

최 종
연구보고서

Dehydration stress에 의해 유도되는 유전자
탐색 및 유전자 조작을 통한 인삼의
가뭄내성 형질전환체 개발 연구

연구기관
한국인삼연초연구원

농 림 부

633.883687

L 293 d

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "Dehydration stress에 의해 유도되는 유전자 탐색 및 유전자 조작을 통한 인삼의 가뭄내성 형질전환체 개발 연구" 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2000년 10월 28일

주관연구기관명 :한국인삼연초연구원

총괄연구책임자 :박 지 창

연구원 :이 종 화

연구원 :이 청 호

연구원 :안 인 옥

연구원 :이 정 현

협동연구기관명 :충남대학교 미생물학과

협동연구책임자 :맹 필 재



요 약 문

I. 제목

Dehydration stress에 의해 유도되는 유전자 탐색 및 유전자 조작을 통한 인삼의 가뭄내성 형질전환체 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

식물은 물부족으로 발생하는 가뭄피해에 대하여 민감한 반응을 나타내고 있으며, 물에 대한 식물체의 반응에 대한 연구는 기초과학으로서의 학문적 관심은 물론이고 농업 생산성 향상을 위한 중요한 관심사라 할 수 있다.

그러나 물과 관련된 환경변화 및 스트레스에 대한 생리·생화학적연구 및 유전자기능 연구는 부분적으로 yeast 및 bacteria등 하등한 생물체에서 연구된 바 있으나 고등식물에서는 매우 미진한 실정이다.

본 연구에서는 가뭄과 밀접한 관계가 있는 dehydration stress에 의하여 식물체에서 발현이 유도되거나 발현량이 현저히 증가하는 유전자를 분리, 확보하고 유전자 자체와 promoter등의 구조 및 기능을 분석함으로써 식물이 어떤 기작을 통해 dehydration stress를 극복하는지에 대한 연구를 수행 하고자 하였다.

최근 UR, GR등에 따라 농업자원의 보호 및 경쟁력 강화가 국가

적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 바, 생산비 절감 및 고부가가치 농작물의 개발이 요구되고 있다. 인공 관개 시설의 발달에도 불구하고 가뭄 등 물과 관련한 자연재해와 농수 공급에 필요한 비용은 아직도 농업 생산성에 중대한 영향을 미치고 있다. 따라서 수분관리를 위하여 인삼경작에서는 부토 재배법을 이용하고 있는 실정이다. 본 한국인삼연초연구원의 연구결과에 의하면 인삼의 경우 생육초기인 5~6월 경에 강수량이 100mm이하이거나 무강수일이 15일 이상 유지될 경우 생장이 불량할 뿐만 아니라 황병 등 병 발생률이 높아지는데 실제로 92년에는 이 시기에 50mm내외의 강수량만 기록하여 심각한 피해가 발생한 바 있다. 또한 생육 중기 (7월 초순 ~ 8월 초순)에 발생하는 가뭄의 피해는 더욱 심각한데, 실제로 1994년 7월 중 강수량이 평년 대비 25%로 현저히 적었으며 무강수일이 장기간 지속됨에 따라 가뭄 피해가 더욱 극심하였던 바 있다.

한편 가뭄 피해 포장 토양의 전기전도도가 0.2mmhos 이상으로 나타나 강수량 이외에도 인공 비료 등의 무분별한 사용 등에 의한 토양내 염류 농도의 증가가 인삼의 가뭄에 의한 피해를 가중시키는 중요 요인으로 보고되고 있다.

이 시기의 가뭄으로 인해 발생한 인삼의 피해는 인삼뿌리의 생체 중을 기준으로 볼 때 최소 10.5% (6년근의 경우)에서 최대 50% (묘삼의 경우)의 생산량 감소 피해가 나타난 것으로 보고되고 있다. 따라서 인삼의 가뭄 내성 관련 유전자를 탐색하고 외부의 물 부족 환경에 반응하여 유도되는 유전자의 발현 기작 연구 및 신호전달 체계에 대한 연구를 수행함으로써 가뭄 내성의 인삼 형질전환체를 개발하는 것은 경제적 산업적으로 중요한 가치가 있다고 사료된다. Dehydration stress 내성과 관련된 유전자를 탐색하고 인삼에 적용을

시도하여 우리 농업의 생산성 제고에 기여하고자 하였다.

본 연구에서 획득된 가뭄내성 유전자와 이들의 발현 기작에 대한 정보 및 실험에서 축적된 연구 기법등은 생물 자원과 생물공학 기술이 국가의 산업자원으로 혹은 무기로 사용되는 시점에서 경제적으로 중요한 기여를 할 수 있을 뿐만 아니라 특히 인삼 종주국으로서 인삼으로부터 유용 유전자원을 확보하고 신기술의 개발을 수행한다는 것이 한국인으로서의 자긍심을 고취시킬 수 있다는 사회·문화적 중요성을 갖는다. 또한 현재에 국제적으로 각광받고 있는 첨단 생명공학 기술을 이용하여 인삼의 유전적, 생리·생화학적 연구를 수행한다는 점에서 인삼 종주국으로서 한국의 위상을 대내외적으로 제고할 수 있을 것이며, 자원화 되고 있는 생물자원개발과 이에 따른 핵심 기술확보는 UR등에 대비하는 매우 중요한 과제라 할 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 가. Dehydration 유도 조건에서 발현되는 유전자의 확보 및 cloning
 - Dehydration 스트레스 유발 조건 및 비유발 조건에서 스트레스로 유도되는 mRNA의 분리 정제 및 확보
 - Dehydration 스트레스 저항성 line과 비저항성 line의 mRNA 비교
 - Differential display에 의해 dehydration 스트레스 내성 관련 유전자의 cDNA확인 및 cloning
 - 기존 알려진 dehydration 스트레스 저항성 유전자 cloning을 위한 primer, probe 합성 및 제조

- 기존의 dehydration 스트레스 저항성 유전자의 cloning 및 유전자 조작
- Cloning된 유전자의 염기서열 분석 및 구조 구명
- data base를 통한 cDNA의 identification

나. Dehydration 스트레스에 의해 유도 되는 유전자의 genomic clone 확보 및 발현 연구

- trehalose-6-phosphate synthase gene 등을 probe로 하여 인삼의 유전자 선별
- 기존 알려진 dehydration 스트레스 저항성 유전자의 cloning 및 유전자 조작, 염기서열 분석
- Northern blot 등으로 선별 유전자의 유도조건 및 특성 확인
- Southern blot analysis 및 genomic PCR을 이용하여 유전자의 genomic clone 분리, 분석
- dehydration 스트레스에 의해 유도되는 유전자의 발현 연구
- 1차년도에 협동과제에서 얻은 유전자 및 본연구에서 얻을 각 유전자는 3차년도에 인삼내 도입이 가능하도록 분석 및 조작

다. Dehydration 스트레스 저항성 유전자의 형질 전환에 의한 형질 전환체 개발

- 형질전환에 적합하도록 유전자를 조작
- 전년도까지 확보된 유전자를 인삼내에 도입 및 발현 확인
- 인삼내에 유도된 유전자가 보다 효과적으로 발현될 수 있도록 vector system의 개선
- 도입 유전자가 인삼내에서 안정된 발현을 하는지 여부를 조사
- 인삼내 형질전환 효율 증대 및 형질전환된 인삼의 재분화 효율 증대 연구

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. *Aspergillus nidulans*의 dehydration stress 내성 유전자 탐색

가. Dehydration stress 내성 유전자의 탐색

- 1) Differential display를 통해 얻은 cDNA 중 dehydration stress 내성과 관련이 있을 것으로 사료되는 Or1A (trehalose-6-phosphate phosphatase) 유전자와 상동성을 가진 clone을 얻어 cloning 완료하였다.
- 2) Or1A 유전자로 확인된 clone을 probe로 제작하여 *Aspergillus nidulans* chromosome specific library를 대상으로 Southern hybridization을 실시하여 genomic clone을 선별하였다.
- 3) Genomic library로 부터 선별된 clone을 다양한 제한효소로 처리 후 Southern blot analysis를 실시하여 제한효소 지도를 작성하였으며 염기서열 분석을 실시하여 유전자의 promoter 부위로 추측되는 부분에 대한 cloning 및 분석 수행에 이용하였다.
- 3) TPS (Trehalose-6-phosphate synthase) gene으로 사료되는 유전자를 cloning하였으며 염기서열 분석을 통해 이를 확인하였고 다른 생물체의 Trehalose-6-phosphate synthase의 유전자와 비교하였다.
- 4) Glycerol metabolism related genes의 primer를 제조 하였으며, 제조된 primer를 이용하여 *A. nidulans*의 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하여. glycerol kinase와 glycerol-3-phosphate

dehydrogenase 모두 예상되는 절편을 증폭하고 cloning하였다.

- 5) Cloning된 유전자 중 orlA (Trehalose-6-phosphate phosphatase) gene에 대한 분석을 집중적으로 수행하였다. 자세한 염기서열 분석을 위하여 serial deletion을 실시하였으며 이로부터 염기서열 분석을 실시하였다.
- 6) Or1A gene과 dehydration stress와의 관련성은 Northern blot을 통해 확인하였으며, 발현단계에서 보다 직접적인 관련성을 확인하기 위하여 *Aspergillus nidulans* 내에서 발현시켜 보았다.
- 7) Promoter 부위를 찾기 위해 analysis 용 vector를 construction하였으며 reporter로는 GFP (green fluorescense protein)를 사용하였고, 이와 같이 얻어진 promoter vector는 *Aspergillus nidulans* 에 transformation하여 confocal microsystem을 이용하여 GFP 발현에 따른 510nm의 elumination 파장을 관찰하였다. 그 결과 NaCl 농도의 증가에 따라 300bp이상의 부위를 포함하는 경우에 형광량이 증가하는 것을 확인하여 이 부위가 유전자 발현 조절에 역할을 하고 있음을 확인 하였다. 또한 promoter의 길이에 따라 발현량과 반응이 개시되는 NaCl의 농도가 다른 것을 관찰할 수 있었다. 이와같은 결과는 orlA 유전자가 dehydration stress와 밀접한 관련이 있음을 의미하는 것으로 사료된다.

2. Dehydration stress에 의해 유도되는 유전자 탐색 및 유전자 조작을 통한 인삼의 가뭄내성 형질전환체 개발

가. Dehydration stress와 관련된 인삼 생장 특성 조사 및 인삼 세포주 선발

- 1) 스트레스 비 유발성 인삼세포주를 NaCl 농도별로 치상한 후에 인삼세포로부터 수분분비 현상을 조사하였던 바, 인삼세포를 배지에 치상한 후에 0.05M의 NaCl을 제외한 모든 NaCl농도에서 2분 후 수분을 분비하였으며, 이 결과로 정상적인 인삼세포가 NaCl, 즉 삼투압에 적응하는 최저 농도가 0.05M임을 알 수 있었다.
- 2) 정상의 인삼세포주(KGC 13)중 17 세포주들을 NaCl 농도별로 60일간 배양한 후에 성장여부를 조사하였던 바, 모든 인삼세포들이 0.05M의 NaCl농도에서는 수분을 분비하지 않았을 뿐만 아니라 세포 성장도 매우 양호하였으나, 0.1M의 NaCl 농도에서는 성장 형태가 다양하였다. 0.1M의 NaCl 농도에서 선발된 인삼 세포주들은 성장 및 세포의 색깔등이 다양하였다.
- 3) 인삼세포주의 NaCl 농도 0.05M에서 증식 선발되는 기간은 12주가 걸렸으며, 이 세포주들은 세포증식 단계를 거쳐서 인삼세포의 최대 내성을 갖는 NaCl 농도를 결정하고, dehydration 유도 조건에서 발현되는 유전자의 확보 및 cloning을 수행하는데 사용하였다.
- 4) 0.05M의 NaCl농도에서 배양시간 별 성장을 조사하였던 바, 초기 6일동안 생체중이 감소하다가 증가하기 시작하였으며, 성장율이 급격히 증가하지는 않았다. 이 기간이 adapation되는 기간으로 사료되었다.
- 5) 고 농도에서 배양한 인삼세포는 생체중이 증가하지 않았으며, 이 세포들을 정상 배지에 옮긴 후에 세포생장을 관찰하였던 바, 세포생장이 전혀 나타나지 않았다. Osmotic pressure에 의하여 원형질 분리가 일어난 후 정상조건에서 다시 원상회복되는 현상과는 다른 것으로 사료되었다.

- 6) 0.1M의 NaCl농도에서 선별된 세포를 2차 계대배양시 0.2M의 농도에 배양후 생장을 조사하였던 바, 인삼세포의 dehydration stress 내성인자는 점진적인 스트레스 농도가 증가하므로서 획득되는 것으로 사료되었다.
- 7) 0.1M NaCl 고체배지상에서 인삼 배양세포는 dehydration 스트레스에 의한 반응으로 anthocyanin을 합성하였다. 0.1M NaCl의 스트레스가 주어지면 3주 내지 1개월 배양만에 anthocyanin이 합성된다. 일반적으로 환경스트레스가 가해지면 anthocyanin 합성 과정을 통해서 인삼세포생장을 극복하는 것으로 사료되었다.

나. Dehydration stress에 의해 유도되는 인삼의 유전자 탐색

- 1) 정상인 인삼세포주(KGC 13)와 NaCl농도 0.05M에서 증식 선발되어 세포증식 단계를 거친 인삼세포로부터 RNA를 분리하였으며 분리된 RNA를 Differential display에 사용하였다.
- 2) Differential display방법에 의해 얻어진 fragment는 elution 하여 cloning하였으며 Northern hybridization을 실시하여 재현성과 stress specific하게 나타나는 유전자임을 확인하였다.
- 3) *Aspergillus*로부터 얻어진 orlA gene을 probe로 하여 인삼 genomic DNA를 대상으로 genomic Southern blot을 실시하였으며 이를 통해 인삼의 trehalose-6-phosphate phosphatase 유전자를 cloning하였다.
- 4) Dehydration stress와 관련이 있을 것으로 사료되는 superoxide dismutase, heat shock protein, UDPG pyrophosphorylase 등의 유전자를 cloning하고 염기서열을 분석하였다.

- 5) 인삼내에 형질전환을 위한 vector system을 개발하고 reporter의 성능 확인 및 형질전환을 확립하기 위해 일차적으로 GFP (Green Fluorescence Protein)을 reporter로 하는 형질전환 vector를 construction 하였으며 이를 식물체내에 도입하였다.
- 6) Yeast 의 trehalose-6-phosphate synthase gene을 인삼내에 도입하여 사용가능성을 타진하기 위하여 먼저 yeast TPS 1 gene을 식물 형질 전환용 vector에 도입하였다. 형질전환용 vector에는 enhanced CaMV 35S promoter가 중복되어 포함되어 있으며, nos terminator가 포함되어 있다
- 7) 또한 삼투 충격에만 선택적으로 발현할 수 있도록 enhanced CaMV 35S promoter대신 osmotin promoter를 치환하여 식물체에 도입하였다. PCR 및 Southern hybridizaion 으로 도입을 확인하였다.

다. 인삼내 형질전환 효율 증대 및 형질전환된 인삼의 재분화 효율 증대 연구

- 1) 체세포배의 크기가 약 3mm이상될 때 이차배 발생 및 단일배 형성이 양호하였다.
- 2) 또한 형질전환체가 절편당 많은 수의 이차배를 형성하도록 하기 위하여는 1M sucrose 처리 후 3% sucrose 함유 MS배지를 사용하는 것이 가장 좋은 조건으로 사료되었다.
- 3) 형질전환체 체세포배 유도를 위해서는 호르몬이 첨가되지 않은 Murashige-Skoog(MS) 고체배양기에 접종하여 체세포배를 유기

하고 2,4-D $0.5\mu\text{M}$ 와 sucrose 3%를 첨가한 고체배양기에서 증식시켰다.

- 4) Sorbitol처리시 배가 단리되며 증식하는 양상이 양호하였으며 배의 증식은 sorbitol 1% 처리시 다소 높았고 sorbitol의 첨가량이 높아짐에 따라 성장량이 감소되었는데, 이는 배양액의 수분포텐셜이 낮아져 배의 수분흡수가 다소 억제되었기 때문으로 생각되었다. 각 처리구에서 증식된 배를 발육배지로 옮겨 배양하였을 때 sorbitol 1% 처리구에서 자랐던 배의 발육이 양호하였다.
- 5) Sucrose를 농도별로 첨가한 액체배지에 체세포배를 접종하여 1주간격으로 3회 연속 배양한 후 수확하여 조사한 바, 배가 단리되며 증식하는 양상은 sucrose 4% 처리구에서 가장 양호하였으며 농도가 낮아짐에 따라 세포가 단리되지 않고 증식하였다. 배의 증식은 2% 처리구에 비하여 3%-4% 처리구에서 양호하였으며 5% 처리구에서는 다소 감소하였는데, 이는 5% 이상에서는 배양액의 수분포텐셜이 낮아 배의 수분흡수가 억제되었기 때문으로 생각된다. 각 처리구에서 증식된 배를 발육배지에 옮겨 배양하였을 때 4% sucrose에서 자랐던 배에서 발육이 양호하게 이루어졌다.
- 6) 계대기간에 따라서는 1주 간격으로 계대하였을 때 배가 양호하게 단리되며 증식하였으며 계대기간이 길어짐에 따라 단리되지 않고 점차 뭉치며 증식하였다. 배의 증식은 2주간격으로 계대하였을 때 가장 높았으며 3주간격으로 계대한 처리구에서는 증식량이 미미하였다. 각 처리구에서 증식된 배를 발육배지에 옮겨 배양하였을 때 1주 간격으로 배양한 처리구에서 자랐던 배에서 발육이 양호하게 이루어졌다.

- 7) 고행제로 배지에 첨가하는 phytagel을 농도별로 첨가한 발육배지에 배를 접종 배양하였던 바, 0.4-0.6%의 phytagel 처리구에서는 배가 단립되며 발육하였으나 phytagel의 농도가 낮아짐에 따라 배가 단립되지 않고 점차 뭉치며 발육하였다. 0.1% 처리구에서는 배지가 완전히 굳지 않았고 배의 발육도 거의 이루어지지 않았으며, 2% 처리구에서는 배의 발육이 관찰되기 시작하여 4% 처리구에서 가장 양호한 배의 발육을 나타내었다. 이는 고행제로 배지에 첨가한 phytagel이 배지내의 수분을 흡착하여 배의 발육을 도모한 것으로 생각된다. 각 처리구에서 발육된 세포를 발아배지에 옮겨 배양하였을 때 유식물체의 전환은 phytagel 4%에서 발육한 세포에서 높게 이루어 졌다.
- 8) 배지의 수분포텐셜은 변화시키지 않고 배의 수분포텐셜만을 변화시키는 ABA를 농도별로 배지에 첨가한 경우에는 ABA시 배가 단립되는 양상이 양호하였으며, 배의 발육도 다소 양호하였다. 그러나 ABA시 발아율이 다소 낮았는데, 이는 ABA가 체세포배에 잔류하여 발아억제물질로 작용하였기 때문으로 생각된다.
- 9) 체세포배의 활력유지에 적절한 액체배양기간을 구명하고자, 총배양기간이 다른 체세포배를 접종배양하여 발육상태를 비교하였던 바, 액체배지에서의 배양기간이 1개월 경과된 세포는 단립화는 양호하였으나 수십개의 배가 뭉쳐서 발육하였다. 배양기간이 6개월에서 12개월 경과된 체세포배는 단립화가 양호하게 진행되었으며 발육도 양호하였다.
- 10) 암모늄태 질소원은 5mM-20mM 범위에서 체세포배의 발육을 촉진하였으며 다량으로 첨가되면 체세포배의 단립화가 불량해지는 것이 관찰되었다. 질산태 질소원은 10mM이상에서 배의 발육

을 촉진하였으며 20-40mM의 농도범위에서 배의 양호한 발육이 관찰되었다.

라. 재분화 식물체의 육성 조건 연구

- 1) Auxin, cytokinin, gibberellic acid를 함께 처리시 초기발아가 양호하였으나 출아율이 낮았으며 유경이 탈분화되는 경향을 나타내었으며, cytokinin과 gibberellic acid가 함께 처리된 경우 초기발아는 낮았으나 출아율이 높았으며 탈분화되는 현상을 나타내지 않았다. Cytokinin 단독 첨가시 발아와 출아가 비교적 양호하였으며, gibberellic acid 단독 첨가시 출아율이 낮았으며 탈분화되는 경향을 나타내었다.
- 2) MS배지 원액과 1/2 희석된 배양액에서 유식물의 출아율이 낮게 나타났으며 탈분화 현상이 높게 나타났다. 1/20-1/40으로 희석 MS 배지에서는 출아율이 양호하였으며 탈분화 현상도 낮게 나타났다.
- 3) 성숙배지에서의 배양기간이 짧았던 체세포배는 발아배지에서 지상부가 웃자랐으며 성숙기간이 과도한 체세포배는 발아배지에서 지하부가 웃자라는 현상을 나타내었으며 성숙기간이 적당한 체세포배는 지상부와 지하부가 균형있게 발달하였다.
- 4) 10-100 uM putrescine 처리시 유근의 초기 생육이 양호하였으나 2주간 연속 처리한 경우에는 유근이 이상 발육하였으며 생육의 진전이 이루어지지 않았다. 종자 발아의 putrescine의 함량이 단기간 높았던 점으로 보아 putrescine 배양기에서 처리기간을 1주 이내로 하는 것이 적당할 것으로 생각된다.

Summary

I. Title :

The studies on the survey of the gene related to dehydration stress and development of transformant

II. Purpose and importance of the study :

In general, plant respond very sensitively to the water droughtness so it is vey important points of the study about the responses of plant to water as a basic study and improvement of crop productivity.

Physiological, biochemical and genetic studies about the environmental changes and stresses related to water in yeast and bacteria have been well but poor in highly developed plant.

Recently, making powerful protection of agronomic resources and containing competitive ability to other country as like UR, GR, development of economically efficient crops are demanded.

Although improvement of water control mechanism, the cost of water for agriculture and natural disater as like drought are major portion of them, so ginseng are cultured on field with highly water control.

In this study, we try to understand how plant can overcome the dehydration stress by the isolation of the genes which are induced or expressed their products dramatically increased and characterization of the gene itself and their structure and function of their promoters.

III. Contents and Scope

Main contents and their scope of this study are as follows:

1. Isolation and cloning of dehydration stress related genes

- mRNA induced by the dehydration stress condition was isolated.
- Dehydration stress resistant cell line was compared with non-resistant cell line.
- cDNAs which is of dehydration stress related gene were identified and isolated by differential display technique.
- Primer and probe for cloning of dehydration stress related genes were designed and synthesized.
- Dehydration stress related genes were isolated, manipulated and sequence analyzed.

2. Isolation of genomic clones of dehydration stress related genes and study of expression of these genes

- Cloned gene from *Aspergillus nidulans* was used as probe for cloning the genes from ginseng.
- Cloned genes from ginseng were manipulated and sequence analyzed.
- Genomic clones of cloned genes were isolated by Southern blot analysis or genomic PCR and were analysed.

3. Transformation of dehydration stress related genes into ginseng cells

- Genes were manipulated for transformation.
- Cloned genes were introduced into ginseng and expressed.
- Vector system was improved to express the genes effectively.
- Expression of the gene in ginseng was experimented.
- Improvement of ginseng transformation rate and redifferentiation rate was studied.

IV. Results

The results of the study are summarized as follows :

1. Isolation of dehydration stress related genes from *Aspergillus nidulans*

1) Isolation of dehydration stress related genes

- Or1A (trehalose-6-phosphate phosphatase) gene was cloned from the cDNAs which was obtained by differential display.
- Or1A gene was used as probe for screening of genomic clone from *Aspergillus nidulans* chromosome specific library. And Genomic clone of the gene was isolated.

- The clone isolated from genomic library was digested by various restriction endonucleases and was Southern blot analysed. Restriction enzyme map of this gene was prepared and the promotor region of this gene was identified.
- TPS (Trehalose-6-phosphate synthase) gene was cloned and analysed the sequence of the gene. Nucleotide sequence was compared with various plants.
- Primers for glycerol metabolism related genes were designed and synthesized. These primers were used to clone the genes from *A. nidulans* genomic library by PCR. PCR products containing glycerol kinase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase were amplified.
- To find the promoter of OrlA gene, promoter analysis vector was constructed. Vector containing OrlA promoter and GFP reporter was introduced into *Aspergillus nidulans*.

2. Development of transgenic transformant by searching and manipulation of dehydration stress inducible gene

- 1) The selection of ginseng callus and the characteristics of cells by the dehydration stress

- The ginseng cells was adapted to 0.05M sodium chloride and then the cells were subcultured by the increasing of the concentration of sodium chlorided.
- The growth pattern of ginseng cells was different on the agar plate including 0.1M of sodium chloride. Also, the surface of ginseng callus appeared several kinds of colour which was yellow or red.
- The fresh weight of ginseng cells were decrease during 6 days and then incresed.
- On the higher concentration of sodium chloride, the fresh weight of ginseng cells were not increased because of the osmolysis of cells by the osmotic pressure.
- The ginseng cells synthesized the anthocyanins (red colour) by the dehydration stress which was induced between 3 weeks and 4 weeks in 0.1M sodium chloride. However, the production of the anthcyanins was disappeared for the long term subculture.

2) Searching dehydration stress related gene from ginseng

- RNA was isolated from ginseng cultured on medium containing NaCl (0.05M) and normal ginseng cell(KGC 13). The RNA isolated was used to perform differential display.
- The fragment isolated by differential display was eluted and cloned. The fragment was used as probe to perform Northern analysis.

- Trehalose-6-phosphate phosphatase gene was cloned from ginseng. Or1A gene from *Aspergillus* was used as probe for genomic Southern hybridization.
- Superoxide dismutase, heat shock protein, UDPG pyrophosphorylase gene was cloned from ginseng and their nucleotide sequence was analysed.
- Vector containing green fluorescence protein as reporter was constructed and introduced into plant cell.
- Trehalose-6-phosphate synthase gene from yeast was ligated with plant transformation vector containing enhanced CaMV 35S promoter and nos terminator.
- Osmotin promoter was substituted for enhanced CaMV 35S promoter to let the vector express in osmotic shock specifically.

3) Enhance of transformation rate and regeneration rate

- Three millimeter or more of somatic embryos in length was good to generate secondary embryos and single embryos.
- Pretreatment of 1M sucrose and culture on MS medium containing 3% of sucrose was the best condition to let the transformant make many secondary embryos.
- To induce somatic embryos, somatic embryos was induced on hormone-free MS agar media firstly and then propagated on the medium containing 0.5uM of 2,4-D and 3% of sucrose.

- Somatic embryos proliferated well on the media containing sorbitol and conversion into granule shape embryos was high on the media containing 1% sorbitol.
- On the media containing 3-4% sucrose somatic embryos proliferated well and conversion into granule shape embryos was high on the media containing 4% sucrose.
- Somatic embryos subcultured with one week interval proliferated well.
- On the media containing 3-4% sucrose somatic embryos proliferated well and conversion into granule shape embryos was high.
- Conversion into granule shape embryos was stimulated on the media containing ABA.
- Somatic embryos began to lose embryogenic potential when exposed to longterm subculture more than 1 year.
- Growth of embryos was improved on the media containing ammonium nitrate with the range of 5-20mM and potassium nitrate with the range with 20-40mM.

4) Establishment of seedling production

- Addition of both gibberellin and cytokinin promoted sprouting of embryos and depressed dedifferentiation.
- Sprouting ratio of embryo was improved on the MS media diluted with 1/20-1/40 times.
- Somatic embryos exposed to the maturation treat insufficiently showed abnormal sprouting on the germination media.

- Radicle growth of plantlet was improved on the treatment with 10-100uM putrescine within 1 week.

CONTENTS

I. Introduction.....	25
1. Objectives and scope.....	25
II. Isolation of dehydration related gene from <i>Aspergillus nidulans</i>	31
1. Introduction.....	31
2. Isolation of dehydration related gene.....	34
III. Isolation of dehydration related gene from ginseng and development transformant.....	54
1. Introduction.....	54
2. Isolation of dehydration stress resistant ginseng cell lines.....	59
3. Isolation of dehydration related gene from ginseng.....	67
4. Enhance of transformation rate and regeneration rate.....	78
Literature ceted.....	92

여 백

목 차

제 1 장 서 론.....	25
제1절 연구개발의 목적과 범위.....	25
제 2 장 <i>Aspergillus nidulans</i> 의 dehydration stress 내성 유전자 탐색.....	31
제1절 서설.....	31
제2절 Dehydration stress 내성 유전자의 탐색.....	34
제 3 장 Dehydration stress에 의해 유도되는 유전자 탐색 및 유전자 조작을 통한 인삼의 가뭄내성 형질전환체 개발..	54
제1절 서설.....	54
제2절 Dehydration stress 내성 인삼 세포주의 선발.....	59
제3절 Dehydration stress에 의해 유도되는 인삼의 유전자 탐색.....	67
제4절 인삼내 형질전환 효율 증대 및 형질전환된 인삼의 재분화 효율 증대 연구.....	78
참고문헌.....	92

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

생물체의 생존에 있어서 외부 환경을 인식하고 생존에 필요한 적절한 반응을 하는것은 필수적이며 특히 고착생활을 하는 식물의 경우는 생존 및 생장에 적합한 환경을 선택할 수 없기 때문에 환경조건의 변화에 따른 적절한 적응 및 신속한 반응 능력이 대단히 잘 발달해 있을 것으로 기대되고 있다. 물은 모든 생물체의 80% 이상을 차지하고 있는 중요한 생체 구성성분으로서 생물체가 속한 환경 중에서도 특히 물과 관련된 생물체의 반응은 대단히 중요한 연구과제 중의 하나이다. 식물은 물부족으로 발생하는 가뭄피해에 대하여 민감한 반응을 나타내고 있으며, 물에 대한 식물체의 반응에 대한 연구는 기초과학으로서의 학문적 관심은 물론이고 농업 생산성 향상을 위한 중요한 관심사라 할 수 있다.

세포막을 통하여 환경의 변화라는 제1차 신호는 세포내 2차 신호로 전달되는 일련의 생화학적 연쇄반응들을 통해 유전자 발현등을 조절하게 되고 환경변화에 적응하기 위한 생리적, 생화학적 변화를 유도하게 된다. 최근에 생화학 및 분자생물학의 눈부신 발전에 따라 온도변화와 같은 일부 환경변화에 대한 생물체의 반응에 관한 많은 연구가 수행되었다. 특히 bacteria 및 yeast의 경우에는 이들 환경 변화에 따른 유전자의 발현 조건 및 조절 기작등에 대하여도 상당히 많은 연구가 진척

되었으며 온도 변화에 반응하여 유도된 유전자 및 단백질등이 온도 뿐 아니라 중금속, 탈수, 유기화합물등에 노출된 환경에서도 작용하는 다기능 유전자 (Multi-function gene)으로서 작용한다는 결과도 보고되었다. 그러나 물과 관련된 환경변화 및 스트레스에 대한 생리·생화학적 연구 및 유전자기능 연구는 부분적으로 yeast 및 bacteria등 하등한 생물체에서 연구된 바 있으나 고등식물에서는 거의 전무한 실정이다.

가뭄이나 삼투압 변화에 의한 탈수(dehydration) 현상은 원형질막 안과 밖의 삼투압의 차(osmotic gradient)가 붕괴 되어 일어나는데, 이 결과로 생물체는 세포 생장의 감소, non-isotropic shrinkage, 세포내 독성 용질 유입 및 농도 증가, 세포내 구성물질의 유실 등이 일어나게 되어 궁극적으로 생존이 불가능한 상태에 놓이게 된다. 이러한 환경의 변화에 대응하여 생물체는 세포내 삼투압을 높여서 탈수를 막기 위하여 glycerol, arabitol 등의 poly alcohol들을 생합성하며 세포내에 유입된 독성 용질을 세포외로 배출하기 위하여 active transport와 관련된 유전자들을 작동하여 세포내 물질을 보호하고 회복하는데 필요한 단백질등을 합성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 일련의 반응들이 적절히 일어나기 위하여는 외부의 환경변화라는 신호를 세포내로 전달하고 유전자의 발현 및 단백질의 변화를 유도하는 신호전달 체계가 필요한데 최근의 많은 연구에도 불구하고 protein kinase들과 관련된 신호전달 체계가 이에 관여한다는 사실이 밝혀진 바 있을 뿐 자세한 기작이나 고등생물체 특히 식물등에서는 거의 이해되고 있지 못하다.

본 연구에서는 가뭄과 밀접한 관계가 있는 dehydration stress에 의하여 식물체에서 발현이 유도되거나 발현량이 현저히 증가하는 유전자를 분리, 확보하고 유전자 자체와 promoter등의 구조 및 기능을 분석함으로써 식물이 어떤 기작을 통해 dehydration stress를 인식하고 유

전자의 발현 유도 및 변화에 필요한 신호를 전달하는지에 대한 연구를 수행 하고자 하였다.

최근 UR, GR등에 따라 농업자원의 보호 및 경쟁력 강화가 국가적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 바, 생산비 절감 및 고부가가치 농작물의 개발이 요구되고 있다. 인공 관개 시설의 발달에도 불구하고 가뭄등 물과 관련한 자연재해와 농수 공급에 필요한 비용은 아직도 농업 생산성에 중대한 영향을 미치고 있다. 따라서 수분관리를 위하여 인삼경작에서는 부토 재배법을 이용하고 있는 실정이다. 본 한국인삼연초연구원의 연구결과에 의하면 인삼의 경우 생육초기인 5~6월경에 강수량이 100mm이하이거나 무강수일이 15일 이상 유지될 경우 생장이 불량할 뿐만 아니라 황병등 병 발생률이 높아지는데 실제로 1992년에는 이 시기에 50mm내외의 강수량만 기록하여 심각한 피해가 발생한 바 있다. 또한 생육 중기 (7월초순~8월 초순)에 발생하는 가뭄의 피해는 더욱 심각한데, 실제로 1994년 7월 중 강수량이 평년 대비 25%로 현저히 적었으며 무강수일이 장기지속됨에 따라 가뭄 피해가 더욱 극심하였던 바 있다.

한편 가뭄 피해 포장 토양의 전기전도도가 0.2mmhos 이상으로 나타나 강수량 이외에도 인공 비료등의 무분별한 사용등에 의한 토양내 염류 농도의 증가가 인삼의 가뭄에 의한 피해를 가중시키는 중요 요인으로 보고되고 있다.

이 시기의 가뭄으로 인해 발생한 인삼의 피해는 인삼뿌리의 생체중을 기준으로 볼 때 최소 10.5% (6년근의 경우)에서 최대 50% (묘삼의 경우)의 생산량 감소피해가 나타난 것으로 보고되고 있다. 따라서 인삼의 가뭄 내성 관련 유전자를 탐색하고 외부의 물 부족환경에 반응하여 유도되는 유전자의 발현 기작 연구 및 신호전달 체계에 대한 연구

를 수행하는 것은 경제적 산업적으로 중요한 가치가 있다고 사료된다. Dehydration stress내성과 관련된 유전자를 인삼, 혹은 외부로부터 탐색하고 인삼에 적용가능여부를 연구함으로써 이를 통해 인삼 및 타 식물체들이 가뭄등 환경 스트레스에 적응하며 살아가는데 필요한 신호전달 과정과 유전자 발현 기작을 이해할 수 있을 뿐 아니라 가뭄에 내성을 갖는 인삼의 개발이 가능할 것이며 이는 우리 농업의 생산성 제고에 기여하게 될 것이다.

또한 본 연구에서 획득되는 가뭄내성 유전자와 이들의 발현 기작에 대한 정보 및 실험에서 축적될 신호전달기작연구 기법, 환경스트레스에 의해 유도되는 유전자의 탐색 기법등은 생물 자원과 생물공학 기술이 국가의 산업자원으로 혹은 무기로 사용되는 시점에서 경제적으로 중요한 기여를 할 수 있을 것이다.

뿐만아니라 특히 인삼 종주국으로서 인삼으로부터 유용 유전자원을 확보하고 신기술의 개발을 수행한다는 것이 한국인으로서의 자긍심을 고취시킬 수 있다는 점에 있어서 사회·문화적 중요성이 있으며 현재 국제적으로 각광받고 있는 첨단 생명공학 기술을 이용하여 인삼의 유전적, 생리·생화학적 연구를 수행한다는 점에서 인삼 종주국으로서 한국의 위상을 대내외적으로 제고할 수 있을 것이며, 자원화 되고 있는 생물자원개발과 이에 따른 핵심 기술확보등이 본 연구의 중요성이라고 사료된다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 가뭄과 밀접한 관계가 있는 dehydration stress에 의하여 인삼에서 발현이 유도되거나 발현량이 현저히 증가하는 유전자를 분리,

확보하고 유전자 자체와 promoter 등의 구조 및 기능을 분석함으로써 인삼이 어떤 기작을 통해 dehydration stress를 인식하고 유전자의 발현 유도 및 변화에 필요한 신호를 전달하는지에 대한 연구를 수행하고자 하였으며 확보된 유전자를 인삼내에 도입하여 기능을 나타낼 수 있도록 인삼의 형질전환과 재분화 및 그 효율 증대등을 연구하고자 하였다.

환경 스트레스에 대한 생물체의 반응이나 developmental, differential stage에 따라 다르게 발현하는 유전자를 찾기위하여 사용되는 방법으로는 일반적으로 subtractive hybridization 혹은 two-dimensional electrophoresis에 의한 mRNA의 fingerprinting technique이 사용되지만 최근에 보다 효과적인 방법으로 differential display(Liang, P and Pardee, A.B. ,1992)가 주목받고 있다. 이 방법은 total RNA로 부터 mRNA의 추출 없이 PCR을 이용하여 매우 신속하고 정확하게 유전자 발현의 변화를 구분할 수 있는 방법으로서 Patrick J. Donahue등 (1995)이 murine NIH 3T3 fibroblast에서 fibroblast growth factor-1에 의해 유도되는 유전자를 밝히는데 사용한 바 있다. 이 기술은 1992년에 시도되기 시작하여 1995년경에 그 유용성이 확립된 최신의 기술이며 현재에는 유전자 발현 연구에서 가장 유용한 기술로 생각되고 있다. 본 연구에서도 인삼에 적합한 differential display technique을 확립하고 인삼이 dehydration stress에 대해 적응하기 위하여 발현하는 가뭄 내성 유전자를 탐색하기 위하여 이 기술을 적용하고자 한다.

Dehydration 스트레스 유발 조건 및 비유발 조건에서 스트레스로 유도되는 mRNA의 분리 정제 및 확보하고 dehydration 스트레스 저항성 line과 비저항성 line의 mRNA 비교하였으며, dehydration 스

트레스 내성 관련 유전자의 cDNA를 확인 및 cloning하였다.

또한 기존 알려진 dehydration 스트레스 저항성 유전자를 cloning 하여 이들을 각각 유전자 염기서열을 분석하고 data base를 이용하여 identification을 하고자 하였다.

확보된 유전자를 인삼내에 도입하여 기능을 나타낼 수 있도록 인삼의 형질전환과 재분화 및 그 효율 증대에 관한 연구를 수행하였다.

형질전환에 적합하도록 유전자를 조작하여 인삼내에 유도된 유전자가 보다 효과적으로 발현될 수 있도록 개선된 vector system내에 유전자를 도입하였으며 도입 유전자가 인삼내에서 안정된 발현을 하는지 여부를 조사하고자 하였다. 또한 인삼내 형질전환 효율 증대 및 형질전환된 인삼의 재분화 효율 증대 연구를 수행하였다.

제 2 장 *Aspergillus nidulans*의 dehydration stress 내성 유전자 탐색 (1차년도 협동과제)

제 1 절 서 설

인삼은 물부족으로 발생하는 가뭄피해에 대하여 민감한 반응을 나타내고 있으며, 경제적, 사회적으로 매우 중요한 관심사임은 물론 식물체의 dehydration에 대한 반응 연구는 기초 학문적으로도 매우 중요한 관심사라 할 수 있다.

인삼의 경우에도 다른 식물 혹은 생물들과 같이 세포막을 통하여 환경의 변화라는 제1차 신호는 세포내 2차 신호로 전달되는 일련의 생화학적 연쇄반응들을 통해 유전자 발현등을 조절하게 되고 환경변화에 적응하기 위한 생리적, 생화학적 변화를 유도하게 될 것으로 추측된다. 그러나 인삼뿐 아니라 대부분의 고등식물의 경우는 이에 관한 연구가 거의 전무한 실정이고, 다만 bacteria 및 yeast의 경우에는 이들 환경 변화에 따른 유전자의 발현 조건 및 조절 기작등에 대하여도 상당히 많은 연구가 진척되었으며 온도 변화에 반응하여 유도된 유전자 및 단백질등이 온도 뿐 아니라 중금속, 탈수, 유기화합물등에 노출된 환경에서도 작용하는 다기능 유전자 (Multi-function gene)으로서 작용한다는 결과도 보고되었다. 따라서 본 연구에서 이미 많이 연구되었거나 연구가 용의한 모델시스템으로서 식물과 진화적으로 매우 근접한

filamentous fungi를 사용하고자 하였다.

Mishira 와 Tatum(1973)이 처음 filamentous fungi를 재료로 형질전환 실험을 보고한 이래 molecular biological technique과 transformation 기술의 발달과 함께 yeast(Hinnen *et al.*, 1978), *Neurospora crassa* (Case *et al.*, 1980) 등 많은 fungal species에서 형질전환 체계를 확립되었으며, *Aspergillus*의 경우에는 1983년 Ballance 등에 의해 형질전환기술이 도입되기 시작하였다. 현재에는 형질전환에 필요한 vector system 및 selection 방법등이 비교적 잘 연구되어있으므로 생물학적 목적이나 의학적, 농업적, 공업적인 용도로 각광 받는 단계에 있다. 특히 *Aspergillus*등 fungal species는 고등식물과 같은 eukaryote로 유전자 발현 mechanism 및 post-translational modification등이 매우 유사하기 때문에 이들을 고등생물 연구의 model system으로 많이 사용하는 경향이 있다.

생체는 환경조건이 변화함에 따라 적응 및 생존을 위한 신속한 반응을 하게 된다. 이러한 현상은 일반적으로 환경조건의 변화라는 signal이 plasma membrane을 통과하여 세포내로 일련의 연쇄적인 생화학적 반응들을 거쳐 전달되어 환경조건에 적응하는데 필요한 유전자의 발현등을 유도, 조절함으로써 나타나게 된다. 최근에 분자생물학의 발전 등의 결과로 환경조건중 특히 온도변화와 관련된 많은 연구가 수행된 바 있으며 온도의 변화에 대해 진화적으로 잘 보존되어 있는 일련의 단백질, 즉 heat shock protein에 대한 발현조건 및 transcription factor, transcription element등 분자생물학적 연구에 많은 진척이 있었다. 또한 heat shock protein중 여러 종류가 온도 변화 뿐만 아니라 중금속, 환경내 삼투압의 변화 및 동물의 경우에는 hormone의 자극 등 전혀 다른 환경변화 또는 stress에 의해서도 발현이 유도됨이 밝혀졌다. 이

러한 결과로 생물체의 환경에 대한 적응 기작이 다양한 환경에도 불구하고 서로 연관되어 있으며 생물계내에 진화적으로 상당히 잘 보존되어 있음을 알 수 있다.

본 연구팀에서는 세포의 생존 및 생장에 있어 물은 대단히 중요한 환경요소이며 물의 흡수는 필수적이라는 관점에서 세포의 환경 stress 중 가장 중요한 연구대상 중 하나가 물과 관련된 것이라고 인식하고 본 연구를 수행하고자 한다.

물의 흡수는 plasma membrane 내외의 osmotic gradient에 의해 유발되는데 된다. 건조, high osmolarities 등 물 부족의 환경에 세포가 노출되면 dehydration이 일어나고 ion gradient가 붕괴되어 세포의 생장률이 감소하게 된다. Dehydration stress에 처한 세포는 급격한 탈수로 인한 non-isotropic shrinkage, 세포내 용질 농도의 증가, 독성 용질 (e.g. Na^+)의 유입, cytoskeleton 등 세포내 물질의 손실 등의 현상이 일어난다. 이때 세포는 생존하기 위하여 일어나는 일련의 molecular events를 일으키며 이를 osmotic stress response라고 한다.

Dehydration에 대하여 반응하는 osmotic stress response는 대개 osmoregulatory reaction과 general stress reaction 모두가 동시에 작용하는 것으로 생각되나 그 process에 대한 이해는 거의 전무한 실정이다. 단지 yeast 혹은 bacteria에서 이해된 바에 의하면 물 손실에 대한 반응으로서 세포내 삼투압을 높이고자 세포내 용질로서 glycerol 등의 생산이 일어나며 독성 용질의 유입을 막고 세포외로 배출하기 위한 일련의 반응들이 일어나는 한편 세포 구성물질을 보호하고 repair 및 recovery를 촉진하기 위하여 heat-shock protein과 trehalose 등이 합성되는 것이 알려지고 있다. 최근의 연구에 의하면 protein kinase-mediated signal-transduction pathway가 세포의 물손실에 대한

저항 및 그 신호전달에 작용함이 밝혀진 바 있다.

이와 같은 연구의 중요성과 yeast, bacteria 등에서의 약간의 진척에도 불구하고 본 연구에서 사용하고자 하는 *Aspergillus* 뿐만 아니라 다른 대부분의 filamentous fungi의 경우에 osmostress에 반응하는 process에 대한 연구가 거의 전무한 실정이므로 본 연구팀에서는 이에 관심을 가지고 물 손실에 대한 저항성이 큰 세포주를 이미 분리 선발하였으며 이 세포주에 대한 연구를 수행하여 저항성과 관련한 유전자를 탐색하고 조절 mechanism에 대한 연구를 수행 하고자 하였다.

제2절 Dehydration stress 내성 유전자의 탐색

1. 실험방법

세포내 dehydration stress 에 대하여 기능을 수행하리라 생각되는 유전자를 분리하고 이 유전자의 조작을 통해, 높은 삼투 환경에서 세포가 내성을 갖을 수 있는지, 혹은 인삼에 probe혹은 외래 유전자로 사용하고 연구를 수행하였으며, 유전자들의 분리는 다른 종에서 분리된 유전자의 상동성을 비교하여 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 유전자 절편을 분리하고, 이를 탐침자로 이용하여 *A. nidulans*의 genomic library에서 전체 구조 유전자를 찾고자 하였다.

실험에 사용된 균주는 야생형인 *A. nidulans* FGSC4를 사용하였으며 완전배지(CM)에서 배양하였다. Dehydration stress를 유도하기 위하여 *A. nidulans*을 18시간 배양한 후 여과에 의해 균사를 수확한 후

control 및 0.6M NaCl 이 포함된 배지로 옮겨 다시 4시간동안 배양하였다. 이렇게 dehydration stress가 유도된 균주는 즉시 여과하여 수확하고 액체질소로 동결건조하여 RNA 및 DNA의 추출에 사용하였다. *A. nidulans*의 genomic DNA를 분리하는 균사체 분말 1 g을 사용하여 Hwang (1991)등의 방법을 따랐으며 RNA를 분리하기 위하여 균사체 분말 1g을 사용하여 Chomzynski의 Acid Guanidium thiocyanate-phenol -chloroform extraction 방법을 따라 실시하였다. 분리된 RNA는 differential display 방법에 사용하였다(그림 1).

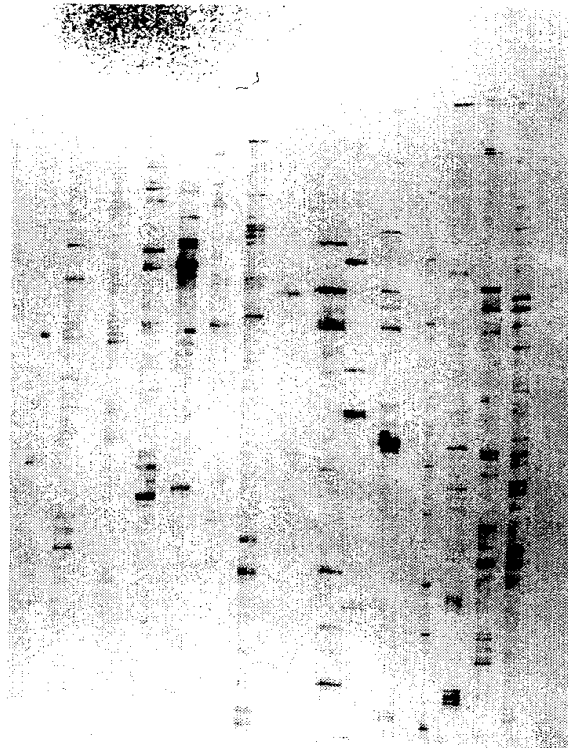


그림 1. Control 혹은 dehydration stress를 받은 *Aspergillus nidulans*로부터 얻는 total RNA를 RT-PCR을 통해 증폭하여 생산한 cDNA를 polyacrylamide gel electrophoregram.

2. Or1A (trehalose-6-phosphate phosphatase) gene의 cloning

Differential display를 통해 얻은 cDNA 중 dehydration stress 내성과 관련이 있을 것으로 사료되는 Or1A (trehalose-6-phosphate phosphatase) 유전자와 상동성을 가진 clone을 얻어 cloning 완료하였다(그림 2).

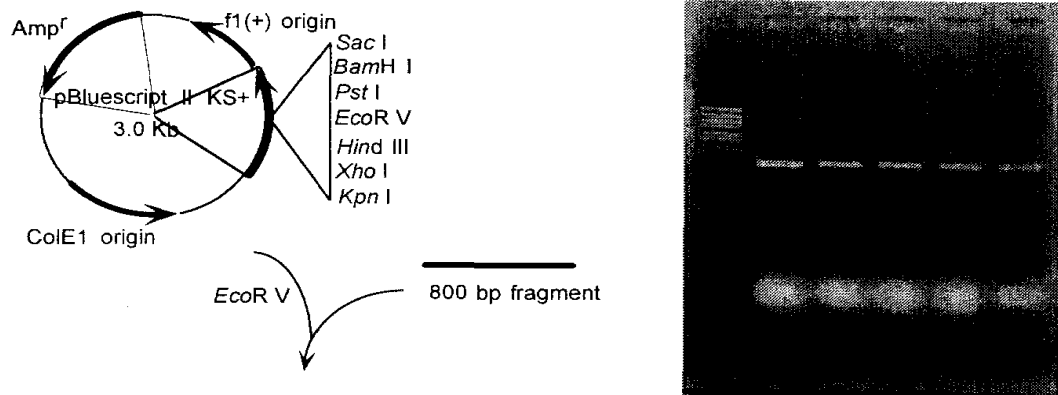


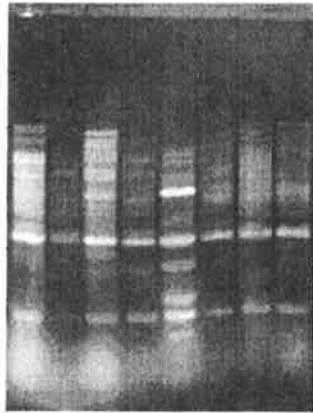
그림 2. ddRT PCR-amplified fragment의 cloning.

Or1A 유전자로 확인된 clone을 probe로 제작하여 *Aspergillus nidulans* chromosome specific library를 대상으로 Southern hybridization을 실시하여(그림 3), 양성 colony를 선발하였다.

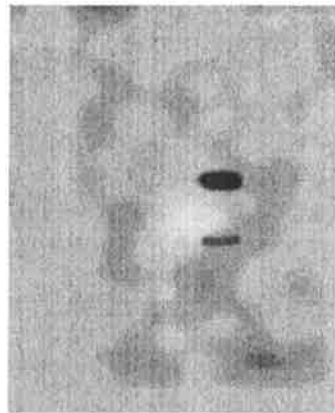
First library screening : Each lane contained total clones of each chromosome.

Chromosome 6 was selected.

cl1 cl2 cl3 cl4 cl5 cl6 cl7 cl8

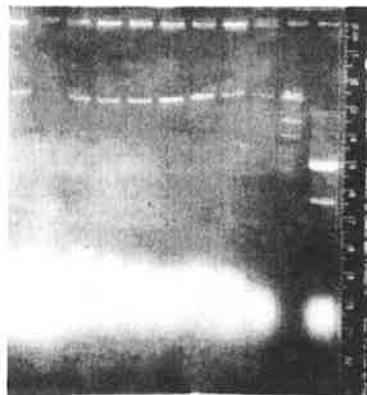


cl1 cl2 cl3 cl4 cl5 cl6 cl7 cl8



Secondary library screening : Each lane contained 12 clones of chromosome 63

A B C D E F G H I M P



A B C D E F G H I M P



Third library screening : chromosome 63 contained each clone

A7 A8 A9 A10 A11 A12 M P



A7 A8 A9 A10 A11 A12 M P

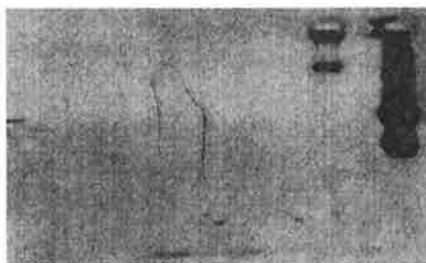


그림 3. *Aspergillus nidulans* genomic library로부터 OrfA clone을 screening하기 위하여 실시한 Southern blot analysis 각 chromosome의 total clone에 대하여 first screening을 실시하였으며, chromosome 6의 library에서 clone을 선발하여 second screening에 사용함.

Genomic library로 부터 선발된 clone을 다양한 제한효소로 처리 후 Southern blot analysis를 실시하여 정확한 유전자의 위치를 확인하였다(그림 4, 그림 5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



A

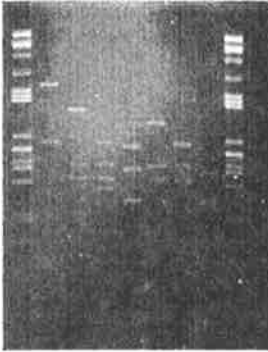
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



B

그림 4. Chromosome 63, A12 clone에 대하여 실시한 전기영동과 Southern hybridization(B) pattern.(Lane 1 : Uncut, Lane 7 : *Kpn* I, Lane 2 : λ *Hind* III size, marker, Lane 8 : *Pst* I, Lane 3 : *Sac* I, Lane 9 : *Bam*H I, Lane 4 : *Xba* I, Lane 10 : *Hind* III, Lane 5 : *Sal* I, Lane 11 : *Sma* I, Lane 6 : *Xho* I)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



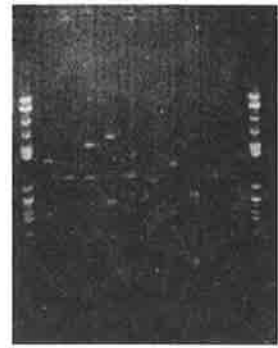
Lane 1 : M
 Lane 2 : *Cla* I
 Lane 3 : *EcoR* I
 Lane 4 : *Pst* I
 Lane 5 : *Xho* I
 Lane 6 : *Cla* I/*EcoR* I
 Lane 7 : *Cla* I/*Xho* I
 Lane 8 : M

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



Lane 1 : M
 Lane 2 : *EcoR* I
 Lane 3 : *Hind* III
 Lane 4 : *Sac* I
 Lane 5 : *Xba* I
 Lane 6 : *EcoR* I/*Hind* III
 Lane 7 : *EcoR* I/*Sac* I
 Lane 8 : *EcoR* I/*Xba* I
 Lane 9 : *Hind* III/*Sac* I
 Lane 10 : *Hind* III/*Xba* I
 Lane 11 : *Sac* I/*Xba* I
 Lane 12 : M

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



Lane 1 : M
 Lane 2 : *Pst* I
 Lane 3 : *Xho* I
 Lane 4 : *EcoR* I/*Pst* I
 Lane 5 : *EcoR* I/*Xho* I
 Lane 6 : *Pst* I/*Xba* I
 Lane 7 : *Kpn* I
 Lane 8 : *Sac* I
 Lane 9 : *Kpn* I/*Sac* I
 Lane 10 : M

그림 5. 다양한 restriction enzyme으로 절단 후 실시한 spBT8.4/*Bam*HI clone 의 전기영동 pattern.

제한효소 절단 및 Southern blot analysis를 통해 제한효소 지도를 작성하였으며(그림 6) 염기서열 분석을 실시하여 유전자의 promoter 부위로 추측되는 부분에 대한 cloning 및 분석 수행에 이용하였다.

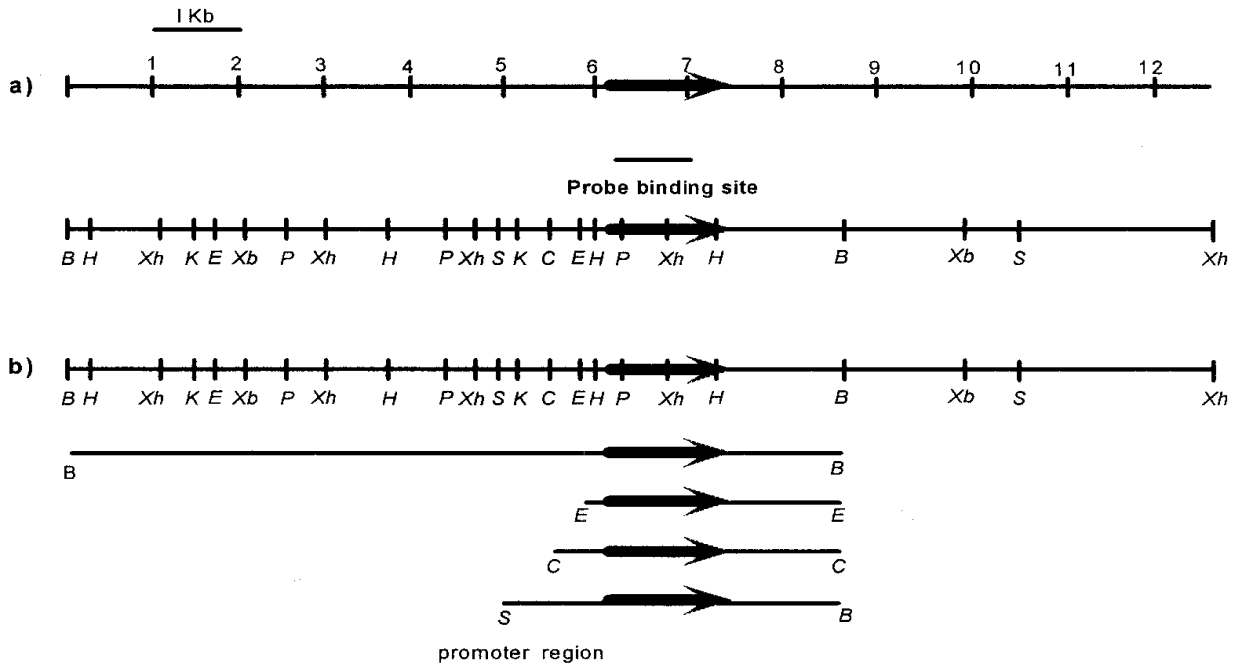


그림 6. *orlA* 유전자의 structural analysis.

- a) Restriction map of chromosome 63A12 clone.
 - b) Subclones for *orlA* promoter; pBT, pET, pCT and pSBT which contained 8.4kb, 3.0kb, 3.4kb and 4.0kb fragment, respectively.
- B: *Bam*H I, H: *Hind* III, Xh: *Xho* I, K: *Kpn* I, E: *Eco*R I, Xb: *Xba* I, P: *Pst* I

2. TPS (Trehalose 6-phosphate synthase) gene의 cloning

TPS (Trehalose 6-phosphate synthase)로 사료되는 유전자를 cloning 하였으며 염기서열 분석을 통해 이를 확인하였다. 다른 생물체의 Trehalose 6-phosphate synthase의 유전자와 비교한 결과는 그림 7 과 같다.

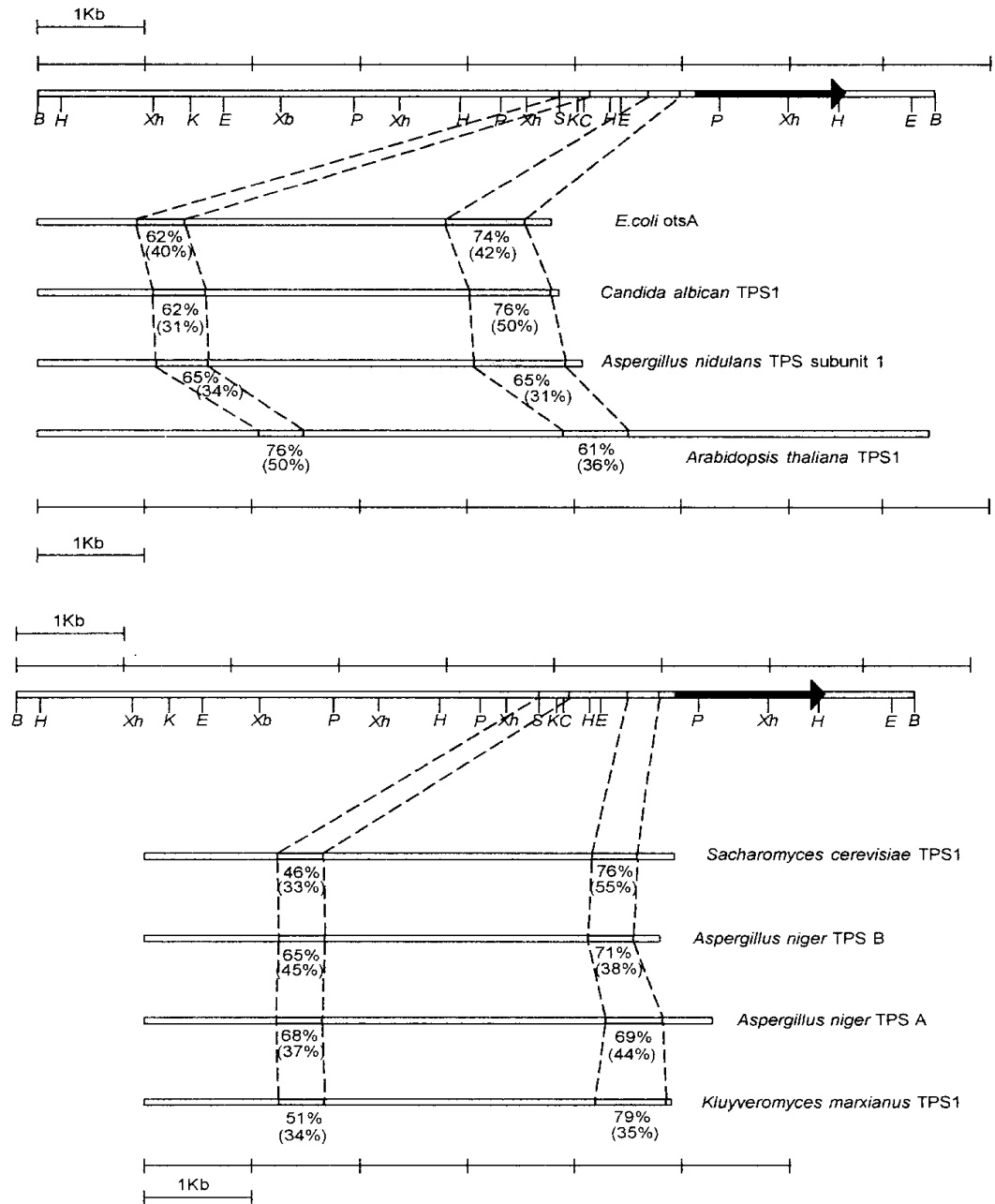


Fig. 7. *Aspergillus nidulans* TPS gene의 homology 비교.

3. Glycerol metabolism related genes의 cloning

glycerol kinase는 이미 분리된 5종류의 유전자의 아미노산 서열을 Clawstral program을 통해 비교하여 상동성을 보이는 부위를 대상으로 *Apergillus*의 codon usage와 비교하여 각각 한 세트와 두 세트의 primer를 제조 하였다(그림 8). 제조된 primer에 의해 예상되는 절편의 크기는 glycerol kinase가 약 900bps, glycerol 3-phosphate dehydrogenase는 각각의 primer조합에 의해 200bps, 480 bps, 580bps가 증폭될 것으로 예상되었다.

Glycerol 3- phosphate dehydrogenase

Sense : 5'-GYACYGCNATYGCNAARAT-3'

5'-CATCARAAYGTSAASTAYCT-3'

Antisense : 5'-ACRCCYTTRTARTARTTYACAT

5'-GCSACSAACSTTYTTASA-3'

Glycerol kinase

Sense : 5'-ACBGTSYGAYACBTGGYSTAT-3'

Antisense : 5'ATRTCNGCYTGKTWYTGCAT-3'

그림 8. Degenerated primer의 염기서열. IUPAC nucleotide code : R(A,G), Y(C,T), M(A,C), K(G,T), S(G,C), W(A,T), H(A,T,C), B(G,T,C), D(G,A,T), N(A,CG,T)

제조된 primer를 이용하여 *A. nidulans*의 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하여. Glycerol kinase와 glycerol 3-phosphate dehydrogenase 모두 예상되는 크기의 절편을 증폭하고 cloning하였다. 다만 glycerol 3-phosphate dehydrogenase의 경우 GPDHP1s와 GPDH4a 만이 효과적으로 증폭됨을 알 수 있었다(그림 9).

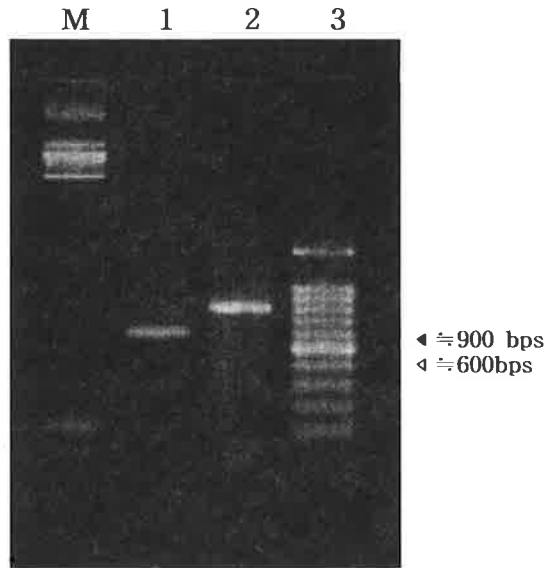


그림 9. *A. nidulans* genomic DNA로부터 PCR로 증폭한 amplified fragments.(◀ is denotes glycerol 3-phosphate dehydrogenase and ◀ is denotes glycerol kinase. Lanes: M, 123 ladder size marker; 1, 2 PCR products of glycerol kinase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase, respectry; 3, 100 base ladder.)

4. Or1A (Trehalose-6-phosphate phosphatase) gene Analysis

Cloning된 유전자 중 or1A (Trehalose-6-phosphate phosphatase) gene에 대한 분석을 집중적으로 수행하였다. 이 유전자의 조작을 통해 높은 삼투환경에서 세포가 내성을 가질 수 있는지 여부를 관찰하고, 가능성이 확인될 경우 인삼에 probe로 사용하거나 혹은 외래 유전자로 도입하고자 하였다.

가. Sequence analysis of OrlA(Trehalose-6-phosphate phosphatase) gene

자세한 염기서열 분석을 위하여 serial deletion을 실시하였으며 그림 10 같이 순차적으로 deletion된 절편을 얻었으며 이로부터 염기서열 분석을 실시하여 그림 12와 같은 결과를 얻었다.

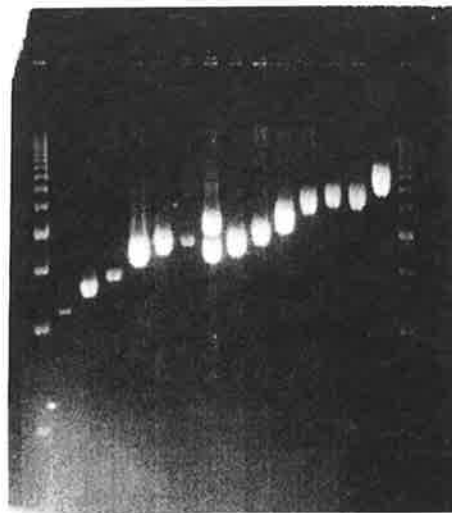


그림 10. OrlA 유전자를 포함하는 것으로 생각되는 절편을 deletion을 실시한 후 얻어진 전기영동 pattern.

그림 10에서와 같이 얻어진 deletion fragment들에 대해 염기서열 분석을 실시하였으며 염기서열 분석이 수행된 위치는 그림 11에서와 같다. 염기서열 분석은 Perkin Elmer Big dye terminator kit을 이용하여 PCR 9600(Perkin Elmer)에서 반응을 하였으며, ABI prism 377 Automatic sequencer를 이용하여 분석하였다.

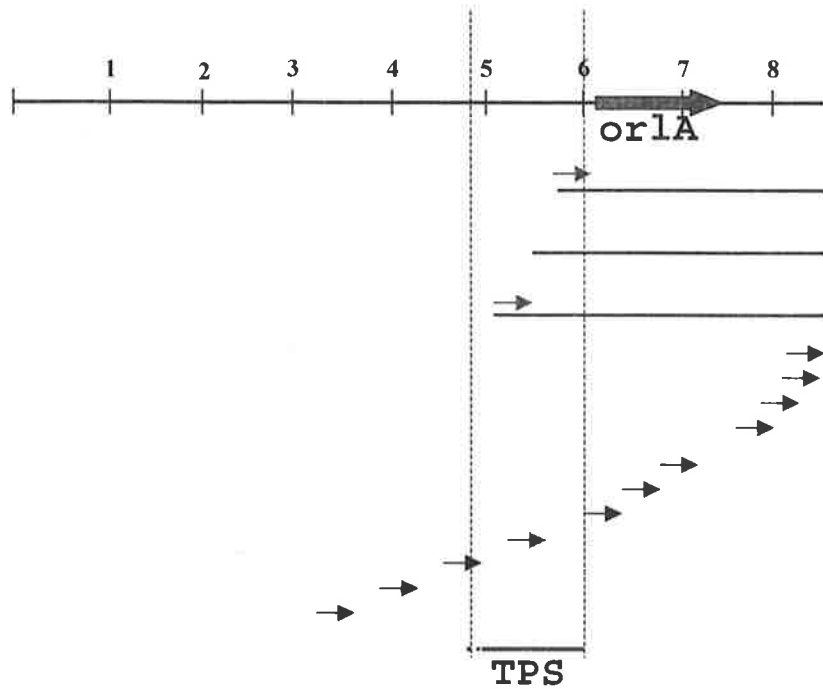


그림 11. OrIA(trehalose-6-phosphate phosphatase)gene의 염기서열분석을 위한 serial deletion (→:염기서열 분석을 완료한 부분).

TCTTC	CCCAA	AGCCA	CGCTT	AGACA	TCACG	AATTA	CGCCG	TCATC	CATTA
TTACT	AACTT	GTGCA	TTGCC	TTGAT	TGCAA	GCGGA	AGGTT	CCTTT	AGCAT
GATGT	ATTTC	AATTT	CTTTT	AGTCC	TCGGT	CCGGC	TCCAC	TTTTC	AGTGA
CTTTC	TTGAC	TGTGT	CGACT	TNGAC	TTTCC	NTACG	TCGAT	CACCC	GCTTG
ACCCC	AACCC	TCTTG	GTCGT	TCCTA	CTTTG	TTCGA	AGCCC	CCGAA	GAAAG
TGGAT	TTAGC	TTTCT	GGCTA	TCGCA	AGCAT	AACAT	CATCC	CTGCT	CGTGG
TGAAT	CACTG	TCAGC	TTCTC	CCAAG	TCTTT	CAACC	GTTTC	GTTGA	ACCGG
TCTTC	TTCAC	CGCCC	CGTTG	CCCCT	CCGAT	AACCA	TCGTA	CCCTT	GGCCC
CCCAA	GGATC	AACCT	CGCAG	CACTT	TGCTT	TTACT	TATCA	CATTG	ACCTT
TCCTG	CACGC	TGCAT	GGCCT	AGCCT	GCCAT	CATTT	TTAGC	TGTTC	CACTA
CCTCA	GCTTC	CTCAG	TCCGG	AGCAG	TCGTC	CTGCT	CGGTG	TGTAC	TATTT

CAGAA TACAA AACCG GATGA TGAAC ACTAA TACTT GTTAC GATCT TAAGG
 ACAA AGCCA TTACA CTTAT CCTAC CTCCT TCTCT CGAGC CTGCT CCCAA
 GCACT CTTTA GCTCG TTCGC CCACT ATGTC TCTAC AGCAA GACCC TTCCA
 AGCCT GATGG GAGGC CAGGA GAGGT CCGAT TCGAT TCCTT CACTG ACGCT
 TCCGC TCCAA ATGGC TCATC GAACT TTAAC AATGC CTCAA AGACC GCGTC
 CGCTC TATCA GAAGC CGATA AAGGC ACCCA ATCAG GGAGC GATTT GCTGC
 ATCGC CTGAG CTTAA AGGAG ATTCT CACAA TCGCA GCACC CGATT TCCAG
 AAGCA GTATC AGGGC TTGAA CCTTT CTGGT CGTAT CATCA GTGCT GCTTT
 CTGTA TCCCA CATAA GTTAT ACTTC CGGGC TGGCC GTGAT TGGGT ATGAA
 ATTCC GCGTC ATCAA AGATA AAATG ATTAG CTCTA ACCTA CGGCT GTGTA
 GGAGT TGAAA CCTCG GCCTG GATCT TCTGC TTTGT TCGAT TCATT TGCAT
 ATTTA GCCTC CGAGA AATCG GGCTG GAGTC ATACA CTTGT CGGGT GGACC
 GGTGA AGTGG AACCA CTCAA CGAGG GGAGC AATCC CTTGC AGGCA CTTAA
 CTCCA ATGCG AATAC AACT TGCCT GCAGC TCTTG ACAAC ACTTC GCGAT
 CTCTT AGTAA AGGAT CAGCT CCTGT GGTAC CCGAT ATAAG TTTGC TGCAA
 TCAAA TAGTT CCGTT GCAGA AACCT CGACT GTGGG ACCTG ATGAT CGGAA
 AAGGT TGGAG GATCA ATTGA GTTCA AGTCG CCACG GCAAG GTTGT TCCAG
 TATGG CTGTC AGATG AATCC GACGT GCCCG AGGAC ACAAT AATTC TTGGG
 GATCA AAGCA GATGG AGGCG CTATG CGGAG AAAGA GCTCT ATGCT CTTCT
 GCACT ATAAA AAAAT GGACC AACTG ACGGC AGGTT CGAGC GCGAT TCTTG
 GACAG ACTAC GTGAG AATGA ACCAG CTCTT TGCAG AGCGT ATTCT CCAGG
 AATAC AAGGA GGGGG ATATT GTTTG GATTC ATGAT TACCA CTTAT TTTTG
 CTCCC AAGCA TTCTG CGGCA GCATG TTCCG AATAT CTACA TTGGT TTCTA
 TCTGC ACT

그림 12. Or1A gene의 nucleotide sequence.

얻어진 염기서열은 amino acid sequence로 번역하여 이미 trehalose-6-phosphate phosphatase가 분석된 기타 생물체와 비교하였다. 그 결과 완전한 or1A gene을 cloning하였음을 확인하였다. 한편

orlA 유전자가 포함된 절편의 앞부분에는 TPS(trehalose-6- phosphate synthase)로 생각되는 부분을 포함하고 있었으며 이 부분 또한 아미노산 서열을 다른 생물체와 비교한 결과 매우 유사함을 확인할 수 있었다(그림 13).

541	555 556	570 571	585 586	600
1. GFHTYDYARHFLSAV	QRIL-NVNTLPNGVE	FDGRFVNVGAFPIGI	DVETFFTEGLKQDA-V	
2. GFHTYDYARHFLSAV	QRIL-NVNTLPNGVE	FDGRFVNVGAFPIGI	DVETFFTEGLKQDA-V	
3. GFHTYDYARHF	ISSV SRIVPNVSTLPNGIK	YQGRSISIGAFPIGI	DVDNFIDGLKKDS-V	
4. GFHTYDYTRHF	LSAC SRL-GLTTTPNGIE	FQGKIIACGAFPIGI	DPEKFEEGLKKEK-V	
5. GFHTYDYARHF	LSCC SHIL-GLVTPSSVK	FKDRSVAVGAFPIGI	DPDKFTEGLKSPK-V	
6. GFHTYDYARHF	LSAC SRIL-NLSTLPNGVE	YNGQMVSVGTFFPIGI	DPEKFSALKSDV-V	
7. GFQTENDRLA	FLDCL SNLTRVTTRS	AKSHT AWGKAFRTEVYPIGI	EPKEIAKQAAGP--L	
8. GFQTREYARH	FLQTS NRLLMADV	VHDEELK YNGRVSVRFT	PVGI DAFDLQSQLKDGS-V	
9. GFQTFSYFCH	FSSCC TRVL-GFESDS	SAGVD AYGAHVAVDV	FPPIGI DAEAIQKIAFENADT	

601	615 616	630 631	645 646	660
1 IKRIKELKESFKGCK	IIIGVDRLDYIKGVP.	QKLHALEVFLGAHPE	WIGKVVLVQVAVPSR	
2 IKRIKELKESFKGCK	IIIGVDRLDYIKGVP.	QKLHALEVFLGAHPE	WIGKVVLVQVAVPSR	
3 VERIKQLKSKFKDVK	VIVGVDRLDYIKGVP.	QKLHAFEVFLNENPE	WIGKVVLVQVAVPSR	
4 QKRIAMLEQKFQGVK	LMVGVDRLDYIKGVP.	QKLHALEVFLSDHPE	WVGKVVLVQVAVPSR	
5 QNRIASLENKFQGTK	LMVSDRLDYIKGIP.	QKLHALEVFLSQHPE	WVGKVVLVQVAVPSR	
6 KDIRSIERRLQGVK	VIVGVDRLDYIKGVP.	QKFHAFEVFLEQYPE	WVGKVVLVQVAVPSR	
7 PPKLAQLKAELKNVQ	NIFSVERLDYSKGLP.	ERFLAYEALLEKYPQ	HHGKIRYQTQIAPTSR	
8 MQWRQLIRERWQGKK	LIVCRDQFDRIRGIH.	KLLAYEKFLVENPE	YVEKSTLIQICIGSS	
9 EKAVEGLRQLYAGKK	IIVGRDRLDSARGVA.	PEAQLRDVPSNDLNA	QSYYYIDSVER---	

661	675 676	690 691	705 706 720
1 GDVEEYQYLR	SVVNE LVGRINGQFGTAEFV	PIHFMHRSIPFQELI	SLYAVSDVCLVSSTR
2 GDVEEYQYLR	SVVNE LVGRINGQFGTAEFV	PIHFMHRSIPFQELI	SLYAVSDVCLVSSTR

```

3 GDVEEYQSLRSTVSE LVGRINGEFGTVEFV PIHYLHKSIPFDELI SLYNISDVCLVSSTR
4 QDVEEYQNLRAVVNE LVGRINGKFGTVEFM PIHFLHKSIVNFDELI ALYAVSDACIVSSTR
5 QDVEEYQNLRAVVNE LVGRINGKFGTVDYM PIHFMHKSIVSFDELI ALYAASDACVVSSTR
6 QDVEEYQNLRAVVNE LVGRINGRFGTVEYT PIHFLHKSIVRFEELV ALYNVSDVCLITSTR
7 GDVQAYQDIRHQLEN EAGRINGKYGQLGWT PLYYLNQHFDRKLLM KIFRYSDVGLVTPLR
8 KDVELERQIMIVVDR IN---SLSTNISISQ PVVFLHQDLDFSQYL ALSSEADLFVVSSLR
9 -----

```

그림 13. OrlA 유전자를 포함한 절편의 앞부분을 다른 생물체의 trehalose-6-phosphate synthase의 아미노산 서열과 비교한 결과. (1:*Kluyveromyces lactis*, 2:*Kluyveromyces lactis* TPS1,3:*Candida albicans*, 4:*Aspergillus niger* TPSA, 5: *A.niger* TPSB, 6:*Schizoasccaromyces pombe* TPS1, 7:*Escherichia coli*, 8:*Saccaromyces cerevisiae*, 9: 990120-#10_frame+2).

나. OrlA (Trehalose-6-phosphate phosphatase) gene 의 promoter 선 발 및 발현조사

OrlA gene과 dehydration stress와의 관련성은 differential display를 통해 발견한 점과 Northern blot 을통해 확인하였으나 발현단계에서 보다 직접적인 관련성을 확인하기 위하여 *Aspergillus nidulans* 내에서 발현시켜 보고자하였다. 또한 promoter 부위와 structural gene부위를 분명히 밝혀 인삼에 도입할 경우 이용이 편리하도록 연구를 수행하였다. Promoter 부위를 찾기위해 analysis 용 vector를 construction하였으며 reporter로는 GFP (green fluoresecence protein)를 사용하였고, 그 모식도는 그림 14와 같다.

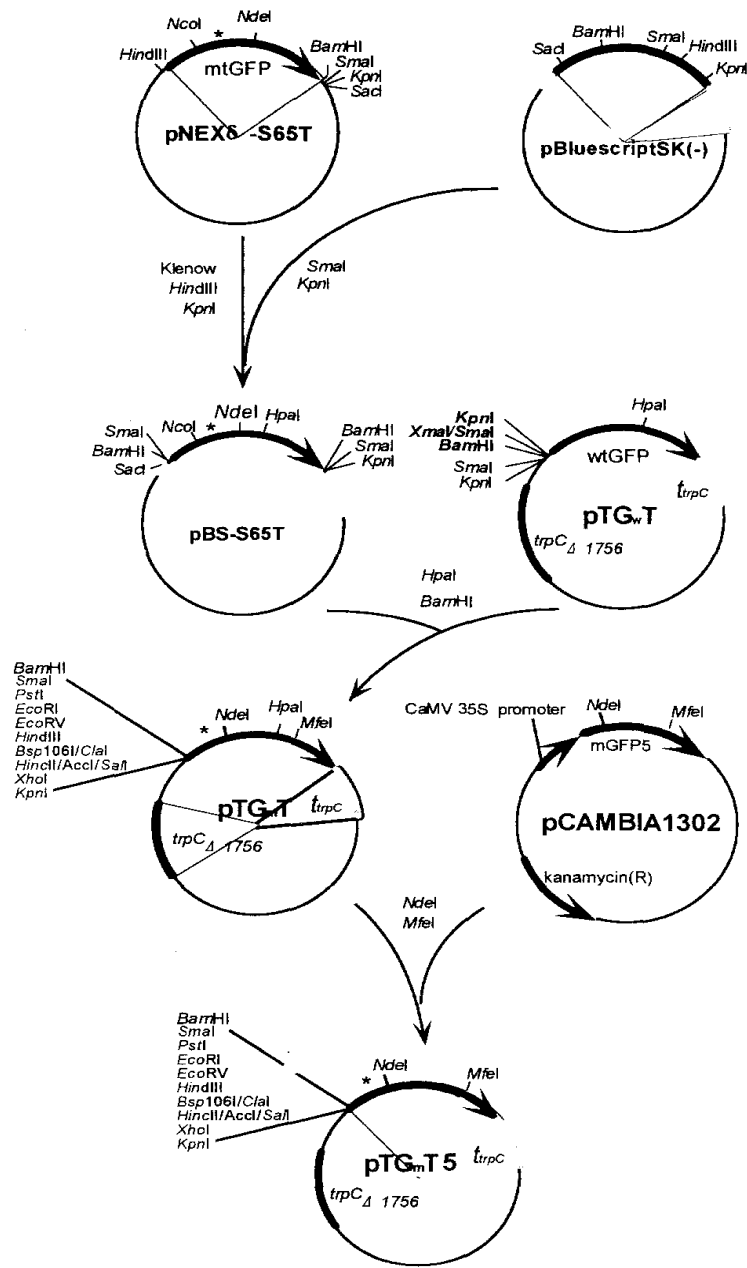
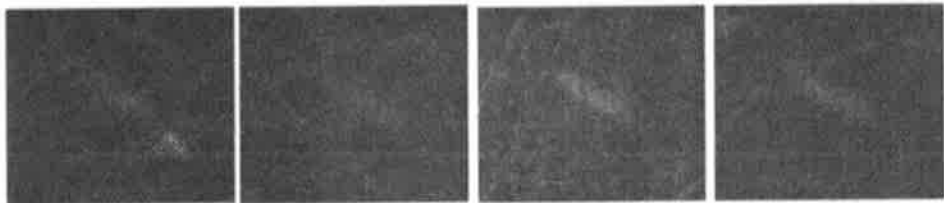
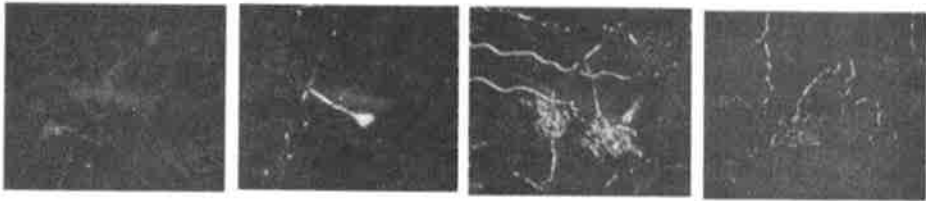


그림 14. Construction of promoter analysis vector.

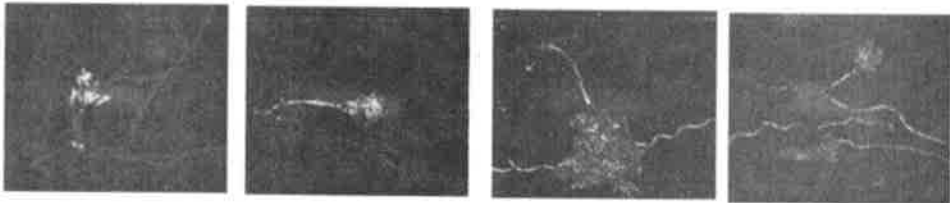
이와 같이 얻어진 promoter vector는 *Aspergillus nidulans* 에 transformation하여 confocal microsystem을 이용하여 GFP 발현에 따른 510nm의 elumination 파장을 관찰하였다. 그 결과 NaCl 농도의 증가에 따라 300bp이상의 부위를 포함하는 경우에 형광량이 증가하는 것을 확인하여 이 부위가 유전자 발현 조절에 역할을 하고 있음을 확인하였다(그림 15). 또한 promoter의 길이에 따라 발현량과 반응이 개시되는 NaCl의 농도가 다른 것을 관찰할 수 있었다. 이와같은 결과는 orlA 유전자가 dehydration stress와 밀접한 관련이 있음을 의미하는 것이다.



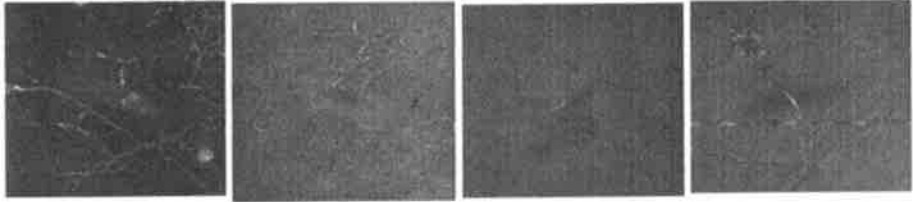
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
Host Control	Host Control	Host Control	Host Control
Overlay image	Overlay image	Overlay image	Overlay image
0M NaCl media	0.5M NaCl media	1.5M NaCl media	2.0M NaCl media



<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
P1200	P1200	P1200	P1200
Transformant	Transformant	Transformant	Transformant
Overlay image	Overlay image	Overlay image	Overlay image
0M NaCl media	0.5M NaCl media	1.5M NaCl media	2.0M NaCl media



<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
P600	P600	P600	P600
Transformant	Transformant	Transformant	Transformant
Overlay image	Overlay image	Overlay image	Overlay image
0M NaCl media	0.5M NaCl media	1.5M NaCl media	2.0M NaCl media



<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>nidulans</i>	<i>nidulans</i>	<i>nidulans</i>	<i>nidulans</i>
P300	P300	P300	P300
Transformant	Transformant	Transformant	Transformant
Overlay image	Overlay image	Overlay image	Overlay image
0M NaCl media	0.5M NaCl media	1.5M NaCl media	2.0M NaCl media

그림 15. GFP를 reporter로 이용한 OrfA gene promoter 부위의 발현조건 분석 (P1200, P600, P300 : start codon으로부터 -1200, -600, -300 부위를 포함하는 fragment).

제 3 장 Dehydration stress에 의해 유도되는 유전자 탐색 및 유전자 조작을 통한 인삼의 가뭄내성 형질전환체 개발

제 1 절 서설

생물체의 생존에 있어서 외부 환경을 인식하고 생존에 필요한 적절한 반응을 하는 것은 필수적이며 특히 고착생활을 하는 식물의 경우는 생존 및 생장에 적합한 환경을 선택할 수 없기 때문에 환경조건의 변화에 따른 적절한 적응 및 신속한 반응 능력이 대단히 잘 발달해 있을 것으로 기대되고 있다. 물은 모든 생물체의 80% 이상을 차지하고 있는 중요한 생체 구성성분으로서 생물체가 속한 환경 중에서도 특히 물과 관련된 생물체의 반응은 대단히 중요한 연구과제 중의 하나이다. 식물은 물부족으로 발생하는 가뭄피해에 대하여 민감한 반응을 나타내고 있으며, 물에 대한 생물체의 반응에 대한 연구는 기초과학으로서의 학문적 관심은 물론이고 농업 생산성 향상을 위한 중요한 관심사라 할 수 있다.

세포막을 통하여 환경의 변화라는 제1차 신호는 세포내 2차 신호로 전달되는 일련의 생화학적 연쇄반응들을 통해 유전자 발현등을 조절하게 되고 환경변화에 적응하기 위한 생리적, 생화학적 변화를 유도하게 된다. 최근에 생화학 및 분자생물학의 눈부신 발전에 따라 온도변화와 같은 일부 환경변화에 대한 생물체의 반응에 관한 많은 연구가 수행되

었다. 특히 bacteria 및 yeast의 경우에는 이들 환경 변화에 따른 유전자의 발현 조건 및 조절 기작등에 대하여도 상당히 많은 연구가 진척되었으며 온도 변화에 반응하여 유도된 유전자 및 단백질등이 온도 뿐 아니라 중금속, 탈수, 유기화합물등에 노출된 환경에서도 작용하는 다기능 유전자 (Multi-function gene)으로서 작용한다는 결과도 보고되었다. 그러나 물과 관련된 환경변화 및 스트레스에 대한 생리·생화학적 연구 및 유전자기능 연구는 부분적으로 yeast 및 bacteria등 하등한 생물체에서 연구된 바 있으나 고등식물에서는 거의 전무한 실정이다.

가뭄이나 삼투압 변화에 의한 탈수(dehydration) 현상은 원형질막 안과 밖의 삼투압의 차(osmotic gradient)가 붕괴 되어 일어나는데, 이 결과로 생물체는 세포 생장의 감소, non-isotropic shrinkage, 세포내 독성 용질 유입 및 농도 증가, 세포내 구성물질의 유실 등이 일어나게 되어 궁극적으로 생존이 불가능한 상태에 놓이게 된다. 이러한 환경의 변화에 대응하여 생물체는 세포내 삼투압을 높여서 탈수를 막기 위하여 glycerol, arabitol 등의 poly alcohol들을 생합성하며 세포내에 유입된 독성 용질을 세포외로 배출하기 위하여 active transport와 관련된 유전자들을 작동하여 세포내 물질을 보호하고 회복하는데 필요한 단백질등을 합성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 일련의 반응들이 적절히 일어나기 위하여는 외부의 환경변화라는 신호를 세포내로 전달하고 유전자의 발현 및 단백질의 변화를 유도하는 신호전달 체계가 필요한데 최근의 많은 연구에도 불구하고 protein kinase들과 관련된 신호전달 체계가 이에 관여한다는 사실이 밝혀진 바 있을 뿐 자세한 기작이나 고등생물체 특히 식물등에서는 거의 이해되고 있지 못하다.

본 연구에서는 가뭄과 밀접한 관계가 있는 dehydration stress에 의하여 식물체에서 발현이 유도되거나 발현량이 현저히 증가하는 유전자를 분리, 확보하고 유전자 자체와 promoter등의 구조 및 기능을 분석함으로써 식물이 어떤 기작을 통해 dehydration stress를 인식하고 유전자의 발현 유도 및 변화에 필요한 신호를 전달하는지에 대한 연구를 수행 하고자 한다. 또한 bacteria나 yeast에 비해 고등한 eukaryote이며 식물에 비해서는 비교적 많은 연구가 수행된 *Aspergillus nidulans*로부터 dehydration 스트레스 내성 관련 유전자를 선별하는 연구를 협동연구과제로 수행함으로써 식물의 가뭄내성을 증진 시키는데 필요한 mechanism을 연구하고 외부유래의 dehydration 내성관련 구조 유전자 부분 및 promoter 부분등을 식물 유전자와 조합하여 식물에 직접 도입함으로써 궁극적으로 가뭄내성의 식물체를 개발하는 연구를 수행 하고자 하였다.

환경 스트레스에 대한 생물체의 반응이나 developmental, differential stage에 따라 다르게 발현하는 유전자를 찾기위하여 사용되는 방법으로는 일반적으로 subtractive hybridization 혹은 two-dimensional electrophoresis에 의한 mRNA의 fingerprinting technique이 사용되지만 최근에 보다 효과적인 방법으로 differential display(Liang, P and Pardee, A.B. ,1992)가 주목 받고 있다. 이 방법은 total RNA로부터 mRNA의 추출 없이 PCR을 이용하여 매우 신속하고 정확하게 유전자 발현의 변화를 구분할 수 있는 방법으로서 Patrick J. Donahue등 (1995)이 murine NIH 3T3 fibroblast에서 fibroblast growth factor-1에 의해 유도되는 유전자를 밝히는데 사용한 바 있다. 이 기술은 1992년에 시도되기 시작하여 1995년경에 그 유용성이 확립된 최신의 기술이며 현재에는 유전자 발현 연구에서 가장 유

용한 기술로 생각되고 있다. 본 연구에서도 인삼에 적합한 differential display technique을 확립하고 인삼이 dehydration stress에 대해 적응하기 위하여 발현하는 가뭄 내성 유전자를 탐색하기 위하여 이 기술을 적용하였다.

생물공학 기술은 최근차세대 농업 육성 및 의료 복지등 미래산업의 핵심 기술로 부각되고 있고 물질특허, UR, 등 생물자원이 산업무기화되는 경향으로 인해 선진각국의 기술개발 노력 및 기술 보호 강화 추세가 지속되고 있어 국내에서도 이에 대한 대책마련에 부심하는 시점에서국내 유용 유전자원의 확보 차원에서도 본 연구는 대단히 중요한 가치를 갖는다고 사료된다.유전자원의 확보 뿐만 아니라 본 연구에서 수행되어질 유전자 재조합 기술, 환경 스트레스에 의해 유도되는 유전자의 탐색 및 cloning 기술, 신호전달 체계 연구 기술등은 본 연구 이외의 다른 생명공학산업 전반에도 반드시 필요하며 외국에서 도입이 불가능한 기술인 바, 본 연구를 통한 이들 기술의 Know-How 축적은 국내 생명공학분야에 매우 커다란 기여를 할 것으로 기대된다.

최근 UR, GR등에 따라 농업자원의 보호 및 경쟁력 강화가 국가적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 바, 생산비 절감 및 고부가가치 농작물의 개발이 요구되고 있다. 인공 관개 시설의 발달에도 불구하고 가뭄등 물과 관련한 자연재해와 농수 공급에 필요한 비용은 아직도 농업 생산성에 중대한 영향을 미치고 있다. 따라서 수분관리를 위하여 인삼경작에서는 부토 재배법을 이용하고 있는 실정이다. 본 한국인삼연초연구원의 연구결과에 의하면 인삼의 경우 생육초기인 5~6월경에 강수량이 100mm이하이거나 무강수일이 15일 이상 유지될 경우 생장이 불량할 뿐만 아니라 황병등 병 발생률이 높아자는데 실제로 92년에는 이 시기에 50mm내외의 강수량만 기록하여 심각한 피해가

발생한 바 있다. 또한 생육 중기 (7월 초순 ~ 8월 초순)에 발생하는 가뭄의 피해는 더욱 심각한데, 실례로 1994년 7월 중 강수량이 평년 대비 25%로 현저히 적었으며 무강수일이 장기지속됨에 따라 가뭄 피해가 더욱 극심하였던 바 있다.

한편 가뭄 피해 포장 토양의 전기전도도가 0.2mmhos 이상으로 나타나 강수량 이외에도 인공 비료등의 무분별한 사용등에 의한 토양내 염류 농도의 증가가 인삼의 가뭄에 의한 피해를 가중시키는 중요 요인으로 보고되고 있다.

이 시기의 가뭄으로 인해 발생한 인삼의 피해는 인삼뿌리의 생체중을 기준으로 볼 때 최소 10.5% (6년근의 경우)에서 최대 50% (묘삼의 경우)의 생산량 감소피해가 나타난 것으로 보고되고 있다. 따라서 인삼의 가뭄 내성 관련 유전자를 탐색하고 외부의 물 부족환경에 반응하여 유도되는 유전자의 발현 기작 연구 및 신호전달 체계에 대한 연구를 수행은 경제적 산업적으로 중요한 가치가 있다고 사료된다.

또한 인삼 종주국으로서 인삼으로 부터 유용 유전자원을 확보하고 신기술의 개발을 수행한다는 것이 한국인으로서의 자긍심을 고취시킬 수 있다는 점이 사회·문화적 중요성이 있으며, 현재 국제적으로 각광받고 있는 첨단 생명공학 기술을 이용하여 인삼의 유전적, 생리·생화학적 연구를 수행한다는 점에서 인삼 종주국으로서 한국의 위상을 대내외적으로 고취하는데 의미가 있을 것으로 사료된다.

제2절 Dehydration stress 내성 인삼 세포주의 선발

가뭄내성에 관한 연구는 분자수준, 세포수준, 기관수준 및 whole plant등 여러 가지 다른 수준에서 수행되고 있으며, 본 실험에서 dehydration유도 조건에서 발현되는 유전자의 확보 및 cloning을 수행하기 위해 첫 단계로서 dehydration 스트레스 유발 조건으로 NaCl을 사용하여 인삼세포주를 NaCl 고체배지에서 배양하여 osmotic pressure에 내성의 인삼 세포주를 선발하였던 바, 1) 인삼세포는 매우 빠르게 고체배지상에 수분을 분비하였으며, 2) 인삼의 정상세포들은 NaCl의 농도가 0.05M인 낮은 농도에서 생장이 가능하였으며, 0.05M의 농도차이를 가지고 NaCl에 적응되고 있다. 그러나 고 농도의 NaCl (0.2M-0.7M)에서 배양된 인삼세포는 정상 배지에서의 viability를 상실하였다.

1) 인삼세포의 수분 감소현상.

스트레스 비 유발성 인삼세포주를 NaCl 농도별로 치상한 후에 인삼세포로부터 수분분비 현상을 조사하였던 바, 그림 16과 같았다. 인삼세포를 배지에 치상한 후에 0.05M의 NaCl을 제외한 모든 NaCl농도에서 2분후 수분을 분비하였으며, 이 결과로 정상적인 인삼세포가 NaCl, 즉 삼투압에 적응하는 최저 농도가 0.05M임을 알 수 있었다.

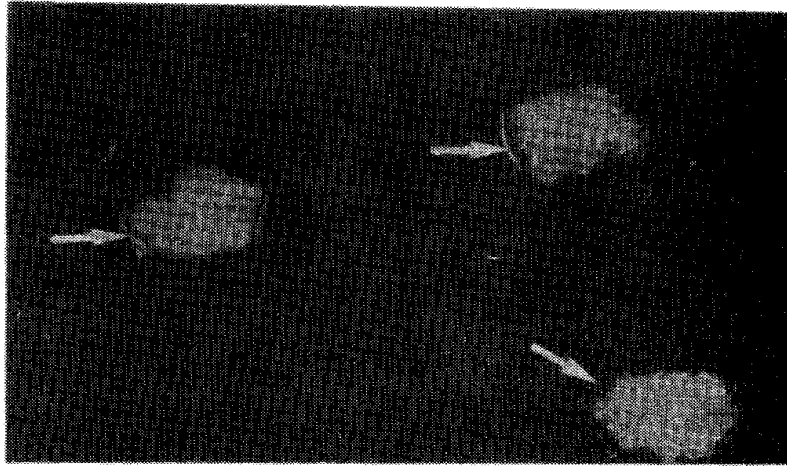


그림 16. 0.2M NaCl 배지상에서 배양한 인삼 세포의 수분 분비

2) NaCl 농도별 인삼세포주의 선발

정상의 인삼세포주(KGC 13)중 17 세포주들을 NaCl 농도별로 60일간 배양한 후에 성장여부를 조사하였던 바, 표 1에서와 같은 결과를 얻었다. 모든 인삼세포들이 0.05M의 NaCl농도에서는 수분을 분비하지 않았을 뿐만 아니라 세포 성장도 매우 양호하였으나, 0.1M의 NaCl 농도에서는 성장 형태가 다양하였다. 0.1M의 NaCl 농도에서 선발된 인삼 세포주들은 그림 2에서와 같이 성장 및 세포의 색깔등이 다양하였다.

인삼세포주의 NaCl 농도 0.05M에서 증식 선발되는 기간은 12주가 걸렸으며, 이 세포주들은 세포증식 단계를 거쳐서 1) 인삼세포의 최대 내성을 갖는 NaCl 농도를 결정하고, 2) dehydration 유도 조건에서 발현되는 유전자의 확보 및 cloning을 수행하는데 사용하였다.

표 1. NaCl의 농도에 따라 저항성을 갖는 인삼세포주의 선발; The first adaptation of ginseng cells cultured for 60 days on MS-basal medium containing 2 mg/L of p-CPA for the control and 2 mg/L of p-CPA plus NaCl for the selection

Strain	Plate Number	NaCl concentration (M)								
		control	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
KGV 123	1	+++++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	2	+++++	+++	++*	-	-	-	-	-	-
	3	+++++	++	++*	-	-	-	-	-	-
	4	+++++	++	+	-	-	-	-	-	-
	5	+++++	++	++	-	-	-	-	-	-
	6	+++++	++	++	-	-	-	-	-	-
	7	+++++	++	++	-	-	-	-	-	-
	8	+++++	++	+	-	-	-	-	-	-
	9	+++++	++	+(red)	-	-	-	-	-	-
	10	+++++	++	++	-	-	-	-	-	-
	11	+++++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	12	+++++	+++	++*	-	-	-	-	-	-
	13	+++++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	15	+++++	++++	++	-	-	-	-	-	-
	16	+++++	++	+	-	-	-	-	-	-
	17	+++++	++	+	-	-	-	-	-	-

+++++; Normal growth, ++++; Good growth and higher resistance, +++; Good growth, ++, +; Lower growth and a little resistance, -; Secretion of water from cells and stop the growth and color changed.

* The cells secondly subcultured on 0.1M NaCl plate(1998/3/16).

*# 2, 3, 11, 12 and 16 cells were subcultured.

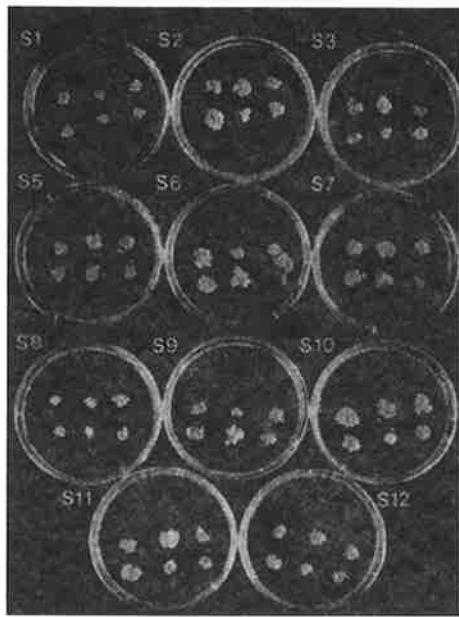


그림 17. p-CPA 및 0.1M NaCl을 포함한 MS-basal medium 에서 NaCl에 저항성을 갖는 인삼 세포주의 선발.

3) 스트레스 비 유발조건과 0.05M NaCl농도에서 정상의 인삼세포의 생장을 조사

가뭇내성 세포주를 선발하고 이용하기위해 세포의 생장을 조사함은 매우 중요한 생리적 현상을 보여주는 결과로서 표 2에서는 정상적인 인삼세포를 NaCl농도(0.15M, 0.2M, 0.25M과 0.3M) 별로 30일간 배양 후 세포의 생체중을 조사 하였다. Inoculum size를 4 mg/callus로하여 인삼세포를 무처리구와 0.15M 이상의 NaCl농도의 고체 배지에 치상하고 30일동안 배양한 후에 측정 한 인삼세포의 생체중은 NaCl농도에

따라서 3.6-2.2mg/callus로 대조구보다 4.5-7.4배나 감소하였으며, 최초의 inoculum size보다도 감소하였다 (표 2).

표 2. 다양한 NaCl농도에서 30일동안 배양한 인삼 callus의 성장

Concentration (M)	Fresh weight (mg/callus)
0(6)	16.3
0.15(6)	3.6
0.20(5)	3.2
0.25(5)	3.2
0.30(6)	2.2

() The number of callus measuring the fresh weight.

0.05M의 NaCl농도에서 배양시간 별 성장을 조사하였던 바, 표 3과 같이 초기 6일동안 생체중이 감소하다가 증가하기 시작하였으며, 생장율이 급격히 증가하지는 않았다. 이 기간이 adapation되는 기간으로 사료된다.

표 3. 0.05M of NaCl에 적응된 인삼세포주의 성장

Growth of Ginseng Cell(FW mg/callus)	
Culture Time(days)	0(10) 2(10) 6(10) 10(10) 15(10) 20(10) 30(10)
Control	4.41 4.41 6.52 4.85 5.19 6.50 9.70
0.05M NaCl	3.94 3.64 3.30 3.75 3.73 3.98 4.28

(); Number of callus measuring the fresh weight

4) 고 농도의 NaCl에서 배양한 인삼세포의 Viability 조사

고 농도(0.2M-0.7M)에서 배양한 인삼세포는 표 2에서와 같이 생체 중이 증가 하지 않았으며, 이 세포들을 정상 배지에 옮긴 후에 세포생장을 관찰하였던 바, 그림 18과 같이 세포생장이 전혀 나타나지 않았다. Osmotic pressure에 의하여 원형질 분리가 일어난 후 정상조건에서 다시 원상회복되는 현상과는 다른 것으로 사료된다.

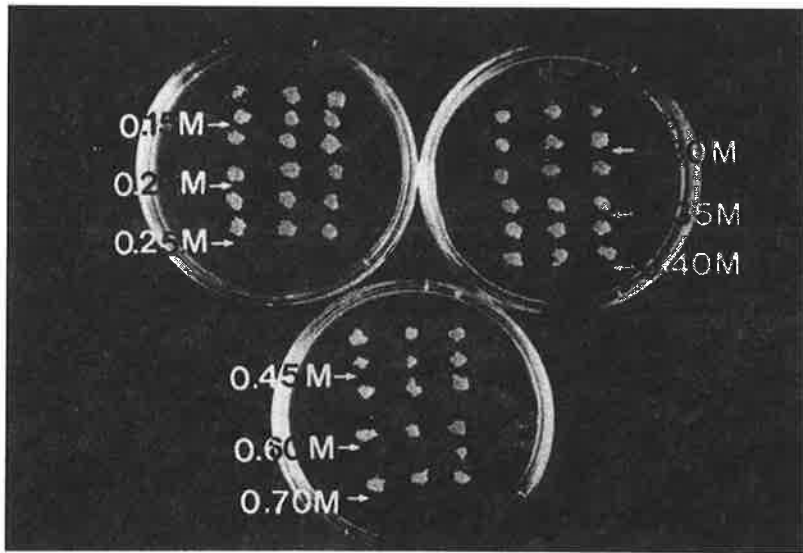


그림 18. 고농도(0.2M to 0.7M)의 NaCl에서 배양한 인삼세포의 Viability 조사.

5) NaCl 농도 증가에 의한 인삼세포의 생장

0.1M의 NaCl농도에서 선별된 세포를 2차 계대배양시 0.2M의 농도에 배양후 생장을 조사하였던 바 그림 19와 같았다. 인삼세포의 NaCl에 대한 최초 adaptation concentration은 0.05M로서 0.1M의 NaCl 농도에서 선발된 인삼세포도 0.2M의 NaCl 농도에서는 생장하지 않았다. 인삼세포의 가뭄 또는 염류 내성인자는 점진적인 스트레스 농도가 증가하므로써 획득되는 것으로 사료된다.

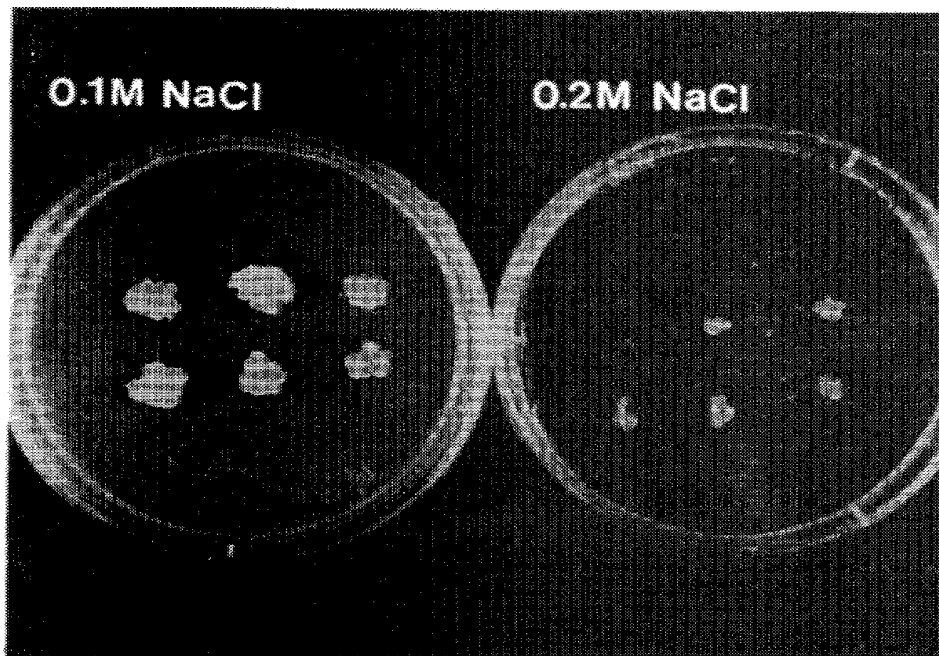


그림 19. 0.1M NaCl에 저항성을 갖는 인삼세포주의 2차 계대배양.

6) Dehydration 스트레스에 의한 anthocyanin의 합성

0.1M NaCl 고체배지상에서인삼 배양세포는 dehydration 스트레스에 의한 반응으로 anthocyanin을 합성한다. 인삼 세포는 곰팡이 세포벽 주성분인 chitosan에 노출되거나 또는 세포배양 기간이 길어질 경우에도 anthocyanin이 합성되지만 그림 20에서 0.1M NaCl의 스트레스가 주어지면 정상배지에서는 2-3개월이 경과 후 anthocyanin이 합성됨에 비해 3주에서 1개월 배양만에 anthocyanin이 합성된다. 일반적으로 환경스트레스가 가해지면 anthocyanin 합성 과정을 통해서 인삼세포생장을 극복하는 것으로 사료된다.

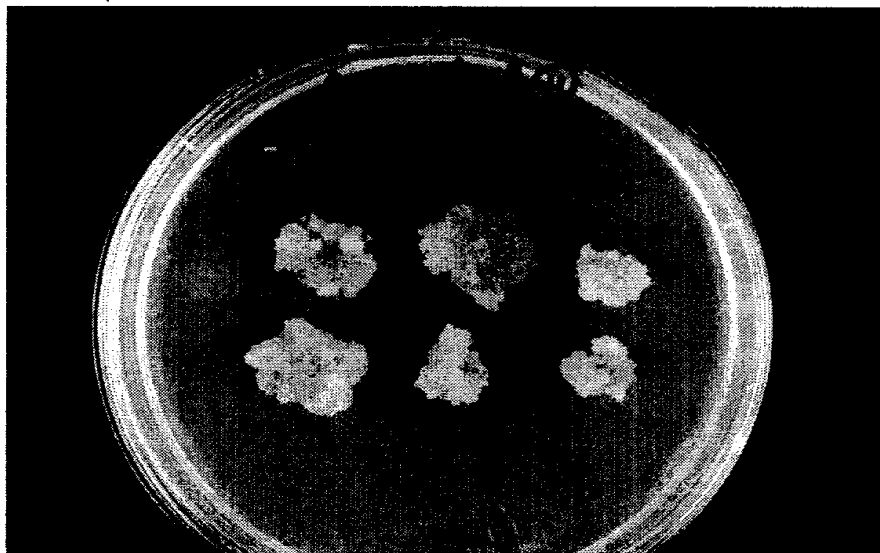


Fig 20. 인삼세포에서 0.1M NaCl에 의해 발생한 Anthocyanin synthesis.

제3절 Dehydration stress에 의해 유도되는 인삼의 유전자 탐색

1. RNA의 정제 및 Differential display

정상의 인삼세포주(KGC 13)와 NaCl농도 0.05M에서 증식 선발되어 세포증식 단계를 거친 인삼세포로부터 RNA를 분리하였으며 분리된 RNA를 Differential display에 사용하였다.

Differential display는 RNImage™ kit(GenHunter Co.)을 이용하여 실시하였으며 HT₁₁A, HT₁₁G, HT₁₁C 등 세종류의 primer를 이용하여 Reverse transcription 반응을 실시한 후 각 반응용액에 동일한 primer 및 HAP1 ~ HAP6 primer를 이용하여 differential display 반응 PCR을 실시하였다.

Differential display방법에 의해 얻어진 fragment는 elution 하여 cloning하였으며 재현성과 stress specific하게 나타나는 유전자임을 확인하기 위하여 Northern hybridization을 실시하였다.

Northern hybridization에 의해 스트레스에 특이적으로 나타나는 fragment를 확인(그림 21)하였으며 이들의 염기서열을 분석하였다. 재현성 및 염기서열이 확인되지 않은 fragment는 실험상 artifact등으로 사료되며, 한편 dehydration stress 내성 유전자를 탐색하기 위하여 *Aspergillus*로부터 얻어진 유전자들을 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시하였다.

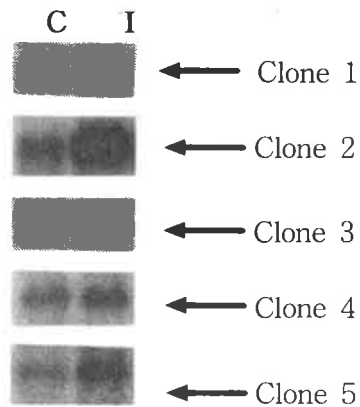


그림 21. Differential display를 통해 얻어진 fragment에 대한 Northern hybridization.
(C: control, I: induced)

2. 인삼으로부터 trehalose-6-phosphate phosphatase gene 의 선발

인삼의 trehalose-6-phosphate phosphatase 유전자를 cloning하기 위하여 *Aspergillus*로 부터 얻어진 *orlA* gene을 probe로 하여 인삼 genomic DNA를 대상으로 genomic Southern blot을 실시하였다.

가. 인삼 genomic DNA 추출

인삼의 genomic DNA 추출은 Chen등의 방법(1986)을 인삼에 적합하도록 변형하여 사용하였으며 이 방법으로 얻은 genomic DNA를 제한 효소 *EcoRI* 및 기타 제한효소로 절단하였으며 이 중 제한 효소 *EcoRI* 으로 절단 후 전기영동한 결과는 그림 22과 같다.

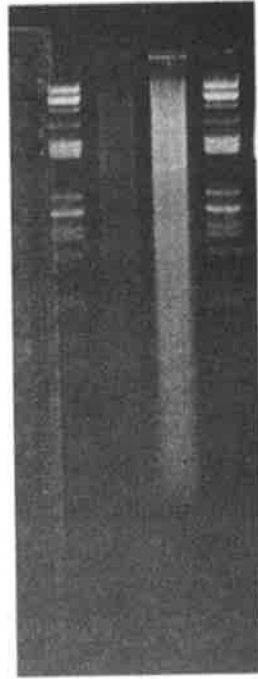


그림22. 인삼 genomic DNA를 제한효소
*EcoRI*으로 절단 후 전기영동한 pattern.

나. Genomic Southern hybridization

제한효소 절단 후 전기영동이 완료된 genomic DNA를 capillary 방법으로 nitrocellulose paper에 이동시켰다. Probe를 이용하여 Southern hybridization을 실시하였고, 그 결과 양성으로 생각되는 band를 얻어 (그림 23), 이를 cloning하였다.

Cloning된 절편은 제한효소 지도 작성 및 염기서열 분석을 통해 인삼의 trehalose-6-phosphate phosphatase gene인지 확인하였다.



그림 23. Genomic Southern hybridization.

3) Differential display로부터 얻어진 기타 유전자의 cloning 및 염기 서열 분석

인삼의 mRNA로부터 수행된 differential display에 의해 얻어진 기타 clone들 중 Northern blot결과 dehydration stress와 관련이 있을 것으로 사료되는 몇몇 clone에 대해 염기서열을 분석하였다(그림 24, 그림 25, 그림 26).

gisneng: 15 AACAA**TGGT**GGAAGGCTGT**CACAGT**TCTTAGCGGCAGTGGAGGAGTCAGTGGCGTCATCCA 74
 tomato : 2 AAAA**TGGT**GGAAGGCCGTCGCCGTCCTTAACAGCAGTGAAGGTGTTAGTGGCACCTACCT 61

gisneng: 75 CTTTACCCAGGAAGAAGATGGTCCA**ACTACAGT**TACTGGAAA**ACTTTCTGGC**CTTGCACC 134
 tomato : 62 CTTCACTCAAGTAGGAGTAGCTCCA**ACCACAGT**TAATGGAAATATTTCTGGCCTAAAACC 121

gisneng: 135 CGGACTTCATGGTTTTTCATGTCCATGCACTTGGTGATAACAACAACGGTTGCCTGTCAAC 194
tomato : 122 TGGACTTCATGGCTTCCATGTCCATGCCCTTGGTGATACCACAAATGGCTGTATGTCAAC 181

gisneng: 195 TGGACCCCATTAATAACCCTGCTAATAAAGAGCATGGTGCTCCGGAAGATGAGACCCGCCA 254
tomato : 182 AGGACCACATTACAATCCTGCTGGTAAGGAGCATGGTGCTCCTGAAGATGAGGTGCGTCA 241

gisneng: 255 TGCTGGTGATCTCGGGAATGTGACAGTTGGTGAAGATGGTACTGCCGAATTCCTATTGT 314
tomato : 242 TGCTGGTGATCTTGGTAACATCACAGTTGGAGAAGATGGTACTGCATCTTTTACTATTAC 301

gisneng: 315 TGACAAACAGATTCCACTCATTGGATCAGGTTCCATCATTGGAAGGGCCGTAGTTGTCCA 374
tomato : 302 CGACAAGCAGATTCCTCTCACTGGTCCACAGTCCATCATTGGAAGAGCTGTTGTTGTCA 361

gisneng: 375 TGCTGACCCTGATGACTTGGGAAAGGGTGGTCATGAACTCAGCAAAGCACTGGAAATGC 434
tomato : 362 TGCTGATCCTGATGATCTTGGAAAGGGAGGACATGAGCTCAGTAAAAGCACCGGAAATGC 421

gisneng: 435 TGGTGAAGGCTTGCCTGTGGTTTTATTGGGCTGCAGGGTTGATT 479
tomato : 422 TGGCGGAAGGATTGCTTGTGGTATTATTGGCTCCAGGGTTAACT 466

그림 24. Tamato의 유전자와 비교한 인삼 superoxide dismutase gene의 염기서열.

ginseng: 169 AAACAGTGGACTGGGACAAGCTGGCAGCAGAAGTGAAGAAGGAGGAGAAAGAAGAGAAAC 228
potato : 65 AAAGTGTGAGGAGCCCATGGAGGAAGAAGAAGCAGCCAAAGAAGAGAAAGAAGAATCTG 124

ginseng: 229 TTGATGGAGATGCAG 243
potato : 125 ATGATGAAGCTGCAG 139

그림 25. Potato의 유전자와 비교한 인삼 heat shock protein homolog의 염기서열.

ginseng : 287 GAGAGCGAACTTGAGTGCAATCAAAGACTTGTACAAGCAAATGCTCTCAAGATGGAGAT 228
H. vulgare: 1012 GTGGGTGAACTTGAAGGCGATCAAGAGGCTTGTAGATGCTGAAGCACTTAAGATGGAAAT 1071

ginseng : 227 TATTCCAAACCCGAAGGAAGTGAAGGGTTTAAAGTTCTTCAGCTOGAACTGCAGCTGG 168
H. vulgare: 1072 CATTCCCAACCCCAAGGAAGTTGATGGTGTGAAAGTGCTACAGCTAGAAACCCGAGCTGG 1131

ginseng : 167 TGCTGCGATTAAGTTTTTTGATCATGCTATTGGGAGTAATGTTCCAAGATCACGATTCT 108
H. vulgare: 1132 AGCAGCGATCAGGTTCTTTGAGAAAGCAATCGGCATCAATGTTCCCCGCTCAAGGTTTCT 1191

ginseng : 107 TCCAGTAAAAGCAAGTTCAGATTTGCTTCTTGTCCAGTCTGATCTTTACACCTTATCTGA 48
H. vulgare: 1192 GCCCGTGAAGGCTACATCTGATTTGTTGCTTGTGCAGTCTGATCTCTATACCTTGGTCTGA 1251

ginseng : 47 TGGCCTTGTGACCCGAAATCCGGCTAGGGCAAATCCTGCAAATCCT 2
H. vulgare: 1252 TGGCTATGTCATCCGCAACCCGGCCAGAGTGAAGCCATCGAACCCCT 1297

그림 26. 인삼 UDPG pyrophosphorylase gene의 nucleotide sequence.

4) 인삼에 유전자도입을 위한 형질전환용 vector construction

인삼내에 형질전환을 위해서는 인삼 세포 형질전환에 적합한 vector system의 개발이 필수적이다. 따라서 vector system 및 reporter의 성능을 테스트하고 형질전환을 확립하기 위해 일차적으로 GFP(Green Fluorescence Protein)을 reporter로 하는 형질전환 vector를 construction 하였다. 이를 식물체내에 도입하여 형질전환을 완료하였다. 발현여부 및 발현 양상에 대한 보다 심도있는 연구가 필요하다고 사료된다.

가) Green Fluorescence Protein의 vector내 subcloning

인삼내에 도입된 유전자를 표지하기에 적합한 reporter로서 GFP

(Green Fluorescence Protein)의 적합성을 검토하기 위하여 인삼에 도입가능한 형태로 유전자 cloning 및 조작을 실시하였다.

제한효소 *Bam*HI 및 *Bgl* II를 포함하도록 GFP 분리용 primer를 합성하였다. 이를 이용한 PCR을 통해 얻은 GFP를 promoter와 terminator를 포함하는 vector 524-*Xba*I의 *Bam*HI site에 도입하였다. 재조합된 vector를 *E.coli* DH5 α 에 도입한 후 다시 DNA를 분리하여 *Xba*I로 절단하고 전기영동하여 재조합 여부를 확인하였다(그림 27).

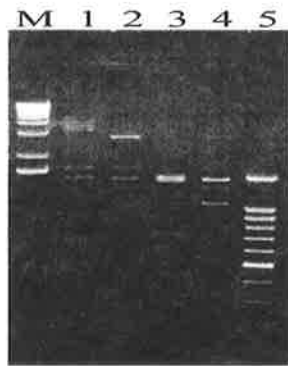


그림 27. Green Fluorescence Protein의 재조합 여부 및 방향을 확인하기 위하여 제한효소 절단 후 실시한 전기영동 pattern.(lane M: Marker, lane 1, 2: 524XbaI, lane 3, 4: 524-XbaI::GFP, lane 1, 3: *Ava*II/*Bgl*III, lane 2, 4: *Ava*II/*Xba*I, lane 5: 100bp ladder)

나) 식물 형질전환용 도입체 개발

Reporter의 기능의 식물체내 작동여부를 확인하기 위하여 재조합된 vector를 식물 형질전환용 binary vector pRD400에 도입하였다.

GFP가 포함된 vector를 제한효소 *Xba*I으로 불완전 절단 한 후(그림 28), 이 중 GFP와 promoter 및 terminator를 포함하는 절편을 회수하

여 pRD400의 *Xba*I site에 ligation하였다. 재조합된 binary vector는 다시 추출 후 제한효소 *Xba*I 절단 후 전기영동을 실시하여 확인하였다 (그림 29). 이상과 같은 일련의 과정을 그림 30에 요약하였다.

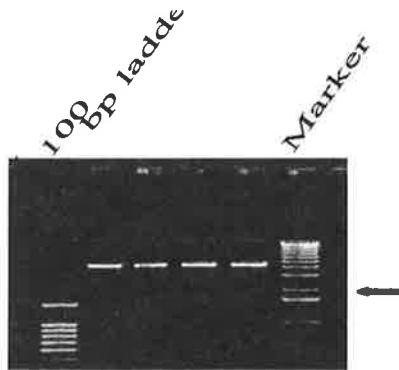


그림 28. 524-*Xba*I::GFP를 제한효소 *Xba*I으로 불완전 절단 후 전기영동 pattern.(arrow indicates the fragment eluted)



그림 29. Green Fluorescence Protein의 binary vector내 재조합 여부를 확인하기 위하여 *Xba*I로 절단후 실시한 전기영동 pattern(lane M: Marker).

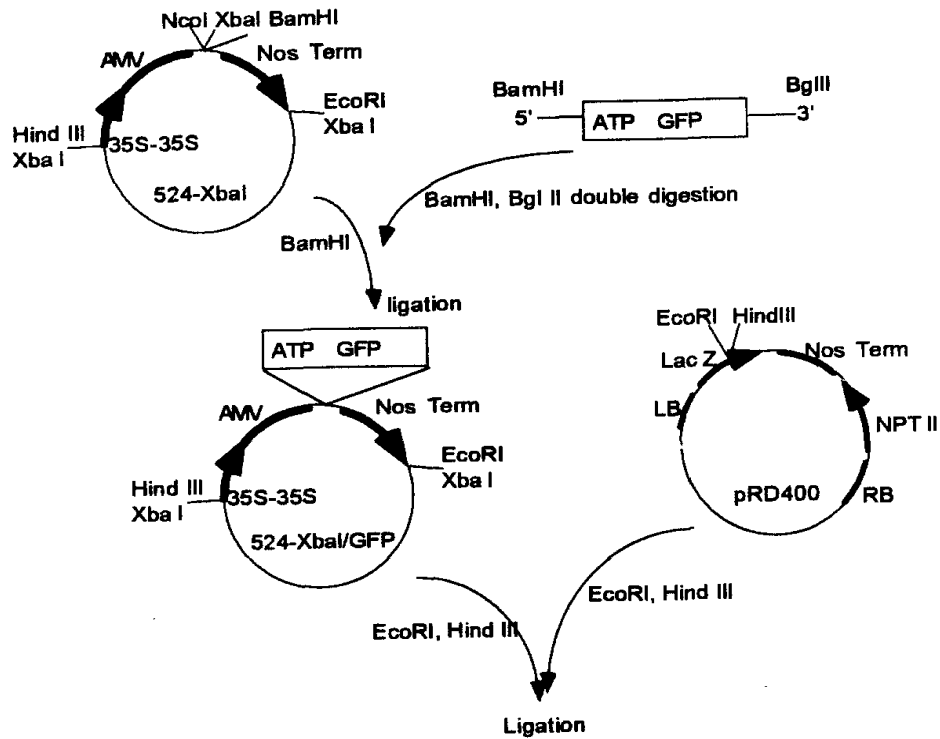


그림 30. Schematic diagram of construction of binary vector system.

5) 식물체에 형질전환용 GFP vector의 도입
 vector system 및 reporter의 성능을 테스트하고 형질전환을 확립하기
 위해 일차적으로 construction 된 GFP 형질전환 vector를 식물체내에
 도입하여 형질전환을 완료하였으며(그림 31), 식물체에 GFP의 도입 여
 부를 PCR을 통해 확인하였다.

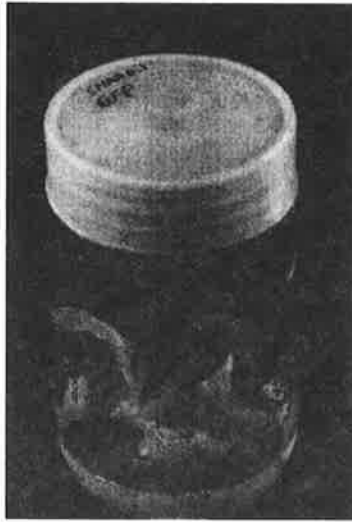


그림 31. GFP 형질전환 vector가 도입된 유식물체.

5) Trehalose-6-phosphate synthase (TPS 1) gene의 subcloning
yeast 의 trehalose-6-phosphate synthase gene을 인삼내에 도입하여
사용가능성을 타진하기 위하여 먼저 yeast TPS 1 gene을 식물 형질
전환용 vector에 도입하였다. 형질전환용 vector에는 enhanced CaMV
35S promoter가 중복되어 포함되어 있으며, nos terminator가 포함되
어 있다(그림 32). 또한 삼투 충격에만 선택적으로 발현할 수 있도록
enhanced CaMV 35S promoter대신 osmotin promoter를 치환하였다.
이 vector는 식물체에 도입을 진행중이며, 또한 이 유전자를 이용하여
인삼내에서 선발할 수 있도록 genomic Southern hybridizaion 등을
실시할 예정이다.

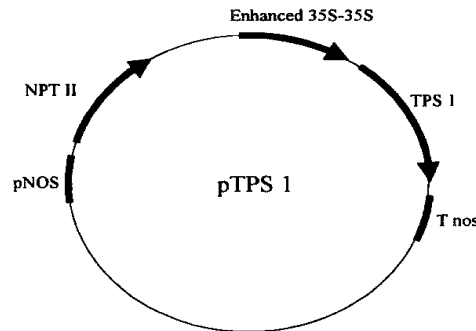


그림 32. yeast trehalose-6-phosphate synthase (TPS 1) gene 의 식물체 형질전환용 vector

가. 형질전환에 적합하도록 vector system의 개선 및 인삼내 도입 yeast 의 trehalose-6-phosphate synthase (TPS 1)gene을 식물 형질 전환용 vector에 도입하여 식물체내에 도입하였다. 식물체내 도입을 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리 정제하여 이를 대상으로 PCR을 수행하였으며(그림33-A) Southern hybridizaion 으로 확인하였다(그림 33-B). 형질전환용 vector에 enhanced CaMV 35S promoter를 삼투 충격에만 선택적으로 발현할 수 있도록 osmotin promoter를 치환하였다 (그림 34)

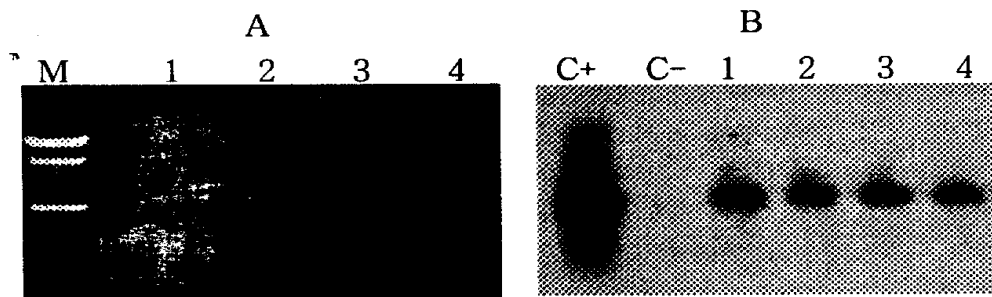


그림 33. 식물체에 도입된 식물형질 전환용 vector를 확인하기 위하여 실시한 PCR(A) 및 Southern hybridization(B) 결과.(M: DNA molecular weight marker, C+: positive control, C-: negative control, Lane 1-4: genomic PCR product)

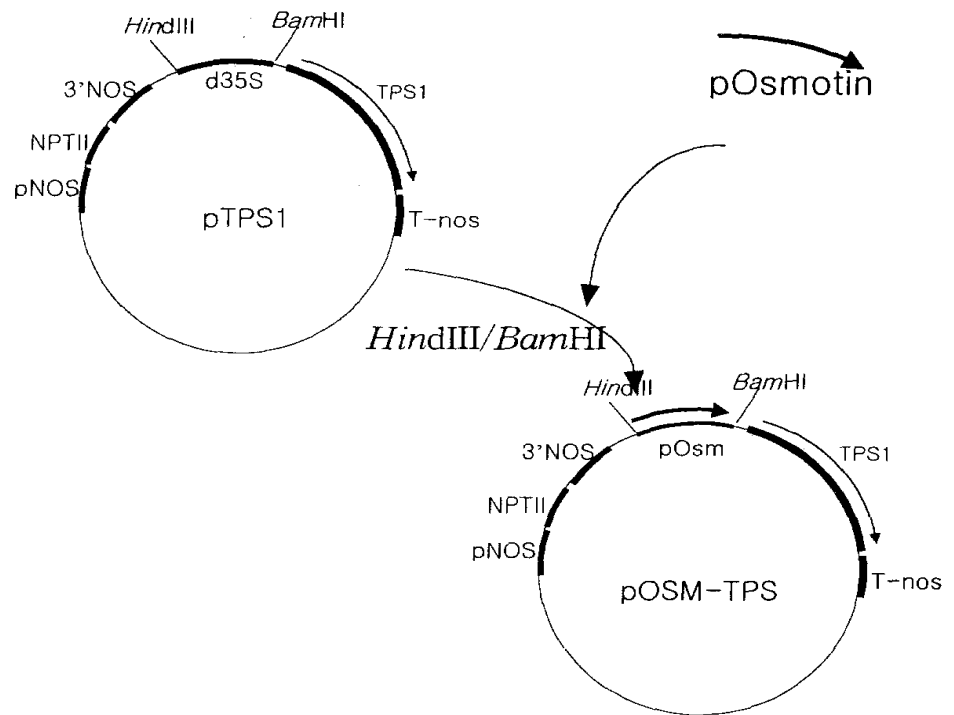


그림 34. yeast TPS 1 gene의 형질전환용 vector construction 과 osmotin promotor의 치환 모식도.

제4절 인삼내 형질전환 효율 증대 및 형질전환된 인삼의 재분화 효율 증대 연구

1. 인삼내 형질전환 체세포배의 유도

가. 형질전환 체세포배의 이차배 유도

형질전환된 인삼 식물체를 궁극적으로 토양에 활착시키기 위하여는 많은 수의 형질전환 유식물체가 요구되므로 형질전환체의 대량증식기술 역시 시급하다고 사료된 바, 형질전환이 확인된 체세포배를 이용, 이차배의 유도가 필요하였다.

본 연구팀의 결과에서 체세포배의 크기가 약 3mm 이상될 때 이차배 발생 및 단일배 형성이 양호하였다. 또한 형질전환체가 절편당 많은 수의 이차배를 형성하도록 하기 위하여는 1M sucrose 처리 후 3% sucrose 함유 MS배지를 사용하는 것이 가장 좋은 조건으로 사료되었으며, 형질전환체 체세포배 유도를 위해서는 호르몬이 첨가되지 않은 Murashige-Skoog(MS) 고체배양기에 접종하여 체세포배를 유기하고 2,4-D 0.5uM와 sucrose 3%를 첨가한 고체배양기에서 증식시켰다(그림 35).

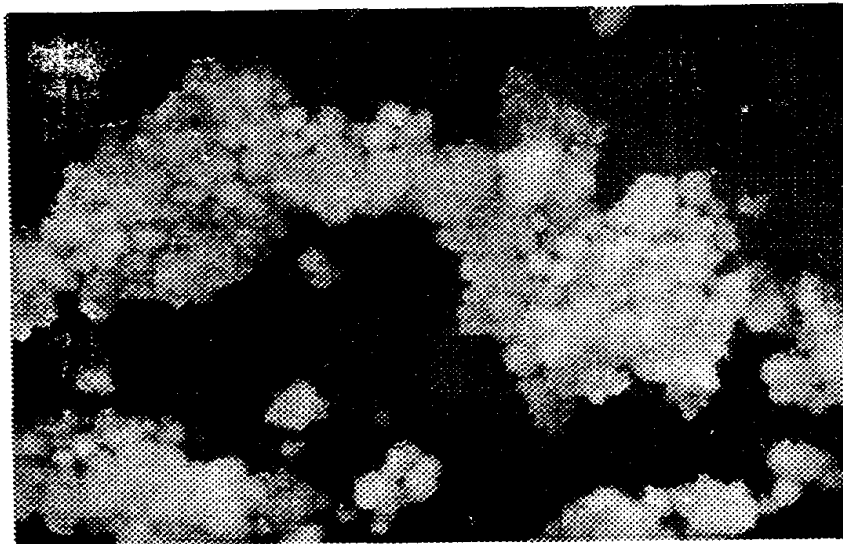


그림 35. 형질전환체 체세포배 유도를 위해서는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 고체배지에서 유기된 체세포배 (2,4-D 0.5uM, sucrose 3%).

또한 체세포배의 증식을 위하여 2,4-D 1 μ M과 BAP 0.1 μ M이 첨가된 변형된 MS배지에 삼투제로서 1-3%의 sorbitol과 2-5%의 sucrose를 각기 첨가시킨 액체배지를 250ml 삼각플라스크에 50ml씩 분주한 다음 체세포배를 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 100rpm으로 진탕배양하였다(그림 36).

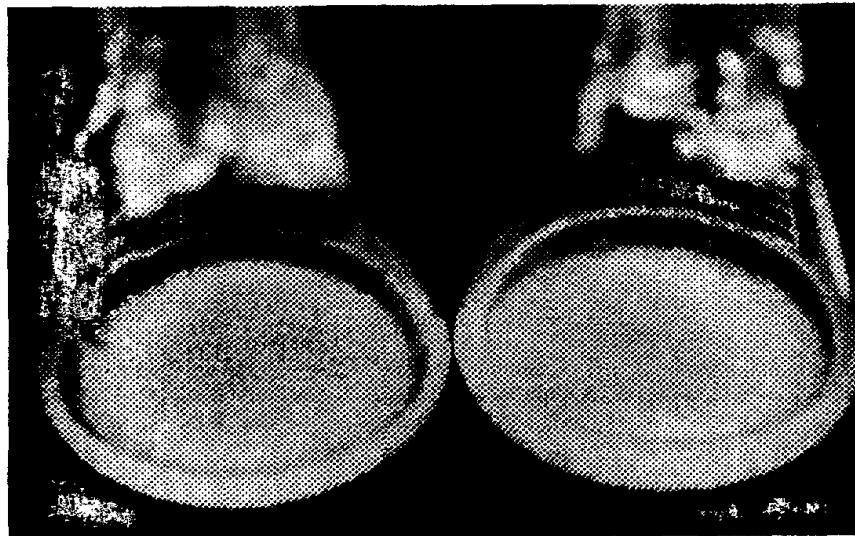


그림 36. 체세포배의 증식을 위하여 액체배지 (2,4-D 1 μ M, BAP 0.1 μ M, 1-3% sorbitol, 2-5%의 sucrose, MS배지)에서 진탕배양한 체세포배(25 $^{\circ}$ C, 100rpm).

나. 체세포배의 증식조건

1) 삼투제의 영향

가) Sorbitol

Sorbitol을 농도별로 처리한 후 체세포배를 접종하여 1주 간격으로 3회 연속 배양한 후 수확하여 조사하였는 바, 배가 단리되며 증식하는 양상은 sorbitol처리구에서 양호하였으며 무처리구에서는 세포가 단리되

지 않고 증식하였다. 배의 증식은 무처리에 비하여 sorbitol 1% 처리구에서 다소 높았고 sorbitol의 첨가량이 높아짐에 따라 성장량이 감소되었는데, 이는 삼투제의 첨가로 인하여 배양액의 수분포텐셜이 낮아져 배의 수분흡수가 다소 억제되었기 때문으로 생각되었다. 각 처리구에서 증식된 배를 발육배지로 옮겨 배양하였을 때 sorbitol 1% 처리구에서 자랐던 배의 발육이 양호하였다.

표 4. Sorbitol의 처리가 체세포배의 증식과 발육에 미치는 영향

Sorbitol 처리농도	배의 증식량 (g/50 ml)	단립화 지수 (0-4)	발육 지수 (0-4)
0%	4.5	3	2
1%	5.2	4	4
2%	3.7	4	3
3%	2.5	4	1

Modified MS I media

나) Sucrose

Sucrose를 농도별로 첨가한 액체배지에 체세포배를 접종하여 1주간격으로 3회 연속 배양한 후 수확하여 조사한 바, 배가 단리되며 증식하는 양상은 sucrose 4% 처리구에서 가장 양호하였으며 농도가 낮아짐에 따라 세포가 단리되지 않고 증식하였다. 배의 증식은 2% 처리구에 비하여 3%-4% 처리구에서 양호하였으며 5% 처리구에서는 다소 감소하였는데, 이는 5% 이상에서는 배양액의 수분포텐셜이 낮아 배의 수분흡수가 억제되었기 때문으로 생각된다. 각 처리구에서 증식된 배를 발육배지에 옮겨 배양하였을 때 4% sucrose에서 자랐던 배에서 발육이

양호하게 이루어 졌다.

표 5. 체세포배의 증식과 발육에 미치는 sucrose의 영향

Sucrose 처리농도	배의 증식량 (g/50 ml)	단립화 지수 (0-4)	발육지수 (0-4)
2%	3.2	2	1
3%	4.5	3	2
4%	4.2	4	3
5%	3.7	3	2

Modified MS I media

2) 배양기간의 영향

가) 계대기간

1, 2, 3주 간격으로 계대기간을 달리하여 배양한 후 배의 상태를 조사한 바, 1주 간격으로 계대하였을 때 배가 양호하게 단립되며 증식하였으며 계대기간이 2주, 3주로 길어짐에 따라 단립되지 않고 점차 뭉치며 증식하였다. 배의 증식은 2주간격으로 계대하였을 때 가장 높았으며 3주간격으로 계대한 처리구에서는 증식량이 미미하였다. 각 처리구에서 증식된 배를 발육배지에 옮겨 배양하였을 때 1주 간격으로 배양한 처리구에서 자랐던 배에서 발육이 양호하게 이루어 졌다.

표 6. 체세포배의 증식과 발육에 미치는 배양기간의 영향

계대배양기간	배의 증식량 (g/50 ml)	단립화 지수 (0-4)	발육지수 (0-4)
1주	4.5	4	4
2주	10.2	2	3
3주	12.2	1	1

Modified MS I media

다. 체세포배의 발육조건 구명

1) 고형제의 영향

체세포배는 액체배지에 비하여 고체배지에서 발육이 양호한 바 고형제로 배지에 첨가하는 phytagel이 배의 발육에 미치는 영향을 알아보고자 phytagel를 농도별로 첨가한 발육배지에 배를 접종 배양하였다.

0.4-0.6%의 phytagel 처리구에서는 배가 단립되며 발육하였으나 phytagel의 농도가 낮아짐에 따라 배가 단립되지 않고 점차 몽치며 발육하였다. 0.1% 처리구에서는 배지가 완전히 굳지 않았고 배의 발육도 거의 이루어지지 않았으며, 2% 처리구에서는 배의 발육이 관찰되기 시작하여 4% 처리구에서 가장 양호한 배의 발육을 나타내었다. 이는 고형제로 배지에 첨가한 phytagel이 배지내의 수분을 흡착하여 배지의 수분포텐셜을 현저히 낮춤으로써 배의 발육을 도모한 것으로 생각된다. 각 처리구에서 발육된 세포를 발아배지에 옮겨 배양하였을 때 유식물체의 전환은 phytagel 4%에서 발육한 세포에서 높게 이루어졌다.

표 7. 체세포배의 발육에 미치는 고형제인 phytigel의 영향

Phytigel 첨가량	단립화지수 (0-4)	발육지수 (0-4)	발아율 (%)
0.1%	0	0	0
0.2%	2	2	27
0.4%	3	4	48
0.6%	4	3	35
0.8%	3	3	24

Modified MS II media

2) ABA의 영향

배지의 수분포텐셜은 변화시키지 않고 배의 수분포텐셜만을 변화시키는 ABA를 농도별로 배지에 첨가한 후 체세포배를 접종 배양하며 발육상황을 조사하였다.

배가 단리되는 양상은 무처리에 비하여 ABA처리구에서 양호하였으며, 배의 발육도 무처리구에 비하여 ABA처리구에서 다소 양호하였다. 각 처리구에서 발육된 세포를 발아배지에 옮겨 배양하였을 때 무처리구에서 발육한 체세포배는 발아율이 50% 전후이었으나 ABA처리구에서 발육된 세포는 발아율이 다소 낮았는데, 이는 ABA가 체세포배에 잔류하여 발아억제물질로 작용하였기 때문으로 생각된다.

표 8. 체세포배의 발육 및 발아에 미치는 ABA의 영향

ABA의 첨가량 (uM)	발육지수 (0-4)	단립화 지수 (0-4)	발아율 (%)
0	2	3	48
0.1	4	2	32
1.0	4	1	16

Modified MS II media

3) 총배양기간의 영향

액체증식배지에서의 배양기간이 장기화되면 체세포배의 단립화가 감소되고 발육 및 성숙이 불량해지므로 체세포배의 활력유지에 적절한 액체배양기간을 구명하고자, 총배양기간이 다른 체세포배를 접종배양하여 발육상태를 비교하였다.

액체배지에서의 배양기간이 1개월 경과된 세포는 단립화는 양호하였으나 수십개의 배가 뭉쳐서 발육하였다. 배양기간이 6개월에서 12개월 경과된 체세포배는 단립화가 양호하게 진행되었으며 발육도 양호하였다.

표 9. 체세포배의 단립화와 발육에 미치는 액체배지에서의 총배양기간 비교

액체배지에서의 총배양기간(개월)	단립화 지수 (0-4)	발육 지수 (0-4)
1	4	2
6	4	4
12	4	4

Modified MS II media

4) 질소원의 영향

배지에 첨가되는 암모늄태 및 질산태 질소원의 상대비와 총합량이 체세포배의 소질변화를 나타내는 주요한 요인으로 작용하는 바, 암모늄태 및 질산태 질소원을 0-50mM의 농도 범위에서 조합처리하여 체세포배의 발육 및 성숙을 조사하였다.

암모늄태 질소원은 5mM-20mM 범위에서 체세포배의 발육을 촉진하였으며 다량으로 첨가되면 체세포배의 단립화가 불량해지는 것이 관찰되었다. 질산태 질소원은 10mM이상에서 배의 발육을 촉진하였으며 20-40mM의 농도범위에서 배의 양호한 발육이 관찰되었다.

표 10. 암모늄태 및 질산태 질소원의 상대비와 총합량이 체세포배의 발육에 미치는 영향 비교

암모늄태:질산태 (mM)	발육 지수 (0-4)	암모늄태:질산태 (mM)	발육 지수 (0-4)
5 : 20	1	20 : 20	3
5 : 40	4	20 : 40	2
10 : 20	4	30 : 20	2
10 : 40	4	30 : 40	1

Modified MS II media

2. 재분화식물체의 육성

가. 재분화 식물체의 육성 조건

배양기내 재분화식물체로부터 지상부가 출아되기 전후에 색소의 발현과 함께 이차휴면에 들어가 생육이 정지되고 정아부위에 이차체세포배가 발생하는 등 비정상적인 양상을 나타내는 현상이 기내 염류농도와 호르몬조성 등과의 관계로 사료되어 유식물의 휴면 억제 및 생육촉진에 적합한 배양환경을 알아보하고자 실험을 수행하였다.

1) 식물호르몬의 영향

Auxin, Cytokinin, Gibberellic acid 등의 식물 호르몬을 조합처리하여 유식물을 배양하여 그 조성이 발아에 출아에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과 Auxin, cytokinin, gibberellic acid를 함께 처리시 초기발아가 양호하였으나 출아율이 낮았으며 유경이 탈분화되는 경향을

나타내었으며, cytokinin과 gibberellic acid가 함께 처리된 경우 초기발아는 낮았으나 출아율이 높았으며 탈분화되는 현상을 나타내지 않았다. Cytokinin 단독 첨가시 발아와 출아가 비교적 양호하였으며, gibberellic acid 단독 첨가시 출아율이 낮았으며 탈분화되는 경향을 나타내었다.

표 11. 식물호르몬 조성이 발아와 출아에 미치는 영향

호르몬 조합	발아율(%)	출아율(%)	탈분화율(%)
A+CK+GA	57	3	23
CK	23	12	7
CK + GA	28	37	3
GA	32	7	12

A: auxin CK: cytokinin GA: gibberellic acid

Modified MS III media

나) 배양 염류농도의 영향

MS배지의 염류농도는 5.5ds/m으로 인삼에 적합한 염류농도에 비하여 50배 이상 높은 바, 배지의 염류농도를 1/2에서 1/40배까지 희석한 고체배양기에 유식물을 접종 배양하여 생육을 조사하였다. MS배지 원액과 1/2 희석된 배양액에서 유식물의 출아율이 낮게 나타났으며 탈분화 현상이 높게 나타났다. 1/20-1/40으로

회석 MS 배지에서는 출아율이 양호하였으며 탈분화 현상도 낮게 나타났다. 1/40 회석 배지의 염류농도는 0.17ds/m으로 인삼의 적정 염류농도인 0.05-0.1ds/m에 근접하였다(표 12).

표 12. MS배지의 회석비율에 따른 배양액의 염류농도와 유식물의 출아율 및 생육

MS배지 회석비율	EC5 (ds/m)	출아율(%)	탈분화정도(0-4)
1	5.50	3	4
1/2	2.91	7	3
1/10	0.62	12	1
1/20	0.35	15	1
1/40	0.17	21	1

Modified MS III media

다) 성숙단계별 발아 비교

Gibberrelin이 5uM 첨가된 변형된 MS 배지에 성숙배지에서의 배양기간이 각기 다른 체세포배를 접종하여 발아를 유도하였다. 이로부터 정상적인 유식물과 지상부 또는 지하부가 웃자란 비정상 유식물의 출현을 비교 조사하였다.

성숙배지에서의 배양기간이 짧았던 체세포배는 발아배지에서 지상부가 웃자랐으며 성숙기간이 과도한 체세포배는 발아배지에서 지하부가 웃자라는 현상을 나타내었으며 성숙기간이 적당한 체세포배는 지상부와

지하부가 균형있게 발달하였다.

표 13. 미성숙 및 과성숙이 체세포배의 발아에 미치는 영향 비교

성숙배지에서의 경과일수 (일)	성숙정도	발아양상
30일	미성숙	지상부 이상 발아
60일	성숙	정상 발아
90일	과성숙	지하부 이상 발아

나) 폴리아민이 배의 생육에 미치는 영향

인삼종자의 발아기에 putrescine 함량이 높게 나타나는 바, 발아가 진행 중인 유식물을 putrescine이 첨가된 배양기에서 일정기간 배양한 후 무처리배양기로 옮겨 조사하였다.

무처리에 비하여 10-100 uM putrescine 처리구에서 유근의 초기 생육이 양호하였으나 2주간 연속 처리한 경우에는 유근이 이상 발육하였으며 생육의 진전이 이루어지지 않았다. 종자 발아기의 putrescine의 함량이 단기간 높았던 점으로 보아 putrescine 배양기에서 처리기간을 1주 이내로 하는 것이 적당할 것으로 생각된다.

표 14. Putrescine 처리가 유식물의 유근생육에 미치는 영향

Putrescine 첨가량 (uM)	유근의 길이(mm)		이상 발아 정도(0-4)	
	1주 처리	2주 처리	1주 처리	2주 처리
0	1.2	1.5	0	0
1	1.1	1.7	0	1
10	2.5	2.8	0	3
100	3.7	4.	2	3

References

Mishira N.C., and E.L. Tatum (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 3875-3879

Hinnen, A., Hicks, J.B., and Fink, G.R. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 1929-1933

Case, M.E., Schweizer, M., Kushner, S.R., and Giles, N.H. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 5259-5263

Ballance, D.J., Buxton, F.P., and Turner, G. (1983). Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 284-289

Blomberg, A., and Adler, L. (1989). J Bacteriol 171: 1087-1092

Brown, A.D. et al. (1986) FEMS Microbiol Rev 39: 31-36

Edgley, M., and Brown, A.D. (1983) J Gen Microbiol 129: 3453-3464

Csonka, L.N., and A.D. Hanson (1991) Ann. Rev. Microbiol 45:569-606

Mackenzie, K.F. et al. (1988) J Gen Microbiol 134: 1661-1666

Adler, L. et al. (1985) J. Bacteriol 162: 300-306

- Andre, L. et al. (1988) *J. Gen. Microbiol* 134: 669-677
- Watanabe, Y. et al. (1991) *Yeast* 7:500-606
- Latterich, M., and Watson, M.D. (1991) *Mol Microbiol* 5: 2417-2426
- Van Zyl, P.J. et al. (1990) *Appl Microbiol Biotechnol* 34:231-235
- Varela, J.C.S. et al. (1992) *Mol Microbiol* 6: 2183-2190
- Bant, L.M. et al. (1988) *J Cell Biol* 107: 1369-1383
- Brewster, J.L., T. de Valoir, N.D. Dwyer, E. Winter. and M.C. Gustin. (1993). *Science* 259: 1760-1763
- Larsson, C. et al. (1990) *J Bacteriol* 172: 1769-1774
- Levin, D.E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992) *J Cell Biol* 116: 1221-1229
- Novick, P., and Botstein, D. (1985) *Cell* 40: 405-416
- Paravicini, G. et al. (1992) *Mol Cell Biol* 12:4896-4905
- Trollmo, C. et al. (1988) *FEMS Microbiol Lett* 56:312-326