최 종
연구보고서

내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산

Mass production of high-productive garlic by introduction of HSP related genes

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
농촌진흥청 원예연구소

농 림 부

최 종
연구보고서

내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산

Mass production of high-productive garlic by introduction of HSP related genes

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
농촌진흥청 원예연구소

농 림 부

최 종 보 고 서

1997년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 **내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산**에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000년 10월 28일

주 관 연 구 기 관 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 조진기 (인)

주관연구기관장 :

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량 생산” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2000년 10월 28일

주관연구기관명: 경 북 대 학 교
총괄연구책임자: 조 진 기
연 구 원: 이 병 현
연 구 원: 이 효 신
연 구 원: 원 성 혜
협동연구기관명: 원 예 연 구 소
협동연구책임자: 우 종 규
연 구 원: 김 기 택
연 구 원: 김 도 선
연 구 원: 최 학 순

요 약 문

Ⅰ. 제목 : 내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 마늘의 하고현상 (夏枯現象)

마늘은 양념채소로서 뿐 만 아니라 건강식품과 항암제 등의 의약품원료로서 이용되는 채소식물로서 우리나라 뿐 만 아니라 세계적으로도 점차 그 중요성이 널리 인식되고 있다. 마늘은 지중해성 기후에 적합한 작물로서 우리나라와 같이 여름이 무더운 기후환경 아래에서는 하고현상 (summer depression)이 심하여 정상적인 생육이 어려우며 6월 중순 이후에는 식물체의 지상부가 고사하여 광합성이 중단됨으로 인해 마늘의 생산성이 급격히 떨어지는 문제점을 안고 있다. 마늘의 생육적온은 20-23℃ 정도이므로 이보다 높은 온도에서는 광합성 관련 효소들이 고온저해를 받으며 결과적으로 마늘 생산량의 감소로 이어지게 된다. 지중해 연안국에서 생산된 마늘이나 우리나라의 해안지방에서 생산되는 난지형의 마늘이 한지형의 마늘보다 굵은 것은 하고현상에 의한 생산량 감소의 증거로서 제시될 수 있다.

하고현상을 일으키는 식물들은 내열성 유전자의 발현량이 적은 것이 특징이므로 이들 식물에 내열성 유전자를 도입하면 하고현상을 극복할 수 있고 따라서 생산량을 증대시킬 수 있다. 마늘은 생장특성상 지상부의 생장이 끝나는 6월경, 즉 마늘이 하고의 피해를 받기 시작하는 시기에 도달 했을 때 bulb의 생장이 급격히 커지기 시작하는데, 만일 이 시기에 하고의 피해가 극복 될 수 있다면 생산량은 매우 많이 늘어나리라 예상된다.

2. 내열성 유전자 (HSP gene)

모든 생물세포에서는 고온에 의하여 내열성 유전자가 발현된다. 즉, 모든 생물은 생육적온보다 5-10℃ 이상의 고온에 노출되면 대부분의 정상적인 mRNA와 단백질의 합성이 억제되고, heat shock protein (HSP)이라 불리는 일련의 단백질들이 합성된다. 진핵생물 내에서 합성되는 HSP는 분자량에 따라 크게 5 종류로 분류되어지는데, 주로 HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15-30 kDa의 저분자량 (lmw; low molecular weight) HSP로 분류된다. 고등식물에 있어 내열성의 획득에 관한 지금까지의 연구보고에 따르면 식물에서는 저분자량 HSP이 내열성의 획득과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 저분자량 HSP는 고온 스트레스 하에서 세포 내 단백질의 변성방지 및 단백질 간의 응집 등을 방지하는 분자 chaperone의 기능을 수행함으로서 식물의 내열성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

3. 내열성 유전자 발현의 조절

유전자들은 식물체 내에서 항상적으로 발현되거나 또는 필요가 있을 때만 발현하게된다. 기초대사에 관여하는 효소들의 유전자들은 항상적으로 발현 (constitutive expression)을 하지만 특수한 조직에서만 필요한 단백질이나 효소들은 조직 특이적 발현 (tissue specific expression)을 하며, 생장시기에 따라서 필요한 효소들은 생장시기 특이적인 발현 (life cycle specific expression)을 하게되며, 환경에 적응하기 위하여 발현되는 유전자들을 유도효소 유전자 (inducible enzyme gene)라고 한다. 예컨대 식물에서 30℃ 이상의 고온에서만 발현되는 저분자량 HSP 유전자는 일종의 유도효소 유전자에 속한다. 이 유도효소 유전자를 식물에 도입하여 형질전환식물을 만들 때 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid 계, 예를 들어 pBI121 등을 사용하면, 도입된 유전자는 35S promoter에 의해서 항상적 발현을 하게되고, 고온환경이 도래하기 전에 발현되어 생산되는 HSP는 식물에 무

익하여 에너지 경제상 불리하며 식물 생육에 마이너스적인 효과를 가져오게 된다. 따라서 유용유전자의 형질전환에 의한 주요 작물의 생산성 향상을 위한 최근의 연구동향은 도입된 유전자의 최적화된 발현을 위한 promoter의 개발에 집중되는 추세이며, 본 연구에서도 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현을 위한 최적화된 조절영역의 탐색을 통하여 형질전환 식물체 내에서 도입된 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현과 이를 통한 내열성의 획득이 가능하리라 생각된다.

4. 마늘의 형질전환

마늘은 우리나라의 연간 생산액이 약 1조원에 달하며 전체 채소생산량의 거의 27%를 차지하는 매우 중요한 채소작물이다. 그러나 마늘의 국내가격이 국제시세의 4-5배에 달하므로 자칫 마늘 연구를 소홀히 하면 국산 마늘이 외국산 마늘에 의하여 점령당할 수도 있을 것이다. 마늘의 생산성을 높이는 방법에는 여러 가지가 있겠으나 가장 확실한 방법은 마늘에 유용유전자를 도입하는 길이다. 그러므로 여러 연구자들에 의하여 마늘의 형질전환에 관한 연구가 진행되고 있으나 아직 이렇다 할 결과를 얻지 못하고 있다. 본 연구에서는 내열성 유전자를 마늘에 도입함으로서 마늘의 생산성을 획기적으로 높이려고 하고 있으나 아무리 좋은 유전자를 확보했다고 하더라도 이들 유전자를 식물에 도입하지 않으면 아무 소용이 없으므로, 본 연구의 제 1 협동과제에서 차제에 마늘의 형질전환법을 체계화하여 마늘연구의 총본산인 원예연구소에서 그 확실한 기술을 보유하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 내열성 유전자의 발현조절을 위한 분자수식

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	1. 벼 genomic DNA library의 구축	① Genomic DNA 분리 ② *Sau*3AI 분해 ③ λBlueSTAR에 도입 ④ *In vitro* packaging
	2. 내열성유전자의 선발	① Plating ② Screening ③ 확인
	3. 염기서열 결정 및 특성 분석	① DNA sequencing ② Sequence analysis ③ Southern and Northern blot analyses
	4. 엽록체 HSP cDNA의 선발	① 벼 cDNA library의 구축 ⑤ 엽록체 HSP cDNA의 선발 및 특성규명
2차년도	1. HSP 유전자의 마늘로의 도입을 위한 발현 vector의 구축	① *BcHSP17.4, OsHSP17.9* 및 *OsHSP26*을 이용한 발현 vector의 구축 ② 형질전환 식물체의 구축 ③ 발현양상 및 내열성의 확인 ④ 협동과제에 분양
	2. 내열성 유전자 조절영역의 탐색	① Deletion clone의 제작 ② Reporter gene(GUS)을 가진 vector의 제작 ③ transient assay ④ 형질전환 식물체의 구축 및 분석 ⑤ 발현조절영역 확정
	3. HSF의 선발과 특성규명	① HSF cDNA의 선발 ② DNA 염기서열 결정 및 특성 규명
3차년도	1. 조절영역 확정 발현 vector의 구축	① 확정조절영역에 HSP 유전자 (*BcHSP17.4, OsHSP17.9, OsHSP26*) 및 HSF (*OsHSF13*) 유전자를 연결한 발현 vector의 구축
	2. 구축 vector의 모델 식물에의 도입	① 모델식물의 형질전환 ② 형질전환 식물체의 선발
	3. 형질전환 식물체에서 도입된 유전자의 발현 양상과 내열성의 확인	① 온도에 따른 발현양상의 확인·분석 ② 내열성의 확인 ③ 구축 vector의 협동과제에 분양

제 1 협동과제 : 마늘 형질전환체계의 확립

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	1. 조직배양 및 재분화 효율 증진	① 국내 주요 마늘 산지의 재배종 수집 및 유지 ② 각 재배종으로부터 callus 유기 및 증식 ③ 치상조직 및 시기 등을 달리하여 조직배양 효율 증진 방법 연구 ④ 형질전환 기초조건 조사
2차년도	1. 최적 조직배양 조건 구명 (계속)	① 치상조직 : 생장점, 보통엽, 미숙총포 등 ② 배지조건 및 치상환경 : 식물생장조절제 종류 및 농도, 광환경 등
	2. 형질전환 조건 구명 및 효율증진 연구	① 형질전환 기초조건 조사 ② 형질전환 적정조건 구명 ③ GUS를 이용한 형질전환 효율증진 연구
	3. 외래 유용 유전자의 도입 위한 형질전환	① 내열성 유전자의 형질전환 Ⓢ 제초제 저항성 유전자의 형질전환
3차년도	1. 외래 유용 유전자가 도입된 형질전환 마늘 포장재배, 증식 및 분석	Ⓘ 형질전환 shoot 순화 또는 기내소구 획득 후 포장재배하여 증식 Ⓢ 형질전환체 분석 - GUS 발현 분석 (intron 포함 GUS 유전자 대상), PCR 분석 - 제초제 저항성 등 검정
	2. 형질전환 효율증진	Ⓘ *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용한 형질전환 방법 제고
	3. 외래 유용 유전자를 이용한 형질전환 계속	Ⓘ 제초제 저항성, 내열성 (제1세부과제 개발) 유전자 도입 연구

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산을 위하여, 먼저 식물에서 내열성에 관여하는 것으로 알려진 저분자량 heat shock protein (HSP) 유전자와 HSP 유전자의 발현조절에 관여하는 것으로 알려진 heat shock factor (HSF) 유전자를 분리한 다음, 모델식물인 담배에 형질전환하여 분석한 결과, 저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 고온에서의 광합성 효율의 증가와 고온에 대한 내성의 증가에 기여함을 확인하였다. 내열성 유전자 promoter의 탐색을 통하여 *OsHSP17.9* 유전자의 -579 bp promoter sequence를 고온 및 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 하에서 내열성 유전자의 발현유도를 위한 inducible promoter로 확정하였다. 확정된 -579 bp promoter에 배추 유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자와 벼 유래의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* 유전자를 연결하여 담배에 형질전환하여 분석한 결과, 도입된 HSP 및 HSF 유전자의 고온에 의한 유도성 발현을 확인하였으며, 이를 통한 고온 내성의 획득을 확인하였다.

마늘의 형질전환 체계를 확립하기 위하여, 마늘 재배종 4품종의 인편 생장점, 보통엽 조직을 이용하여 캘러스 및 shoot 유기율을 조사하였으며, 생장점 및 보통엽 유래 callus, 미숙총포 조직 등을 이용하여 형질전환 조건을 구명하였다. 형질전환 효율은 미숙총포 조직이 가장 유리한 것으로 나타났으며, 유전자 총을 이용한 방법보다 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 경우, 전처리 2일, *Agrobacterium* O.D.=0.4 농도 조건으로 접종하였을 때, acetosyringone 100 μM이 첨가된 배지에서 공동배양했을 때, 균주는 EHA101을 이용하였을 때 각각의 조건에서 선발배지 내 shoot 유기율이 높게 나타났다. *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용하여 형질전환된 것으로 추정되는 많은 shoot들을 선발하여 GUS 유전자 발현 및 PCR 분석으로 bar

유전자 삽입을 확인하였으며 이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다. 이상의 결과를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

가. 제 1 세부과제 : 「내열성 유전자의 발현조절을 위한 분자수식」과 관련된 연구개발 결과

1) 내열성 관련 유전자의 선발과 특성규명

벼의 세포질에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *OsHSP17.9*를 선발하였다. 선발된 *OsHSP17.9*의 DNA 염기서열의 총 길이는 3,147 bp로서, 161개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 17.9 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. *OsHSP17.9* 유전자는 벼의 genome 상에서 3-5 copy정도 존재하는 것으로 나타났으며, 38℃에서 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 오히려 발현량이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 42℃에서 처리 후 10분부터 발현이 유도되기 시작하여, 30분에 최대치를 나타내었으며, 그 후 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

벼의 엽록체에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *OsHSP26*을 선발하였다. 선발된 *OsHSP26* cDNA의 총 길이는 1,026 bp였으며, 239개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 26.6 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. *OsHSP26* 유전자는 벼의 genome 상에서 single copy로 존재하는 것으로 나타났으며, 39℃에서 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 42℃에서 처리 후, 20분부터 발현이 유도되기 시작하여, 2시간에 최대치를 나타내었으며, 그 후 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

배추의 세포질에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *BcHSP17.4* cDNA의 총 길이는 732 bp이며, 157개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 17.4 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다.

벼의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* cDNA의 총 길이는 1,377 bp였으며, 353개의 아미노산으로 구성되는 하나의 ORF를 포함하는 것으로 나타났다. *OsHSF13* 유전자는 벼의 genome 상에서 2 copy 이상 존재하는 것으로 나타났으며, 이 유전자는 벼의 생육온도인 28℃에서도 발현되며, 온도가 증가할수록 발현량이 조금씩 증가하는 경향을 나타내었으나 47℃에서는 감소하는 것으로 나타났다.

2) 내열성 유전자의 도입과 내열성의 획득

저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 식물의 고온내성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector의 35S promoter 하류에 연결한 다음, 모델식물인 담배에 각각 형질전환하였다. Southern blot 분석 및 PCR 분석으로 외래의 저분자량 HSP 유전자가 도입되었음을 확인한 다음, Northern blot 분석을 통하여 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

형질전환된 담배에서 heat shock 처리 후, 광합성 효율을 온도의 증가에 따른 chlorophyll 형광의 Fo 및 Fv 값의 변화로 분석하였다. 그 결과, lmw HSP의 발현량이 높을수록 Fo의 증가율이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 광합성 효율을 나타내는 Fv/Fm와 광양자수율을 나타내는 1/Fo-1/Fm 치를 각각 측정한 결과, 광합성이 완전히 없어지는 온도인 52℃에서의 활성의 1/2이 되는 온도가 wild-type 식물체보다 약 2℃ 정도 증가되었다. 따라서 lmw HSP는 고온 스트레스 하에서 광화학계를 안정화시키고, LHCII의 분리를 억제함으로서 광합성기구를 보호하는 것으로 나타났다.

형질전환 식물체의 고온에 대한 내성의 획득여부를 유식물체 수준에서 조사하였다. Wild-type 식물체와 형질전환 식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, wild-type 식물체는 전부 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 80%가 생존하여 고온에 대한 내성의 획득을 나타내었다.

3) 내열성 유전자 발현조절영역의 탐색

내열성 유전자의 고온 특이적인 발현에 관여하는 조절영역을 탐색하기 위하여, *OsHSP17.9* 유전자의 promoter를 이용하여, heat shock element 등의 특이서열을 중심으로 promoter deleted clone을 구축하였다. *OsHSP17.9*의 -579 bp까지의 조절영역을 포함하는 construct I, -360 bp까지의 construct II, -237 bp까지의 construct III, -108 bp까지의 construct IV 그리고, 대조구로 promoter를 완전히 제거한 construct Ⅴ 및 35S promoter를 포함하는 construct VI를 각각 제작한 다음, GUS 유전자를 연결하였다.

담배 BY-2 현탁배양세포의 원형질체를 이용한 transient assay 결과, Construct Ⅰ의 GUS 활성이 대조구인 35S promoter에 비해 11.3 배 이상 증가된, 가장 높은 수준을 나타내었으며, construct II의 경우 construct I의 약 59%, construct III의 경우 12% 이하로 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 또한 Construct Ⅳ는 promoter sequence를 완전히 제거한 construct V와 유사한 수준으로 나타나 promoter의 기능을 소실한 것으로 판단되었다.

제작된 construct를 이용하여 형질전환 담배를 구축한 다음, promoter 활성을 RNA 및 단백질 수준에서 확인하였다. 먼저, GUS 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사한 결과, 35S promoter는 30℃ 이상의 고온처리에서는 발현량이 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, promoter가 완전히 제거된 construct V는 모든 온도에서 전혀 발현하지 않는 것으로 나타났다. Promoter가 개변된 constructs의 경우, 25℃, 6시간 및 30℃, 1시간 처리구에서는 모든 construct에서 GUS transcript가 검출되지 않았다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 construct I의 경우 35S promoter보다 약간 증가된 GUS transcript의 축적을 나타내었다. 또한 42℃, 1시간 처리구에서는 construct I이 가장 높은 GUS transcript의 축적을 나타내었으며, construct II에서도 construct I보다는 낮지만 35S promoter보다 높은 상당한 수준의 GUS transcript의 축적을 확인하였다.

Promoter의 활성을 GUS 단백질 수준에서 chemiluminescence 분석으로 확인한

결과, 35S promoter는 처리온도에 따른 변화를 나타내지 않았으며, construct V는 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. Promoter가 개변된 constructs의 경우, 25℃에서는 모든 construct에서 promoter가 완전히 제거된 construct V와 동일한 수준으로 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 2배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었다. 42℃, 2시간 처리구에서는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 20배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었으며, construct II의 경우 35S promoter에 비해서 8배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었다.

4) 조절영역 확정 발현 vector의 구축과 형질전환 식물체의 분석

OsHSP17.9 유전자의 조절영역의 탐색을 통하여 내열성 유전자의 고온에 의한 발현유도에 필수적인 것으로 나타난, -579 bp promoter sequence에 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9*, *OsHSP26* 및 *OsHSF13* 유전자를 연결하여, 내열성의 획득을 위한 최종 construct로서 pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13을 각각 제작하였다. 구축된 constructs를 담배에 각각 형질전환한 다음, HSP 및 HSF 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사하였다. 그 결과, 25℃에서는 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되지 않았다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 비교적 낮은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 나타나기 시작하였으며, 42℃, 1시간 처리구에서는 4 constructs에서 모두 매우 높은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적을 나타내었다.

최적 promoter에 의한 고온에서의 lmw HSP 및 HSF의 과발현이 식물체 전체의 고온에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 T1 식물체 수준에서 조사한 결과, 부분적인 내열성의 획득을 나타내었다. 즉, 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, wild-type 식물체는 완전히 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 30-50% 이상의 생존율을 나타내었다. 형질전환 식물체에서 식물체의 생존율이 약 30-50% 정도로 비교적 낮게 나타난 것은 T1 세

대의 heterozygous line을 이용함으로서, 약 25%의 비형질전환 식물체가 포함된 영향으로 생각된다.

나. 제 1 협동과제 : 「마늘 형질전환체계의 확립」과 관련된 연구개발 결과

마늘은 전세계적으로 영양번식만으로 계속 유지되어 온 까닭에 바이러스 이병에 의한 수량감소와 품질저하를 가져옴은 이미 알려진 사실이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 무병종구의 생산 및 증식, 가임마늘간 교잡에 의한 신품종 육성 등의 연구가 진행 중이나 연 6-12배 정도의 낮은 증식율과 가임마늘 유전자원의 수와 변이의 폭이 좁아 연구결과가 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 마늘의 생산성을 높일 수 있도록 마늘의 형질전환 체계를 확립하여 개발된 내열성 유전자 또는 노쇠유전자를 마늘에 도입하고자 하였다.

마늘 재배종 4품종의 인편 생장점을 식물생장조절제의 종류와 농도를 달리한 배지에 치상하여 캘러스를 배양해 본 결과, LS 기본배지에 2,4-D 및 BA를 각각 2.0 mg/l씩 첨가한 CII 배지에서 callus 유기율이 높았다.

조직배양 효율을 높이기 위해 인편내 생장점 외에 보통엽 조직을 치상시기와 절편위치 등의 처리를 달리하여 치상한 결과, 엽이 1-2cm 출현 시기에 인편기부에서 1-2cm 위치의 제 1보통엽 조직을 0.5cm 절편크기로 치상하였을 때 callus 유기율이 가장 높았다. 미숙총포는 배양 결과 NAA 1.0 mg/l, BA 1.0 mg/l, sucrose 6% 농도 조건에서 shoot 분화 상태 및 구비대 정도 모두 양호하였다.

생장점 및 보통엽 유래 callus, 미숙총포 조직 등 여러 조직으로 형질전환 조건을 구명하고자 하였으나, 형질전환 후 callus를 거치는 경우 재분화율의 급격한 감소로 효율이 떨어지므로 미숙총포 조직만을 주로하여 형질전환 조건 구명 및 유용 유전자를 도입하였다.

미숙총포 절편은 kanamycin 150mg/l, hgromycin 20mg/l, PPT 1.0mg/l의 농도조건에서 배양하였을 때 모두 고사하였으므로 이를 형질전환체 선발농도로 이용하였다.

단자엽 작물에서 많이 이용되는 유전자 총으로 텅스텐 입사위치와 헬륨가스압을 달리 하여 형질전환을 수행한 결과 차이를 보였으나, 효율면에서는 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건을 알아본 바, 전처리 2일, *Agrobacterium* O.D.= 0.4 농도 조건으로 접종하였을 때, acetosyringone 100uM 첨가된 배지에서 공동배양했을 때, *Agrobacterium* 균주는 EHA101을 이용하였을 때 각각의 조건에서 선발배지내 shoot 유기율이 높았다. *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용한 형질전환한 후 kanamycin, PPT가 포함된 배지에서 GUS, 제초제저항성, 내열성유전자 등이 도입된 것으로 추정되는 많은 shoot들이 선발되었고, 이 중 많은 shoot로부터 GUS 유전자 발현 및 PCR 분석으로 bar 유전자 삽입을 확인하였으며 이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다.

제 2 절 활용에 대한 건의

본 연구에서는 내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산을 위하여, 먼저 식물에서 내열성에 관여하는 것으로 밝혀진 저분자량 heat shock protein (HSP) 유전자와 HSP 유전자의 발현조절에 관여하는 것으로 알려진 heat shock factor (HSF) 유전자를 분리하였다. 분리한 유전자를 모델식물인 담배에 형질전환하여 분석한 결과, 저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 고온에서의 광합성 효율의 증가와 고온에 대한 내성의 증가에 기여함을 확인하였다. 내열성 유전자 promoter의 탐색을 통하여 *OsHSP17.9* 유전자의 -579 bp promoter sequence를 고온 및 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 하에서 내열성 유전자의 발현유도를 위한 inducible promoter로 확정하였다. 확정된 -579 bp promoter에 배추 유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자와 벼 유래의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* 유전자를 연결하여 담배에 형질전환하여 분석한 결과, 도입된 HSP 및 HSF 유전자의 고온에 의한 유도성 발현을 확인하였으며, 이를 통한 고온 내성의 획득을 확인하였다.

마늘의 형질전환 체계를 확립하기 위하여, 마늘 재배종 4품종의 인편 생장점, 보통엽 조직을 이용하여 캘러스 및 shoot 유기율을 조사하였으며, 생장점 및 보통엽 유래 callus, 미숙총포 조직 등을 이용하여 형질전환 조건을 구명하였다. 형질전환 효율은 미숙총포 조직이 가장 유리한 것으로 나타났으며, 유전자 총을 이용한 방법보다 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 경우, 전처리 2일, *Agrobacterium* O.D.=0.4 농도 조건으로 접종하였을 때, acetosyringone 100 μM이 첨가된 배지에서 공동배양했을 때, 균주는 EHA101을 이용하였을 때 각각의 조건에서 선발배지 내 shoot 유기율이 높게 나타났다. *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용하여 형질전환된 것으로 추정되는 많은 shoot들을 선발하여 GUS 유전자 발현 및 PCR 분석으로 bar 유전자 삽입을 확인하였으며 이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다.

따라서, 본 연구에서 획득한 내열성 관련 유전자 (*BcHSP17.4, OsHSP17.9, OsHSP26, OsHSF13*)와 이들 유전자의 고온 특이적인 발현을 위한 최적 promoter, 이들을 이용하여 구축한 각각의 construct 그리고 마늘 형질전환 체계 및 본 연구의 수행과정을 통하여 축적된 기술 등을 보다 효율적으로 활용하여 효과를 극대화시키기 위한 방안 및 활용 가능성은 다음과 같다.

1. 연구결과보고서를 관련기관 또는 관련 종묘회사, 생명공학업계 및 관련 연구자에게 배부하여 적극적으로 홍보한다.
2. 종묘회사 및 작물육종과 관련된 생명공학 업계와의 유상 및 무상으로 기술이전을 도모하여 연구결과를 최대한 활용한다.
3. 관련분야 국내외의 학술지에 연구결과를 발표하고 각종 학술회의에 발표하여 연구내용을 검증받고 홍보한다.
4. 형질전환 식물체를 이용한 분석 결과 고온에서의 광합성 효율의 증가와 고온에 대한 내성의 증가에 기여하는 것으로 나타난 내열성 관련 유전자 (*BcHSP17.4, OsHSP17.9, OsHSP26, OsHSF13*)를 관련 기관 및 연구자에게 적극 홍보하여 주요 작물의 하고현상 극복을 통한 생산성 향상 연구에 활용하게 한다.

5. 고온에서의 내열성 유전자의 발현유도 뿐 만 아니라 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 하에서의 발현유도를 위한 inducible promoter로의 유용성을 확인한 *OsHSP17.9* 유전자의 -579 bp promoter를 관련 기관 및 연구자에게 적극 홍보하여, 세포 내에서의 유전자 발현조절 기작의 연구 등에 활용하게 한다.
6. 본 연구를 통하여 구축된 constructs 및 형질전환 식물체를 관련 기관 및 연구자에게 적극 홍보하여 내열성과 관련된 세포 내 기작의 연구에 활용하게 한다.
7. 본 연구를 통하여 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현 유도를 통하여 내열성의 획득이 가능한 것으로 나타났으므로, 이를 마늘 등의 주요 작물에 도입하여 생산성 향상을 통한 농가소득 증대에 활용하기 위해서는 지속적인 연구와 투자가 추가되어야 할 것으로 생각된다.
8. 마늘의 형질전환체계 확립으로 제초제 내성, 바이러스 저항성 등의 유용유전자의 도입이 가능하게 되므로 우수한 특성을 갖는 마늘의 개발이 가능하다. 또한 형질전환 기술과 조직배양에 의한 대량증식 기술은 백합 등 영양번식을 하는 화훼류의 품종개량 및 대량증식에도 응용될 수 있다.
9. 현재 해외에서 생명공학적으로 육성된 품종들이 급격히 시장을 장악하고 있으며, 이러한 흐름은 자본력이 강한 다국적 기업들이 생명공학적 품종 육성에 오랜 기간, 많은 투자를 통해 얻는 결과이다. 이러한 흐름 속에서 본 과제에서 확립한 형질전환 체계는 그 유용성이 국제적으로 앞서 나갈 것이며, 이를 응용하여 얻어지는 형질전환 개체들은 앞으로 농민의 기대에 부응하는 새로운 유전자를 지닌 마늘 품종을 만드는데 결정적인 역할을 할 것이다.
10. 마늘의 형질전환 연구의 경우 다른 작물과 달리 인편의 장기 저장 어려움, 미숙총포의 짧은 채취시기, 재분화 및 구비대에 소요되는 긴 시간 등의 문제로 형질전환 조건 구명을 위한 처리도 충분한 반복 및 보완실험이 이루어지지 못하는 어려움이 있으며, 또한 조직배양만을 거친 재분화 식물체로부터 기내 구비대를 유도하고 포장에서 단구를 획득하기까지 2년이 소요됨을 고려할 때 3년

간의 실험 기간으로 형질전환된 마늘을 얻기엔 불가능하였다. 전세계적으로 정식으로 보고된 마늘 형질전환 사례가 없는 것을 고려할 때 연구기간 중에 얻어진 실험결과들은 아주 성공적이며 그 가능성이 크다 하겠다. 따라서 마늘의 특수성과 형질전환 연구의 어려운 점을 고려하여 확인된 형질전환 방법을 체계화 및 새로운 유용유전자의 개발 및 도입연구는 계속 수행될 필요가 있다.

11. 연구수행 중 획득한 첨단기술은 국내 생명공학 관련분야 (유전자 조작 및 식물육종) 정보의 database로 활용할 수 있으며, 본 연구에서 획득한 유전자는 생물자원으로서 중요한 가치를 지닌다.

제 3 절 본 과제와 관련된 발표실적

가. 국내외 전문 학술지

1) Ki-Yong Kim, Yo-Soon Jang, Byung-Hyun Lee and Jinki Jo. 1998. Expression and accumulation of lmw HSPs under various heat shock conditions. J. Korean Grassl. Sci. 18(4):303-310

2) 이병현, 조진기. 1999. 엽록체 small heat shock protein의 도입에 따른 형질전환 식물체의 광합성 활성 및 고온내성의 증가. 경북대 농학지. 17:15-20.

3) 이병현, 이효신, 원성혜, 조진기. 1999. *Agrobacterium*을 이용한 내열성 유전자의 벼로의 형질전환 및 발현. 경북대 농학지. 17:39-44.

4) 이병현, 이효신, 원성혜, 조진기. 1999. 벼 small HSP의 발현에 의한 대장균의 고온 stress 하에서의 내성의 증가. 경북대 농학지. 17:59-64.

5) Byung-Hyun Lee, Sung-Hye Won, Hyo-Shin Lee, Mitsue Niyao, Won-Il Chung, In-Jung Kim and Jinki Jo. 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. Gene. 245:283-290.

6) Byung-Hyun Lee, Sung-Hye Won, Ki-Yong Kim, Hyoshin Lee Jinki Jo.

2000. Increased thermotolerance of transgenic rice plant by introduction of thermotolerant gene. J. Korean Grassl. Sci. 20(2):97-102.

나. 학술회의 Proceeding

1) **김기용, 임용우, 최기준, 신재순, 조진기**. 1998. **내열성 유전자 도입에 의한 내하고성 오차드그라스 개발**. **한국초지학회 학술발표회 논문초록**. pp. 14.
2) **최윤정, 이효신, 김기용, 이병현, 조진기**. 1998. **식물체로부터 내열성 유전자의 선발과 구조 및 특성규명**. **한국초지학회 학술발표회 논문초록**. pp. 14-15.
3) **이병현, 원성혜, 이효신, 조진기**. 1998. **엽록체형 저분자량** HSP cDNA**의** cloning **및 유전자 도입에 의한 고온내성의 증가**. **한국초지학회 학술발표회 논문초록**. pp. 17-18.
4) Lee, B.H., J. Jo, M. Mitsue. 1998. Characterization of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco and the acquisition of thermotolerance in transgenic tobacco. **한국분자생물학회 추계학술대회 초록집**. pp. 248.
5) **김도선, 우종규, 정혜욱, 김정윤, 김기택**. 1998. **마늘의 형질전환을 위한 조직배양 연구**. **원예과학기술지** 16(3):437
6) **김기용, 임용우, 최기준, 김원호, 신재순, 조진기**. 1999. **내열성 유전자 도입에 의한 알팔파의 형질전환**. **한국초지학회 학술발표회 논문초록**. pp. 71.
7) **이병현, 원성혜, 이효신, 김기용, 김미혜, 정동민, 조진기**. 1999. **벼로부터** chloroplast small heat shock protein cDNA**의** cloning **및** characterization. **한국초지학회 학술발표회 논문초록**. pp. 71-72.
8) Kim, D.S., T.K. K.T. Kim, H.S. Choi, K.S. Lee, J.G. Woo, D.G. Oh. 2000. Transformation of Garlic (*Allium sativum* L.) Using Particle-bombardment and *Agrobacterium*-mediated Methods. Kor. J. Hort. Sci. & Technol. 18(5):697.

9) **김기용, 임용우, 최기준, 성병렬, 한학석, 박근제, 조진기**. 2000. BcHSP17.6 **유전자 도입에 의한 알팔파 형질전환 및 재분화. 한국초지학회 학술발표회 논문초록**. pp.102.

다. 특별강연 및 강습회

1) **조진기**. 1998. Heat shock protein **유전자 도입에 의한 고온내성 식물의 창출. 농촌진흥청 원예연구소.**
2) **조진기**. 2000. Heat shock protein **유전자의 도입에 의한 내열성 형질전환 목초의 창출. 농업과학협회.**

라. 기타

1) **조진기**. 1999. Heat Shock Protein **유전자 도입에 의한 고온내성식물의 창출. 농경과 원예**. 8**월호** pp. 86-90.
2) **최윤정**. 1998. **벼** genomic DNA library**의 구축과** low-molecular-weight heat shock protein **유전자의 선발 및 특성 해명. 경북대학교 석사학위논문.**
3) **정동민**. 2000. *OsHSP17.9* **유전자의 조절영역 분석을 통한 발현양상 해명. 경북대학교 석사학위논문**

SUMMARY

This project, " Mass production of high-productive garlic by introduction of HSP related genes" consists of a main subject and a joint subject. The former is on the molecular modification of thermotolerant genes for regulation of the gene expression. The latter is on the establishment of an efficient transformation method for garlic. The results obtained are summerized as follows :

1) Results on 「**the molecular modification of thermotolerant genes for regulation of gene expression**」

① Cloning and characterization of HSP and HSF genes

A rice genomic clone, *OsHSP17.9,* encoding the cytoplasm-localized lmw HSP was isolated. The determined sequence of *OsHSP17.9* was 3,147 bp and had only one uninterrupted open reading frame (ORF) of 493 bp. The ORF encodes a polypeptide of 161 amino acid residues with a predicted molecular weight of 17.9 kDa. Southern blot analysis suggested that there were at least three copies for the cytoplasmic class I lmw HSPs in rice plants. Transcripts of *OsHSP17.9* were not detected at 28℃, but were accumulated at temperatures of 38℃ and higher. The level of transcripts was the highest at 42℃ but slightly decreases at 45℃.

A rice cDNA clone, *OsHSP26* encoding the chloroplast-localized lmw HSP was also isolated. The *OsHSP26* cDNA is 1,026 bp long and it has only one uninterrupted ORF of 720 bp which encodes a polypeptide of 239 amino acid residues with a predicted molecular weight of 26.6 kDa. Southern blot analysis

indicates that the *OsHSP26* gene was encoded by a single gene in the rice genome. The *OsHSP26* gene was expressed following heat stress: the transcript level was the highest when rice leaves were treated at high temperatures for 2 h of 42℃, and the transcripts became detectable after 20 min treatment and reached the maximum level after 2 h treatment.

A Chinese cabbage cDNA clone, *BcHSP17.4*, encoding the cytoplasm-localized lmw HSP was isolated. The *BcHSP17.4* cDNA is 732 bp long and it has only one uninterrupted ORF of 474 bp which encodes a polypeptide of 157 amino acid residues with predicted molecular weight of 17.4 kDa.

A rice cDNA clone, *OsHSF13*, encoding the heat shock factor was isolated. The *OsHSF13* cDNA is 1,377 bp long and has only one uninterrupted ORF of 1,062 bp which encodes a polypeptide of 353 amino acid residues. Southern blot analysis suggested that there were at least two copies for the HSF in rice plants. The *OsHSP26* gene was expressed at normal temperature of 28℃, and was increased at temperatures of 38℃ and higher.

② Acquisition of thermotolerance by HSP overproduction

To investigate the function of the lmw HSP, we have developed transgenic tobacco plants that show constitutive expression of the lmw HSP (*OsHSP17.9*, *OsHSP26* or *BcHSP17.4*, respectively). Effects of constitutive expression of the introduced gene of thermotolerance were proved by the chlorophyll fluorescence. After 5 min incubation of leaf discs at high temperature regimes, an increase in the Fo level and a decrease in the Fv level indicating the separation of LHCII from PSII and inactivation of electron transport reactions in PSII, were mitigated by constitutive expression of lmw HSP. When tobacco plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52℃ for 45 min and subsequently

incubated at 25℃, non-transformants were gradually became white and all of them died while more than 80% of transformants remained green and survived. This result suggests that the lmw HSP functions in protecting the plant during heat stress.

③ Promoter assay of *OsHSP17.9*

To investigate the promoter sequences that regulate the high-temperature specific expression of HSP gene, chimeric genes consisting of different sizes of *OsHSP17.9* promoters and the coding region of the reporter *GUS* gene were constructed. Construct **I** containing -579 bp sequences from translation start site, construct **II** containing -360 bp, construct **III** containing -237 bp, and construct **IV** containing -108 bp have been prepared. We have also made both construct **V** which is removed all the promoter sequences as a negative control and construct 35S containing CaMV 35S promoter sequences as a positive control. They were treated with PEG for tobacco BY-2 protoplasts, and their promoter activity was examined by measuring the GUS activity. The GUS activity showed a maximum in construct I and the activity was 11.3 times higher than construct VI having 35S promoter. Deletion clones with less promoter sequences resulted in the decreased GUS activity.

All constructs are also transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum*) and their promoter activity were examined by Northern blot analysis and chemilluminescence assay. Northern blot analysis showed that the GUS was induced at 30℃ for 6 h in only construct I with slightly higher level than that of construct VI with 35S promoter. The transcript level was the highest in construct I when heat treated at 42℃ for 1 h, and the level of construct II was also higher than construct VI at the same treatment.

Chemilluminescence assay showed the same results as the northern blot analysis. The GUS activity was detected with background level under treatment at 25℃ in all constructs except for the construct VI with 35S promoter. The activity was increased about 2 times higher than that of construct VI at 30℃ for 6 h in construct I. Moreover, the maximum activity was detected in construct I under the heat treatment at 42℃ for 2 h and the activity was 21 times higher than construct VI. And the activity of construct II was also higher than that of construct VI with about 8 times at same treatment.

④ Transformation of promoter-HSP/HSF constructs and acquisition of thermotolerance

Because the construct I having the -579 bp sequences from transcription start site of *OsHSP17.9* promoter showed the highest transcriptional activity under heat stress in our previous work, we concluded that the -579 bp sequences were indispensible for full promoter activity in heat stress inducible expression. We constructed pIG579-HSP vectors (pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26, and pIG579-HSF13, respectively) to obtain the thermotolerance of transgenic plants.

To examine the thermo-inducible expression of introduced genes in transformed plants, a northern blot analysis was performed after heat treatment with 25℃, 30℃, and 42℃ for 1-6 h, respectively. The transcripts of introduced genes were not detected at 25℃ for 6 h. However, the accumulation of the transcripts was initiated at 30℃ for 6 h and increased significantly at 42℃ for 1 h.

To identify the acquisition of thermotolerance by heat inducible expression of HSP or HSF with control of the -579 bp promoter of *OsHSP17.9*, tobacco

plantlets were treated at 52℃ for 45 min. More than 30-50% of transformants survived whereas non-transformants dried out at the same treatment. The relatively low survival rate of 30-50% was because that transformants analysed were not homozygous lines but heterozygous ones of T1 plants.

2) Results on 「**Establishment of a efficient transformation method for garlic**」

Garlic has been multiplied vegetatively because of its sexual sterility; consequently, viral diseases are a very serious problem.

Meristem-tip culture is proved to be useful for eliminating viruses from infected plantlets. Although meristemming could be a solution for the yield enhancement, the technology has not been widely applied in the industry due to low multiplication rate of garlic. Various in vitro techniques have been studied to device a way to multiply the propagator, but none has been adopted as a practical solution.

In 1980s, there were several reports on fertile garlic clones, and breeding possibility by sexual crosses between them was postulated. But cross-breeding of garlic requires a long period of careful breeding manipulations. Furthermore, the diversity of garlic germplasm for cross-breeding is known to be quite narrow. Genetic transformation, amid being tested in many seed- and vegetatively propagated crops, has received much attention as an important alternative for improving garlic varieties.

In this report we have tried to establish a efficient transformation method for garlic to introduce useful foreign genes, heat- or herbicide-tolerant genes. A reporter gene, β-*glucuronase* (GUS) and/or selectable marker herbicide-tolerant gene, were chosen to test the protocol.

Callus was induced from explants of either apical meristems and foliage leaves of garlic on LS medium containing 2.0 mg/l 2,4-D and 2.0 mg/l BA, and plant regeneration was carried out. Callus formation was effective in the explants of the first leaf segment, 1-2 cm distance from the basal plate, at the sprouts grow 1-2 cm in size.

For the transformation, we used calli derived from meristems and foliage leaves. The calli howed very low transformation frequency in selection medium, thus immature scapes were tried for the transformation. The immature scapes were regenerated on MS medium containing 1.0 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA, and 6% sucrose.

The immature scape, inside which the floral organs and bulbils are positioned, were transformed using particle-bombardment or *Agrobacterium*-mediated methods. The explants were bombarded with tungsten particle coated with pCAMBIA3301 in various condition of He gas pressure and vacuum chamber size. *Agrobacterium*-mediated method showed more effective transformation frequency than particle-bombardment.

After preculture for 2 days, the explants inoculated with bacterial liquid suspension (OD=0.4) and cocultivated for 4 days showed the highest frequency of shoot regeneration on selection medium. Inoculation of *Agrobacterium* EHA101 on cocutivation medium supplemented with 50 uM acetosyringone at pH 5.2 was the most effective in transformation frequency.

After 2-3 months, regenerated shoots were observed on selection medium in both methods. Putative transformants from independent transformation events were selected and regenerated after 2 to 3 months on medium containing kanamaycin and PPT. Among these shoots, GUS activity was observed and gene insert was confirmed by PCR analysis with specific primer for *bar* gene. We are in the process of multiplying plantlets obtained from the study.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

1. 마늘의 하고현상 (夏枯現象)

마늘은 양념채소로서 뿐 만 아니라 건강식품과 항암제 등의 의약품원료로서 이용되는 채소식물로서 우리나라 뿐 만 아니라 세계적으로도 점차 그 중요성이 널리 인식되고 있다. 마늘은 지중해성 기후에 적합한 작물로서 우리나라와 같이 여름이 무더운 기후환경 아래에서는 하고현상 (summer depression)이 심하여 정상적인 생육이 어려우며 6월 중순 이후에는 식물체의 지상부가 고사하여 광합성이 중단되므로 말미암아 마늘의 생산성이 급격히 떨어지는 문제점을 안고 있다. 마늘의 생육적온은 20-23℃ 정도이므로 이보다 높은 온도에서는 광합성 관련 효소들이 고온저해를 받으며 결과적으로 마늘 생산량의 감소로 이어지게 된다. 지중해 연안국에서 생산된 마늘이나 우리나라의 해안지방에서 생산되는 난지형의 마늘이 한지형의 마늘보다 굵은 것은 하고현상에 의한 생산량 감소의 증거로서 제시될 수 있다.

하고현상을 일으키는 식물들은 내열성 유전자의 발현량이 적은 것이 특징이므로 이들 식물에 내열성 유전자를 도입하면 하고현상을 극복할 수 있고 따라서 생산량을 증대시킬 수 있다. 마늘은 생장특성상 지상부의 생장이 끝나는 6월경, 즉 마늘이 하고의 피해를 받기 시작하는 시기에 도달 했을 때 bulb의 생장이 급격히 커지기 시작하는데, 만일 이 시기에 하고의 피해가 극복 될 수 있다면 생산량은 매우 많이 늘어나리라 예상된다.

2. 내열성 유전자 (HSP gene)

모든 생물세포에서는 고온에 의하여 내열성 유전자가 발현된다. 즉, 모든 생물

은 생육적온보다 5-10℃ 이상의 고온에 노출되면 대부분의 정상적인 mRNA와 단백질의 합성이 억제되고, heat shock protein (HSP)이라 불리는 일련의 단백질들이 합성된다. 진핵생물 내에서 합성되는 HSP는 분자량에 따라 크게 5 종류로 분류되어지는데, 주로 HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15-30 kDa의 저분자량 (lmw; low molecular weight) HSP로 분류된다. 고등식물에 있어 내열성의 획득에 관한 지금까지의 연구보고에 따르면 식물에서는 저분자량 HSP이 내열성의 획득과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 저분자량 HSP는 고온 스트레스 하에서 세포 내 단백질의 변성방지 및 단백질 간의 응집 등을 방지하는 분자 chaperone의 기능을 수행함으로서 식물의 내열성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

3. 내열성 유전자 발현의 조절

유전자들은 식물체 내에서 항상적으로 발현되거나 또는 필요가 있을 때만 발현하게된다. 기초대사에 관여하는 효소들의 유전자들은 항상적으로 발현 (constitutive expression)을 하지만 특수한 조직에서만 필요한 단백질이나 효소들은 조직 특이적 발현 (tissue specific expression)을 하며, 생장시기에 따라서 필요한 효소들은 생장시기 특이적인 발현 (life cycle specific expression)을 하게되며, 환경에 적응하기 위하여 발현되는 유전자들을 유도효소 유전자 (inducible enzyme gene)라고 한다. 예컨대 식물에서 30cC 이상의 고온에서만 발현되는 저분자량 HSP 유전자는 일종의 유도효소 유전자에 속한다. 이 유도효소 유전자를 식물에 도입하여 형질전환식물을 만들 때 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid 계, 예를 들어 pBI121 등을 사용하면, 도입된 유전자는 35S promoter에 의해서 항상적 발현을 하게되고, 고온환경이 도래하기 전에 발현되어 생산되는 HSP는 식물에 무익하여 에너지 경제상 불리하며 식물 생육에 마이너스적인 효과를 가져오게 된다. 따라서 유용유전자의 형질전환에 의한 주요 작물의 생산성 향상을 위한 최근의 연구동향은 도입된 유전자의 최적화된 발현을 위한 promoter의 개발에 집중되는 추

세이며, 본 연구에서도 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현을 위한 최적화된 조절 영역의 탐색을 통하여 형질전환 식물체 내에서 도입된 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현과 이를 통한 내열성의 획득이 가능하리라 생각된다.

4. 마늘의 형질전환

마늘은 우리나라의 연간 생산액이 약 1조원에 달하며 전체 채소생산량의 거의 27%를 차지하는 매우 중요한 채소작물이다. 그러나 마늘의 국내가격이 국제시세의 4-5배에 달하므로 자칫 마늘 연구를 소홀히 하면 국산 마늘이 외국산 마늘에 의하여 점령당할 수도 있을 것이다. 마늘의 생산성을 높이는 방법에는 여러 가지가 있겠으나 가장 확실한 방법은 마늘에 유용유전자를 도입하는 길이다. 그러므로 여러 연구자들에 의하여 마늘의 형질전환에 관한 연구가 진행되고 있으나 아직 이렇다 할 결과를 얻지 못하고 있다. 본 연구에서는 내열성 유전자를 마늘에 도입함으로서 마늘의 생산성을 획기적으로 높이려고 하고 있으나 아무리 좋은 유전자를 확보했다고 하더라도 이들 유전자를 식물에 도입하지 않으면 아무 소용이 없으므로, 본 연구의 제 1 협동과제에서 차제에 마늘의 형질전환법을 체계화하여 마늘연구의 총본산인 원예연구소에서 그 확실한 기술을 보유하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 내열성 유전자의 발현조절을 위한 분자수식

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	1. 벼 genomic DNA library의 구축	① Genomic DNA 분리 ② *Sau*3AI 분해 ③ λBlueSTAR에 도입 ④ *In vitro* packaging
	2. 내열성유전자의 선발	① Plating ② Screening ③ 확인
	3. 염기서열 결정 및 특성 분석	① DNA sequencing ② Sequence analysis ③ Southern and Northern blot analyses
	4. 엽록체 HSP cDNA의 선발	① 벼 cDNA library의 구축 ⑤ 엽록체 HSP cDNA의 선발 및 특성규명
2차년도	1. HSP 유전자의 마늘로의 도입을 위한 발현 vector의 구축	① *BcHSP17.4, OsHSP17.9* 및 *OsHSP26*을 이용한 발현 vector의 구축 ② 형질전환 식물체의 구축 ③ 발현양상 및 내열성의 확인 ④ 협동과제에 분양
	2. 내열성 유전자 조절영역의 탐색	① Deletion clone의 제작 ② Reporter gene(GUS)을 가진 vector의 제작 ③ transient assay ④ 형질전환 식물체의 구축 및 분석 ⑤ 발현조절영역 확정
	3. HSF의 선발과 특성규명	① HSF cDNA의 선발 ② DNA 염기서열 결정 및 특성 규명
3차년도	1. 조절영역 확정 발현 vector의 구축	① 확정조절영역에 HSP 유전자 (*BcHSP17.4, OsHSP17.9, OsHSP26*) 및 HSF (*OsHSF13*) 유전자를 연결한 발현 vector의 구축
	2. 구축 vector의 모델 식물에의 도입	① 모델식물의 형질전환 ② 형질전환 식물체의 선발
	3. 형질전환 식물체에서 도입된 유전자의 발현 양상과 내열성의 확인	① 온도에 따른 발현양상의 확인 · 분석 ② 내열성의 확인 ③ 구축 vector의 협동과제에 분양

제 1 협동과제 : 마늘 형질전환체계의 확립

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	1. 조직배양 및 재분화 효율 증진	① 국내 주요 마늘 산지의 재배종 수집 및 유지 ② 각 재배종으로부터 callus 유기 및 증식 ③ 치상조직 및 시기 등을 달리하여 조직배양 효율 증진 방법 연구 ④ 형질전환 기초조건 조사
2차년도	1. 최적 조직배양 조건 구명 (계속)	① 치상조직 : 생장점, 보통엽, 미숙총포 등 ② 배지조건 및 치상환경 : 식물생장조절제 종류 및 농도, 광환경 등
	2. 형질전환 조건 구명 및 효율증진 연구	① 형질전환 기초조건 조사 ② 형질전환 적정조건 구명 ③ GUS를 이용한 형질전환 효율증진 연구
	3. 외래 유용 유전자의 도입 위한 형질전환	① 내열성 유전자의 형질전환 Ⓢ 제초제 저항성 유전자의 형질전환
3차년도	1. 외래 유용 유전자가 도입된 형질전환 마늘 포장재배, 증식 및 분석	Ⓘ 형질전환 shoot 순화 또는 기내소구 획득 후 포장재배하여 증식 Ⓢ 형질전환체 분석 - GUS 발현 분석 (intron 포함 GUS 유전자 대상), PCR 분석 - 제초제 저항성 등 검정
	2. 형질전환 효율증진	Ⓘ *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용한 형질전환 방법 제고
	3. 외래 유용 유전자를 이용한 형질전환 계속	Ⓘ 제초제 저항성, 내열성 (제1세부과제 개발) 유전자 도입 연구

제 2 장 내열성유전자의 발현조절을 위한 분자수식

제 1 절 서설

우리나라와 같이 여름이 무더운 기후환경 아래서는 고온에 의한 작물의 생산성 감소 즉, 하고현상 (summer depression)이 발생한다. 마늘의 경우, 6월 중순 이후에는 식물체의 지상부가 고사하여 광합성이 중단됨으로 인해 마늘의 생산성이 급격히 떨어지는 문제점을 안고 있다. 마늘의 생육적온은 20-23℃ 정도이므로 이보다 높은 온도에서는 광합성 관련 효소들이 고온저해를 받으며 결과적으로는 마늘 생산량의 감소로 이어지게 된다. 지중해 연안국에서 생산된 마늘이나 우리나라의 해안지방에서 생산되는 난지형의 마늘이 한지형의 마늘보다 굵은 것은 하고현상에 의한 생산량 감소의 증거로서 제시될 수 있다.

하고현상을 일으키는 식물들은 내열성 유전자의 발현량이 적은 것이 특징이므로 이들 식물에 내열성 유전자를 도입하면 하고현상을 극복할 수 있고 따라서 생산량을 증대시킬 수 있다. 마늘은 생장특성상 지상부의 생장이 끝나는 6월경 즉 마늘이 하고의 피해를 받기 시작하는 시기에 도달 했을 때 bulb의 생장이 급격히 커지기 시작하는데 만일 이 시기에 하고의 피해가 극복이 될 수 있다면 생산량은 매우 많이 늘어나리라 예상된다.

한편, 생물은 생육적온보다 5-10℃ 이상의 고온에 노출되면 대부분의 정상적인 mRNA와 단백질의 합성이 억제되고, heat shock protein (HSP)이라 불리는 일련의 단백질들이 합성된다. 진핵생물 내에서 합성되는 HSP는 분자량에 따라 크게 5종류로 분류되어지는데, 주로 HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15-30 kDa의 저분자량 (lmw; low molecular weight) HSP로 분류된다. 고등식물에 있어 내열성의 획득에 관한 지금까지의 연구보고에 따르면 식물에서는 저분자량 HSP이 내열성의 획득과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 저분자량 HSP은 고온 스트레스 하에서 세포 내 단백질의 변성방지 및 단백질 간의 응집 등을 방지

하는 분자 chaperone의 기능을 수행함으로서 식물의 내열성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

최근, 기존의 육종방법에 생물공학적 방법을 접목하여 주요 작물을 개량하려는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 그 대표적인 방법 중의 하나가 외래의 유용유전자를 도입시켜 형질전환된 식물체를 육성하여, 형질개량은 물론 신품종의 창출을 기대하는 것이다. 이를 이용하여 내열성에 관여하는 저분자량 HSP 유전자를 마늘을 포함한 경제적으로 중요한 작물에 도입함으로서 고온에 의한 생산성의 감소를 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

또한 지금까지 유용유전자의 형질전환에 관한 대부분의 연구가 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti plasmid 계, 예를 들어 pBI121 등을 사용하였는데, 이 경우 도입된 유전자는 35S promoter에 의해서 항상적 발현을 하게되고, 고온환경이 도래하기 전에 발현되어 생산되는 HSP은 식물에 무익하여 에너지 경제상 불리하며 식물생육에 마이너스적인 효과를 가져오게 된다. 따라서 식물이 고온에 의한 생육저해 즉 하고현상을 나타내는 시기에 - 마늘의 경우, 6-7월경 즉 bulb의 생장이 고온에 의해 저해를 받는 시기에 - 특이적으로 내열성 유전자를 발현하게 함으로서 고온에서의 유도성 발현에 의한 내열성의 효율적 획득이 가능하리라 판단된다.

이를 위하여 본 연구에서는 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현을 위한 분자수식을 위하여, 먼저 배추와 벼의 세포질에 존재하는 저분자량 HSP 유전자인 *BcHSP17.4* 및 *OsHSP17.9* 유전자와 벼의 엽록체에 존재하는 저분자량 HSP 유전자인 *OsHSP26* 유전자 그리고 HSP 유전자의 발현조절에 관여하는 것으로 알려진 heat shock factor (HSF) 유전자인 벼 유래의 *OsHSF13* 유전자를 선발하여 그 특성을 규명하였다. 또한 이들 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector의 35S promoter 하류에 연결하여 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, 저분자량 HSP 유전자의 과발현이 식물의 고온 내성의 획득에 미치는 영향을 조사하였다.

또한 내열성 유전자의 고온 특이적인 발현에 관여하는 조절영역의 탐색을 위하여, 벼의 genomic DNA library로부터 선발한 *OsHSP17.9* 유전자의 promoter sequence를 이용하여 HSP 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 heat shock

element (HSE) 등의 특이서열을 중심으로 promoter deleted clones을 구축한 다음, marker 유전자로 GUS 유전자를 연결하여 원형질체를 이용한 transient assay 및 형질전환 식물체를 이용한 Northern blot 분석과 GUS 활성의 측정을 통하여 다양한 온도에서의 promoter 활성을 탐색하였다.

최종적으로, HSP 유전자의 promoter 탐색을 통하여 확정된 최적 promoter sequence에 저분자량 HSP 유전자인 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자와 HSF 유전자인 *OsHSF13* 유전자를 연결하여 내열성의 획득을 위한 최적화된 발현 vector, pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13을 각각 제작하였다. 구축된 각각의 constructs를 모델 식물인 담배에 형질전환한 다음, 다양한 온도조건 하에서의 HSP 및 HSF 유전자의 발현양상을 확인하고, HSP 및 HSF 유전자의 고온 특이적인 과발현이 식물의 내열성 획득에 미치는 영향을 조사하였다.

위와 같은 내열성 유전자의 발현조절을 위한 분자수식에 관한 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료식물

본 실험의 재료식물로 벼 (*Oryza sativa* L cv. Milyang 23 & Nakdong) 및 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun)를 광도 12,000 lux, 습도 70%, 온도 25-28℃/16시간의 광조건과 20-22℃/8시간의 암조건으로 growth chamber에서 생육시켰다. Transient assay를 위한 담배 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2)의 현탁배양 세포는 7일 간격으로 200 ㎎/ℓ KH_2PO_4, 1.0 ㎎/ℓ thiamin, 100 ㎎/ℓ myo-inositol, 0.2 ㎎/ℓ 2,4-D 및 3% sucrose가 첨가된 MS 배지 (pH 5.8)에서 26℃, 암상태에서 7일 간격으로 계대배양 (130 rpm)하였다.

2. 균주 및 Vector

본 실험에서 사용된 균주 및 vector는 다음과 같다. Plasmid를 이용한 subcloning과 증폭을 위한 숙주균으로 *E. coli* JM109와 DH5α를 이용하였다. 벼의 genomic DNA library 구축을 위한 vector로는 λBlueSTAR *Bam*HI arm DNA (Novagen)를 사용하였으며, cDNA library 구축을 위한 vector로는 λUni-ZAP XR vector (STRATAGENE, U.S.A.)를 사용하였다. Phage DNA로부터 plasmid로의 *in vivo* excision을 위한 숙주균으로는 *E. coli* XL1-blue MRF' 및 BM25.8을 이용하였다. PCR 산물의 subcloning을 위하여 pGEM-T easy vector를 이용하였으며, binary vector로는 pIG121-Hm, pBI101 및 pBI221을 이용하였으며, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 및 EHA101에 각각 형질전환하여 식물체 형질전환에 이용하였다. 그 외 DNA 단편의 subcloning과 DNA 염기서열의 결정을 위하여 pBluescript II SK+ vector를 이용하였다.

3. Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA는 alkaline lysis 법 (Birnboim과 Dolly, 1979)으로 분리하였다. 배양액을 원심하여 대장균 세포만을 회수한 다음, solution I에 현탁하였다. 2 volume의 solution II를 첨가하고 다시 1.5 volume의 solution III를 첨가하여 혼합한 다음, 얼음에 5분간 정치하였다. 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 회수한 다음, phenol/chloroform/isoamylalcohol (phe/chl/iso; 25:24:1; v/v/v) 추출하였다. 2 volume의 ethanol을 첨가하여 -80℃에서 15분 정치한 다음 원심분리하여 DNA pellet을 회수하였다. 70% ethanol 세정 후, 진공건조하여 멸균수에 녹였다.

4. Genomic DNA의 분리

파종 후, 3-4주령 된 잎으로부터 cetyltrimetyl ammonium bromide (CTAB)를 이용한 Murray와 Thompson (1980)의 방법으로 genomic DNA를 분리하였다. 잎 5 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 5 ㎖의 2×CTAB buffer (2% CTAB; 0.1 M Tris, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 1% PVP)를 넣고, 55℃의 항온 수조에서 10분간 정치하였다. Chloroform/ isoamylalcohol (chl/iso; 24:1; v/v)을 첨가하여 실온에서 30분간 교반한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 chl/iso로 한번 더 추출한 다음 1/10 volume의 10×CTAB buffer (10% CTAB; 0.7 M NaCl)와 1 volume의 침전용 buffer (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA)를 첨가하였다. 30분간 교반한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하고 1 M NaCl-TE buffer (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)에 녹인 다음, 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하여 70% ethanol로 2회 세정하고, 진공 건조한 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2.5 mM EDTA)에 녹여 RNase A를 처리하였다.

5. Total RNA의 분리

식물조직으로부터 total RNA의 분리는 guanidine thiocyanate (GTC) 법으로 실시하였다. 식물조직 1 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 4 ㎖의 GTC extraction buffer (4.2 M GTC; 0.5% N-Laurylsarcosyl; 25 mM Na-citrate; 0.1% antiform A emulsion)와 50 ㎕의 β-mercaptoethanol 및 400 ㎕의 3 M Na-acetate (pH 5.2)를 첨가하여 완전히 혼합하였다. 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거하고, phe/chl/iso 추출을 5회 이상 실시하였다. 상층을 회수하여 2 volume의 ethanol을 첨가하여 혼합한 다음, 15,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하였다. 침전물을 1 ㎖의 멸균수에 완전히 녹인 다음, 250 ㎕의 10 M LiCl를 첨가하여, 얼음에 30분간 정치하였다. 15,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하여 70% ethanol로 2회 세정하고, 실온에서 건조한 후

DEPC 처리한 멸균수에 녹였다.

6. 단백질의 분리

식물의 잎 1 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 1 ㎖의 추출용 buffer (50 mM NaH_2PO_4, pH 7.0; 10 mM EDTA; 0.1% Triton X-100; 0.1% sarkosyl; 10mM β-mercaptoethanol)를 첨가하였다. 4℃에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 상층액을 회수하여 -20℃에 보관하였다. 단백질의 농도는 standard protein으로 BSA를 이용한 Bradford 법 (1976)을 이용하여, 595 ㎚에서의 흡광도의 값으로 결정하였다.

7. DNA 조작

DNA의 절단은 제한효소를 첨가 후, 최종 volume이 10-20 ㎕가 되게 조절하여 각각의 효소의 적정온도에서 1 시간 이상 반응시켰다. 두 가지 이상의 제한효소 처리는 먼저 낮은 염 농도에서 활성이 있는 효소를 처리한 다음, phenol 추출 및 ethanol 침전을 통하여 DNA를 회수한 후, 높은 염 농도에서 활성이 있는 효소를 처리하였다. 반응산물은 0.8-1.2% agarose gel에서 TBE buffer (89 mM Tris-borate; 2 mM EDTA)를 사용하여 전기영동하였으며, 이때 running buffer에 ethidium bromide를 최종농도 0.5 ㎍/㎖로 첨가하여 영동한 후, UV transilluminator 상에서 확인하였다.

Gel로부터 DNA의 회수를 위하여, 목적으로 하는 DNA band를 잘라낸 다음, Elu-Quik kit (Schleicher & Schuell, USA)를 사용하여 정제하였으며, 제조회사의 protocol에 따라 실시하였다.

DNA ligation은 vector와 insert DNA의 molar ratio를 1:2-3으로 하여 T4 DNA ligase를 이용하여 실시하였으며, 반응온도는 sticky end의 경우 16℃에서, blunt end의 경우는 22℃에서 각각 12시간 이상 반응시켰다.

DNA의 조작을 위한 기타 DNA modifying enzyme의 처리는 제조회사의 protocol에 따라 실시하였다.

8. 대장균의 형질전환

가. 대장균 competent cell의 준비

대장균 세포의 single colony를 3 ㎖의 LB 배지에 접종한 다음, 37℃에서 8시간 이상 진탕배양하였다. 배양액 400 ㎕를 다시 40 ㎖의 LB 배지에 접종한 다음, 37℃에서 A600이 0.4가 될 때까지 배양하였다. 배양액을 얼음에 10분간 정치한 후, 3,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 20 ㎖의 ice-cold 50 mM $CaCl_2$ 용액에 균체를 현탁하여 얼음에 30분간 정치한 다음, 원심분리하여 균체를 회수하고 4 ㎖의 stock buffer (50 mM $CaCl_2$; 15% glycerol)에 현탁하였다. 현탁액을 Eppendorf tube에 100 ㎕씩 분주한 다음, 액체질소에 급속동결하여 -80℃에 보관하였다.

나. 대장균의 형질전환

DNA sample (약 100-200 ng)을 50-100 ㎕의 대장균 competent cell에 첨가하여 혼합한 다음, 얼음에 30분간 정치하였다. 42℃에서 90초간 열처리 한 다음, 다시 얼음에 5분간 정치하였다. 1 ㎖의 LB 배지를 첨가하여 37℃에서 1 시간 배양한 후, 50-100 ㎕를 취하여 선발표지로서 항생제가 첨가된 LB agar plate에 도말하여 37℃에서 colony의 형성을 유도하였다.

9. Southern blot 분석

Genomic DNA를 각각의 제한효소로 절단한 다음, 0.8% agarose gel에서 전기

영동하였다. Gel 상의 DNA를 nylon membrane으로 transfer 하기 위하여 vacuum transfer 장치에 멸균수로 적신 blotting paper와 membrane을 놓고, gel을 얹은 다음 기포를 제거하였다. 진공상태에서 gel 위에 depurination 용액 (0.25 M HCl)으로 10분간, transfer 용액 (0.4 NaOH, 0.6 M NaCl)으로 30분간 처리한 다음, membrane을 회수하여 2×SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate)에 1분간 세정하고 UV-crosslinker (UVP CL-1000, USA)를 이용하여 fixation을 실시하였다.

Probe DNA의 방사능 표식을 위하여 Multiprime Labelling kit (Amersham, RPN1601)를 이용하였다. 10 μℓ (25 ng)의 template DNA를 5분간 끓인 후, 다시 얼음에 5분간 정치하였다. 5 μℓ의 5×labelling buffer, 2.5 μℓ의 random primer/BSA 용액, 26.5 μℓ의 nuclease-free water, 1 μℓ의 Klenow enzyme 및 5 μℓ의 [α-^{32}P] dCTP를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. Hybridization을 위하여 membrane 당 10-15 μℓ의 probe DNA를 5분간 끓여 변성시킨 다음, 얼음에 냉각시켜 첨가하였다.

Membrane에 high stringency hybridization 용액 (50% formamide; 5×SSC; 5× Denhardt's solution; 50 mM Na-phosphate, pH 6.5; 0.1% SDS; 100 μg/mℓ denatured salmon sperm DNA) 또는 low stringency hybridization 용액 (20% formamide; 5×SSC; 5× Denhardt's solution; 0.1% SDS; 100 μg/mℓ denatured salmon sperm DNA)을 각각 9 mℓ 첨가한 다음, 3 mℓ의 50% dextran sulfate를 첨가하여 42℃에서 3시간 동안 prehybridization을 실시하였다. [α-^{32}P] 로 표지한 probe DNA를 첨가하여 42℃에서 18시간 동안 hybridization을 실시한 다음, membrane을 42℃에서 2×SSC-0.1% SDS 용액으로 20분 및 0.1×SSC-0.1% SDS 용액으로 1시간 세정하고, intensifying screen을 이용하여 -80℃에서 X-ray film에 노출시켰다.

10. Northern blot 분석

Northern blot 분석은 Thomas (1983)의 방법으로 실시하였으며, 모든 전기영동 장치는 하루 전에 2% Absolve NEF-971 solution (Daichi chem, Japan)으로 처리

하여 RNase를 제거한 다음 멸균수로 헹구어 사용하였다. 15 ㎍의 total RNA를 5 ㎕의 멸균수에 완전히 녹인 다음, 15 ㎕의 RNA sample buffer와 1 ㎕의 Et-Br (1 ㎎/㎖)를 첨가하였다. 65℃에서 15분간 변성시킨 다음, 1.2% formaldehyde agarose gel에서 40 V, 4시간동안 전기영동을 실시하였다. Gel을 10×SSC로 20분간 세정한 다음 Funapad (Funakoshi, Japan)를 이용하여 capillary transfer 방법으로 gel 상의 RNA를 membrane으로 transfer하였다.

Membrane을 UV-crosslinker로 fixation하고 2×SSC로 5분간 세정한 다음, high stringency 조건으로, Southern blot 분석에서와 동일한 방법으로 hybridization하였다. Hybridization probe로는 각각의 유전자에 특이적인 probe를 PCR로 증폭하여 사용하였다.

11. PCR 증폭

PCR 반응은 *Taq* DNA polymerase reaction buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.5 mM $MgCl_2$; 0.01% gelatin; 0.1% Triton X-100)에 0.2 mM의 dNTP mix, 100 pmol의 sense 및 antisese primers, 100 ng의 template DNA 그리고 2 units의 *Taq* DNA polymerase (Takara)를 첨가하여 수행하였으며, 50 ㎕의 mineral oil을 첨가하여 반응액의 증발을 방지하였다. 반응은 Personal Cycler (Biometra, Germany)에서 30-35 cycle을 실시하였다. 1 cycle은 denaturation을 94℃에서 1분간, annealing을 50-63℃에서 1분간 그리고 extension을 72℃에서 1분간으로 하여 수행하였다. 본 연구에서 사용된 PCR primers는 Table 2-1에 표시하였다.

12. GUS assay

가. Fluorometric assay

Table 2-1. PCR primers used in this study

Primer	Sequence
26Ps	5' - CAGATGCTGGACACGATGGA - 3'
26Pas	5' - CACGCCGTTCTTGAGCTCG - 3'
HSFPs	5' - CCGTTCCTGAGCAAGACG - 3'
HSFPas	5' - GTTGTTGAATTGTCGCAC - 3'
35S-s2	5' - CCCACCCACGAGGAGCATC - 3'
17.4as-1	5' - CACTTCTTCCTTTTTCAGCC - 3'
17.4as-2	5' - TTAGCCGGAGATGTCAATAG - 3'
17.9as-3	5' - AGAAGGGGTCGAACACGTTG - 3'
26as-1	5' - TCCTGGTTGACGTGGACATC - 3'
26as-2	5' - CCTCCTTGTCGTCCTCCATG - 3'
35S-s1	5' - TTCAACAAAGGGTAATATCCGG - 3'
35S-as	5' - CGAAGGATAGTGGGATTGTGC - 3'
-579s1	5' - CGGAGCCCATTTGTGTAAGC - 3'
-360s1	5' - CTACACAGCGGTTAAGTCAG - 3'
-237s1	5' - TCGAGTGGATCCAGGAATAG - 3'
-108s1	5' - AAGAAGCCAGCGATCGAAAG - 3'
HSPPas	5' - AGAGGTCTAGAGAGAAGGGG - 3'
17.9as-2	5' - GGGGATCCCTAGCCGGAGAT - 3'
HSF-as	5' - CTTCCTCATCTGGCTGAGCTC - 3'
GUS-s	5' - AACTGTGGAATTGATCAGCG - 3'
GUS-as1	5' - AAAGACTTCGCGCTGATACC - 3'
GUS-as2	5' - CATAGAGATAACCTTCACCC - 3'
NPTIIs	5' - GAGGCTATTCGGCTATGACTG - 3'
NPTIIas	5' - ATCGGGAGCGGCGATACCGTA - 3'

식물조직으로부터 분리한 단백질 100 ㎍에 50 ㎕의 20 mM 4-MUG (4-methyl umbelliferyl glucuronide)를 첨가하고, 단백질 extraction buffer를 사용하여 1 ㎖로 fill-up한 다음, 37℃에서 배양하였다. 배양 1시간 및 2시간에 각각 400㎕를 취하여 800㎕의 stop solution (0.2M Na_2CO_3)에 혼합하였다. 준비된 sample을 spectrofluorophotometer (RF-5301 PC, SHIMADZU)를 이용하여 365/455 nm에서 β-glucuronidase (GUS) 활성에 의해 생산된 4-MU (4-methyl-umbelliferone)의 fluoroscence를 측정하였다. Blank 실험으로 각각의 시간에 대하여 기질과 완충액만으로 단백질을 포함하지 않는 것을 준비한 다음, 이것을 반응시켜서 background로 하였다. Standard curve는 단백질 extraction buffer에 4-MU를 1 ㎛M에서 1 nM까지 다양한 농도로 희석하여 측정한 다음, 작성하였다.

나. Chemiluminescence assay

Chemiluminescence assay의 측정을 위하여 GUS-Light kit (TROPIX, PE Biosystems)와 TD-20/20 Luminometer (DLReady)를 이용하였다. 식물조직으로부터 분리한 단백질에 180 ㎕의 GUS reaction buffer [Glucuron substrate를 GUS reaction buffer diluent (0.1 M sodium phosphate, pH 7.0; 10 mM EDTA)로 100배 희석]를 첨가한 다음, 단백질 extraction buffer를 사용하여 200 ㎕로 fill-up하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 300 ㎕의 light emission accelator를 첨가하여 3초간 반응시킨 후, TD-20/20 Luminometer를 이용하여 측정하였고, 3 번의 실험결과를 평균하여 결과로 이용하였다.

제 3 절 내열성 관련 유전자의 선발과 특성규명

1. *OsHSP17.9*

가. Genomic DNA library의 구축

벼의 genomic DNA library를 구축하기 위하여, λ BlueSTAR arm DNA (Novagen, USA)와 *in vitro* packaging module (Stratagene, USA)을 사용하였다. 파종 후, 4주령된 벼 (*Oryza sativa* L. cv Milyang23)의 잎으로부터 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)를 이용한 Murray와 Thompson (1980)의 방법으로 Genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Sau*3AI으로 부분 분해한 다음, 10-40% (w/v) sucrose 밀도구배 초원심분리하였다 (28,000 rpm, 22 hrs, 20℃). 9-23 kb의 DNA 단편만을 회수한 후, Klenow DNA polymerase와 dCTP 및 dTTP를 이용하여 양 말단 (GATC)을 partial fill-in하여 vector arm 말단의 *Xho*I half site (CT)와 상보적으로 만든 후, T4 DNA ligase를 이용하여 λ BlueSTAR arm DNA와 ligation하였다. 재조합된 phage DNA를 감염이 가능한 완전한 phage의 형태로 만들기 위하여 *in vitro* packaging한 다음, 숙주균으로 *E. coli* ER1647을 이용하여 구축된 library의 titer를 결정한 결과, 8.51×105 plaque forming unit (pfu)/㎖를 나타내었다. 이를 본 연구에서 사용된 vector, λ blueSTAR에 클로닝 가능한 insert size 9-23 kb의 평균 크기인 16 kb로 계산하면, 1.36×107 kb로서 벼의 genome size 4.3 ×105 kb의 31.6배의 크기를 나타낸다. 따라서, 본 연구에서 구축한 벼의 genomic DNA library는 벼의 전체 genome을 완전하게 포함하는 것으로 판단되었다. 재조합된 phage의 수를 증폭시키고, 불안정한 library를 안정화시켜 보존하기 위하여 숙주균 *E. coli* ER1647을 이용하여 증폭시킨 다음, screening에 사용하였다. 이때 증폭된 library의 titer는 1.85×10℃/㎖을 나타내었다.

나. Genomic DNA library**로부터** HSP genomic clone**의 선발**

HSP genomic clone**의 선발을 위하여** [α-32P] dCTP**로** labelling**된 배추의** HSP 17.4 cDNA**를** probe**로 사용하여** standard plaque hybridization method (Sambrook **등**, 1989)**로** screening**을 실시하였다**. **숙주균으로** *E. coli* ER1647**을 이용하여 직경** 150 ㎜ plate**에** 50,000 plaque**가 형성되도록 도말한 다음**, 37℃**에서 배양하여** plaque**의 형성을 유도하였다**. Plaque**의 크기가** 0.5-1 mm**에 도달한** plate**를** 4℃**에** 2**시간 정치한 다음**, Hybond-N+ nylon membrane (Amersham, USA)**을 얹어** 1**분간 정치하고**, **이때** plate**상의** membrane**의 위치를 표시하였다**. Membrane**을** alkali **변성액** (0.5 M NaOH; 1.45 M NaCl)**을 적신 여과지 위에서** 7**분간 정치한 다음**, **중화액** (1.5 M NaCl; 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2; 1 mM EDTA)**을 적신 여과지 위에서** 5**분간 정치하였다**. Membrane**을** 2×SSC **용액** (0.3M NaCl; 30mM sodium citrate)**으로** 1**분간 세정한 후**, **건조시켜** UV crosslinker (UVPCL-1000, USA)**로** fixation**하였다**. Hybridization bottle**에** membrane**을 넣고** 9 ㎖**의** hybridization **용액** (50% formamide; 5×SSC; 5×Denhardt's solution; 50 mM Na-phosphate, pH6.5; 0.1% SDS; 100 ㎍/㎖ salmon sperm DNA)**과** 3 ㎖**의** 50% dextran sulfate (Wahl et al., 1979)**를 첨가하여** 42℃**에서** 3**시간동안** prehybridization**을 실시하였다**. **벼의** genomic DNA library**로부터** HSP **유전자를 분리하기 위한** probe **합성의** template **로는 배추의** HSP 17.4 cDNA (**김 등**, 1996)**를 이용하였으며**, Rediprime random primer labelling kit (Amersham, USA)**를 사용하여 합성하였다**. Prehybridization **이 끝난** hybridization bottle**에** [α-32P]**로** labelling**된** probe DNA**를 첨가하고** 42℃**에서** 18**시간동안** hybridization**을 실시하였다**. Membrane**을** 1×SSC, 0.5% SDS **용액으로** 42℃**에서** 3**회 세정한 다음 물기를 제거하고** intensifying screen**을 이용하여** −80℃**에서** X-ray film**에** expose**하였다**. **그 결과**, 1**차** screening**을 통하여** 18**개의** positive clone**을 선발하였으며**, **선발된** positive clone**의** phage **원액을** 100**배 희석한 후**, 1**차** screening**과 동일한 방법으로** 2**차** screening**하여** 18**개의 독립된** clone **을 각각 선발하였다** (Fig. 1-1).

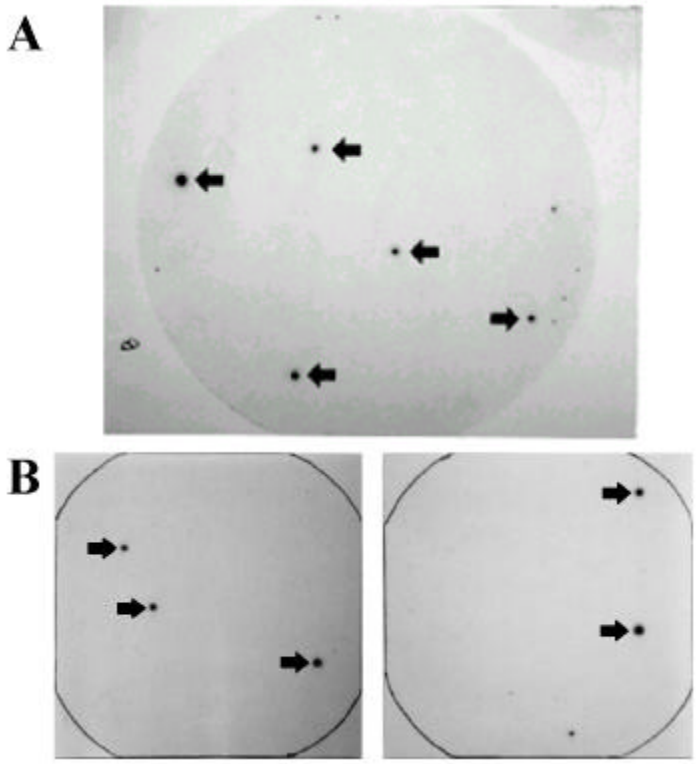


Fig. 1-1. Screening of rice genomic DNA library probed with [α-^{32}P] dCTP labeled *BcHSP17.4* cDNA.

A. Autoradiogram after first screening.
B. Autoradiograms after second screening.

Arrow indicates positive signals.

다. Plasmid pBlueSTAR**로의** *in vivo* excision

Screening**을 통하여 선발된** 18**개의** phage clone**들을** *E. coli* BM25.8**을 이용하여** plasmid**인** pBlueSTAR**의 형태로** *in vivo* excision **하였다**. Plasmid**로 전환된** DNA**를 분리하여 제한효소** *Xho*I**과** *Bam*HI**으로 분해하여** agarose gel **전기영동으로 확인한 결과, 이들** 18**개의** clones**은 그림** 2-2**에서 나타난 것처럼 서로 다른** 6**개의** clones**으로 분류되었으며,** 10 20 kb**의** insert DNA**를 각각 포함하는 것으로 나타났다. 이들** 6**개의** clone **각각을** pBST-HSP 1 6**으로 명명하였다**. *In vivo* excision**된** clones**의 안정화를 위하여,** *E. coli* DH5α**에 형질전환하여 이후의 실험에 이용하였다**.

라. **제한효소지도의 작성**

선발된 clone**의** insert DNA**가 벼의** HSP **유전자를 포함하는지의 여부를 확인하고 또한** insert DNA**의 제한효소 지도를 작성하기 위하여** Southern blot **분석을 실시하였다. 그림** 2-3**은** Southern blot **분석 결과 얻어진** autoradiogram**과 전기영동 사진을 비교하여 작성된** pBST-HSP 1 6**의 제한효소 지도를 보여주고 있다. 선발된** clones**의 제한효소 지도를 분석한 결과** 6**개의** clones**은** 3**개의** type**으로 구분되었다**. 6**개의** clones**의** insert size**는** pBST-HSP2**는** 10.15 kb, pBST-HSP4**는** 10.75kb, **그리고** pBST-HSP6**은** 9.35 kb**로 나타났으며** pBST-HSP1, pBST-HSP3 **및** pBST-HSP5**는** 5′**쪽의 길이만 다를 뿐** pBST-HSP6**와 동일** clone**으로 나타났다**.

마. **염기서열의 결정**

선발된 clones **중에서** Southern blot **분석 결과 상대적으로** signal**이 가장 강하고,** HSP **유전자의 구조 유전자 뿐만 아니라 조절영역을 동시에 포함하는 것으로**

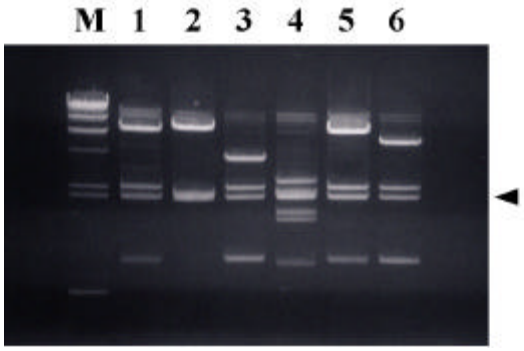


Fig. 2-2. Agarose gel electrophoresis of *in vivo* excised positive clones.

M : DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.
Lane 1-6 : *In vivo* excised pBST-HSP 1-6 were digested with *Bam*HI.
Arrowhead indicates vectors and other bands are inserts.

나타난 pBST-HSP6 (Fig. 2-3)의 DNA 염기서열을 결정하였다. 먼저, pBST-HSP6의 제한효소지도에 근거하여 양 말단이 *Bam*HI인 2.4 kb 단편과 양 말단이 *Sac* II인 1.15 kb와 1.05 kb 단편을 각각 pBluescript II SK+ vector에 subcloning한 다음, 제한효소 분해 및 Southern blot 분석을 통하여 정상적으로 삽입되었음을 확인하였다 (Fig. 2-4). pBST-HSP6의 2.4 kb, 1.15 kb 및 1.05 kb 단편이 삽입된 이들 클론을 각각 pBS2.4, pBS1.15 및 pBS1.05로 명명하였다. 각각의 단편을 포함하는 클론의 양 말단을 제한효소를 이용하여 이중 절단한 다음, ExoIII nuclease와 Mung bean nuclease를 이용하여 nested-deletion한 다음 (Fig. 2-5), Sanger 등 (1977)의 dideoxy chain termination법으로 DNA 염기서열을 결정하였다. Plasmid DNA의 분리에는 Wizard *plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 이용하였으며, ALFexpress AutoRead Sequencing kit (Pharmacia, USA)와 ALFexpress DNA Sequencing System (Pharmacia, USA)을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다.

바. pBST-HSP6의 염기서열 분석

결정된 벼의 pBST-HSP6 유전자의 염기서열을 BLAST와 DNASIS software program (Hitachi, Japan)을 이용하여 확인 및 분석하였다.

결정된 벼 유래의 pBST-HSP6의 DNA 염기서열의 총 길이는 3,147 bp로서, 추정 개시코돈을 기준으로 1,021 bp의 5'upstream region, 483 bp의 full-length cDNA coding region 및 1,643 bp의 3'downstream region으로 구분되었다 (Fig. 2-6). 이 클론은 1,022번째의 개시 codon인 ATG로부터 1,505번째의 stop codon인 TGA에 이르는 161개의 아미노산으로 구성되는 하나의 ORF (open reading frame)를 포함하는 것으로 나타났으며, ORF의 하류에 하나의 polyadenylation signal (AATAAA)을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 coding region에서는 intron 영역이 존재하지 않았으며, 이 유전자에 의해 암호화되는 polypeptide의 예상분자량이 17.925 kDa으로 나타나 이 ORF를 *OsHSP17.9*라 명명하였다.

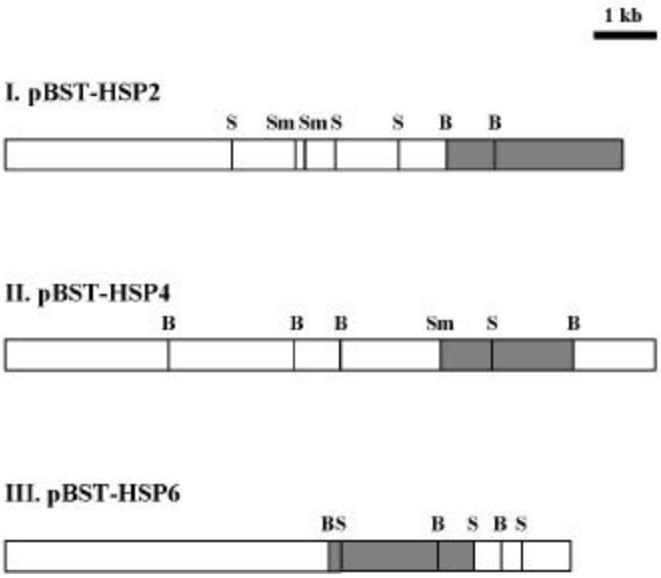


Fig. 2-3. Restriction map of pBST-HSP clones.

Stripped regions contain the HSP genes.
B, *Bam*HI; S, *Sac*II, Sm, *Sma*I

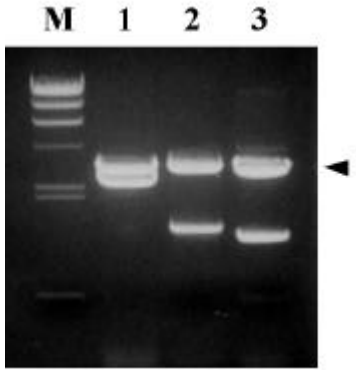


Fig. 2-4. Subcloning of HSP genomic fragments into pBluescriptII vector.

M : DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.
2.4 (lane 1), 1.15 (lane 2) and 1.05 kb (lane 3) fragments of pBST-HSP6 are subcloned into pBluescriptII . Arrowhead indicates vector DNA of pBluescriptII.

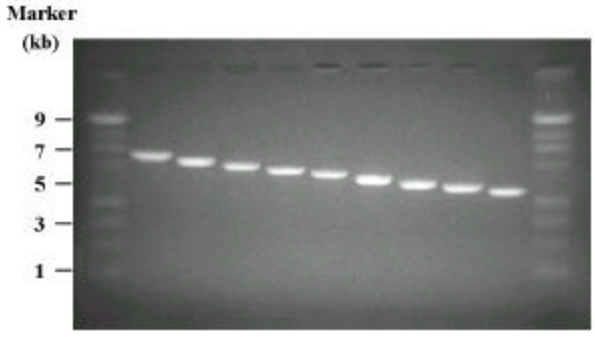
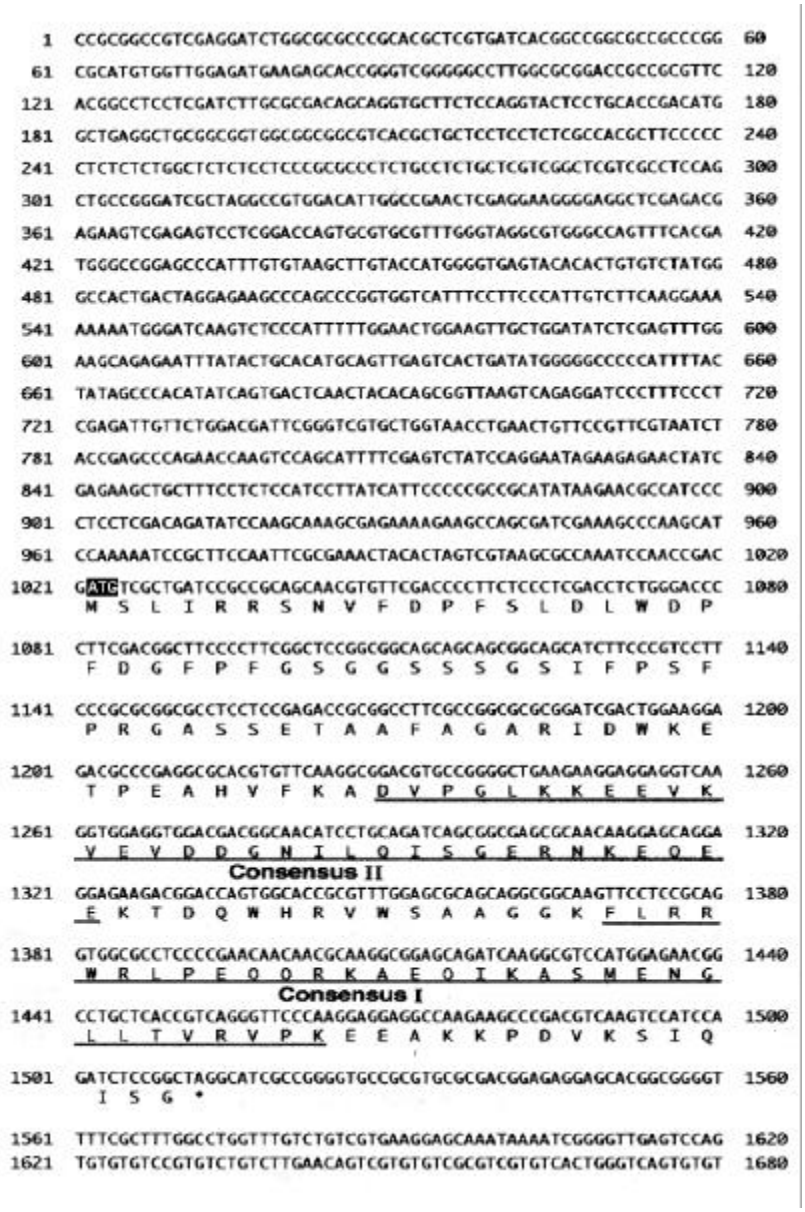


Fig. 2-5. Restriction enzyme analysis of nested deletion clones for pBS2.4.

Plasmid DNA was digested with *Bam*HI and analyzed by agarose gel electrophoresis.


Consensus II
Consensus I

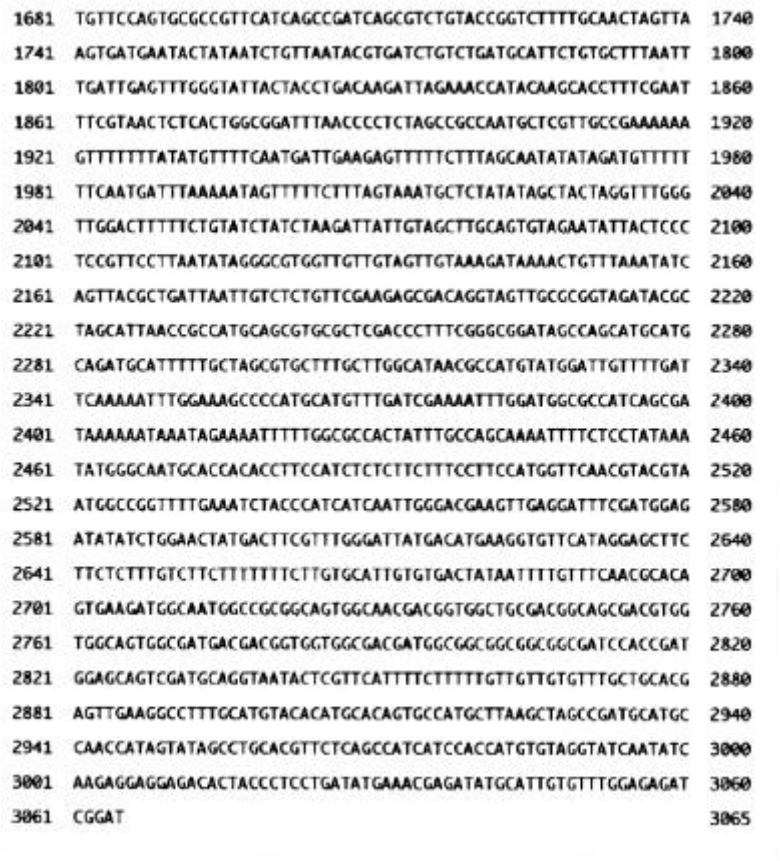


Fig. 2-6. Nucleotide and deduced amino acid sequences of pBST-HSP6.

Closed box indicates the translation initiation site. Consensus region I and II are underlined.

사. *OsHSP17.9*의 아미노산 서열의 상동성 비교

*OsHSP17.9*의 추정 아미노산 서열을 BLAST를 이용하여 이미 보고되어 있는 5 type의 저분자량 (lmw) HSP의 아미노산 서열과 비교하였다.

Cytoplasm의 class **I** lmw HSP인 *OsHSP17.4* (*Oryza Sativa*; Nishi *et al.*, 1992), cytoplasm의 class **II** lmw HSP인 *AtHSP17.6* (*Arabidopsis thaliana*; Bartling *et al.*, 1992), mitochondria의 class **III** lmw HSP인 *PsHSP22* (*Pisum sativum*; Lenne *et al.*, 1995), endoplasmic reticulum의 class **IV** lmw HSP인 *GmHSP22* (*Glycine max*; Helm *et al.*, 1993) 그리고 chloroplast의 class **V** lmw HSP인 *NtHSP26* (*Nicotiana tabacum*; Lee *et al.*, 1998)의 아미노산 서열과 비교한 결과, 일반적으로 lmw HSP의 보존영역인 consensus region I (116번째 Phe부터 146번째 Lys까지)과 consensus region **II** (70번째 Asp부터 101번째 Glu까지)가 *OsHSP17.9*에도 잘 보존되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2-7).

이들 아미노산 서열간의 상동성을 비교해 본 결과, 각각 85% (*OsHSP17.4*), 39% (*AtHSP17.6*), 34% (*PsHSP22*), 43% (*GmHSP22*) 그리고 32% (*NtHSP26*)를 나타내어 본 실험에서 분리한 *OsHSP17.9*가 cytoplasm에 존재하는 class I LMW HSP 임을 추정할 수 있었다 (Table 2-2).

분리한 *OsHSP17.9*의 아미노산 서열을 이미 보고되어 있는 여러 식물 종에서 cytoplasm에 존재하는 class I lmw HSP의 아미노산 서열과 비교해 본 결과, *OsHSP17.4* (*Oryza Sativa*; Nishi *et al.*, 1992)와는 85%, *TaHSP16.9* (*Triticum aestivum*; McElwain and Spiker, 1989)와는 68%, *GmHSP17.3* (*Glycine max*; Schöffl *et al*, 1984)과는 68%, *AtHSP17.4* (*Arabidopsis thaliana*; Takahashi and Komeda, 1989)와는 66% 그리고 *CrHSP18.3* (*Chenopodium rubrum*; Knack *et al.*, 1992)과는 64%의 높은 상동성을 나타내었다 (Table 2-2). 특히 쌍자엽 식물보다는 단자엽 식물에서의 상동성이 높게 나타났으며, 벼로부터 클로닝된 *OsHSP17.4* (Nishi *et al.*, 1992)와는 가장 높은 상동성 (85%)을 나타내었으나 동일한 유전자는 아닌 것으로 판명되었다.

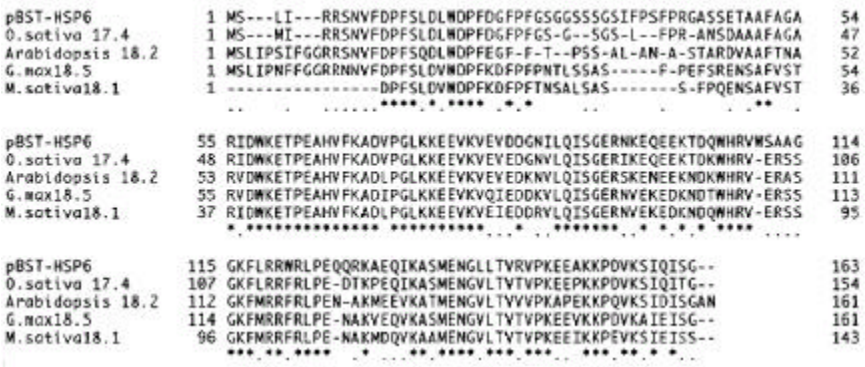


Fig. 2-7. Comparison of the deduced amino acid sequences of pBST-HSP6 with those from *Oryza sativa* (*O. sativa* 17.4), *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana* 18.2), *Glycine max* (*G. max* 18.5) and *Medicago sativa* (*M. sativa* 18.2).

Asterisks represent amino acid residues identical to those of the pBST-HSP6. Gaps are introduced for alignment as dashes.

Table 2-2. Identity scores between OsHSP17.9 and other LMW HSPs.

Proteins	Class I					Class II	Class III	Class IV	Class V
	OsHSP 17.4	*TaHSP 16.9*	*GmHSP 17.3*	*AtHSP 17.4*	*CrHSP 18.3*	*AtHSP 17.6*	*PsHSP 22*	*GmHSP 22*	*NtHSP 26*
OsHSP17.9	85 (93)	68 (81)	68 (83)	66 (79)	64 (79)	39 (59)	34 (46)	43 (58)	32 (44)

Sequence homologies are determined via pairwise sequence alignments using the DNASIS program. Numbers indicate percentage of identity and similarity (in parentheses).

OsHSP17.4, Oryza sativa
TaHSP16.9, Triticum aestivum;
Gmhsp17.3, Glycine max
Athsp17.4, Arabidopsis thaliana
Crhsp18.3, Chenopodium rubrum
AtHSP17.6, Arabidopsis thaliana
PsHSP22, Pisum sativum
GmHSP22, Glycine max
NtHSP26, Nicotiana tabacum

따라서, 분리한 *OsHSP17.9* 유전자에 의해 암호화되는 단백질이 cytoplasm에 존재하는 벼의 또 다른 class I lmw HSP임을 확인하였다.

아. Southern blot 분석

벼의 genome상에 존재하는 cytoplasmic class I lmw HSP 유전자의 copy number를 조사하기 위하여 20 μg의 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI, *Kpn*I, *Xba*I으로 각각 완전 분해한 다음, ^{32}P로 표지된 *OsHSP17.9* 유전자를 probe로 하여 Southern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 2-8). 그 결과, 제한효소 *Bam*HI으로 분해한 genomic DNA에서는 5 개의 hybridization bands가 관찰되었으며, *Kpn*I으로 분해한 genomic DNA에서는 3 개 그리고 *Xba*I으로 분해한 genomic DNA에서는 4 개의 hybridization bands가 관찰되었다. 따라서, 분리한 *OsHSP17.9*의 ORF 영역 내에서는 *Bam*HI, *Kpn*I 및 *Xba*I site가 존재하지 않는다는 것으로 미루어, *Oryza sativa* L. cv Milyang 23의 genome상에는 cytoplasmic class I LMW HSP 유전자가 최소한 3 copy에서 5 copy정도 존재하는 것으로 판단된다.

자. Northern blot 분석

분리한 *OsHSP17.9*가 본 연구에서 개발하고자 하는 고온특이적인 발현을 위한 promoter 개발에 적합한가의 여부를 확인하고자, 다양한 온도 및 처리시간에 따른 발현양상을 Northern blot 분석을 통하여 확인하였다.

먼저 처리온도에 따른 발현양상을 확인하기 위하여, 20일령 된 벼의 엽조직을 28℃, 38℃, 42℃ 그리고 45℃에서 각각 1시간 동안 heat shock 처리를 실시하였다. Heat shock은 절취한 벼의 잎을 온도가 조절된 waterbath에서 미리 가온하여 둔 vat 내의 증류수에 잎의 아랫면과 물 사이에 기포가 생기지 않도록 얹은 다음, 습도의 유지를 위하여 OHP film을 덮어 1시간 처리하였다.

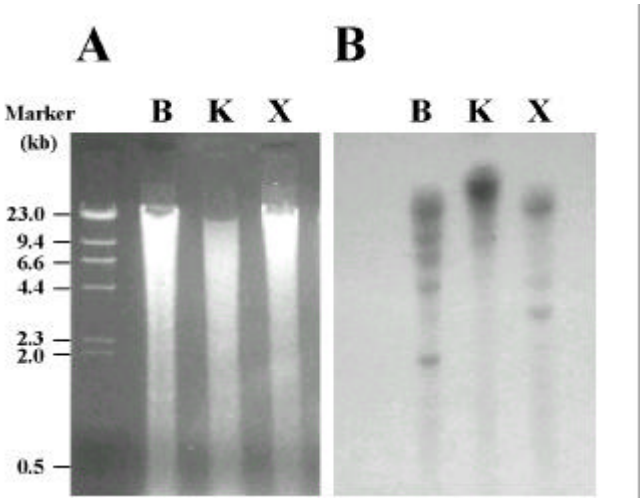


Fig. 2-8. Southern blot analysis of rice genomic DNA.
A. Agarose gel electrophoresis.
B. Southern blot analysis.

Rice genomic DNA (10 μg) was digested with *Bam*HI (B), *Kpn*I (K) or *Xba*I (X) and hybridized with the ^{32}P-labeled coding region of *OsHSP17.9*.

각각의 처리구로부터 total RNA를 분리하여 분석한 결과, *OsHSP17.9*의 mRNA는 38℃부터 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대치의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 오히려 발현량이 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2-9). 42℃ 이상의 고온에서의 발현량의 감소는 세포자체의 파괴와 HSP 유전자의 발현에 관여하는 전사기구들의 열에 의한 불활성화에 따른 것으로 추정된다.

*OsHSP17.9*의 발현량이 가장 높게 나타난 42℃에서 처리시간에 따른 발현량의 변화를 조사하였다. 벼의 잎을 42℃에서 5분, 10분, 30분, 1시간 그리고 2시간동안 각각 처리한 다음 total RNA를 분리하여 분석하였다. 그 결과, *OsHSP17.9*의 mRNA는 처리 후 10분부터 발현이 유도되기 시작하여, 처리 30분에서 최대치를 나타내었으며 그 이후부터는 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2-10). 42℃에서 30분 이상의 heat shock 처리 후 *OsHSP17.9*의 mRNA 발현량의 감소는 30분에 최대치의 발현이 된 mRNA로부터 만들어진 단백질량으로도 충분히 heat shock에 따른 세포의 손상을 막을 수 있어 더 이상의 mRNA의 합성을 필요로 하지않거나, 단백질로의 번역이 이루어진 후에 mRNA의 분해속도 증가에 따른 것으로 생각된다.

따라서, 이러한 *OsHSP17.9*의 처리온도 및 시간에 따른 급격한 발현의 증가는 이 유전자가 내열성의 획득과 밀접한 상관관계를 나타내는 것으로, 고온특이적 promoter의 개발과 이를 통한 내열성의 획득에 중요할 것으로 생각된다.

2. *OsHSP26*

가. cDNA library의 구축

재료식물로 벼 (*O. sativa* L. cv Nakdong)를 28℃, 16시간 광조건과 20℃, 8시간 암조건, 습도 70%, 광도 12,000 lux조건의 생장실에서 생육시켰다. HSP 및 HSF의 발현유도를 위하여, 파종 후 4주령된 벼의 본엽을 42℃에서 90분간 처리한 다음, guanidine thiocyanate (GTC) 법으로 total RNA를 분리하였다.

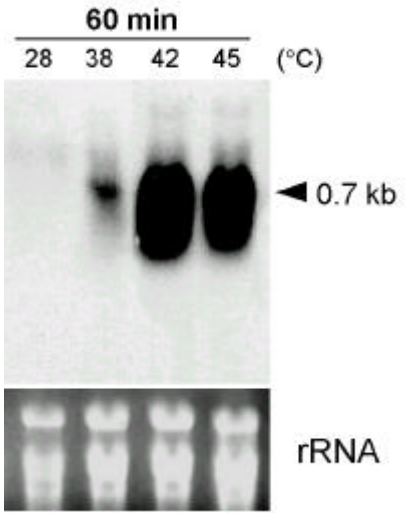


Fig. 2-9. Effect of temperature on the expression of *OsHSP17.9* gene in rice.

Leaves were incubated at the designated temperatures in a shaking waterbath for 1 h under illumination with white light. Each lane was loaded with 15 μg of total RNA. Transcripts were hybridized with ^{32}P-labeled coding region of *OsHSP17.9*. rRNA indicates the relative RNA amount put in each lane.

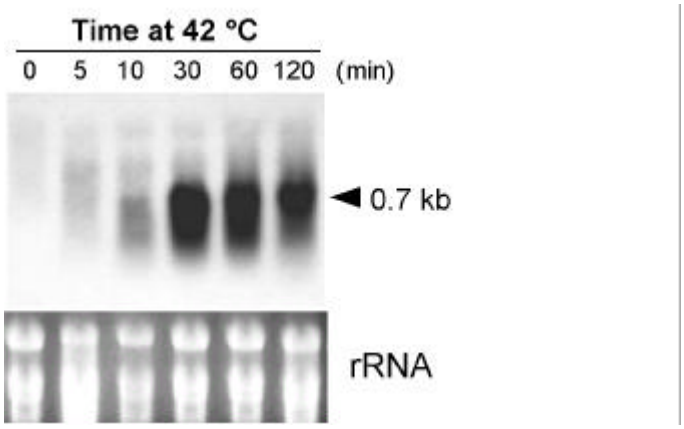


Fig. 2-10. Time course of expression of *OsHSP17.9* gene in control and heat shocked rice leaves.

Leaves were incubated at 42℃ in a shaking waterbath under illumination with white light. RNA was prepared from the treated leaves, which were sampled at indicated times. Each lane was loaded with 15 μg of total RNA. Transcripts were hybridized with ^{32}P-labeled coding region of *OsHSP17.9*. rRNA indicates the relative RNA amount put in each lane.

분리한 total RNA로부터 oligo(dT) column chromatography를 통하여 mRNA를 정제한 후, cDNA library 작성을 위한 template로 사용하였다. 정제한 5 μg의 mRNA를 template로하여 cDNA synthesis kit (STRATAGENE, U.S.A.)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Sepharose cloumn으로 size fractionation 한 후, 추측되는 HSP 및 HSF mRNA의 크기에 상당하는 0.5 kb 이상의 fraction을 모아, T4 DNA ligase를 이용하여 λ phage vector (Uni-ZAP XR vector, STRATAGENE, U.S.A.)에 ligation하였다. 재조합된 phage DNA를 감염이 가능한 완전한 phage의 형태로 만들기 위하여 *in vitro* packaging (Gigapack III Gold packaging extract, STRATAGENE, U.S.A.)하여 cDNA library를 구축하였다. 구축된 library의 titer를 결정하여 본 결과, 2.6×106 plaque forming unit (pfu)/㎖의 titer를 나타내어 HSP 및 HSF cDNA를 포함한 벼에서 발현되는 거의 모든 유전자의 cDNA를 포함하는 것으로 판단되었다. 구축된 library를 증폭시킨 후 titer를 결정한 결과 3.2×10ℰ으로 나타났다.

나. cDNA library로부터 엽록체 HSP cDNA의 선발

1) Probe DNA의 준비

구축한 벼의 cDNA library로부터 엽록체 lmw HSP cDNA를 선발하기 위한 probe를 제작하기 위하여 지금까지 보고된 식물 유래의 엽록체 lmw HSP의 아미노산 서열을 비교하여 homology가 높은 영역을 동정하였다. 이들 중, 단자엽 식물인 벼와 가장 높은 homology를 가질 것으로 예상되는 옥수수의 엽록체 lmw HSP 유전자 서열을 기초로 하여 C-terminal 부분의 PCR primer (26Ps and 26Pas; Table 2-1)를 합성한 후, 옥수수의 genomic DNA를 template로 하여 증폭시킨 결과, 약 0.4 kb의 증폭산물을 얻었다 (Fig. 2-11). PCR 증폭산물을 pGEM-T vector에 subcloning한 다음, DNA 염기서열을 결정하여 본 결과, 이미 보고된 옥수수의 엽록체 lmw HSP와 완전히 일치하는 것으로 나타났다.

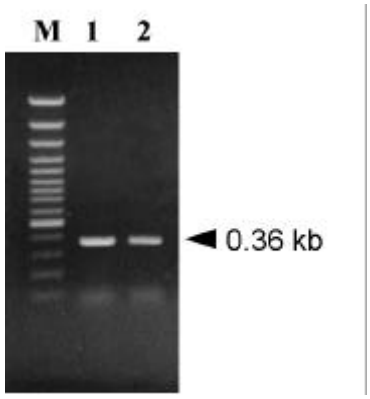


Fig. 2-11. PCR amplification of chloroplast-localized lmw HSP DNA fragment from genomic DNA of maize.

M: 100 bp DNA ladder, Size marker.
Lanes 1 and 2 represent the PCR products with sense primer (26Ps) and antisense primer (26Pas).

따라서, 이 DNA 단편을 ^{32}P로 labelling하여 cDNA library의 screening에 probe로 사용하였다.

2) cDNA library의 screening

벼의 cDNA library로부터 엽록체 lmw HSP cDNA clone을 선발하기 위하여 PCR로 증폭시킨 probe DNA를 사용하여 앞에서 언급한 genomic DNA library의 screening과 동일한 방법으로 screening을 실시한 결과, 2차에 걸친 선발을 통해 최종적으로 26개의 positive clone을 선발하였다. 이들 clone의 제한효소 분해양상을 분석한 결과 동일한 양상을 나타내어, 이 중 5개의 clone을 선발하여 DNA 염기서열을 결정하였다.

다. DNA 염기서열 결정 및 특성 규명

DNA 염기서열을 결정하기 위하여, 선발된 clone의 양 말단을 제한효소를 이용하여 이중 절단한 다음, ExoIII nuclease와 Mung bean nuclease를 이용하여 nested-deletion한 다음, Sanger 등의 dideoxy chain termination법으로 DNA 염기서열을 결정하였다. Plasmid DNA의 분리에는 Wizard *plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 이용하였으며, ALFexpress AutoRead Sequencing kit (Pharmacia, USA)와 ALFexpress DNA Sequencing System (Pharmacia, USA)을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다 (Fig. 2-12).

결정된 5개의 clone의 염기서열을 BLAST와 DNASIS software program (Hitachi, Japan)을 이용하여 확인 및 분석한 결과, 5개의 clone은 5'- 및 3'- 말단의 길이만 다를 뿐 동일한 clone인 것으로 나타났다. 최종적으로 결정된 벼의 엽록체 lmw HSP cDNA의 염기서열의 총 길이는 1,026 bp로 나타났으며, 5'- 쪽에 106 염기의 noncoding region과 107번째 염기의 개시코돈, ATG로부터 826번째의 종결코돈, TAG까지의 720 bp로 구성되는 하나의 완전한 open reading frame (ORF)

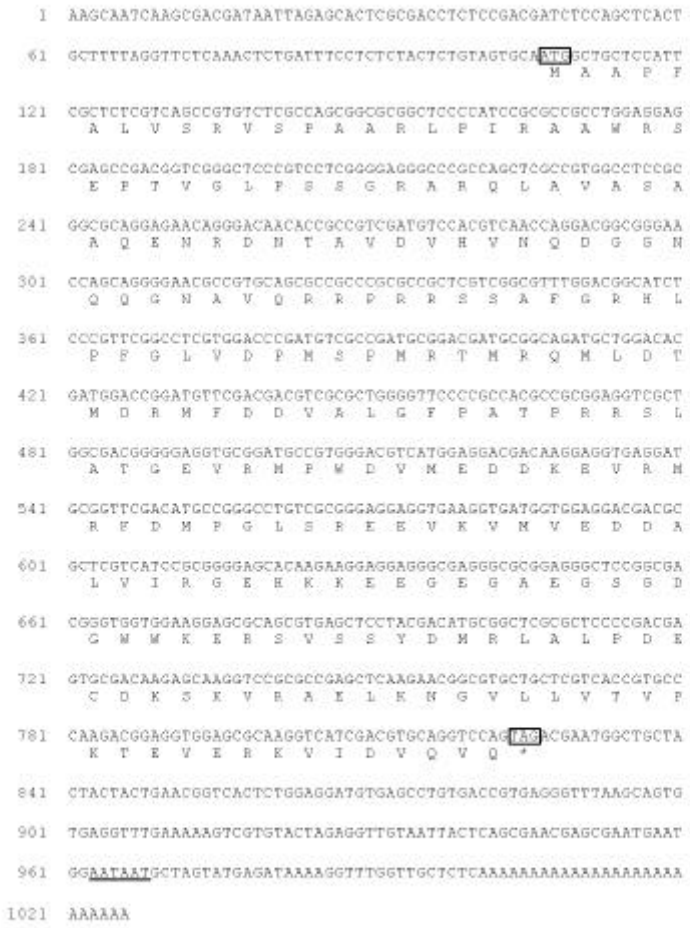


Fig. 2-12. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA for the chloroplast lmw HSP of rice.

Closed boxes indicate the translation initiation and termination sites. The site of the putative polyadenylation signal is underlined.

및 3'-쪽의 200 염기의 noncoding region으로 구성되어 있었다. 선발된 cDNA에 의해 암호화되는 단백질은 아미노산 239개로 구성되며, 예상 분자량은 26.639 kDa 으로 나타나, 선발된 cDNA를 *OsHSP26*으로 명명하였다.

결정된 염기서열로부터 추정되는 아미노산 서열을 이용하여 Database를 통하여 검색하여 본 결과, 지금까지 보고된 고등식물 유래의 엽록체 lmw HSP와 높은 상동성을 나타내었다 (Fig. 2-13). 즉, lmw HSP 단백질에서 공통적으로 보존된 영역인 consensus region I 및 II가 잘 보존된 것으로 나타났으며, 또한 엽록체 lmw HSP의 보존서열인 consensus region III도 87-100번째 아미노산에 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 분리한 *OsHSP26* clone은 벼에 있어서 엽록체 lmw HSP 유전자임을 확인하였다.

라. Southern blot 분석

벼의 genome상에 존재하는 *OsHSP26* 유전자의 copy number를 조사하기 위하여, genomic DNA를 제한효소 *Hin*dIII, *Sal*I, *Pst*I으로 각각 완전 분해한 다음, ^{32}P로 표지된 *OsHSP26* 유전자를 probe로 하여 Southern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 2-14). 그 결과, 제한효소 *Hin*dIII와 *Pst*I으로 분해한 genomic DNA에서는 각각 2 개의 hybridization bands가 관찰되었으며, *Sal*I으로 분해한 genomic DNA에서는 1 개의 hybridization bands가 관찰되었다. 이러한 결과는 *OsHSP26*의 cDNA 영역 내에는 *Hin*dIII, *Sal*I 및 *Pst*I site가 존재하지 않는다는 것으로 미루어, 벼에서 *OsHSP26* 유전자가 small gene family로 존재할 가능성을 나타내는 것이다. 그러나, cDNA library의 screening을 통하여 선발된 26개의 clone의 제한효소 분해양상이 동일하였다는 것을 고려하면, 벼의 genome 상에서 *OsHSP26* 유전자는 single copy로 존재하는 것으로 판단된다. 즉, *Hin*dIII와 *Pst*I으로 분해한 genomic DNA에서는 각각 2 개의 hybridization bands가 관찰된 것은 *OsHSP26* 유전자에 존재하는 intron 내에 *Hin*dIII와 *Pst*I site가 존재하여 나타난 결과로 생각된다.

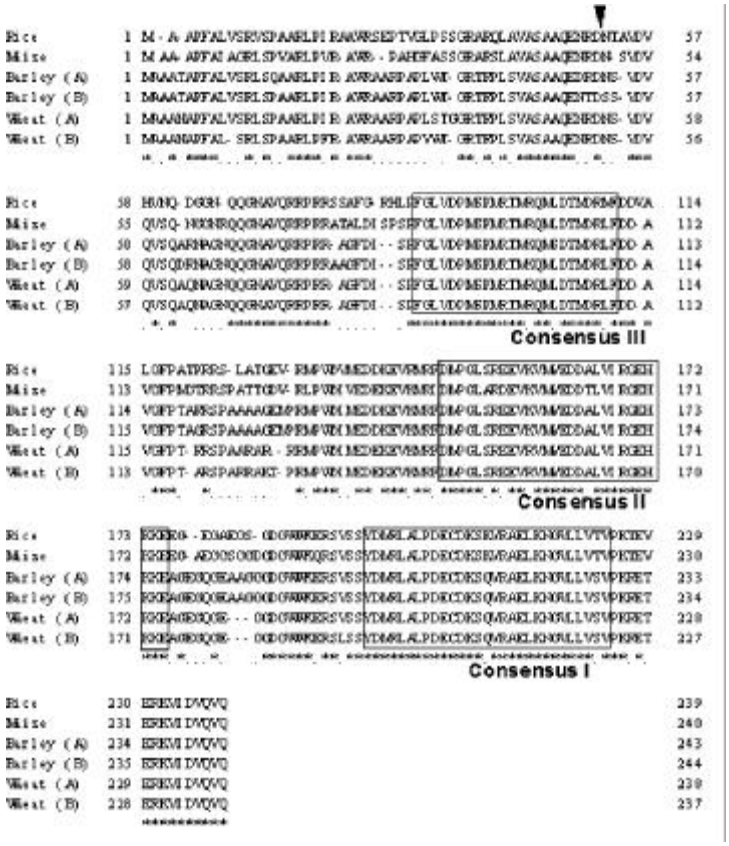


Fig. 2-13. Alignment of the deduced amino acid sequences of the chloroplast lmw HSPs from six plant species.

An arrowhead indicates the putative processing site and boxes indicate the consensus region I, II and III. Asterisks represent identical amino acid residues and dashes indicate gaps introduced to optimize alignment.

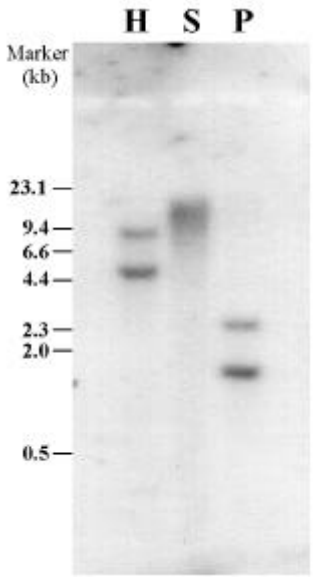


Fig. 2-14. Southern blot analysis of genomic DNA of rice plants.

Genomic DNA (5 μg) was digested with *Hin*dIII (H),
*Sal*I (S), or *Pst*I (P) and separated on an 0.8% agarose gel.
The full-length *OsHSP26* cDNA was used as a hybridization probe.

마. Northern blot 분석

분리한 *OsHSP26* 유전자의 다양한 온도 및 처리시간에 따른 발현양상을 Northern blot 분석을 통하여 확인하였다.

먼저 처리온도에 따른 발현양상을 확인하기 위하여, 20일령 된 벼의 엽조직을 25℃, 39℃, 42℃ 그리고 45℃에서 각각 2시간 동안 heat shock 처리를 한 다음 total RNA를 분리하여 분석한 결과, *OsHSP26*의 mRNA는 39℃부터 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대치의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 오히려 발현량이 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2-15A). 42℃ 이상의 고온에서의 발현량의 감소는 세포자체의 파괴와 HSP 유전자의 발현에 관여하는 전사기구들의 열에 의한 불활성화에 따른 것으로 추정된다.

*OsHSP26*의 발현량이 가장 높게 나타난 42℃에서 고온처리 중 및 처리 후 25℃의 회복 처리시간에 따른 발현량의 변화를 조사하였다. 그 결과, *OsHSP26*의 mRNA는 처리 후 20분부터 발현이 유도되기 시작하여, 처리 2시간 후에 최대치를 나타내었으며 그 이후부터는 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2-15B). 고온처리 후 식물체를 25℃로 옮겨 회복처리한 결과, *OsHSP26*의 mRNA는 비교적 완만하게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서, *OsHSP26*의 mRNA는 고온처리에의해 급격하게 증가하지 않고 비교적 느린 속도로 축적되며, 또한 축적된 전사체의 안정성이 높은 것으로 나타났다.

*OsHSP26*의 조직특이적인 발현양상을 조사하기 위하여 잎, 뿌리 및 줄기를 각각 25℃ 및 42℃에서 2시간 처리한 다음, Northern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 2-15C). 그 결과, *OsHSP26*의 mRNA는 잎에서 뿐만 아니라 줄기와 뿌리에서도 모두 25℃에서는 발현되지 않고, 42℃의 고온처리에 의해 발현되는 것으로 나타났다. 그러나, RNA 수준에서의 전사체의 축적수준은 잎에서 높게 나타났으며, 뿌리와 줄기에서는 그보다 낮게 나타났다.

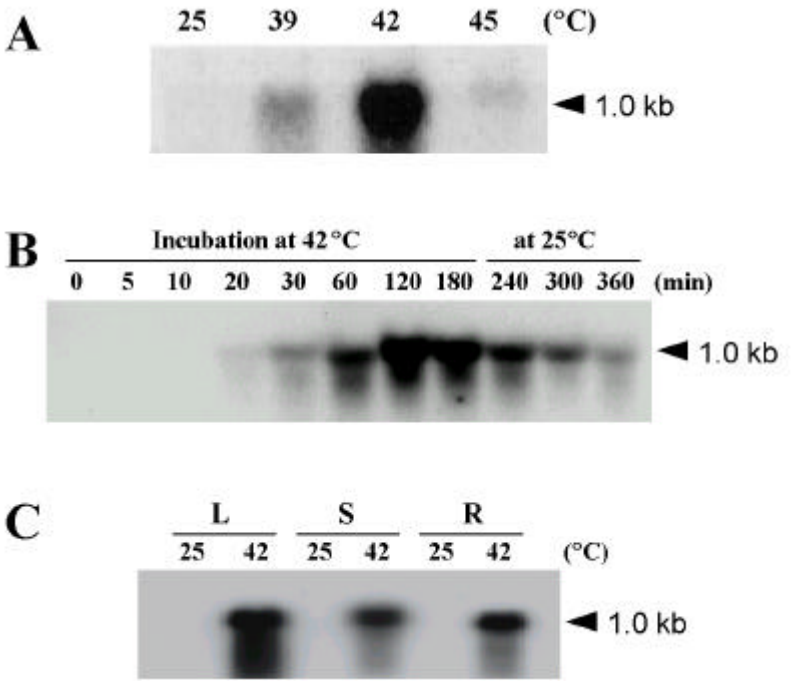


Fig. 2-15. Expression of transcripts of the chloroplast lmw HSP gene under heat stress conditions in rice.

(A) Temperature dependence. Rice leaves were treated for 2 h at designated temperatures. (B) Time course during heat treatment and the subsequent recovery treatment. Rice leaves were treated at 42℃ for 3 h, and then further incubated at 25℃. At designated times, samples were withdrawn for analysis. (C) Expression in various organs. Hydroponically grown rice plants were treated for 2 h at designated temperatures. L, S, and R indicate leaves, stems, and roots, respectively. Total RNA (5 μg) was separated by electrophoresis and transcripts were detected with the gene-specific probe.

3. *BcHSP17.4*

BcHSP17.4 유전자는 본 연구실에서 배추 (*Brassica campestris* L. cv Seoul)의 cDNA library로부터 분리하였다. *BcHSP17.4*의 총 길이는 732 bp이며, open reading frame은 69번째의 개시코돈인 ATG로부터 542번째의 TAA까지 474 bp로, 157개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 17.4 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 2-16). 아미노산 서열분석 결과 *BcHSP17.4* 단백질은 세포질에 존재하는 class I lmw HSP로 나타났다.

4. *OsHSF13*

가. cDNA library로부터 HSF의 선발

1) Probe DNA의 준비

앞에서 구축한 벼의 cDNA library로부터 HSF cDNA를 선발하기 위한 probe를 제작하기 위하여 지금까지 보고된 식물 유래의 HSF의 아미노산 서열을 비교하여 homology가 높은 영역을 동정하였다. 이들 중, 단자엽 식물인 벼와 가장 높은 homology를 가질 것으로 예상되는 옥수수의 HSF 유전자 서열을 기초로 하여 보존영역 부분의 PCR primer (HSFPs and HSFPas; Table 2-1)를 합성한 후, 벼의 genomic DNA를 template로 하여 증폭시킨 결과, 약 0.2 kb의 증폭산물을 얻었다 (Fig. 2-17A). PCR 증폭산물의 염기서열을 결정하여 본 결과 (Fig. 2-17B), 이미 보고된 옥수수와 높은 homology를 나타내었으며 벼의 EST clone의 HSF cDNA 염기배열과 일치하였을 뿐만 아니라, 이미 보고된 *Arabidopsis*, 옥수수 등의 HSF homolog들의 DNA binding domain부분과의 높은 homology를 나타내었다. 따라서, 이 DNA 단편을 ^{32}P로 labelling하여 cDNA library의 screening에 probe로 사용하였다.

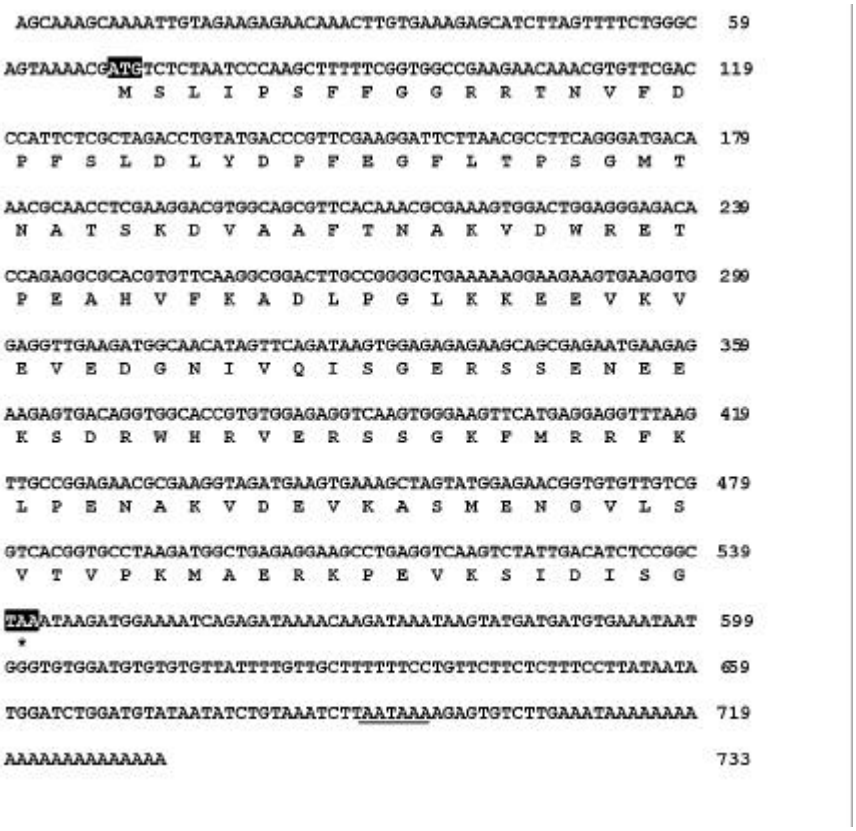


Fig. 2-16. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *BcHSP17.4*.

Closed boxes indicate the translation initiation and termination sites. The site of the putative polyadenylation signal is underlined.

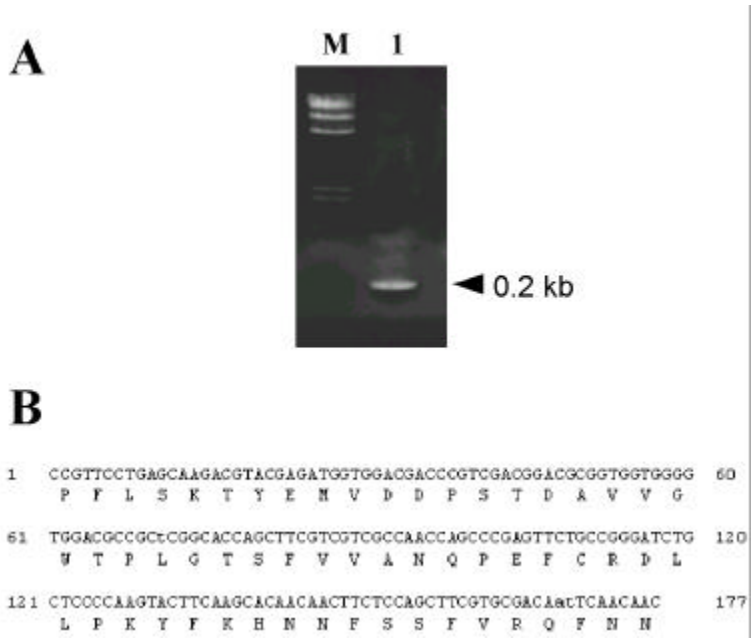


Fig. 2-17. Preparation of partial rice HSF gene fragment.

A. PCR product. M: DNA digested with *Hin*dIII, Size marker. Lane 1 is represents the PCR products with sense primer (HSFPs) and antisense primer (HSFPas).

B. Nucleotide and deduced amino acid sequence of DNA fragment amplified by PCR from genomic DNA of rice.

2) cDNA library의 screening

cDNA library로부터 HSF cDNA clone을 선발하기 위하여 PCR로 증폭시킨 probe DNA를 사용하여 앞에서 언급한 genomic DNA library의 screening과 동일한 방법으로 screening을 실시한 결과, first screening에서 35개의 positive clone을 선발하였다. 이 positive clone들로부터 second screening을 실시하여 최종적으로 12개의 독립된 phage clone을 선발하였다.

3) Plasmid에로의 subcloning

Positive phage clone으로부터 plasmid DNA를 얻기 위하여 f1 helper phage를 이용하여 *in vivo* excision한 후, plasmid DNA를 분리하였다. HSF cDNA의 확인을 위하여 plasmid DNA를 제한효소 *Eco*RI과 *Xho*I으로 절단한 다음, Southern blot 분석을 실시하였다. 이를 통하여 작성된 각각의 positive clone의 제한효소지도를 작성하여 분석한 결과, Southern blot 분석에서 가장 강한 signal을 나타낸 clone13-2가, 벼의 HSF cDNA의 예상크기와 동일한 1.5 kb의 insert DNA를 포함하는 것으로 나타났으며, 5'-말단쪽에 *Sal* I site를 가지고 있어서 probe DNA와 동일한 clone임을 확인하였다. 또한 다른 식물의 HSF homolog들과 비교했을 때 약 100 bp의 5'-noncoding region을 포함하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 벼의 HSF의 full length의 cDNA로 추측되는 이 clone을 *OsHSF13*으로 명명하고 (Fig. 2-18A), DNA 염기서열을 결정하였다.

나. DNA 염기서열 결정 및 특성 규명

DNA 염기서열을 결정하기 위하여, *OsHSF13*의 양 말단을 제한효소를 이용하여 이중 절단한 다음, ExoIII nuclease와 Mung bean nuclease를 이용하여 nested-deletion한 다음 (Fig. 2-18B), Sanger 등의 dideoxy chain termination법으로

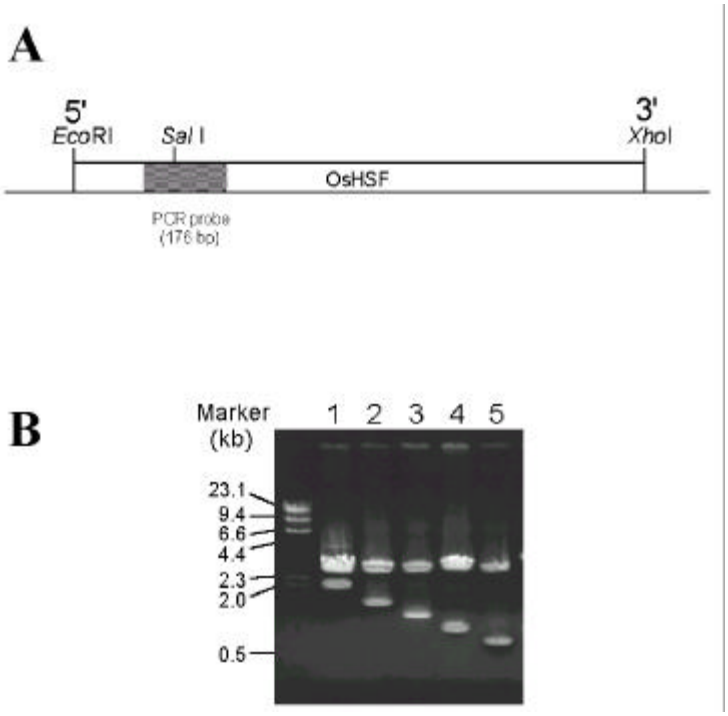


Fig. 2-18. Restriction enzyme map of a positive clone for rice HSF cDNA (A) and construction of nested-deletion clones for rice HSF cDNA (B).

DNA 염기서열을 결정하였다. Plasmid DNA의 분리에는 Wizard *plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 이용하였으며, ALFexpress AutoRead Sequencing kit (Pharmacia, USA)와 ALFexpress DNA Sequencing System (Pharmacia, USA)을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다.

결정된 *OsHSF13*의 염기서열을 BLAST와 DNASIS software program (Hitachi, Japan)을 이용하여 확인 및 분석하였다 (Fig. 2-19). 결정된 *OsHSF13*의 DNA 염기서열의 총 길이는 1,377 bp로서, 5'- 쪽에 50 염기의 noncoding region과 51번째 염기의 개시코돈, ATG로부터 1,112번째의 종결코돈, TAA까지의 1,062 bp의 염기로 구성되는 하나의 완전한 open reading frame 및 3'-쪽의 265 염기의 noncoding region으로 구성되어 있었다.

결정된 염기서열로부터 추정되는 아미노산 서열을 이용하여 Database를 통하여 검색하여 본 결과, 지금까지 보고된 고등식물 유래의 HSF와 높은 상동성을 나타내었다 (Fig. 2-20). 따라서 분리한 *OsHSF13* clone은 벼에 있어서 HSF 유전자임을 확인할 수 있었다.

다. Southern blot 분석

벼의 genome상에 존재하는 HSF 유전자의 copy number를 조사하기 위하여 벼로부터 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I으로 각각 완전 분해한 다음, ^{32}P로 표지된 *OsHSF13* 유전자를 probe로 하여 Southern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 2-21). 그 결과, 각각의 처리구에서 2-3개의 hybridization bands가 관찰되어 벼의 genome에는 2개 이상의 복수의 HSF 유전자가 존재하는 것으로 판명되었다.

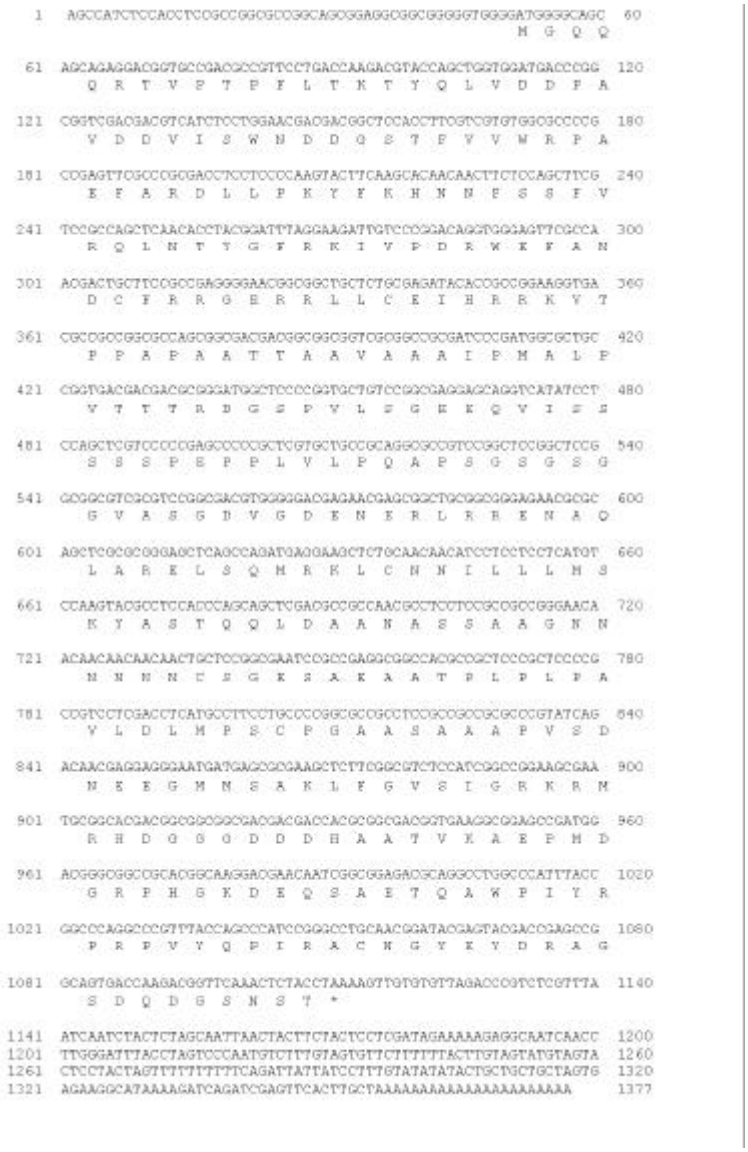


Fig. 2-19. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsHSF13* cDNA.

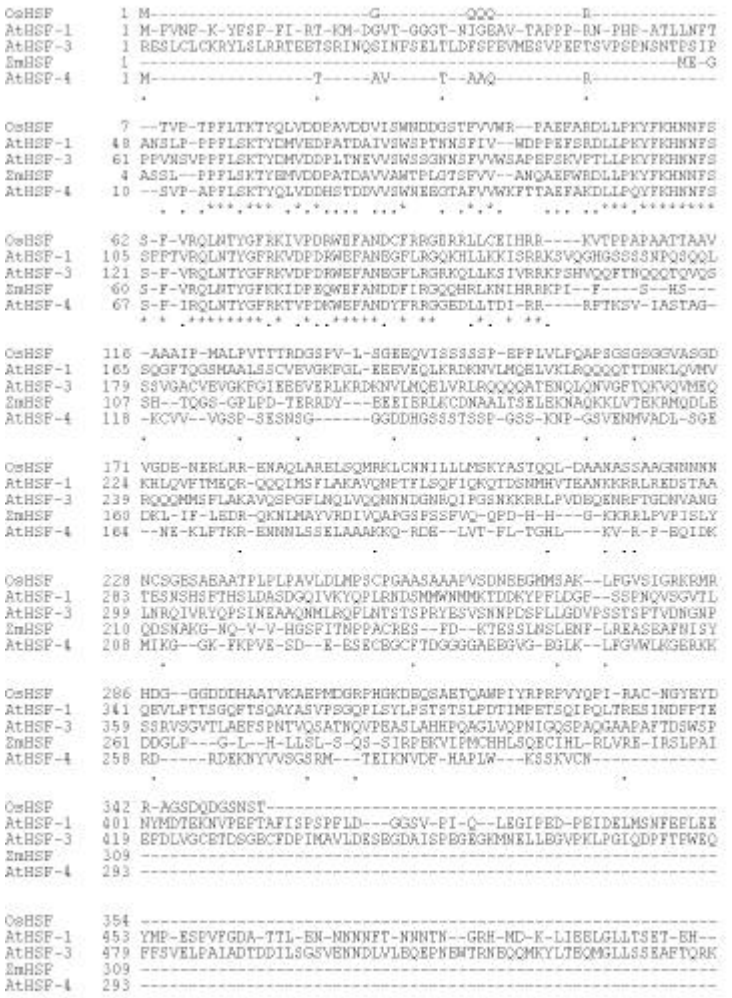


Fig. 2-20. Comparison of the deduced amino acid sequences of *OsHSF13* with other HSF protein.

Asterisks represent identical amino acid residues and dashes indicate gaps introduced to optimize alignment.

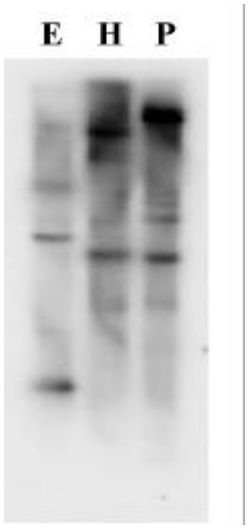


Fig. 2-21. Southern blot analysis of genomic DNA of rice plants.

Genomic DNA (5 μg) was digested with *Eco*RI (E), *Hin*dIII (H), or *Pst*I (P) and separated on an 0.8% agarose gel. The full-length *OsHSF13* cDNA was used as a hybridization probe.

라. Northern blot **분석**

HSF **유전자의 발현양상을 조사하기 위하여, 벼의 잎을 각각** 28℃, 37℃, 42℃ **및** 47℃**에서** 1**시간 처리한 다음,** total RNA**를 분리하여** Northern blot **분석을 실시하였다. 그 결과, 그림** 2-22**에 나타낸 바와 같이** HSF **유전자는 벼의 생육온도인** 28℃**에서도 발현되고 있었으며, 온도가 증가할수록 그 발현량이 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나, 벼의 생육에 치명적인 온도인** 47℃**에서는 오히려 발현량이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서** HSF **유전자는 항상적으로 발현할 뿐만 아니라 고온처리에 의해 그 발현이 증가하는 것으로 나타났다.**

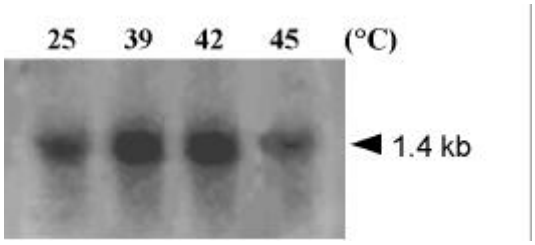


Fig. 2-22. Effect of temperature on the expression of *OsHSF13* gene in rice.

Leaves were incubated at the designated temperatures in a shaking waterbath for 1 h under illumination with white light. Each lane was loaded with 5 μg of total RNA. The full-length *OsHSF13* cDNA was used as a hybridization probe.

제 4 절 내열성 유전자의 도입과 내열성의 획득

진핵생물 내에서 합성되는 HSP는 분자량에 따라 크게 5 종류로 분류되어지는데, 주로 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15-30 kDa의 저분자량 (lmw; low molecular weight) HSP로 분류된다 (Lindquist and Craig, 1988). 이들 중 식물에서 가장 많이 발현되는 것이 저분자량 HSP이며, 분자량 20 kDa 내외의 HSP20 superfamily를 형성한다 (Waters *et al.*, 1996). 이들 저분자량 HSP는 고온 스트레스 하에서 세포 내 단백질의 변성방지 및 단백질간의 응집 등을 방지하는 분자 chaperone의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Waters *et al.*, 1996). 따라서, 본 연구에서는 이들 저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 식물의 고온내성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저분자량 HSP 유전자인 배추유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector의 35S promoter 하류에 연결하여 모델식물인 담배에 형질전환하였다. Southern blot 분석 및 PCR 분석을 통하여 외래의 저분자량 HSP 유전자가 도입되었음을 확인하고, Northern blot 분석을 통하여 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인한 다음, 최종적으로 고온 내성의 획득 여부를 조사하였다. 또한 협동과제의 마늘형질전환체계의 확립과 내열성 유전자 도입 연구에 활용하기 위하여 구축된 constructs를 원예연구소에 분양하였다.

1. 식물체 형질전환용 발현 vector의 구축

BcHSP17.4, *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 각각 식물체 형질전환용 binary vector인 pBI121 및 pIG121-Hm의 35S promoter 하류에 도입하여 발현 vector pBIHSP17.4, pIGHSP17.9 및 pIGHSP26을 구축하였다. 구축된 발현 vector의 DNA를 분리하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭을 실시하여 도입된 HSP 유전자의 위치와 방향을 확인한 다음, 식물체 형질전환에 이용하였다.

가. pBIHSP17.4

pBluescript vector**에 클로닝되어있던** *BcHSP17.4* **유전자를 제한효소** *Bam*HI**으로 절단하여 회수한 다음**, pBI121 vector**의** 35S promoter **하류에 도입하여 발현** vector pBIHSP17.4**를 구축하였다** (Fig. 2-23A). **구축된** pBIHSP17.4 plasmid DNA**를 분리하여 제한효소** *Bam*HI**으로 분해하여** agarose gel **전기영동으로 확인한 결과** *BcHSP17.4* **유전자가 삽입되었음을 확인하였으며** (Fig. 2-23B), 35Ss-2, 17.4as-1 **및** 17.4as-2 primer**를 이용하여** PCR **증폭으로 확인한 결과** 35S promoter **하류에** *BcHSP17.4* **유전자가 정방향으로 삽입되었음을 확인하였다** (Fig. 2-23C).

나. pIGHSP17.9

OsHSP17.9 **유전자를 발현** vector**에 도입하기 위하여** pBST-6 clone**을 제한효소** *Sph*I**으로 절단하여** *OsHSP17.9* ORF**를 포함하는** 2.4 kb **단편을 회수하였다. 회수한 단편을** T4 DNA polymerase**를 이용하여 양 말단을** blunting**한 다음, 제한효소** *Xba*I**으로 절단하여** 5' *Xba*I - 3' blunt**의 구조를 가진** insert DNA**를 준비하였다. 발현** vector**로는** pIG121-Hm DNA**를 제한효소** *Sac*I**으로 절단하고** T4 DNA polymerase**로 양 말단을** blunting**한 다음, 제한효소** *Xba*I**으로 절단하여** insert DNA**와** ligation**하여 발현** vector, pIGHSP17.9**를 구축하였다** (Fig. 2-24A). **구축된** pIGHSP17.9 plasmid DNA**를 분리하여 제한효소 분해 및** PCR **증폭을 통하여** *OsHSP17.9* **유전자가 정상적으로 삽입되었음을 확인하였다** (Fig. 2-24B & C).

다. pIGHSP26

OsHSP26 **유전자를 제한효소** *Xho*I**으로 절단하여 양 말단을** blunting**한 다음,** 5' **말단을 제한효소** *Xba*I**으로 절단하여** 5' *Xba*I - 3' blunt**의 구조의** insert DNA

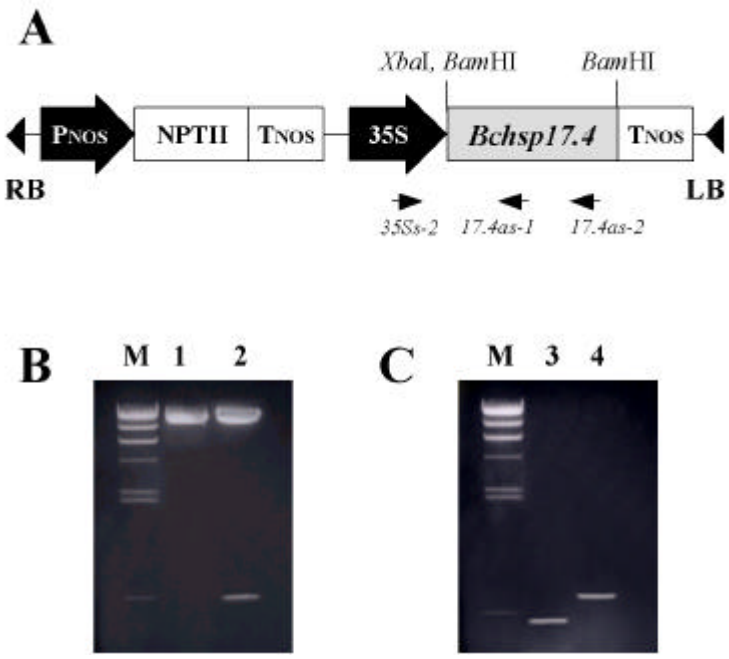


Fig. 2-23. Construction of the expression vector, pBIHSP17.4.

A. Structure of pBIHSP17.4. The *BcHSP17.4* cDNA was placed under the control of the CaMV 35S promoter. B-C. Identification of pBIHSP17.4. Lanes 1 and 2 represent plasmids digested with *Xba*I and *Bam*HI, respectively. Lanes 3 and 4 represent the PCR products with sense primer (35Ss-2) and antisense primers, 17.4as-1 (lane 3) or 17.4as-2 (lane 4). M : DNA digested with *Hin*dIII, size marker.

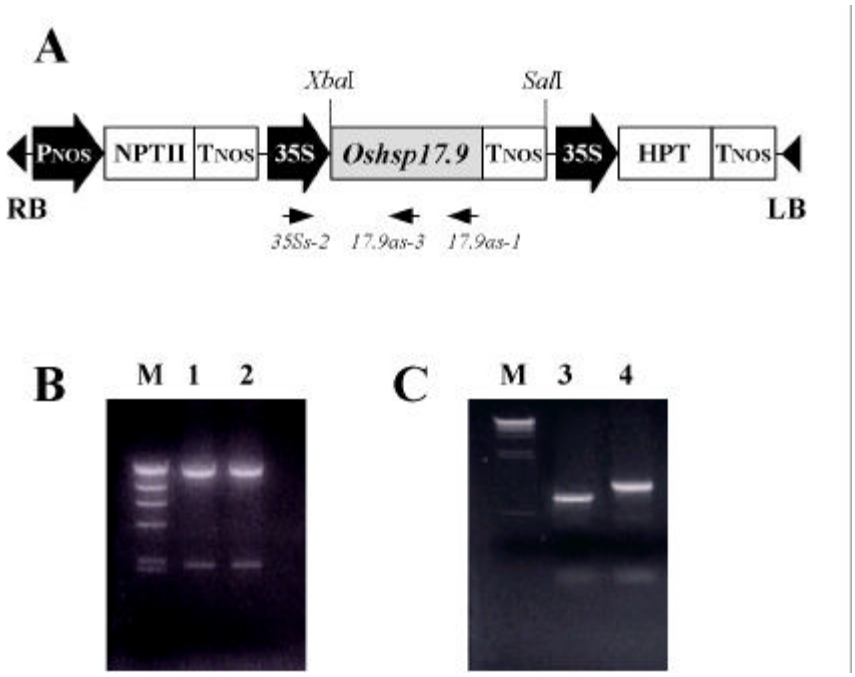


Fig. 2-24. Construction of the expression vector, pIGHSP17.9.

A. Structure of pIGHSP17.9. The *OsHSP17.9* gene was placed under the control of the CaMV 35S promoter. B-C. Identification of pIGHSP17.9. Lanes 1 and 2 represent plasmid digested with *Xba*I and *Sal*I. Lanes 3 and 4 represent the PCR products with sense primer (35Ss-2) and antisense primers, 17.9as-3 (lane 3) or 17.9as-1 (lane 4).
M : DNA digested with *Hin*dIII, size marker.

를 준비하였다. 발현 vector인 pIG121-Hm은 제한효소 *Sac*I으로 절단하고 양 말단을 blunting한 다음, 제한효소 *Xba*I으로 절단하여 insert DNA와 ligation하여 발현 vector, pIGHSP26을 구축하였다 (Fig. 2-25A). 구축된 pIGHSP17.9 내의 35S promoter 하류에 *OsHSP26* 유전자가 정상적으로 삽입되었는지의 여부를 35Ss-2, 26as-1 및 26as-2 primer를 이용한 PCR 증폭을 통하여 확인하였다 (Fig. 2-25B).

2. 모델식물의 형질전환

가. *Agrobacterium*의 형질전환

제작된 발현 vector pBIHSP17.4, pIGHSP17.9 및 pIGHSP26을 각각 Horsch 등 (1988)의 direct *Agrobacterium* transformation (freeze-thaw method) 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭으로 발현 vector의 도입여부를 확인한 다음, 식물체 형질전환에 이용하였다.

나. 모델식물의 형질전환

각각의 constructs로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 kanamycin과 rifampicin이 첨가된 YEP 배지에 접종하여 하룻밤 배양한 후, Horsch 등 (1988)의 leaf disc transformation 방법으로 식물체를 형질전환하였다 (Fig. 2-26). 기내에서 무균 배양한 담배의 잎을 0.5×0.5 ㎠ 크기로 잘라 *A. tumefaciens* LBA4404 현탁액에 감염시킨 다음, MS 배지에 치상하여 28℃, 암상태에서 이틀간 배양하였다. 멸균수로 엽조각을 수회 세척한 후, 1 ㎎/ℓ의 BAP, 0.1 ㎎/ℓ의 NAA, 100 ㎍/㎖의 cefotaxime 및 100 ㎍/㎖의 kanamycin이 첨가된 MS 배지로 옮겨 shoot의 분화를 유도하였다. 유도된 shoot를 micro nutrient의 양을 1/2로 줄이고 kanamycin과 cefotaxime이 첨가된 MS 배지로 옮겨 뿌리를 유도하여 정상적인 식물체로 분화시켰

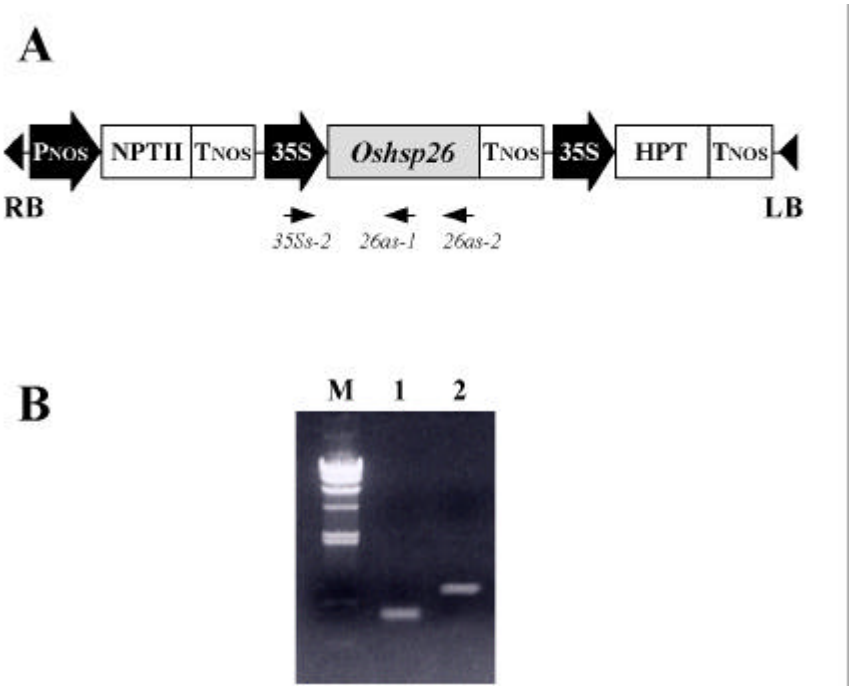


Fig. 2-25. Construction of the expression vector, pIGHSP26.

A. Structure of pIGHSP26. The *OsHSP26* cDNA was placed under the control of the CaMV 35S promoter. B. Identification of pIGHSP26.
Lanes 1 and 2 represent the PCR products with sense primer (35Ss-2) and antisense primers, 26as-1 (lane 1) or 26as-2 (lane 2).
M: DNA digested with *Hin*dIII, size marker.

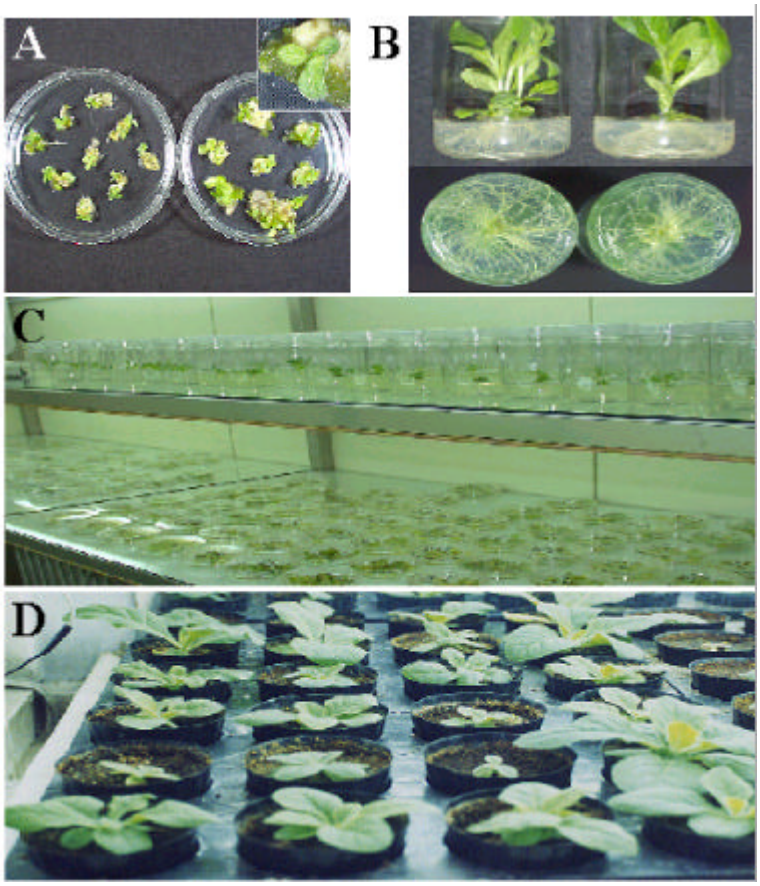


Fig. 2-26. Production of transgenic tobacco plants.

A. Shoot formation on the selection medium.
B. Normal green plants selected from the medium with kanamycin.
C. Regeneration of transgenic tobacco plants in a growth chamber.
D. Plants cultivated in pots.

다. 기내에서 잎과 뿌리가 완전히 형성된 식물체를 원예용 상토 (5호, 부농)를 담은 화분으로 옮긴 다음, 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 일주일간 순화시켰다. 형질전환된 식물체는 형질전환 시에 빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이는 나타내지 않았다.

3. 형질전환 식물체의 확인

가. PCR 분석

형질전환된 식물체의 genome에 HSP 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여, 재분화된 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석 (결과 미제시)과 genomic PCR 분석으로 확인하였다. PCR 증폭을 위하여 35S promoter와 HSP 유전자의 염기서열에 근거하여 35S sense-1 및 sense-2 primer, 35S antisense, BcHSP17.4 antisense, OsHSP17.9 antisense 및 OsHSP26 antisense primer를 합성한 다음 (Table 2-1), 각각의 primer를 조합으로 하여 형질전환 식물체로부터 분리한 genomic DNA를 template로 PCR 증폭을 실시하였다.

그 결과, 그림 2-27 29에서 나타낸 바와 같이 pBIHSP17.4, pIGHSP17.9 및 pIGHSP26의 모든 형질전환 식물체에서 35S sense-1과 35S antisense primer 조합을 이용한 PCR 증폭 결과, 예상크기 0.3 kb와 동일한 35S promoter 영역의 특이적 증폭산물을 확인하였다. 또한 pBIHSP17.4의 형질전환구에서 35S sense-2와 BcHSP17.4 antisense primer 조합을 이용한 PCR 증폭 결과 0.4 kb의 35S promoter-HSP 유전자의 특이적 증폭산물을 확인하였으며 (Fig. 2-27C), pIGHSP17.9의 형질전환구에서는 35S sense-2와 OsHSP17.9 antisense primer 조합을 이용한 PCR 증폭 결과 0.8 kb (Fig. 2-28C), pIGHSP26의 형질전환구에서는 35S sense-2와 OsHSP26 antisense primer 조합을 이용한 PCR 증폭 결과 0.45 kb (Fig. 2-29C)의 35S promoter-HSP 유전자의 특이적 증폭산물을 각각 확인하였다.

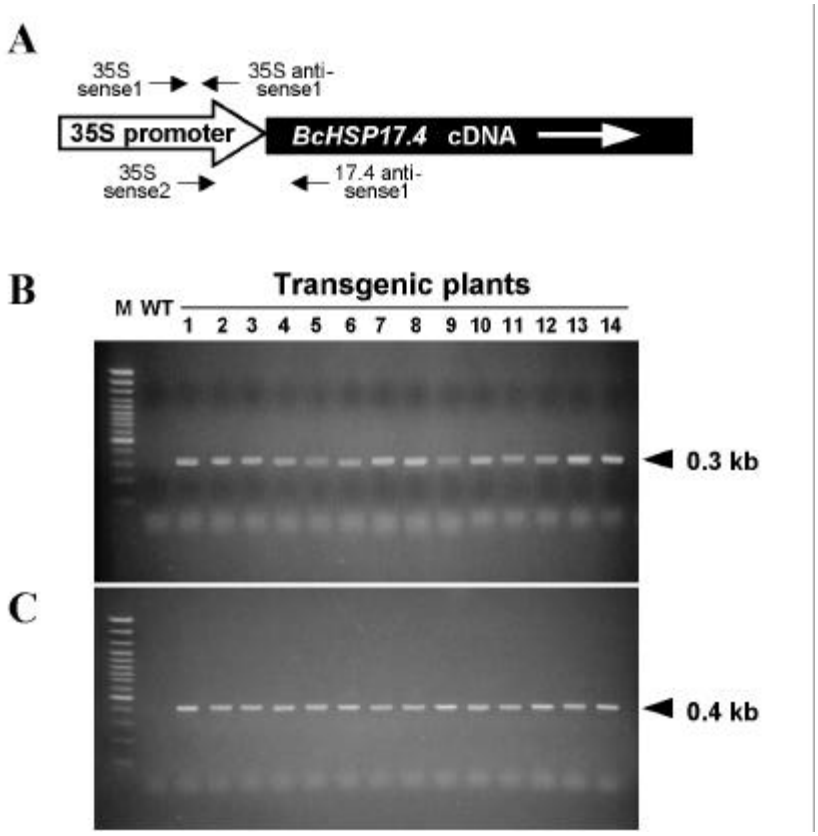


Fig. 2-27. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pBIHSP17.4.

A. Schematic diagram for PCR amplification of 35S promoter and *BcHSP17.4* cDNA fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with 35S sense1 and 35S antisense1 primers.
C. PCR amplification with 35S sense2 and 17.4 antisense1 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines. M: 100 bp DNA ladder.

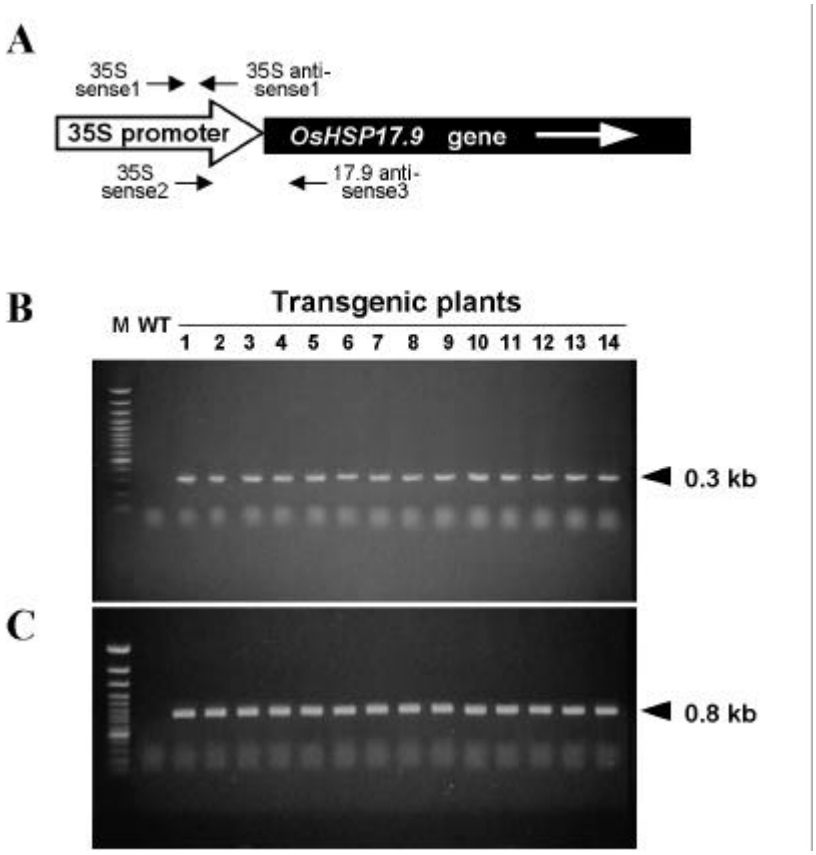


Fig. 2-28. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pIGHSP17.9.

A. Schematic diagram for PCR amplification of 35S promoter and *OsHSP17.9* gene fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with 35S sense1 and 35S antisense1 primers.
C. PCR amplification with 35S sense2 and 17.9 antisense1 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines. M: 100 bp DNA ladder.

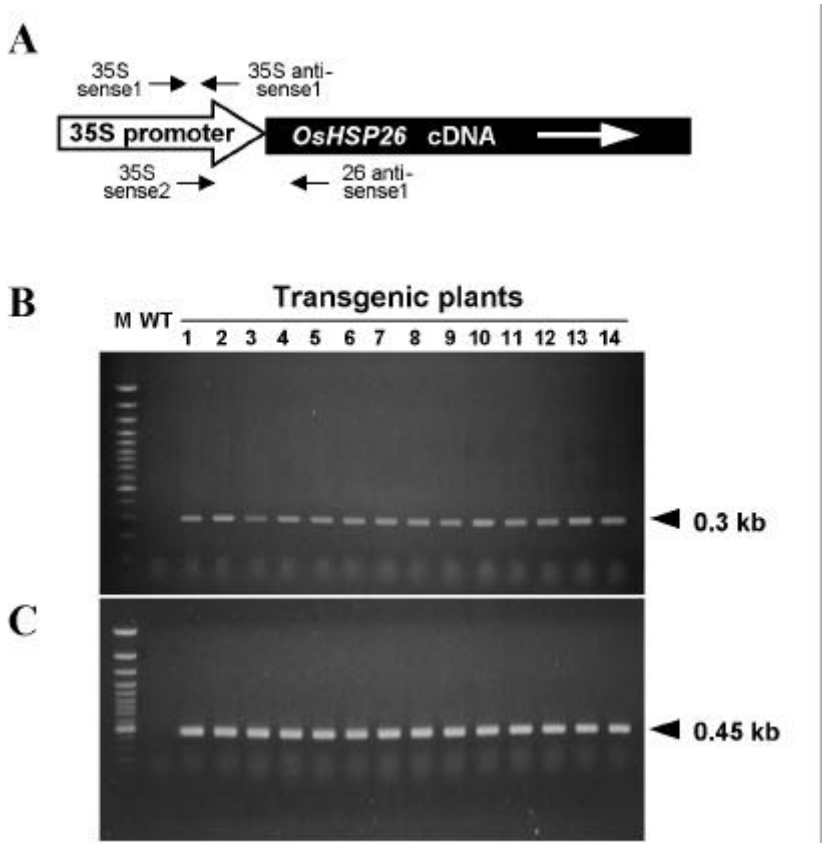


Fig. 2-29. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pIGHSP26.

A. Schematic diagram for PCR amplification of 35S promoter and *OsHSP26* cDNA fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with 35S sense1 and 35S antisense1 primers.
C. PCR amplification with 35S sense2 and 26 antisense1 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines. M: 100 bp DNA ladder.

이와 같은 각각의 construct에 대한 2 조합의 PCR 분석을 통하여 최종적으로 pBIHSP17.4의 경우 24 line, pIGHSP17.9의 경우 26 line 및 pIGHSP26의 경우 24 line의 형질전환 담배 (T0 plant)를 선발하였다.

나. Northern blot 분석

형질전환된 담배의 세포 내에서 도입된 외래의 HSP 유전자가 항상적으로 발현하고 있는지의 여부를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 실시하였다. 담배의 엽조직으로부터 guanidine thiocyanate 법으로 total RNA를 분리한 다음 15 μg을 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동하였으며, hybridization probe로는 형질전환에 사용한 *BcHSP17.4, OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 각각 사용하였다.

그 결과, 그림 2-30서 나타낸 바와 같이 wild-type 담배에서는 보이지 않는 0.7-1.0 kb의 전사체가 모든 형질전환 식물체에서 축적되었다. 따라서, 형질전환된 담배의 세포 내에서 도입된 외래의 HSP 유전자 (*BcHSP17.4, OsHSP17.9* 및 *OsHSP26*)가 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

4. 형질전환 식물체의 분석

가. pIGHSP26

1) 엽록체 lmw HSP의 축적이 광합성 효율에 미치는 영향

형질전환 담배의 세포 내에서 특정 HSP 단백질의 과발현에 의한 축적이 식물의 고온내성 획득에 미치는 영향을 알아보기 위하여 heat shock 처리 후 광합성 효율을 조사하였다. 이를 위하여 식물체의 잎으로부터 직경 22 mm의 leaf disc를 만들어 온도가 조절되는 aluminum block 위에 놓은 후, 암상태에서 PAM101을 이용하여 chlorophyll 형광을 측정하였으며, 온도의 증가에 따른 chlorophyll 형광의

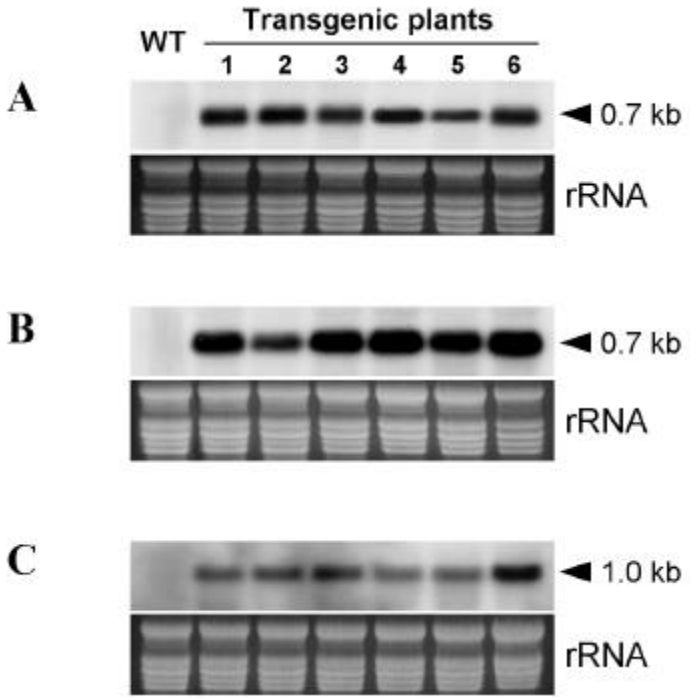


Fig. 2-30. Northern blot analysis of transgenic tobacco plants.

Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transgenic tobacco plants. Numbers indicate independent transgenic lines.
rRNA indicates the relative RNA amount put in each lane.

A. pBIHSP17.4 B. pIGHSP17.9 C. pIGHSP26

Fo 및 Fv 값의 변화를 분석하였다 (Miyao-Tokutomi *et al.*, 1998). 일반적으로 식물에 있어서 고온처리는 chlorophyll 형광의 Fo 값을 증가시키며 Fv 값을 감소시키는데, 이들은 각각 광화학계 II (PSII)로부터 light harvest complex (LHC) II의 분리에 의한 것과 PSII의 전자전달반응의 불활성화에 의한 것으로 알려져 있다 (Asada, 1994). 그림 2-31에 나타낸 바와 같이 형질전환하지 않은 wild-type 식물체의 경우, 40℃ 이상의 온도에서는 5분간의 고온처리에 의해 Fv 값이 감소하였으며, Fo 값은 급격히 증가하였다. 따라서 wild-type 식물의 광합성 기구는 40℃ 이상의 온도에서는 불활성화되기 시작함을 알수 있었다. 한편, wild-type 식물체의 leaf disc를 5분간 고온처리한 후, 다시 25℃에서 5분간 배양한 후 형광을 측정하였을때는 Fv 및 Fo 값의 증감이 완화되었다. 이러한 결과는 PSII로부터 분리되었던 LHCII가 회복되었음을 의미한다.

한편 엽록체 lmw HSP (*OsHSP26*)이 이러한 고온 스트레스에 의한 광화학계의 불활성화를 완하시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 형질전환 식물체의 잎으로부터 단백질을 분리하여 12% SDS-전기영동한 다음, nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher and Schell, Germany)에 blotting하여 immunoblot 분석을 실시하였으며, 형질전환 식물체의 고온 스트레스 하에서의 Fo의 변화를 측정하였다 (Fig. 2-32). 그 결과 엽록체 lmw HSP의 발현이 거의 없는 8, 26 등은 비형질전환 식물체와 비슷한 수준으로 Fo가 증가하였으나, 전체적으로 엽록체 lmw HSP (*OsHSP26*)의 발현량이 높을수록 Fo의 증가율이 감소하였다. 이러한 결과는 항상적으로 발현된 엽록체 lmw HSP가 고온 스트레스에 따른 PSII로부터의 LHCII의 분리를 감소시킨 결과임을 나타낸다.

한편, 고온 스트레스 하에서 Fo의 증가율이 가장 낮았던 형질전환 식물체 3, 20에 대하여 광합성 효율을 나타내는 Fv/Fm 및 광양자수율을 나타내는 1/Fo-1/Fm 치를 각각 측정하였다 (Fig. 2-33). 그 결과 광합성이 완전히 없어지는 온도인 52℃에서의 활성의 1/2이 되는 온도가 wild-type 식물체보다 약 2℃ 정도 증가되었다 (Fig.2-33C). 이러한 결과는 고온 스트레스 하에서의 Fo의 증가율의 감소 및 Fv의 감소율의 억제에 따른 결과임을 알수 있었다 (Fig. 2-33A & B). 따라서 엽

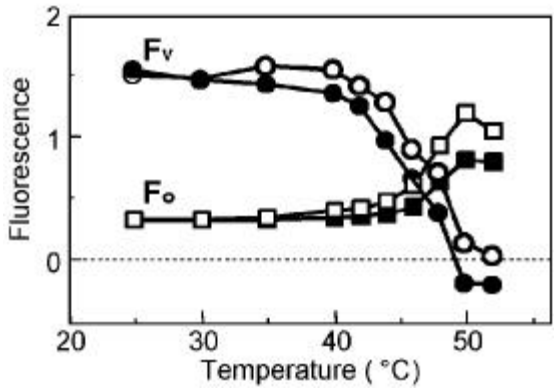


Fig. 2-31. Changes in the Fo and Fv levels of chlorophyll fluorescence after heat treatment of leaf discs from nontransformants.

Leaf discs were placed on a temperature-controlled aluminum block and incubated at designated temperatures in the darkness. After 5 min incubation, the chlorophyll fluorescence was measured using a modulation fluormeter, PAM101. □: Fo of 5 min incubation at designated temperature. ■: Fo of 5 min incubation at 25℃ after heat treatment. ○: Fv of 5 min incubation at designated temperature. ●: Fv of 5 min incubation at 25℃ after heat treatment.

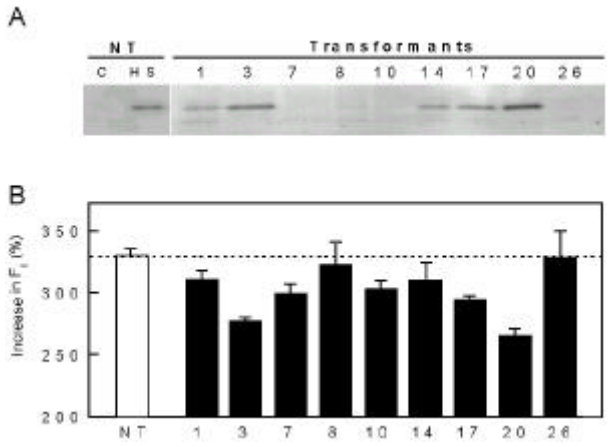


Fig. 2-32. Comparison of increase in Fo levels of chlorophyll fluorescence after heat treatment.

A. Immunoblot analysis. Total proteins were extracted from leaves of nontransformants (NT) and transformants, and subjected to immunoblotting. C and HS denotes leaves subjected to 25℃ and 42℃ for 4 h, respectively.
B. Percent increase of Fo after 5 min incubation at 48℃.

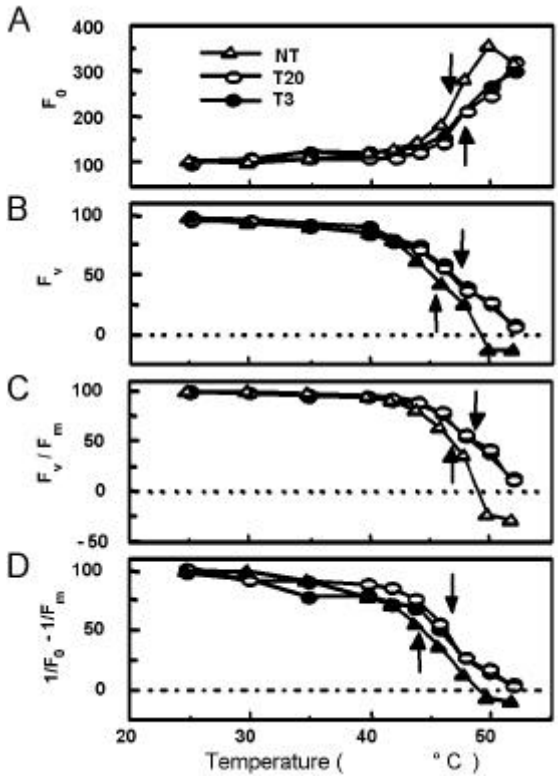


Fig. 2-33. Changes of photosynthetic parameters.

Fo (A), Fv (B), Fv/Fm (C) and 1/Fo-1/Fm (D) of chlorophyll fluorescence after 5 min heat treatment at designated temperatures. Arrows represent temperatures at which the level of Fo was doubled. (A) or the levels of Fv (B), Fv/Fm (C) and 1/Fo-1/Fm (D) were reduced to half of control samples.

록체 lmw HSP는 고온 스트레스 하에서 광화학계를 안정화시키고, LHCII의 분리를 억제함으로서 광합성기구를 보호하는 것으로 생각된다.

2) 엽록체 lmw HSP의 축적이 식물체의 내열성에 미치는 영향

고온 스트레스 하에서의 엽록체 lmw HSP의 광합성 기구에 대한 보호작용이 식물체 전체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 식물체 수준에서 조사하였다 (Fig. 2-34). 형질전환하지 않은 wild-type 식물체를 기내에서 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 암조건 또는 광조건에서 각각 배양한 결과, 암조건에서는 식물체가 생존하였으나 광조건에서는 1주일 이내에 전부 고사하였다 (Fig. 2-34A). 이러한 결과는 고온 스트레스에 따른 식물체의 손상 원인이 높은 온도 그 자체뿐만 아니라, 고온과 더불어 광조건에 의해 유도되는 광산화적 스트레스에 의한 것임을 나타낸다. 한편 형질전환 식물체의 경우 동일한 조건으로 처리했을 때, 유식물체의 약 80%가 광조건하에서도 생존하였다 (Fig. 2-34B). 이러한 결과는 항상적으로 발현된 엽록체 lmw HSP가 고온 스트레스 하에서 광화학계를 보호함으로서 고온 및 광산화적 스트레스에 대한 내성을 증가시킨 결과로 추측된다. 이러한 결과는 엽록체 lmw HSP 유전자가 고온처리뿐만 아니라, 산화적 스트레스에 의해서도 발현이 유도된다는 이 등 (1999)의 결과와 일치하는 것이다. 따라서 엽록체 lmw HSP는 식물체 내에서 광합성 기구를 고온 스트레스 또는 광산화적 스트레스로부터 보호하는 기능을 담당하는 것으로 생각되며, 본 연구에서 목적으로 하는 내열성 식물의 구축에 유용할 것으로 판단된다.

나. pBIHSP17.4 및 pIGHSP17.9

벼 유래의 HSP26 유전자로 형질전환된 식물체의 분석을 통하여, 엽록체 lmw HSP의 과발현이 식물의 광합성 효율 및 내열성의 획득과 밀접한 연관이 있다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 식물세포 내의 세포질에 존재하는 lmw HSP의

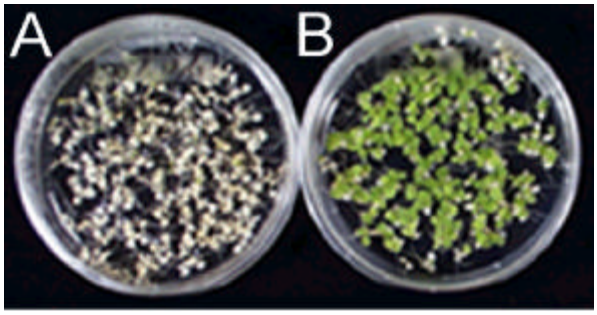


Fig. 2-34. Increased thermotolerance of *OsHSP26* transformants.
A. Nontransformants. B. Transformants.

Plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52℃ in darkness for 45 min and subsequently incubated at normal growth conditions.

과발현이 식물의 광합성 효율 및 내열성의 획득에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 세포질 lmw HSP (pBIHSP17.4 및 pIGHSP17.9)의 과발현이 광합성 효율에 미치는 영향을 Fv 및 Fo 값의 증감으로 분석한 결과, 엽록체 lmw HSP의 과발현에 비해서는 낮지만 대조구에 비해서는 증가된 광합성 효율을 나타내었다 (결과 미제시). 이러한 결과는 pBIHSP17.4 및 pIGHSP17.9의 과발현 산물이 세포질에 존재하는 lmw HSP라는 사실에 기인한 결과로 생각되며, 세포질 lmw HSP의 축적이 어떤 방식으로든 엽록체의 광합성 기구에 영향을 미친 결과로 생각된다.

세포질 lmw HSP의 과발현이 식물체 전체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 유식물체 수준에서 조사한 결과 (Fig. 2-35), 역시 엽록체 lmw HSP에 비해서는 낮지만, 부분적인 내열성의 획득을 나타내었다. 즉, 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, 그림 35에서 나타낸 것과 같이 형질전환 하지 않은 wild-type 식물체는 완전히 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 50% 이상의 생존율을 나타내었다. 세포질 lmw HSP로 형질전환된 식물체의 내열성이 엽록체 lmw HSP에 비해서 낮게 나타난 것은 이들 단백질의 세포 내 작용부위의 차이에 기인한 이유도 있지만, 엽록체 lmw HSP 형질전환 식물체의 경우 homozygous line (T2 plants)을 분석에 이용하였지만, 세포질 lmw HSP의 경우는 heterozygous line (T1 plants)을 분석에 이용한 차이로 생각된다.

이와 같이, 모델식물 (담배)의 형질전환을 통하여 식물체의 내열성 획득에 기여하는 것으로 밝혀진 발현 vector pBIHSP17.4, pIGHSP17.9 및 pIGHSP26을 협동과제의 마늘형질전환체계의 확립과 내열성 유전자 도입 연구에 활용하기 위하여, 구축된 constructs를 원예연구소에 분양하였다.

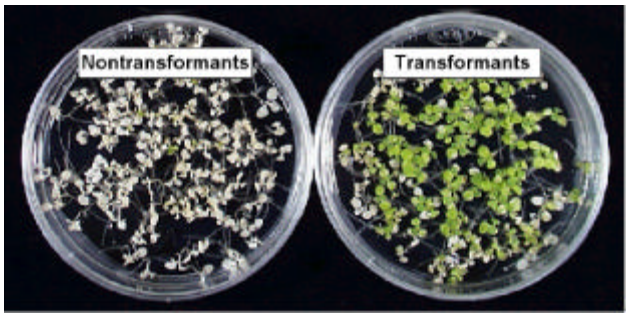


Fig. 2-35. Increased thermotolerance of *OsHSP17.9* transformants.

Plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52℃ in darkness for 45 min and subsequently incubated at normal growth conditions.

제 5 절 내열성 유전자 발현조절영역의 탐색

유전자들은 식물체 내에서 항상적으로 발현되거나 또는 필요가 있을 때만 발현하게된다. 기초대사에 관여하는 효소들의 유전자들은 항상적으로 발현(constitutive expression)을 하지만, 특수한 조직에서만 필요한 단백질이나 효소들은 조직 특이적인 발현 (tissue specific expression)을 하며, 생장시기에 따라서 필요한 효소들은 생장시기 특이적인 발현 (life cycle specific expression)을 하게된다. 특히 환경에 적응하기 위하여 발현되는 유전자들을 유도효소 유전자 (induced enzyme gene)라고 한다. 예를 들어, 식물에서 특정 온도 이상의 고온에서만 발현되는 저분자량 HSP 유전자들은 일종의 유도효소 유전자에 속한다. 이 유도효소 유전자를 식물에 도입하여 형질전환 식물을 만들 때 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti plasmid계, 예를 들어 pBI121 등을 사용하게되면 도입된 유전자는 35S promoter에 의해서 항상적 발현을 하게되고, 고온환경이 도래하기 전에 발현되어 생산되는 HSP은 식물에 무익하여 에너지 경제상 불리하며 식물생육에 마이너스적인 효과를 가져오게 된다. 따라서 본 연구에서는 식물의 genomic DNA library로부터 HSP 유전자의 조절영역을 찾아내어 HSP 유전자의 5' 영역에 부착함으로서 형질전환된 마늘에서 고온특이적인 발현을 하게 하려고 한다. 이를 위하여 먼저 벼의 genomic DNA library를 구축하여 HSP 유전자를 분리한 다음, 그 조절영역의 분석을 통하여 HSP 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 HSE (Heat Shock Element) 등의 특이서열을 중심으로 promoter deleted clone을 구축하였다. 각각의 deleted clone에 marker 유전자로 GUS 유전자를 연결하여 원형질체를 이용한 transient assay 및 형질전환 식물체를 이용한 분석을 통하여 다양한 온도에서의 GUS 활성을 조사함으로서 최적화된 promoter sequence를 확정하였다. 확정된 조절영역에 저분자량 HSP 유전자인 배추유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 연결한 다음, 형질전환 식물체를 구축하고 다양한 온도에서의 발현유도 및 내열성의 획득에 미치는 영향을 본 연구의 제6절에서 조사하였다.

1. *OsHSP17.9* promoter의 분석

HSP 유전자의 발현은 기본적으로 전사수준에서 조절이 이루어지며, heat shock promoter 즉 TATA box의 상류영역에 의해 조절된다 (Schöffl *et al.*, 1984, Schöffl, 1989). HSP 유전자의 발현은 heat shock에 의하여 활성화된 heat-shock element (HSE) binding factor (HSF)가 multiple copy 형태로 조절 영역에 존재하는 HSE에 결합하므로써 유도되는 것으로 알려져 있다 (Schöffl *et al.*, 1989, Czarnecka *et al.*, 1989 Czarnecka *et al.*, 1990). HSP 유전자의 5′ 상류영역에 특이적으로 나타나는 특징은 TATA box의 상류에 "—GAA—" 또는 "—TTC—"의 alternating unit의 염기서열을 가지는 multiple HSE가 존재하며, adenine과 thymine의 염기를 다수 함유하는 AT-rich region과 일반적인 promoter 영역에 나타나는 CCAAT box가 존재하는 것으로 보고되어있다 (Baumann *et al.*, 1987; Czarnecka *et al.*, 1989; Schöffl *et al.*, 1992).

본 연구에서 분리한 *OsHSP17.9*의 염기서열에서 5′ 상류영역을 분석한 결과, 161개의 아미노산으로 구성되어 있는 HSP 구조 유전자의 상류영역 600 bp 이내에서 HSP 유전자의 특이적인 발현에 관여하는 것으로 알려져 있는 HSE 즉, "—GAA—" 또는 "—TTC—"의 alternating unit의 유사서열이 30군데 이상 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 HSE들이 하류의 HSP 유전자의 전사를 유도하기 위해서는 HSE의 trimer와 결합을 할때만 가능하다고 알려져 있다. 분리한 *OsHSP17.9*의 조절 영역에서는 이러한 trimer 형태가 7 반복으로 존재함을 확인하였으며, 그 상류에 RNA polymerase Ⅱ의 인식배열 중의 하나인 CCAAT box도 발견되었다 (Fig. 2-36).

2. 내열성 유전자 조절영역의 탐색 - Transient assay

Northern blot 분석을 통하여, 본 연구에서 분리한 *OsHSP17.9*는 처리온도 및 시간에 따른 급격한 발현의 증가를 나타내어 내열성의 획득과 밀접한 상관관계를

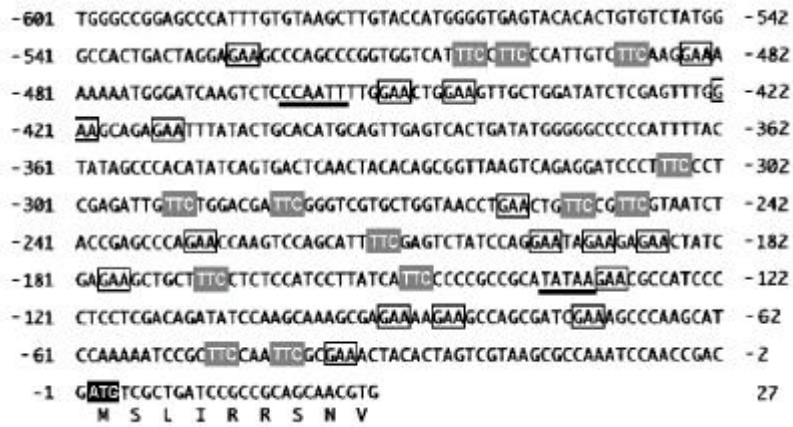


Fig. 2-36. Nucleotide sequence in the 5'-flanking region of the *OsHSP17.9* gene.

The translation start site shown as +1, and the deduced amino acid residues are represented as the single-letter amino acid code. The CCAAT box and TATA box are underlined. The putative heat shock elements, --GAA-- and --TTC-- are boxed.

가진 것으로 나타났으며, 또한 조절영역의 분석 결과, HSP의 특이적인 발현에 관여하는 HSE (heat shock element) 즉, "—GAA—" 또는 "—TTC—"의 alternating unit의 유사서열이 30군데 이상 존재하며, 이러한 HSE의 trimer 형태가 7반복으로 존재하는 것으로 나타나 thermo-inducible promoter의 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다는 것을 보여주었다. 따라서, *OsHSP17.9*의 promoter의 개변을 통한 promoter의 활성변화를 먼저 원형질체를 이용한 transient assay로 분석하였다.

가. Deletion constructs의 제작

*OsHSP17.9*의 promoter 영역을 원형질체를 이용한 transient assay로 탐색하기 위하여 조절영역 내에 존재하는 "—GAA—", "—TTC—", CCAAT box 및 TATA box를 중심으로 promoter가 개변된 6 종류의 mutant clones을 제작하였다. 이를 위하여 *OsHSP17.9* promoter의 염기서열에 근거하여 각각의 PCR primer를 합성하였으며, 5′sense primer 내에는 제한효소 *Hin*dIII site를 그리고 3′antisense primer 내에는 *Xba*I site를 각각 도입하여 합성하였다 (Table 2-1). 먼저 pBI221 vector DNA를 제한효소 *Hin*dIII와 *Xba*I으로 절단하여 CaMV 35S promoter를 제거한 다음, PCR 증폭 후 제한효소 *Hin*dIII와 *Xba*I으로 절단한 각각의 promoter 단편을 도입하였으며, 이를 통하여 제작된 constructs는 다음과 같다. 먼저 *OsHSP17.9*의 번역개시 codon으로부터 -579 bp까지의 조절영역을 포함하는 construct I, -360 bp까지의 construct II, -237 bp 까지의 construct III, -108 bp 까지의 construct IV 그리고, 대조구로 promoter sequence를 완전히 제거한 construct V 및 CaMV 35S promoter를 포함하는 construct VI를 각각 제작하였다 (Fig. 2-37).

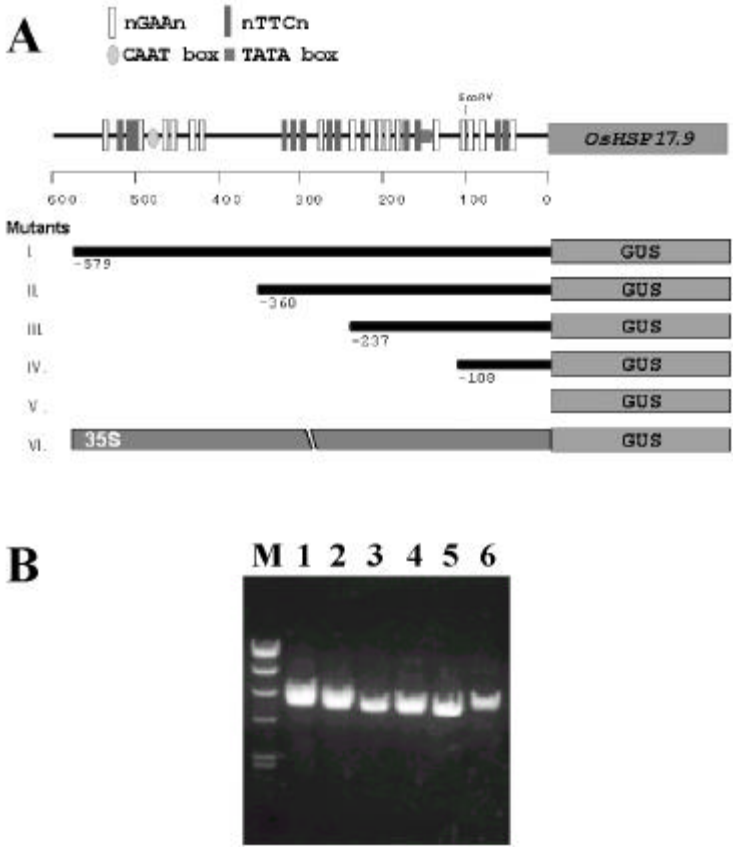


Fig. 2-37. Construction of serial deletion clones for the promoter region of *OsHSP17.9* gene.

DNA fragments amplified by PCR were ligated into pBI221 vectors (A) and plasmid DNAs were analyzed by agarose gel electrophoresis (B). Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6 represent construct I, II, III, IV, V and VI, respectively.

나. 원형질체의 분리

조절영역을 개조한 deleted promoter-GUS construct를 식물세포에 도입하여 transient assay로 해석하기 위하여 담배 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2)의 현탁배양 세포를 사용하였다. 현탁배양세포는 7일 간격으로 200 ㎎/ℓ KH_2PO_4, 1.0 ㎎/ℓ thiamin, 100 ㎎/ℓ myo-inositol, 0.2 ㎎/ℓ 2,4-D 및 3% sucrose가 첨가된 MS 배지 (pH 5.8)에서 26℃, 암상태로 계대배양 (130 rpm)하였다. 원형질체의 분리를 위해 배양 3일째의 세포를 회수한 다음 0.4 M mannitol로 1회 washing (100×g, 3 min)하여 enzyme solution (1% cellulase Onozuka RS (Yakult Honsha); 0.1% Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical); 10 mM MES; 0.4 M mannitol, pH 5.5)에 현탁하였다. 15분 간격으로 부드럽게 pipetting하면서 30℃에서 1시간 배양한 다음, 원심분리 (100×g, 3 min)하여 원형질체를 회수한 다음, CPW 용액 (pH 5.8)으로 3회 washing하고 최종적으로 CPW 용액에 2×10^6/㎖로 현탁하였다.

다. 형질전환

원형질체에 200 ㎕의 PEG 용액과 20 ㎍의 DNA를 첨가하여 실온에서 15분간 배양한 다음, 5 ㎖의 275 mM $Ca(NO_3)_2$를 첨가하여 DNA의 흡수를 중지시켰다. 원심분리 (100×g, 3 min)하여 원형질체를 회수한 다음, 1 ㎖의 200 ㎎/ℓ KH_2PO_4, 1.0 ㎎/ℓ thiamin, 100 ㎎/ℓ myo-inositol, 0.2 ㎎/ℓ 2,4-D 0.4 M mannitol 및 1% sucrose가 첨가된 MS 배지에 현탁하여 26℃, 암상태에서 20 시간동안 배양하였다.

라. Transient assay

Deleted promoter-GUS construct의 transient assay를 위하여, 형질전환된 원형

질체를 42℃에서 1시간 처리하고 25℃ 광조건에서 2시간 배양한 다음, β-glucuronidase (GUS) 활성에 의해 생산된 4-methyl-umbelliferone의 fluoroscence를 spectrofluorophotometer (RF-5301 PC, SHIMADZU)를 이용하여 측정하였다 (Fig. 2-38). 이때 control로는 35S promoter가 연결된 construct VI와 promoter를 완전히 제거한 construct V를 사용하였다. 그 결과 그림 2-38에서 나타난 바와 같이 CCAAT box 부근까지를 포함하는 Construct Ⅰ의 GUS 활성이 대조구인 35S promoter에 비해 11.3 배 이상 증가된, 가장 높은 수준을 나타내었으며, HSE의 수가 감소할수록 낮아지는 것으로 나타났다. 즉, construct II의 경우 construct I의 약 59%의 활성을 나타내었으며, construct III의 경우 12% 이하로 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 또한 TATA box 하류의 HSE를 포함하는 construct Ⅳ는 promoter sequence를 완전히 제거한 construct V와 유사한 수준으로 나타나 promoter의 기능을 완전히 소실한 것으로 판단되었다. 이러한 결과로 미루어 *OsHSP17.9*의 -579 -360 사이의 서열이 이 유전자의 고온 특이적인 발현을 위한 전사 활성화에 필수적일 것으로 즉, positive *cis*-element로 판단되었다.

3. 내열성 유전자 조절영역의 탐색 - 형질전환 식물체의 분석

원형질체를 이용한 transient assay를 통하여 *OsHSP17.9* promoter의 -579 sequence가 고온 (42℃)에서의 발현유도에 필수적이라는 것을 확인하였다. 이를 형질전환 식물체에서 다시 확인하고, 아울러 마늘의 성장둔화를 가져오는 6-7월의 온도인 28-30℃에서의 promoter 활성의 측정을 위하여, deletion된 각각의 constructs를 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm으로 subcloning하여 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, promoter 활성을 측정하였다.

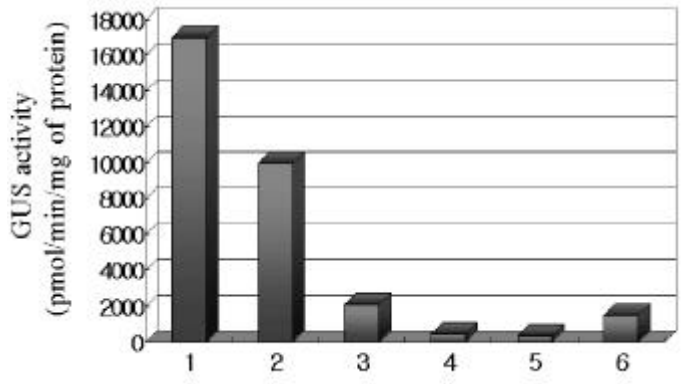


Fig. 2-38. Comparison of GUS activity of deletion mutants for the heat shock promoter fused with GUS cassette after heat treatment.

Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6 represent construct I, II, III, IV, V and VI, respectively.

가. 식물체 형질전환용 binary vector의 구축

pBI221 vector에 클로닝된 -579, -360, -237 및 -108 bp promoter 단편을 제한효소 *Hin*dIII와 *Xba*I으로 절단하여 분리한 다음, 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter와 대체하여 제작한 각각의 constructs를 그림 2-39에 표시하였다. 제작된 각각의 constructs를 Horsch 등 (1988)의 direct *Agrobacterium* transformation (freeze-thaw method) 방법으로 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환한 다음 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭을 통하여 확인하였다.

나. 식물체의 형질전환

각각의 constructs로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 kanamycin과 rifampicin이 첨가된 YEP 배지에 접종하여 하룻밤 배양한 후, 제4절의 2항에서 기술한 Horsch 등 (1988)의 leaf disc transformation 방법으로 형질전환 담배 식물체를 구축하였다 (see Fig. 2-26).

다. 형질전환 식물체의 확인

형질전환 식물체의 선발을 위하여 재분화된 담배의 잎으로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭을 위하여 NPTII 유전자, *OsHSP17.9* promoter 및 GUS 유전자의 서열에 근거하여 합성한 primer는 Table 2-1에 표시하였다.

그 결과, 그림 2-40B에서 나타낸 바와 같이 모든 형질전환 식물에서 NPTII sense와 antisense primer 조합에서 0.7 kb의 특이적 증폭산물을 확인하였다. 또한 각각의 constructs에 특이적인 primer 조합을 통하여 다시 한번 형질전환 여부를 확인하였으며 (Fig. 2-40C), 이때 사용된 primer의 조합은 다음과 같다.

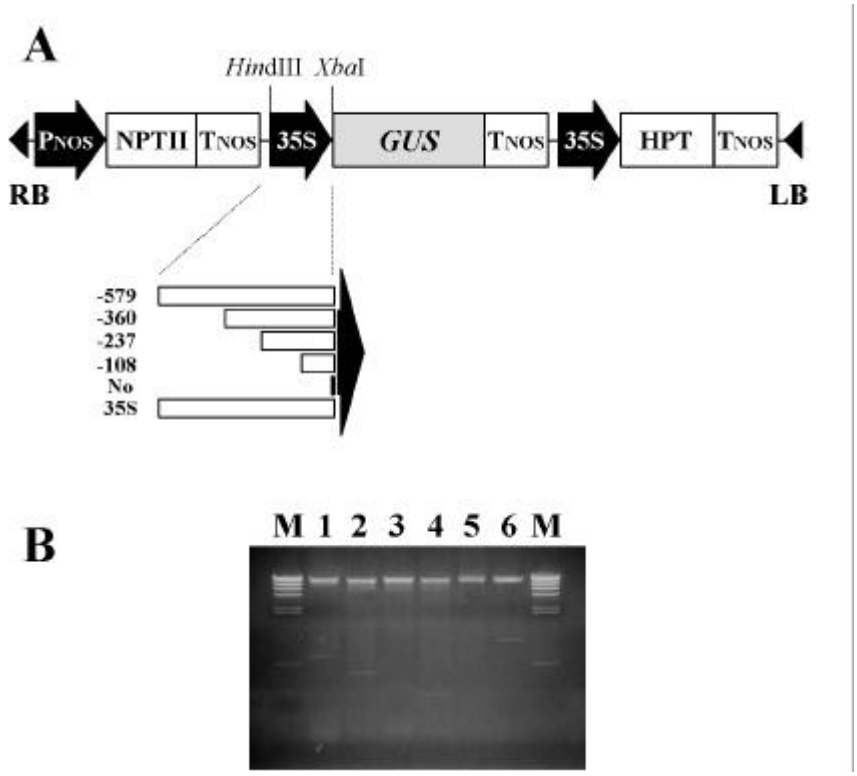


Fig. 2-39. Construction of *OsHSP17.9* promoter constructs.

A. Structure of promoter constructs. For functional analysis of the promoter in transgenic tobacco plants, deleted *OsHSP17.9* promoter clones has replaced 35S in pIG121-Hm vectors. B. Identification of promoter constructs. Plasmid was digested with *Hin*dIII and *Xba*I. M: DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.

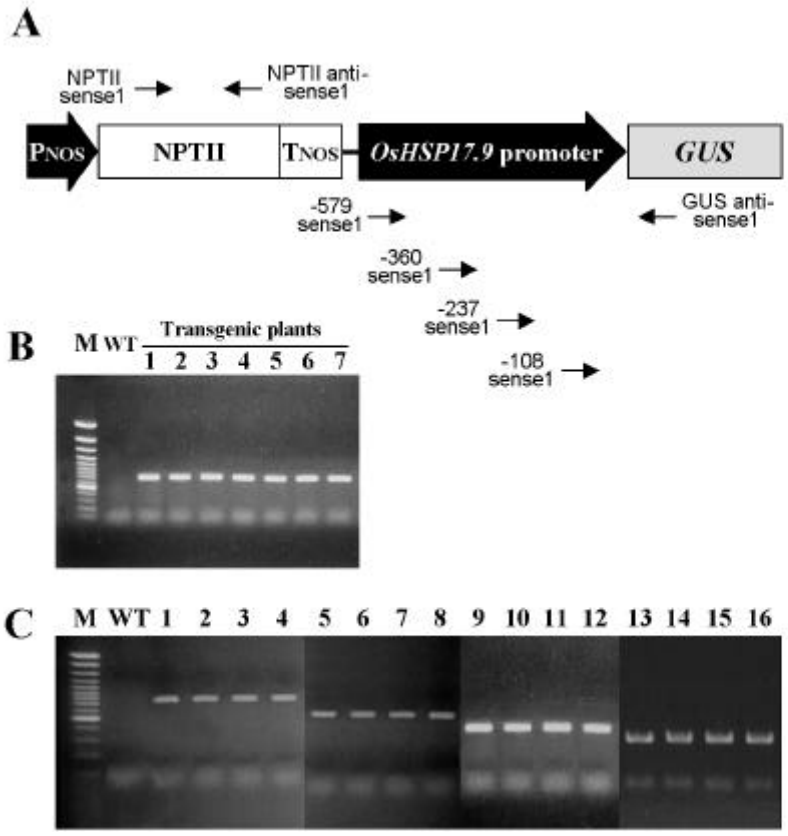


Fig. 2-40. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with *OsHSP17.9* promoter constructs.

A. Schematic diagram for PCR amplification of *OsHSP17.9* promoter, NPTII and GUS gene fragments for identification of transformation. B. PCR amplification with NPTII sense1 and NPTII antisense1 primers. C. PCR amplification with *OsHSP17.9* sense primers, -579 (lane 1-4), -360 (lane 5-8), -237 (lane 9-12) or –108 (lane 13-16) and GUS antisense1 primers.

construct I -587 sense-1 & GUS antisense

construct II -360 sense-1 & GUS antisense

construct III -237 sense-1 & GUS antisense

construct VI -108 sense-1 & GUS antisense

construct V GUS sense-1 & GUS antisense

construct VI 35S sense-2 & GUS antisense

이와 같은 constructs 별 2 조합의 PCR 분석을 통하여 최종적으로 construct 당 15 20 line 이상의 형질전환 담배 (T0 plant)를 선발하였다.

라. 발현정도의 확인 - Northern blot 분석

각각의 constructs로 형질전환이 확인된 식물체의 잎을 이용하여, RNA 수준에서 promoter 활성을 비교하였다. 식물체의 잎을 절취하여 25℃, 30℃ 및 42℃에서 처리한 다음, total RNA를 분리하여 GUS 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사하였다. HSP promoter의 고·저온별 발현정도의 검토를 위하여 먼저, 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스로 30℃의 온도를 설정하였으며, 온도 스트레스를 포함한 대부분의 스트레스가 1시간 이내의 단기간에 끝나지 않고, 하루 4-6 시간 이상, 몇 일간에 걸친 장기간의 스트레스로 나타난다는 사실을 고려하여 6시간 처리하였다. 또한 고온 스트레스로서 형질전환 식물체의 잎을 42℃에서 1시간 처리하였다.

각각의 처리구로부터 total RNA를 분리하여, Northern blot 분석을 실시한 결과, 그림 2-41에서 나타낸 바와 같이 positive control로 사용한 35S promoter의 경우는 30℃ 이상의 고온처리에서는 발현량이 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, negative control로 사용한0 promoter가 완전히 제거된 construct V의 경우는 모든 온도에서 전혀 발현하지 않는 것으로 나타났다.

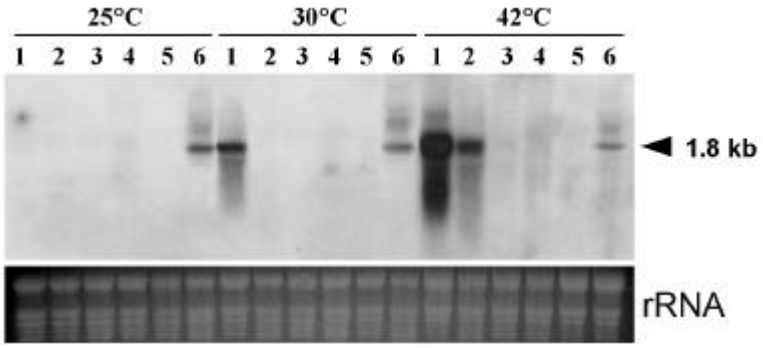


Fig. 2-41. Effect of temperature on the expression of GUS gene of *OsHSP17.9* promoter constructs in transgenic tobacco plants.

The leaves of transgenic tobacco plants were treated at 25℃ for 6 h, 30℃ for 6 h, or 42℃ for 1 h, respectively. Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6 represent construct I, II, III, IV, V and VI, respectively. rRNA indicates the relative RNA amount put in each lane.

Promoter가 개변된 constructs (-579, -360, -237 및 -108 bp promoter)의 경우, 25℃에서는 모든 construct에서 GUS transcript가 검출되지 않아, 발현되지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 2-41). 또한 30℃에서 1시간 처리조건에서도 GUS transcript의 축적이 나타나지 않았다 (결과 미제시). 그러나, 30℃, 6시간 처리조건에서는 -579 bp promoter 단편을 포함하는 construct I의 경우 35S promoter보다 약간 증가된 GUS transcript의 축적을 확인하였다 (Fig. 2-41). 이러한 결과는 construct I의 경우 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 조건에서 HSP 유전자의 발현 유도를 위한 inducible promoter로서의 활용가능성을 보여주는 중요한 결과로 생각된다. 또한 42℃, 1시간 처리조건하에서는 construct I이 가장 높은 GUS transcript의 축적을 나타내었으며, -360 bp promoter 단편을 포함하는 construct II에서도 construct I보다는 낮지만 35S promoter보다 높은 상당한 수준의 GUS transcript의 축적을 나타내었다 (Fig. 2-41).

이러한 결과는 원형질체를 이용한 transient assay에서의 결과와 일치하는 것으로, *OsHSP17.9*의 -579 promoter sequence가 고온 특이적인 발현을 위한 전사 활성화에 필수적이라는 것을 나타내는 결과로 생각된다. 또한 마늘의 숙기에 발생하는 장시간에 걸친 비교적 낮은 고온 스트레스의 극복을 HSP 유전자를 통한 내열성의 획득에 유용할 것으로 생각된다.

마. 발현정도의 확인 - Chemiluminescence assay

형질전환 식물체 내에서 promoter 활성을 단백질 수준에서 확인하기 위하여, Northern blot 분석에서와 동일한 방법으로 heat shock 처리한 다음, 단백질을 분리하여 GUS 활성을 측정하였다. 이를 위하여 GUS-Light kit (TROPIX, PE Biosystems)와 TD-20/20 Luminometer (DLReady)를 이용하였으며, 3 번의 실험결과를 평균하여 결과로 이용하였다.

그 결과, 그림 2-42에서 나타낸 바와 같이 positive control로 사용한 35S promoter의 경우는 처리온도에 따른 유의적인 변화를 나타내지 않고 항상적으로 발현하는 것으로 나타났으며, negative control로 사용한 promoter가 완전히 제거된 construct V의 경우는 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다.

Promoter가 개변된 constructs (-579, -360, -237 및 -108 bp promoter)의 경우, 25℃에서는 모든 construct에서 promoter가 완전히 제거된 construct V와 동일한 수준으로 나타나 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나, 30℃, 6시간 처리조건에서는 -579 bp promoter 단편을 포함하는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 2배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었으며, -360, -237 및 -108 bp promoter의 경우는 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 42℃, 2시간 처리조건하에서는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 20배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었으며, construct II의 경우 35S promoter에 비해서 8배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었다.

이러한 결과는 앞의 원형질체를 이용한 transient assay 및 형질전환 식물체의 Northern blot 분석의 결과와 일치하는 것으로 construct Ⅰ의 -579 bp promoter가 고온 (42℃)에서의 내열성 유전자의 발현유도에 필수적일 뿐 만 아니라 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 하에서 내열성 유전자의 발현유도를 위한 inducible promoter로의 유용성을 나타내는 결과로 생각된다.

따라서 construct Ⅰ의 -579 bp promoter sequence를 확정 promoter로 하여 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 이용한 constructs의 구축 및 식물체 형질전환에 이용하였다.

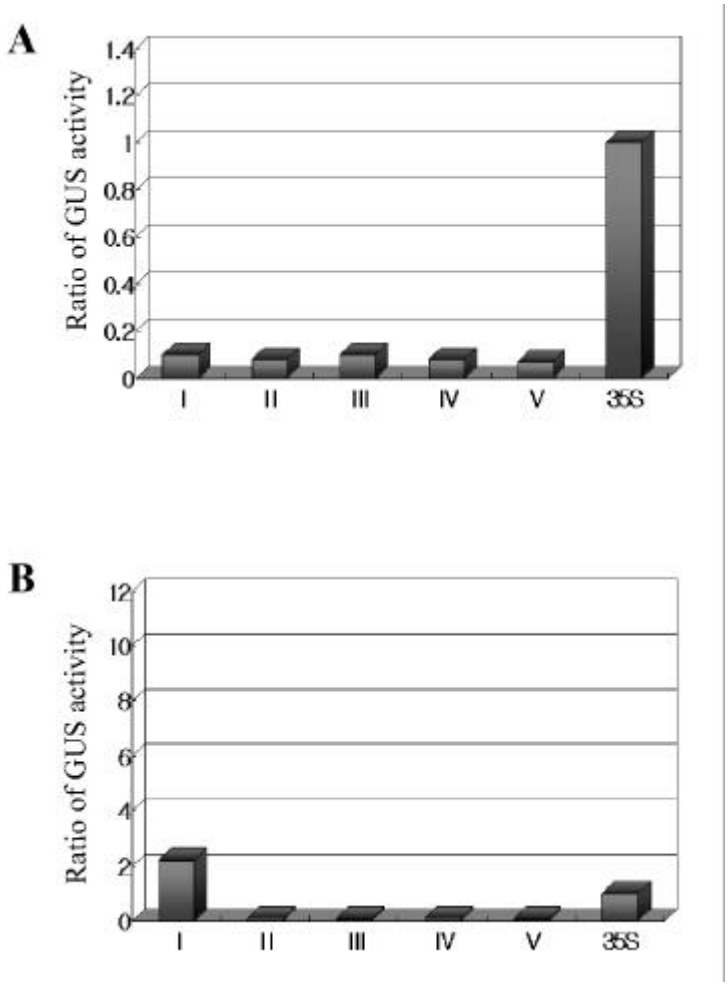


Fig. 2-42 continued.

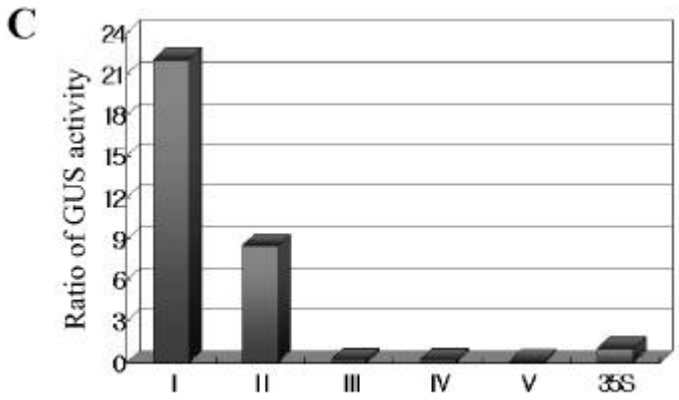


Fig. 2-42. Ratio of GUS activity of transformed tobacco plants with the mutated heat shock promoters after heat treatment.

GUS activity was measured with 50 μg of crude protein of transformed tobacco plant. The data are presented as mean values of 3 independent experiments.

A. Ratio of GUS activity of plant treated at 25℃ for 6 h.
B. Ratio of GUS activity of plant treated at 30℃ for 6 h.
C. Ratio of GUS activity of plant treated at 42℃ for 1 h.

제 6 절 조절영역 확정 발현 vector의 구축과 형질전환 식물체의 분석

제 5 절의 연구를 통하여 벼의 *OsHSP17.9* 유전자의 조절영역 중에서 -579 bp promoter sequence가 고온에 의한 전사 활성화에 필수적인 것으로 나타나, 이를 내열성 유전자의 분자수식을 위한 확정 promoter로 판단하였다. 따라서, 본 연구에서는 내열성의 획득을 위한 형질전환 식물체의 구축에 있어 항상적 발현에 의한 세포수준에서의 에너지 경제상의 손실을 방지하고, 고온에서의 유도성 발현에 의한 내열성의 효율적 획득을 위하여, 확정 promoter에 본 연구실에서 분리하여둔 저분자량 HSP 유전자인 배추 유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자와 벼 유래의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* 유전자를 연결하여 내열성의 획득을 위한 최종 constructs로서 pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13을 각각 제작하였다. 또한 구축된 각각의 constructs를 모델 식물인 담배에 형질전환하여 다양한 온도조건 하에서의 발현유도 및 이를 통한 내열성의 획득을 조사하고자 하였다. 또한 구축된 constructs는 협동과제에서 마늘의 최적 형질전환 조건이 구명되면, 이를 마늘에 도입하여, 하고현상 (summer depression)의 극복을 통한 생산성의 향상에 이용하고자 한다.

1. 조절영역 확정 발현 vector의 구축

본 연구의 제 4 절에서 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 각각 식물체 형질전환용 binary vector인 pBI121 및 pIG121-Hm의 35S promoter 하류에 도입하여 발현 vector pBIHSP17.4, pIGHSP17.9 및 pIGHSP26을 구축하였다. 본 연구의 제 6 절에서는 이들 vector (pBIHSP17.4, pIGHSP17.9 및 pIGHSP26)를 제한효소 *Hin*dIII와 *Xba*I으로 이중절단하여 35S promoter를 제거한 다음,

*OsHSP17.9*의 -579 bp promoter 단편을 삽입하였다. 이를 통하여 *OsHSP17.9*의 확정 promoter의 하류에 각각의 HSP 유전자가 연결된 발현 vector, pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9 및 pIG579-HSP26을 각각 제작하였다 (Fig. 2-43 45). 또한 벼 유래의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* 유전자의 도입을 위하여 앞에서 구축된 pIG579-HSP17.9 DNA를 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 이중절단하여 *OsHSP17.9* 유전자를 제거한 다음, *OsHSF13* 유전자를 도입하여 발현 vector, pIG579-HSF13을 제작하였다 (Fig. 2-46). 구축된 각각의 발현 vector의 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭을 실시하여, 도입된 확정 promoter 및 HSP/HSF 유전자의 위치와 방향을 확인하였다.

2. 모델식물의 형질전환

가. *Agrobacterium*의 형질전환

제작된 발현 vector pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13을 각각 Horsch 등 (1988)의 direct *Agrobacterium* transformation (freeze-thaw method) 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭으로 발현 vector의 도입여부를 확인한 다음, 식물체 형질전환에 이용하였다.

나. 모델식물의 형질전환

각각의 constructs로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 kanamycin과 rifampicin이 첨가된 YEP 배지에 접종하여 하룻밤 배양한 후, 제 4 절의 2항에서 기술한 Horsch 등 (1988)의 leaf disc transformation 방법으로 형질전환 담배 식물체를 구축하였다 (see Fig. 2-26).

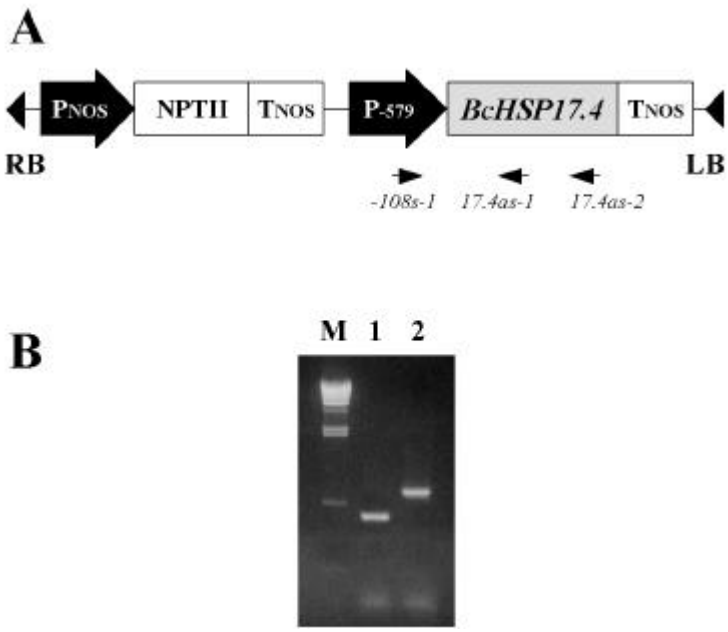


Fig. 2-43. Construction of the expression vector, pBI579-HSP17.4.

A. Structure of pBI579-HSP17.4. The *BcHSP17.4* cDNA was placed under the control of the the -579 promoter of *OsHSP17.9*.

B. Identification of pBI579-HSP17.4. Lanes 1 and 2 represent the PCR products with sense primer (-108s-1) and antisense primers, 17.4as-1 (lane 1) or 17.4as-2 (lane 2). M : DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.

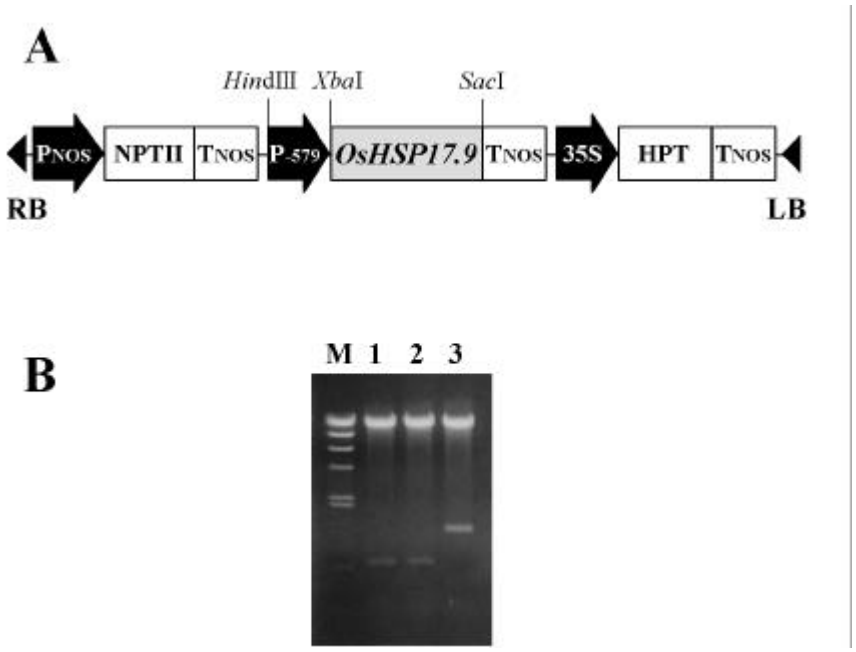


Fig. 2-44. Construction of the expression vector, pIG579-HSP17.9.

A. Structure of pIG579-HSP17.9. The *OsHSP17.9* gene was placed under the control of the the -579 promoter of *OsHSP17.9*.

B. Identification of pIG579-HSP17.9.
M: DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.
Lane 1: pIG579-HSP17.9 DNA digested with *Hin*dIII and *Xba*I.
Lane 2: pIG579-HSP17.9 DNA digested with *Xba*I and *Sac*I.
Lane 3: pIG579-HSP17.9 DNA digested with *Hin*dIII and *Sac*I.

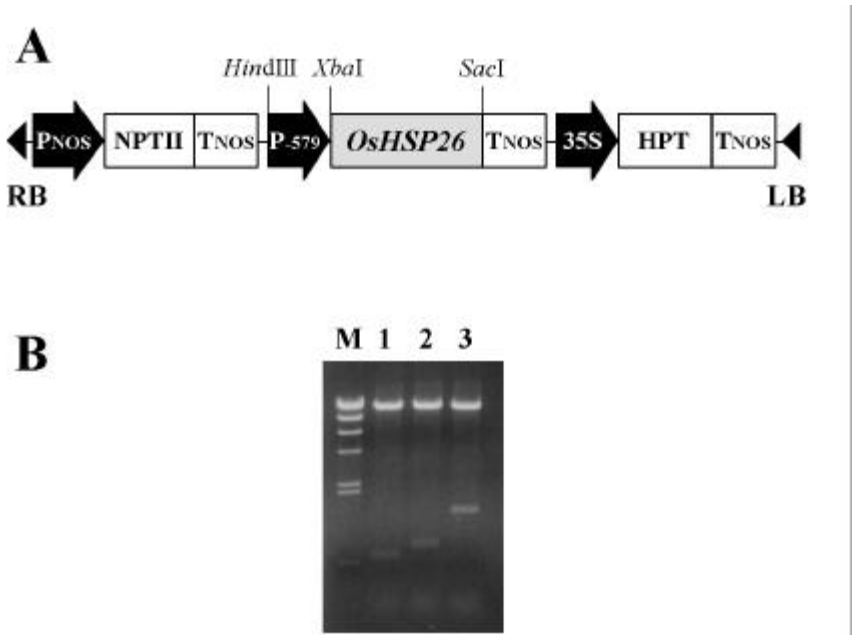


Fig. 2-45. Construction of the expression vector, pIG579-HSP26.

A. Structure of pIG579-HSP26. The *OsHSP26* cDNA was placed under the control of the the -579 promoter of *OsHSP17.9*.

B. Identification of pIG579-HSP26.
M: DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.
Lane 1: pIG579-HSP26 DNA digested with *Hin*dIII and *Xba*I.
Lane 2: pIG579-HSP26 DNA digested with *Xba*I and *Sac*I.
Lane 3: pIG579-HSP26 DNA digested with *Hin*dIII and *Sac*I.

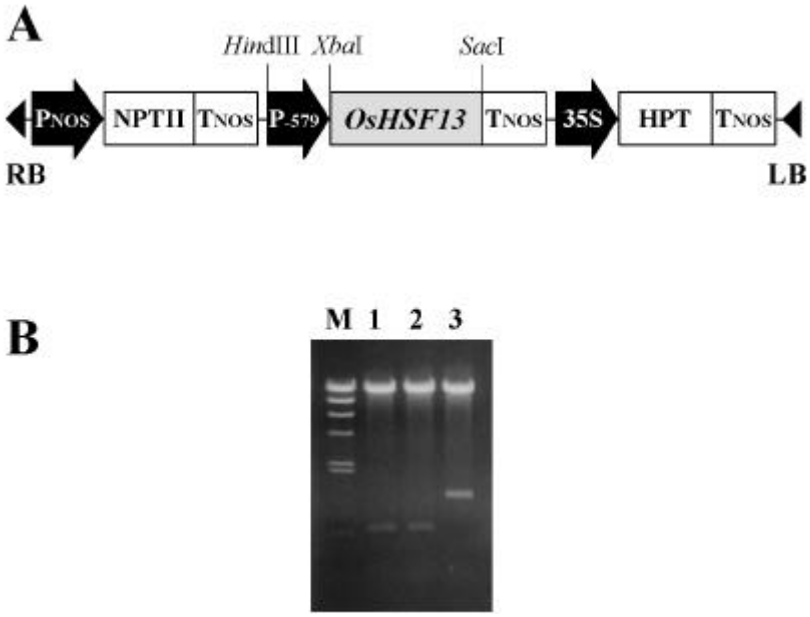


Fig. 2-46. Construction of the expression vector, pIG579-HSF13.

A. Structure of pIG579-HSF13. The *OsHSF13* gene was placed under the control of the the -579 promoter of *OsHSP17.9*.

B. Identification of pIG579-HSF13.
M: DNA digested with *Hin*dIII, Size marker.
Lane 1: pIG579-HSF13 DNA digested with *Hin*dIII and *Xba*I.
Lane 2: pIG579-HSF13 DNA digested with *Xba*I and *Sac*I.
Lane 3: pIG579-HSF13 DNA digested with *Hin*dIII and *Sac*I.

3. 형질전환 식물체의 확인

형질전환된 식물체의 genome에 pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9 pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13 construct가 각각 도입되었는지를 확인하기 위하여, 재분화된 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석 (결과 미제시)과 genomic PCR 분석으로 확인하였다. PCR 증폭을 위하여 NPTII 유전자, *OsHSP17.9* promoter 및 HSP 유전자의 서열에 근거하여 합성한 primer는 Table 2-1에 표시하였다.

그 결과, 그림 2-47 50에서 나타낸 바와 같이 모든 형질전환 식물에서 NPTII sense와 antisense primer 조합에서 0.7 kb의 특이적 증폭산물을 확인하였다. 또한 각각의 constructs에 특이적인 primer 조합을 통하여 다시 한번 형질전환 여부를 확인하였으며, 이때 사용된 primer의 조합은 다음과 같다.

pBI579-HSP17.4	-108 sense-1 & BcHSP17.4 antisense primers
pIG579-HSP17.9	-108 sense-1 & OsHSP17.9 antisense primers
pIG579-HSP26	-108 sense-1 & OsHSP26 antisense primers
pIG579-HSF13	-108 sense-1 & OsHSF13 antisense primers

이와 같은 constructs 별 2 조합의 PCR 분석을 통하여 최종적으로 construct 당 15 20 line 이상의 형질전환 담배 (T0 plant)를 선발하였다.

4. 형질전환 식물체의 분석

가. Northern blot 분석

형질전환된 담배의 세포 내에서, 도입된 외래의 HSP 및 HSF 유전자의 온도에 따른 발현양상을 조사하기 위하여, 25℃, 30℃ 및 42℃에서 각각 1-6 시간 처리한

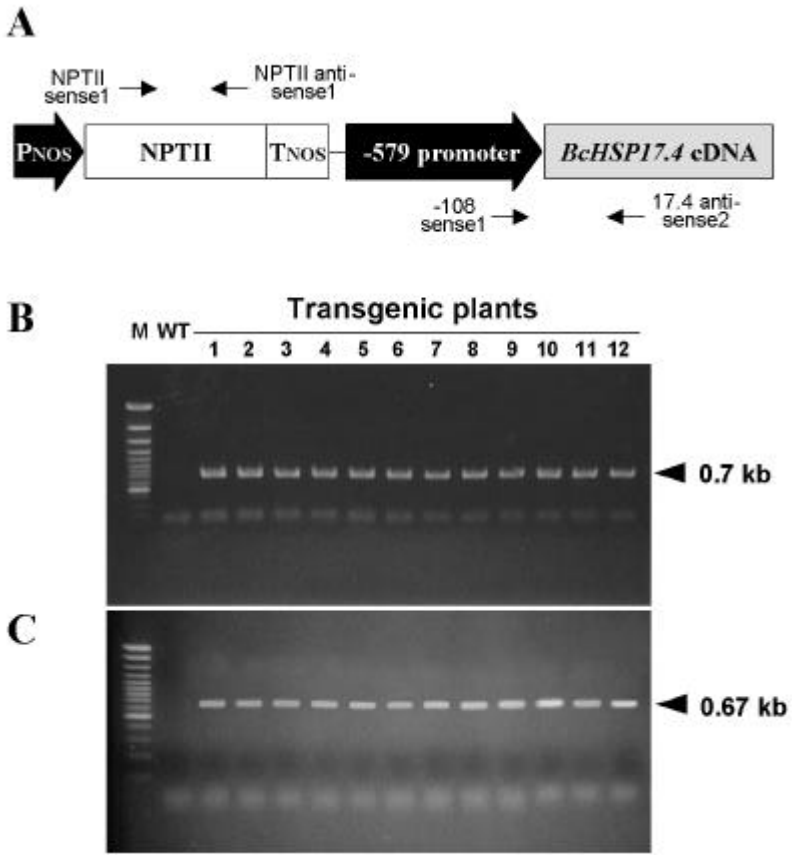


Fig. 2-47. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pBI579-HSP17.4.

A. Schematic diagram for PCR amplification of NPTII gene or -579 promoter of *OsHSP17.9* and *BcHSP17.4* cDNA fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with NPTII sense1 and NPTII antisense1 primers.
C. PCR amplification with -108 sense1 and 17.4 antisense2 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines.

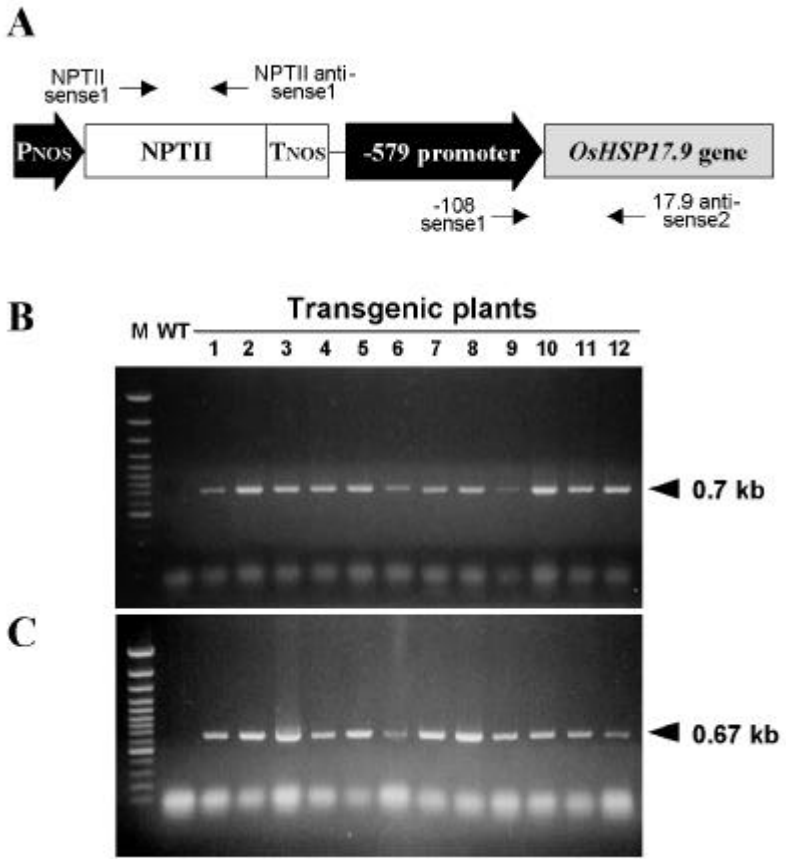


Fig. 2-48. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pIG579-HSP17.9.

A. Schematic diagram for PCR amplification of NPTII gene or -579 promoter of *OsHSP17.9* and *OsHSP17.9* gene fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with NPTII sense1 and NPTII antisense1 primers.
C. PCR amplification with -108 sense1 and 17.9 antisense2 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines.

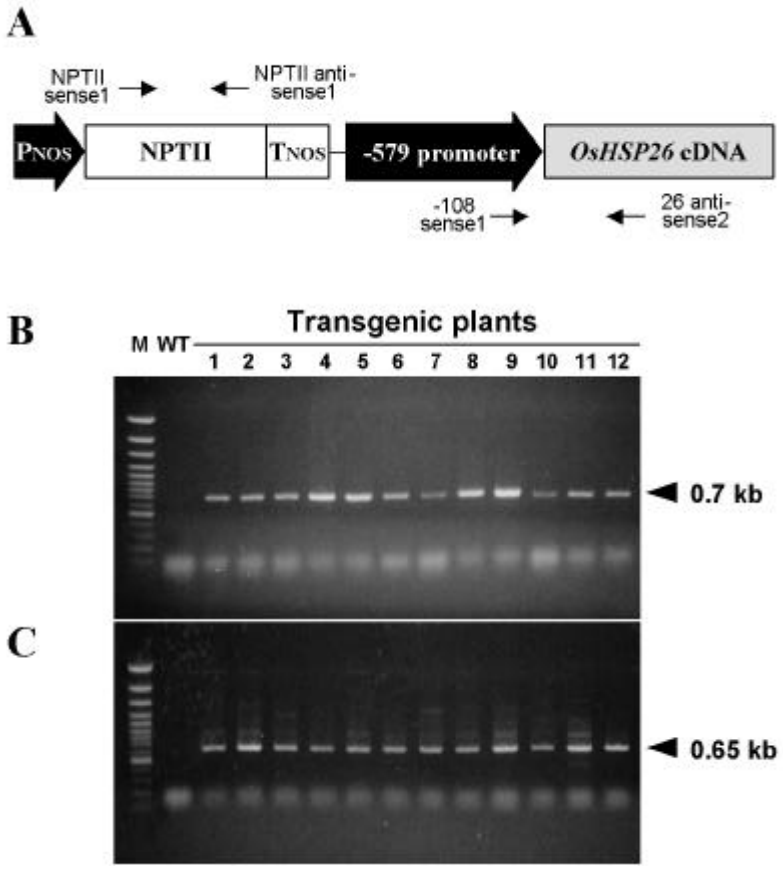


Fig. 2-49. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pIG579-HSP26.

A. Schematic diagram for PCR amplification of NPTII gene or -579 promoter of *OsHSP17.9* and *OsHSP26* cDNA fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with NPTII sense1 and NPTII antisense1 primers.
C. PCR amplification with -108 sense1 and 26 antisense2 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines.

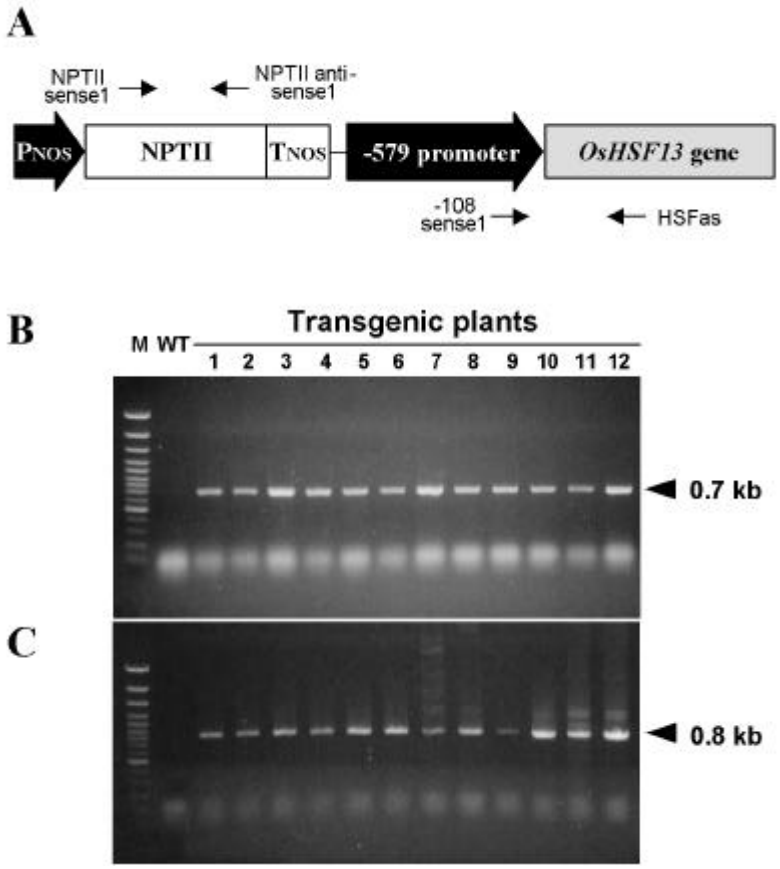


Fig. 2-50. PCR analysis of regenerated tobacco plants transformed with pIG579-HSF13.

A. Schematic diagram for PCR amplification of NPTII gene or -579 promoter of *OsHSP17.9* and *OsHSF13* gene fragments for identification of transformation.
B. PCR amplification with NPTII sense1 and NPTII antisense1 primers.
C. PCR amplification with -108 sense1 and HSFas primers.

Numbers indicate independent transgenic lines.

다음, Northern blot 분석을 실시하였다. 확정 promoter (*OsHSP17.9*의 -579 bp promoter)에 의한 HSP 및 HSF 유전자의 발현유도를 비교하기 위한 대조구로서는 형질전환 식물체의 잎을 25℃에서 6시간 처리하여 사용하였으며, HSP promoter의 온도특이적 발현양상의 분석을 위하여, 형질전환 식물체의 잎을 30℃에서 6시간 및 42℃에서 1시간 처리하여 분석하였다.

각각의 처리를 한 형질전환 담배의 잎으로부터 guanidine thiocyanate 법으로 total RNA를 분리한 다음, 5 μg을 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동하였으며, 형질전환에 사용한 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9*, *OsHSP26* 및 *OsHSF13* 유전자의 specific probe를 각각 사용하였다.

그 결과, 그림 2-51에서 나타낸 바와 같이 25℃, 6시간 처리구의 경우, pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13 construct 형질전환구에서 모두 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되지 않아, 이 온도조건하에서 확정 promoter의 활성이 없는 것으로 나타났다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 4 constructs에서 모두 낮은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되었으며, 42℃, 1시간 처리구에서는 4 constructs에서 모두 매우 높은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되었다. 즉, 30℃, 6시간 처리구에서 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 나타나기 시작하였으며, 42℃, 1시간 처리구에서는 매우 높은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되었다. 이러한 결과는 promoter의 활성에 관한 제 5 절에서의 결과와 일치하는 것으로, *OsHSP17.9* 유전자 유래의 -579 bp promoter sequence가 고온에서의 HSP 및 HSF 유전자의 유도성 발현을 통한 내열성의 효율적 획득에 유용한 결과로 생각된다.

나. 내열성의 분석

최적 promoter에 의한 고온에서의 lmw HSP 및 HSF의 과발현이 식물체 전체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 T1 식물체 수준에서 조사한 결과, 부분적인 내열성의 획득을 나타내었다 (Fig. 2-52).

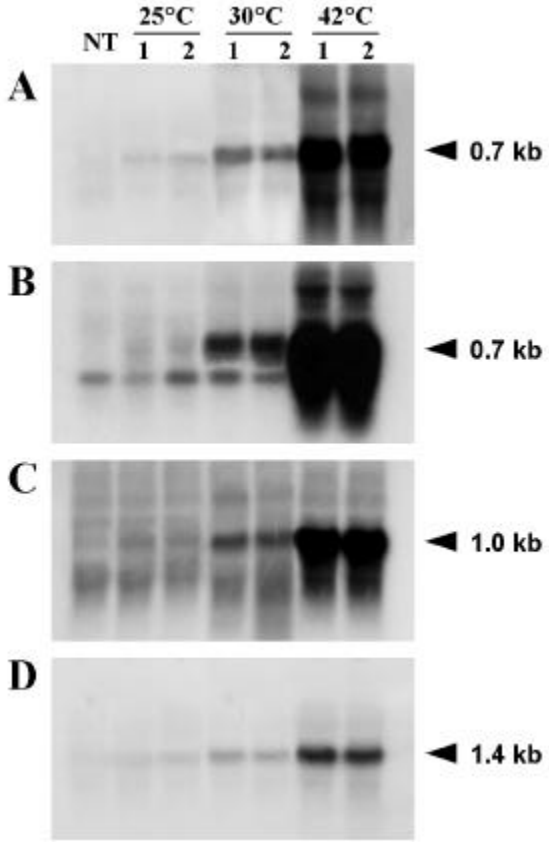


Fig. 2-51. Northern blot analysis of transgenic tobacco plants.

Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transgenic tobacco plants. The leaves of transgenic tobacco plants were treated at 25℃ for 6 h, 30℃ for 6 h, or 42℃ for 1 h, respectively. Numbers indicate independent transgenic lines.

A. pBIHSP17.4. B. pIGHSP17.9. C. pIGHSP26. D. pIGHSF13.

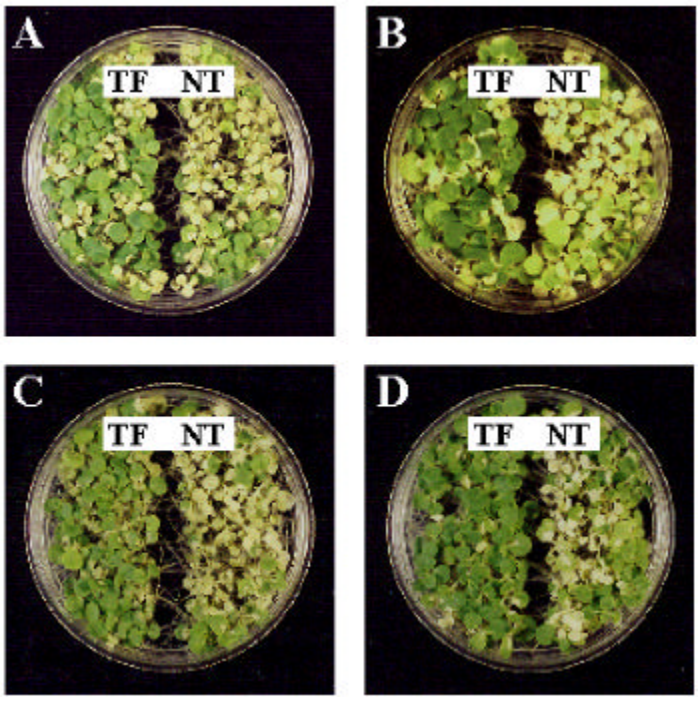


Fig. 2-52. Increased thermotolerance of transformants.

Plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52℃ in darkness for 45 min and subsequently incubated at normal growth conditions. NT. Nontransformants. TF. Transformants.

A. pBIHSP17.4. B. pIGHSP17.9. C. pIGHSP26. D. pIGHSF13.

즉, 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52°C에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, 그림 52에서 나타낸 것과 같이 형질전환하지 않은 wild-type 식물체는 완전히 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 30-50% 이상의 생존율을 나타내었다. 형질전환 식물체에서 식물체의 생존율이 약 30-50% 정도로 비교적 낮게 나타난 것은 연구기간의 제약으로 인해 본 연구에서 homozygous line을 선발하여 조사하지 않고, T1 세대의 heterozygous line을 이용함으로서, 약 25%의 비형질전환 식물체가 포함된 영향으로 생각된다. 또한, 35S promoter를 이용한 제 4 절의 결과와 비교하면, 식물세포 내에서 항상적으로 발현하는 35S promoter를 이용한 경우, heat shock 처리 이전에 이미 축적된 lmw HSP의 작용에 의한 강한 내성을 나타내는 반면에, 확정 promoter의 경우는 고온처리시 lmw HSP의 축적이 시작된다는 것도 영향을 미친 것으로 생각된다.

그러나, HSP 및 HSF 단백질의 half-life가 3-4일로서 비교적 길다는 점과 실제 포장에서의 스트레스가 비교적 낮은 온도에서 장시간에 걸쳐 나타난다는 점을 고려하면, 적어도 4-5일에 한번 이상의 고온 스트레스가 가해진다면, lmw HSP 및 HSF 단백질의 유도성 축적을 통한 내열성의 획득이 가능하리라 생각된다.

T0 및 T1 세대의 heterozygous line을 이용하여 lmw HSP 및 HSF의 유도성 축적과 내열성의 획득이 확인된 식물체로부터 종자를 채종하여 현재 homozygous line의 확립 중에 있으며, homozygous line이 확립되면, lmw HSP 및 HSF의 유도성 축적과 내열성의 획득에 관한 보다 정확한 분석을 실시할 것이다. 또한 lmw HSP 및 HSF 유전자로 각각 형질전환된 homozygous line을 교잡시킨 후, 후세대의 반복적인 자가수정을 통하여 두 유전자가 모두 도입된 형질전환 식물체를 제작하여 내열성의 획득에 미치는 영향을 분석하고자 한다.

또한, 모델식물의 형질전환을 통하여 lmw HSP 및 HSF의 유도성 축적과 이를 통한 내열성의 획득에 기여하는 것으로 확인된 발현 vector pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9 pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13 constructs를 포함하고 있는 *Agrobacterium* cell line을 glycerol stock하여 마늘의 형질전환에 이용하고자 -80°C에 stock하였으며, 또한 원예연구소에 분양하였다.

제 7 절 결 론

마늘을 포함한 농업적으로 중요한 작물의 고온에 의한 생산성의 감소로 인해 발생하는 경제적 피해를 극복하기 위하여, 분자수식에 의한 내열성 유전자의 발현 조절을 통한 내열성 작물의 창출에 관한 연구를 수행하였다. 이를 위하여 식물에서 내열성에 관여하는 것으로 알려진 저분자량 (low-molecular weight; lmw) heat shock protein (HSP) 유전자와 HSP 유전자의 발현조절에 관여하는 것으로 알려진 heat shock factor (HSF) 유전자를 선발한 다음, 모델식물인 담배에 형질전환하여 내열성의 획득여부를 확인하였다. 또한 형질전환 식물체 내에서 도입된 HSP 유전자의 항상적 발현에 의한 에너지 경제상의 손실을 방지하고, 작물의 생육을 억제하는 고온에서의 유도성 발현을 통한 내열성의 획득을 위하여, HSP 유전자의 고온 특이적인 발현조절에 관여하는 조절영역을 탐색하였다. 이를 통하여 확정된 조절영역에 최종적으로 다양한 lmw HSP 유전자와 HSF 유전자를 연결하여 최적화된 발현 vector를 구축한 다음, 모델식물인 담배에 형질전환하여 도입된 HSP 및 HSF 유전자의 고온 특이적인 발현과 이를 통한 내열성의 획득여부를 확인하였다. 이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 내열성 관련 유전자의 선발과 특성규명

가. *OsHSP17.9* - 벼 (*Oryza sativa* L. cv Milyang23)의 genomic DNA library를 구축한 다음, 벼의 세포질에 존재하는 class I lmw HSP 유전자인 *OsHSP17.9*를 선발하였다. 선발된 *OsHSP17.9* clone의 DNA 염기서열의 총 길이는 3,147 bp로서, 추정 개시코돈을 기준으로 1,021 bp의 5′ upstream region, 483 bp의 full-length cDNA coding region 및 1,643 bp의 3′ downstream region으로 나타났다. 이 유전자는 161개의 아미노산으로 구성되는 하나의 ORF (open reading frame)를 포함하며, 예상분자량이 17.925 kDa인 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. Southern blot 분석 결과, *OsHSP17.9* 유전자는 벼의 genome 상에서 3-5 copy정

도 존재하는 것으로 나타났다. 또한 다양한 온도 및 처리시간에 따른 발현양상을 Northern blot 분석을 통하여 확인한 결과, *OsHSP17.9* 유전자는 38℃에서 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 오히려 발현량이 감소하는 경향을 나타내었다. *OsHSP17.9*의 발현량이 가장 높게 나타난 42℃에서 처리시간에 따른 발현량의 변화를 조사한 결과, 처리 후 10분부터 발현이 유도되기 시작하여, 처리 30분에서 최대치를 나타내었으며 그 이후부터는 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

나. *OsHSP26* - 벼 (*O. sativa* L. cv Nakdong)의 cDNA library를 구축한 다음, 벼의 엽록체에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *OsHSP26*을 선발하였다. 선발된 *OsHSP26* cDNA의 총 길이는 1,026 bp였으며, 239개의 아미노산으로 구성되는 하나의 완전한 ORF를 포함하며, 예상분자량이 26.639 kDa인 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. Southern blot 분석 결과, *OsHSP26* 유전자는 벼의 genome 상에서 single copy로 존재하는 것으로 나타났다. Northern blot 분석 결과, *OsHSP26* 유전자는 39℃에서 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 42℃에서 처리시간에 따른 발현량의 변화를 조사한 결과, 처리 후 20분부터 발현이 유도되기 시작하여, 처리 2시간에서 최대치를 나타내었으며 그 이후부터는 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

다. *BcHSP17.4* - 배추 (*Brassica campestris* L. cv Seoul)의 cDNA library로부터 분리한 *BcHSP17.4* cDNA의 총 길이는 732 bp이며, 157개의 아미노산으로 구성되는 하나의 완전한 ORF를 포함하며, 예상분자량이 17.4 kDa인 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. 아미노산 서열분석 결과 *BcHSP17.4* 단백질은 세포질에 존재하는 class I lmw HSP로 나타났다.

라. *OsHSF13* - 벼의 cDNA library로부터 분리한 heat shock factor 유전자인

OsHSF13 cDNA의 총 길이는 1,377 bp였으며, 353개의 아미노산으로 구성되는 하나의 완전한 ORF를 포함하는 것으로 나타났다. Southern blot 분석 결과, *OsHSF13* 유전자는 벼의 genome 상에서 2 copy 이상 존재하는 것으로 나타났다. Northern blot 분석 결과, *OsHSF13* 유전자는 벼의 생육온도인 28℃에서도 발현되며, 온도가 증가할수록 발현량이 조금씩 증가하는 경향을 나타내었으나 47℃에서는 감소하는 것으로 나타났다.

2. 내열성 유전자의 도입과 내열성의 획득

저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 식물의 고온내성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저분자량 HSP 유전자인 배추유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector의 35S promoter 하류에 연결한 다음, 모델식물인 담배에 각각 형질전환하였다. 형질전환 식물체의 잎에서 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석 및 PCR 분석으로 외래의 저분자량 HSP 유전자가 도입되었음을 확인한 다음, Northern blot 분석을 통하여 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

형질전환 담배의 세포 내에서 특정 HSP 단백질의 과발현이 식물의 고온내성 획득에 미치는 영향을 알아보기 위하여, heat shock 처리 후 광합성 효율을 온도의 증가에 따른 chlorophyll 형광의 Fo 및 Fv 값의 변화로 분석하였다. 그 결과, lmw HSP의 발현량이 높을수록 Fo의 증가율이 감소하는 것으로 나타나, 항상적으로 발현된 lmw HSP가 고온 스트레스에 따른 PSII로부터의 LHCII의 분리를 감소시킨다는 것을 나타내었다. 또한 광합성 효율을 나타내는 Fv/Fm와 광양자수율을 나타내는 1/Fo-1/Fm 치를 각각 측정한 결과, 광합성이 완전히 없어지는 온도인 52℃에서의 활성의 1/2이 되는 온도가 wild-type 식물체보다 약 2℃ 정도 증가되었다. 따라서 lmw HSP는 고온 스트레스 하에서 광화학계를 안정화시키고, LHCII의 분리를 억제함으로서 광합성기구를 보호하는 것으로 나타났다.

고온 스트레스 하에서의 lmw HSP의 과발현이 식물체 전체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 유식물체 수준에서 조사하였다. 형질전환하지 않은 wild-type 식물체와 형질전환 식물체를 52°C에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, wild-type 식물체는 전부 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 80%가 생존하여 고온에 대한 내성의 획득을 나타내었다.

3. 내열성 유전자 발현조절영역의 탐색

내열성 유전자의 고온 특이적인 발현에 관여하는 조절영역을 탐색하기 위하여, 벼의 genomic DNA library로부터 선발한 *OsHSP17.9* 유전자의 promoter sequence를 이용하여, HSP 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 HSE (heat shock element) 등의 특이서열을 중심으로 promoter deleted clone을 구축하였다. PCR 증폭 등을 이용하여 *OsHSP17.9*의 번역개시 codon으로부터 -579 bp까지의 조절영역을 포함하는 construct I, -360 bp까지의 construct II, -237 bp까지의 construct III, -108 bp까지의 construct IV 그리고, 대조구로 promoter sequence를 완전히 제거한 construct Ⅴ 및 CaMV 35S promoter를 포함하는 construct VI를 각각 제작한 다음, marker 유전자로 GUS 유전자를 연결하였다. 각각의 constructs를 이용하여 원형질체를 이용한 transient assay 및 형질전환 식물체를 이용한 Northern blot 분석과 GUS 활성의 측정을 통하여 다양한 온도에서의 promoter 활성을 탐색하였다.

담배 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) 현탁배양세포의 원형질체를 이용한 transient assay 결과, CCAAT box 부근까지를 포함하는 Construct Ⅰ의 GUS 활성이 대조구인 35S promoter에 비해 11.3 배 이상 증가된, 가장 높은 수준을 나타내었으며, HSE의 수가 감소할수록 낮아지는 것으로 나타났다. 즉, construct II의 경우 construct I의 약 59%의 활성을 나타내었으며, construct III의 경우 12% 이하로 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 또한 TATA box 하류의 HSE를 포함하는 Construct Ⅳ는 promoter sequence를 완전히 제거한 construct V

와 유사한 수준으로 나타나 promoter의 기능을 완전히 소실한 것으로 판단되었다.

OsHSP17.9 promoter의 활성을 RNA 및 단백질 수준에서 다시 확인하고, 아울러 마늘의 성장둔화를 가져오는 6-7월의 온도인 28-30℃에서 조사하기 위하여, deletion된 각각의 constructs를 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm으로 subcloning한 다음, 모델식물인 담배에 형질전환하였다. 형질전환 식물체의 잎에서 분리한 genomic DNA를 이용하여 Southern blot 분석 및 PCR 분석으로 각각의 constructs가 정상적으로 도입되었음을 확인한 다음, 25℃, 30℃ 및 42℃에서의 GUS 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사하였다. 그 결과, positive control로 사용한 35S promoter의 경우는 30℃ 이상의 고온처리에서는 발현량이 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, negative control로 사용한, promoter가 완전히 제거된 construct V의 경우는 모든 온도에서 전혀 발현하지 않는 것으로 나타났다. Promoter가 개변된 constructs (-579, -360, -237 및 -108 bp promoter)의 경우, 25℃에서는 모든 construct에서 GUS transcript가 검출되지 않아, 발현되지 않는 것으로 나타났으며, 30℃에서 1시간 처리조건에서도 GUS transcript의 축적이 나타나지 않았다. 그러나, 30℃, 6시간 처리조건에서는 -579 bp promoter 단편을 포함하는 construct I의 경우 35S promoter보다 약간 증가된 GUS transcript의 축적을 나타내었다. 또한 42℃, 1시간 처리조건하에서는 construct I이 가장 높은 GUS transcript의 축적을 나타내었으며, -360 bp promoter 단편을 포함하는 construct II에서도 construct I보다는 낮지만 35S promoter보다 높은 상당한 수준의 GUS transcript의 축적을 나타내었다.

형질전환 식물체 내에서 *OsHSP17.9* promoter의 활성을 GUS 단백질 수준에서 chemiluminescence 분석으로 확인한 결과, 35S promoter의 경우는 처리온도에 따른 변화를 나타내지 않고 항상적으로 발현하는 것으로 나타났으며, promoter가 완전히 제거된 construct V의 경우는 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. Promoter가 개변된 constructs의 경우, 25℃에서는 모든 construct에서 promoter가 완전히 제거된 construct V와 동일한 수준으로 나타나 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나, 30℃, 6시간 처리조건에서는 -579 bp promoter 단편을 포

함하는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 2배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었으며, -360, -237 및 -108 bp promoter의 경우는 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 42℃, 2시간 처리조건하에서는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 20배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었으며, construct II의 경우 35S promoter에 비해서 8배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었다.

원형질체를 이용한 transient assay 및 형질전환 식물체의 Northern blot 분석과 GUS 단백질의 chemiluminescence 분석 결과를 종합하면, Construct Ⅰ의 -579 bp promoter가 고온 (42℃)에서의 내열성 유전자의 발현유도에 필수적일 뿐 만 아니라 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 하에서 내열성 유전자의 발현유도를 위한 inducible promoter로의 유용성을 나타내는 결과로 판단된다.

4. 조절영역 확정 발현 vector의 구축과 형질전환 식물체의 분석

OsHSP17.9 유전자의 조절영역의 탐색을 통하여 내열성 유전자의 고온에 의한 발현유도에 필수적인 것으로 나타난 -579 bp promoter sequence에 배추 유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자와 벼 유래의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* 유전자를 연결하여 내열성의 획득을 위한 최종 constructs로서 pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13을 각각 제작하였다. 구축된 constructs를 이용하여 다양한 온도조건하에서의 발현유도 및 이를 통한 내열성의 획득을 조사하고자, 이를 모델 식물인 담배에 각각 형질전환하였다. 형질전환 식물체의 잎에서 분리한 genomic DNA를 이용하여 Southern blot 분석 및 PCR 분석으로 각각의 constructs가 정상적으로 도입되었음을 확인한 다음, 25℃, 30℃ 및 42℃에서의 도입된 외래의 HSP 및 HSF 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사하였다. 그 결과, 25℃에서는 pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13 construct 형질전환구에서 모두 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되지 않아, 이 온도조건하

에서 확정 promoter의 활성이 없는 것으로 나타났다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 4 constructs에서 공히 낮은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 나타나기 시작하여, 42℃, 1시간 처리구에서는 4 constructs에서 모두 매우 높은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적을 나타내어 promoter의 활성에 관한 제 5 절에서의 결과와 일치하는 결과를 나타내었다.

최적 promoter에 의한 고온에서의 lmw HSP 및 HSF의 과발현이 식물체 전체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 T1 식물체 수준에서 조사한 결과, 부분적인 내열성의 획득을 나타내었다. 즉, 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, 형질전환하지 않은 wild-type 식물체는 완전히 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 30-50% 이상의 생존율을 나타내었다. 형질전환 식물체에서 식물체의 생존율이 약 30-50% 정도로 비교적 낮게 나타난 것은 T1 세대의 heterozygous line을 이용함으로서, 약 25%의 비형질전환 식물체가 포함된 영향으로 생각된다. 또한, 35S promoter를 이용한 제 4 절의 결과와 비교하면, 식물세포 내에서 항상적으로 발현하는 35S promoter를 이용한 경우, heat shock 처리 이전에 이미 축적된 lmw HSP의 작용에 의한 강한 내성을 나타내는 반면에, 확정 promoter의 경우는 고온처리시 lmw HSP의 축적이 시작된다는 것도 영향을 미친 것으로 생각된다. 그러나, HSP 및 HSF 단백질의 half-life가 3-4일로서 비교적 길다는 점과 실제 포장에서의 스트레스가 비교적 낮은 온도에서 장시간에 걸쳐 나타난다는 점을 고려하면, 적어도 4-5일에 한번 이상의 고온 스트레스가 가해진다면, lmw HSP 및 HSF 단백질의 유도성 축적을 통한 내열성의 획득이 가능하리라 판단된다.

제 3 장 마늘 형질전환체계의 확립

제 1 절 서 설

마늘은 우리나라의 연간 생산액이 약 1조원에 달하며 전체 채소생산량의 거의 27%를 차지하는 매우 중요한 채소작물이다. 그러나 마늘의 국내시세가 국제가격의 4-5배에 달하므로 국내 마늘의 생산성을 높이는 방법이 모색되고 있는 실정이다. 또한 마늘은 전세계적으로 영양번식만으로 계속 유지되어 온 까닭에 바이러스 이병에 의한 수량감소와 품질저하를 가져옴은 이미 알려진 사실이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 무병종구의 생산 및 증식, 돌연변이 육종 및 가임마늘간 교잡에 의한 신품종 육성 등의 연구가 수행되었거나 진행 중이나, 연 6-12배 정도로 대단히 증식율이 낮고, 가임마늘 유전자원의 수와 변이의 폭이 좁아 연구성과가 미흡한 상태이다.

형질전환에 의한 신품종 육성은 재래육종방법에서의 유용유전자원의 고갈 및 긴 육종연한의 한계를 타파할 수 있으며 특히 교잡에 의해서 도입될 수 없는 유용한 유전자들을 광범위하게 사용할 수 있어 신작물을 창출하는데 획기적이며, 현재 새로운 육종 방법의 한 분야로서 자리매김하게 되었다. 형질전환 기술은 1983년을 시작으로 급속하게 발전하여 최근 미국의 주도하에 아르헨티나, 멕시코 등 여러 국가에서 형질전환 신품종이 육성되었으며 일부 작물은 대규모 농가재배가 이루어지고 있다. 또한 전세계 약 45개국에서 60개 이상의 작물들을 대상으로 대규모 포장시험이 진행되고 있으며 주로 내제초성, 내충성, 내병성 및 품질개선 등을 목적으로 하고 있다.

본 연구에서는 마늘의 생산성을 획기적으로 높일 수 있도록 마늘의 형질전환체계를 확립하여, 개발된 내열성 유전자를 마늘에 도입하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 품종: 국내 주요 마늘 산지에서 수집한 재배종 마늘 및 원예연구소에서 유지 중인 유전자원 중 난지형 품종인 남도 및 한지형 품종인 서산, 의성, 단양 등의 품종을 이용하였다.

나. 치상조직: 재분화율이 높은 조직을 알아보기 위하여 마늘 인편에서 획득한 생장점 및 보통엽 등의 조직을 이용하였으나, 이후 포장에서 재배중인 마늘의 미숙총포를 사용하였다. 생장점 조직은 해부현미경하에서 적출하였으며, 보통엽은 인편외부로 출현하지 않았거나 일부 출현한 어린 엽을 이용하였으며, 잎차례 (엽서) 별 또한 같은 잎에서도 위치별로 구분하여 치상하였다. 미숙총포는 엽초 부위를 뚫고 나온 직후의 미숙한 것을 4등분하여 치상, 이용하였다.

다. *Agrobacterium* 균주 및 도입유전자 : 초기 형질전환 조건 구명을 위해서는 GUS (intron 포함) 및 제초제 저항성 (bar) 유전자가 삽입된 pCAMBIA3301을 주로 이용하였으며, kanamycin 저항성, hygromycin 저항성 및 내열성 유전자가 삽입된 pIG121-HSP26 등의 vector가 포함된 AGL1, EHA101, LBA4404 등의 균주를 형질전환에 이용하였다.

2. 국내 주요 마늘 산지의 재배종 수집 및 유지

마늘 주산단지에 현지 출장하여 그 지역에서 계속 재배되어오고 있는 품종이 확실한 마늘을 수집, 재분화 조건 구명 실험에 이용하였고, 일부는 다음 년도의 시료로 사용하기 위하여 재배종 마늘 5품종 이상을 포장에서 재배, 수확하여 이용하였다. 이를 휴면타파 및 계속적인 실험수행을 위한 시료공급을 위해 4℃에서 냉장

보관하였다.

3. 각 재배종으로부터 callus 및 shoot 유기 및 증식, 재분화 조건 구명

마늘 인편의 생장점을 IAA, NAA 및 BA 등의 식물 생장조절제 종류와 농도를 달리한 MS 및 LS 기본배지에 치상하여 직접 shoot를 유기하는 조건을 구명하였으며, 유기된 신초를 다시 NAA, BA 등이 첨가된 배지에 계대배양하여 다수의 shoot 획득 가능성을 검토하였다.

또한, 인편내 생장점과 보통엽 조직을 2-iP, NAA, 2,4-D 등이 처리된 MS 및 LS 기본배지에 치상하여 callus를 유기하였으며, callus로부터 재분화가 가능한 조건을 구명하였다.

4. 치상조직 및 시기를 달리한 조직배양 효율 증진 연구

마늘 인편을 이용한 재분화는 마늘의 특성상 수확 후 종구 휴면이 타파된 다음에야 조직배양에 이용이 가능하고, 이후 냉장보관을 하여도 장기보관이 어려워, 종자를 연중 기내 파종하여 재분화에 이용하는 고추, 배추 등과 달리 조직배양에 이용되는 시료 확보가 연중 시기에 제한을 받는다. 또한 생장점 등을 이용할 경우 재분화 기간이 다른 작물에 비해 6 8개월이 소요되어 형질전환 기술을 개발하고자 할 때, 결과 확인 후 재처리가 어려운 점이 있다. 따라서 인편 생장점보다 시료의 다량확보가 용이한 보통엽 조직을 이용하여 재분화 효율을 증진코자 치상시기를 인편내 엽 출현전, 0.5-1 cm 및 1-2 cm 출현 후로 하였고, 절편위치를 발아엽, 제 1보통엽, 제 2보통엽 등의 조직 밖에서 안쪽 방향과, 기부에서부터 위방향으로 순서대로 치상하였으며, 절편크기를 0.3, 0.5 cm로 구분 치상하여 callus 유기율을 조사하였다. 또한 생장조절제에 따른 callus 증식 및 shoot 분화율이 높은 배지조건을 구명하였다.

생육중인 마늘 식물체의 총포내에는 많은 생장점이 있어 다량의 shoot가 발생

할 가능성이 높아 형질전환에 이용하였다. 미숙총포는 5월경 포장재배 중인 마늘 3품종 (서산, 의성, 단양)에서 채취하여 NAA, 2,4-D, BA 등의 식물생장조절제 농도별 8종류의 배지 (sucrose 3%)에 치상하였고, MS 기본배지에 sucrose 농도 3, 6, 9 % 처리하여 재분화에 미치는 영향을 조사하였다.

5. 형질전환 기초 조건 조사

형질전환을 위하여 *Agrobacterium* strain을 수집하였으며 확립된 재분화 조건으로 선발배지내 치상조직의 kanamycin, hygromycin, PPT 선발농도 조건 등을 알아보고, 또한 유전자총을 이용하기 위해 적정 헬륨가스 압력, particle 이동거리 등을 구명하고자 하였다.

6. 형질전환 조건 구명

마늘 callus 및 생육중인 식물체에서 획득한 미숙총포 등의 조직에 DNA를 코팅한 tungsten 미세입자를 4, 6, 8, 10 cm의 chamber 높이에서 15, 20, 25 kgf/cm2로 헬륨가스압을 달리하여 유전자총 (Bioneer사 'Gene gunII')을 이용한 형질전환 조건을 조사하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 적정조건을 구명하고자 이들 조직을 이용하여 전처리 기간 (3처리: 0, 2, 5일), 공동배양기간 (4처리: 2, 3, 4, 6일), 균농도 (3처리: O.D = 0.4, 0.8, 1.6), acetosyringone 첨가 효과 (4처리: 0, 50, 100, 200 uM), 접종균주 등을 달리하여 처리한 후 선발배지 내 shoot 재분화율을 조사하였다.

7. 획득 형질전환체 확인 및 분석

Kanamycin 및 PPT가 포함된 배지에서 선발된 재분화 shoot를 대상으로 GUS 유전자 발현 분석을 수행하였으며, 이후 도입유전자가 식물체 genome에 삽

입되었는지 확인하기 위해 선발배지에서 생육중인 마늘 shoot를 소량 채취하여 genomic DNA를 분리한 후 PCR을 수행하였다. PCR에 이용된 primer는 bar 유전자에 특이적인 염기서열에 근거하여 합성한 다음 (barN: 5'-CACCATCGTCAACCACTAC-3', barC: 5'-CCAGCTGCCAGAAACCC -3') 사용하였으며, Perkin Elmer P600을 이용하여 92℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분의 조건으로 맞춰 35회 반응시켰다. 반응이 끝난 증폭산물을 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

제 3 절 마늘 형질전환체계의 확립

1. 국내 주요 마늘 산지의 재배종 수집 및 유지

무안, 단양 (마늘시험장) 등에 현지 출장으로 품종이 확실한 남도 (난지형), 단양 (한지형) 마늘을 수집하여 인편의 생장점 및 보통엽 조직을 shoot 및 callus 유기, 증식 후 재분화 조건 구명에 이용하였다. 매년 시료 확보를 위해 수집 마늘 외에도 연구소에서 유지하고 있는 재배종 마늘 (남도, 남해, 서산, 의성, 단양 등)을 포장 증식 재배 후 수확하여 이용하였다.

2. 각 재배종으로부터 callus 및 shoot 유기 및 증식

마늘 재배종 4품종 (남도, 서산, 의성, 단양)의 인편 생장점을 NAA, 2-iP, 2,4-D, BA 등의 식물생장조절제의 종류와 농도를 달리한 배지 (국내외 문헌 검색 등을 통해 선별한 배지 보완)에 치상하여 캘러스를 배양해 본 결과, LS 기본배지에 2,4-D 및 BA를 각각 2.0 mg/l씩 첨가한 CII 배지에서 callus 유기율이 높은 반면, CI 배지에서는 callus 보다는 shoot만이 유기되었다 (표 3-1, 그림 3-1).

품종간에는 한지형 품종이 난지형 품종보다 callus 및 shoot 유기율이 높게 나타났다. 유기된 callus를 2,4-D 0.2 mg/l, BA 0.2 mg/l가 첨가된 LS 기본배지에서

배양하여 callus 증식을 유도하였으나 증식율이 크게 높아지진 않았으며, callus 증식을 이용하는 방법은 시간이 오래 걸리고 계대배양 횟수에 따라 재분화 효율이 떨어지는 점을 고려할 때 대량증식이 목적이 아닌 형질전환 연구를 위해서는 증식단계를 거친 callus 보다 생장점으로부터 바로 유기된 callus가 더 유리할 것으로 판단되었다.

표 3-1. 마늘 품종 및 배지조성에 따른 인편 생장점의 callus 및 shoot 유기율

배지	품종	callus 유기율 (%)	신초 유기율 (%)	callus color (%)		callus diameter (㎜)
				green	yellow	
CⅠ	남도	NR	55.1	-	-	-
	서산	NR	48.5	-	-	-
	의성	NR	70.9	-	-	-
	단양	NR	77.2	-	-	-
CⅡ	남도	29.2	NR	85.7	14.3	6.24 18.45
	서산	39.3	NR	0.0	100	4.98 8.71
	의성	76.4	NR	57.7	42.3	4.34 8.64
	단양	76.1	NR	30.0	70.0	4.88 9.49

* 품종별 처리당 생장점 15개씩 치상하여 약 2개월 경과후 조사 (3반복)
* 배지조성 : CⅠ (MS 기본배지 + NAA 0.5㎎/ℓ + 2-iP 0.1㎎/ℓ + 2,4-D 0.1㎎/ℓ + Sucrose 3%), CⅡ (LS 기본배지 + 2,4-D 0.1 ㎎/ℓ + BA 0.1 ㎎/ℓ + Sucrose 3%)
* NR (no response)

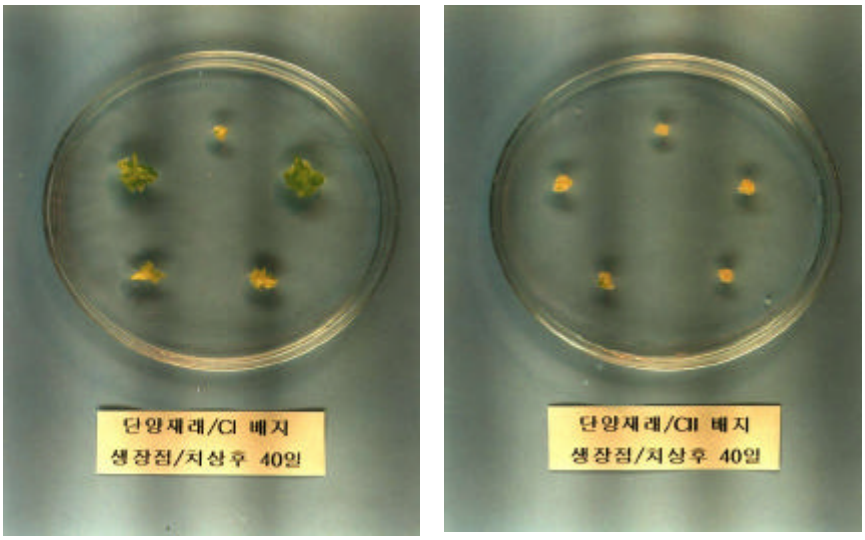


그림 3-1. 마늘 인편 생장점으로부터 callus 유기되는 모습

직접 shoot를 유기하기 위하여 인편의 생장점을 IAA, NAA, BA 등의 식물생장조절제간 조합을 달리한 배지에 치상하여 직접 shoot를 유기시켜 본 결과 SI, SII 배지에서 모두 shoot가 유기되었으나, shoot 분화 상태 및 multi-shoot 유기정도는 SI 배지에서 더 양호하였다 (표 3-2, 그림 3-2).

생장점으로부터 유기된 shoot로부터 multi-shoot를 유기하기 위하여 NAA 1.0 및 BA 2.0 mg/l를 첨가한 LS 기본배지 (multi-shoot 유기배지: SIm 배지)에 배양하였을 때 multi-shoot가 발생되기는 하였으나 높은 증식율을 보이지는 않았다 (그림 3-3).

표 3-2. 마늘 품종 및 배지조성에 따른 인편 생장점의 shoot 유기율

배지 / 품종	SI		SII	
	shoot 유기율 (%)	shoot 길이 (㎜)	shoot 유기율 (%)	shoot 길이 (㎜)
남도	51.0	4.69 19.20	77.8	2.21 12.80
서산	77.8	4.66 45.58	74.3	4.86 22.35
의성	71.9	3.49 87.45	84.4	12.43 16.14
단양	66.9	1.75 36.20	57.5	2.47 19.67

* 배지조성 : SⅠ(LS + IAA 0.2 + BA 0.2 + Sucrose 3%)
SⅡ(MS + NAA0.02 + BA 2.0 + Sucrose 3%)
* 품종별 처리당 생장점 15개씩 치상하여 약 2개월 경과후 조사(3반복)
* NR (no response)

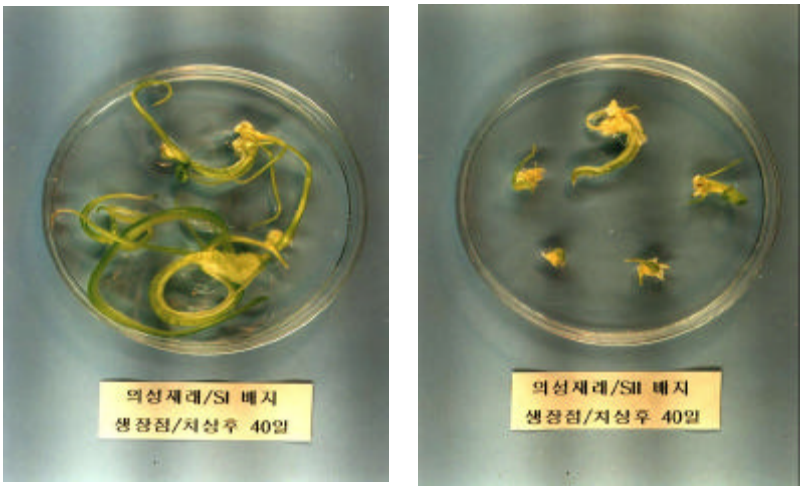


그림 3-2. 마늘 인편 생장점으로부터 shoot가 유기되는 모습

그림 3-3. 마늘 인편 생장점 유래 shoot로부터 multi-shoot가 유기되는 모습

인편의 생장점 외에 조직배양 효율을 높이기 위해 인편 내에 생장점과 인접한 보통엽 조직을 상, 하로 구분하여 0.5 cm 폭으로 횡절단한 것을 반으로 자른 절편을 callus 유기 배지인 CI, CII 배지에 바깥쪽 발아엽부터 제1보통엽, 제2보통엽 등의 순으로 Petri-dish 중앙에서 시계 및 반시계 방향으로 순서대로 치상하였을 때 발아엽 안쪽의 제1보통엽 조직에서만 callus가 유기되었다. CI 배지보다는 CII 배지에서의 callus 상태가 미백색의 유연한 callus가 더 많이 발생하였으며, 생장점과 인접한 보통엽 (하) 부분에서 callus 분화능이 우수하였다 (그림 3-4, 3-5).

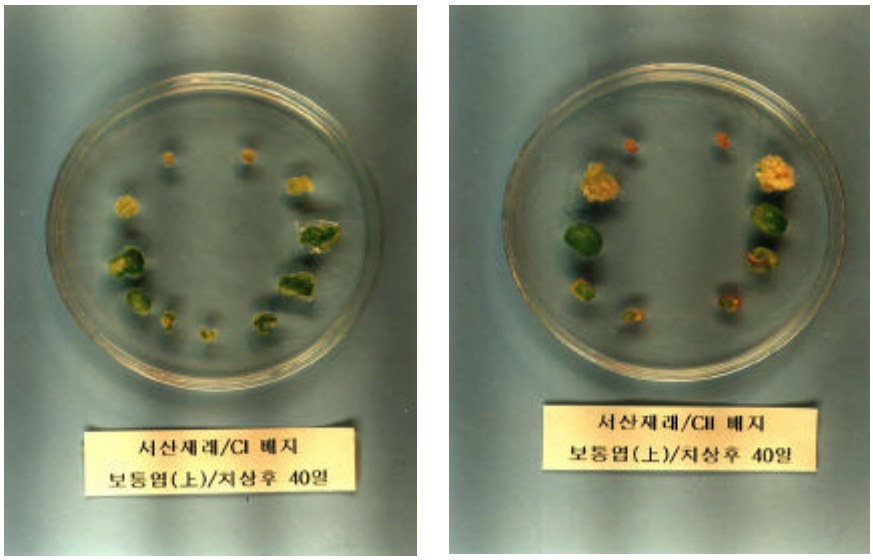


그림 3-4. **마늘 인편 내 제1보통엽 (상)조직으로부터** callus**가 유기되는 모습**

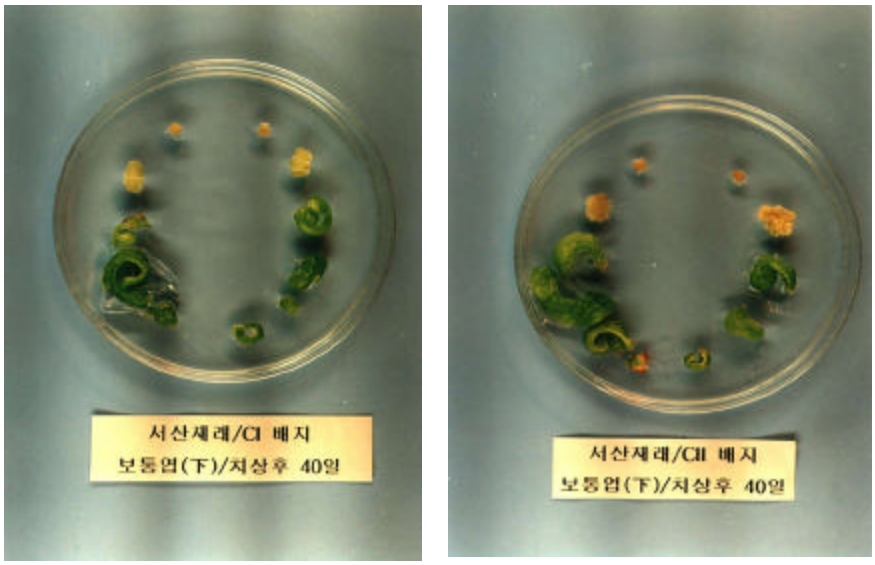


그림 3-5. **마늘 인편 내 제1보통엽 (하) 조직으로부터** callus**가 유기되는 모습**

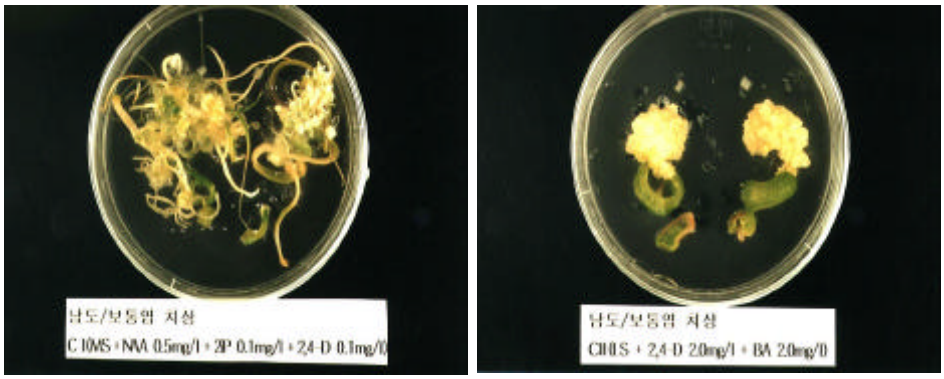


그림 3-6. 마늘 인편 내 제1보통엽 (하) 조직으로부터 callus가 유기되는 모습 (치상 4개월 경과 후, 좌: CI 배지, 우: CII 배지)

3. 치상조직 및 시기를 달리한 조직배양 효율증진 연구

인편 내 보통엽 조직을 치상시기와 절편위치 등의 처리를 달리하여 치상한 결과 (표 3-3, 3-4, 그림 3-7), 인편 내 엽 1-2 cm 출현 시기에 0.5 cm 절편크기로 치상하였을 때, 기부에서 1-2 cm 위치의 제1보통엽 조직에서 가장 높은 callus 유기율을 보였다 (그림 3-8). 이 후 callus의 증식에는 Cm2 배지가, 재분화에는 D3 배지 (BA 10mg/l 처리)가 효과적인 것으로 나타났다 (표 3-5, 그림 3-9).

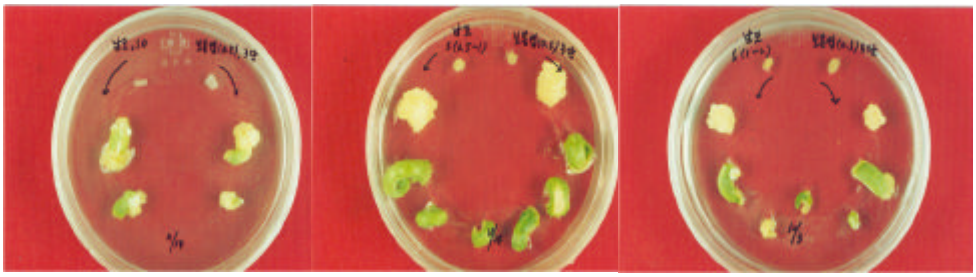
표 3-3. 마늘 보통엽의 치상시기 및 절편위치에 따른 callus 유기율

인편출현엽 길이 (㎝)	보통엽위 (인편 밖 -> 안)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
엽출현 전	30.4	4.3	17.4	47.8	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5-1.0	22.7	18.2	13.6	9.1	13.6	22.7	0	0	0	0	0	0
1.0-2.0	34.5	9.1	18.2	13.6	4.5	13.6	0	13.6	9.1	9.1	9.1	0

표 3-4. 마늘 제1보통엽의 치상시기, 절편크기 및 부위에 따른 callus 유기율

인편출현엽 길이 (cm)	Explant size (cm)	제1보통엽위 (기부:하->상)	Callus formation (%)	Callus type(%)	
				B	C
1.0-2.0	0.3	1	12.5	28.6	71.4
		2	7.9	50.0	50.0
		3	8.3	100.0	0
		4	13.9	66.7	33.3
		소 계	10.7	61.3	38.7
	0.5	1	4.7	91.7	8.3
		2	20.5	100.0	0
		3	38.9	100.0	0
		4	44.8	92.3	7.7
		소 계	27.2	96.0	4.0

* Callus type: B, globular; C, cluster



(A) (B) (C)

그림 3-7. 치상시기를 달리한 마늘 인편내 보통엽 조직으로 부터의 callus 유기

(A: 인편 내 엽출현 전, B: 엽출현 0.5-1 cm, C: 엽출현 1-2 cm)

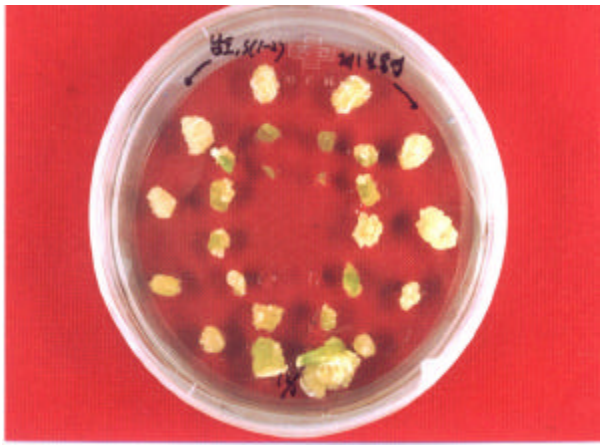
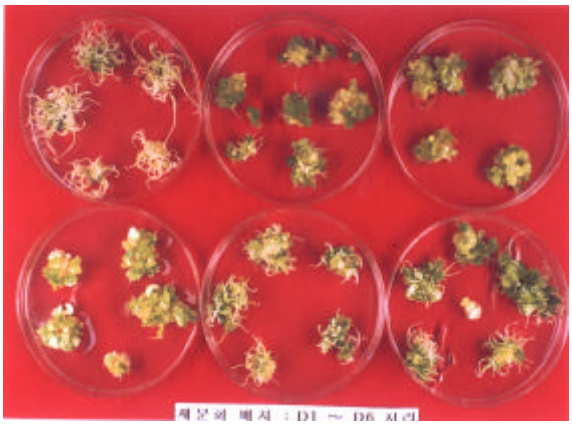


그림 3-8. 마늘 인편 내 제1보통엽 조직으로부터 callus 유기 모습
(기부 → 윗방향 순으로 치상)

표 3-5. 증식배지에 따른 보통엽 유래 callus 증식율 (%)

배지*	생장조절제 (㎎/l)			Callus 형태		Callus color		
	2,4-D	NAA	BA	Compact	Friable	Yellow	Greenish yellow	Green
Cm1	0.2	-	0.2	66.2	33.8	54.6	31.5	13.8
Cm2	"	-	1.0	41.6	58.4	53.5	34.7	11.9
Cm3	"	-	0.2	74.1	25.2	61.5	30.1	7.7
Cm4	"	-	0.5	55.1	44.9	57.1	30.0	13.0
Cm5	"	-	1.0	43.5	56.5	50.6	36.9	12.5
Cm6	-	1.0	1.0	62.4	22.9	1.3	45.2	53,5

* 기본배지 : Cm1,2 (MS medium), Cm3 6 (LS medium)



D1	D2	D3
D4	D5	D6

그림 3-9. 배지에 따른 보통엽 유래 callus로부터 재분화 모습 (D1 D6 배지)

미숙총포 배양 결과 NAA 1.0 mg/l에 BA 1.0 8.0 mg/l를 처리한 배지조건에서는 shoot 분화가 잘된 반면, 2,4-D 1.0 mg/l에 BA 1.0 8.0 mg/l를 처리한 배지조건에서는 shoot 유기가 전혀 이루어지지 않았다 (표 3-6, 그림 3-10).

표 3-6. 마늘 품종 및 배지조성에 따른 미숙총포의 shoot 유기

생장조절제 (㎎/ℓ)			품 종								
			서 산			의 성			단 양		
NAA	2,4-D	BA	shoot 형성율(%)	shoot 길이(㎜)	세포비대정도	shoot 형성율(%)	shoot 길이(㎜)	세포비대정도	shoot 형성율(%)	shoot 길이(㎜)	세포비대정도
1.0		1.0	93.8	38.2	+	93.8	46.4	++	87.5	38.2	+
1.0		2.0	75.0	31.2	+	81.3	49.2	+	15.0	38.3	+++
1.0		4.0	87.8	34.0	+	87.5	50.6	+	75.0	31.4	+
1.0		8.0	87.5	34.1	-	81.5	42.8	+	68.8	34.1	-
	1.0	1.0	NR	NR	-	1.3	20.9	+	NR	NR	-
	1.0	2.0	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	-
	1.0	4.0	NR	NR	-	1.3	15.1	++	NR	NR	-
	1.0	8.0	NR	NR	+	NR	NR-	+	NR	NR-	-

* 품종별 처리당 미숙총포 절편 8개씩 치상하여 약 3주 경과후 조사 (2반복)
* 기본배지: MS 기본배지, NR: no response

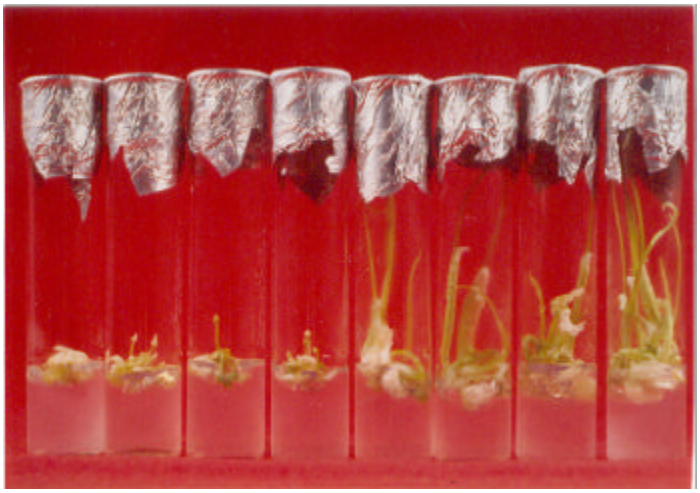


그림 3-10. 배지 내 생장조절제 농도에 따른 마늘 미숙총포의 shoot 유기
(우 → 좌: NAA 1.0 + BA 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 (mg/l):
NAA 1.0 + 2,4-D 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 (mg/l))

배지 내 sucrose 농도를 달리하여 보았을 때 3% 처리조건에서는 shoot 분화 및 신장이 크게 이루어졌고, 9% 처리조건에서는 구비대만이 주로 이루어졌으며, 6% 조건에서 shoot 분화 상태 및 구비대 정도 모두 양호하였다 (표 3-7, 그림 3-11).

표 3-7. 마늘 미숙총포 배양에 미치는 배지 내 sucrose 농도 영향

품종 / sucrose 농도 (%)	서산		의성		단양	
	shoot 유기	구비대	shoot 유기	구비대	shoot 유기	구비대
3	++	++	++	++	++	++
6	++	+++	++	+++	++	+++
9	+	++++	+	++++	+	+++

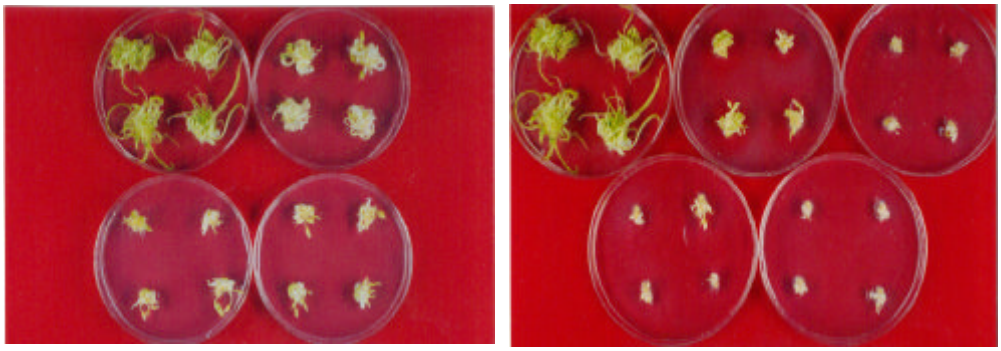
* 기본배지 : MS 기본배지, NR: no response
* 품종별 1처리당 미숙총포 절편 8개씩 치상하여 약 3주 경과후 조사 (2반복)

그림 3-11. 마늘 미숙총포의 배지 내 sucrose 농도에 따른 shoot 및 구형성 모습
(우 → 좌 : sucrose 농도 3, 6, 9%)

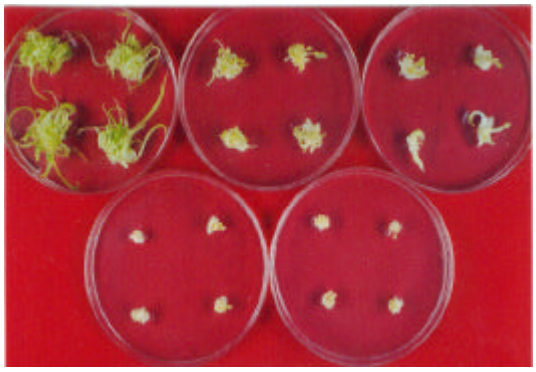
4. 형질전환 기초 조건 조사

확립된 마늘 재분화 방법을 형질전환에 이용하기 위해 개발 중인 내열성 유전자에 앞서, 이용 가능한 유전자 (제초제유전자 등) 및 *Agrobacterium* strain (EHA101 등)을 이용하였다. *Agrobacterium*을 이용하기 위해 치상조직의 제초제 및 항생제 저항성 정도를 검정하였다.

생육중인 식물체에서 채취한 미숙총포를 kanamycin 0 200 mg/l (6처리), hygromycin 0 60 mg/l (8처리), PPT 0 10 mg/l (8처리)의 농도 범위에서 배양하였을 때 kanamycin 150 mg/l, hgromycin 20 mg/l, PPT 1.0 mg/l의 농도조건에서 모두 고사하였으므로 이를 형질전환체 선발농도로 이용하였다 (그림 3-12).



(A) (B)



(C)

그림 3-12. **마늘 미숙총포의 배지 내 항생제 및 제초제 내성 검정**

(A: Kanamaycin 0, 150, 200 **및** 300 (mg/l); B: PPT 0, 0.5, 1.0, 1.5 **및** 2.0 (mg/l); C: Hygromycin 0, 20, 40 **및** 60 (mg/l))

5. 형질전환 조건 구명 및 유용유전자 도입 연구

생장점 및 보통엽 유래 callus, **미숙총포 조직 등 여러 조직으로 형질전환 조건을 구명하고자 하였으나,** callus**는 형질전환 후 재분화율이 급격히 저하되어 미숙총포 조직을 형질전환 조건 구명 및 유용유전자 도입에 이용하였다.**

단자엽 작물의 형질전환에서 많이 이용되는 유전자 총을 이용하여 tungsten 입사위치와 헬륨가스압을 달리 하여 형질전환을 수행한 결과 차이를 보였으나 (그림 3-13), 효율면에서는 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

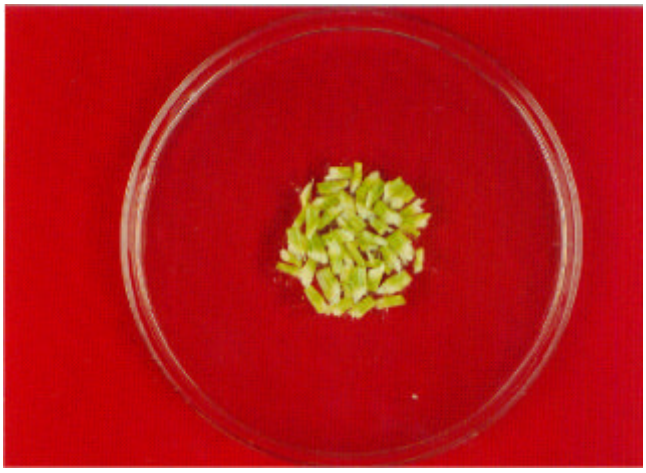


그림 3-13. 유전자총 입사전의 마늘 미숙총포 치상모습

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건 구명 결과 전처리 기간 (표 3-8, 그림 3-14), 접종균 농도 및 공동배양 기간, acetosyringone 처리농도에 따라 선발배지에서의 재분화율에서 차이를 보였다. 전처리 기간 및 공동배양기간이 길어질수록 초기 shoot 유기율은 높았지만 선발배지에서의 계속적인 shoot 신장 및 재분화율과는 일치하지는 않았다. 전처리 2일 (표 3-8, 그림 3-14), *Agrobacterium* O.D=0.4 농도 조건으로 접종하였을 때 (표 3-9, 그림 3-15), acetosyringone 100 uM 첨가된 배지에서 공동배양했을 때 (표 3-10, 그림 3-16), *Agrobacterium* EHA101을 이용하였을 때 (표 3-11) 각각 선발배지 내 shoot 유기율이 높았다.

표 3-8. *Agrobacterium* 접종 전 배양기간에 따른 형질전환 shoot 유기율

Preculture (일)	선발배지내 shoot 유기율 (%)
0	6/35 (17.1)
2	15/32 (46.9)
5	14/34 (41.2)

* AGL1/pCAMBIA3301, *Agrobacterium* OD600 = 0.8, 공동배양 3일 처리

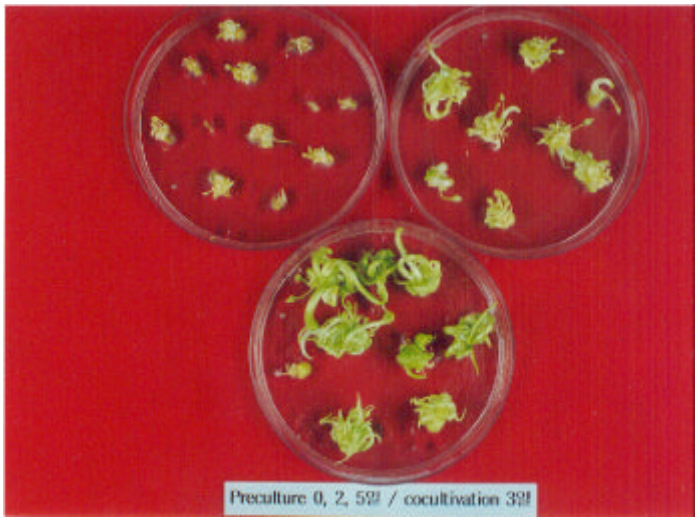


그림 3-14. *Agrobacterium*을 접종 전처리 기간에 따른 선발배지에서의 미숙총포 재분화

표 3-9. *Agrobacterium* 접종 농도 및 공동배양기간에 따른 형질전환 shoot 유기율

Agrobacterium 농도 (CDEEE)	공동배양기간 (일)	선발배지내 shoot 유기율 (%)	GUS 발현정도
0.4	2	2/25 (8.0)	+
	4	12/25 (48.0)	++
	6	12/29 (41.4)	+
0.8	2	2/31 (6.5)	-
	4	7/22 (31.8)	++
	6	4/30 (13.3)	++
1.6	2	5/32 (15.6)	++
	4	9/33 (27.3)	++
	6	16/31 (51.6)	+

* AGL1/pCAMBIA3301, preculture 2일 처리

표 3-10. *Agrobacterium* 공동배양시 acetosyringone 첨가에 따른 형질전환 shoot 유기율

Acetosyringone 농도 (uM)	선발배지내 shoot 유기율 (%)
0	15/32 (46.9)
50	7/32 (21.9)
100	17/32 (53.1)
200	14/33 (42.4)

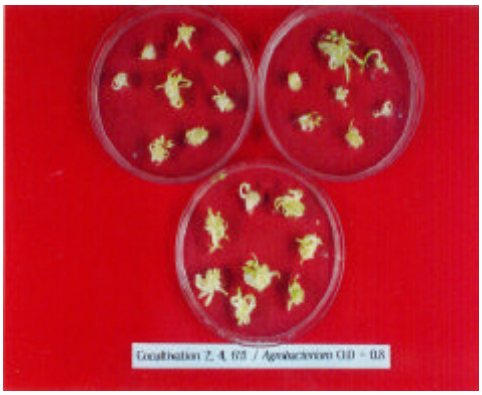
* AGL1/pCAMBIA3301, Agro. 농도 0.8, preculture 2일, 공동배양 3일 처리

표 3-11. *Agrobacterium* 균주에 따른 형질전환 shoot 유기율

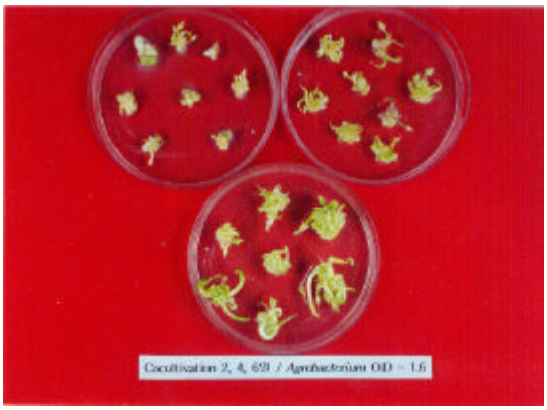
Agrobacterium 균주	선발배지내 shoot 유기율 (%)
AGL1/pCAMBIA3301	4/22 (18.2)
EHA101/pIG121	7/32 (21.9)
LBA4404/pIG121-CsHSP17.9	4/25 (16.0)

* *Agrobacterium* ODEE0 = 0.8, preculture 2일, 공동배양 3일 처리

(A)



(B)



(C)

그림 3-15. *Agrobacterium* **접종농도 및 공동배양기간에 따른 선발배지에서의 미숙 총포 재분화** (A: **공동배양** 2, 4, 6**일**/ O.D= 0.4, B: **공동배양** 2, 4, 6**일**/ O.D= 0.8, C: **공동배양** 2, 4, 6**일**/ O.D= 1.6)

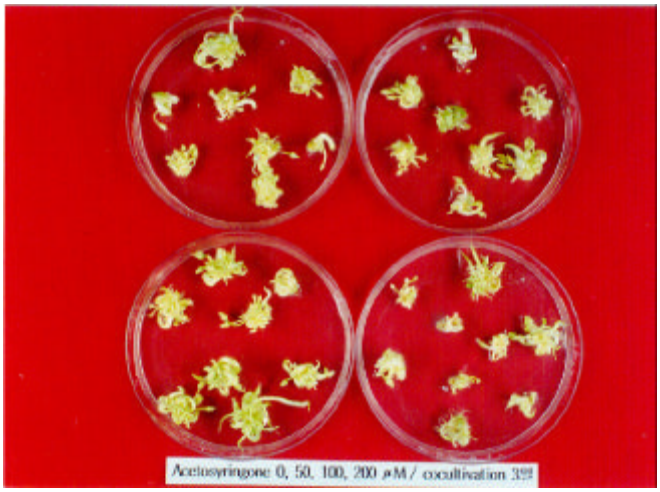


그림 3-16. *Agrobacterium*을 **공동배양시 배지 내** acetosyringone **첨가 효과** (acetosyringone 0, 50, 100, 200 uM **처리**)

Agrobacterium **및** gene gun**을 이용하여 형질전환한 결과** kanamycin **및** PPT **가 포함된 배지에서** GUS, **제초제저항성, 내열성유전자 등이 도입된 것으로 추정되는 많은** shoot**를 선발하였고 (그림** 3-17-A), **이 중 일부** shoot**로부터** GUS **유전자 발현을 확인하였으며 (그림** 3-18), PCR **분석으로** bar **유전자 삽입을 확인하였으며 (그림** 3-18), **이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다 (그림** 3-17-B).

(A) (B)

그림 3-17. **선발배지에서 재분화 중인 형질전환 마늘의** shoots **및 기내단구**

(A) **좌**: control, **우**: **형질전환** shoots

(B) **형질전환** shoot **유래의 기내 마늘 단구**

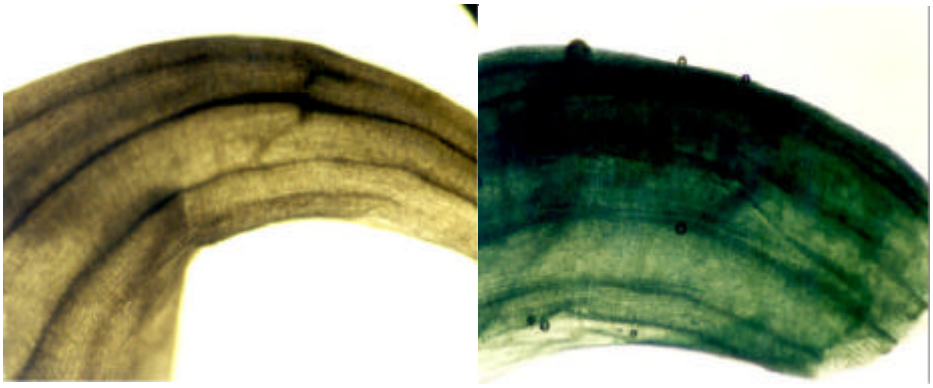


그림 3-18. **형질전환** shoot**의** GUS **유전자 발현**

(**좌**: non-transformant **우**: transformant)

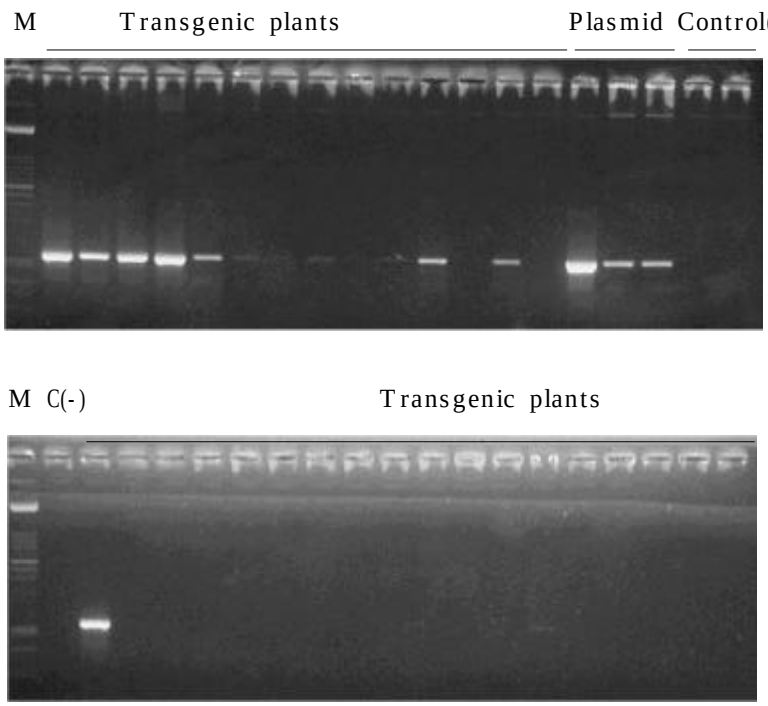


그림 3-19. Bar primer**를 이용한 형질전환 마늘의** PCR **분석**
(**상**: *Agrobacterium* **공동배양**, **하**: **유전자총**)

제 4 절 결 론

마늘은 전세계적으로 영양번식만으로 계속 유지되어 온 까닭에 바이러스 이병에 의한 수량감소와 품질저하를 가져옴은 이미 알려진 사실이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 무병종구의 생산 및 증식, 가임마늘간 교잡에 의한 신품종 육성 등의 연구가 진행 중이나 연 6-12배 정도의 낮은 증식율과 가임마늘 유전자원의 수와 변이의 폭이 좁아 연구결과가 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 마늘의 생산성을 높일 수 있도록 마늘의 형질전환 체계를 확립하여, 개발된 내열성 유전자를 마늘에

도입하고자 하였다.

마늘 재배종 4품종의 인편 생장점을 식물생장조절제의 종류와 농도를 달리한 배지에 치상하여 캘러스를 배양해 본 결과, LS 기본배지에 2,4-D 및 BA를 각각 2.0 mg/l씩 첨가한 CII 배지에서 callus 유기율이 높았다.

조직배양 효율을 높이기 위해 인편 내 생장점 외에 보통엽 조직을 치상시기와 절편위치 등의 처리를 달리하여 치상한 결과, 엽이 1-2 cm 출현 시기에 인편기부에서 1-2 cm 위치의 제1보통엽 조직을 0.5 cm 절편크기로 치상하였을 때 callus 유기율이 가장 높았다. 미숙총포는 배양 결과 NAA 1.0 mg/l, BA 1.0 mg/l, sucrose 6% 농도 조건에서 shoot 분화 상태 및 구비대 정도 모두 양호하였다.

생장점 및 보통엽 유래 callus, 미숙총포 조직 등 여러 조직으로 형질전환 조건을 구명하고자 하였으나, 형질전환 후 callus를 거치는 경우 재분화율의 급격한 감소로 효율이 떨어지므로 미숙총포 조직만을 주로하여 형질전환 조건 구명 및 유용 유전자를 도입하였다.

미숙총포 절편은 kanamycin 150 mg/l, hgromycin 20 mg/l, PPT 1.0 mg/l의 농도조건에서 배양하였을 때 모두 고사하였으므로 이를 형질전환체 선발농도로 이용하였다.

단자엽 작물에서 많이 이용되는 유전자 총으로 텅스텐 입사위치와 헬륨가스압을 달리 하여 형질전환을 수행한 결과 차이를 보였으나, 효율면에서는 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건을 알아본 바, 전처리 2일, *Agrobacterium* O.D.=0.4 농도 조건으로 접종하였을 때, acetosyringone 100 uM이 첨가된 배지에서 공동배양했을 때, *Agrobacterium* 균주는 EHA101을 이용하였을 때 각각의 조건에서 선발배지 내 shoot 유기율이 높았다. *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용한 형질전환한 후 kanamycin 및 PPT가 포함된 배지에서 GUS, 제초제 저항성, 내열성유전자 등이 도입된 것으로 추정되는 많은 shoot들이 선발되었고, 이 중 많은 shoot로부터 GUS 유전자 발현 및 PCR 분석으로 bar 유전자 삽입을 확인하였으며 이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다.

제 4 장 종 합 결 론

내열성 유전자의 도입에 의한 다수성 마늘의 대량생산을 위하여, 먼저 식물에서 내열성에 관여하는 것으로 알려진 저분자량 heat shock protein (HSP) 유전자와 HSP 유전자의 발현조절에 관여하는 것으로 알려진 heat shock factor (HSF) 유전자를 분리한 다음, 모델식물인 담배에 형질전환하여 분석한 결과, 저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 고온에서의 광합성 효율의 증가와 고온에 대한 내성의 증가에 기여함을 확인하였다. 내열성 유전자 promoter의 탐색을 통하여 *OsHSP17.9* 유전자의 -579 bp promoter sequence를 고온 및 마늘의 숙기에 발생하는 온도 스트레스 (중고온, 장기간) 하에서 내열성 유전자의 발현유도를 위한 inducible promoter로 확정하였다. 확정된 -579 bp promoter에 배추 유래의 *BcHSP17.4*, 벼 유래의 *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자와 벼 유래의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* 유전자를 연결하여 담배에 형질전환하여 분석한 결과, 도입된 HSP 및 HSF 유전자의 고온에 의한 유도성 발현을 확인하였으며, 이를 통한 고온 내성의 획득을 확인하였다.

마늘의 형질전환 체계를 확립하기 위하여, 마늘 재배종 4품종의 인편 생장점, 보통엽 조직을 이용하여 캘러스 및 shoot 유기율을 조사하였으며, 생장점 및 보통엽 유래 callus, 미숙총포 조직 등을 이용하여 형질전환 조건을 구명하였다. 형질전환 효율은 미숙총포 조직이 가장 유리한 것으로 나타났으며, 유전자 총을 이용한 방법보다 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 경우, 전처리 2일, *Agrobacterium* O.D.=0.4 농도 조건으로 접종하였을 때, acetosyringone 100 μM이 첨가된 배지에서 공동배양했을 때, 균주는 EHA101을 이용하였을 때 각각의 조건에서 선발배지 내 shoot 유기율이 높게 나타났다. *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용하여 형질전환된 것으로 추정되는 많은 shoot들을 선발하여 GUS 유전자 발현 및 PCR 분석으로 bar 유전자 삽입을 확인하였으며 이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다. 이상의 결과를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

가. 제 1 세부과제 : 「내열성 유전자의 발현조절을 위한 분자수식」과 관련된 연구개발 결과

1. 내열성 관련 유전자의 선발과 특성규명

벼의 세포질에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *OsHSP17.9*를 선발하였다. 선발된 *OsHSP17.9*의 DNA 염기서열의 총 길이는 3,147 bp로서, 161개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 17.9 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. *OsHSP17.9* 유전자는 벼의 genome 상에서 3-5 copy정도 존재하는 것으로 나타났으며, 38℃에서 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 오히려 발현량이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 42℃에서 처리 후 10분부터 발현이 유도되기 시작하여, 30분에 최대치를 나타내었으며, 그 후 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

벼의 엽록체에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *OsHSP26*을 선발하였다. 선발된 *OsHSP26* cDNA의 총 길이는 1,026 bp였으며, 239개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 26.6 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다. *OsHSP26* 유전자는 벼의 genome 상에서 single copy로 존재하는 것으로 나타났으며, 39℃에서 발현이 유도되기 시작하여 42℃에서 최대의 발현량을 보였으며, 45℃에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 42℃에서 처리 후, 20분부터 발현이 유도되기 시작하여, 2시간에 최대치를 나타내었으며, 그 후 서서히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

배추의 세포질에 존재하는 lmw HSP 유전자인 *BcHSP17.4* cDNA의 총 길이는 732 bp이며, 157개의 아미노산으로 구성되는 예상분자량 17.4 kDa의 polypeptide를 암호화하는 것으로 나타났다.

벼의 heat shock factor 유전자인 *OsHSF13* cDNA의 총 길이는 1,377 bp였으며, 353개의 아미노산으로 구성되는 하나의 ORF를 포함하는 것으로 나타났다. *OsHSF13* 유전자는 벼의 genome 상에서 2 copy 이상 존재하는 것으로 나타났으

며, 이 유전자는 벼의 생육온도인 28℃에서도 발현되며, 온도가 증가할수록 발현량이 조금씩 증가하는 경향을 나타내었으나 47℃에서는 감소하는 것으로 나타났다.

2. 내열성 유전자의 도입과 내열성의 획득

저분자량 HSP의 과발현에 의한 세포 내 축적이 식물의 고온내성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9* 및 *OsHSP26* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector의 35S promoter 하류에 연결한 다음, 모델식물인 담배에 각각 형질전환하였다. Southern blot 분석 및 PCR 분석으로 외래의 저분자량 HSP 유전자가 도입되었음을 확인한 다음, Northern blot 분석을 통하여 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

형질전환된 담배에서 heat shock 처리 후, 광합성 효율을 온도의 증가에 따른 chlorophyll 형광의 Fo 및 Fv 값의 변화로 분석하였다. 그 결과, lmw HSP의 발현량이 높을수록 Fo의 증가율이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 광합성 효율을 나타내는 Fv/Fm와 광양자수율을 나타내는 1/Fo-1/Fm 치를 각각 측정한 결과, 광합성이 완전히 없어지는 온도인 52℃에서의 활성의 1/2이 되는 온도가 wild-type 식물체보다 약 2℃ 정도 증가되었다. 따라서 lmw HSP는 고온 스트레스 하에서 광화학계를 안정화시키고, LHCII의 분리를 억제함으로서 광합성기구를 보호하는 것으로 나타났다.

형질전환 식물체의 고온에 대한 내성의 획득여부를 유식물체 수준에서 조사하였다. Wild-type 식물체와 형질전환 식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, wild-type 식물체는 전부 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 80%가 생존하여 고온에 대한 내성의 획득을 나타내었다.

3. 내열성 유전자 발현조절영역의 탐색

내열성 유전자의 고온 특이적인 발현에 관여하는 조절영역을 탐색하기 위하여,

OsHSP17.9 유전자의 promoter를 이용하여, heat shock element 등의 특이서열을 중심으로 promoter deleted clone을 구축하였다. *OsHSP17.9*의 -579 bp까지의 조절영역을 포함하는 construct I, -360 bp까지의 construct II, -237 bp까지의 construct III, -108 bp까지의 construct IV 그리고, 대조구로 promoter를 완전히 제거한 construct Ⅴ 및 35S promoter를 포함하는 construct 35S를 각각 제작한 다음, GUS 유전자를 연결하였다.

담배 BY-2 현탁배양세포의 원형질체를 이용한 transient assay 결과, Construct Ⅰ의 GUS 활성이 대조구인 35S promoter에 비해 11.3 배 이상 증가된, 가장 높은 수준을 나타내었으며, construct II의 경우 construct I의 약 59%, construct III의 경우 12% 이하로 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 또한 Construct Ⅳ는 promoter sequence를 완전히 제거한 construct V와 유사한 수준으로 나타나 promoter의 기능을 소실한 것으로 판단되었다.

제작된 construct를 이용하여 형질전환 담배를 구축한 다음, promoter 활성을 RNA 및 단백질 수준에서 확인하였다. 먼저, GUS 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사한 결과, 35S promoter는 30℃ 이상의 고온처리에서는 발현량이 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, promoter가 완전히 제거된 construct V는 모든 온도에서 전혀 발현하지 않는 것으로 나타났다. Promoter가 개변된 constructs의 경우, 25℃, 6시간 및 30℃, 1시간 처리구에서는 모든 construct에서 GUS transcript가 검출되지 않았다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 construct I의 경우 35S promoter보다 약간 증가된 GUS transcript의 축적을 나타내었다. 또한 42℃, 1시간 처리구에서는 construct I이 가장 높은 GUS transcript의 축적을 나타내었으며, construct II에서도 construct I보다는 낮지만 35S promoter보다 높은 상당한 수준의 GUS transcript의 축적을 확인하였다.

Promoter의 활성을 GUS 단백질 수준에서 chemiluminescence 분석으로 확인한 결과, 35S promoter는 처리온도에 따른 변화를 나타내지 않았으며, construct V는 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. Promoter가 개변된 constructs의 경우, 25℃에서는 모든 construct에서 promoter가 완전히 제거된 construct V와 동일한

수준으로 GUS 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 2배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었다. 42℃, 2시간 처리구에서는 construct I의 경우 35S promoter에 비해서 20배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었으며, construct II의 경우 35S promoter에 비해서 8배 이상 증가된 GUS 활성을 나타내었다.

4. 조절영역 확정 발현 vector의 구축과 형질전환 식물체의 분석

OsHSP17.9 유전자의 조절영역의 탐색을 통하여 내열성 유전자의 고온에 의한 발현유도에 필수적인 것으로 나타난, -579 bp promoter sequence에 *BcHSP17.4*, *OsHSP17.9*, *OsHSP26* 및 *OsHSF13* 유전자를 연결하여, 내열성의 획득을 위한 최종 construct로서 pBI579-HSP17.4, pIG579-HSP17.9, pIG579-HSP26 및 pIG579-HSF13을 각각 제작하였다. 구축된 constructs를 담배에 각각 형질전환한 다음, HSP 및 HSF 유전자의 발현정도를 Northern blot 분석으로 조사하였다. 그 결과, 25℃에서는 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 관찰되지 않았다. 그러나, 30℃, 6시간 처리구에서는 비교적 낮은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적이 나타나기 시작하였으며, 42℃, 1시간 처리구에서는 4 constructs에서 모두 매우 높은 수준의 HSP 및 HSF mRNA의 축적을 나타내었다.

최적 promoter에 의한 고온에서의 lmw HSP 및 HSF의 과발현이 식물체 전체의 고온에 대한 내성을 증가시키는지의 여부를 T1 식물체 수준에서 조사한 결과, 부분적인 내열성의 획득을 나타내었다. 즉, 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 광조건에서 배양한 결과, wild-type 식물체는 완전히 고사하였으나, 형질전환 식물체는 약 30-50% 이상의 생존율을 나타내었다. 형질전환 식물체에서 식물체의 생존율이 약 30-50% 정도로 비교적 낮게 나타난 것은 T1 세대의 heterozygous line을 이용함으로서, 약 25%의 비형질전환 식물체가 포함된 영향으로 생각된다.

나. 제 1 협동과제 : 「마늘 형질전환체계의 확립」과 관련된 연구개발 결과

마늘은 전세계적으로 영양번식만으로 계속 유지되어 온 까닭에 바이러스 이병에 의한 수량감소와 품질저하를 가져옴은 이미 알려진 사실이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 무병종구의 생산 및 증식, 가임마늘간 교잡에 의한 신품종 육성 등의 연구가 진행 중이나 연 6-12배 정도의 낮은 증식율과 가임마늘 유전자원의 수와 변이의 폭이 좁아 연구결과가 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 마늘의 생산성을 높일 수 있도록 마늘의 형질전환 체계를 확립하여, 개발된 내열성 유전자를 마늘에 도입하고자 하였다.

마늘 재배종 4품종의 인편 생장점을 식물생장조절제의 종류와 농도를 달리한 배지에 치상하여 캘러스를 배양해 본 결과, LS 기본배지에 2,4-D 및 BA를 각각 2.0 mg/l씩 첨가한 CII 배지에서 callus 유기율이 높았다.

조직배양 효율을 높이기 위해 인편 내 생장점 외에 보통엽 조직을 치상시기와 절편위치 등의 처리를 달리하여 치상한 결과, 엽이 1-2 cm 출현 시기에 인편기부에서 1-2 cm 위치의 제1보통엽 조직을 0.5 cm 절편크기로 치상하였을 때 callus 유기율이 가장 높았다. 미숙총포는 배양 결과 NAA 1.0 mg/l, BA 1.0 mg/l, sucrose 6% 농도 조건에서 shoot 분화 상태 및 구비대 정도 모두 양호하였다.

생장점 및 보통엽 유래 callus, 미숙총포 조직 등 여러 조직으로 형질전환 조건을 구명하고자 하였으나, 형질전환 후 callus를 거치는 경우 재분화율의 급격한 감소로 효율이 떨어지므로 미숙총포 조직만을 주로하여 형질전환 조건 구명 및 유용 유전자를 도입하였다.

미숙총포 절편은 kanamycin 150 mg/l, hgromycin 20 mg/l, PPT 1.0 mg/l의 농도조건에서 배양하였을 때 모두 고사하였으므로 이를 형질전환체 선발농도로 이용하였다.

단자엽 작물에서 많이 이용되는 유전자 총으로 텅스텐 입사위치와 헬륨가스압을 달리 하여 형질전환을 수행한 결과 차이를 보였으나, 효율면에서는 *Agrobacterium*을 이용하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건을 알아본 바, 전처리 2일, *Agrobacterium* O.D.=0.4 농도 조건으로 접종하였을 때, acetosyringone 100 uM이 첨가된 배지에서 공동배양했을 때, *Agrobacterium* 균주는 EHA101을 이용하였을 때 각각의 조건에서 선발배지 내 shoot 유기율이 높았다. *Agrobacterium* 및 gene gun을 이용한 형질전환한 후 kanamycin 및 PPT가 포함된 배지에서 GUS, 제초제 저항성, 내열성유전자 등이 도입된 것으로 추정되는 많은 shoot들이 선발되었고, 이 중 많은 shoot로부터 GUS 유전자 발현 및 PCR 분석으로 bar 유전자 삽입을 확인하였으며 이들로부터 기내단구를 얻어 증식 중에 있다.

참 고 문 헌

1. Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.), Cause of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-104
2. Bartling, D., Bulter, H., Liebeton, K. and Weiler, E.W. 1992. An Arabidopsis thaliana cDNA clone encoding a 17.7 kDa class II heat shock protein. Plant Mol. Biol. 18 (5): 1007-1008
3. Baumann, G., Raschke, E., Bevan, M. and Schöffl, F.P. 1987. Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants. EMBO J. 8: 2195-2202
4. Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
5. Czarnecka, E., Key, J.L. and Gurley, W.B. 1989. Regulatory domains of the Gmhsp17.5-E heat shock promoter of soybean. Mol. Cell. Biol. 9: 3457-3463
6. Czarnecka, E., Fox, P.C. and Gurley, W.B. 1990. In vitro interaction of nuclear proteins with the promoter of soybean heat shock gene Gmhsp17.5-E. Plant Physiol. 94: 935-943
7. Helm, K.W., LaFayette, P.R., Nagao, R.T. Key, J.L. and Vierling, E. 1993. Localization of small heat shock protein to the higher plant endoplasmic membrane system. Mol. Cell. Biol. 13: 238-247
8. Horsch, R. B., Fry, J., Hoffmann, N., Neidermeyer, J., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1978. Leaf disc transformation. In Plant Molecular Biology: Manual. Gelvin S. B. Ed., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, A5: 1-9

9. Hui-min Xue, Hajime Araki, Ling Shi, and Toshiro Yakuwa. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration in basal plate and receptacle derived-callus cultures of garlic (Allium sativum L.). J. Japan Hort. Sci. 60(3):627-634

10. Kehr, A. E. and G. W. Schaeffer. 1976. Tissue culture and differentiation of garlic. HortScience 11(4):422-423

11. Knack, G., Liu, Z. and Kloppstech, K. 1992. Low molecular mass heat-shock proteins of a light-resistant photoautotrophic cell culture. Eur. J. Cell Biol. 59 (1): 166-175

12. Jeon, J. S., H. S. Jung, S. K. Sung, J. S. Lee, Y. D. Choi, H. J. Kim, and K. W. Lee. 1994. Introduction and expression of foreign genes in rice cells by particle bombardment. J. Plant Biol. 37(1):27-36

13. Lee, B.H., Tanaka, Y., Iwasaki, T., Yamamoto, N., Kayano, T. and Miyao, M. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. Plant Mol. Biol. 37: 1035-1043

14. Lenne, C., Block, M.A., Garin, J. and Douce, R. 1995. Sequence and expression of the mRNA encoding HSP22, the mitochondrial small heat-shock protein in pea leaves. Biochem. J. 311 (3): 805-813

15. Lindquist, s.l. and Craig, E. 1988. The geat shock proteins. Ann. Rev. Genet 22: 631-677

16. Masanori Ayabe, Kenji Taniguchi, and Shin-ichiro Sumi. 1995. Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (Allium sativum L). Plant Cell Reports 15:17-21

17. McElwain, E.F. and Spiker, S. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kDa heat-shock protein gene family of soybean. Nucleic Acids Res. 17 (4): 1764

18. Miyao-Tokutomi, M., Lee, B.H., Mizusawa, N. and Yamamoto, N. 1998

Active oxygen and photoinhibition of photosystem **II**. In: Garab, G. (Ed.), Photosynthesis Mechanisms and Effects. Kluwer Academic, Netherlands, pp. 2097-2102

19. Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8: 4321-4325
20. Nishi, R., Hashimoto, H., Uchimiya, H. and Kato, A. 1992. A Oryza sativa cDNA clone encoding a low-molecular-weight heat shock protein. Unpublished. Genbank Acc. No.: D12635
21. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
22. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A, R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74: 5463-5467
23. Schöffl, F., Raschke, E. and Nagao, R.T 1984. The DNA sequence analysis of soybean heat-shock genes and identification of possible regulatory promoter elements. EMBO J. 3: 2491-2497
24. Schöffl, F., Rieping, M., Baumann, G., Bevan, M.W. and Angermuller, S. 1989. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimeric genes in transgenic tobacco. Mol. Gen. Genet. 217: 246-253
25. Schöffl, F., Diedring, M., Kliem, M., Rieping, M., Schroder, G. and Severin, K. 1992. The heat shock response in transgenic plants: the use of chimeric heat shock genes. Society for Experimental Biology Seminar Series. 49: Inducible Plant Proteins. J.L. Wray (eds) In Cambridge University Press, pp. 247-266
26. Takahashi, T. and Komeda, Y. 1989. Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in Arabidopsis thaliana. Mol. Gen. Genet. 219 (3):

365-372

27. Thomas, P. S. 1983. Hybridization of denatured RNA transfer of dotted nitrocellulose paper. Methods in Enzymology 100: 255-266

28. Waters, E.R., Lee, G.J. and Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J. Exp. Bot. 47: 325-338

29. Yasseen Mohamed-Yasseen, Walter E. Splittstoesser, and Richard E. Litz. 1994. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:243-247

30. **김 기용**. 1996. **배추로부터** Low Molecular Weight (LMW) Heat Shock Protein (HSP) **유전자의 분리와 특성 규명**. **경북대학교 농학박사학위논문**

31. **이병현**, **조진기**. 1999. **엽록체** Small Heat Shock Protein**의 도입에 따른 형질전환 식물체의 광합성 활성 및 고온내성의 증가**. **경북대 농학지** 17: 15-20

32. **최성렬**, **백기엽**, **조진태**. 1992. **마늘 정단**, **화경 및 화뢰배양에 의한 유식물체 생산**. **한국식물조직배양학회지** 19(6):337-342

33. **최성렬**, **백기엽**, **조진태**. 1993. **마늘 캘러스 배양을 통한 식물체 생산**. **한국원예학회지** 34(1):16-28