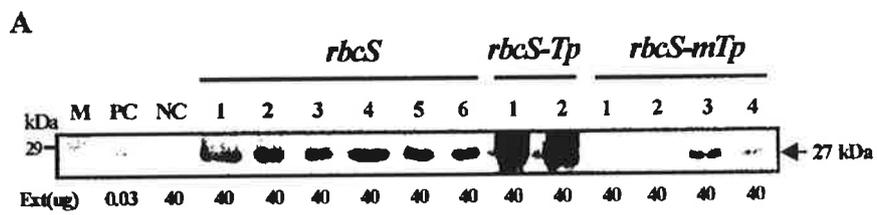


그림 3-2. 엽록체 내 도입유전자의 단백질 발현 분석

나. 발현 단백질의 정량적 비교 분석

세포질 발현과 엽록체 내 발현간의 정확한 발현 수준의 차이를 비교하기 위해 엽록체 내 발현의 시료를 연속 희석하여 western-blot을 실시하였다(그림 10A). 양성 대조구(PC, 그림 10A)와 비교 분석한 결과, 세포질 발현(rbcS1-3, 그림 10)의 경우, 전체 용해성 단백질의 약 0.5%를 차지하고 있음을 알 수 있었고, 엽록체 내 발현(rbcS-Tp, 그림 10A)의 경우는 세포질 발현(rbcS1-3, 그림 10A)과 비교해 볼 때 약 20배 향상된 발현 수준을 보였으며 이 결과는 단백질 gel을 Coomassie blue 염색법[Coomassie Brilliant Blue R250, 0.25g, methanol:H₂O (1:1 v/v), 90 ml, glacial acetic acid, 10 ml]으로 관찰한 결과를 통하여 정확히 알 수 있었다. 세포질 발현의 경우는 일반적으로 식물 전조직에 고루 발현하는 것으로 알려져 있고 벼 형질전환에 많이 사용하는 벼 Act1 프로모터에 GFP 유전자를 연결하여 벼에 발현시킨 것 (Act1)과 엽록체 발현(rbcS-Tp)과의 발현 양을 비교하였다. 엽록체 내 발현의 경우 (rbcS-Tp, 그림 10B)의 전체 용해성 단백질 2 ug내 GFP의 양과 순수 분리된 양성 대조구(Lane 1, 그림 10)의 200 ng을 비교해 볼 때 비슷한 양이 발현되고 있음이 관찰되었고 이는 전체 용해성 단백질의 약 10%를 상회하는 것으로 나타났다. 이러한 엽록체 내 발현법은 지금까지 식물 유전공학에 주로 사용하는 도입유전자의 세포질 내 발현 시 나타나는 문제점들을 해결할 수 있을 것으로 본다. 즉, 본 시스템은 발현수준이 낮음으로 인하여 표현형이 불확실한 경우 혹은 세포질 내 발현 시 나타나는 독성장애 등을 극복할 수 있는 대체방안으로 이용될 수 있어서 앞으로 도입 유전자를 높은 수준으로 안전하게 발현시키는 데 유용한 발현 시스템으로 사료된다.

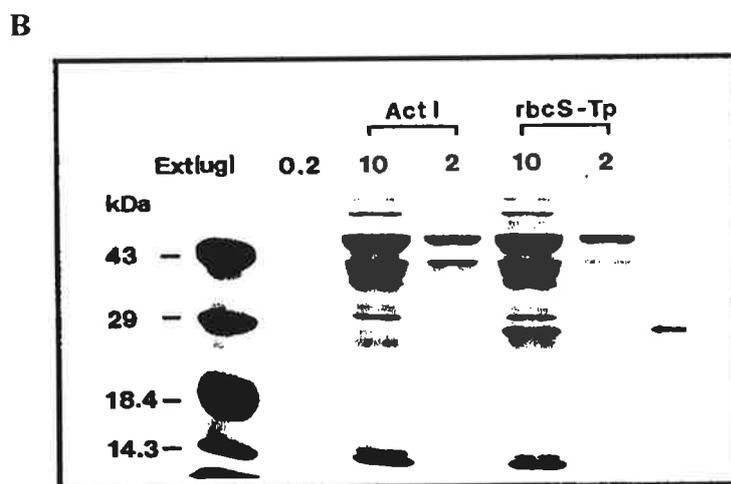
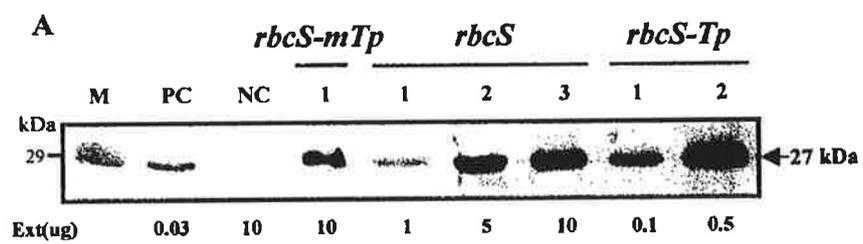


그림 10. 발현 단백질의 정량적 비교 분석

다. 엽록체 내 targeting된 GFP의 N-말단 아미노산 서열 분석

일반적으로 식물 RbcS 단백질은 세포질 리보솜에서 합성되어 엽록체로 들어갈 때 transit peptide부분이 잘려나가고 mature 단백질만 stroma내에서 검출된다. 벼 RbcS 단백질의 경우, 담배작물의 RbcS 단백질의 N-말단 아미노산 서열(Mazur and Chui, 1985)과 비교하여 엽록체로 targeting될 때 transit peptide의 47번째 Cys과 48번째 Met사이에서 잘릴 것으로 추정되었다(Kyozuka *et al.*, 1993). 본 연구에 사용된 Tp-GFP fusion 단백질의 경우는 PCR을 통한 유전자 분리과정 및 운반체 제작 과정을 통해 엽록체로 targeting될 때 GFP의 N-말단부위와 Tp sequence 사이에 추가적으로 세 개의 아미노산(Met-Gln-Ala)이 첨가되도록 고안되었다. 단백질 발현분석을 통해 엽록체 내 targeting된 경우 잎 조직 및 캘러스 모두 단백질 band의 위치가 세포질 발현의 경우와 동일한 것으로 미루어 GFP가 정확히 엽록체 내로 targeting되었음을 알 수 있었으며 캘러스의 경우는 엽록체 전구체인 proplastid내로 targeting되었음을 알 수 있었다. 이러한 Tp-GFP fusion 단백질의 targeting시 정확한 절단 부위를 확인하기 위해 N-말단 염기서열법에 의해 GFP의 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다. N-말단 염기서열 분석은 잎 조직의 경우 10 ug, 캘러스의 경우는 40 ug의 단백질을 사용하여 SDS-PAGE후 PVDF membrane(MILLIPORE)에 transfer한 단백질을 Ponceau S 용액(Sigma)에 염색 및 탈 염색 후 GFP band만을 도려내어 기초과학 지원 연구소 생체 고분자 연구실에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열 분석결과 두 시료 모두 예상된 염기서열과 동일한 Met-Gln-Ala-Met-Val의 결과를 보였다. 특이적인 결과는 캘러스에서도 Tp-GFP fusion 단백질의 processing이 일어나고 있으며 Tp sequence는 엽록체뿐만 아니라 proplastid에도 단백질을 targeting하고있음을 최초로 확인하였다.

10. 참고 문헌

- Cao J, Duan X, McElroy D, Wu R (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension cells. *Plant Cell Rep* 11: 586-591
- Cavener DR, Ray SC (1991) Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucl Acids Res* 19: 3185-3192
- Chiu W-L, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6: 325-330
- Choi SB, Wang C, Muench DG, Ozawa K, Franceschi VR, Wu Y, Okita TW (2000) Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* 407: 765-767
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18: 675-689
- Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* 5: 213-218
- Cornejo M-J, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD, Blechl AE (1993) Activity of maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 23: 567-581
- DeAlmeida ERP, Gossele V, Muller CG, Dock J, Reynaerts A, Botterman J, Krebbers E, Timko MP (1989) Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis* rbcS promoter: sequence encoding the rubisco transit peptide increase expression levels. *Mol Gen Genet* 218:78-86
- Dean C, Pichersky E, Dunsmuir P (1989) Structure, Evolution, and regulation of rbcS genes in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 415-439

- Duan X, Li X, Xue Q, Abo-El-Saad M, Xu D, Wu R (1996) Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnol* 14: 494-498.
- Helliwell CA, Gray JC (1995) The sequence surrounding the translation initiation codon of the pea plastocyanin gene increases translational efficiency of a reporter gene. *Plant Mol Biol* 29: 621-626
- Herminghaus S, Tholl D, Rugenhagen C, Fecker LF, Leuschner C, Berlin J (1996) Improved metabolic action of a bacterial lysine decarboxylase gene in tobacco hairy root cultures by its fusion to a *rbcS* transit peptide coding sequence. *Transgen Res* 5: 193-201
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries T-DNA. *Plant J* 6: 271-282
- Jang I-C, Nahm BH, Kim J-K (1999) Subcellular targeting of green fluorescent protein to plastids in transgenic rice plants provides a high-level expression system. *Molecular Breeding* 5: 453-461
- Keegstra K, Bruce B, Hurley M, Li H-M, Perry S (1995) Targeting of proteins into chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 93: 157-162
- Kim J-K, Duan X, Wu R, Seok SJ, Boston RS, Jang I-C, Eun MY, Nahm BH (1999) Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance *bar* gene. *Molecular Breeding* 5: 85-94
- Kindle KL, Lawrence SD (1998) Transit peptide mutations that impair in vitro and in vivo chloroplast protein import do not affect accumulation of the δ -subunit of chloroplast ATPase. *Plant Physiol* 116: 1179-1190

- Köhler RH, Cao J, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR (1997) Exchange of protein molecules through connection between higher plant plastids. *Science* 276: 2039-2042
- Köhler RH, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR (1997) The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*. *Plant J* 11: 613-621
- Kyozuka J, McElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R, Shimamoto K (1993) Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion gene in transgenic rice. *Plant Physiol* 102: 991-1000
- Matsuoka M, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ozeki Y, Yamamoto N (1988) Classification and nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from rice. *Plant Cell Physiol* 29: 1015-1022
- Matsuoka M, Fukayama H, Tsuchida H, Nomura M, Agarie S, Ku MSB, Miyao M (2000) How to express some C4 photosynthesis genes at high levels in rice. In JE Sheehy, PL Mitchell, B Hardy, eds, *Redesigning rice photosynthesis to increase yield*, Elsevier science, Amsterdam, 167-175
- Matsuoka M, Kyozuka J, Shimamoto K, Kano-Murakami Y (1994) The promoters of two carboxylases in a C4 plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C3 plant (rice). *Plant J* 6: 311-319
- McElroy D, Blowers AD, Jenes B, Wu R (1991) Construction of expression vectors based on the rice *actin1(Act1)* 5' region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet* 231: 150-160
- Nawrath C, Poirier Y, Somerville C (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Pro Natl Acad Sci USA* 91: 12760-127654
- Riess B, Wasmann CC, Bohnert HJ (1987) Regions in the transit peptide of SSU essential for transport into chloroplasts. *Mol*

- Gen Genet 209: 116-121
- Schöffner AR, Sheen J (1992) Maize C4 photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J* 2: 221-232
- Shomamoto K (1995) The molecular biology of rice. *Science* 270: 1772-1773
- Uchimiya H, Iwata M, Nojiri C, Smarajeewa PK, Takamatsu S, Ooba S, Anzai H, Christensen AH, Quail PH, Toki S (1993) Bialophos treatment of transgenic rice plants expressing a bar gene prevents infection by the sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*) *Bio/Technology* 11: 835-836
- von Hejine G, Steppuhn J, Herrmann RG (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* 180: 535-545
- Wandelt CI, Khan MRI, Craig S, Schroeder HE, Spencer D, Higgins TJV (1992) Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *The Plant J* 2: 181-192
- Wong EY, Hironaka CM, Fischhoff DA (1992) *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 20: 81-93
- Xie Y, Wu R (1988) Nucleotide sequence of a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene (*rbcS*) in rice. *Nucl Acids Res* 16: 7749

11. 연구성과

가. 국외학술지 논문발표

Jang, I.-C., Nahm, B. H. and Kim, J. -K. (1999) Subcellular

targeting of green fluorescent protein to plastids in transgenic rice plants provides a high-level expression system. *Molecular Breeding* 5: 453-461

나. 국내학술지 논문발표

Chung, B.-C., Kim, J.-K., Nahm, B. H., and Lee, C.-H. (2000) *In vivo* monitoring of green fluorescent protein in transgenic rice. *Mol. Cells* 10: 411-414. (August 31, 2000)

Ju-Kon Kim and Baek Hie Nahm (1999) The EST analysis and transgene expression system in rice. *Plant Biotechnology* 1, 46-55.

다. 국외 학술대회 발표

주제강연(국외)

Ju-Kon Kim (1999) Transgene expression system in rice: use of MAR and plastid-targeting. The International Program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24, Invited speaker.

포스터 발표(국외)

Jang, I.-C., Lee, K.-H., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (2000) Chloroplast targeting signal regulate transgene expression in rice. International Rice Genetics Symposium, Los Banos, Laguna, Philippines, October 22-27, poster.

Jang, I.-C., Kim, N.-J., Park, M.-H., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (1999) Localization of transgene products into plastids: a high level expression system in rice. The International Program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24, poster.

Choi, W. B., Jang, I.-C. Nahm, B. H. and Kim Ju-Kon (1997) Green-fluorescent protein (GFP) as a new reporter in rice transformation. The International Program on Rice Biotechnology, Malacca, Malaysia September 15-19, poster.

라. 국내 학술대회 발표

주제강연(국내)

Kim, Ju-Kon (1999) Roles of MAR and Plastid-Targeting Signal in Transgene Expression of Rice. 제54회 한국생물과학협회 학술발표대회(한국유전학회) 심포지움 초청강연, 원광대학교, 1999. 10. 29-30.

Jang, I.-C., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (1999) Sequestering of Transgene Products in Chloroplasts Increased Expression Levels Significantly. '99 한국농화학회 추계학술발표회 초청강연, 전남대, 1999. 10.29

Kim, Ju-Kon (1998) Development of transgene expression systems and their applications in transgenic rice. Kumho Life &Environmental Science Laboratory Workshop No. 3, Kwangju, 1998. 6. 10-11.

Kim, Ju-Kon (1998) Development of transgene expression systems and their applications in transgenic rice. 한국생화학회, 1998. 10. 20 대전 KAIST.

I.-C. Jang, B. H. Nahm and Ju-Kon Kim (1998) Chloroplast targeting of GFP and high levels of its expression in transgenic rice. 초청강연, 98 The 3rd Symposium of Korea Rice Genome Research Program, 농업과학기술원 1998 2. 20.

포스터발표(국내)

- Jang, I.-C., Lee, K.-H., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (2000)
Chloroplast targeting signal regulate transgene expression in rice. '00 한국농화학회 추계학술대회, 천안 상록리조트, 2000. 10.27-28, 포스터.
- Jang, I.-C., Lee, K.-H., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (1999)
Chloroplast targeting signal regulate transgene expression in rice. '00 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울교육문화회관, 2000. 10.12-13, 포스터.
- Jang, I.-C., Park, M.-H., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (1999)
Chloroplast targeting signal regulate transgene expression in rice. '99 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울교육문화회관, 1999. 10.25-26, 포스터.
- Jang, I.-C., Park, M.-H., Lee, K. H., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (1999) Localization of transgene gene products into plastids provides a high-level expression system in rice. '99 한국농화학회 춘계학술대회, 춘천 두산리조트, 1999. 5. 20-21, 포스터.
- Jang, I.-C., Nahm, B. H. and Kim, Ju-Kon (1998) Targeting of GFP to plastids in transgenic rice: a high-level expression system. '98 한국분자생물학회 추계학술대회, 서울대학교 문화관, 1998. 10.22-24, 포스터.
- 장제윤, 김경일, 마상동, 김주곤, 정인식 (1998) 형질전환 식물체 및 식물세포배양에서 GFP 발현조건의 최적화. 1998 춘계학술발표회 및 한일공동 심포지움, 전북대학교 공과대학, 1998. 4.10.
- Jang, I.-C. Nahm, B. H. and Kim Ju- Kon (1997) The green

fluorescent protein as a marker for subcellular localization in transgenic rice plants. 97 한국분자생물학회 추계학술대회 포스터.

마. 특허

국내특허출원 1건

명칭: 엽록체를 타겟팅하는 신규한 유전자 발현방법

출원번호: 98-33594

출원일자: 1998. 8. 19