

631.52
L2932

최 중
연구보고서

작물의 생체방어 및 신호전달관련 유용유전자
분리 및 활용기술 개발

Isolation and Characterization for Utilization of
Defense-Related Genes from plant

연구기관
생명공학연구소

농 림 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “작물의 생체방어 및 신호전달관련 유용유전자 분리 및 활용기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다

2000 . 11.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 최 도 일

연 구 원 : 배 현 속

연 구 원 : 이 상 협

연 구 원 : 조 혜 선

연 구 원 : 오 상 근

연 구 원 : 이 소 영

연 구 원 : 김 영 철

연 구 원 : 김 수 용

위탁연구기관명 : 흥농종묘 (주)

위탁연구책임자 : 남 상 현

요 약 문

I. 제 목

작물의 생체방어 및 신호전달관련 유용유전자 분리 및 활용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본과제는 최근 급속히 진전되고 있는 병원체에 대한 식물의 생체 방어과정의 분자생물학적 연구기술을 이용하여 가지과 식물을 모델로 병원체에 대한 생체방어 및 신호전달과정에서 발견되는 다수의 조절유전자를 분리하여 유전자의 기능과 역할을 밝히고 그 기능을 이용하여 주요 종자식물의 내병성을 증진시키는 육종소재로 활용하는 기술을 개발하는 것이 연구수행의 목표이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 담배를 모델로 한 병저항성 및 신호전달관련 유전자의 다수분리
- 유전자의 선발 및 유전자 구조연구
- 유전자의 발현기구 규명 및 유전자 유용성 확인
- 생화학적 연구를 통한 유전자 기능규명
- 형질전환 벡터의 제작 및 형질전환체 선발
- 유전자의 조절부위(promoter) 분리 및 조절연구

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 2개의 새로운 생체방어관련 유전자 및 1개의 신호전달관련 유전자가 분리되었으며 연구 결과로 4편의 우수 국제 논문을 발표하였으며 1편의 논문이 출판 준비중에 있음. 본연구과제를 통하여 분리된 유전자는 식물의 내병성 기작을 이해하는 중요 분자 마커로, 내병성형질전환식물을 개발하기 위한 프로모터로 그리고 식물의 발달 및 신호전달을 이해하기 위한 분자수준의 도구로 활용 될 수 있을 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

Studies on isolation of defense-related genes from plants were done using tobacco and tobacco mosaic virus as a model system of plant-pathogen interaction in Solanaceous plants. From differential screening of 900 cDNA clones isolated from TMV-induced tobacco cDNA library, 25 defense-related genes were selected for further characterization. Among them two novel gene named 215, 630 and chitinase like receptor proteinase kinase were selected and further characterized. Expression of two novel genes(215, 630) were preferentially associated with disease resistant response of tobacco against pathogen and Northern blot hybridization and biochemical studies revealed they have some roles in disease resistance in plant.

Expression of 630 was specific to HR and only expressed in the vicinity of HR lesion. promoter of 630 was isolated and characterized. Chitinase-like receptor protein kinase is induced by pathogen infection and expression of this gene in transgenic tobacco revealed that it has role in plant growth and development. Detailed studies on isolation, characterization and transgenic expression of those gene isolated in this research are described in this report.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

1. Background of the research
2. Current status of the research area
3. Prospects of the research
4. Objectives of the research

Chapter 2. Materials and Methods

1. Isolation of defense-related genes using differential screening
2. Isolation and characterization of signalling-related genes

Chapter 3. Results

1. Isolation of defense-related genes using differential screening
2. Isolation and characterization of signalling-related genes

Chapter 4. Discussion

Chapter 5. References

목 차

제 1 장 서 론	6
제 1 절 연구개발의 필요성	6
제 2 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	8
제 3 절 앞으로의 전망	14
제 4 절 본 과제의 연구목표	16
제 2 장 재 료 및 방 법	17
제 1 절 차별스크리닝을 이용한 병방어 유전자의 분리연구	17
제 2 절 신호전달관련 유전자의 분리 및 특성규명	26
제 3 장 연 구 결 과	29
제 1 절 차별스크리닝을 이용한 병방어유전자의 분리연구	29
제 2 절 신호전달 유전자분리 및 특성 규명	59
제 4 장 논 의	89
제 5 장 참 고 문 헌	90

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

병의 피해에 의한 농작물의 손실은 전세계적으로 약 10% 정도에 이르는 것으로 추정되고 있다. 이러한 손실을 줄이기 위하여 이제까지는 여러 종류의 화학농약을 개발하여 사용해오고 있으나 사회적인 문제, 환경오염 문제 및 인축독성 등의 문제 때문에 새로운 병방제기술을 필요로 하고 있다. 농작물의 병저항성 품종을 개발하여 이용하는 것이 유일한 대안으로 여겨지고 있으며 이를 위해서는 새로운 생명공학 기술의 개발이 필수적이다. 유전자조작 및 식물형질전환 등의 유전공학적인 기술을 농학에 접목시켜 병저항성 작물품종육종으로 실용화시키기 위해서는 식물의 생체방어기작에 대한 기초연구가 선결되어야 하며 식물의 생체방어 기작연구에서의 분자생물학적 접근으로 식물의 저항성 관련 유전자 및 저항성 유도에 관련된 유전자 클로닝이 여러 각도에서 가능해 졌다. 생체방어기작 초기에 발현되는 유전자를 연구함으로써 저항성 반응의 발현까지 신호전달 체계를 이해할 수 있게 되었으며 이러한 유전자의 발현 및 조절연구를 통하여 유전자조작을 이용하는 현대적 개념의 육종에 필요한 정보를 확보하는 것이 가능해 졌다. 식물체의 병에 대한 저항성 반응과 감수성 반응의 분자생물학적 비교연구를 통하여 각각의 반응에 관여하는 유전자 및 그의 조절, 감수성을 저항성으로 전환할 수 있는 기술을 획득할 수 있게 되었다. 또한, 식물의 생체방어기작 연구를 통하여 식물체의 방어기작의 초기단계에 작용하여 식물고유의 여러 가지 병에 대한 저항성을 조절 할 수 있는 유전자의 발굴이

가능하며 또한 부위별 시기별로 유전자의 발현을 조절할 수 있는 유전자의 조절부위(promoter)의 발굴도 가능하게 되어 유용유전자를 이용하여 필요시에만 유전자를 발현시켜 원하는 표현형을 획득 할 수 있는 기술이 가능해 지고 있다. 또한, 근래에 이르러 신 기능을 갖는 작물의 유전자 및 이를 이용한 활용기술 개발 및 지적재산권화에 국제적으로 경쟁이 매우 치열한 상태이며 식물고유기능을 갖는 유전자 확보 및 이용기술이 21세기 농업에 주된 부가가치를 지니는 자원으로 부각되고 이다. 그러나 국내의 종자 산업은 영세성을 탈피하지 못하고 있는 실정이며 우리 나라 종자산업의 국제 경쟁력 강화를 위해서도 생명공학기술을 접목한 고유하고 우수한 형질을 가지는 형질전환 작물신품종개발이 시급한 실정이다. 결국 21세기의 농업 경쟁력은 우수한 유전자원, 고유기능의 유전자, 그리고 이들의 지적재산권 확보가 가장 중요한 요소로 등장할 것으로 예측되고 있다.

다른 한편으로는 환경오염과 생태계파괴 등의 문제가 대두됨에 따라 환경친화형 식물보호수단 및 저항성 품종개발에 의한 병해충방제대책이 시급히 요구되고 있다. 선진국에서는 이미 식물의 병해충 침입에 대한 방어기작에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있으며 이러한 연구결과를 실용화시키고 있다. 우리 나라의 경우 농업종사자의 급격한 감소와 농산물시장 개방 등 당면 문제를 고려할 때 국내농업기술의 과학화 및 현대화를 통하여 저노동 저비용화 하여 국제경쟁력을 높이려는 노력이 시급히 필요하다. 작물보호 분야에서는 작물의 고유한 생체방어능력연구와 기술활용을 통하여 내병성작물개발 또는 식물의 자체방어 능력을 향상시키는 새로운 식물보호제 개발이 가능하며 궁극적으로 노동력과 비용을 줄일 수 있는 첨단 농업 기술 개발이 가능하다.

제 2 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

식물의 생체방어 기작에 관한 연구는 선진국을 중심으로 연구가 매우 활발한 상황이며 작물의 병에 대한 방어 기작은 작물을 침해할 수 있는 병원체만큼이나 다양해 매우 복잡한 양상을 띠고 있다. 그러나 최근 들어 속속 발표되고 있는 논문들을 통해 비록 작물의 과(Family), 속(Genus), 종(Species)이 다르다 하더라도 병원체에 대하여 매우 유사한 생체방어반응을 가지고 있음이 밝혀지고 있으며, 거의 동일한 유전자들이 생체방어의 초기 또는 신호전달 과정에 관여하고 있음이 보고되고 있다. 이는 한 종류의 식물체에 관한 병원체에 대한 생체방어기작 연구를 통하여 얻어진 지식이나, 생체방어관련 유전자를 경제성이 높은 작물에 직접 이용하는 것이 가능함을 시사해주고 있다. 이러한 최근 연구결과에 따라 선진국들은 국가 연구기관 및 기업연구소를 중심으로 생체방어관련 유전자확보 및 기능연구를 통하여 화학농약사용절감과 환경파괴문제를 줄일 수 있는 유전공학적 내병성 작물개발에 박차를 가하고 있다.

식물은 여러 가지 다양한 방법으로 외부로부터 침입해 들어오는 병원균을 방어하는 데 그것은 첫째, 구조적인 벽을 만듦으로서 병원균의 침입 또는 확산을 막는 방법으로 세포벽에 lignin과 같은 물질을 축적하여 침입을 방해하는 방법, 침입된 세포자체를 죽여 버림으로서(과민성 반응) 절대 기생체인 병원체의 확산을 막은 방법 등이 바로 이것이다. 둘째는, 생화학적 방어방법인데 병원체의 생육을 억제하는 화학물질을 생합성 축적하여 병원균의 확산을 막는 방법으로 감염된 부위에 축적되는 phytoalexin 등이 이물질에 속한다. 생화학적 방어기작은 오래 전부터 식물의 병저항성 기작

의 하나로 많이 연구되었는데 특히 콩과식물(Leguminosae)의 isoflavonoid phytoalexin 합성과 관련하여 이의 합성에 관여하는 유전자인 phenylalanine ammonia lyase(PAL, Hoebereeder et. al 1989, Bolwell, et. al. 1985, Cramer, et. al. 1989) 및 chalcone synthase(CHS, Chappell and Hahlbrock, 1984, Harker, et. al. 1990, Ryder, et. al. 1984, Ryder, et. al. 1987)가 오래 전에 cloning 되었고 병저항성 및 phytoalexin 합성과 관련한 그 생합성 경로가 많이 연구되었다(for review Regrand, 1983, Hahlbrock and Scheel, 1989). 가지과 식물(Solanaceae)에서는 전혀 다른 경로인 isoprenoid 생합성을 통하여 phytoalexin이 합성되는데 이의 합성관련 효소인 HMG Co-A reductase(HMGR, Choi, et. al. 1992, Choi, et. al. 1994, Choi and Bostock 1994) 유전자가 cloning 되었고 sesquiterpene cyclase(SC)와 병저항성과의 관련관계가 연구되어 대사공학을 이용한 병저항성 식물개발의 가능성을 제시하였으며 일부 성공사례도 보고되고 있다. 식물은 병원체에 감염에 대하여 과민성 저항성으로 반응하였을 때 병원체에 노출되지 않은 다른 부위도 여러 가지 병원체에 대하여 저항성 반응을 보이는 현상을 가지고 있는데 이를 획득저항성 이라고 하며 획득저항성(SAR)에 대한 기작은 오랫동안 많은 연구자들에게 흥미의 대상이 되어 왔으며 최근 이 저항성의 발현이 자연계에 존재하는 물질인 salicylic acid 및 pathogenesis related protein(PR-protein) 축적과 관련되어 있음이 밝혀졌다(Ward,et. al. 1991, Yalpani, et. al. 1991, Rasmussen, et. al. 1991, Enyedi, et. al. 1992, Chen, et. al. 1993). 획득저항성의 발현과 더불어 다량 축적되는 PR-protein들에 관한 연구가 활발히 진행되어 그중 일부가 glucanase(Edelbaum, et. al. 1991) 및 chitinase임이 밝혀졌다(Beerhues

and Kombrink, 1994). 획득저항성 관련 유용유전자를 이용한 담배의 형질전환 실험을 통하여 PR-1, 및 chitinase의 over-expression이 담배의 역병 및 입고병 저항성에 기여함이 증명되었으며 여러 가지 아직 기능이 확인되지 않은 PR-protein들(Brederode, et. al. 1991, Rhoads and McZn tosh, 1993, Casa cuberta, et. al. 1991. Fleming, et. al. 1991, Pfitzner, et. al. 1991, Simmons, et. al. 1992, Friedrish, et. al. 1991, Pfitzner and Goodman 1987)도 보고되어있다. 획득저항성 연구의 특이할 만한 사항은 식물이 병저항성을 나타낼 때 발현되는 유전자들(PR-protein genes)의 존재이며 이들 유전자가 병원체의 직접개입 없이도 화학물질(salicylic acid 또는 aminobutyric acid)에 의해서도 그 발현이 유도되고 식물을 여러 가지 병해로부터 보호할 수 있다는 사실이다.

한편, 병원체의 특정 레이스 또는 strain에 대한 특이적 저항성 유전자의 분리연구도 활발히 진행되고 있다. 옥수수의 잎마름병(병원균, *Cochliobolus carbonum*)에 대한 특이적 저항성 유전자가 식물에서 최초의 특이적 저항성 유전자로 분리되어 잎마름병저항성 옥수수 품종개발이 가능해졌으며(Johal and Briggs, 1992), 토마토의 세균성 점무늬병(병원세균, *Pseudomonas syringae* pv tomato)에 대한 특이적 저항성 유전자인 Pto 유전자가 미국 코넬대학의 연구팀에 의해 클로닝 되어 저항성 토마토 품종개발이 가능하게 되었으며 특히 이 유전자가 protein kinase domain을 갖는

신호전달기작 관련 유전자임이 밝혀져 병저항성 반응의 신호전달기작 연구가 활기를 띠게 되었다(Martin et al. 1993). 담배의 모자이크 바이러스 저항성 유전자인 N 유전자가 클로닝 되었으며(Witham, et al. 1994), 이를 이용하여 주요작물인 토마토 고추 등의 저항성 품종 육성연구

가 진행되어 실용화를 앞두고 있다. 이밖에도 Arabidopsis의 RPS2 유전자 (Bent, et al. 1994), 토마토의 잎곰팡이병 저항성 유전자인 CF9 유전자 (Dixon, et al. 1996), 아마의 녹병 저항성 유전자(Lawrance, et al. 1995), 우리나라 및 아시아의 주된 식량작물인 벼의 흰빛잎마름병(병원세균, *Xanthomonas campestris pv oryza*)에 대한 저항성 유전자인 Xa21 유전자 등이 클로닝 되어 각각의 작물의 특이적 병원체에 대한 저항성 품종육성이 가능하게 되었다. 이러한 식물의 특이적 저항성 유전자 분리연구는 몇 가지 점에서 주시할 만한 점이 등장하는데 첫째, 분리된 병저항성 유전자들이 모두 생물체의 신호전달과정에 중요한 역할을 할 수 있는 유전자라는 점이며 둘째, 병원체와 작물의 종류에 상관없이 분리된 특이적 저항성 유전자들이 매우 유사한 구조를 지니고 있다는 것으로 이는 다양한 식물이 다양한 병원체에 대하여 매우 유사한 신호전달 과정을 거쳐서 병저항성이라는 반응을 나타냄을 암시하는 것이고, 셋째, 새로이 밝혀지고 있는 작물의 병저항성 과정에서 일어나고 있는 여러 가지 생화학 및 분자생물학적 현상이 비록 식물의 과(family), 속(genus), 및 종(species)이 다르다 하더라도 작물간에 매우 유사한 반응이 진행된다는 것으로 이는 하나의 대표적인 작물의 생체방어기작 연구로 그 지식 및 유전자를 여러 가지 작물에 동시에 활용할 수 있다는 것을 제시해 주고 있다.

식물의 병저항성 유전자가 다수 클로닝 되면서 이 분야의 연구자들의 주된 관심은 병저항성 유전자에서부터 병저항성 반응에 이르기까지의 일련의 신호전달기작 규명과 이에 관여하는 유전자 클로닝 그리고 이를 통해 얻어진 유전자 및 지식을 이용한 내병성 품종육성에 맞추어 지고 있다. 토마토의 Pto 유전자를 클로닝한 Martin 그룹은 Pto 유전자와 상호작용 하는

단백질의 유전자를 다수 클로닝 하여 병저항성 반응에서의 기능 등을 연구하고 있으며 미국의 California대학의 연구팀은 병저항성 유전자의 하위 신호전달에 관여하는 유전자의 분리에 성공하였으며 그 유전자를 다른 식물체에 과다 발현하여 여러 가지 병에 대해 저항성을 띠는 식물개발에 성공한 사례가 있다. 작물의 병저항성 및 이에 관여하는 신호전달 기작의 유사성 및 공통성 때문에 이 분야 의 연구는 앞으로도 매우 활기를 띠게 될 것으로 여겨지며 새로운 유전자 또는 새로운 지식의 발견은 학문 특성상 직접 종자개발 및 식물보호제 개발로 이어져 상당한 경제적 가치를 창출할 것으로 여겨지고 있다.

국내의 경우 최근에 들어 식물분자생물학 연구가 활성화되면서 대학, 농진청산하 연구기관, 출연연구기관, 및 일부 사기업연구소에서 식물의 생체방어기작 및 이에 관련된 유전자 클로닝이 중요연구 대상이 되고 있다. 농촌진흥청 산하연구기관 에서는 주로 작물을 대상으로 식물의 방어에 관련된 2차대사 관련 유전자(벼의 HMG CoA reductase gene, 와 토마토의 Phenylalanine Ammonia Lyase gene) 및 병발생 관련 단백질 유전자(Pathogenesis-related protein genes)등을 클로닝 하고 작물의 분자유종에 이용하는 연구를 시행하고 있다. 미생물 또는 동물유래의 유용유전자를 식물에 도입, 형질전환 하여 병저항성 식물을 만들려는 시도가 이루어져 일부 성공사례가 보고되어 있다. 생명공학 연구소와 한국인삼연초 연구원의 공동연구로 바이러스 유전자를 이용한 바이러스내성 연초품종육성이 보고되었으며 각 대학의 연구도 활성화되어 경상대학교 식물유전자조작센터, 서울대학교 등에서 기초연구를 목표로 한 유용유전자 클로닝이 활발히 진행되어 이를 이용한 내병성식물개발결과를 보고하고 있다. 그러나 전반적

인 고급연구인력의 부족과 연구비의 부족 등으로 아직까지는 연구가 종합적으로 진행되지 못하고 있으며 연구개발을 통하여 산업화 단계에까지 도달되지 못하고 있는 실정이다. 유용유전자의 Pool의 확보와 이를 이용한 식물의 병해충에 대한 방어기작연구가 국가 및 산업 재산이 되려면 더 많은 연구집단과 더 많은 연구비투자가 필요하며 다양한 유전자원의 확보 및 이를 이용한 연구가 곧 농업 및 관련산업의 국제경쟁력을 확보하는 관건이 될 것으로 여겨진다.

제 3 절 앞으로의 전망

우리나라의 경우 식물분자생물학의 주된 연구경향은 식물의 형질전환기술 등 기술적 측면에 중점을 두어 왔으며 메커니즘 연구 등을 통해 이를 실용적 측면에서 이용하는 연구는 미비하였다. 그러나 최근, 생명공학연구소, 농진청 산하연구기관, 및 대학을 중심으로 식물의 병저항성 관련 방어기작 및 유전자 클로닝이 시도되어 일부성공사례가 보고되어 있으며 여기서 얻어진 지식을 실용적 측면에서 이용 하려는 연구가 시도되고 있다. 작물의 생체방어 반응의 생리, 생화학, 분자생물학 등 기초분야 에서의 활발한 연구가 필요하며 이를 토대로 얻어진 종합적인 지식을 작물의 병방제 수단개발에 활용하는 응용연구가 동시에 진행되어야 한다. 세계적으로 활용가능한 data base등을 이용하여 이미 선진국에서 축적된 지식을 즉시 이용하여 이를 차원 높은 응용기술 개발에 활용하려는 노력이 요구되고 있으며 모델 식물을 이용한 기초지식과 유전자분리 연구가 필요하다. 현재의 생물학 및 농학 연구는 기초학문과 응용학문이 분리 될 수 없으며 따라서 실용적측면만 강조된 연구보다는 기초학문을 근간으로하는 목표지향적 연구가 더 나은 부가가치를 창출 할 수 있는 연구결과로 이어질 가능성이 높다.

외국의 경우 식물의 생체방어 기작에 관한 연구는 식물분자생물학의 기술이 발달되기 시작하면서 주요 연구분야가 되어 현재 다수의 작물에서 특정병원체에 대한 특이적 저항성유전자가 분리되어 특허와 논문이 출판되었다(Martin, et. al. 1993, Whitham, et. al. 1994, Bent, et. al. 1994, Ellis, et. al. 1995, Mindrinos, et. al. 1994). 식물의 병저항성 유전자에서부터 생체방어반응 까지의 신호전달기작의 이해가 아직까지는 미흡한

편이며 각 단계의 신호전달 과정에 관여하는 유전자의 분리 및 기능연구를 통하여 완전히 새로운 개념의 내병성 품종 또는 작물보호방법 개발이 가능할 것으로 예측되고 있으며 수년내에 이를 실용화하여 개발된 신작물이 시장에 등장할 것으로 판단된다. 식물의 2차대사과정을 통한 방어기작도 활발히 연구되어 콩과식물(Leguminosae plants) 및 가지과식물의 Phytoalexins 합성경로인 phenyl propanoids, 및 isoprenoids 대사에 관여하는 유전자들(PAL, HMGR, CHS, Sesquiterpene cyclase 유전자) 등이 클로닝 되어 이들 유전자의 발현과 식물의 병저항성과의 관련관계가 연구되었고 metabolic engineering을 통하여 병저항성 식물을 창출하려는 연구가 시도되어 일부 성공사례가 보고되고 있다.

획득저항성(SAR)발현과 관련된 유전자들(pathogenesis-related genes, PR-1 to PR-5) 이 클로닝되어 이들 유전자의 발현과 획득저항성과의 상관관계, 화학물질에 의한 유도발현 그리고 식물보호제로서의 개발이 연구되고 있다. 작물을 포함한 모든 식물체가 종, 속이 다른 경우에도 유사 또는 동일한 생체방어기작을 가지는 것으로 계속 밝혀지고 있으며 따라서 한 식물체를 모델로 한 생체방어 및 신호전달관련 유전자의 깊이 있는 연구와 유전자들의 기능을 밝히는 연구는 여러 가지 중요 식량작물의 내병성 및 내 스트레스성을 증진시키는 중요한 수단으로 등장하게 될 것이다. 이 분야의 수많은 우수한 연구결과와 현재 선진국에서의 연구개발 투자에 비추어 짧은 시간안에 상당한 부가가치를 지니는 새로운 품종 또는 생명공학종자의 출현이 예상되며 유용유전자의 분리 및 이에 대한 지적재산권 확보경쟁이 치열해질 것으로 예상된다.

제 4 절 본 과제의 연구목표

본과제는 최근 급속히 진전되고 있는 병원체에 대한 식물의 생체 방어과정의 분자생물학적 연구기술을 이용하여 가지과 식물을 모델로 병원체에 대한 생체방어 및 신호전달과정에서 발견되는 다수의 조절유전자를 분리하여 유전자의 기능과 역할을 밝히고 그 기능을 이용하여 주요 종자식물의 내병성을 증진시키는 육종소재로 활용하는 기술을 개발하는 것이 연구수행의 목표이다.

제 2 장 재 료 및 방 법

제 1 절 차별스크리닝을 이용한 병방어 유전자의 분리연구

가. 담배의 병저항성 기작을 이용한 연구 체계확립

담배모자이크바이러스에 대하여 특이적 저항성 유전자인 N-gene을 가지는 담배품종 (*Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv Samsun NN, *N. tabacum* cv Xanthi nc 등)에 담배모자이크 바이러스를 감염시키면 감염된 식물체는 과민성 세포사멸과 더불어 그 식물체가 여러 가지 다른 병원체에 감염이 일어났을 때에도 동일하게 일어나는 일반적인 병저항성 반응을 보이게 되는데 이와 같이 식물이 병원체의 종류 또는 식물의 종류에 상관없이 일반적인 방어반응을 보이는 현상을 통칭하여 식물의 common defense라 한다. 본 연구에서는 N-gene을 가지고 있는 담배품종의 과민성저항성 반응 특히 temperature sensitive-resistance를 이용하여 인위적으로 저항성, 감수성을 조절하여 일시에 식물체전체에 병원체에 대한 생체방어 반응을 유도하여 이러한 과정에서 새로이 발현이 증가 또는 감소하는 유전자를 분리하고 그 기능을 연구하여 작물의 새로운 병저항성을 육성하는 실험에 이용하였다.

나. Modified differential screening을 통한 생체방어 유전자 선발

작물의 과민성세포사멸부위 및 이러한 과정을 거친 식물체의 다른 부위에서 발현이 특이적으로 증가 또는 감소되는 유전자를 분리하기 위하여 담배모자이크 바이러스에 감염된 후 전신에 세포사멸이 유도된 식물체에서부터 제조된 cDNA library의 일부를 in vivo excision technique을 이용하여

개개의 plasmid 상태로 전환하였으며 각각 하나씩의 plasmid를 함유하는 E. coli 클론으로 확보하였다. 그림 1 은 Differential screening 과정을 도식적으로 나타낸 그림이다.

이런 과정을 통해 얻어진 900개의 E. coli clone을 각각 plasmid miniprep 하여 일정량(2-3 ug)을 slot blotter를 이용하여 nytran membrane에 blotting 한 후 저항성 반응을 보이는 식물체 또는 건강한 식물체에서 분리한 mRNA로부터 cDNA probe를 제조하여 reverse northern blot을 수행하였다.

Outline of modified differential screening

In vivo excision of TMV -induced cDNA library



Plasmid miniprep



Selection of TMV -inducible clones
(Reverse Northern Blot Analysis)



5'end sequence analysis &
Northern Blot Analysis



Characterization of the genes

Figure 1. Outline of modified differential screening for cloning of pathogen-responsive genes. TMV-induced tobacco cDNA library was massively *in vivo* excised and transformed into E. coli. Plasmid DNAs from 900 clones were isolated and mounted onto 48 well slot blotter and duplicated blots were hybridized with ³²P-labelled induced or uninduced cDNA probes prepared from infected and uninfected tobacco plants.

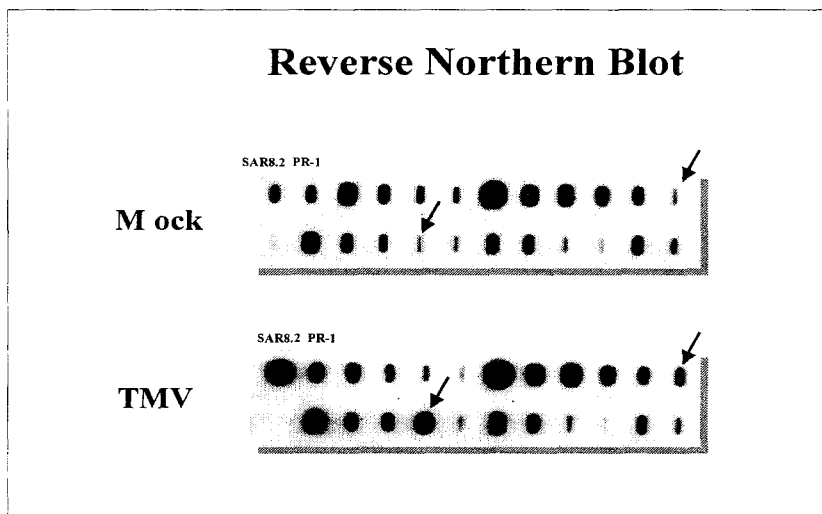


Figure 2. A typical results of reverse-Northern blot analysis. Northern blot hybridization of mRNA isolated from healthy(H), and resistant(R) tobacco with isolated 1,000 cDNA clones(only one blot was presented). Pathogenesis-related protein-1 and SAR8.2 cDNAs were used as positive controls.

다. 후보유전자의 선발

분리된 900개의 plasmid DNA를 48개씩 duplicated slot blot을 만들어 reverse northern을 수행 하였다. 그 결과로 전체의 9.3%인 84개의 클론이 일차적으로 선발 되었다(표 1)

Table 1 Classification of genes identified by partial DNA sequencing and data base search.

	Slot Blot	Sequencing & Data base search	Classification		
			PR/Defense related	High score matched	Unknown
Number of clones (%)	900	84 (100)	25 (30)	43 (51)	16 (19)

선발된 모든 클론들은 각 유전자의 5'-말단 부위의 염기서열이 결정되었으며 각 염기서열의 Data Base 조회결과(NCBI Blast program)에 따라 유전자가 동정되었다. 선발된 84개의 클론 중 30%에 해당되는 유전자는 이제까지 식물체의 생체방어와 관련하여 발현이 증가되는 것으로 담배를 비롯한 다양한 식물체에서 보고 되어있는 유전자였으며 52%에 해당되는 43개의 유전자는 식물의 생체방어와는 관련이 알려져 있지 않지만 이미 보고되어 있는 유전자들이었으며 19%인 16개의 유전자는 이제까지 알려지지 않은 유전자들이었다. (표 2).

라. 유전자의 분리 및 염기서열 결정

유전자의 정체가 확인된 유전자뿐만 아니라 data base 상에 아무런 homologue도 존재하지 않는 유전자의 경우도 병저항성을 보이는 식물조직과 그렇지 아니한 조직에서 분리한 RNA를 이용하여 RNA blot hybridization을 수행하였다. 이중 2개의 새로운 유전자 (clone #215, #630)

가 data base에 그 정보가 전혀 존재하지 않으며 병저항성 반응을 보이는 식물조직에서 특이적으로 발현되는 유전자로 선발되었다. 그림 3은 담배모자이크 바이러스에 감염된 저항성인 식물체에서 온도변경 후 선발된 215 및 630 유전자가 저항성 특이적으로 발현되는 모습을 나타내고 있다.

마. cDNA library 스크리닝 및 full-length clone의 선발

선발된 두 개의 새로운 유전자인 215와 630 유전자의 full length clone을 분리하기 위하여 병저항성이 유도된 식물체로부터 분리한 mRNA로부터 제작된 cDNA library를 스크리닝 하여 full length cDNA clone을 분리하였으며 각각의 유전자를 dye terminator automatic sequencing 방법을 이용하여 전체염기서열을 결정하였다. 215 유전자는 약 24 KD의 단백질을 코딩하였으며 아미노산 서열만으로는 그 기능을 유추할 수 없었다. 630 유전자는 약 20 KD의 단백질을 코딩하는 한 개의 open reading frame을 가지고 있었으며 역시 그 일차구조로만은 기능을 유추할 수 없었다.

바. 전체 DNA 분리 및 계놈 유전자 분석

새로이 분리된 유전자인 215와 630의 계놈상의 구조를 확인하기 위하여 southern blot hybridization을 수행하였다 (그림 5). 그 결과 215의 경우 amphidiploid 식물체인 재배종담배(*Nicotiana tabacum* cv. samsun NN)에서는 4개의 hybridization signal이 그리고 diploid인 야생종담배(*Nicotiana glutinosa*)에서는 2개의 hybridization signal이 관찰되어 최소한 2 copy의 유전자가 diploid genome에 존재하는 것으로 확인 되었다. 한편 630 유전자의 경우 재배종담배에는 2개 그리고 야생종 담배에서는 1개의 hybridization signal이 관찰되어 계놈 상에 한 개의 유전자가 존재하는 것으로 확인되었다.

사. 630 유전자의 발현 연구

새로이 분리된 유전자의 기능을 규명하기 위한 1차 단계로 이 유전자가 어떤 상황에서 발현이 증가하는가를 확인하였다. 그림 6는 담배모자이크바

이러스의 감염이후 630유전자의 발현을 이미 알려져 있는 병저항성 관련 유전자인 pathogenesis-related protein-1 유전자의 발현과 비교한 그림이다. 이 유전자는 담배모자이크바이러스에 대해 저항성인 품종의 담배에서 세포 괴사가 눈으로 확인되는 시간대에 즙음해서부터 발현이 증가된다는 점에서 pathogenesis-related protein-1유전자와 유사한 발현양상을 나타내었다 (그림 6-1). 세포괴사가 일어난 부위를 cork corer로 분리해낸 후 유전자 발현 양상을 조사한 결과 630유전자와 pathogenesis-related protein-1유전자 모두 세포괴사가 일어나는 부위에서 집중적으로 발현되는 것으로 확인되었다 (그림 6-2).

630 유전자가 식물의 병 저항성 반응에서만 특이적으로 발현되기 때문에 이미 알려져 있는 식물의 병 저항성 유도 물질인 salicylic acid에 의한 유전자 발현증진여부를 확인하였다. 그 결과 630 유전자는 비교적 고농도의 salicylic acid 처리에 의하여 전혀 발현이 증가되지 아니 하였다 (그림 7). 이에 비하여 동일한 RNA를 salicylic acid에 의해서 발현이 증가하는 것으로 알려진 PR-1유전자의 probe로 hybridization한 결과 PR-1 유전자는 처리 후 12시간 이내에 매우 증가된 발현을 보이는 것으로 확인되었다. 이 결과는 630 유전자가 병 저항성 반응에 관련된 새로운 유전자로써, 이미 알려져 있는 salicylic acid signalling pathway와는 전혀 다른 신호 전달 기작을 거쳐서 병 저항성 반응에만 특이적으로 발현이 증가하는 유전자임을 의미한다.

630 유전자가 병 저항성 유도물질로 알려진 salicylic acid에 의해 발현이 유도되지 않았으므로 이 유전자의 발현을 유도하는 신호 전달 기작을 연구하기 위하여 reactive oxygen species의 일종인 H_2O_2 에 대한 반응을 조사하였다. 최근의 연구는 병원균 침입부위에 증가하는 reactive oxygen species가 병 저항성을 유도하는 신호역할을 할 가능성을 제시하고 있다. 630 유전자는 pathogenesis-related protein-1 유전자와 마찬가지로 H_2O_2 에 의해 발현이 유도되었으며 그 발현정도는 H_2O_2 의 농도에 비례하였다 (그림

8). 이는 630 유전자의 발현이 단순히 세포괴사에 따른 부작용으로 이루어지는 것이 아니라 병원균으로부터 유래하는 신호에 의해 조절됨을 의미하며 이 유전자의 발현이 식물 병 저항성에 적극적으로 관여될 가능성을 제시하는 결과이다.

식물세포 괴사는 구리와 같은 중금속에 의해서도 일어나는데 이때 발현되는 유전자의 양상은 식물병원균에 의한 것과 유사하다. Pathogenesis-related protein-1 유전자의 발현은 그 대표적인 예이다. 630 유전자가 중금속처리에 의한 세포의 괴사 때 발현되는지를 조사해본 결과 pathogenesis-related protein-1 유전자와 유사한 시간대에 발현됨을 관찰할 수 있었다 (그림 9).

630 유전자가 H_2O_2 및 중금속에 의해서 발현되고 salicylic acid에 의해서 발현되지 않음은 병 저항성을 유도하는데 있어서 salicylic acid signalling pathway와 다른 신호전달과정이 존재함을 의미하며 그 과정에 의해 630 유전자가 발현될 가능성을 제시한다. 그 신호전달과정 및 그에 의해 발현되는 유전자의 기능연구는 salicylic acid signalling pathway와 더불어 병저항성 유도과정 및 결과를 종합적으로 이해할수 있게 한다는 측면에서 매우 중요한 정보를 제공할 것으로 여겨진다.

아. 215 유전자의 발현연구

저항성 및 감수성 품종의 담배에 담배모자이크바이러스를 감염시킨 후 215 유전자의 발현을 시간적으로 관찰하였다 (Fig 10). 이 유전자는 저항성 식물체에서의 경우 저항성 반응의 초기 (감염 후 6시간)에 발현이 급격히 증가하였다가 다른 저항성 관련 유전자발현이 진행되는 후기시간 (24-48시간 후)에는 전혀 발현이 되지 않는 것으로 확인되었다. 특히 감수성 식물에서는 그 발현정도가 저항성 식물에서보다 높고 오래 유지되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 215 유전자의 발현정도가 식물체내의 바이러스 농도와 상관관계가 있을 가능성을 제시하고 있다.

자. 유전자 기능연구를 위한 단백질 생산 벡터 제작 및 *E. coli*에서의 발현

215 유전자의 아미노산 서열을 Data Base (NCBI Blast program) 에 조회한 결과 이 유전자는 cysteine proteinase inhibitor 와 가장 homology 가 높고 또한 Kunitz type trypsin inhibitor domain 을 가지고 있는 것으로 나타났다 (Fig 11). 최근의 논문에서는 cysteine proteinase inhibitor가 항균성을 가지고 식물 병 저항성에 적극적으로 관여한다고 보고되고 있다. 또한 630 유전자는 병 저항성 반응에서만 특이적으로 발현되는 것과 병원균 침입 부위에 집중적으로 발현되는 것으로 미루어 항균성 단백질을 code 할 가능성이 높다고 보고 있다. 그러므로, 215 유전자와 630 유전자 산물의 구체적인 역할을 규명하기 위하여 *E. coli* 내에서 다량발현 실험을 실시하였다. 215 유전자와 630 유전자의 coding region을 단백질 다량생산벡터인 pET21a 에 클로닝 하고 그 벡터를 *E. coli* cell내로 옮겨 단백질이 발현되는지를 조사하였다. 215 유전자는 다량의 단백질을 생산하였으나 대부분이 불용성인 inclusion body를 만드는 것으로 나타났다 (그림 12). 그러므로 이 단백질의 용해도를 높이기 위하여 *E. coli* 내에서 solubility가 높은 maltose binding protein과의 합성단백질을 만드는 것을 시도하고 있다.

차. Inverse-PCR을 이용한 630 유전자 프로모터의 분리

630 유전자의 발현이 일련의 실험을 통하여 병원체의 침입에 의한 세포 사멸 또는 이와 유사한 상황에서만 발현되는 것으로 확인되었기 때문에 630 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 부위가 매우 흥미롭게 여겨졌으며 또한 조절 가능한 프로모터로서의 유용성도 추정할 수 있었기 때문에 Inverse polymerase chain reaction을 이용하여 630 유전자의 upstream부위를 클로닝 하였다. *Nicotiana glutinosa*의 게놈 DNA를 NdeI, HindIII, SacI 및 XbaI등의 제한효소로 절단한 뒤 T4 DNA ligase를 이용하여 self ligation한 후 630 유전자의 coding region에서 서로 반대방향으로 디자인된 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 약 1kb의 DNA fragment를 확보하여 T-vector에 클로닝하여 염기서열을 결정하고 이를 계속 실험에 사용하였다.

파. 형질전환 벡터제작 및 식물체 형질전환

분리된 630 유전자의 프로모터부위 중 병원체 침입에 따른 세포사멸 과정에서 유전자 발현을 조절하는 부위를 알아보기 위하여 1kb의 DNA를 5-prime말단에서부터 deletion된 7개의 DNA조각으로 분할하여 이를 pBI101 vector의 GUS유전자 앞에 클로닝 하여 Agrobacterium을 이용하여 담배 (*N. tabacum* cv Xanth nc)에 형질전환 하였다.

제 2 절 신호전달관련 유전자의 분리 및 특성규명

가. 유전자 재조합 기술

대부분의 기술은 분자생물학의 기본 기법으로 Maniatis의 “Molecular Cloning”에 나오는 방법을 따라서 행하였다.

나. DNA sequencing

DNA sequencing은 Dideoxy sequencing method를 이용하여 수행하였다.

다. genomic DNA 분리

2 그램의 담배 어린 잎을 liquid Nitrogen에서 잘 간다음 urea extraction buffer를 넣고 섞은 뒤 phenol/chloroform과 mix하여 실온에서 15분간 둔다. 그후 원심분리하여 상등액을 취한 후 ammonium acetate와 isopropanol을 이용하여 DNA를 침전시킨다. 그 후 한번 더 DNA를 침전한 후 TE 용액에 녹인다.

라. PCR

담배형질전환체의 잎조직으로부터 genomic DNA를 분리한 후 pMBP vector내의 nptII 유전자에 대응하는 PCR primer를 써서 Taq DNA polymerase로 PCR 하여 transgene의 존재여부를 검증하였다.

마. mRNA 분리

Total RNA를 담배형질전환체의 잎조직으로부터 Trizol 방법을 이용하여 추출하고 몇번의 chloroform extraction을 통하여 정제하고 이로부터 mRNA를 분리하고자 할 때에는 oligo(dT) cellulose chromatography를 통하여 poly(A) RNA를 얻었다.

바. Gene expression 연구

담배 형질전환체의 잎 조직으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot hybridization 분석을 통하여 이들 유전자의 발현을 wildtype 식물체와 비교하여 연구하였다. 또한 여러 가지 chemical을 처리하여 이들 chemical의 처리가 CHRK1 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

사. 식물세포배양 방법

1). MEDIA

SOLID MS0 MEDIUM: Murashige and Skoog Basal Medium, e.g., Imperial Laboratories #9-300-40 3% (w/v) Sucrose 0.8% (w/v) Agar, e.g., Sigma A7002 pH 5.8

LIQUID MSA MEDIUM: As solid MS0 medium, but supplemented with: 0.5 mg/l 2,4-D 0.05 mg/l kinetin

CALLUS INDUCTION MEDIUM: Gamborg's B5 Basal medium e.g. Sigma G 5893 2% (w/v) Glucose 0.8% (w/v) Agar 0.5 g/l MES 0.5 mg/l 2,4-D 0.05 mg/l Kinetin pH 5.7.

2). 씨의 소독 및 발아

씨를 10% (w/v) "Domestos" (commercial bleach)에 20분 동안 담가 놓는다. 그런 후에 500 ml 소독된 물을 이용하여 씻고 40C에 4-7일 동안 저장하여 둔다. MS0 media를 가지는 55 mm diameter, 100 mm height 을 갖는 petri dish에 심는다. Plate들을 형광불빛 아래에 둔다

3). CALLUS INITIATION

약 2 주일 후에 이들을 plate에서 꺼내어 뿌리를 아주 잘게 자르고 이들 callus induction medium을 가진 plate에 옮기고 다시 키운다. Callus의 크기가 약 1 mm 정도 크기로 자랐을 때에 새로운 plate로 옮긴 다음 계속하여 키운다.

4). INITIATION OF CELL SUSPENSIONS

Callus가 만들어진 2-3 주 후에 약 pea 크기의 callus를 liquid MSA medium에 넣고 약 40rpm의 속도로 shaking하면서 suspension culture를 만든다. 약 7-10일 후에 suspension culture는 subculture하도록 한다.

5). SUB-CULTURING

모든 액체 medium을 제거하고 새로운 liquid MSA medium을 50 ml 넣어 주고 계속 shaking하며 키운다.

Cell mass가 두배로 증대된 후에 30% 의 culture를 새로운 flask로 옮기고 계속하여 키운다.

제 3 장 연구 결과

제 1 절 차별스크리닝을 이용한 병방어유전자의 분리연구

1. 차별스크리닝을 통한 내병성 유전자의 분리

담배의 담배모자이크바이러스에 대한 저항성 반응을 모델로 이용하여 차별 스크리닝을 수행하였으며 900개의 클론을 스크리닝 하여 표2와 같은 유전자가 분리되었다.

Table 2. Blast analysis of ESTs selected from differential screening

2-1. Pathogenesis-related and Defense-related protein genes

Clone No.	Gene Name	Accession No.	Size(Full or Partial)	Reference
59	Taumatoin-like protein(PR-5)	X03913	Partial-3aa	PMB 12:153-155
103	Glutathione-S-transferase(IAA-reg)	M29274	Full	
104	Glycine-rich protein(Wound,Dev-reg)	D86721	Partial	PMB 33:667-678
107	Pathogenesis-related protein-1a(PR-1)	D90196	Full	
143	Pathogenesis-related protein-4(PR-4)	X60281	Partial	
163	SAR8.2	M97361	Full	
169	Glycine-rich cell wall protein	M37152	Full	
198	Osmotin(PR-5)	X95308	Full	
239	Glycine-rich protein	M37152	Full	Plant Cell 6:1035-47
260	Extensin-like protein	D83226	Partial	
358	Acidic Chitinase(PR-P, PR-3)	M29869	Full	
422	Glutathione-S-transferase	M29274	Partial	
428	PR 4b(antifungal protein)	S72452	Full	
433	Acidic chitinase(PR-Q)(PR-3)	M29868	Full	
512	Flower specific gamma thionin(antifungal)	Z11748	Full	
559	SAR8.2	M97194	Full	
570	Osmotin(antifungal)(PR-5)	X95308	Full	
600	SAR8.2	M97194	Full	
622	Acidic chitinase(PR-3)	X51426	Full	
674	Glycine-rich protein	M37152	Full	MPMI 1:107-112
676	Proteinase Inhibitor	U08219	Partial	
703	Glycine-rich protein	M37152	Partial	
778	SAR8.2	M97361	Full	
849	Pathogenesis-related protein-1(PR-1)	D90196	Full	
874	Acidic chitinase(PR-Q)(PR-3)	M29868	Full	

2-2. Known and High Score Matched Genes

Clone No.	Gene Name	Accession No.	Size(Full or Partial)	Reference
23	Proteosome α subunit	Y14339	full	
33	Tobacco, Chloroplast ORF82	Z00044	Full	
60	Plastocyanin	X13934	?	
63	psaDa(photosystem reac center subII)	X60008	partial	PMB 17:1251-1254
94	Phosphogludomutase	U89341	partial	
113	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas	M14417	full	Cell 47:73-80
126	Cytochrome C reductase(8.2KD sub U)	X79275	full	BBA 1188:367-372
138	Ferredoxin-I	Z75520	partial	PMB 33:641-651
156	Plastidic aldolase	Y10380	partial	
183	Kinesin homologues	Z97335	partial	
189	Potassium transporter	AF012660	full	FEBS Let 415:206-11
215	Putative Ca binding protein	S51858	partial	
216	Putative Ca binding protein	S51858	partial	
227	Plastocyanin	X13934	partial	NAR 21:1647-1653
232	NADP-malate dehydrogenase	X74507	full	EJB 217:189-197
342	Apomixis-associated mRNA	D37938	partial	
406	14-3-3 protein	Y11211	full	FEBS Let 413:294-298
460	Replication Activator	M87349	partial	Patent WO9518231-A
478	Induced stolon tip protein	Z11679	Partial	
545	PSII, water oxidizing complex(33KD)	X64349	full	
580	Beta-amylase	Z97342	partial	
603	Trios-phospate translocator	X75088	full	
617	Zeta carotene desaturase	U38550	full	
669	adenylate kinase	P43188	full	
746	Cytochrome B6-F Comp. Iron-S sub II	X66010	partial	
824	NAD-malate oxidoreductase	Z23023	partial	

2-3. Unknown and low score matched gene

Clone No.	Gene Name(most matched)	Accession No.	Size(Full or Partial)	Reference
32	C25A1.6(unknown function)	Z81083	full	
68	unknown			
92	membrane protein	M75136	?	
191	ribosomal protein(Brassica)	D78495	?	
193	Stromal cell-derived factor 2	D50643	partial	
239	proline rich protein precursor	X60391	?	Plant J. 1:345-354
266	RSI-1 protein(Tomato, GA-regulated)	L22188	partial	MGG 243:148-157
392	ORFR2, Titin(human)	U72238	partial	
414	Uridine Kinase	L31783	full	
465	Dynein LC6	AB004830	full	MCB 16:1966-1977
473	unknown	Z81060	?	
581	motor protein/Zinc finger protein	U92949	?	
605	NADH-Ubiquinone oxidoreductase	L06178	?	
630	Lemir(rapid nematode-induced)	U70076	?	
672	ATP synthase subunit F	D17462	full	

2-4. RUBISCO, Ribosomal, CAB genes

Clone No.	Gene Name	Accession No.	Size(Full or Partial)	Reference
46	Ribosomal protein L36	U47095	full	
73	RUBISCO SSU	X01722	full	
117	RUBISCO SSU	M32420	?	
182	RUBISCO SSU	X01722	full	
190	Ribosomal protein S27	X83694	full	
195	Cab 40	X52744	full	
197	Cab CP29	Z50801	?	
218	Ribosomal protein S15	Z23161	full	
228	RUBISCO SSU	X01722	?	
230	Ribosomal protein L37A	L21897	full	
426	RUBISCO SSU	X01722	?	
504	RUBISCO SSU	X01722	?	
506	Cab	X58230	?	
511	metallothionein(cytikinin regulated)	U35225	full	
533	Type II Metallothionein	Q40410	partial	
640	Ribosomal protein S27	X83694	full	

이러한 실험 과정을 거쳐 식물이 병저항성 반응을 보일 때 발현이 증가 또는 억제되는 다수의 유전자가 분리되었으며 그림 3은 본 실험에서 분리된 담배의 pathogenesis-related protein 유전자들이 병저항성 반응과정에서 발현이 증가되는 현상을 Northern blot으로 보여주고 있다.

또한 그림 4는 본 실험에서 분리된 식물의 내병성관련 유전자 12개가 담배의 *Pseudomonas syringae pv syringae* 61에 대한 비기주 저항성 반응과정 동안에 시간적인 차이를 가지고 발현되고 있는 것을 보여주고 있다.

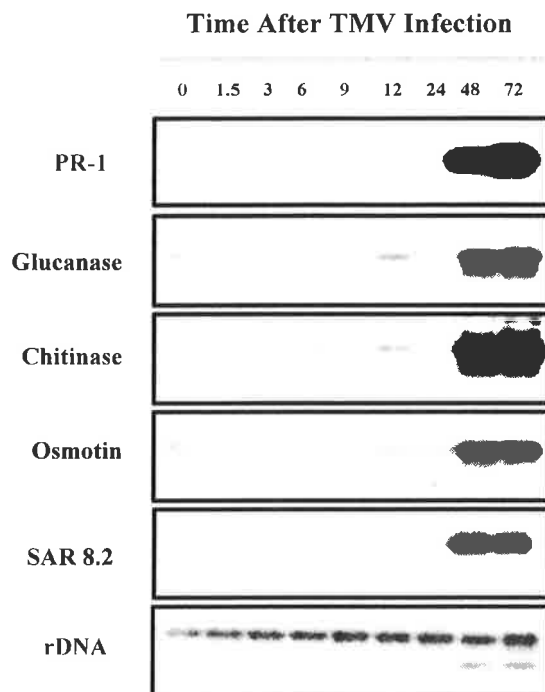


Figure 3. Northern blot hybridization of PR-genes TMV-infection in tobacco.

RNA samples were isolated from TMV infected tissues following indicated time

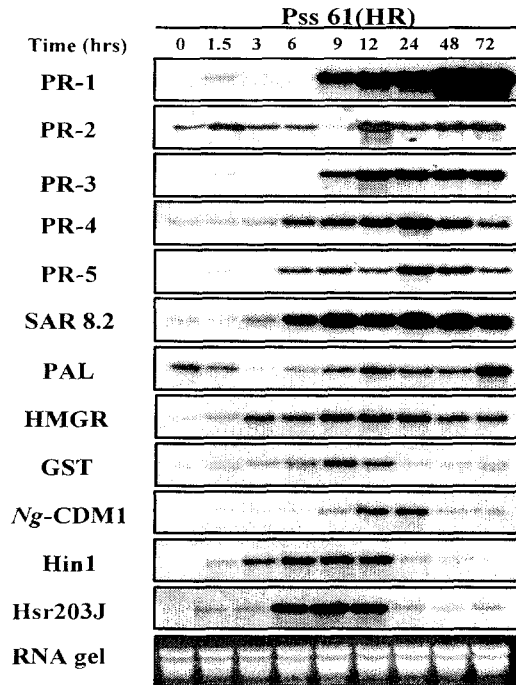


Figure 4. Differential expression of defense-related genes of tobacco during non-host resistance response following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*

2. 유전자의 분리 및 염기서열 결정

이러한 reverse northern 및 northern blot 과정을 통하여 다수의 유전자가 분리되었으며 분리된 유전자의 염기서열 결정을 통하여 유전자가 동정되었다(표 1 및 표 2 참조). 유전자의 정체가 확인된 유전자뿐만 아니라 data base 상에 아무런 homologue도 존재하지 않는 유전자의 경우도 병저항성을 보이는 식물조직과 그렇지 아니한 조직에서 분리한 RNA를 이용하여 RNA blot hybridization을 수행하였다. 이중 2개의 새로운 유전자(clon # 215, #630)가 data base에 그 정보가 전혀 존재하지 않으며 병저항성 반응을 보이는 식물조직에서 특이적으로 발현되는 유전자로 선발되었다. 그림 5는 담배모자이크 바이러스에 감염된 저항성인 식물체에서 630 유전자가 저항성 특이적으로 발현되는 모습을 나타내고 있다. 양성 대조구로 담배의 PR-1 유전자를 사용하였다.

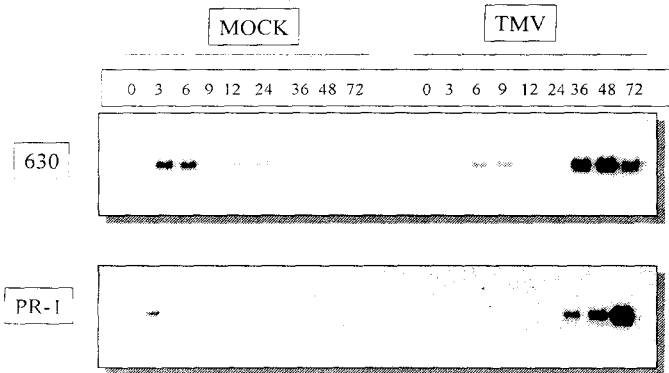


Figure 5. Differential induction of PR-1 and 630 gene during disease resistant response of tobacco against TMV.

215 와 630 유전자는 이미 알려져 있는 병저항성 관련 유전자인 pathogenesis-related protein-1 유전자, phenylalanine ammonia lyase 유전자, 및 HMG-CoA reductase 유전자 등과는 상이한 발현 패턴을 보였으며 그 차이는 발현시작시간 및 최고발현시간이 다른 것으로 판단할 수 있었다. 이는 매우 흥미로운 결과를 작물의 병저항성 신호전달이 최소한 3개 이상의 서로다른 과정을 거쳐서 일어나고 있음을 시사한다.

3. cDNA library 스크리닝 및 full-length clone의 선별

선발된 두 개의 새로운 유전자인 215 와 630 유전자의 full length clone을 분리하기 위하여 병저항성이 유도된 식물체로부터 분리한 mRNA로부터 제작된 cDNA library를 스크리닝하여 full length cDNA clone을 분리하였으며 각각의 유전자를 dye terminator automatic sequencing 방법을 이용하여 전체염기서열을 결정하였다. 215 유전자는 약 24 KD의 단백질을 코딩하였으며 아미노산 서열만으로는 그 기능을 유추 할 수 없었다. 630 유전자는 약 20 KD의 단백질을 코딩하는 한 개의 open reading frame을 가지고 있었으며 역시 그 일차구조로만은 기능을 유추할 수 없었다. 이들 유전자들은 연구완료 후 유전자특허에 출원 할 예정이다.

4. 전체 DNA 분리 및 게놈 유전자 분석

새로이 분리된 유전자인 215 와 630의 게놈상의 구조를 확인하기 위하여 southern blot hybridization을 수행 하였다. 그결과 215의 경우 amphidiploid 식물체인 재배종담배(*Nicotiana tabacum* cv. samsun NN)에서는 4개의 hybridization signal이 그리고 diploid 인 야생종담배(*Nicotiana glutinosa*)에서는 2개의 hybridization signal이 관찰되어 최소한 2 copy의 유전자가 diploid genome에 존재하는 것으로 확인되었다. 한편 630 유전자의 경우 재배종 담배에는 2개 그리고 야생종 담배에서는 1개의 hybridization signal이 관찰되어 게놈상에 한 개의 유전자가 존재하는 것으로 확인되었으며 630 유전자의 게놈유전자(genomic gene) 분리와 promoter 분석을 위한 실험을 수행하였다.

5. 215 유전자의 동정

data base 조회 결과 215유전자의 DNA sequence는 상동성을 가진 유전자를 발견할 수 없는 새로운 유전자였으며 215로부터 유추된 단백질은 식물의 protease inhibitor와 유사성을 가지고 있었다 (그림 6)

	1	50
215aa	MKSFIFSFLL LSTLTLSPF VVFSSTFTST NPVLPITTD DDKGFPVPVL	
Sporamin A	MKAFTLALFL ... ALSL... Y LLLNPAHSRF NPVLPITTHE ... PASSE	
Potato CPI	... SINILSFLL LSSTLSLVAF ... ARSFTSE NPVLPITTCB DDDNL ... VL	
Potato CDI	... MMKCLFL LC... LCLFPI LVFSSTFTSQ NPINLPS... ESPVFKR...	
Potato API	... MMKCLFL LC... LCLVPI VVFSSTFTSK NPINLPS... DAT... P...	
Tobacco TRP	... MK... TNG L... FLFF L... IFTIS FNSLLSSAAE AP...	
Lemir	... MK... INQ L... FFFF L... ILAIS FNSLLSSAAE SP...	
Miraculin	... MKELTM L... SLSF FVFSGLLAAA ANPRLSAADS AP...	
Consensus	... mK.l.l.l.l.l.l.l.pf ... s...fts... npi.Lps...	
	51	100
215aa	PEVLIDINGEP LQIGEKYHIV SAIWGAGGGG VYLTIVRN... TRCPNDVQGH	
Sporamin A	TPVLIDINGDE VRAGSNVYMW SAIWGAGGGG LRLAHLDTM SKCASDVIVS	
Potato CPI	PEVVDGQGNP LRTIGERYIIN NFLLGAGA VVLYNIGNL OCPNAVLIQH	
Potato CDI	... VLDITNGKK LNPNSSVRII STFNGALGGD VYLGKSPNSD APCPDGVFRY	
Potato API	... VLDVAGKE LDSRLSVRII STFNGALGGD VYLGKSPNSD APCANGIFRY	
Tobacco TRP	PAVVDIAGKK LRTGIDYVIL PVVRGRGGGL TLDSTGNE... SCPLDAVVQ	
Lemir	PEVVDIDGKI LRTGVDYVIL PVVRGRGGGL TMSIGDK... MCPDAVVQ	
Miraculin	NPVLDIDGEX LRTGTNYIVV PVLRDHGGGL TVSATTPNGT FVCP PRVVQ	
Consensus	... VIdi.Gk. Lr.g...Y.I. s...GagGG. vyl...n... Cp.v...	
	101	150
215aa	GRTPK KACF LNSLPLAPGP PFF NVVRET NNINIMFSVP TSRLCVNETV	
Sporamin A	PNDLD NGDF ITITPATADP ES... TVVMAS TYGTFRENTA TNKLCVNNVN	
Potato CPI	MSIPQFLGEG TPVVFVRKSE SDYGDVVRVM TWVYIKFFVK TTKLQVDQTV	
Potato CDI	NSDWGFSSTP VREIFLS ... GANIFED GLLNIQFNIP TVKLCGSVTI	
Potato API	NSDWGFSSTP VRESHF ... GQGIFEN ELLNIQFAIS TSKLCVSVTI	
Tobacco TRP	EGGEIKNGLF LITFPVNPKK ... GVIREs TDLNIFSA SFC... VGTIL	
Lemir	EHNEIDGSLP LITFPVDPKK ... GVIREs TDLNIFSA SFC VOTTG	
Miraculin	TRKEVDHDFR LAFFFNPKK ... DVVRVS TDLNIFSAF MPCRWTSSTV	
Consensus	... g.P ... f.p... vire. t.Ini.F... t.klc.v.T.	
	151	200
215aa	WKVGDPDLIA RGRTRFVVIGG TILGNRPETI NSWFKIEKVT KTAPFYKLRV	
Sporamin A	WGIGHD SA SGGYFLKAGE FVSDNSG... FKIEVVD ANLNFYKLRV	
Potato CPI	WKVNDGQLVV TGGKVGNNEND IPKIMKTDLV TP... G GSKFYVLLH	
Potato CDI	WKVGNINARL R TMLLETGG TIGGADS... SYFKI... VK SSKFYVLLY	
Potato API	WKVGDYDASL G TMLLETGG TIGGADS... SWFKI... VK SSGFYVLLY	
Tobacco TRP	WKLDDFDET TGQYFITLGG NEGNGGRET SSWFKIEKF ERD... YKLVY	
Lemir	WKLDDFDET TGQYFITLGG DGNNGGVETI SSWFKIEKY DRD... YKLLY	
Miraculin	WRLDKYDES TGQYFVTIIGG VKGNPGPETI SSWFKIEEFC GSGF... YKLVF	
Consensus	Wkv.d.d... g.f...Gg .g.g... swFKIe.v... s...YkLly	
	201	250
215aa	CP...DNFLCP ECHPDV CLD VGL THE... RRLAL TNQP FVVLFRKPK	
Sporamin A	C... QFGSD KCVNNG RFH DPM LRT... TRRAL SNSP FVFIKPTDV	
Potato CPI	CP...SHLGCK NI...GG NFK NGY PRL... VIVDD DKDF IPFVIKA...	
Potato CDI	CPLTRHFLCP FCRDDNFCAK VGV VIGNCK RRLALVNEP LDVLFQEV...	
Potato API	CPVTSMSMCP FSSDDQFCLK VGV VIGNCK RRLALVNDP LDVLFQGV...	
Tobacco TRP	CPT... VCN FCK...VICKD VGIFIGD GI RRLAL SDVP FKVMPKKAQV	
Lemir	CPT... VCD FCK...VICRD IGIFIGD GV RRLAL SDVP FKVMPKKA...	
Miraculin	CPT... VCG SCK...VKCGD VGIYIDQKGR RRLAL SDKP FAFEFNKTVY	
Consensus	CP...C. fc...c... vG...g. rRLAL...P f.v.F.k...	
	251	
215aa	TD	
Sporamin A	...	
Potato CPI	...	
Potato CDI	...	
Potato API	...	
Pobacco TRP	VKD	
Lemir	...	
Miraculin	F...	
Consensus	...	

Figure 6. Alignment of deduced 215 amino acid sequence with homologous proteins.

Data base분석 결과로 215 유전자와 가장 유사성이 높은 단백질은 감자에서 분리된 cysteine ptotease inhibitor였으며 215로부터 유추된 단백질의 아미노산 서열에도 protease inhibitor들이 흔히 가지고 있는 Kuniz-type protease inhibitor domain

[<LIM>-x-D-x-<EDNTY>-<DG>-

<RKHDENQ>-x-<LIVM>-x(5)-Y-x-<LIVM>] 을 가지고 있는 것으로 확인 되어 215가 코딩하는 유전자는 새로운 protease inhibitor일것으로 판단된다. 215와 유사한 유전자들의 phylogenetic tree(Fig. 7) 분석결과도 아미노산 서열 분석 결과와 유사한 추론을 가능케 하고 있다.

Phylogenetic analysis of 215 protein

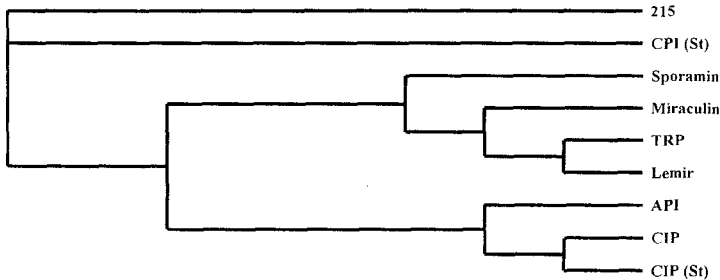


Figure 7. Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequence of 215 protein. CPI; cysteine protease inhibitor from potato, Sporamin; protease inhibitor from sweet potato, Miraculin; from sweet berry, TRP; tumor related protein from tobacco, Lemir; nematode response gene from tomato, API; aspartic protease inhibitor, CIP; cathepsin D inhibitor protein from potato.

6. 신규유전자(215, 630)의 발현연구

새로이 분리된 유전자의 기능을 규명하기 위한 1차단계로 두 유전자가 어떤 상황에서 발현이 증가되는가를 확인하였다.

온도에 민감한 저항성과정에서 215와 630 유전자의 발현을 조사한 결과 215 유전자는 병저항성 반응에 특이적으로 온도를 변화 시킨후 6시간에서 8시간 사이에 발현이 급격히 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 8). 630 유전자의 발현은 215 유전자의 발현과 유사 하였으나 그 발현량은 215 유전자에 미치지 못했다. 이들 두 유전자의 발현양상은 이미 알려져있는 pathogenesis-related protein-1 유전자 발현과 차이가 있었으며 이는 서로다른 신호전달기작에 의해서 유전자의 발현이 조절됨을 암시하는 것으로 추정된다.

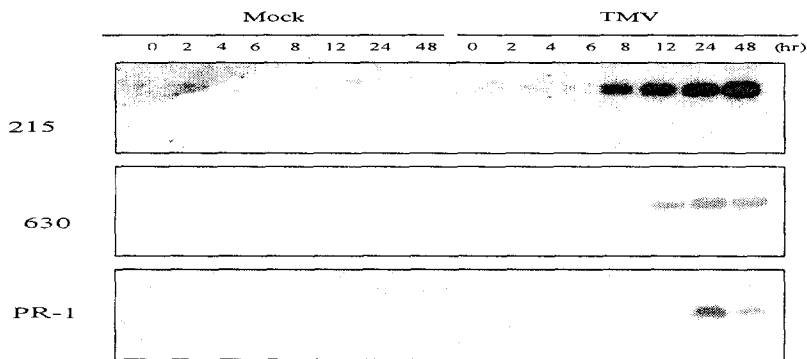


Figure 8. Expression of 215, 630, and pathogenesis-related protein-1 gene during acute hypersensitive response of tobacco after temperature shift. Tobacco plants were placed in 32 °C for 48 hr following infection with TMV then move to 26 °C for induction of systemic hypersensitive response. Leaf tissues were harvested at the indicated time in the figure for isolation of total RNA.

7. 상처에 의한 215 유전자의 발현

식물체의 상처에 대한 반응에 의한 215 유전자의 발현을 확인한 결과 215 유전자는 식물에 상처가 난 후 3시간 이내에 급격한 발현의 증가를 보여 48시간 까지 계속 발현되는 양상을 보였다 (Fig. 4). 이 발현 패턴은 담배에서 이미 알려져 있는 proteinase inhibitor 유전자와 비슷한 양상이며 유사한 신호전달과정이 작용할 것이라는 유추가 가능하다. 상처처리의 대조구로 사용된 PR-1 유전자는 상처처리에 의해서는 전혀 발현되지 않았다.

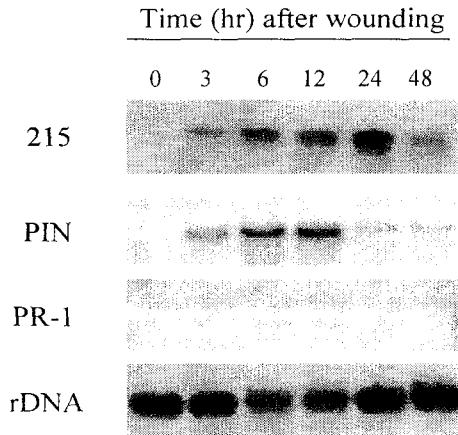


Figure 9. Temporal expression of 215 following wounding.

Tobacco plants were wounded by scrubbed with wet cotton plug following carborandum dusting. Leaf tissues were harvested indicated time after wounding for RNA isolation and Northern blot hybridization. Four identical blots were independently hybridized with 4 different probes indicated in the figure.

PIN; tobacco proteinase inhibitor, PR-1; pathogenesis-related protein-1, rDNA; 25S ribosomal DNA probe.

8. 바이러스 감염에 의한 215 유전자의 발현

정상적인 온도조건에서 바이러스 감염에 대한 저항성 반응과정에서 215 유전자를 확인한결과 감염후 약 6시간이 경과한후 215 유전자의 발현 증가를 관찰 할 수 있었다(Fig. 10). 발현양상은 상처처리와 마찬가지로 proteinase inhibitor 유전자의 발현과 매우 유사 하였으며 이는 역시 같은 메커니즘에 의하여 이들 두 유전자의 발현이 조절된다는 것을 의미한다. 바이러스감염의 양성 대조구로 사용된 PR-1 유전자는 저항성 반응이 눈으로 목격되는 감염후 48시간 뒤 그 발현이 급격히 증가 하였다.

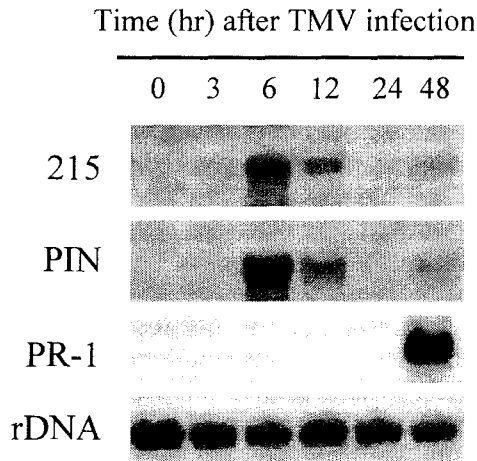


Figure 10. Temporal expression of 215 following tobacco mosaic virus infection.

Tobacco plants were inoculated with TMV by scrubbed with wet cotton plug following carborandum dusting. Leaf tissues were harvested indicated time after infection for RNA isolation and Northern blot hybridization. Four identical blots were independently hybridized with 4 different probes indicated in the figure.

PIN; tobacco proteinase inhibitor, PR-1; pathogenesis-related protein-1, rDNA; 25S ribosomal DNA probe.

9. 살리실산 처리에 의한 215 유전자의 발현

식물체가 병저항성 반응을 보일 때 체내에 다량축적되는 물질이며 또한 PR-protein 유전자의 발현 조절 물질로 확인된 살리실산을 처리한후 215 유전자의 발현을 확인한결과 215 유전자는 살리실산에 의해서는 전혀 발현이 유도되지 않았다 (Fig. 11). 이에 비하여 PR-1유전자의 발현은 살리실산 처리후 24시간이내에 발현이 증가된 것으로 관찰 되었다. 대조적으로 proteinase inhibitor 유전자의 발현은 처리후 6시간에서부터 48시간 까지 dir한 발현의 증가를 보였다. 이 결과는 215유전자가 PR-유전자와 다른 과정을 거쳐 식물의 병저항성 과정에 발현됨을 의미하는 것으로 추정된다.

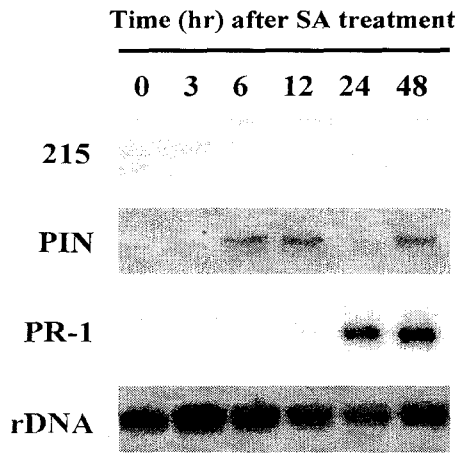


Figure 11. Temporal expression of 215 following salicylic acid treatment. Tobacco plants were sprayed with 2 mM solution of SA and leaf tissues were harvested indicated time after treatment for RNA isolation and Northern blot hybridization. Four identical blots were independently hybridized with 4 different probes indicated in the figure. PIN; tobacco proteinase inhibitor, PR-1; pathogenesis-related protein-1, rDNA; 25S ribosomal DNA probe.

10. 구리용액 처리에 의한 215 유전자의 발현

구리용액은 식물체의 생체방어와 관련된 여러 가지 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 보고되어 있다. 215 유전자는 구리용액처리에 의하여 6시간후부터 약한 증가를 보여 48시간후 최대 발현되는 것으로 나타났다 (Fig. 12). 이에 반하여 proteinase inhibitor 유전자는 6시간후 최대 발현되는 것으로 나타나 구리에 의한 이들 유전자 발현은 서로 다른 메커니즘을 통하여 이루어 지는 것으로 판단된다. 이는 이들 두 유전자의 발현이 가해지는 스트레스에 따라 공통적 또는 상이한 과정을 거쳐 일어남을 보여주는 결과로 신호전달연구의 소중한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

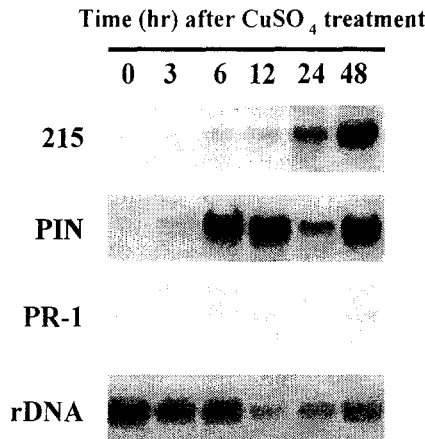


Figure 12. Temporal expression of 215 following CuSO₄ treatment. Tobacco plants were sprayed with 10 mM solution of CuSO₄ and leaf tissues were harvested indicated time after treatment for RNA isolation and Northern blot hybridization. Four identical blots were independently hybridized with 4 different probes indicated in the figure. PIN; tobacco proteinase inhibitor, PR-1; pathogenesis-related protein-1, rDNA; 25S ribosomal DNA probe.

11. methyl-jasmonate처리에 의한 215 유전자의 발현

Proteinase inhibitor 유전자와 215 유전자가 모두 식물의 상처반응으로 발현되었기 때문에 유전자 발현에 관여하는 신호전달물질중 상처 hormone 으로 여겨지는 methyl-jasmonate가 이들 유전자의 발현에 관여하는지를 실험하였다. 그 결과 이들 두 유전자는 모두 상처 및 MJ처리에 의하여 발현이 증가 하였다. 그러나 MJ 처리에 의한 발현 양상이 서로 상이한 것으로 나타나 비록 같은 신호전달 물질에 의해 조절 되지만 조절기작 자체는 다를 수 있음을 암시하고 있다 (Fig. 13).

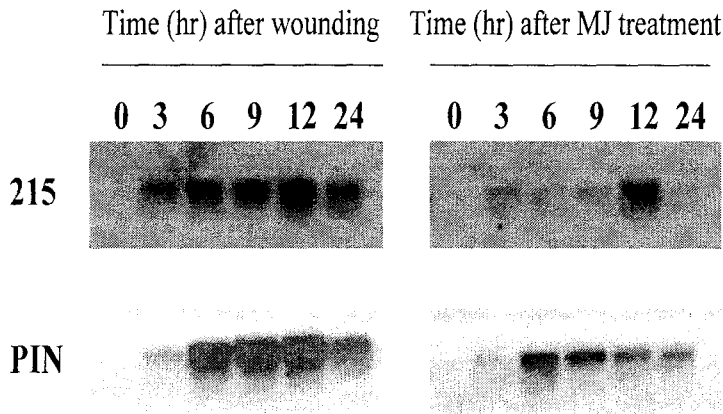


Figure 13. Temporal expression of 215 following wounding and methyl jasmonate treatment.

Tobacco plants were sprayed with 40 μ M solution of MJ and leaf tissues were harvested indicated time after treatment for RNA isolation and Northern blot hybridization. Wound control was included for comparison. Two identical blots were independently hybridized with 2 different probes indicated in the figure.

PIN; tobacco proteinase inhibitor,

12. 형질전환 벡터의 제작

215 유전자를 식물체에 과다발현시켜 그 기능을 추적하기 위하여 식물체 형질전환 벡터를 제작 하였다. 이미 생명공학연구소에서 제작되어 사용되고 있는 pMBPⅡ 벡터를 근간으로하여 215 유전자의 full length cDNA를 두 개의 35S promotor에 의하여 그 발현이 조절되게 벡터를 제작하였다 (Fig. 14). 이 plasmid를 Agrobacterium에 형질전환하고 다시 식물체에 형질전환 하여 형질전환 식물체를 획득 하였으며 식물의 병 저항성과 관련된 기능을 추적 하고자 하고 있다.

Construction of PR-GUS reporter system

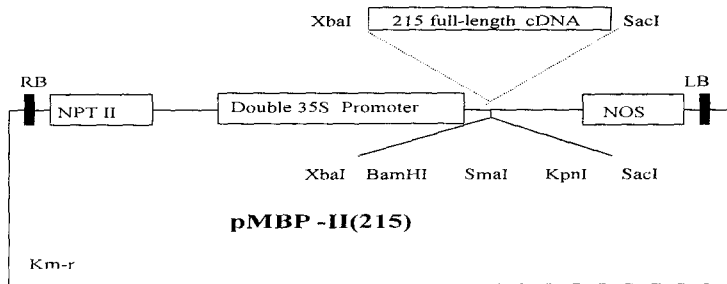


Figure 14. Construction plant expression vector for 215 gene.

Entire ORF of 215 was amplified by polymerase chain reaction. The amplified fragment was digested with restriction enzymes XbaI and SacI then cloned into pMBPⅡ vector

13. 630 유전자의 Genomic Southern blot

630(Ng-CDM1)유전자의 계놈상의 구조를 확인하기 위하여 담배 및 야생종 담배인 *Nicotiana glutinosa*의 계놈 DNA를 EcoRI, HindIII, 및 XbaI 등 세 종류의 제한효소로 절단하여 전기영동한 결과 Ng-CDM1 유전자는 diploid genome에 single copy 그리고 amphidiploid genome에 2copy가 존재하는 것을 확인할 수 있었다.(그림 15)

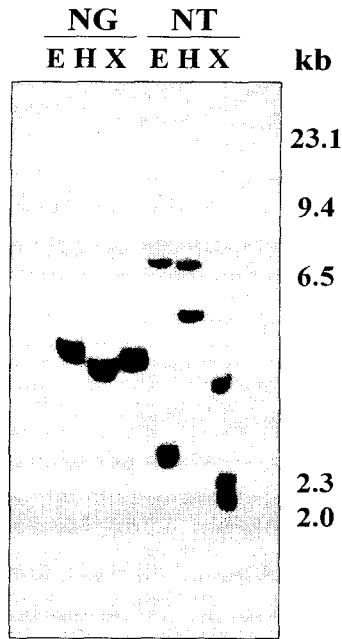


Fig 15 Genomic southern blot of 630 cDNA clone.

10 ug of genomic DNA was digested with proper restriction enzymes and fractionated on agarose gel. Blot was hybridized with full length cDNA of 630 clone as a probe.

14. 식물의 병저항성 및 감수성 반응과정에서의 630 유전자 (Ng-CDM1)의 발현

식물의 병저항성 및 감수성반응과정에서 630 유전자의 발현을 알아보기 위하여 담배모자이크 바이러스에 저항성인 식물(N. tabacum cv Xanthi nc) 및 감수성인 식물(N. tabacum cv SR1)에 바이러스를 감염 시킨 뒤 Total RNA를 분리하여 Northern blot을 수행한결과 이 유전자는 저항성 특이적으로 발현 함을 그림 16과 같이 확인할 수 있었다.

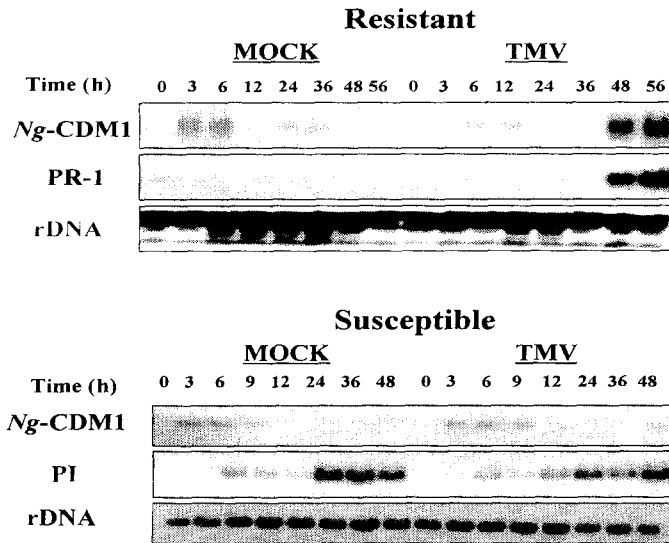


Fig 16 Expression of 630(Ng-CDM1) mRNA during resistant and susceptible response of tobacco against tobacco mosaic virus.

15. 비기주 저항성 발현과정에서의 630(Ng-CDM1) 유전자의 발현

630 유전자의 발현이 기주저항성 세포사멸과정과 시간적으로 일치하기 때문에 담배의 비기주저항성 세포사멸과정에서의 이 유전자의 발현을 확인하였다. 그림 16에서 보여주는 바와 같이 630 유전자는 비기주저항성 반응과정에서도 과민성 세포사멸 특이적으로 발현이 증가하였으며 그 특이성 또한 이미 과민성반응 특이발현 유전자로 보고되어 있는 담배의 *hin1* 유전자보다도 더욱 특이적인 것으로 나타났으며 (그림 16) 그림에서는 보여주고 있지 않지만 또다른 과민성반응 특이 유전자인 *hsr203j* 유전자보다도 더욱 더 특이적인 발현을 하고 있음을 알 수 있었다.

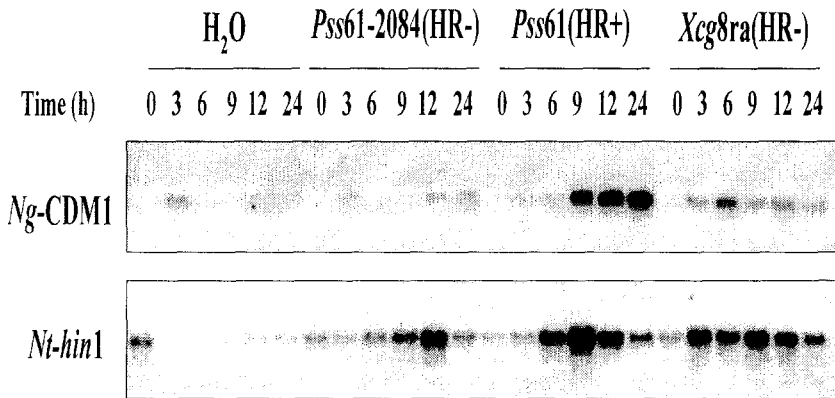


Fig 17 Expression of 630 gene following inoculation of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* 61-2084, *Pseudomonas syringae* pv *syringae* 61 and *Xanthomonas campestris* pv *glycines* 8ra. All the pathogen cause non-host response in tobacco and only *Pss61* cause hypersensitive response in tobacco.

16. 여러 가지 생물적 및 비생물적 세포사멸 과정에서의 유전자 발현

630 유전자의 발현이 식물의 세포사멸과정과 시간적으로 일치하고 있기 때문에 이 유전자의 발현이 식물의 세포사멸과 밀접한 연관이 있는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 그림 17의 1번 열은 노화에 의한 세포사멸, 2,3번 열은 저온에 의한 세포사멸로 2번은 -20 C처리 후 12시간, 3번은 -20 C처리 후 24시간 후 시료를 채취한 RNA 이며 4번 열은 *Pseudomonas syringae* pv *tobaci*에 의한 불마름병징에 의한 세포 사멸과정을 나타내고 있다. 그 결과 630 유전자의 발현은 생물적 요인에 의한 식물의 세포사멸 과정에서 특이적으로 발현이 증가하는 것으로 밝혀졌다.

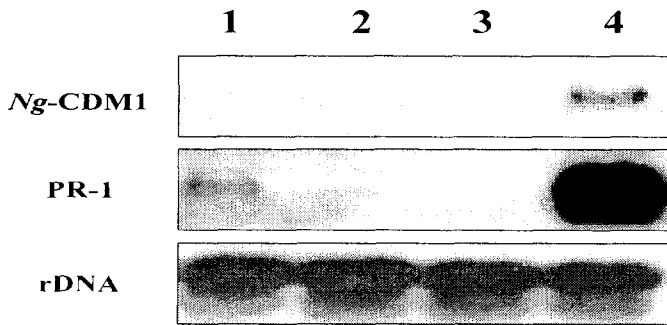


Fig 18 Expression of 630 gene during abiotic and biotic cell death of tobacco plant.

Lane 1; leaves of aged tobacco

Lane 2; 12 hr after 20 min -20 C stress

Lane 3; 24 hr after 20 min -20 C stress

Lane 4; diseased leaves of tobacco following inoculation with *P. s. pv tabaci*.

17. 여러 가지 화학물질 처리에 의한 630(Ng-CDM1) 유전자의 발현

630 유전자가 식물의 병저항성 반응에서만 특이적으로 발현하기 때문에 이미 알려져 있는 작물의 병저항성 유도물질인 salicylic acid 와 BTH에 의하여 이 유전자들의 발현증진 여부를 확인 하였다. 그 결과 630 유전자는 비교적 고농도의 salicylic acid 처리에 의하여 전혀 발현이 증가되지 아니하였다 (그림 18B). 이에 비하여 동일한 RNA를 salicylic acid에 의해서 발현이 증가하는 것으로 알려진 PR-1 유전자의 probe 로 hybridization한 결과 PR-1 유전자는 처리후 12시간 이내에 매우 증가된 발현을 보이는 것으로 확인 되었다. 이 결과는 630 유전자가 새로운 유전자로 병저항성 반응에 특이적으로 발현이 증가되며 이미 알려져 있는 salicylic acid signalling pathway와는 전혀다른 신호전달기작을 거쳐서 병저항성 반응에만 특이적으로 발현이 증가하는 유전자로 그 신호전달기작 및 유전자의 기능연구는 식물의 생체방어기작을 연구하는데 매우 중요한 정보를 제공해 줄 것으로 여겨진다.

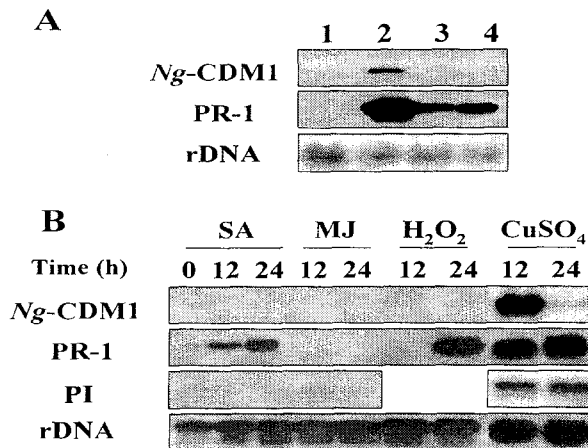


Fig 19 Systemic expression of 630 gene following TMV infection(A) Expression of 630 gene following inoculation of various treatment (B).

18. 대장균을 이용한 630 단백질의 생산

630 유전자의 기능을 밝히기 위해 630 유전자에서 신호전달 부위로 사료되는 부분이 삭제된 유전자를 대장균 발현 벡터인 pMal-C2에 클로닝하여, 대장균 내에서 약 68 kDa에 해당하는 MBP(maltose binding protein):630 fusion 단백질의 발현이 확인되었다. MBP(maltose binding protein):630 fusion 단백질은 amylose column 과 SDS-PAGE 을 이용하여 부분 정제한 후 (Fig. 20), 항체생산에 이용되었다.

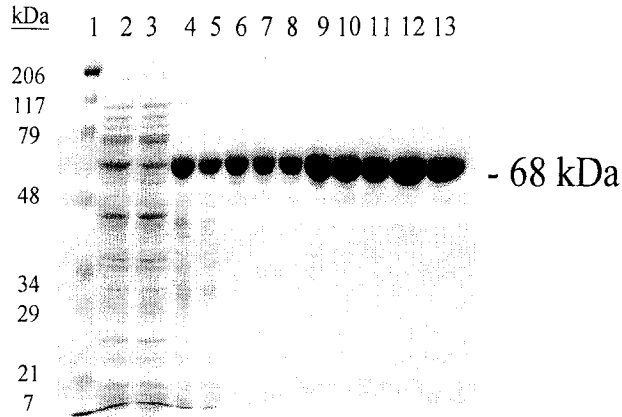


Fig. 20. Expression of 630 protein in *E. coli* and its partial purification using amylose column chromatography and SDS-PAGE.

1, Molecular weight standards from Bio-Rad. 2 and 3, Soluble fractions of *E. coli* expressed MBP:630 fusion protein. 4 and 5, MBP:630 fusion proteins from column eluates after amylose column chromatography. 6-13, MBP:630 fusion proteins eluted from SDS-PAGE.

19. 630 단백질에 대한 생쥐 항체의 생산

대장균에서 생산된 630 단백질을 이용하여 마우스를 대상으로 항체생산을 시도 하여 그림 21 과같은 결과를 얻었다. 만들어진 항체는 MBP-fused 630 protein 뿐만 아니라 분리된 630 protein (27 KD)과 특이적으로 반응하였다 (그림 21).

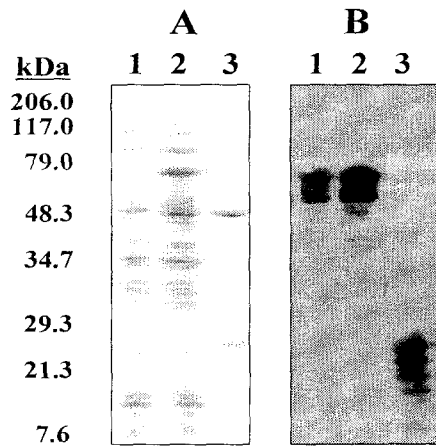


Fig 21 Production of specific antibody against purified 630 protein.

20. 병저항성 과정에서의 630(Ng-CDM1) 단백질의 발현

담배에서 630 단백질의 발현을 조사하기 위하여 담배모자이크바이러스를 감염시킨 저항성 담배에서 단백질을 분리하여 western blot을 수행하였다. 바이러스 감염 후 약 48시간이 경과한 후 단백질을 확인할 수 있었으며(그림 22A) 이는 northern blot에서 확인한 RNA 발현결과와 논리적으로 일치하는 시간대였다. 또한 병원체에 의한 세포사멸이 일어나는 부위 (local lesion부위)에 특이적으로 RNA 및 단백질이 집중적으로 축적되어 이유전자 및 단백질의 발현은 병원체에 의한 세포사멸에 의해 세포사멸 부위에 특이적으로 축적되는 것을 확인하였다(그림 22B).

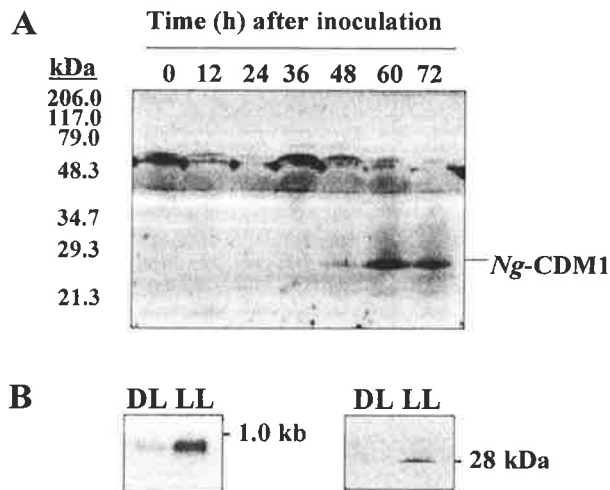


Fig 22 Western blot analysis of 630 protein accumulation during hypersensitive cell death of tobacco following infection of tobacco mosaic virus infection. A; time course accumulation of 630 protein during HR. B; localized accumulation of 630 mRNA and protein around TMV-induced local lesions.

21. 형질전환 고추의 개발

1). 식물재료; 재배종 F1 종자인 녹광 (*Capsicum annum* cv Nokwang)을 형질전환용 공시품종으로 사용하였다.

2). 유전자재료: 주관연구기관인 생명공학연구소에서 pMBPⅡ vector에 제작되어 *Agrobacterium*에 transformation 되어있는 균주를 넘겨 받아 630 및 215 유전자를 고추에 도입 하였다.

3) 연구결과

- 현재 몇 개의 형질전환 식물체를 확보하여 포장 순화중에 있음

(그림 참조).

- PCR 분석을 통한 유전자 도입여부 확인. 그림 23은 215 및 630 유전자가 형질전환된 녹광품종으로 현재 다수의 형질전환체가 토양적용 중에 있는 그림을 보여주고 있음. 외래유전자가 삽입된 개체를 선발하여 당대 및 차세대의 종자를 이용하여 병저항성 증진 여부를 확인하고자 한다.

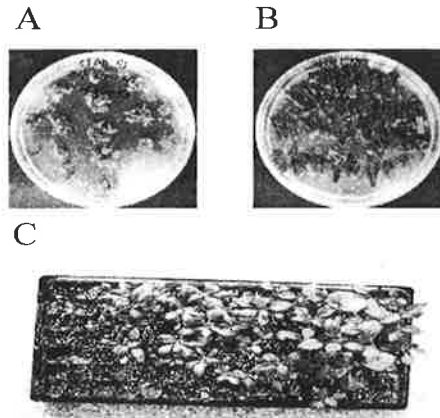


Figure 23. Transgenic plants that overexpress 215 or 630 genes.

A: shooting of Nokwang pepper transformed with pMBPⅡ(35S-215). B: shooting of Nokwang pepper transformed with pMBPⅡ(35S-630). C: transgenic pepper growing on soil.

22. I-PCR을 이용한 630 promoter region의 클로닝

630 유전자의 발현이 식물의 병원체에 의한 세포사멸과 매우 밀접한 관계를 가지고 있고 그 유용성이 매우 높기 때문에 Inverse-PCR 반응을 이용하여 유전자의 프로모터 부위를 분리 하였다. 그림 24는 그 과정의 결과를 보여주고 있음.

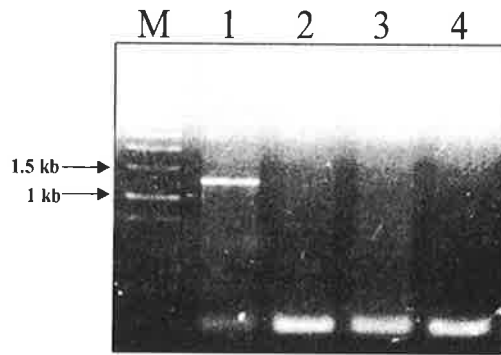


Fig 24 Inverse PCR of #630 promoter region using the self-ligated

N. glutinosa genomic DNA digested by each restriction enzyme
M : 1 kb DNA ladder(200ng), L1 : *Nde*I, L2 : *Hind*III, L3 : *Sac*I,
L4 : *Xba*I

23. 프로모터 분석을 위한 deletion constructs의 제작

분리된 1kb의 프로모터의 병원체에 의한 발현조절부위를 확인하기 위하여 7개의 deletion constructs를 PCR을 이용하여 제작하였으며 이를 pBI101 vector를 이용하여 식물체 형질전환 벡터에 삽입하여 담배를 이용한 형질전환 식물을 제작 하였다.

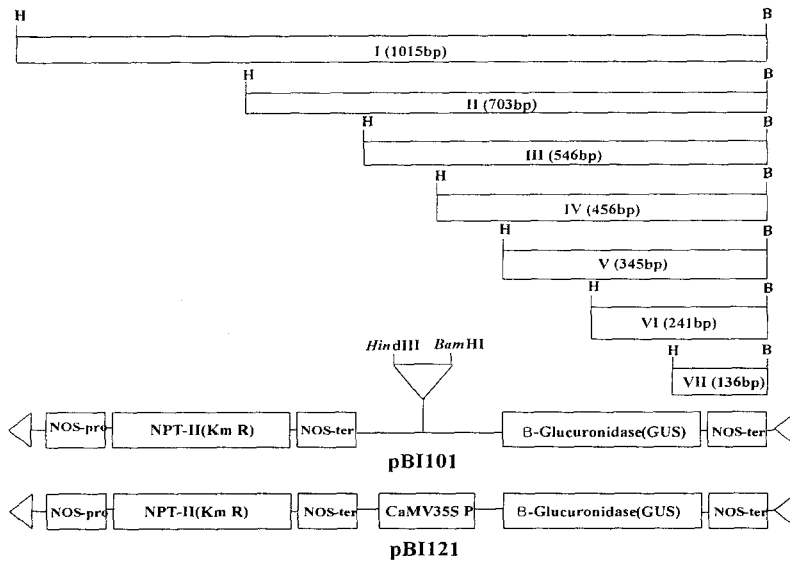


Fig 25 Construction of serial deletion constructs of 630 promoter region and assemble in T-DNA vector using pBI101 Agrobacterium vector.

제 2 절 신호전달 유전자분리 및 특성 규명

1. CHRK1 kinase의 구조 및 특성

본 연구팀은 담배 (*Nicotiana tabacum*) 유래의 수용체키나제인 CHRK1 (Chitinase-related Receptor-like Kinase 1)을 분리하여 염기서열, 발현 양상, 단백질의 인화, chitinase activity, chitin분자와의 결합능에 관해 조사하였다. 좀더 상세하게 설명하자면 CHRK1은 그 extracellular domain에 키틴 분해효소인 chitinase와 매우 유사한 염기서열을 가지는 것으로 최초로 밝혀진 수용체키나제로 담배모자이크 바이러스에 의해 그 유전자의 발현이 촉진되며 대장균에서 발현된 kinase domain은 자신을 인화하는 성질을 가지고 chitinase domain은 chitin 분해능은 없으나 chitin polymer와 chitin oligomer에 결합하는 성질을 보인다. 이 유전자의 특이한 구조와 담배모자이크 바이러스에 의해 전사가 촉진된다는 점, 또한 이 단백질의 키틴결합능력 및 세포막내의 존재 등은 CHRK1이 chitooligosaccharide 신호전달의 수용체일 것을 시사한다. 식물체의 수용체키나제는 extracellular domain의 염기서열의 특징을 바탕으로 몇 개의 그룹으로 나뉘는데 chitinase 유사 염기서열을 가진 수용체키나제에 관하여는 현재까지 동식물을 통하여 보고된 예가 없다. 식물에서는 다양한 수용체키나제 유전자가 호르몬에 대한 반응, 식물기관 발생, 식물과 병원체간의 상호작용 등에 관련되어 있는 것이 여러 연구자에 위해서 밝혀졌다. 최근 식물에게 특정한 타입의 병원체에 대한 내성을 주는 R (resistance) 유전자의 몇 종류가 수용체키나제인 것은 병원체 신호전달에 관련된 기능을 보여주고 있다. 곰팡이 세포벽 성분의 한 종류인 키틴은 세포내 활성산소 증가, phytoalexin 합

성, 여러 방어단백질 유전자의 전사를 촉진하는 등 식물의 방어체계를 활성화시키는 elicitor인데 그 신호전달기작에 관해서는 거의 알려져 있지 않으나 특별한 수용체가 그 elicitor 분자를 인지하여 신호전달을 개시한다는 여러 증거가 보고되고 있다. 그러므로 CHRK1 수용체키나제는 세포막 밖에 위치하는 chitinase domain으로 chitin과 결합하여 연결된 세포 내의 kinase domain을 활성화시키므로서 chitin oligosaccharide 신호전달을 하는 것으로 사료된다. 그러므로 CHRK1 유전자는 식물의 방어체계를 활성화시키는 elicitor receptor로의 가능성이 있으므로 많은 종류의 곰팡이에 대한 내병성을 식물체에 도입하는데 매우 유용할 것이다.

가. CHRK1의 구조

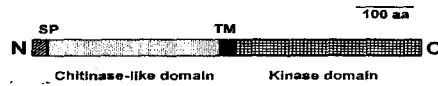
CHRK1은 N-terminal에 chitinase domain을, C-terminal에 kinase domain을 가지고, 두 domain 사이에 transmembrane (tm) domain을 가지는 receptor-like kinase로서 739 아미노산으로 이루어져있다 (그림 1a). CHRK1의 cDNA는 2943 bp로서 739 개 아미노산으로 구성되어 있는 수용체키나제의 구조를 가지고 있다. N 말단에는 signal peptide가 다음에는 extracellular domain이 나오는데 키틴 분해효소인 chitinase와 매우 유사한 염기서열을 가진다. 다음은 23개 아미노산으로 이루어진 transmembrane domain이 C 말단에는 kinase domain이 있다.

나. CHRK1의 amino acid sequence와 다른 단백질과의 유사성

CHRK1 유전자를 담배꽃 cDNA library에서 screening하여 얻은 뒤 pBluscript vector로 subcloning하여 sequencing을 수행하였다.

CHRK1의 Kinase domain을 다른 kinase들과 비교하였을 때 Ser/Thr type의 kinase와 유사성이 높았으며 kinase가 공통적으로 가지는 11개의 subdomain (domain I-XI)을 모두 가지고 있었다. CHRK1의 Chitinase domain은 식물의 chitinase (class I-IV)과는 유사성이 낮은 반면에 bacterial chitinase와 담배의 class V chitinase (Melchers et al, 1994) (bacterial chitinase와 유사함)와 더 높은 유사성을 보였다. 담배의 class V chitinase와는 아미노산 수준에서 41%가 동일하였고, *Bacillus circulans* WL-12의 exochitinase와는 23%, *Serratia marcescens*의 exochitinase와는 19%의 identity를 보였다.

(a)

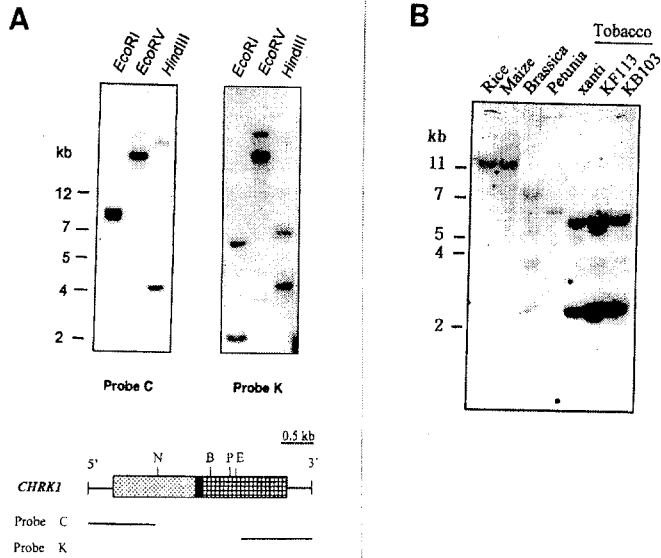


(b)

CHRK1	MSSEMLPSPFLFLVLPSSSSDATAWIKSGFNYAGSE	37			
CHRK1	FFVPEPSSMFTLHFAPAVI	NASS 52			
CHIV	LALANPSSLVHLLFCAPAL	NPSQ 65			
CHIA	VWVAELPFLVHLLVGLSSD	ICWNGIENP DPSGPNPVTM TCONEK 112			
CHRK1	FELVSHSDEPVYSTFSSM	VLKHTSVI 90			
CHIV	NGLIISPPMO DRSQSTSL	VQKRIHVK 92			
CHIA	QTINVPNGTI VLGDVWIDG	KTFAGDTMDD PIAGNINQLN KLGKTHMLK 156			
CHRK1	LLLSWVORD ESNPFAMTS	QFSRKSSTIT TSIKTAQVQ	PLVLDLGNV 140		
CHIV	FLSLAAGRA DITAYGIMAR	QNSRKSSTID SSIKLAQVQ	PLVLDLGNV 142		
CHIA	HLVNGDWTW SRRFSVAAAT	AA.TLEVWAN SAVDFLQVW	PLVLDLGNV 205		
CHRK1	LVDA	...NHTVM SPTEENLTAI NSEKSSGTR	ITLLTNGAVY 181		
CHIV	LSAL	...DMLGL ILLNEWLTAI NNEARNSRA	ALLTAAVSY 183		
CHIA	LVSGLDGNS	KRFEDKQNT LLLSKTEKL DAAGAVDCK	VLLTASGAS 255		
CHRK1	SPFLDSMSYP	IDTIIIRNFV VHLKAT	...AVY 211		
CHIV	SPRVNGLNYP	VESVARNLNL INLMAQVYQ	PNHSPSQNS	... 229	
CHIA	ATTAANTELA	K...IAAIVLD	INIMDLQFMG A.WG.KISAN	...NYPNYPAA 301	
CHRK1	...DPSK	LNTDYDKEW	IKRDLRANL	VLRVAVQVA	PLVLPKGM 255
CHIV	...DPSK	LNTDYDKEW	IKRDLRANL	VLRVAVQVA	PLVLPKGM 272
CHIA	SAAGVDANT	FNVAAAGQH LDAVMAAG	VLRVAVQVA	PLVLPKGM	LDGCAQAGN 351
CHRK1	TVRTDANK	...LAITGDH	SVYNIK...C	YMSGVQVYV	VLRVAVQVA 309
CHIV	DLRAFAAAG	NVGAVDSSM	TYNRIR...D	IVQS.RAIVV	VLRVAVQVA 319
CHIA	QYQ.TCTSS	SVGTWEASL	FDVYLEANY	INQN.GYDRI	VLRVAVQVA 398
CHRK1	TIGSF...MIS	VDEWEAIRV	VSDVADKTE	FAAFGIEP	DYNWELSKTA 347
CHIV	YSSG...MIS	VDETSVRVM	VNVSERTE	VYFAMVAGI	QNWGLSRTA 366
CHIA	YNASHRFLS	VDAASVGYD	TADLSKTE	GANFWELSG	RKTLQMLK 448
CHRK1	ODEEEDQSS	SNRLLALL	PVLLTILL	STVPLIKK	TLRSEGITEL 397
CHIV	SDTVESSD	EMK			378
CHIA	ADLPTGGTVP	PVDITAPVFP	GNARST		474
CHRK1	NERAIGHMLK	VFKFDKIK			415
CHRK1	AAPDMSIKN	KVQTCRQGV	VKQRFSSD	EITLNSRAY	SKQDVEEEN 454
ARK3	MAVMSHAN	KLGGTRGEM	IKLQDITD	DAVNSRST	STQDVEEEN 535
SRK6	KAENQSSCN	KCGGGGQV	VKQRFSSD	EITLNSRAY	SKQDVEEEN 537
PRK5	KMNSGA...H	VLDGHEGRTV	VKQRFSSD	EITLNSRAY	SKQDVEEEN 340
CHRK1	SVTLASKLQ	VNVLOGGQ	TEREEKILLV	VYVNSSTP	VLYDPVGSLO 514
ARK3	SVTLARLQ	LVVLLACS	VVASEMLLV	VYVNSSTP	HLFQKSRSK 564
SRK6	SVTLARLQ	LVVVOVLC	YEDKMLLV	VYVNSSTP	VLFQKTRSK 586
PRK5	VWASHRITSQ	VHIVSLGFA	YEKNKRAIV	SNPFLSMDK	YI.SAMSTK 389
CHRK1	LNVTRVRII	EGTQGLAV	QEYSATVIV	ROLKASNTL	DDEMDKISD 564
ARK3	LNVTRFDII	NHARSLVA	RODSRFRIIV	ROLKASNTL	DXYMFKISH 634
SRK6	LNVTRFDIT	NHARSLVA	RODSRFRIIV	ROLKASNTL	DXYMFKISH 635
PRK5	NESEELVYA	VHRSRSLV	INVCYTRIVV	PVLRQVLLV	DENLCHKISD 438
CHRK1	NDVLRQKQD	TEANTRIV	EVVGVVTE	VYKR.RVSR	QVDEKIVLV 612
ARK3	NDVLRIFED	TEANTRIV	EVVGVVTE	YAMD.HIEN	QVDEKIVLV 684
SRK6	NDVLRIFED	TEANTRIV	EVVGVVTE	YAMY.HIEN	QVDEKIVLV 686
PRK5	NDVLRCLKK	STISMLRGR	TEFVYIAGSM	FSKNFVAVSH	QVDEKIVLV 488
CHRK1	LDIILBERK	NSSVGTIKND	LNLL.EYAV	ELWEKMGVD	PLD... 655
ARK3	LDIITSSKQ	NKQVNSIRD	LNLL.GQWV	HWKFKGLE	IIDPVIYDQ 731
SRK6	VHEIVSGQI	NRGFVLDYE	NDLL.SYVM	SRWKEPALE	IVDEVIDVL 733
PRK5	VHEIVGALNI	EKVSESDNN	GSMYFFENVY	KDFEKE...	ITRIFGNSI 538
CHRK1	ODDSRIGKO	...RYWQAA	LNVKQWED	NSLEVYSD	KNETEVLPM 702
ARK3	SS...TFRDH	ETRCIGIQI	LNVKQWED	NSLEVYSD	GSESTTIPO 776
SRK6	SSQFIIPOD	EVKGTQIQI	LNVKQWED	NSLEVYSD	GSESTTIPO 781
PRK5	TEEEKFAKX	LVL...VAV	WLDVNSPSD	DEMIKUTEL	EGNLELOVW 582
CHRK1	KVWAFSKNKD	NDQQTIVTP	DLTCS...DN	SLTISOLIAR	739
ARK3	KANVCLERS	LLDTPS...SS	SKO.R...DDE	SWTVMQI...	818
SRK6	KNDVCTERS	TYLEP...SS	SKOCD...EME	SWTVMQI...	831
PRK5	PMVLL.FSPE	ETVPPDLEDS	DUTSTFFNPS	HFEQTIILAS	619

다. Genomic DNA blot analysis

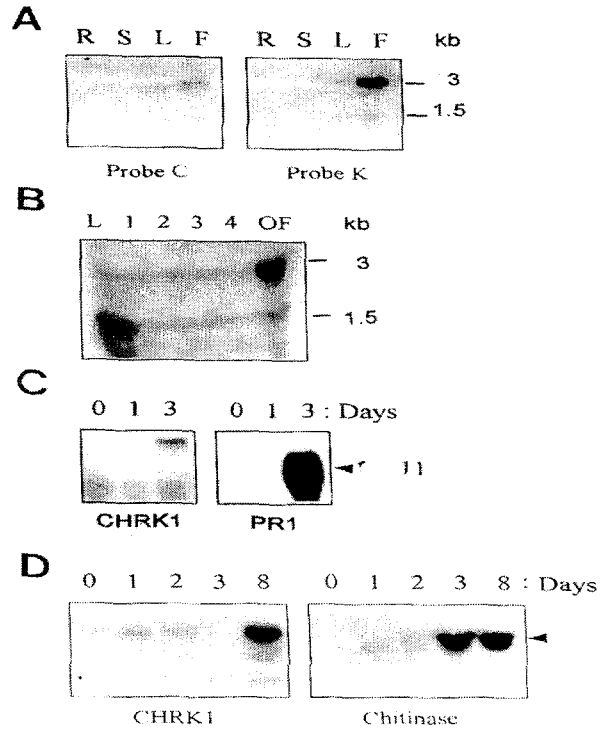
CHRK1 유전자 및 그의 유사 유전자의 염색체내의 개수를 조사하기 위하여 genomic Southern blot analysis를 수행하였다. 먼저 담배 잎으로부터 Genomic DNA을 분리한 다음 그중 10 microgram을 EcoRI, EcoRV, HindIII로 digest하여 0.8% agarose gel에서 전기영동 후 membrane으로 transfer하였다. chitinase probe와 kinase probe를 사용하여 각각 hybridization 하였다. 0.1XSSC, 0.1%SDS 용액에서 60°C에서 30분간 씻은 뒤 X-ray film에 노출시켰다. <그림 2>는 그 결과이다. EcoRV digestion에서 chitinase probe와 kinase probe 둘다 같은 band pattern을 보여주므로서 이 CHRK1 유전자가 정말로 chitinase domain과 kinase domain을 가지며 cloning artifact가 아니라는 것을 보여주고 있다. 또한 모든 digestion에서 두 개의 band를 보이는데 담배가 amphidiploid 라는 것을 감안할 때 이 사실은 CHRK1 유전자가 염색체 내 한 copy로 존재하는 것을 시사한다.



라. CHRK1 mRNA의 조직 특이적인 발현

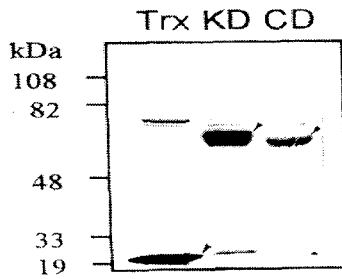
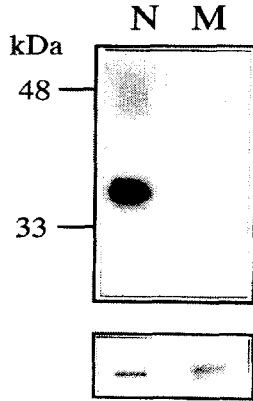
- 50 microgram의 total RNA를 뿌리(R), 줄기(S), 잎(L), 꽃(F)으로부터 분리하여 membrane으로 옮긴뒤 chitinase domain probe와 kinase domain probe를 사용하여 hybridization시켰다. membrane을 0.1XSSC, 0.1%SDS 용액에서 60°C에서 30분간 씻은 후 X-ray film에 노출시켰다.
- CHRK1은 chitinase probe와 kinase probe가 둘다 같은 크기의 mRNA와 결합하여 이 유전자가 chitinase domain과 kinase domain을 가진다는 것을 보여주고 있다. 주요 mRNA는 3.0 kb로서 cDNA의 크기와 일치하나 그 외 1.5 kb의 작은 mRNA도 존재한다. 1.5kb

mRNA는 chitinase probe와 kinase probe에 모두 hybridize하여 그 mRNA가 *CHRK1* 유전자로부터 유래되었다는 것을 시사하고 있다. *CHRK1* mRNA는 꽃에서 가장 높게 발현되며 잎에서도 발현되는데 뿌리와 줄기에서는 거의 발현되지 않는다 (그림 3). 특히 꽃의 발생학적인 시기에 다른 발현을 보면 어린 시기의 화아에서는 낮게 발현되나 개화기에 높이 발현된다. tobacco mosaic virus를 잎에 접종하였을 때 3일 후 *CHRK1* transcripts가 크게 증가하였으며 동시에 PR-1a transcripts도 동시에 크게 유도되었다 (그림 4). 그러나 tobacco BY2 cells을 chitosan, chitin oligosaccharides (chitotriose와 chitotetraose), fungal elicitors, salicylic acid, methyl jasmonate로 처리하였을 때 *CHRK1* mRNA의 양은 증가하지 않았다.



마. autophosphorylation assay

recombinant kinase domain을 이용하여 autophosphorylation을 수행한 결과, wild type CHRK1은 자신을 인화시킬 수 있지만 kinase mutant (Lys449Asn)는 인화가 되지 않는 것을 보임으로서 CHRK1이 kinase로서 기능이 있음을 증명하였다 (그림5).



마. Chitinase assay

여러 chitinase들을 비교해 보면 Ser, Asp, Glu의 세 가지 잔기가 잘 보존되어 있는 것을 알 수 있고 그 중 특히 Asp와 Glu는 chitinase 효소활성에 필수적인 잔기임이 보고되어있다 (Watanabe et al, 1993). CHRK1의 chitinase domain에는 위의 세가지 잔기중 Glu가 전혀 다른 성질의 아미노산인 Val으로 바뀌어 있다 (그림 6). 이 glutamic acid 잔기의 돌연변이는 CHRK1의 chitinase domain이 chitinase activity를 가지지 않을 것을 시사하고 있다. MU-chitotriose, Mu-chitotetraose, chitin azure, regenerated chitin 을 기질로 recombinant chitinase domain을 사용하여 chitinase assay를 수행하였다 (표 1). CHRK1은 예상했던 대로 전혀 chitin 분해능을 가지고 있지 않았다.

Table I. Chitinase assay of the recombinant domain of CHRK1

Substrates	control chitinasea	CHRK1
4-MU-(GlcNAc)3b	> 1,000	< 10
4-MU-(GlcNAc)4	> 1,000	< 10
Chitin-azurec	0.26	< 0.005
Regenerated chitin	0.18	< 0.002

The recombinant chitinase like domain, both as a fusion protein with thioredoxin and as a separate moiety, was assayed. Data obtained with the fusion protein are only presented, since the protein in both forms produced similar results. Measuring units for chitinase assays using 4-MU-(GlcNAc)3 and 4-MU-(GlcNAc)4 are fluorescence unit. Measuring units for chitinase assays using chitin-azure and regenerated chitin are O.D. unit.

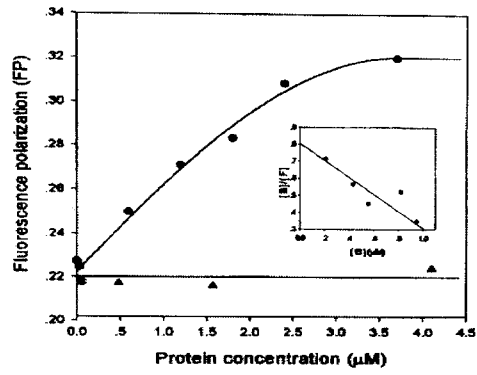
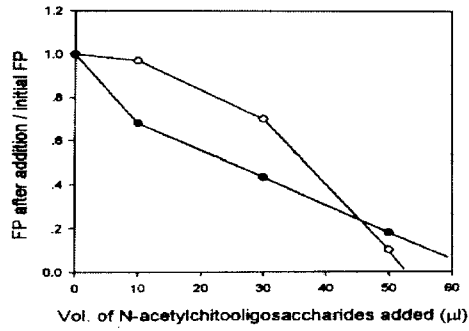
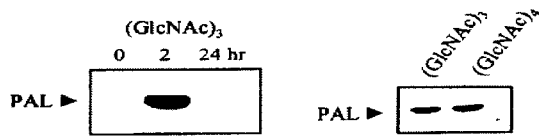
aAs a control, *Serratia marcescens* chitinase was used.

b4-methylumbelliferyl-N,N',N''-triacetylchitotriose

cRemazol Brilliant Violet conjugated to carboxymethyl-chitin

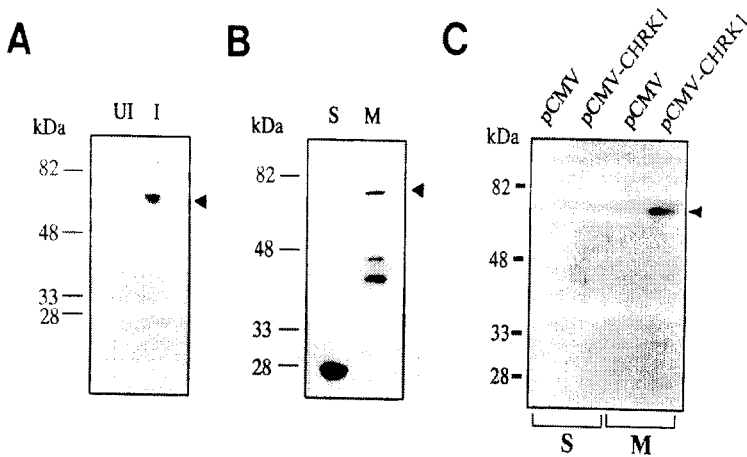
사. chitin oligomer에 대한 결합능 (fluorescence polarization)

CHRK1은 chitin 분해능을 가지고 있지 않지만 세포밖에 노출되어 있는 chitinase domain을 통해 곰팡이 세포벽에서 유래된 chitin과 결합하여 kinase domain을 활성화시키므로써 곰팡이 침입 신호를 세포안으로 전달하여 다각적인 방어체계 (callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase등의 방어관련 유전자의 발현)를 활성화시킨다고 생각된다. 그러므로 recombinant chitinase domain을 이용하여 MU-chitotriose와 MU-chitotetraose와의 결합능을 thioredoxin을 control로 fluorescence polarization을 써서 측정하였다 (그림 7). 또한 unlabelled chitotriose, chitopentose, and chitooctose (Sigma, USA)를 competitor로 사용하여 Competition assay를 수행하였다 (그림 8). recombinant chitinase domain는 saturable, reversible binding을 보이며 Hill plot을 그려서 측정된 dissociation constants (K_d)는 MU-chitotriose에 각각 800 nM이다.

a**b****c**

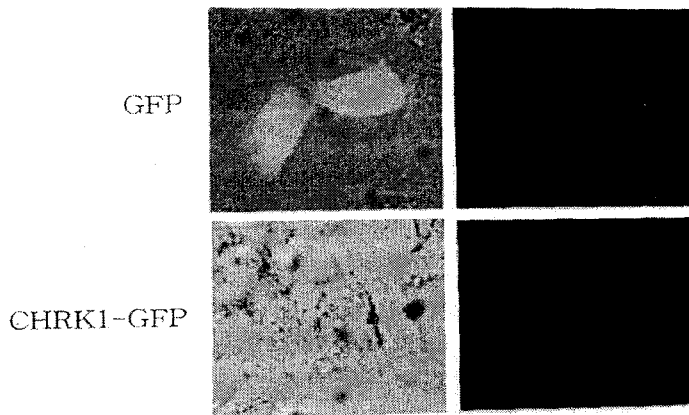
아. Membrane localization of CHRK1 protein

CHRK1의 chitinase domain을 E.coli에서 induction한 후 분리하여 토끼에서 CHRK1에 대한 polyclonal antibody를 제조하였다. 이 antibody는 induction 후의 E. coli total protein에 특이적으로 반응하여 (A, I) 이 antibody가 specific하다는 것을 보였다. 담배 BY2 cell에서 분리한 cytosolic fraction과 membrane fraction을 SDS-PAGE로 전기영동 한 뒤 CHRK1 antibody를 이용하여 western blotting을 수행하였을 때 membrane fraction에서만 70 kDa의 단백질을 인지하였다. 이 결과는 CHRK1 kinase가 membrane에 존재한다는 것을 보인다. 또한 이 CHRK1 유전자를 human cell에서 CMV promoter를 이용하여 발현하여 그 위치를 조사하였을 때 오로지 membrane fraction에서만 CHRK1 protein이 detect되므로서 CHRK1이 동물 세포에서도 membrane에 localize된다는 것을 보였다.



자. CHRK1-GFP protein의 membrane localization

CHRK1 유전자를 GFP (Green Fluorescent Protein)와 융합시켜 이 융합유전자를 human Hela cell에 transfection하여 발현시킨 후 융합단백질의 세포내 위치를 조사하였다. control인 GFP는 cytosol에 분포하였으나 CHRK1-GFP 단백질은 plasma membrane 에 분포하였다.

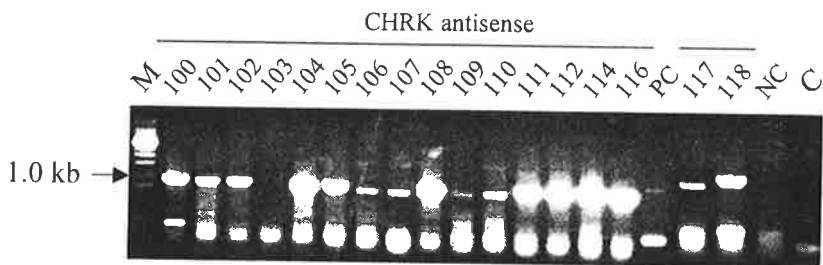


2. CHRK1 antisense transgenic plants 의 제조와 분석

o CHRK1의 식물체내의 기능을 탐구하기 위하여 Antisense RNA technology를 이용하였다. CHRK1의 kinase domain을 antisense orientation으로 형질전환 벡터인 pMBP1에 클로닝 하였다. pMBP1은 CaMV35S promoter를 가지고 있어 식물 대부분의 조직에서 삽입된 유전자를 높이 발현시킬 수 있다. CHRK1 antisense cDNA를 가진 pMBP1 plasmid를 *Agrobacterium* LBA4404로 electroporation을 이용하여 도입시켰다. 그후 가나마이신 배지에서 transformation된 *Agrobacterium* 을 선별한 후 이 균주를 이용하여 leaf disk를 이용한 담배의 형질전환을 수행 하였다.

o 이들 putative 형질전환식물체에서 genomic DNA를 분리하였고 nptII 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR로서 도입 유전자를 분석하여 형질전환식물체를 확인하였다. 현재까지 15개체가 형질전환식물체 임이 확인되었다.

그림1: 형질전환체로의 CHRK1 antisense 유전자의 도입을 PCR로 확인



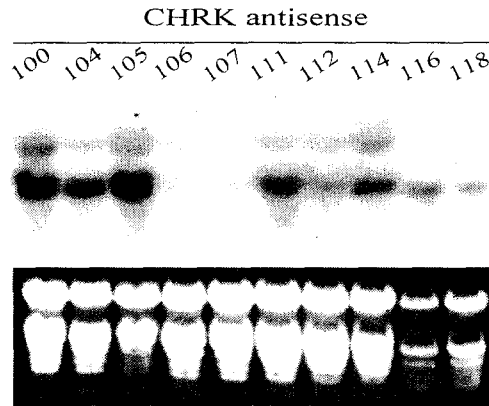
- CHRK antisense 형질전환체 담배(T_0) #100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 116, 117, 118과 대조구 Xanthi에서 simple and quick method for DNA isolation from leaf 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리한 뒤, 35S promoter primer 20 pmole, nos terminator primer 20 pmole를 94 °C 1 min, 94 °C 1 min 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 cycles로 PCR을 수행하였다.

- PCR 결과 #100, 104, 105, 108, 111, 112, 114, 116, 118 lines이 CHRK antisense 형질전환체 담배임을 확인할 수 있었고, #100, 111, 114, 116, 118은 kanamycin 50 μ g/l 을 가진 MS 배지에서 뿌린 결과와 동일함을 관찰할 수 있었다. 특히 #111, 114, 116 lines에서는 3:1 분리비를 나타냄을 관찰할 수 있었고, #100, 118 lines은 multi copy로 형질전환 되었음을 관찰할 수 있었다. CHRK antisense 형질전환체 담배(T_0) #100, 104, 105, 106, 107, 111, 112, 114, 116, 118과 대조구 Xanthi에서 TRIzolTM Reagent를 이용해서 total RNA를 추출하였다. 40 μ g을 정량, 전기영동하여 Zeta-Probe^R GT Genomic Tested Blotting Membrane에 blotting하였다. 준비된 filter에 nptII 20 ng으로 혼성화반응을 하였다. Washing 조건은 실온에서 5min, 60°C에서 10 min을 행했고, X-ray film에 일주일 감광하였다.

- Hybridization결과는 각각의 CHRK antisense 형질전환체 담배를 확인하기 위해 35S promoter primer와 nos terminator promoter primer로 수행한 PCR결과와 일치함을 관찰 할 수 있었다. 즉, PCR결과 non-transgenic 이라고 추정된 #106, 107lines은 npt가 발현하지 않는 것을 관찰 할 수 있었다. 반면 3:1 분리비를 관찰할 수 있었던 #111, 114, 116 lines에서는 npt발현이 multi copy로 형질전환 되었다고 여겨지는 #100 line보다는 2배 이하

로 적었다. 그러나, multi copy로 형질전환된 #118 lines보다는 더 많이 발현되어 copy 수와 발현양과는 상호관계가 없음을 알 수 있었다.

그림 2: 형질전환체에서 nptII 유전자의 발현 조사



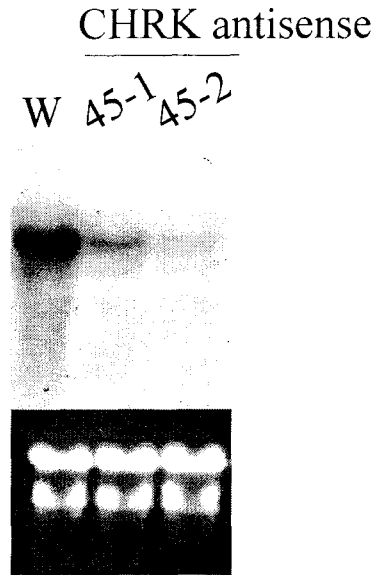
o 이 형질전환 식물체의 잎에서 RNA를 분리하고 northern blot analysis와 RT-PCR을 통하여 삽입 유전자 (CHRK1 antisense cDNA)의 발현과 이 antisense RNA의 발현에 의한 endogenous CHRK1 mRNA의 양의 변화를 확인하였다.

-CHRK antisense 형질전환체 담배(T₁) #45-1, -2와 대조구 Xanthi에 TMV를 접종하고 7일이 지난 뒤 위와 같은 방법으로 total RNA를 추출하고 Zeta-Probe^R으로 blotting하였고, CHRK kinase domain 20ng으로 혼성화반응을 수행하였다. Washing 조건은 위와 동일하다.

- 대조구 Xanthi와 CHRK antisense 형질전환체 담배(T₁) #45-1, -2에 TMV처리 했을 때, #45-1, -2 에서 CHRK발현이 두 배 이하로 감소됨을

볼 수 있었고, local lesion의 수 역시 약 50% 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, 이러한 결과들이 local lesion 감소효과인지 또는 antisense 효과인지 알 수 없었다.

그림 3: Wild-type과 형질전환체에서 Tobacco mosaic virus 감염시의 CHRK1 mRNA의 발현양 조사

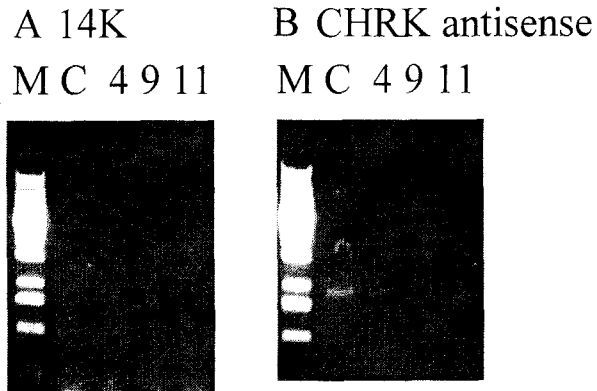


- CHRK antisense 형질전환체 담배(T₁) #45-4, -9, -11과 대조구 Xanthi에서 TRIZOL™ Reagent를 이용해서 total RNA를 추출하였다. Accupower™ RT-PCR Kit을 이용하여 total RNA 1μg, poly dT primer 20 pmole 57 °C 10 min, 42 °C 60 min, 94 °C 5 min RT를 수행하였고, 이렇게하여 얻어진 cDNA를 주형으로 cht5, cht2 primer 20 pmole 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 23 cycles로 PCR을 수행하였다.
- RT-PCR결과 endogeneous CHRK level이 대조구 Xanthi에 비하여

CHRK antisense 형질전환체 담배(T_1) #45-4, -9, -11는 뚜렷히 감소됨을 확인할 수 있었다.

그림 4: Wild-type과 형질전환체에서 CHRK1 mRNA의 발현양 조사 (quantitative RT-PCR)

- A. Control mRNA (14K encoding dual-specificity kinase)
- B. CHRK1 mRNA



○ 이들 형질전환 담배에서 chitin elicitor 신호전달이 제대로 전달되어 downstream 유전자의 전사를 유도하는지와 Tobacco mosaic virus 감염시 downstream 방어 유전자들의 발현이 정상으로 이루어지는지 조사하였다.

- CHRK antisense 형질전환체 담배(T_1) #45-4, -9, -11과 대조구 Xanthi에서 TRIzolTM Reagent를 이용해서 total RNA를 추출하였다. 40 μ g을 정량, 전기영동하여 Zeta-Probe^R GT Genomic Tested Blotting Membrane에

blotting하였다. 준비된 filter에 chitinase, PAL, PR1, SAR 그리고, CHRK kinase domain 각각 20ng으로 혼성화반응을 하였고, washing 조건은 실온에서 5min, 60℃에서 10min, 새로운 washing solution으로 5min동안 washing 하였고, X-ray film에 일주일 감광하였다. CHRK antisense 형질전환체 답배 #45-4, -9, -11에서 chitinase 발현이 대조구 Xanthi보다 2배~4배이상 증가하였고, PAL발현은 약간 증가하였음을 관찰할 수 있었다. 그러나, PR1과 SAR에서는 차이를 관찰 할 수 없었다.

그림 5: wild-type과 형질전환체에서 chitinase mRNA의 발현
(northern blot analysis)

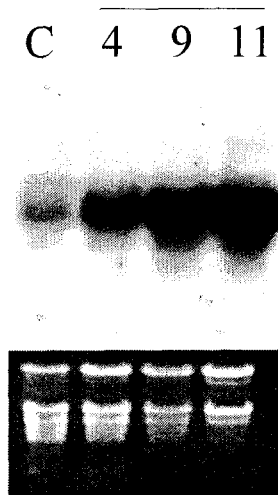


그림 6: wild-type과 형질전환체에서 PAL mRNA의 발현 (northern blot analysis)

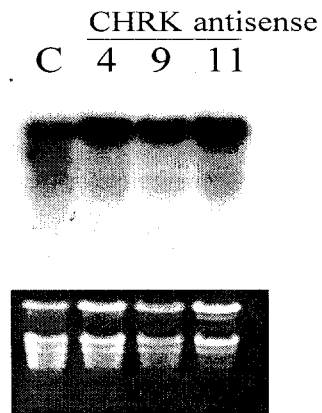


그림 7: wild-type과 형질전환체에서 PR1 mRNA의 발현 (northern blot analysis)

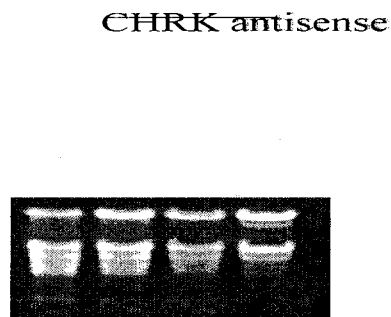
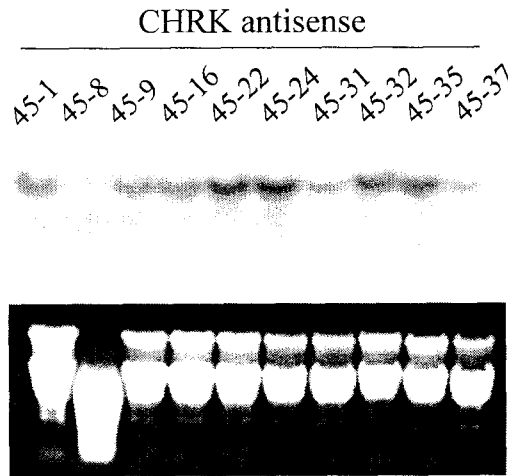


그림 8: 형질전환체 T1 식물체에서 chitinase mRNA의 발현 (northern blot analysis)



- CHRK antisense 형질전환체 담배(T₁) #45-1, -8, -9 -16, -22, -24, -31, -32, -35, -37와 #54-2, -5, -6, -8, -11, -15, -26, -27, -33, -34, -38, -41에서 TRIzolTM Reagent를 이용해서 total RNA를 추출하였다. 40 μ g을 정량, 전기영동하여 Zeta-Probe^R GT Genomic Tested Blotting Membrane에 blotting하였다. 준비된 filter에 담배 chitinase fragment로 혼성화반응을 하였다. Washing 조건은 실온에서 5min, 60 $^{\circ}$ C에서 10min, 새로운 washing solution으로 5min을 행했고, X-ray film에 8일 감광하였다.

그림 9: T1 식물체에서 chitinase mRNA의 발현 (northern blot analysis)

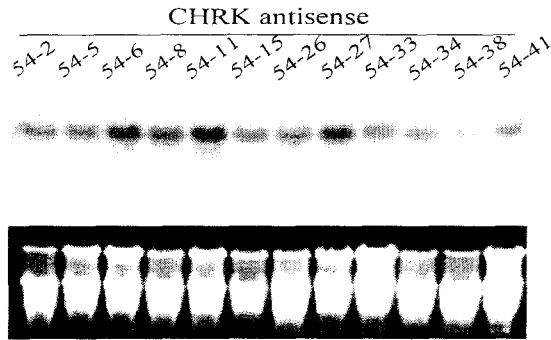
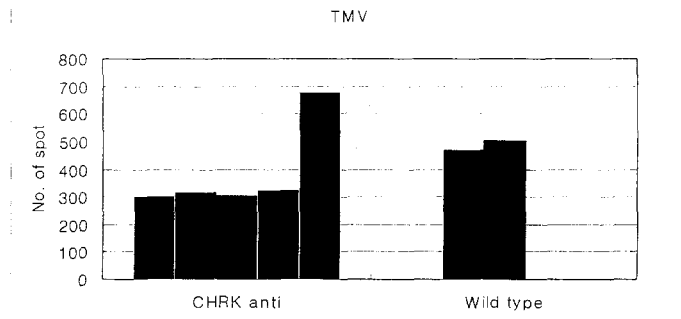


그림 10: wild-type과 형질전환체 T1 식물체의 TMV 감염시 lesion의 수 조사



3. Yesat two hybrid를 이용한 CHRK1 상호작용 단백질 분리

- CHRK1의 kinase domain과 상호작용하는 단백질을

MATCHMAKER LexA two-hybrid system (Clontech, USA)으로 탐색하기 위하여 여러 발생학적 시기의 담배꽃으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA를 합성한 뒤 yeast two hybrid vector (pB42AD)에 이 library를 클로닝하여 transcription activation domain인 B42AD에 융합된 library를 제조하였다. Initial library titer는 5×10^5 total recombinants로 측정되었고 한번 amplify하여 library를 완성하였다. 담배 flower cDNA library는 pB42AD plasmid 내에 cDNA들을 yeast에서 전사를 활성화시키는 88-residue acidic *E. coli* peptides (B42)와 융합시켜 제조된 것이다. 이 library에서 10개의 clone을 무작위로 뽑아 EcoRI/XhoI digestion하여 cDNA insert의 여부, cDNA insert size를 조사하였다. 그 결과 모든 plasmid가 insert를 가지고 있음을 보이며 그 size역시 다양하여 0.5kb 에서 3kb 이상의 variation을 보여주고 있다.

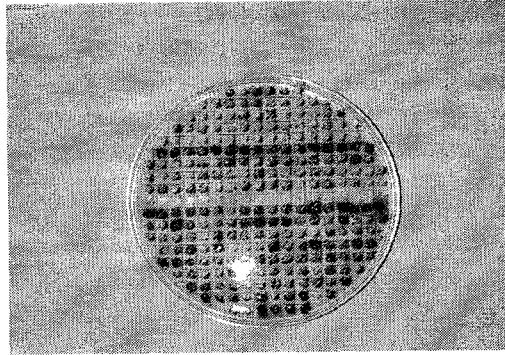
-pB42AD plasmid에 cloning된 담배 flower cDNA library를 CHRK1의 cytoplasmic kinase domain으로 screening하였다. bait plasmid는 CHRK1 kinase domain에 해당하는 DNA 절편을 pLexA (Clontech)에 cloning한 것이다.

-LexA-CHRK1 fusion protein은 자체만으로는 reporter 유전자의 전사를 활성화하지 못한다는 것을 확인하였다.

-Total 5×10^5 개의 yeast cotransformants (EGY48[p8op-lacZ]strain)을 얻었으며 amplification후 Leu+과 b-galactosidase activity에 의거하여

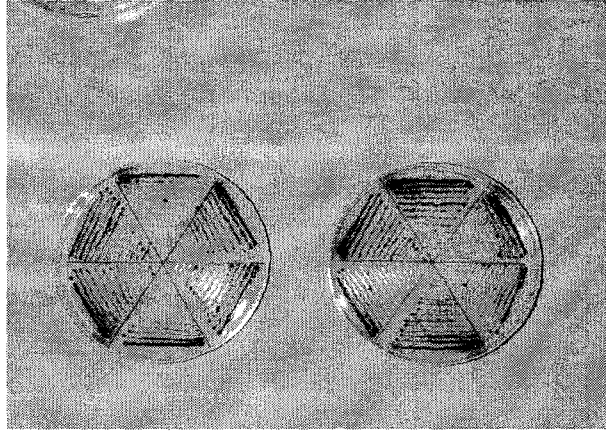
total 2×10^7 transformants를 탐색하여 78개의 positive clones (blue, Leu+)을 얻었다. 그 중 40 개의 clone을 PCR-amplification과 sequencing으로 분석한 결과 세 개의 다른 그룹으로 나뉜다는 것을 알게 되었다.

그림 1. screening of putative positive clones



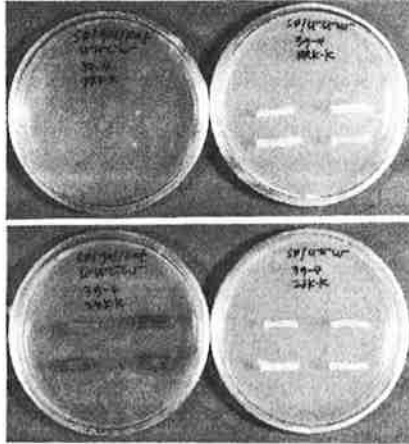
-그 결과 3 가지의 서로 다른 cDNA clone을 얻을수 있었다. 이들은 그 크기가 각각 1 kb, 0.8 kb, 2 kb 였으며 (그림은 PCR된 사진), 다시 yeast cell에 도입시켜 CHRK1의 kinase domain과 특이적으로 상호작용함을 확인하였다.

그림 2. CHRK1와 NtARC (왼쪽), FHT1 (오른쪽)과의 상호작용



-bait와 pray간의 상호작용을 확인하기 위하여 그 cDNA 들을 가지는 pB42AD plasmid를 EGY48[p8op-lacZ] strain과 pLexA/PRK1 plasmid를 가지는 EGY48[p8op-lacZ] strain으로 transformation시켜 transformants의 b-galactosidase activity를 테스트하였다. 그 결과 PRK1 kinase와는 세 개의 positive clone들이 전혀 반응하지 않아 CHRK1과의 interaction이 특이적으로 이루어지고 있다는 것을 확인하였다.

그림 3. Specificity of the interaction between CHRK1 and 39-4 clone



위) 39-4 clone did not interact with a control PRK1
(Pollen Receptor Kinase 1).

Left, on Leu⁻ medium, the yeast strain did not grow.

Right, on X-gal/Gal (Leu⁺) medium, the yeast strain did show the beta-galactosidase activity.

아래) Specific interaction between CIIRK1 and 39-4.

Left, on Leu⁻ medium, the yeast strain grew well.

Right, on X-gal/Gal (Leu⁺) medium, the yeast strain showed the beta-galactosidase activity.

-그 세 종류의 cDNA clone의 염기서열을 NCBI DNA database에서 상동성 비교를 한 결과, BLAST program을 이용하여 분석하였는데 1)

Forkhead transcription factor (FHT1), 2) ARC (Arm-Repeat-Containing) protein (NtARC1), 3) Unidentified protein으로 나타났다. 그 후 tobacco cDNA library에서 PCR로서 이들 유전자의 full sequence를 CHRK1과 이들 단백질들의 상호작용에 대한 연구가 진행중이다.

- 현재 이들 clone의 여러 deletion mutant와 LexABD-CHRK1와의 상호작용을 yeast two hybrid로 분석하여 두 단백질 사이의 상호작용에 필요한 지역을 분석 중이다. 또한 이들 clone들을 대장균에서 발현시켜 해당 단백질을 분리하며 CHRK1에 의한 phosphorylation과 in vitro 결합능을 검사할 예정이다.

-NtARC1과 Forkhead transcription factor (FHT1)의 amino acid sequence는 아래와 같다. Forkhead transcription factor는 식물에서는 분석되어 있지 않으나 동물과 yeast에서는 embryogenesis와 cell division을 조절하는 중요한 조절인자라는 것이 보고되고 있다. ARC는 SRK (S-locus Receptor Kinase)와 상호작용하는 단백질로 처음 cloning 된 후 SRK가 관련되어 있는 self-incompatibility interaction을 조절한다는 기능이 Science(1999)에 발표되었다. CHRK1이 ARC와 특이적으로 상호작용한다는 것은 CHRK1 sequence로 database를 search할 때 SRK group의 receptor kinase와 상동성이 가장 높다는 사실을 고려할 때 흥미로운 결과이며 CHRK1과 ARC의 상호작용의 생물학적 중요성을 시사하고 있다.

그림 4. Amino acid sequence of Forkhead transcription factor (FHT1)
MGSSSGSDVEAGFAKLQGEDFEYYMQTYSIILGRNSKKSTVDVDLSSL
GGGMNISRHARIFYDFQRRRFNLEVLGKNGCFVEGVLHLPGNPPIKLD
SQDLLQIGDKEFYFLLPVRSILGGGPIGPKQNVNYPVAAHYGGIGKKG
GLFRGREREYYDEEEYDDDDDDDDGTGGKKMRRCDGAEGGGGYGGY
GSCGSSGKASISGQLGQ

그림 5. Amino acid sequence of Arm-Repeat-Containing protein (NtARC1)
MEISLLKVLLNNISCFSHLSSSDHISGELVRRYYCKIEDILKLVKPILDAIV
DVEAASGELLKAFAGLAQCVELRELFFETLEPLCSKVYFVLQAEPLIG
KIRSCSLEILELLKSSHKSLPADVTLTTLELYILKIKYVDYEMISVTITKV
IKAQVEGLGTSSDSFAKIADCLSLNSNQELLIELVALEKLENAEQAQEK
SEVVEYIEQMITLVSHMHDCFVTTKQSQSCTAVPIPPDFCCPLSLELMT
DPVIVASGQTYERAFIRRWIDLGLTVCPKTRQTLGHTNLIPNYTVKALI
ANWCEINNVKLPDPMKSLSLNQPSLSPDSTQSSGSPRKSLISSTVSQRE
ESSPSHPRSSEESLPGVGGNILAFDVERMRIKSEDRMAHSGEISSHGHS
TLVADDQFPLGHNRTTSAPSTLSNSNFSPVIPGDGNKLSSESSVASGD
VGLDSKPAASVLPKEPEFPYTPEMRPRNQLIWRPRTFRPRIVSSATVE
RRADLSEVEEQVKKLIEELKSTSLDMQRNATAELRLLAKHNMDNRMV
IANCGAISSLVNLLHSKDMKVQEDAVTALLNLSINDNNKCAIANADAIE
PLIHVLQTGSAEAKENSAATLFSLSVMEENKMKIGRSGAIKPLVDLLG
NGTPRGKKDAATALFNLSILHENKSRIQAGAVKYLVELMDPATGMVD
KAVAVLSNLATIPEGRAEIGQEGGIPLLEVVELGSARGKENAAAALLQ
LCTNSSRFCNMVLQEGAVPPLVALSQSGTPRAREKAQQLLSYFRNQRH
GNAGRG

제 4 장 논 의

본 과제는 최근 급속히 진전되고 있는 병원체에 대한 식물의 생체방어과정의 분자생물학적 연구기술을 이용하여 가지과식물인 담배와 이를 가해하는 중요 병원체인 담배모자이크 바이러스를 모델로 이용하여 병원체에 대한 가지과 식물의 생체방어 및 신호전달과정에서 발현되는 다수의 유전자를 분리하여 각 유전자의 병저항성 과정에서의 발현연구를 통하여 새로운 유전자를 선발하고 그 유전자의 식물의 병저항성 발현과정에서의 기능과 역할을 규명하고 그 기능을 이용하여 주요 종자식물의 내병성을 증진시키는 육종소재로 활용하는 기술을 개발하고자 하였다. 이러한 연구수행을 위하여 다음과 같은 내용의 연구가 수행되었다.

- 담배를 모델로 한 병저항성 및 신호전달관련 유전자의 다수분리
- 유전자의 선발 및 유전자 구조연구
- 유전자의 발현기구 규명 및 유전자 유용성 확인
- 생화학적 연구를 통한 유전자 기능규명
- 형질전환 벡터의 제작 및 형질전환체 선발
- 유전자의 조절부위(promoter) 분리 및 조절연구

3년간의 과제 수행을 통하여 900개의 분리된 cDNA clone을 differential screening에 이용하여 최종적으로 2개의 새로운 생체방어관련 유전자 및 1개의 신호전달관련 유전자가 분리되었으며 연구 결과로 4편의 우수 국제 논문을 발표하였고 1편의 논문이 출판 준비중에 있다. 본 연구과제를 통하여 분리된 유전자는 식물의 내병성 기작을 이해하는 중요 분자 마커로, 내병성형질전환식물을 개발하기 위한 프로모터로 그리고 식물의 발달 및 신호전달을 이해하기 위한 분자수준의 도구로 활용 될 수 있을 것이다.

제 5 장 참 고 문 헌

(본 과제를 통하여 출판되었거나 출판 준비중인 논문)

1. Suh, M.-C., Park, K.-S., Oh, S.-K., Pai, H.-S., Choi, D. (2000).
Expression of a novel tobacco gene, Ng-CDM1, is preferentially associated with a biotic cell death. *Plant Physiology* (submitted).
2. Kim, Y.-S., Lee, J.-H., Yoon, K.-M., Cho, H.-S., Park, S.-W., Suh, M.-C., Choi, D., Ha, H.-J., Liu, J.-R., and Pai, H.-S., (2000).
CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiology* 123:905-915.
3. Park, K.-S., Cheong, J.-J., Lee, S.-J., Suh, M.-C., and Choi, D. (2000).
A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. *Biochimica Biophysica Acta* 1492:509-512.
4. Yi, S.-Y., Yu, S.-H., and Choi, D. (1999).
Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L. and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Molecules and Cells* 9:320-325.
5. Naqvi, S.M.S., Park, K.-S., Yi, S.-Y., Lee, H.-W., Bok, S.-H., and Choi, D. (1998).
A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response

following tobacco mosaic virus infection in tobacco. *Plant Molecular Biology* 37:571-576.