

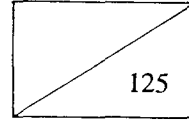
GOVP1200134131

(19th)

633.1853  
L293A

최 종  
연구보고서

BSAGM0060013-2001054-4



식물의 자기방어체계 활성화를 통한  
곰팡이병 저항성 벼 개발

Development of fungal pathogen-resistant rice  
by activating plant defense mechanisms

연구기관  
한국생명공학연구원

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물의 자기방어체계 활성화를 통한 곰팡이병 저항성 벼 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 11 월 1 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

총괄연구책임자 : 배 현 숙

연 구 원 : 조 혜 선

연 구 원 : 이 상 숙

연 구 원 : 이 정 희

연 구 원 : 김 문 일

연 구 원 : 안 준 우

연 구 원 : 김 도 명

연 구 원 : 김 유 경

연 구 원 : 손 준 석

위탁연구기관명 : 명지대학교

위탁연구책임자 : 김 주 곤

연 구 원 : 장 인 철

연 구 원 : 박 미 옥

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

식물의 자기방어체계 활성화를 통한 곰팡이병 저항성 벼 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라 벼 육종은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전재료를 보유하고 있으나 농업적으로 중요한 유전특성 (내병성, 환경저항성 등)의 유전자 분리 개발 및 품종육성은 미흡한 상태이다. 따라서 쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경제 및 대외 경쟁력을 고려하였을 때 기존의 우량품종에 내병성(특히 곰팡이 병 저항성)과 관련된 유전자들을 도입한 벼 품종개발로 환경친화적 농업개발이 요구된다 하겠다. 현재 전세계적으로 병충해에 의한 농업 생산성 감소는 총생산량의 36%에(James, 1996) 달하고 있으며 이중 곰팡이 병에 의한 피해는 12%를 차지하고 있다. 또한 병방제에 사용되는 농약은 전세계적으로 연간 \$27.8 billion (약 28조원)이 소요되어 막대한 비용 뿐 아니라 환경오염 및 인명에 대한 피해는 돈으로 계산하기 어려운 상황이다. 벼에 발생하는 곰팡이 병은 도열병(*Magnaporthe grisea*), 입고병(*Rhizoctonia solani*)으로 대표될 수 있는 데 이 두가지 병에 의한 피해정도는 1975-1990년 사이에 조사된 바에 의하면 전세계적으로 매년 약 30%의 생산량 감소를 가져왔다(Science, 1997).

식물에 있어서는 획기적인 형질전환 기법의 확립과 함께 현재 유전공학 기술로 1997년까지 전 세계적으로 3800여종의 신형질 작물이 포장시험 실시 중이며 50여종이 이미 상품화 되었고 대부분은 4-5년 내에 실용화 될 것으로 전망된다 (James, 1997). 이러한 신형질 작물의 출현은 유전자의 확보 및 새로운 유전자의 개발에 크게 의존하고 있어 이의 관련 유용 유전자의 개발 또한 매우 시급한 당면 과제이다. 총 1000억원의 예산으로 1991년부터 시작된 일본의 10개년 벼 게놈연구는 지난 6년간의 연구결과 약 30,000개 유전자의 정보를 밝혀내었고, 2,000 여개의 표지유전자를 개발하여 벼 유용 유전자의 이용개발에 선도적 역할을 수행하고 있어서 벼의 분자생물학적인 정보가 다른 주곡작물에 비해 훨씬 많이 축적되어 있다. 국내연구로는 과기처 선도기술개발과제로 수행된 벼 게놈연구에서(1994 - 1997년) 6,000개의 미속종자 발

현 유전자를 개발 확보하였고 이중 400여종의 유전자의 기능이 확인되었다.

벼 형질전환에 사용되는 기술은 현재 유전자 총 (Particle Gun) 이용법이 널리 사용되고 있으며 (Kim et al, 1994) 최근에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법이 개발되어 있고(Hiel et al, 1994) 국내에서도 이미 형질전환기술이 정착되어 있다 (Lee et al, 1998; Kim et al., 1998; Jang et al., 1998). 벼 형질전환 기술이 보급되면서, Bt toxin유전자 (Fujimoto et al, 1993) 혹은 Protease inhibitor 유전자 (Ray Wu et al, 1994)를 이용한 내충성 벼, chitinase 유전자 도입에 의한 내병성 벼(Lin et al, 1995), RIP유전자 도입 및 제초제 저항성 벼 (Kim et al, 1998) 등이 개발되어 포장시험 중에 있다. 이와 같이 작물에 외래유전자를 도입함으로써 병 저항성, 환경친화형 품종을 개발하여 이용하는 방법은 기존의 방법보다 비용이 적게 들고, 농업생산성을 극대화 할 뿐 아니라 농약의 과다 사용에서 오는 환경파괴를 막는 데 크게 기여 하게 될 전망이다. 또한 유전공학 기법에 의한 벼의 신품종 개발 기술을 확보하는 것은 다른 단자엽식물체의 형질전환에 파급 효과가 매우 크다고 사료된다. 형질전환 벼가 개발되면 재래 육종법과 상호보완적인 연구가 가능하여 전통적인 육종연구의 시간과 노력의 절감에 상당히 기여 할 것으로 기대된다.

특수기능을 가지는 고부가가치 생물공학이용 농업 신상품의 개발에 따른 수출증대가 가능하며 2000년도 수출전략 품목화으로서 고부가가치 신품종개발로 인한 농업생산성 향상 및 농가소득 증대에 일익을 담당하며 농업의 차세대 산업화 가능성을 제시할수 있다. 또한 유용유전자의 확보로 미래에 분자생물학적 방법을 이용한 유용유전자 발현 작물을 손쉽게 확보할 수 있다. 세계시장의 추세에 미루어 볼 때 유전공학적 기법을 통해 재래적 육종방법으로는 불가능 했던 새로운 품종의 육종은 불가피하므로 신품종 개발의 주도권을 확보하며 고유 브랜드를 육성하고 특성화된 작물의 우수품질 생산으로 타작물 수출에 기여할 것이다.

우리의 식문화는 쌀을 중심으로 발전해온 쌀의 문화이며, 논농사와 쌀은 우리의 문화와 전통풍습에 중요한 역할을 해 왔다. 벼농사는 홍수를 방지하며, 수자원을 함양하고 자연환경과 국토를 관리하는 엄청난 크기의 공익적 기능도 수행하고 있다. 따라서 벼농사는 자연환경의 보존기능과 전통문화의 존속이라는 다양한 공익적 기능을 가지고 있다. 그러나 현재 우리나라는 UR로 대표되는 농수산물 수출입 시장의 전면 개방, 농촌인구의 고령화, 타산업 대비 저부가가치, 농촌생활환경의 상대적 낙후 등으로 인하여 매우 어려운 상황에 직면해 있다. 이와같이 국제화 개방화시대의 한국농업의 위기를 효과적으로 대처하고 다가오는 21세기 선진국 시대의 농업의 위상

을 정립하기 위한 방법으로 전통적인 농업생산 기술에 유전공학적 기법을 접목 시키므로써 새로운 형태의 고 생산성 농업을 창출해낼 수 있을 것이다. 형질전환 식물체를 이용한 외래 유전자의 발현 및 이를 이용하여 새로운 형질을 가진 식물체를 개발하는 것은 차세대 농업의 성공여부를 좌우할 중요한 기술로 부각되고 있다. 최근의 외국농산물 수입등에 의한 안정적 소득작물의 개발이 시급한 실정에서 신품종의 농업작물이 개발된다면 그 경제성이 클 것이고 이를 통해서 UR등에 대비한 농업경쟁력 향상에 의한 농가소득 향상 및 국가경쟁력 향상이 이루어질 것이다.

우리나라의 고르지 못한 기후환경속에서 도열병 등 곰팡이 병에 의한 수도생산력 피해의 심각성을 생각할 때 병 저항성 벼 개발에 의한 경제 산업적인 효과는 짐작하기 어려울 정도로 클 것이며 환경친화적 형질전환작물의 개발은 안전한 식량공급과 생산성 제고에 크게 기여함으로써 보다 쾌적하고 안락한 생활을 가져다 줄 것으로 생각된다. 또한 막대한 양의 농약 사용에 따른 환경오염의 피해를 줄일 수 있고 농약사용에 따른 인명피해에 의한 농정 불안요인을 완화시킬 수 있다.

따라서 본 연구에서는 벼에 Receptor kinase (CHRK1) 유전자와 그의 변형체 (CHRK-K)를 과량으로 안정되게 발현시킴으로서 다각적인 식물의 자기방어체계를 유도하여 도열병이나 입고병 등 곰팡이 병에 저항성을 갖는 벼를 개발하여 농업생산성을 증대시키고 농약의 과다살포를 줄임으로서 환경보호 뿐 아니라 농민의 건강을 증진시키는 품종을 유전공학적인 방법으로 육종하고자 한다. 또한 Receptor kinase 유도 병 저항성 기작 및 식물의 자기방어 메카니즘을 형질전환 식물체내에서 연구함으로써 그 유전자의 생체내에서의 작용기작 및 기능에 관한 기초지식을 확보하여 동 분야 연구의 국제적인 우위를 확보하고자 한다. 마지막으로 주곡 작물인 벼를 대상으로 핵 및 엽록체로의 농업적으로 유용한 유전자를 도입, 안정적으로 후대까지 발현시키는 방법을 확립함으로써 작물 형질전환 기술의 국내 기술 기반을 구축할 뿐만 아니라 타 작물에 응용할 수 있는 토대를 마련코자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

1. 유전공학적으로 변형된 Receptor kinase CHRK1 유전자 함유 운반체 개발 및 담배 형질전환체 제조 (생명공학연구원)
  - CaMV 35S promoter (담배)와 ubuquitin promoter (벼)를 이용한 정상적인

Receptor kinase 유전자 (CHRK1)의 벼와 담배에서의 발현

- CHRK1 단백질을 항시 활성이 있는 형태로 변형하기 위한 유전자 변형 (CHRK-K)
- 정상적인 CHRK1 함유 과대발현 운반체 개발
- 변형유전자 CHRK-K 함유 과대발현 운반체 개발
- 담배 형질전환 및 식물체 재분화

## 2. 형질전환 벼와 담배 식물체 분석

- 형질전환 식물체 임신포 조사
- 형질전환 식물체내 도입유전자 유무 분석 (PCR과 genomic Southern analysis)
- 형질전환 식물체내 도입유전자 발현 분석 (Northern과 Western analysis)

## 3. 벼 형질전환용 CHRK1 Receptor kinase 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환 (명지대)

- 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환
- 정상적인 CHRK1 함유 과대발현 운반체 개발
- 변형유전자 CHRK-K 함유 과대발현 운반체 개발
- 제작운반체 캘루스 형질전환
- 형질전환 캘루스 식물체 재분화

## 4. 형질전환 담배에서 CHRK1과 CHRK-K 유전자의 발현이 유도하는 형질변화 탐구

- 식물방어기작 연구: 도입된 CHRK1 또는 CHRK-K 유전자의 발현으로 인한 식물의 방어기작 유도 검증: PAL (phytoalexin합성 관련), proteinase inhibitor, chitinase, glucanase등 여러 방어관련 유전자의 발현조사
- CHRK1 유전자의 발현이 유도하는 비정상적인 식물발생의 분자적 기작 탐구

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 유전공학적으로 변형된 CHRK1 Receptor kinase 유전자 함유 운반체 개발 및 담배 형질전환체 제조

식물체가 병원체의 침입을 인지하였을 때 그 침입을 국소화 시키기 위해 여러 종류의 방어 메카니즘을 발현하게 되는데 callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase 등의 방어관련 유전자의 발현등이 포함된다. 최근 수년간 식물체의 항병원성 유도 및 발현에 관한 세포적 분자적인 기작연구에 많은 발전이 이루어졌으며 특히 최근의 분자생물학과 식물형질전환기술의 발전에 힘입어 병원체침입의 인지로부터 식물방어체계 유도를 연결하는 신호전달 메카니즘에 관하여 많은 연구 결과가 축적되고 있다. 이러한 분야의 커다란 발전에도 불구하고 아직 가장 핵심적인 의문점들이 그대로 남아있다. 예를 들면 방어기작을 유도하는 신호전달체계에 관한 세포막 receptor의 역할, 관련 분자신호의 기능, 조절 및 전달, 효과적인 저항성에 관련된 2차대사산물의 기능등을 들수 있다.

식물체가 본질적으로 갖고있는 이러한 방어전략을 이용 혹은 강화하여 곰팡이에 내성을 갖는 식물체를 개발하기 위한 노력이 경주되어 왔는데 chitinase, glucanase 등의 방어관련 단백질들을 식물체에 과대발현 하는 것 등이 그 대표적인 예이다. 병원균의 공격에 의해 유도되는 chitinase 및  $\beta$ -1, 3-glucanase와 같은 가수분해 효소를 담배, 알팔파, 감자 및 벼를 비롯한 몇몇 식물체에서 분리하였고 (Broglie, 1986; Jones, 1986; Mauch, 1989; Zhu, 1991), 강낭콩으로부터 분리된 chitinase 유전자를 담배에 형질전환하여 *Rhizoctonia solani*에 내성 조사를 하였다 (Broglie, 1991). 최근에는 벼의 chitinase와 알팔파의 glucanase의 유전자를 담배에서 동시에 발현시켜 *Cercospora nicotianae*에 어느정도 내성을 나타내었다. (Zhu, 1994). *Serratia marcescens*로부터 분리된 키틴 가수분해 효소 유전자를 담배에 도입하고 세포안과 밖에서 각각 발현되도록 함으로써 포장시험에서 *Rhizoctonia solani*에 대한 내성을 조사하였다 (Howie, 1994). 그러나 그러한 노력들은 거의 모두가 실패로 돌아갔고 성공한 경우라하여도 그 효과가 미미하여 실용화단계에 이르지 못했다. 결국 다년간의 시도를 통해 도달한 결론은 한 두가지의 방어관련 단백질의 발현을 통해서도 실용화시킬 정도의 곰팡이 내성을 얻을 수 없다는 사실이다. 즉 식물체가 병원체의 침입에 대응하는 총체적인 방어기작을 이용해야만이 높은 내성을 얻을 수 있으리라 사료된다. 최근의 식물-병원체 상호작용에 관한 연구도 병원체 침입의 신호를 식물체가 어떻게 인지하여 그 신호가 세포내에서 어떻게 전달되어 downstream의 방어관련 유전자의 발현으로 연결되는지에 초점을 맞추고 있다. 그러므로 유전공학을 이용하여 식물체가 병원체 침입의 신호를 더 빨리 인지하게하고 더 강력한 방어기작을



활성화시키는 전략은 높은 내성을 얻는데 가장 탁월한 전략이라 사료된다.

Receptor kinase는 세포막에 위치하여 외부로부터 ligand를 받아 그 신호를 다른 단백질의 phosphorylation을 통하여 전달하는 세포의 신호전달에 관련된 역할을 하는 효소인데 여러 동물 system에서 세포의 증식과 발생에 결정적인 역할을 하는 것이 보고되었다. CHRK1이라는 receptor kinase는 N-terminal에 chitinase를, C-terminal에 kinase motif를 가지며 chitoooligosaccharide 신호의 receptor의 성질을 가지고 있다. 곰팡이가 식물에 침입할 때 곰팡이와 식물 세포벽의 성분인 키틴과 글루칸의 oligomer (oligosaccharides)들이 신호전달 물질로 작용하여 식물의 방어기작을 일으킨다. 즉 CHRK1은 세포밖에 노출되어 있는 chitinase domain을 통해 곰팡이 세포벽에서 유래된 chitin과 결합하여 kinase domain을 활성화시키므로써 곰팡이 침입 신호를 세포안으로 전달하여 다각적인 방어체계 (callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase등의 방어관련 유전자의 발현)를 활성화시킨다고 생각된다. 이러한 CHRK1 유전자의 기능 분석 및 담배 형질전환체 개발을 위하여 세 종류의 형질전환용 운반체를 개발하였다.

#### 가. CHRK1 전체 유전자의 과대발현용 운반체 제작

CHRK1 단백질을 myc peptide motif로 tagging하여 과대발현하기 위하여 CHRK1 full cDNA를 pCMV 플라스미드에 cloning하여 C-terminus에 myc을 붙인 다음 전체 융합유전자를 형질전환 벡터인 pMBP1에 클로닝 하여 그 안의 CaMV35S promoter와 sense orientation으로 융합시켰다. 즉 형질전환체 내에서 35S promoter에 의하여 CHRK1-myc 단백질을 과대발현시키고자 한다. 먼저 CHRK1을 myc으로 tagging하여 발현하기 위하여 *CHRK1* cDNA를 BamHI과 XhoI으로 digest하여 그 3.3 kb DNA 절편을 BamHI과 XhoI으로 digest한 pCMV-Tag vector에 클로닝하여 myc과 융합시켰다. 그 결과 pCMV-CHRK1을 얻었다. 다음 pCMV-CHRK1을 BamHI과 KpnI으로 digest하여 myc과 융합한 CHRK1 DNA 절편을 얻은 뒤 BamHI과 KpnI으로 digest한 pMBP1 (형질전환 벡터)으로 클로닝하였다. 그 결과 pMBP1-CHRK1-myc을 얻었다.

#### 나. CHRK1 kinase mutant 유전자 과대발현용 운반체 제작

CHRK1은 kinase 활성을 가지는데 kinase 활성이 없는 CHRK1의 mutant를 myc peptide motif로 tagging하여 과대발현하기 위하여 다음과 같은 클로닝을 행하였다. 먼저

CHRK1의 BglIII/PstI DNA 절편을 PCR한 뒤 template로 사용하여 kinase activity에 필요한 ATP-binding site인 Lys을 Asn으로 PCR로서 mutation 시켰다. 그 후 pCMV-CHRK1을 BglIII와 PstI으로 digest하여 mutation을 도입한 DNA 절편 (BamHI/PstI 절편)을 그 안으로 클로닝하였다. 결국 CHRK1 mutant cDNA를 pCMV 플라스미드에 cloning하여 C-terminus에 myc을 붙였다. 다음 pCMV-mCHRK1를 BamHI과 KpnI으로 digest하여 myc과 융합한 mCHRK1-myc 융합유전자 절편을 얻은 뒤 BamHI 과 KpnI으로 digest한 pMBP1 (형질전환 벡터)으로 클로닝하여 그 안의 CaMV35S promoter와 sense orientation으로 융합시켰다. 그 결과 pMBP1-mCHRK1-myc을 얻었다. 즉 형질전환체 내에서 35S promoter에 의하여 myc으로 tagging된 CHRK1 mutant 단백질을 과대발현시켰다.

다. 활성을 가지는 CHRK1 kinase domain을 병원체침입에 대응하여 과대발현하기 위한 운반체 제조

항상 활성이 있는 형태로 변형된 CHRK1 mutant의 발현을 위하여 ligand binding domain과 transmembrane domain을 제거한 CHRK1 kinase domain (KD)만을 tagging을 위하여 GST (Glutathione S transferase)와 reading frame이 맞게 융합시킨 후 그 융합부위를 sequencing으로 확인하였다. 이 GST-CHRK-K 융합유전자를 병원체 침입시 높이 발현되는 PRI 유전자의 promoter에 융합시켜 병원체 침입시 GST-CHRK-K 융합단백질을 높이 발현시키고자 하였다. 이 융합유전자를 형질전환 벡터인 pMBP1에 클로닝하여 Agrobacteria로 도입시켜 식물체형질전환에 이용하였다. 개발 과정은 다음과 같다. 먼저 pGEX plasmid로부터 GST를 BamHI과 XbaI sites를 도입한 primer와 PWO DNA polymerase로 PCR 하였다. 이후 PCR product를 BamHI/XbaI으로 digest하여 pBluescript로 클로닝하였다. 그 결과 pBSV-GST를 제조하였다. 그 후 CHRK1 전체 cDNA를 BglIII/XhoI으로 digest하여 1.5kb DNA 절편을 얻었는데 이 절편은 kinase domain (KD)에 대응한다. 이 1.5 kb CHRK1 DNA를 위의 pBluescript-GST로 BamHI/XhoI sites를 이용하여 클로닝하여 GST-KD 융합유전자를 만들었다. GST와 KD가 in-frame fusion된 것을 CHRK1 KD 내의 primer를 이용하여 dideoxy method를 써서 sequencing 하였다. PRI promoter와의 융합을 위하여 pBSV-GST-KD 플라스미드 DNA를 NotI(Klenow)/KpnI으로 자른 뒤 2.3 kb DNA 절편을 다시 pBluescript (XhoI(Klenow)/KpnI)으로 cloning하고 이 플라스미드를 HindIII/SalI(Klenow)로 잘라 HindIII/BamHI(Klenow)로 자른 PRI promoter와 융합시켜 pBluescript-PRI-GST-KD를 얻었다. 그 후 sequence를 확인하고 pBluescript-PRI-GST-KD를 KpnI/HindIII로 잘라

그 3.9 kb PRI-GST-KD insert를 KpnI/HindIII로 자른 형질전환용 pMBP plasmid로 cloning 하였다.

## 2. 담배 형질전환 및 형질전환식물체 확인

위에서 설명한 CHRK1과 CHRK1의 변형유전자를 가진 세 종류의 형질전환벡터, pMBP1-CHRK1-myc, pMBP1-mCHRK1-myc, pMBP1-PRI-GST-KD를 Agrobacterium LBA4404로 electroporation을 이용하여 도입시켰다. 그후 가나마이신 배지에서 transformation 된 Agrobacterium을 선별한 후 이 균주를 이용하여 leaf disk를 이용한 담배의 형질 전환 및 식물체 재분화를 수행하였다. 형질전환을 확인하기 위하여 이들 형질전환식물체에서 genomic DNA를 분리하였고 nptII 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR로서 도입 유전자를 분석하여 형질전환식물체를 확인하였다. 확인된 형질전환 담배식물체의 selfing을 통하여 T1종자를 얻었다.

이들 형질전환식물체에서 genomic DNA를 분리하였고 nptII 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR로서 도입 유전자를 분석하여 형질전환식물체를 확인하였다. 여러 개체의 형질전환식물체(T0 세대)의 잎을 채취하여 TRIzol™ Reagent를 이용해서 total RNA를 추출하였다. Total RNA 50µg을 spectrophotometer를 이용하여 정량, formaldehyde gel에서 전기영동하여 Zeta-Probe Membrane에 blotting하였다. 그 membrane에 CHRK1 cDNA를 probe로 혼성화반응을 하였다. Washing 조건은 실온에서 5 min, 60 °C에서 10 min을 행했고, X-ray film에 일주일 감광하였다. WT 식물체의 CHRK1 mRNA는 잎에서 그 양이 너무 적기 때문에 거의 탐지되지 않았으며 형질전환체에서는 CHRK1 transgene transcript가 형질전환체에 따라 다른 level로 탐침되었다.

발현되는 transgene transcript가 endogenous CHRK1 mRNA의 level에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RT-PCR을 사용하였다. 확인된 형질전환식물체의 T1 세대를 얻어 가나마이신 배지에서 transgene을 갖는 식물체를 선별, 증식하여 실험에 사용하였다. CHRK1 mRNA의 endogenous level은 너무 낮기 때문에 Northern blot을 사용하지 않고 RT-PCR을 사용하였다. 먼저 형질전환체 담배(T1)들과 대조구 Xanthi의 seedling에서 total RNA를 Trizol을 이용하여 분리한 다음 5 microgram의 RNA를 poly A primer를 이용 Reverse Transcription하였다. 그중 1 microliter를 이용하여 CHRK1 유전자에 대한 CHI2 sense primer 와 CHI5 antisense primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. control로는 actin 유전자에 대한 ACT1 sense primer 와 ACT2 antisense

primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 또 다른 control로 14K 유전자 (NtDSK1 dual-specificity kinase) 발현을 test하기 위하여 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과로 CHRK1 형질전환 식물체의 CHRK1 endogenous mRNA의 양이 wild-type 감배 식물체와 비교할 때 크게 줄어든 것을 확인하였고 CHRK1 sense transgene의 발현이 endogenous 유전자의 발현을 suppression 시키는 것을 확인하였다.

### 3. CHRK1 형질전환체의 형질분석

CHRK1의 식물방어에 관련된 기능을 조사하기 위하여 wild-type Xanthi와 CHRK1 suppression 형질전환체 T1세대를 파종하여 비정상적으로 발생하는 개체는 제거하고 정상적으로 자라는 개체만을 선별하여 8-9 leaf stage까지 성장시켰다. 그후 chitin elicitor (100ppm: Sigma T-5894)를 잎에 처리하고 여러 시간 후에 그 잎을 채취하여 즉시 동결시켰다. 그 후 채취한 잎으로부터 total RNA를 분리하여 northern hybridization 실험을 행하였다. probe로는 GST (Glutathione S-transferase), PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase)과 chitinase 유전자 절편을 isotope으로 label하여 사용하였다. 그 결과 chitin elicitor 처리시의 GST, PAL, chitinase 유전자의 induction 양상이 #209, 210, 302, 304 line과 wild-type 식물체가 매우 유사하였다. 이것은 형질전환체의 chitin signaling이 wild-type과 거의 다르지 않게 수행된다는 것을 시사하며 CHRK1이 chitin signaling을 조절하는 chitin elicitor receptor가 아니라는 사실을 제시한다. 그러나 반면 #209와 #210 line의 많은 개체들이 식물발생이 제대로 이루어지지 않는 형질을 보였다. 유전자 suppression의 강도에 따라 다양한 형질을 보였는데 종자가 발아시 callus로 변하고 yellow cotyledon으로 발생되며 자라지 못하고 결국 1cm 미만의 작은 식물체로 성장이 중지되었다. tissue section 결과는 tissue specificity가 없으며 chloroplast의 발달이 정지되었고 cell division이 증가하여 세포수가 크게 증가하였다는 것을 보인다. 이 결과는 CHRK1 유전자가 suppression되었을 때 종자발아시 조직의 분화가 방해되며 대신 proliferation이 일어난다는 것을 보인다. 그중 callus들에서는 auxin-inducible 유전자의 전사가 증가하고 반면 cytokinin-inducible 유전자의 전사가 줄어 CHRK1과 auxin/cytokinin signal pathway와의 관련성을 시사하고 있다. 결론적으로 CHRK1은 chitin elicitor 신호전달이 아니라 식물발생 및 분화를 조절하는 receptor kinase 이다.

#### 가. CHRK1 형질전환체의 비정상적인 식물발생

T1 세대 종자가 발아했을 때 hormone없는 배지에서 약 20%가 캘루스로 변화한다. 캘루스는 처음은 투명하고 불규칙적인 모습으로 출발하나 시간이 지나면서 greening되고 빠르게 증식하며 곧 numerous shoot primordia를 형성하여 자란다. 이들은 kanamycin이 없는 배지에서도 같은 형질을 보인다. 또한 어떤 종자는 정상종자보다 느리게 발아하며 작고 노란색의 cotyledon을 가지며 cotyledon이 융합된 경우도 있다. 이 yellow cotyledon은 그 표면이 울퉁불퉁하며 vitrification이 일어나 있다. 며칠후 초록색의 점들이 노란 cotyledon에 나타나기 시작하며 (variegation) 식물의 키 성장이 중지되며 본엽은 작고 가늘며 노랑 또는 흰색을 띤다. 이러한 비정상적인 잎이 불규칙적으로 생성되며 2-3 cm 미만의 식물체로 죽는 경우도 있고 apical dominance가 없어져 bush같은 모습을 한 비정상적인 yellow/white 식물체로 발생하는 경우도 있다. 이러한 식물체는 뿌리에 캘루스를 자주 형성하여 역시 세포의 dedifferentiation과 proliferation이 증가되는 것을 보인다. shooty callus에서 분리된 각각의 shoot은 호르몬이 없는 배지에서 apical dominance가 없어진 bush같은 모습의 vitrified 식물체로 자란다. 오직 25-30%의 T1식물체가 이러한 mutant 형질을 나타내며 나머지는 정상적으로 발생한다. 그러나 이런 wild-type sibling이 성체가 되어 개화될 때 많은 식물체의 꽃발달이 비정상적이었다. 꽃 기관의 발달이 비정상적이고 꽃기관 사이의 융합도 일어난다. 또한 stem에서 꽃이 분화되기도 한다.

#### 나. 종자발아 시 dedifferentiation과 cell proliferation이 증가

형질전환 line의 종자를 해부하였을 때 wild-type 담배종자와 형태학상으로 매우 유사하였고 propidium iodide로 염색한 뒤 confocal microscopy로 검사하였을 때 세포수와 세포의 나열양상등이 매우 유사하였다. 그러므로 성숙한 종자시기까지는 형질전환체에 이상이 없으나 종자발아시 비정상적인 형질이 나타나는 것으로 생각된다. 210 line의 경우 종자 발아시 radicle protrusion은 일어나나 곧 발아가 중지되며 root hair 형성은 일어나지 않는다. 그 상태에서 해부하였을 때 wild-type 종자 발아 시와는 달리 embryo의 발생이 중지되어 있으며 endosperm을 사용하지 못하여 여전히 endosperm이 cotyledon 부분을 싸고 있어 cotyledon이 갈변하여 죽는다. 특히 cotyledon과 radicle 사이의 중간부분이 퇴화하였다. 반면 wild-type은 발아시 embryo가 빠르게 성장하며 분화하게 된다. endosperm은 완전히 이용되며 shoot apex는 cotyledon으로 분화하여 녹색을 띄게되며 chloroplast 발생도 왕성하다. Root

hair도 왕성하게 형성된다. 즉 비정상적인 배아는 embryo 발생은 정상으로 진행되어 성숙된 종자상태에서는 그 차이가 발견되지 않으나 종자발아 중 발생과 분화가 중지된 상태에서 vitrification이 일어나며 세포가 팽창하며 미분화된 캘러스를 형성하여 자라게 된다. 담배는 embryo 발생이 torpedo stage까지만 일어나고 종자성숙이 일어나며 종자발아시 cotyledon stage로의 발생이 일어난다. 그러므로 CHR1 유전자는 종자발아 시 진행되는 마지막 시기의 embryo 발생을 조절한다고 할 수 있다.

#### 다. CHR1의 종자발아 시 발현 양상

CHR1 유전자는 종자발아시와 종자발생 중 발현되는 유전자이다. CHR1 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 종자발아시 여러시기 (2-7 days imbibition)와 수분후 종자발생 시 여러 시기 (0-7 days after pollination)에서 RNA를 분리하여 CHR1 cDNA를 probe로 사용하여 northern blot analysis를 수행하였다. 그 결과 imbibition 2일째 CHR1 mRNA가 높게 발현되었으며 수분되지 않은 ovary와 수분 직후 mRNA level이 높았다.

라. Cell proliferation의 증가와 cell specificity 감소 및 비정상적인 엽록체 발달 wild-type과 209번 식물체의 cotyledon과 hypocotyl을 section하여 light microscope로 관찰하였다. wild-type은 cell layer가 뚜렷하여 cell specificity가 유지되는 것을 보였으나 #209 line은 cell layer 없고 세포의 크기가 작으며 그 수가 훨씬 많은 형질을 보였다. 또한 cotyledon section을 Transmission electron microscope으로 관찰하였을 때 wild-type은 tylakoid membrane stacking이 잘 보이는 초생달 모양의 엽록체가 관찰 되었으나 209번과 210번은 chloroplast의 발달이 비정상적이어서 그 크기가 작고 thylakoid membrane stacking이 거의 관찰되지 않았다.

#### 마. CHR1 형질전환체의 embryogenesis는 정상

wild-type, 209번, 210번의 성숙한 종자로부터 해부한 embryo는 propidium iodide로 염색한 뒤 confocal microscopy로 검사하였을 때 embryo내의 핵의 수와 핵의 나열양상등이 매우 유사하였다. 즉 성숙된 종자 시기까지는 embryogenesis가 정상적으로 일어난다.

#### 바. apical dominance의 breakdown과 비정상적인 꽃발생

CHR1 형질전환 식물체는 T0와 T1 세대에 걸쳐 apical dominance가 크게 약해져서 곁가지가 많이 생성되어 bush phenotype을 보인다. 꽃의 발생도 비정상적이어서 꽃이

stem에 발생하며 꽃기관의 융합, 여러 꽃의 융합 등이 일어난다.

사. 비정상적인 skotomorphogenesis

CHRK1 형질전환 식물체의 skotomorphogenesis를 연구하였다. Arabidopsis와 토마토등은 암상태에서 성장할 때 배지에 cytokinin이 존재할 때 부분적으로 deetioltation이 되어 hypocotyl elongation이 방해되며 cotyledon opening, radial expansion등이 일어난다. 담배 seedling에서도 그같은 현상이 일어나는데 cytokinin 양을 늘려가며 암상태에서 기를 때 점점 hypocotyl 길이가 짧아지고 뚱뚱해진다. 그러나 형질전환체는 cytokinin 없는 배지에서도 deetioltation이 일어나서 hypocotyl elongation이 방해되며 cotyledon opening, radial expansion등이 일어난다. 이런 현상들은 형질전환체들이 cytokinin phenotype을 cytokinin 없이 보인다는 것을 의미하며 세포내 cytokinin level 증가나 cytokinin signaling 증가를 시사하고 있다. hypocotyl section의 결과는 cytokinin 처리시 세포의 expansion이 사실적으로 일어난다는 것을 보여준다. 형질전환체는 cytokinin 없는 배지에서 cell expansion을 보이나 cell number도 증가하며 random한 location을 보인다.

아. 암상태에서 키운 식물체의 chloroplast degeneration

또한 암상태에서 자랐을 때 deetioltation된 CHRK1 seedling은 chloroplast 발생도 매우 다르다. 암상태에서 키운 seedling의 cotyledon section을 transmission electron microscope로 관찰하였다. wild-type은 MS 배지에서 자랐을 때 prolamellar body를 가진 etioplast를 보이나 cytokinin 배지에서 키울 때는 부분적으로 발달한 chloroplast를 보인다. 반면 CHRK1 deetioltation된 식물체는 chloroplast가 분해되는 현상을 보이고 많은 storage vacuole이 관찰된다. 많은 storage vacuole이 축적되는 현상은 cytokinin 배지에서 자란 wild-type 식물체에서도 관찰되는 현상으로 이 실험에서도 역시 CHRK1 형질전환체가 cytokinin phenotype을 cytokinin 없이 보인다는 것을 알수있다.

자. 여러 농도의 auxin/cytokinin 배지에서의 organogenesis

cytokinin은 tissue culture 실험에서 shoot 발생을 촉진시키고 root 발생을 억제하는 것이 잘 알려져 있다. CHRK1과 cytokinin 관련성을 좀더 연구하기 위하여 여러 농도의 auxin (IAA)와 cytokinin (BA) 배지에서 hypocotyl segment의 organogenesis를 관찰하였다. 결론적으로 wild-type (A)에 비하여 CHRK1 형질전환체는 어느 combination의 배지에서도 shoot formation이 촉진된다는 것이다. 더욱이 #210의 경우는 전혀 hormone이 없는 상태에서 shooting이 일어난다. 담배의 경우는 tissue segment의 orga

nogenesis에 hormone이 절대적으로 필요하여 CHRK1 형질전환체가 hormone에 독립적으로 organogenesis가 일어난다는 것을 보인다.

#### 차. cytokinin measurement

세포 내 cytokinin의 양을 측정하기 위하여 다양한 form의 cytokinin에 반응하는 antibody를 사용하여 ELISA 방법으로 cytokinin 양을 측정하였다. wild-type에 비하여 #209 line은 모든 종류의 cytokinin을 3-5배 함유하고 있었고 #210 line은 trans-zeatinriboside-5'-monophosphate를 특히 높게 함유하고 있었다. 그러나 ethylene 양은 같은 시기에서 잦을 때 wild-type, #209, #210 line에서 큰 차이는 나지 않았다. 이 결과는 CHRK1 발현이 suppression 되었을 때 세포 내 cytokinin 함량이 증가함을 알 수 있다.

#### 카. cytokinin 고농도 배지 위에서의 식물체 반응

고농도 cytokinin (100 microM BA) 함유 배지에서 적은 수의 wild-type seedling은 캘러스화 하며 그 모습은 CHRK1 형질전환체의 캘러스와 유사하다. CHRK1 형질전환체는 고농도 cytokinin (100 microM BA) 함유 배지에서 massive shoot proliferation이 일어난다. 즉 cytokinin에 대하여 과장된 반응을 보인다.

#### 타. 정상적인 cytokinin sensitivity

형질전환식물체의 cytokinin에 대한 sensitivity를 조사하기 위하여 Root elongation assay를 통하여 여러 농도의 BA에서 root elongation inhibition을 조사하였다. BA 농도는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 microM이다. 각 농도에서의 식물체 모습 변화와 root length를 plot한 것이 그림 17이다. 그림 17에 의하면 cytokinin의 농도가 증가하면서 식물생육이 비정상적으로 진행되며 뿌리의 발육이 크게 저해받는 것을 알 수 있다. 그러나 wild-type과 CHRK1 형질전환체 (#201, #201, #205, #209, #210) 간의 root elongation inhibition의 정도는 크게 차이나지 않았다. 즉 cytokinin에 대한 sensitivity는 wild-type과 같았다.

#### 파. 정상적인 auxin sensitivity

형질전환식물체의 auxin에 대한 sensitivity를 조사하기 위하여 Root elongation assay를 통하여 여러 농도의 IAA에서 root elongation inhibition을 조사하였다. IAA 농도는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 microM이다. 각 농도에서의 식물체 모습 변화와 root length를 plot한 것이 그림 18이다. 그림 18에 의하면 auxin의 농도가 증



가하면서 식물생육이 비정상적으로 진행되며 뿌리의 발육이 크게 저해받는 것을 알 수 있다. 그러나 wild-type과 CHRK1 형질전환체 (#201, #201, #205, #209, #210) 간의 root elongation inhibition의 정도는 크게 차이하지 않았다. 즉 CHRK1 형질전환체의 auxin에 대한 sensitivity는 wild-type과 같았다.

하. CHRK1 캘러스와 tobacco genetic tumor의 유사성

CHRK1 캘러스는 1) shooty callus, 2) hormone-autonomous organogenesis, 3) gene expression profile 면에서 tobacco genetic tumor와 유사하다. tobacco genetic tumour는 Nicotiana species 간의 교잡으로 만들어진 hybrid 식물체에서 발생하는데 parent와는 달리 tissue부터 호르몬 없이 organogenesis가 일어나 tumour처럼 성장하는 특징을 가진다. tumour에 높이 발현되는 유전자는 주로 defense에 관련된 PR gene 이고 tumor-related gene 들의 발현도 높다. CHRK1 캘러스의 gene expression 양상을 PCR subtractive cloning과 northern blot analysis로 조사하였다. 그림에서 보듯이 osmotin, beta-glucosidase, glycine-rich protein, proteinase inhibitor 등 Pathogenesis-Related 유전자들이 #210, #203 callus에서 높이 발현되며 그의 transcription factor들, tumor-related gene과 embryo에서 많이 발현되는 유전자들이 발현된다. 이러한 양상은 tobacco genetic tumour의 gene expression과 매우 유사한 양상이다. 그러므로 CHRK1은 tobacco genetic tumour의 형성에 직 간접적으로 영향을 미치지도 모른다. CHRK1 callus는 PR gene이 높이 발현되고 있으며 cell death가 빠르게 진행되고 있다. CHRK1 캘러스를 죽는 세포를 연색할 수 있는 Evans Blue로 staining하였을 때 #210, #203 callus는 짙게 염색 되므로서 callus에서 cell death가 진행된다는 것을 증명하였다. 반면 이들 callus는 매우 빠르게 호르몬 없는 배지에서 증식하여 높은 cell division을 보인다. homeobox 유전자들은 shoot meristem 등 cell division이 높게 일어나는 tissue에서 특이적으로 발현되는 유전자로 알려져 있다. 세 개의 tobacco homeobox gene의 발현양상을 조사하였을 때 NTH15, NTH20, NTH23 모두 캘러스에서 발현되며 특히 NTH15이 높게 발현된다. 이 사실은 CHRK1 callus line은 rapid cell proliferation과 cell death가 동시에 진행된다는 것을 알 수 있다.

☆ 결론적으로 CHRK1 suppression mutant는 세포분열이 촉진되었고 세포분화가 감소되어 식물이 비정상적으로 발생되며 세포 내 cytokinin의 양이 크게 증가되었다. 이 사실은 CHRK1의 정상적인 세포내 기능은 세포분열을 control 하므로서 세포가 proliferation에서 differentiation으로 넘어가는 것을 촉진하고 조절하는 것을 시사

하고 있다. suppression line 외 CHRK1 overexpressing line (35S-CHRK1-myc)과 PR1 promoter에 의해 조절되는 PR1-GST-CHRK-K expression line들은 T0, T1, T2 세대에 크게 비정상적인 형질은 없었으며 병저항성의 증가도 보이지 않았다. CHRK1 과대발현 형질전환체들 중 몇 line은 키생장이 부분적으로 저해되고 잎의 형태가 작고 길쭉하였다. 이 현상의 분자적 기작에 관하여 현재 연구가 진행 중이다.

#### 4. 연구결과의 활용에 관한 건의

##### 가. 본 연구의 논문 및 특허 결과물

1) *Youn Sung Kim, Gyeong Mee Yoon, Hye Sun Cho, Sung-Hwan Park, Mi Chung Suh, Hyun Jung Ha, Jang Ryol Liu, Hyun-Sook Pai\**. (2000) CHRK1 Receptor-Like Kinase Contains a Chitinase-Related Sequence in the Extracellular Domain. *Plant Physiology* 123: 905-915.

2) *Jeong Hee Lee, Hye Sun Cho, Do Myung Kim, Hitoshi Sakakibara, Yong Pyo Lim, and Hyun-Sook Pai\**. (2001) CHRK1 controls cell proliferation and differentiation, and regulates cytokinin level in tobacco. Will be submitted to *Plant Cell*.

3) 키틴결합능이 있는 새로운 수용체 키나제, 그 유전자 및 그의 용도.  
국내특허 출원 99-4938 (1999). 배현숙, 유장렬, 김운성, 조혜선

4) A novel chitin-binding receptor kinase and the gene thereof.  
미국특허 출원 09/503,922 (2000). 배현숙, 유장렬, 김운성, 조혜선

나. 본 과제의 연구결과로 CHRK1 receptor kinase의 정상적인 세포내 기능이 세포분열을 control 하므로써 세포가 proliferation에서 differentiation으로 넘어가는 것을 촉진하고 조절하는 것을 밝혔다. 이 결과는 CHRK1 Receptor kinase 유전자의 생체 내에서의 작용기작 및 기능을 밝힘으로써 동 분야 연구의 국제적인 우위를 확보한 학문적 발견이다. 즉 반대되는 pathway인 식물세포의 분열과 분화가 CHRK1에 의해 control되며 그러한 작용이 CHRK1을 통하여 식물호르몬인 cytokinin과 연결되어 있다

는 것을 밝힌 결과이다. 또한 CHRK1 형질전환체가 보이는 shooty callus는 1980-1990년대 많이 연구되었던 tobacco genetic tumour와 shooty morphology, hormone-autonomous organogenesis, gene expression profile에서 매우 유사하여 CHRK1 유전자가 tobacco genetic tumour formation의 genetic factor로 작용할 가능성을 강력히 시사하고 있다. 이 가능성을 뒷받침하며 tumour line에서 발현되는 CHRK1 유전자는 splicing이 비정상적으로 일어나서 CHRK1 단백질 합성에 premature termination이 유도되어 truncated protein을 만든다. 즉 정상적인 CHRK1 단백질의 합성이 일어나지 않는다. 또한 이 연구결과의 흥미로운 발견 중의 하나는 형질전환체가 cell death와 cell proliferation을 동시에 보인다는 것이다. CHRK1 callus는 cell death시 발현되는 PR gene들을 높이 발현하며 죽는 세포를 선택적으로 염색시키는 Evans Blue에 염색되고, 동시에 여러 tobacco homeobox 유전자들을 높이 발현시키는 현상을 보인다. 그러므로 CHRK1 유전자가 매개하는 신호전달의 분자적 기작에 관하여 심도있게 연구함으로써 식물세포에서 cell death와 cell proliferation activity가 서로 어떻게 연관되어 조절되는가 하는 의문점을 밝힐 수 있을 것으로 생각되고 식물생장 조절작용의 이해를 도울 수 있으리라 사료된다.

다. CHRK1 캘러스는 hormone-autonomous하게 빠르게 자라는 캘러스로서 조직배양을 이용한 신물질 생산 등의 용도에 유용하리라 생각된다. 배지에 auxin, cytokinin등의 호르몬 첨가가 불필요할 뿐 아니라 매우 증식속도가 빨라 많은 양의 캘러스를 확보해야 하는 대량배양에 적합하다.

라. 주곡 작물인 벼를 대상으로 receptor kinase 유전자를 도입하였고 안정적으로 후대까지 발현시키는 방법을 확립하여 작물 형질전환 기술을 개선하였고 타 작물에 응용할 수 있는 토대를 마련하였다.

# SUMMARY

## I. Subject

Development of fungal pathogen-resistant rice by activating plant defense mechanisms

## II. Objective and Significance

Plant receptor-like kinases (RLK) play a fundamental role in various cellular processes, including hormone signaling (Ecker, 1995; Li and Chory, 1997), self-incompatibility (Nasrallah et al., 1994), regulation of plant development (Becraft et al., 1996; Clark et al., 1997; Jinn et al., 2000; Lee et al., 1996; Lee et al., 1997), and plant-pathogen interactions (Martin et al., 1993; Song et al., 1995). Plant RLKs show variations in their structure, especially in the extracellular domain, which probably enable them to selectively respond to diverse extracellular signals (Clark, 1996; Lease et al., 1998).

Various biochemical studies (Dixon et al., 1994; Suzuki and Shinshi, 1995) and recent cloning of resistance (R) genes (Martin et al., 1993; Song et al., 1995), such as *Pto* (encoding a Ser/Thr kinase) and *Xa21* (encoding a receptor-like kinase), indicate the central role of protein phosphorylation in pathogen signaling. R genes are thought to encode receptors which interact with race-specific elicitors as ligands. When the signal is perceived, R gene products activate a wide array of defense responses which result in highly effective disease resistance. Non-race-specific elicitors, such as oligosaccharides, peptides, and glycoproteins released from fungal or plant cell walls, also induce various biochemical responses which slow pathogen growth but often are not as effective as R gene-mediated responses in blocking disease (Bent, 1996). However, non-race-specific elicitors induce defense reactions against a broad spectrum of pathogens, in contrast to R-gene mediated

responses. Although molecular basis of signal transduction via non-race-specific elicitors is poorly understood, various studies have suggested that a specific receptor is involved in perceiving and transducing the signal (Benhamou, 1996).

High affinity binding sites for non-race-specific elicitors have been identified in membrane preparations of several plant species. Soybean root cells contained a high affinity binding protein for hepta-b-glucoside (Cheong and Hahn, 1991), and recently Umemoto et al. (1997) isolated a b-glucan-elicitor-binding protein from soybean root cells. This protein showed homology to three proteins from yeast, the functions of which are unknown. Chitin oligosaccharides also induce various defense responses, including the oxidative burst, phosphorylation of specific proteins, phytoalexin biosynthesis, and transcriptional activation of defense genes (Benhamou, 1996). High affinity binding sites for the chitin elicitor were found in both rice and tomato suspension cultured cells (Shibuya et al., 1993; Baureithel et al., 1994), and a 75 kDa protein which binds to the N-acetylchitooligosaccharide elicitor has been identified in rice using affinity labeling (Ito et al., 1997). Molecular characterization of the protein should be performed in order to understand the significance of its binding to the chitin elicitor and its biological function.

Tobacco CHRK1 is a unique RTK containing an extracellular domain that is closely related to the class V chitinase of tobacco and microbial chitinases (Kim et al., 2000). In the plant and animal database including total 610 RTKs in the Arabidopsis genome, no single RTK has been found to contain the chitinase-like sequence except CHRK1. The chitinase-like domain of CHRK1 lacked the essential Glu residue required for chitinase activity, and indeed the recombinant chitinase-like domain did not show any catalytic activity for either oligomeric or polymeric chitin substrates. However the extracellular chitinase domain of CHRK1 had the ability to bind both chitin oligomers and polymers suggesting that the chitin fragments may be the natural ligand of CHRK1, and a possible function of this protein is a receptor for the chitin

oligosaccharide signal. CHRK1 was detected in membrane fractions of tobacco BY2 cells. CHRK1-GFP fusion protein was localized in plasma membranes when it was expressed in animal cells (Kim et al., 2000).

In this study, we have investigated the function of *CHRK1* by generating various transgenic lines: a CHRK1-suppression line, a CHRK1 mutant-overexpression line, and CHRK1-kinase domain-overexpression line. In the CHRK1-suppression line, transgenic plants produced segregants with a distinct phenotype that involved callus formation from seeds, severely altered plant development, and abnormal chloroplast development. The phenotype was stably inherited into the T2 generation of the transgenic lines containing the sense *CHRK1* construct. Phenotypes of these transgenic plants indicate that CHRK1 is involved in the signal transduction regulating cell proliferation and differentiation. Furthermore, these lines contained higher level of various forms of cytokinin, and exhibited typical cytokinin responses in the absence of cytokinin. In contrast, CHRK1 mutant-overexpression line (CaMV35S promoter) and CHRK1-kinase domain-overexpression line (PR1 promoter) did not show any morphological abnormalities as shown in the suppression lines, except slightly shorter stature and elongated leaves. Any changes in their response to pathogens are currently under study. In addition, we have generated transgenic rice expressing various CHRK1 transgenes in collaboration with DR. Kim Jukon (Myungji University). The promoters and vectors were selected to maximize the transformation efficiency and transgene expression in rice. The resulting transgenic rice did not exhibit visibly abnormal morphological phenotypes, and investigating their responses to fungal pathogen are currently under progress.

### III. Contents and Scope of Research

1. Construction of three plant expression vectors containing CHRK1 transgenes.
2. Generation of three types of CHRK1 transgenic tobacco lines: a CHRK1-suppression line, a CHRK1-overexpressing line, and CHRK1-kinase domain-

overexpression line.

3. Molecular characterization of CHRK1 transgene-inducing phenotypes in transgenic tobacco
4. Generation of transgenic rice lines expressing CHRK1 transgenes (in collaboration with Myungji University)

#### IV. Results and Recommendation

##### 1. Construction of three plant expression vectors containing CHRK1 transgenes

We constructed three types of plant expression vectors, pMBP1-35S-CHRK1-myc, pMBP1-35S-mCHRK1-myc, and pMBP1-PRI-GST-KD to generate a CHRK1-overexpressing line, CHRK1-suppression line, and a CHRK1-kinase domain-overexpression line, respectively. All of the transgenes were tagged with Myc sequence for detection, and mCHRK1 carried a mutation in the essential ATP-binding site (Lys449 to Asn) in the kinase domain. The mutation in the ATP binding site abolished the autophosphorylating activity of CHRK1 *in vitro* (Kim et al., 2000). The KD contains the 1.2 kb *CHRK1* cDNA corresponding to the CHRK1 kinase domain. Either CaMV35S promoter or PRI promoter were used to drive the expression of the transgenes. Transgenic tobacco plants were regenerated after *Agrobacterium*-mediated transformation.

##### 2. Generation of three kinds of transgenic tobacco plants expressing the *CHRK1* constructs

Transgenic plants were selected on the basis of kanamycin resistance and transferred into the greenhouse. The presence of the transgene was tested by PCR and genomic Southern analysis. By selfing, T1 generation and T2 generation were obtained. The transgene transcripts were detected in the T0 transgenic plants and T1 seedlings in RNA gel blot analysis. The corresponding protein was

detected in Western blot analyses with the Myc antibody using total protein extracts. The steady-state level of the endogenous *CHRK1* mRNA was detected using RT-PCR. The transcript level of actin was measured as a control.

### 3. Molecular characterization of *CHRK1* transgene-inducing phenotypes in transgenic tobacco

#### A. Transgenic *CHRK1*-suppression line exhibited pleiotrophic defects during early seedling development

One of the aberrant phenotype in the transgenic line was callus formation during seed germination, most notably in #210 line in which more than 30 % of seeds turned to callus. During germination, radicles protruded from the seeds but germination did not progress further. The embryo then started to dedifferentiate and proliferate to form callus on hormone-free medium within two weeks. These calli became green, grew rapidly on hormone-free media in contrast to wild type tobacco calli that require auxin and cytokinin for growth, and generated numerous shoot primordia and shoot-like structures, which could be propagated more than two years up to now on the hormone-free medium. These shoots were able to form abnormal vitrified shooty plants with limited root development that are similar to the tobacco genetic tumor, as shown in Figure 2K. The transgenic callus that did not go through greening process died within a month.

In addition to callus formation, transgenic lines exhibited severely deformed plants. Germinated seedlings had yellow or variegated cotyledons with rough vitrified surfaces. True leaves were narrow and whitish, and they were formed in the anarchic fashion. Root development was also affected; the abnormal plants developed the primary root that was shorter than that of control with no or rare secondary roots. These abnormal seedlings exhibited hyperplasia, forming callus in roots, on the hormone-free medium. Plant growth was mostly arrested in early stages of plant development, but some of the seedlings grew to become bushy plants with numerous shoot formation and little



chlorophyll accumulation, although these plants could not survive in the soil. The morphology of the bushy plants was similar to that of the vitrified shooty plants originated from the transgenic calli. Additionally, some transgenic seedlings displayed variable phenotypes with cotyledon shapes and numbers ranging from one to four.

The #210 T0 plant exhibited outgrowth of axillary buds during vegetative growth, while other T0 plants including #209 and #203 lines showed lateral bud growth after onset of flowering. In addition, the #210 T0 plant formed a single flower-like structure on the stem, which consists of deformed sepals, stamens, pistils but no petals, and developed a single fused flower with very short flower stem at the terminus of most branches. Normal-looking siblings of #210, #209, and #203 lines at T1 and T2 generation also exhibited abnormal flowers with fused floral organs and short flower stems, similar to the flowers of the #210 T0 plant.

#### B. Ectopic cell proliferation and abnormal chloroplast development in transgenic seedlings

Transverse sections revealed ectopic cell proliferation and loss of cell specificity in cotyledons and hypocotyls of #209 and #203 lines in contrast to the control plants. The mutant cotyledons contained increased numbers of cells that are randomly positioned, and lacked defined cell layers. Transverse sections of hypocotyls of the transgenic seedlings also showed disorganized cell layers and increased cell numbers in contrast to control hypocotyls.

Transmission electron microscopy of cotyledon sections was carried out to examine chloroplast development in control and transgenic plants. Control seedlings germinated in the light developed crescent-shaped chloroplasts with stacked thylakoid membranes. The transgenic seedlings grown in the light had green and white/yellow sectors in cotyledons and true leaves. While cells in the green sectors contained morphologically normal chloroplasts, cells in the white and yellow sectors contained abnormal chloroplasts with irregular shapes, which appeared to be degenerating. The transgenic shooty callus also contains

irregular-shaped chloroplasts with little thylakoid membrane stacking. Hypocotyl sections of the abnormal seedlings showed round chloroplasts with large starch granules in contrast to control.

#### C. Cell division and differentiation during seed germination was defective in *CHRK1* transgenic plants

Embryos of the transgenic lines were examined by light microscopy and confocal scanning microscopy to determine whether cellular differentiation during embryogenesis was interfered. When embryos were removed from mature seeds and examined under a light microscopy, none of the embryos from the #203, #209, and #210 lines examined exhibited morphological abnormality compared with control embryos. Consistent with the results, confocal microscopy of propidium iodide-stained embryos of the transgenic lines showed no detectable abnormality in general morphology and nuclear arrangement.

However, during seed germination, the endosperm could not be utilized, and the apical domain of the embryo including cotyledon and shoot apex became degenerated in the #210 line that produced mostly shooty callus. Then the basal domain of the abnormal embryo, especially in the axis region, started to dedifferentiate and proliferate to form callus in variable morphology on hormone-free medium within two weeks. These results suggest that developmental defects of the transgenic seedlings are mainly caused by abnormal division and differentiation of the embryos during seed germination.

#### D. *CHRK1* gene expression during seed germination and early seed development

We previously characterized the temporal and spatial expression of the *CHRK1* gene during plant growth (Kim et al., 2000). The *CHRK1* transcripts were detected in most plant tissues, although the level was low in roots, stems and mature leaves. The *CHRK1* mRNA level was relatively high in flowers, particularly in open flower stages (Kim et al., 2000). Here we detected the *CHRK1* gene expression during seed germination and early stage of seed development. During seed germination, the *CHRK1* mRNA level was higher at 2 days

of water imbibition than at 3-7 days of water imbibition. Just before anthesis the ovaries contained a relatively high level of *CHRK1* mRNA. After initial increase at 1 day after pollination (DAP), the *CHRK1* level decreased from 3 DAP to a barely detectable level at 7 DAP. The *NtDSK1* encoding a chloroplast-localized dual-specificity kinase (Cho et al., 2001) and actin genes, as controls, exhibited different expression patterns upon pollination.

E. Shoot formation from hypocotyl segments of the transgenic seedlings in the absence of hormone

Pleiotropic phenotypes displayed by the transgenic plants, including stimulated shoot formation, elevated cell proliferation, and anarchic bushy growth, indicate a possibility that *CHRK1* gene function may be related with cytokinin response. Indeed high concentration of cytokinin caused increasing hypertrophy in both control and transgenic seedlings. After 3 weeks in culture in the presence of 100 mM of BA, a small number of control seeds developed vitreous calli, phenotypically resembling transgenic callus at the initial stage, while most seeds developed seedlings with short hypocotyls, little roots, and a few stunted chlorotic leaves. In the transgenic lines, calli were formed from seeds in higher frequency in the presence of 100 mM BA than in the absence of the hormone. Although both control and transgenic calli generated shoots with prolonged incubation, proliferation of the shoots in the control lines was limited in the medium containing cytokinin. In contrast, transgenic shoots proliferated vigorously to form large shoot mass. Thus high concentration of cytokinin could induce the phenotype in control plants, which partially mimics the phenotype of the transgenic plants.

Shoot induction from callus is a well-known effect of cytokinin. Other cytokinin responses in tissue culture include stimulation of cell proliferation, chloroplast development, and inhibition of formation of root primordia. To probe the relationship of the *CHRK1* phenotype with cytokinin, we compared the regeneration of organs from hypocotyl segments of control and transgenic seedlings in the medium containing various concentrations of IAA and

BA. For transgenic lines, kanamycin-resistant normal-looking seedlings were used as a source of hypocotyls. In the absence of any exogenous hormone, hypocotyl segments from control seedlings and transgenic seedlings mostly developed no organ regeneration, except that 21.4% of #210 hypocotyls formed shoots. Regardless of auxin concentration, increasing concentration of BA generally resulted in increasing formation of shoots in both control and transgenic lines. However when cytokinin concentration reached 1000 mg/L, organogenesis was rather inhibited, more severely in the transgenic lines, especially in the lower range of auxin concentration (0 or 10 mg/L). In general, compared with the control, all three transgenic lines exhibited enhanced shoot formation and reduced root formation. We found that hypocotyls from #201 seedlings that do not show any abnormal plant development exhibited similar patterns of organogenesis to that of control in response to IAA and BA. Skoog and Miller (1957) previously reported that high auxin-to-cytokinin ratio leads to root formation, while a low auxin-to-cytokinin ratio favors shoot formation during callus growth *in vitro*. However, we found that organogenesis of hypocotyl segments was not solely determined by the ratio between two hormones. The actual amount of the hormone was also important for fate determination. These results showed that transgenic hypocotyls required no cytokinin, or lower levels of cytokinin for shoot regeneration than the control, implicating of enhanced cytokinin level and/or signal transduction, or enhanced tissue sensitivity to hormone in the transgenic plants.

#### F. Normal sensitivity to auxin and cytokinin

Dose-response experiments in the presence of increasing concentrations of BA (from 0 to 100 mM) showed that the mutant phenotypes of #203, #209 and #210 lines were persistent in all of the concentrations of BA tested. Increasing concentration of cytokinin resulted in increasing inhibition of primary root growth in both control and transgenic plants to the similar degree, suggesting that transgenic seedlings have normal sensitivity to cytokinin. Since cytokinin response is closely related with auxin response, the effect of exogenous auxin

application was analyzed in the presence of increasing concentrations of IAA (from 0 mM to 100 mM). Inhibition of root growth by increasing concentration of auxin was virtually identical in the control and transgenic plants, and the mutant phenotypes of the transgenic plants were persistent in all the auxin concentrations tested. Furthermore, in contrast to the results in the presence of cytokinin, high concentration of auxin neither induced calli in the control seeds nor increased the frequency of callus formation in the transgenic plants. Thus the transgenic plants apparently showed normal responses to auxin.

ABA, GA, brassinosteroid, and ethylene could neither mimic the phenotype of *CHRK1* transgenic plants when applied to the control, nor restore the wild-type phenotype when treated to the transgenic plants, suggesting that the *CHRK1* mutants are not deficient in the ability to synthesize these hormones. In the presence of ABA (50 mM), none of the seeds tested germinated, suggesting that these seeds were sensitive to ABA. GA (5 mM) and brassinosteroid (1 mM) induced an elongation of the hypocotyls, and ethylene (30 mM) caused radial swelling and inhibition of hypocotyl elongation in control and transgenic lines in compatible degrees, suggesting that the transgenic seedlings, both normal and abnormal siblings, are not insensitive to these hormones.

G. The transgenic seedlings showed de-etiolated phenotypes in the dark. Cytokinin induces the de-etiolation response, such as inhibition of hypocotyl elongation and cotyledon opening, in dark-grown *Arabidopsis* seedlings, which are similar to those caused by ethylene (Lieberman, 1979) and light (Chory et al., 1994). Cytokinin also affects hypocotyl length and root length of etiolated seedlings in tomato (Coenen and Lomax, 1998). Dark-grown control tobacco seedlings also exhibited de-etiolation phenotype on medium containing cytokinin. The hypocotyl and root length was increasingly shorter with increasing concentrations of BA up to 100 mM. From 10 mM BA, radial swelling of hypocotyls was visible. Cotyledons were expanded and open at 11 days of growth, in contrast to seedlings grown in the absence of cytokinin.

Morphology of etiolated seedlings of transgenic lines grown in hormone-free medium was examined in comparison with control. About 13-25 % of seedlings in the #203, #209, and #210 lines were significantly shorter than those of control. Furthermore, most of seedlings with short hypocotyl exhibited radial expansion and vitrification. These phenotypes are not due to the defect in growth in the transgenic plants, because all of these seedlings exhibited comparable elongation to that of the control upon GA and brassinosteroid treatments. Hypocotyl sections of de-etiolated control seedlings grown for 11 days in the presence of cytokinin (100mM) showed enlarged cells in epidermis and cortex, compared with etiolated seedlings grown in the absence of hormone. Hypocotyls of de-etiolated transgenic seedlings grown on hormone-free medium also exhibited cell enlargement, but they contained increased number of cells arranged in a disorganized manner. This increased and disorganized proliferation is consistent with the observation from cotyledon and hypocotyl sections of light-grown transgenic seedlings.

We also examined morphology of cellular organelles including plastids in dark-grown seedlings of control and transgenic lines using light and transmission electron microscopy. Figure 7J and 7N show the typical cotyledon cells and etioplasts of dark-grown tobacco seedlings on hormone-free medium. These etioplasts were mostly round and contained the prolamellar body. In contrast, cotyledonary cells of dark-grown control seedlings grown in the presence of 100 mM BA showed accumulation of a large number of small vacuoles, and changes in chloroplast morphology including formation of small starch granules inside and occasional degenerating morphology. Cotyledon cells from the short and radially-expanded transgenic seedlings grown in the absence of hormone also possessed small vacuoles, except their number was much higher than the BA-treated control plants. Furthermore, many plastids of these transgenic lines appeared to be degenerating, and these cells indeed appeared to contain less number of chloroplasts than controls. Cotyledonary cells at the beginning of hydration are characteristically packed with starch grains, protein bodies, and lipid bodies. The overall changes in cotyledonary composition reflect

breakdown of reserves and transport of the products to the embryonic axis. During the initial swelling, protein body contents become more diffuse and with protein hydrolysis the contents disappear, usually after 3-5 days (Jacobsen, 1984). The bodies become small vacuoles that coalesce to form larger vacuoles and ultimately often one large central vacuole (Jacobsen, 1984). Thus accumulation of numerous storage vacuoles in cotyledonary cells of BA-treated control suggests that high concentration of cytokinin inhibits nutrient mobilization process in the cotyledonary cells. In this aspect, the transgenic phenotype is very similar to that of BA-treated control. Yet, transgenic lines exhibited intensive chloroplast degeneration that did not happen in BA-treated control, suggesting that the transgenic effect only partially mimics cytokinin effect.

H. Transgenic shooty callus is similar to tobacco genetic tumors in its shooty morphology, hormone-autonomous growth, and gene expression profile

Tobacco genetic tumors occur spontaneously from hybrids between certain *Nicotiana* species (Ichikawa and Syono, 1991), which develops a shooty growth under aging or stress conditions. These tumor cells are able to grow in tissue culture without added auxin and cytokinin, a requirement for wild-type tobacco cells (Skoog and Miller, 1957). Genes that are expressed preferentially or specifically in the tobacco genetic tumors have been analyzed (Fujita et al., 1994). Shooty callus of the *CHRK1* transgenic plants appeared to be the phenocopy of tobacco genetic tumors in its shooty morphology and hormone-independent growth in tissue culture. We examined gene expression profile using subtractive PCR technique, by isolating cDNA fragments predominantly expressed in shooty calli from #210 line, and RNA blot analysis using those DNA fragments as probes. The shooty callus expressed many stress- and pathogen-related genes, such as osmotin, proteinase inhibitor I and II, glucan endo-1,3-beta glucosidase, PR1 protein, glycine-rich protein, chitinases, and tumor-related protein. This gene expression pattern was surprisingly similar to that of tobacco genetic tumors, in which genes for

glucan endo-1,3-beta glucosidase, PR1a protein, osmotin, proteinase inhibitor, PR1b protein, tumor-related protein, and miraculin were highly expressed (Fujita et al., 1994). Interestingly, the #210 shooty callus also expressed embryonic genes, indicating that #210 callus maintains embryonic characteristics. Thus the shooty callus closely resembled tobacco genetic tumors in morphology, hormone-autonomous behavior in tissue culture, and gene expression.

#### I. Expression of homeobox genes is altered in the transgenic plants

Overexpression of various class 1 and 2 homeobox genes resulted in alteration in leaf and flower morphology in tobacco (Sentoku et al., 1998; Tamaoki et al., 1997; Nishimura et al., 2000). The class 1 homeobox genes are believed to be essential for meristem maintenance and/or lateral organ formation. Indeed, the *Arabidopsis stm* (*shoot meristemless*) mutant failed to develop a shoot apical meristem during embryogenesis (Long et al., 1996), and overexpression of *NTH15* and *NTH20*, tobacco class 1 homeobox genes, resulted in dramatic morphological alteration with ectopic shoot formation (Nishimura et al., 2000). Furthermore overexpression of *NTH15* altered intracellular level of various hormones; particularly GAI level drastically decreased and cytokinin level increased in the transgenic tobacco. We examined expression of *NTH15* and *NTH20*, class 1 genes, and *NTH 23*, a class 2 gene, in control and abnormal transgenic plants. The shooty callus and the abnormal bush plants both of which stimulated shoot formation expressed all of the three homeobox genes in the higher level than did control plants. Thus morphological alteration by modulation of *CHRK1* gene expression altered expression level of homeobox genes in *CHRK1* transgenic plants. In addition, the shooty callus also expressed the *CycD3* mRNA in the elevated levels, compared with control and the abnormal bushy plants. *CycD3* is a cell cycle gene that regulates the G1/S transition. Its overexpression causes cytokinin-independent callus formation in *Arabidopsis* (Riou-Khamlichi et al., 1999).



여 백

# CONTENTS

Chapter 1 Introduction .....	41
Section 1 Background and Significance .....	41
1. Technological View .....	41
2. Ecological and Industrial View .....	42
3. Social and Cultural View .....	43
Section 2 Objectives and Scope of Research .....	44
1. Objective .....	44
2. Scope .....	45
Chapter 2 Construction of plant expression vectors containing CHRK1 receptor kinase derivatives .....	46
Section 1 Introduction .....	46
Section 2 Construction of CHRK1 overexpression vector .....	49
1. Cloning of pCMV-CHRK1 .....	49
2. Cloning of pMBP1-CHRK1-myc .....	50
Section 3 Construction of CHRK1 mutant-overexpression vector .....	50
1. Cloning of pCMV-mCHRK1 .....	50
2. Cloning of pMBP1-mCHRK1-myc .....	51
Section 4 Construction of CHRK1 kinase domain-overexpression vector using PR1 promoter .....	52
1. Cloning of pBluescript-GST .....	53
2. Cloning of pBluescript-GST-KD .....	53
3. Cloning of pBluescript-PR1-GST-KD .....	54
4. Cloning of pMBP1-PR1-GST-KD .....	55
Chapter 3 Generation of transgenic tobacco plants .....	57
Section 1 Introduction .....	57

Section 2 Generation of transgenic tobacco plants .....	58
1. Detection of the CHRK1 transgenes using PCR .....	58
2. Expression of transgenes in the transgenic plants .....	60
3. Downregulation of expression of the CHRK1 endogenous gene .....	61
4. Investigation on defense response of the transgenic plants .....	62
Chapter 4 Molecular characterization of CHRK1 phenotypes .....	64
Section 1 Introduction .....	64
Section 2 Phenotype characterization .....	64
1. Abnormal development of CHRK1 transgenic plants .....	64
2. Enhanced dedifferentiation and cell proliferation .....	66
3. Expression of CHRK1 mRNA during seed germination and development.....	67
4. Reduced cell specificity and abnormal chloroplast development .....	69
5. Normal embryogenesis .....	70
6. Breakdown and apical dominance and abnormal flower development .....	71
7. Abnormal skotomorphogenesis .....	71
8. Chloroplast degeneration in dark-grown transgenic seedlings .....	73
9. Organogenesis under various auxin/cytokinin content .....	74
10. Measurement of intracellular concentrations of cytokinin .....	77
11. Plant response to high concentrations of cytokinin .....	77
12. Normal sensitivity to cytokinin .....	78
13. Normal sensitivity to auxin .....	79
14. Similarity of CHRK1 callus with tobacco genetic tumor .....	80
Construction of plant expression vector containing CHRK1 derivatives and generation of transgenic rice plants .....	83
Section 1 Introduction .....	85
1. Transgenic plants carrying pathogene-resistance genes .....	85
2. Rice transformation .....	86

3. Objectives and Scope of Research .....	87
Section 2 Construction of plant expression vectors containing CHRK1 receptor kinase derivatives .....	87
1. Construction of pMJ-PC vector containing PR1 promoter .....	90
2. Checking junction point between ubi intron and GST/CHRK-K gene .....	98
3. Sequence determination of fusion point between GST and CHRK1-K .....	99
4. Construction pMJ-UC vector containing ubiquitin promoter.....	100
5. Checking junction point between ubi intron and CHRK gene .....	101
Section 3 Rice transformation of the plant expression vectors .....	103
1. Transformation of the vectors into Agrobacterium .....	103
2. Rice transformation mediated by Agrobacterium .....	104
3. Propagation of rice transgenic plants .....	107
References .....	108

여 백

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	41
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	41
1. 기술적 측면 .....	41
2. 경제산업적 측면 .....	42
3. 사회문화적 측면 .....	43
제 2 절 연구개발의 목적과 범위 .....	44
1. 연구개발의 목적 .....	44
2. 연구개발의 범위 .....	45
제 2 장 유전공학적으로 변형된 CHRK1 receptor kinase 유전자 함유 운반체 개발 .....	46
제 1 절 서설 .....	46
제 2 절 CHRK1 유전자 과대발현용 운반체 제작 .....	49
1. pCMV-CHRK1의 클로닝 .....	49
2. pMBP1-CHRK1-myc의 제조 .....	50
제 3 절 CHRK1 kinase mutant 유전자 과대발현용 운반체 제작 .....	50
1. pCMV-mCHRK1의 제조 .....	50
2. pMBP-mCHRK1-myc의 제조 .....	51
제 4 절 활성을 가지는 CHRK1 kinase domain을 병원체침입에 대응하여 과대발현하기 위한 운반체 제조 .....	52
1. pBluscript-GST의 제조 .....	53
2. pBluscript-GST-CHRK-K의 제조 .....	53
3. pBluscript-PR1-GST-KD의 제조 .....	54
4. pMBP1-PR1-GST-KD의 제조 .....	55
제 3 장 담배 형질전환 및 형질전환식물체 확인 .....	57
제 1 절 서설 .....	57

제 2 절 담배 형질전환 및 형질전환식물체 확인 .....	58
1. 형질전환식물체의 확인 .....	58
2. 담배 형질전환체 내의 도입유전자 발현 .....	60
3. transgene transcript가 endogenous CHRK1 mRNA의 level에 미치는 영향 조사 .....	61
4. 도입된 CHRK1 또는 CHRK-K 유전자의 발현으로 인한 식물의 방어기작 유도 검증 .....	62
제 4 장 CHRK1 형질전환체의 형질분석 .....	64
제 1 절 서설 .....	64
제 2 절 CHRK1 형질전환체의 형질분석 .....	64
1. CHRK1 형질전환체의 비정상적인 식물발생 .....	64
2. 종자발아 시 dedifferentiation과 cell proliferation이 증가 .....	66
3. CHRK1 mRNA의 종자발아 시 발현 양상 .....	67
4. Cell proliferaion의 증가와 cell specificity 감소 및 비정상적인 엽록체 발달 .....	69
5. CHRK1 형질전환체의 embryogenesis는 정상 .....	70
6. apical dominance의 breakdown과 비정상적인 꽃발생 .....	71
7. 비정상적인 skotomorphogenesis .....	71
8. 암상태에서 키운 식물체의 chloroplast degeneration .....	73
9. 여러 농도의 auxin/cytokinin 배지에서의 organogenesis .....	74
10. cytokinin measurement .....	77
11. cytokinin 고농도 배지 위에서의 식물체 반응 .....	77
12. 정상적인 cytokinin sensitivity .....	78
13. 정상적인 auxin sensitivity .....	79
14. CHRK1 켈러스와 tobacco genetic tumor의 유사성 .....	80
위탁과제: 벼 형질전환용 Receptor kinase 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환 .....	83
제 1 절 서설 .....	85
1. 곰팡이 병 저항성 유전자 함유 형질전환 식물체 .....	85
2. 벼 형질전환 연구 .....	86

3. 연구목표 및 내용 .....	87
제 2 절 벼 형질전환용 운반체 제작 .....	87
1. PR1a 프로모터를 이용한 CHRK-K 유전자 운반체 pMJ-PC 제작 .....	90
2. Ubi intron과 GST/CHRK-K fusion 유전자의 연결부위 확인 .....	98
3. GST와 CHRK-K fusion 부위의 염기서열 확인 .....	99
4. 항시발현 프로모터를 이용한 CHRK1 유전자 운반체 pMJ-UC 제작 및 확인 .....	100
5. Ubi intron과 CHRK 유전자의 연결부위 확인 .....	101
제 3 절 제작 운반체를 이용한 벼형질전환 .....	103
1. 제작운반체의 <i>Agrobacterium</i> 으로의 도입 .....	103
2. <i>Agrobacterium</i> 을 매개체로 한 벼 형질전환 .....	104
3. 벼 형질전환체 증식 .....	107
참고문헌 .....	108



# 여 백

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

우리 나라 벼 육종은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전재료를 보유하고 있으나 농업적으로 중요한 유전특성 (내병성, 환경저항성 등)의 유전자 분리 개발 및 품종육성은 미흡한 상태이다. 따라서 쌀을 주식으로 하는 우리 나라의 경제 및 대외 경쟁력을 고려하였을 때 기존의 우량품종에 내병성(특히 곰팡이 병 저항성)과 관련된 유전자들을 도입한 벼 품종개발로 환경친화적 농업개발이 요구된다 하겠다. 현재 전세계적으로 병충해에 의한 농업 생산성 감소는 총생산량의 36%에(James, 1996) 달하고 있으며 이중 곰팡이 병에 의한 피해는 12%를 차지하고 있다. 또한 병방제에 사용되는 농약은 전세계적으로 연간 \$27.8 billion (약 28조원)이 소요되어 막대한 비용 뿐 아니라 환경오염 및 인명에 대한 피해는 돈으로 계산하기 어려운 상황이다. 벼에 발생하는 곰팡이 병은 도열병(*Magnaporthe grisea*), 입고병(*Rhizoctonia solani*)으로 대표될 수 있는 데 이 두가지 병에 의한 피해정도는 1975-1990년 사이에 조사된 바에 의하면 전세계적으로매년 약 30%의 생산량 감소를 가져왔다(Science, 1997).

식물에 있어서는 획기적인 형질전환 기법의 확립과 함께 현재 유전공학 기술로 1997년까지 전 세계적으로 3800여종의 신형질 작물이 포장시험 실시 중이며 50여종이 이미 상품화 되었고 대부분은 4-5년 내에 실용화 될 것으로 전망된다 (James, 1997). 이러한 신형질 작물의 출현은 유전자의 확보 및 새로운 유전자의 개발에 크게 의존하고 있어 이의 관련 유용 유전자의 개발 또한 매우 시급한 당면 과제이다. 총 1000억원의 예산으로 1991년부터 시작된 일본의 10개년 벼 게놈연구는 지난 6년간의 연구결과 약 30,000개 유전자의 정보를 밝혀내었고, 2,000여개의 표지유전자를 개발하여 벼 유용 유전자의 이용개발에 선도적 역할을 수행하고 있어서 벼의 분자생물학적인 정보가 다른 주곡작물에 비해 훨씬 많이 축적되어 있다. 국내연구로는 과기처 선도기술개발과제로 수행된 벼 게놈연구에서(1994 - 1997년) 6,000개의 미속종자 발현 유전자를 개발 확보하였고 이중 400여종의 유전자의 기능이 확인되었다.

벼 형질전환에 사용되는 기술은 현재 유전자 총 (Particle Gun) 이용법이 널리 사용되고 있으며 (Kim et al, 1994) 최근에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법이 개

발되어 있고(Hiel et al, 1994) 국내에서도 이미 형질전환기술이 정착되어 있다 (Lee et al, 1998; Kim et al., 1998; Jang et al., 1998). 벼 형질전환 기술이 보급되면서, Bt toxin유전자 (Fujimoto et al, 1993) 혹은 Protenase inhibitor 유전자 (Ray Wu et al, 1994)를 이용한 내충성 벼, chitinase 유전자 도입에 의한 내병성 벼(Lin et al, 1995), RIP유전자 도입 및 제초제 저항성 벼 (Kim et al, 1998) 등이 개발되어 포장시험 중에 있다. 이와 같이 작물에 외래유전자를 도입함으로써 병 저항성, 환경친화형 품종을 개발하여 이용하는 방법은 기존의 방법보다 비용이 적게 들고, 농업생산성을 극대화 할 뿐 아니라 농약의 과다 사용에서 오는 환경파괴를 막는 데 크게 기여 하게 될 전망이다. 또한 유전공학 기법에 의한 벼의 신품종 개발 기술을 확보하는 것은 다른 단자엽식물체의 형질전환에 파급 효과가 매우 크다고 사료된다. 형질전환 벼가 개발되면 재래 육종법과 상호보완적인 연구가 가능하여 전통적인 육종연구의 시간과 노력의 절감에 상당히 기여 할 것으로 기대된다.

## 2. 경제·사회적 측면

쌀은 우리국민의 주식이며, 생계농이라는 특징을 가지고 있는 한국농가의 중심소득원이 되고 있다. 쌀생산은 대부분의 농촌지역의 경제를 뒷받침하는 중심산업 구실을 하고 있다. 벼농사는 고용효과면에서 국민경제에 중요한 몫을 차지하고 있는 산업부문이다. 즉 2백20만명 정도의 노동력 고용, 전체 경제활동 인구의 12% 수준이며 총 농림수산업 취업자의 65%에 해당한다. 만약, 벼농사가 포기된다면 이들 대부분이 농업숙련자이기는 하지만 대체하여 한계노동력을 고용할 수 있는 산업이 없으며 대부분 실업자가 될 것이다.

최근 국가경제 발전에 따른 국민소득 수준의 향상으로 식료품에 대한 소비자의 기호도가 다양화되고, 재배농민 또한 고소득 작물을 선호하고 상대적으로 소득이 낮은 벼농사를 기피하고 있는 실정이다. 국외적으로도 WTO체제의 출범에 따른 농·축·수산물의 수입개방화 등 여러가지 여건들이 우리 농업을 어렵게 하고 있으며 쌀시장 개방에 따른 국민 경제적 파급효과는 매우 다방면으로 진행될 것으로 예측되는데 농가소득의 지속적 감소는 결국 농업기반 상실 가능성이 있다. 또한 앞으로 예견되는 남북한 통일시대를 대비하여 주곡작물인 벼 재배에 국제경쟁력을 키우는 것은 국가의 전략 면에서도 매우 중요하여 병 저항성 신품종 개발을 통한 농민의 노동력 절감, 생산량 증대, 환경친화적 농업으로 국가경쟁력 향상 및 국가농업기반 강화를

피해야 한다.

우리나라는 자력신상품의 개발이 없고 농업자원의 개발, 육종 및 생산화가 현저히 낮다. 따라서 특정 농업상품 개발을 위하여 체계적으로 장기적인 연구계획을 세워 투자하여야 한다. 농업작물을 이용하여 고부가가치를 창출할 수 있는 고유기술의 개발가능성이 높고 첨단 농업 개발로 국제적 우위확보가 가능하다. UR 협정에 따른 농산물 시장개방으로 농업 생산성을 향상과 취약한 국내 농업 관련산업의 경쟁력 배양이 시급한 과제이다. 육종관련 기술은 국내에서 매우 미약하나 선진국과의 기술 격차를 줄이기 위해 특정 소재와 특정 작물에 집중적으로 투자하는 고부가가치 소재 위주의 기술개발 필요하다. 그리하여 개발된 특정 신기술 및 신제품에 의해 국제적인 우위를 확보하도록 노력해야 한다. 재분화 기술 및 형질전환 system 그리고 유전자 cloning 기술을 여러작물에 적용할 수 있는 방안이 확립된다면 기존의 육종방법에 의해 불가능한 작물의 신종창성이 용이해지며 단시간내에 이룩되어 종자시장의 경쟁력이 향상되는 동시에 경제성이 높아진다.

특수기능을 가지는 고부가가치 생물공학이용 농업 신상품의 개발에 따른 수출증대가 가능하며 2000년도 수출전략 품목화으로서 고부가가치 신품종개발로 인한 농업생산성 향상 및 농가소득 증대에 일익을 담당하며 농업의 차세대 산업화 가능성을 제시할수 있다. 또한 유용유전자의 확보로 미래에 분자생물학적 방법을 이용한 유용유전자 발현 작물을 손쉽게 확보할 수 있다. 세계시장의 추세에 미루어 볼 때 유전공학적 기법을 통해 재래적 육종방법으로는 불가능 했던 새로운 품종의 육종은 불가피함하므로 신품종 개발의 주도권을 확보하며 고유 브랜드를 육성하고 특성화된 작물의 우수품질 생산으로 타작물 수출에 기여할 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

우리의 식문화는 쌀을 중심으로 발전해온 쌀의 문화이며, 논농사와 쌀은 우리의 문화와 전통풍습에 중요한 역할을 해 왔다. 벼농사는 홍수를 방지하며, 수자원을 함양하고 자연환경과 국토를 관리하는 엄청난 크기의 공익적 기능도 수행하고 있다. 따라서 벼농사는 자연환경의 보존기능과 전통문화의 존속이라는 다양한 공익적 기능을 가지고 있다. 그러나 현재 우리나라는 UR로 대표되는 농수산물 수출입 시장의 전면 개방, 농촌인구의 고령화, 타산업 대비 저부가가치, 농촌생활환경의 상대적 낙후 등으로 인하여 매우 어려운 상황에 직면해 있다. 이와같이 국제화 개방화시대의 한국농업의 위

기를 효과적으로 대처하고 다가오는 21세기 선진국 시대의 농업의 위상을 정립하기 위한 방법으로 전통적인 농업생산 기술에 유전공학적 기법을 접목시키므로써 새로운 형태의 고 생산성 농업을 창출해낼 수 있을 것이다. 형질전환 식물체를 이용한 외래 유전자의 발현 및 이를 이용하여 새로운 형질을 가진 식물체를 개발하는 것은 차세대 농업의 성공여부를 좌우할 중요한 기술로 부각되고 있다. 최근의 외국농산물 수입등에 의한 안정적 소득작물의 개발이 시급한 실정에서 신품종의 농업작물이 개발된다면 그 경제성이 클 것이고 이를 통해서 UR등에 대비한 농업경쟁력 향상에 의한 농가소득 향상 및 국가경쟁력 향상이 이루어질 것이다.

우리나라의 고르지 못한 기후환경속에서 도열병 등 곰팡이 병에 의한 수도생산력 피해의 심각성을 생각할 때 병 저항성 벼 개발에 의한 경제 산업적인 효과는 짐작하기 어려울 정도로 클 것이며 환경친화적 형질전환작물의 개발은 안전한 식량공급과 생산성 제고에 크게 기여함으로써 보다 쾌적하고 안락한 생활을 가져다 줄 것으로 생각된다. 또한 막대한 양의 농약 사용에 따른 환경오염의 피해를 줄일 수 있고 농약사용에 따른 인명피해에 의한 농정 불안요인을 완화시킬 수 있다.

## 제 2 절 연구개발의 목적과 범위

### 1. 연구개발의 목적

벼에 Receptor kinase (CHRK1) 유전자와 그의 변형체 (CHRK-K)를 과량으로 안정되게 발현시킴으로서 다각적인 식물의 자기방어체계를 유도하여 도열병이나 입고병 등 곰팡이 병에 저항성을 갖는 벼를 개발하여 농업생산성을 증대시키고 농약의 과다살포를 줄임으로서 환경보호 뿐 아니라 농민의 건강을 증진시키는 품종을 유전공학적인 방법으로 육종하고자 한다. 또한 Receptor kinase 유도 병 저항성 기작 및 식물의 자기방어 메카니즘을 형질전환 식물체내에서 연구함으로써 그 유전자의 생체내에서의 작용 기작 및 기능에 관한 기초지식을 확보하여 동 분야 연구의 국제적인 우위를 확보하고자 한다. 마지막으로 주곡 작물인 벼를 대상으로 핵 및 엽록체로의 농업적으로 유용한 유전자를 도입, 안정적으로 후대까지 발현시키는 방법을 확립함으로써 작물 형질전환 기술의 국내 기술 기반을 구축할 뿐만 아니라 타 작물에 응용할 수 있는 토대를

마련코자 한다.

## 2. 연구개발의 범위

1. 유전공학적으로 변형된 Receptor kinase CHRK1 유전자 함유 운반체 개발 및 담배 형질전환체 제조 (생명공학연구원)
  - CaMV 35S promoter (담배)와 ubuquitin promoter (벼)를 이용한 정상적인 Receptor kinase 유전자 (CHRK1)의 벼와 담배에서의 발현
  - CHRK1 단백질을 항시 활성이 있는 형태로 변형하기 위한 유전자 변형 (CHRK-K)
  - 정상적인 CHRK1 함유 과대발현 운반체 개발
  - 변형유전자 CHRK-K 함유 과대발현 운반체 개발
  - 담배 형질전환 및 식물체 재분화
  
2. 형질전환 벼와 담배 식물체 분석
  - 형질전환 식물체 임실률 조사
  - 형질전환 식물체내 도입유전자 유무 분석 (PCR과 genomic Southern analysis)
  - 형질전환 식물체내 도입유전자 발현 분석 (Northern과 Western analysis)
  
3. 벼 형질전환용 CHRK1 Receptor kinase 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환 (명지대)
  - 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환
  - 정상적인 CHRK1 함유 과대발현 운반체 개발
  - 변형유전자 CHRK-K 함유 과대발현 운반체 개발
  - 제작운반체 캘루스 형질전환
  - 형질전환 캘루스 식물체 재분화
  
4. 형질전환 담배에서 CHRK1과 CHRK-K 유전자의 발현이 유도하는 형질변화 탐구
  - 식물방어기작 연구: 도입된 CHRK1 또는 CHRK-K 유전자의 발현으로 인한 식물의 방어기작 유도 검증: PAL (phytoalexin합성 관련), proteinase inhibitor, chitinase, glucanase등 여러 방어관련 유전자의 발현조사
  - CHRK1 유전자의 발현이 유도하는 비정상적인 식물발생의 분자적 기작 탐구

## 제 2 장 유전공학적으로 변형된 CHRK1 Receptor Kinase 유전자 함유 운반체 개발

### 제1절 서 설

Receptor kinase는 세포막에 위치하여 외부로부터 ligand를 받아 그 신호를 다른 단백질의 phosphorylation을 통하여 전달하는 세포의 신호전달에 관련된 역할을 하는 효소인데 여러 동물 system에서 세포의 증식과 발생에 결정적인 역할을 하는 것이 보고되었다. 식물에서 receptor kinase 유전자는 많이 조사되었으나 그 기능에 대해서는 많이 알려지지 않았고, 그 중 그 기능이 알려진 것은 옥수수 잎의 분화에 관련된 crinkly (Becraft et al., 1996), Arabidopsis에서 꽃의 형태를 조절하는 erecta (Torii et al., 1996), 벼의 내병성에 관련된 Xa21 (Song et al., 1995), Brassica에서 자가불화합성을 조절하는 SRK (Stein et al., 1991), 페튜니아의 화분 및 배주 발생에 관련된 PRK1등이 있다 (Mu et al., 1994).

곰팡이가 식물에 침입할 때 곰팡이와 식물 세포벽의 성분인 키틴과 글루칸의 oligomer (oligosaccharides)들은 식물의 방어기작을 일으킬 수 있는 신호전달 물질로 작용한다. Oligosaccharide 신호가 식물에 인지되었을 때 일어나는 식물의 반응을 종합하면 다음과 같다.

ㄱ) Phytoalexin 축적: 콩의 꼬투리와 대두와 parsley의 현탁배양세포에서 oligosaccharide 처리에 의한 Phytoalexin 축적이 보고되었다. 벼의 경우 chitosan은 전혀 영향 없고 chitin은 phytoalexin의 합성을 촉진한다.

ㄴ) Proteinase inhibitor 축적: tomato와 감자 잎에서 chitosan에 의해 Proteinase inhibitor 축적

ㄷ) Callose 합성 (b-1,3-glucan): chitosan에 의해 tomato, parsley와 *Catharanthus roseus*의 현탁배양세포에서 관찰

ㄹ) Lignification: chitosan에 의해 slash pine 현탁배양세포에서 관찰

ㅁ) chitosan and chitin에 의해 활성산소 생성

ㅂ) 배양액의 알칼리화: chitin에 의해 tomato와 벼의 현탁배양세포에서 관찰

ㅅ) 일시적인 세포막 potential의 변화와 ion flux: 벼의 현탁배양세포에서 관찰

○ ) Jasmonic acid 생성: 벼의 현탁배양세포에서 관찰

ㄱ ) 여러 식물 방어관련 유전자의 발현: PAL, chitinase, glucanase등의 유전자가 발현된다.

곰팡이가 식물에 침입할 때 곰팡이와 식물 세포벽의 성분인 키틴과 글루칸의 oligomer (oligosaccharides)들이 신호전달 물질로 작용하여 식물의 방어기작을 일으킨다. 이러한 신호전달에 있어 Oligosaccharide의 경우 일반적으로 4mer이상이어야 생물학적인 반응을 유도할 수 있으며 특히 Chitin의 경우 deacetylation된 것과 부분적으로 acetylation된 것이 같은 reponse를 일으킨다. oligochitosan (8mer)의 경우 reducing end에 0-methyl group이 붙어 있어도 활성이 있으나 0-methoxyphenyl group이 있으면 불활성을 보인다. 벼세포에 chitin을 처리하면 phytoalexin 합성이 촉진되는데 6mer 이상이 가장 활성을 보이고 tomato에서는 배양액의 알칼리화 유도에 4mer 이상이 가장 효과적이다.

이러한 oligosaccharide를 인지할 수 있는 세포막에 존재하는 receptor가 제안되었으며 tomato (1993년)에서 chitin pentamer가 세포막에 결합한다는 것이 보고되었다. 이때 Kd는 32nM이었고 이 receptor의 양은 2.65 pmol/mg protein로 추정되었다. 벼에서는 1993년 세포막에 N-cetylchitoctase에 대한 binding site가 있다는 것이 밝혀졌고 이때 Kd값은 5.4 nM, 세포내에서 0.3 pmol/mg protein의 농도로 존재한다. 1997년에는 벼세포의 세포막에서 75 kDa의 chitin binding protein을 분리하였다. 이 단백질은 chitin oligosaccharide에 특이적으로 결합하며 chitosan은 결합하지 않는 것 같다. 대두의 세포막에서 phytoalexin형성등의 방어기작을 유도할 수 있는 hepta-beta-glucoside와 결합하는 binding site를 발견하였고 대두의 뿌리세포에서 glucan-binding-protein을 분리하여 해당 cDNA를 구하였다. 이 cDNA가 과연 glucan receptor로서 oligosaccharide 신호전달에 관련되어 있는지는 아직 밝혀지지 않았다. CHRK1이라는 receptor kinase는 N-terminal에 chitinase를, C-terminal에 kinase motif를 가지며 chitooligosaccharide 신호의 receptor의 성질을 가지고 있다. 즉 CHRK1은 세포막에 노출되어 있는 chitinase domain을 통해 곰팡이 세포벽에서 유래된 chitin과 결합하여 kinase domain을 활성화시키므로써 곰팡이 침입 신호를 세포안으로 전달하여 다각적인 방어체계 (callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase 등의 방어관련 유전자의 발현)를 활성화시킨다고 생각된다.

CHRK1은 N terminus에 chitinase domain을, C-terminal에 kinase motif를 가



지는 receptor-like kinase이다. 두 domain 사이에는 transmembrane region이 위치하고 있다. Kinase domain는 Ser/Thr type의 kinase와 유사성이 높았으며 kinase에서 일반적으로 보이는 11개의 subdomain을 모두 가지고 있었다. CHRK1의 Chitinase domain은 식물의 것들 (class I-IV)과는 유사성이 낮은 반면에 bacterial chitinase와 담배의 chitinase class V (Melchers et al, 1994) (bacterial chitinase와 유사함)와 더 유사하였다. 담배의 chitinase class V와는 아미노산 수준에서 41%가 동일하였다. 또한 여러 chitinase들을 비교해 보면 Ser, Gly, Asp, Glu의 네 가지 잔기가 잘 보존되어 있는 것을 알 수 있고 그 중 특히 Asp와 Glu는 chitinase 효소활성에 필수적인 잔기임이 보고되어있다 (Watanabe et al, 1993).

CHRK1의 chitinase domain에는 위의 네가지 잔기중 Glu가 전혀 다른 성질의 아미노산인 Val으로 바뀌어 있다. CHRK1의 chitinase domain은 chitin polymer와 oligomer에 대해 chitinase 활성을 보이지 않는다. 그러나 *E. coli*에서 발현된 chitinase domain은 regenerated polymeric chitin 및 chitin oligomer에 결합할 수 있어 CHRK1이 chitin derivative를 ligand로서 결합할 수 있음을 보여준다. Wheat germ agglutinin은 chitin에 결합하는 lectin의 한 종류이다. 이 단백질은 dimer로 작용하는데 그 결정구조가 밝혀져 있다 (Wright CS, J.Mol.Biol., 178 (1984) 91-104). chitin oligomer와의 결합에 중요한 잔기는 Ser<sup>62</sup>, Tyr<sup>73</sup>, Glu<sup>115</sup>이고 그밖에 Tyr<sup>64</sup>, His<sup>66</sup>이 관여한다고 알려져있다. 이와 비슷한 아미노산 잔기가 있는지 조사해 보았는데 CHRK1의 N말단 근처에서 유사한 서열을 발견할 수 있었다. Ser<sup>45</sup> (혹은 Thr<sup>46</sup>), Phe<sup>48</sup>, His<sup>50</sup>, Tyr<sup>57</sup>, Asp<sup>116</sup> (혹은 Glu<sup>117</sup>)이 agglutinin과 유사한 간격으로 위치하고 있었다. 이는 CHRK1 chitinase domain의 chitin이 결합하는 pocket이 wheat germ agglutinin과 유사할 것으로 추측된다. P<sup>32</sup>에 의해 세포를 in vivo labeling 뒤 chito oligosaccharide elicitor 처리 후 CHRK1 antibody를 이용하여 immunoprecipitation 할 때 CHRK1은 처리한 elicitor에 의해 autophosphorylation하는 것으로 보여 chitin elicitor의 신호전달에 관여하는 것으로 보인다.

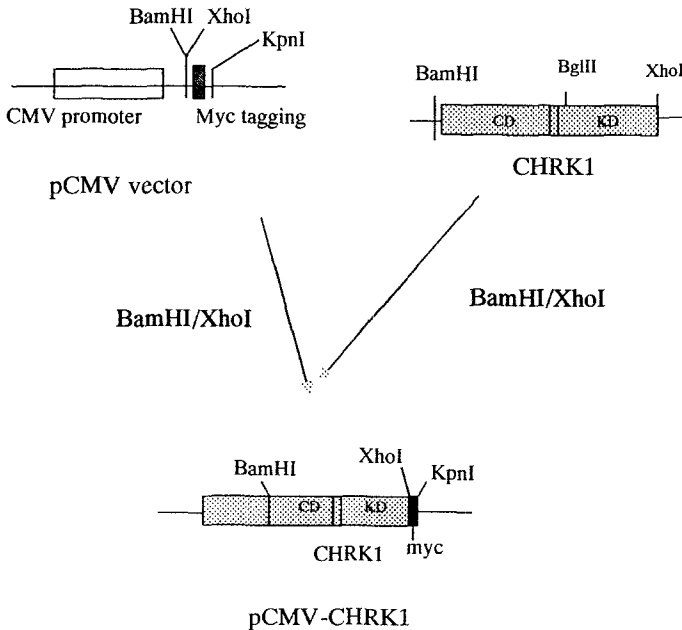
## 제2절 CHRK1 유전자 과대발현용 운반체 제작

CHRK1 단백질을 myc peptide motif로 tagging하여 과대발현하기 위하여 CHRK1 full cDNA를 pCMV 플라스미드에 cloning하여 C-terminus에 myc을 붙인 다음 전체 융합유전자를 형질전환 벡터인 pMBP1에 클로닝 하여 그 안의 CaMV35S promoter와 sense orientation으로 융합시켰다. 즉 형질전환체 내에서 35S promoter에 의하여 CHRK1-myc 단백질을 과대발현시키고자 한다.

### 1. pCMV-CHRK1의 클로닝

CHRK1을 myc으로 tagging하여 발현하기 위하여 *CHRK1* cDNA를 BamHI과 XhoI으로 digest하여 그 3.3 kb DNA 절편을 BamHI과 XhoI으로 digest한 pCMV-Tag vector에 클로닝하여 myc과 융합시켰다. 그 결과 pCMV-CHRK1을 얻었다 (그림 1).

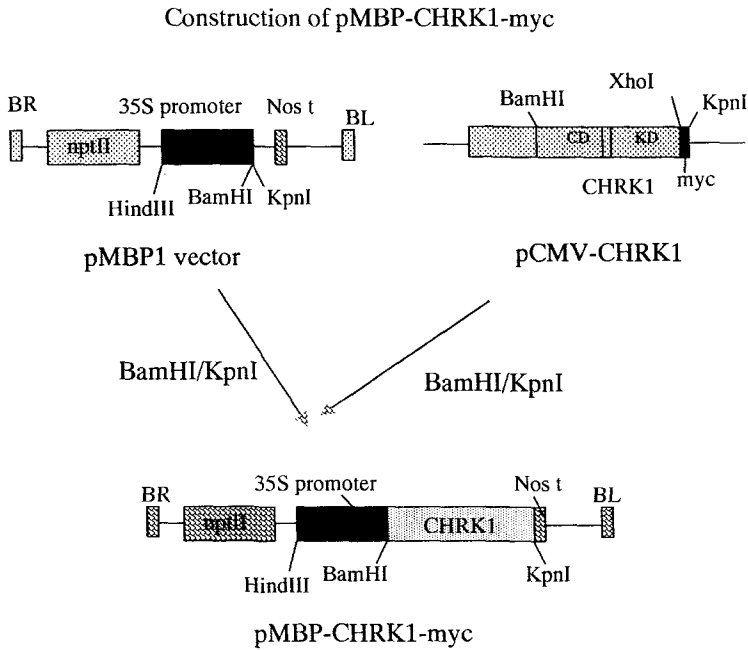
Construction of pCMV-CHRK1



<그림1> pCMV-CHRK1의 제조

## 2. pMBP1-CHRK1-myc의 제조

pCMV-CHRK1을 BamHI과 KpnI으로 digest하여 myc과 융합한 CHRK1 DNA 절편을 얻은 뒤 BamHI 과 KpnI으로 digest한 pMBP1 (형질전환 벡터)으로 클로닝하였다. 그 결과 pMBP1-CHRK1-myc을 얻었다 (그림 2).



<그림 2> pMBP-CHRK1-myc의 제조

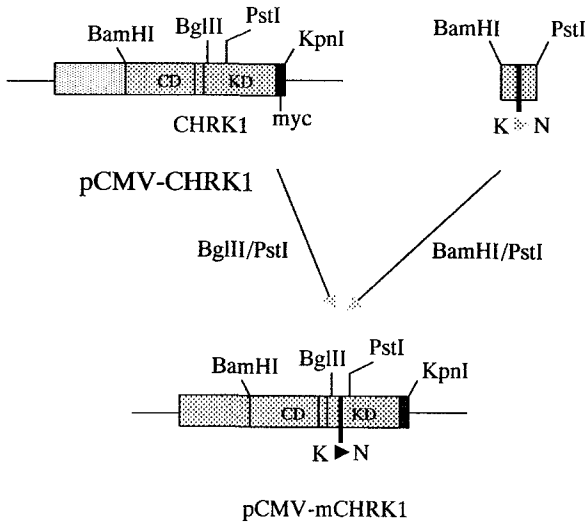
## 제3절 CHRK1 kinase mutant 유전자 과대발현용 운반체 제작

### 1. pCMV-mCHRK1의 제조

CHRK1은 kinase 활성을 가지는데 kinase 활성이 없는 CHRK1의 mutant를 myc peptide motif로 tagging하여 과대발현하기 위하여 다음과 같은 클로닝을 행하였다. 먼저 CHRK1의 BglIII/PstI DNA 절편을 PCR한 뒤 template로 사용하여 kinase activity에 필요한 ATP-binding site인 Lys을 Asn으로 PCR로서 mutation 시켰다. 그 후 pCMV-CHRK1

을 BglIII와 PstI으로 digest하여 mutation을 도입한 DNA 절편 (BamHI/PstI 절편)을 그 안으로 클로닝하였다. 결국 CHRK1 mutant cDNA를 pCMV 플라스미드에 cloning하여 C-terminus에 myc을 붙였다 (그림 3).

### Construction of pCMV-mCHRK1

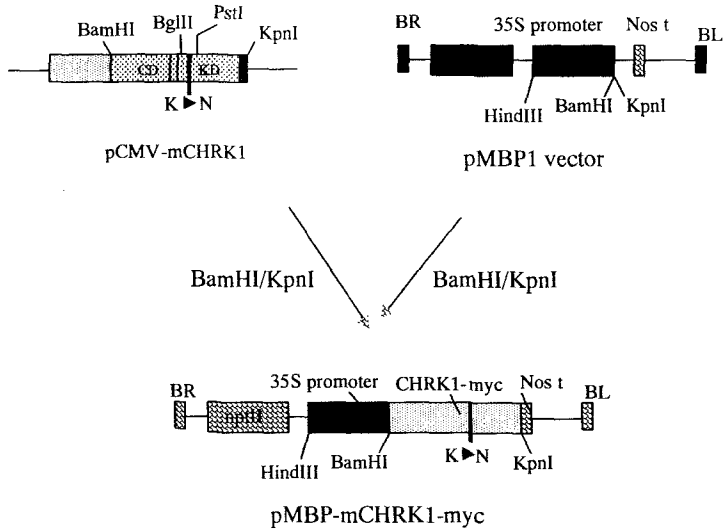


<그림3> pCMV-mCHRK1의 제조

### 2. pMBP-mCHRK1-myc의 제조

다음 pCMV-mCHRK1를 BamHI과 KpnI으로 digest하여 myc과 융합한 mCHRK1-myc 융합유전자 절편을 얻은 뒤 BamHI 과 KpnI으로 digest한 pMBP1 (형질전환 벡터)으로 클로닝하여 그 안의 CaMV35S promoter와 sense orientation으로 융합시켰다. 그 결과 pMBP1-mCHRK1-myc을 얻었다 (그림 4). 즉 형질전환체 내에서 35S promoter에 의하여 myc으로 tagging된 CHRK1 mutant 단백질을 과대발현시켰다..

### Construction of pMBP-mCHRK1-myc



<그림 4> pMBP-mCHRK1-myc의 제조

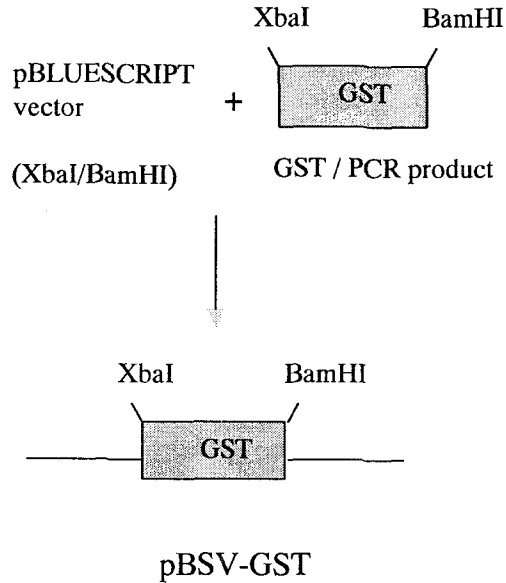
### 제4절 활성을 가지는 CHRK1 kinase domain을 병원체침입에 대응하여 과대발현하기 위한 운반체 제조

항상 활성이 있는 형태로 변형된 CHRK1 mutant의 발현을 위하여 ligand binding domain과 transmembrane domain을 제거한 CHRK1 kinase domain (KD)만을 tagging을 위하여 GST (Glutathione S transferase)와 reading frame이 맞게 융합시킨 후 그 융합부위를 sequencing으로 확인하였다. 이 GST-CHRK-K 융합유전자를 병원체 침입시 높이 발현되는 PR1 유전자의 promoter에 융합시켜 병원체 침입시 GST-CHRK-K 융합단백질을 높이 발현시키고자 하였다. 이 융합유전자를 형질전환 벡터인 pMBP1에 클로닝하여 Agrobacteria로 도입시켜 식물체형질전환에 이용하였다.

## 1. pBluescript-GST의 제조

pGEX plasmid로부터 GST를 BamHI과 XbaI sites를 도입한 primer와 PWO DNA polymerase로 PCR 하였다. 이후 PCR product를 BamHI/XbaI으로 digest하여 pBluescript로 클로닝하였다. 그 결과 pBSV-GST를 제조하였다 (그림 5).

### Construction of pBSV-GST

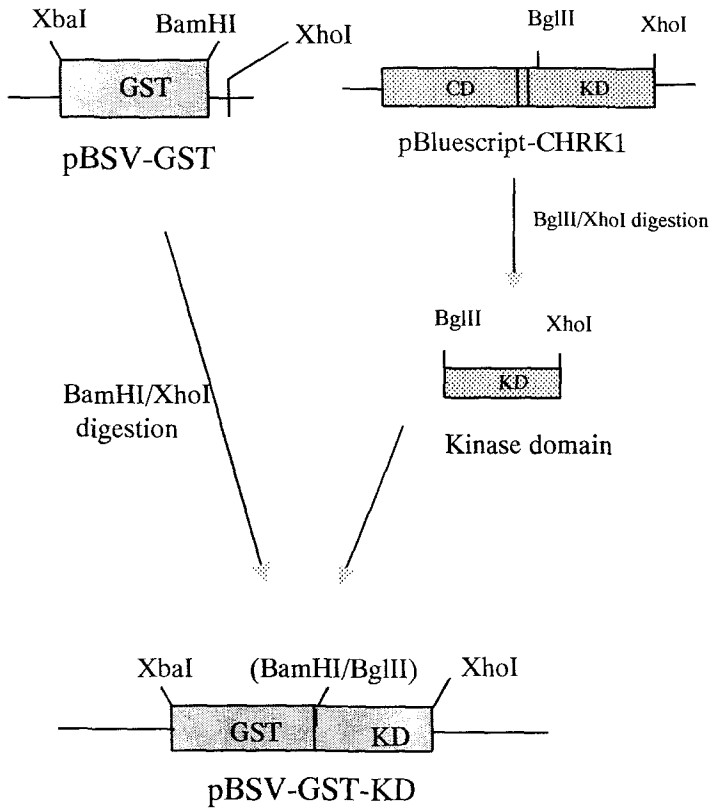


<그림 5> pBluescript-GST 의 제조

## 2. pBluescript-GST-CHRK-K의 제조

그 후 CHRK1 전체 cDNA를 BglIII/XhoI으로 digest하여 1.5kb DNA 절편을 얻었는데 이 절편은 kinase domain (KD)에 대응한다. 이 1.5 kb CHRK1 DNA를 위의 pBluescript-GST로 BamHI/XhoI sites를 이용하여 클로닝하여 GST-KD 융합유전자를 만들었다. GST와 KD가 in-frame fusion된 것을 CHRK1 KD 내의 primer를 이용하여 dideoxy method를 써서 sequencing하였다 (그림 6).

## Construction of pBSV-GST-KD

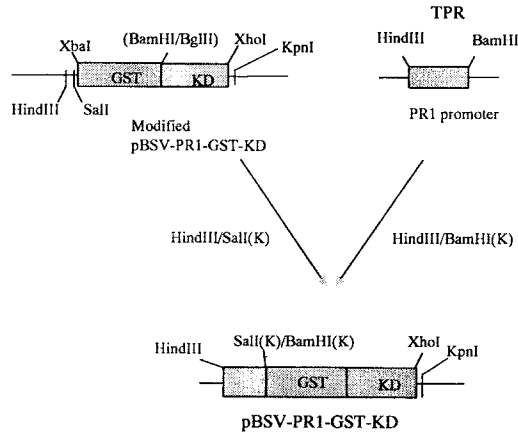


<그림 6> pBluescript-GST-KD의 제조

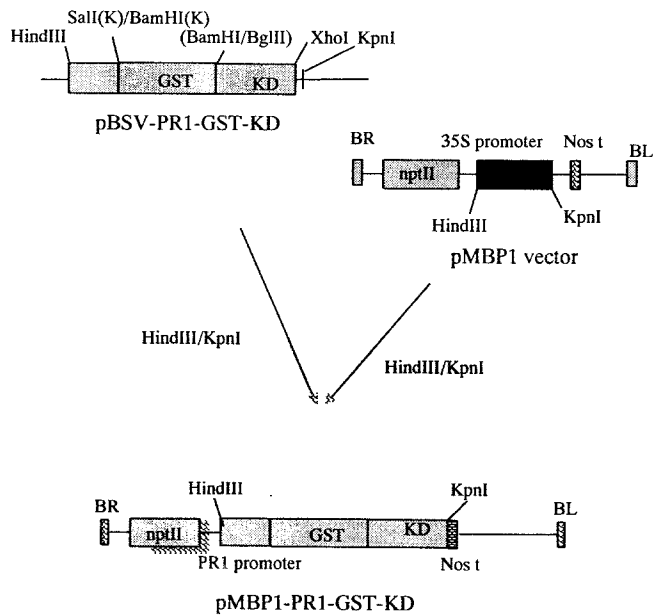
### 3. pBluescript-PR1-GST-KD의 제조

PR1 promoter와의 융합을 위하여 pBSV-GST-KD 플라스미드 DNA를 NotI(Klenow)/KpnI으로 자른 뒤 2.3 kb DNA 절편을 다시 pBluescript (XhoI(Klenow)/KpnI)으로 cloning 하고 이 플라스미드를 HindIII/SalI(Klenow)로 잘라 HindIII/BamHI(Klenow)로 자른 PR1 promoter와 융합시켜 pBluescript-PR1-GST-KD를 얻었다 (그림 7).

Construction of pBSV-PR1-GST-KD



<그림 7> pBluescript-PR1-GST-KD의 제조



<그림 8> pMBP1-PR1-GST-KD의 제조



#### 4. pMBP1-PR1-GST-KD의 제조

그 후 sequence를 확인하고 pBluescript-PR1-GST-KD를 KpnI/HindIII로 잘라 그 3.9 kb PR1-GST-KD insert를 KpnI/HindIII로 자른 형질전환용 pMBP plasmid로 cloning 하였다 (그림 8)

## 제3장 담배 형질전환 및 형질전환식물체 확인

### 제1절 서설

식물체가 병원체의 침입을 인지하였을 때 그 침입을 국소화 시키기 위해 여러 종류의 방어 메카니즘을 발현하게 되는데 callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase 등의 방어관련 유전자의 발현등이 포함된다. 최근 수년간 식물체의 항병원성 유도 및 발현에 관한 세포적 분자적인 기작연구에 많은 발전이 이루어졌으며 특히 최근의 분자생물학과 식물형질전환기술의 발전에 힘입어 병원체침입의 인지로부터 식물방어체제 유도를 연결하는 신호전달 메카니즘에 관하여 많은 연구 결과가 축적되고 있다. 이러한 분야의 커다란 발전에도 불구하고 아직 가장 핵심적인 의문점들이 그대로 남아있다. 예를 들면 방어기작을 유도하는 신호전달체계에 관한 세포막 receptor의 역할, 관련 분자신호의 기능, 조절 및 전달, 효과적인 저항성에 관련된 2차대사산물의 기능 등을 들수 있다.

식물체가 본질적으로 갖고있는 이러한 방어전략을 이용 혹은 강화하여 곰팡이에 내성을 갖는 식물체를 개발하기 위한 노력이 경주되어 왔는데 chitinase, glucanase 등의 방어관련 단백질들을 식물체에 과대발현하는 것등이 그 대표적인 예이다. 병원균의 공격에 의해 유도되는 chitinase 및  $\beta$ -1, 3-glucanase와 같은 가수분해 효소를 담배, 알팔파, 감자 및 벼를 비롯한 몇몇 식물체에서 분리하였고 (Broglie, 1986; Jones, 1986; Mauch, 1989; Zhu, 1991), 강낭콩으로부터 분리된 chitinase 유전자를 담배에 형질전환하여 *Rhizoctonia solani*에 내성 조사를 하였다 (Broglie, 1991). 최근에는 벼의 chitinase와 알팔파의 glucanase의 유전자를 담배에서 동시에 발현시켜 *Cercospora nicotianae*에 어느정도 내성을 나타내었다. (Zhu, 1994). *Serratia marcescens*로부터 분리된 키틴 가수분해 효소 유전자를 담배에 도입하고 세포안과 밖에서 각각 발현되도록 함으로써 포장시험에서 *Rhizoctonia solani*에 대한 내성을 조사하였다 (Howie, 1994). 그러나 그러한 노력들은 거의 모두가 실패로 돌아갔고 성공한 경우라하여도 그 효과가 미미하여 실용화단계에 이르지 못했다. 결국 다년간의 시도를 통해 도달한 결론은 한 두가지의 방어관련 단백질의 발현을 통해서 실용화시킬 정도의 곰팡이 내성을 얻을 수 없다는 사실이다. 즉 식물체가 병

원체의 침입에 대응하는 총체적인 방어기작을 이용해야만이 높은 내성을 얻을 수 있으리라 사료된다.

최근의 식물-병원체 상호작용에 관한 연구도 병원체 침입의 신호를 식물이 어떻게 인지하여 그 신호가 세포내에서 어떻게 전달되어 downstream의 방어관련 유전자의 발현으로 연결되는지에 초점을 맞추고 있다. 그러므로 유전공학을 이용하여 식물이 병원체 침입의 신호를 더 빨리 인지하게하고 더 강력한 방어기작을 활성화시키는 전략은 높은 내성을 얻는데 가장 탁월한 전략이라 사료된다.

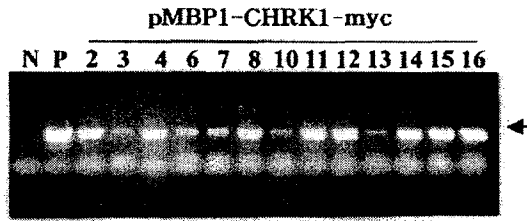
## 제2절 담배 형질전환 및 형질전환식물체 확인

### 1. 형질전환식물체의 확인

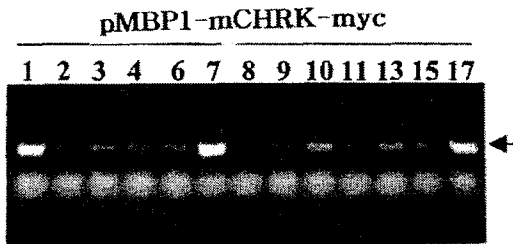
위에서 설명한 CHR1과 CHR1의 변형유전자를 가진 세 종류의 형질전환벡터, pMBP1-CHR1-myc, pMBP1-mCHR1-myc, pMBP1-PR1-GST-KD를 *Agrobacterium* LBA4404로 electroporation을 이용하여 도입시켰다. 그후 가나마이신 배지에서 transformation된 *Agrobacterium*을 선별한 후 이 균주를 이용하여 leaf disk를 이용한 담배의 형질전환 및 식물체 재분화를 수행하였다. 형질전환을 확인하기 위하여 이들 형질전환식물체에서 genomic DNA를 분리하였고 nptII 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR로서 도입 유전자를 분석하여 형질전환식물체를 확인하였다. 확인된 형질전환 담배식물체의 selfing을 통하여 T1종자를 얻었다.

pMBP-CHR1-myc 형질전환체 담배( $T_0$ )들과 대조구 *Xanthi*에서 simple and quick method for DNA isolation from leaf 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리한 뒤 nptII 유전자에 대한 antisense와 sense primer 20 pmole를 사용하여 94 °C 1 min, 94 °C 1 min 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 cycles로 PCR을 수행하였다 (그림 1).

pMBP-mCHR1-myc 형질전환체 담배( $T_0$ )들과 대조구 *Xanthi*에서 simple and quick method for DNA isolation from leaf 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리한 뒤 nptII 유전자에 대한 antisense와 sense primer 20 pmole를 사용하여 94 °C 1 min, 94 °C 1 min 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 cycles로 PCR을 수행하였다 (그림 2).

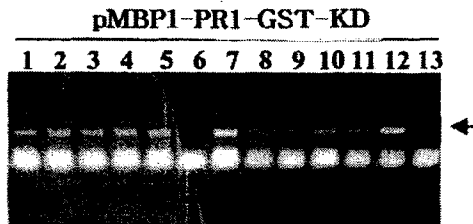


<그림 1> pMBP1-CHRK1-myc 형질전환체에서 외래 유전자의 도입을 nptII primer를 사용하여 PCR로 확인



<그림 2> pMBP1-mCHRK1-myc 형질전환체에서 외래 유전자의 도입을 nptII primer를 사용하여 PCR로 확인

또한 pMBP-PR1-GST-KD 형질전환체 담배( $T_0$ )들과 대조구 Xanthi에서 simple and quick method for DNA isolation from leaf 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리한 뒤 nptII 유전자에 대한 antisense와 sense primer 20 pmole를 사용하여 94 °C 1 min, 94 °C 1 min 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 cycles로 PCR을 수행하였다 (그림 3).

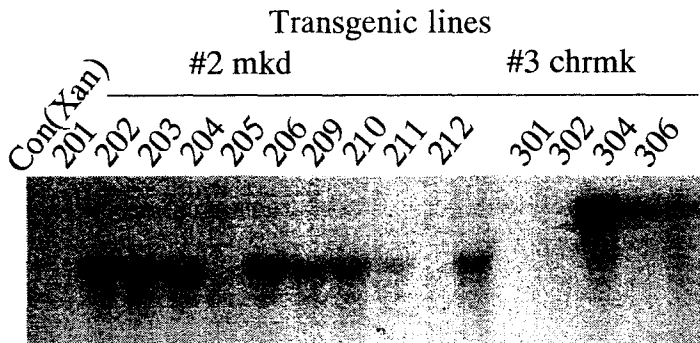


<그림 3> pMBP1-PR1-GST-KD 형질전환체에서 외래 유전자의 도입을 nptII primer를 사용하여 PCR로 확인

## 2. 담배 형질전환체 내의 도입유전자 발현

CHRK1과 CHRK1의 변형유전자를 가진 세 종류의 형질전환벡터 (pMBP1-mCHRK-K-myc, pMBP1-mCHRK1-myc, pMBP1-PR1-GST-KD)를 Agrobacterium LBA4404로 electroporation을 이용하여 도입시켰다. 그후 가나마이신 배지에서 transformation된 Agrobacterium을 선별한 후 이 균주를 이용하여 leaf disk를 이용한 담배의 형질전환 및 식물체 재분화를 수행하였다.

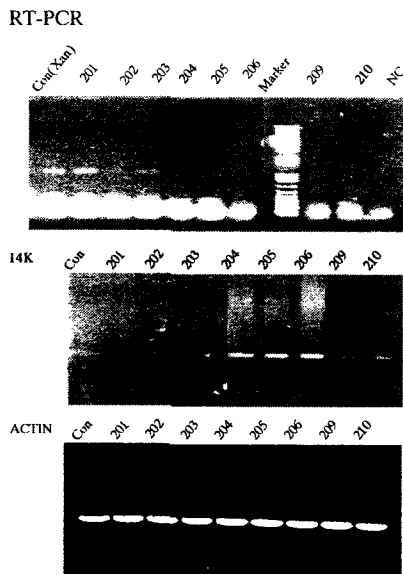
이들 형질전환식물체에서 genomic DNA를 분리하였고 nptII 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR로서 도입 유전자를 분석하여 형질전환식물체를 확인하였다. 여러 개체의 형질전환식물체(T0 세대)의 잎을 채취하여 TRIzol™ Reagent를 이용해서 total RNA를 추출하였다. Total RNA 50µg을 spectrophotometer를 이용하여 정량, formaldehyde gel에서 전기영동하여 Zeta-Probe Membrane에 blotting하였다. 그 membrane에 CHRK1 cDNA를 probe로 혼성화반응을 하였다. Washing 조건은 실온에서 5 min, 60 °C에서 10 min을 행했고, X-ray film에 일주일 감광하였다. WT 식물체의 CHRK1 mRNA는 앞에서 그 양이 너무 적기 때문에 거의 탐지되지 않았으며 형질전환체에서는 CHRK1 transgene transcript가 형질전환체에 따라 다른 level로 탐침되었다 (그림 4).



<그림 4> Northern Blot을 통한 도입유전자 (transgene) 발현 조사

### 3. transgene transcript가 endogenous CHRK1 mRNA의 level에 미치는 영향 조사.

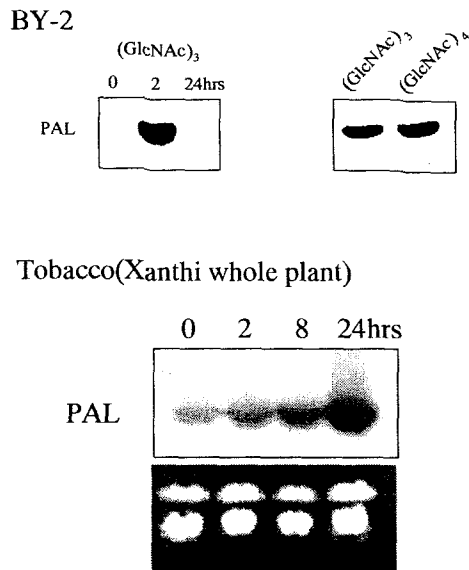
발현되는 transgene transcript가 endogenous CHRK1 mRNA의 level에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RT-PCR을 사용하였다. 확인된 형질전환식물체의 T1 세대를 얻어 가나마이신 배지에서 transgene을 갖는 식물체를 선별, 증식하여 실험에 사용하였다. CHRK1 mRNA의 endogenous level은 너무 낮기 때문에 Northern blot을 사용하지 않고 RT-PCR을 사용하였다. 먼저 형질전환체 담배(T1)들과 대조구 Xanthi의 seedling에서 total RNA을 Trizol을 이용하여 분리한 다음 5 microgram의 RNA를 polyA primer를 이용 Reverse Transcription하였다. 그중 1 microliter를 이용하여 CHRK1 유전자에 대한 CHI2 sense primer 와 CHI5 antisense primer 20 pmole씩을 사용하여 94 °C 1 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 cycles로 PCR을 수행하였다. control로는 RT reaction mix 1 microliter를 이용하여 actin 유전자에 대한 ACT1 sense primer 와 ACT2 antisense primer 20 pmole씩을 사용하여 94 °C 1 min, 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 cycles로 PCR을 수행하였다. 또한 다른 control로 14K 유전자 (NtDSK1 dual-specificity kinase)에 대한 sense primer와 antisense primer 20 pmole씩을 사용하여 94 °C 1 min, 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 cycles로 PCR을 수행하였다 (그림 5).



<그림 5> RT-PCR을 사용한 형질전환체의 endogenous CHRK1 mRNA level 조사

#### 4. 도입된 CHRK1 또는 CHRK-K 유전자의 발현으로 인한 식물의 방어기작 유도 검증

먼저 phytoalexin 생합성 유전자 중의 하나인 PAL의 chitin 처리시의 전사 유도를 WT 담배식물체와 BY2 cell-line에서 조사하였다. 담배식물체에 500 microM의 chitin tetramer를 처리하여 다양한 시간 후 식물체를 습득하여 total RNA를 분리하였고 PAL cDNA를 probe로 하여 Northern blot analysis를 수행하였다. 또한 tobacco BY2 cell line에 100 microM의 chitin trimer와 tetramer를 처리하여 PAL 유전자의 전사를 확인하였다. 식물체와 BY2 cell-line에서 모두 chitin 절편에 반응하여 다른 시간대에 PAL mRNA의 전사가 크게 증가하였다 (그림 6).



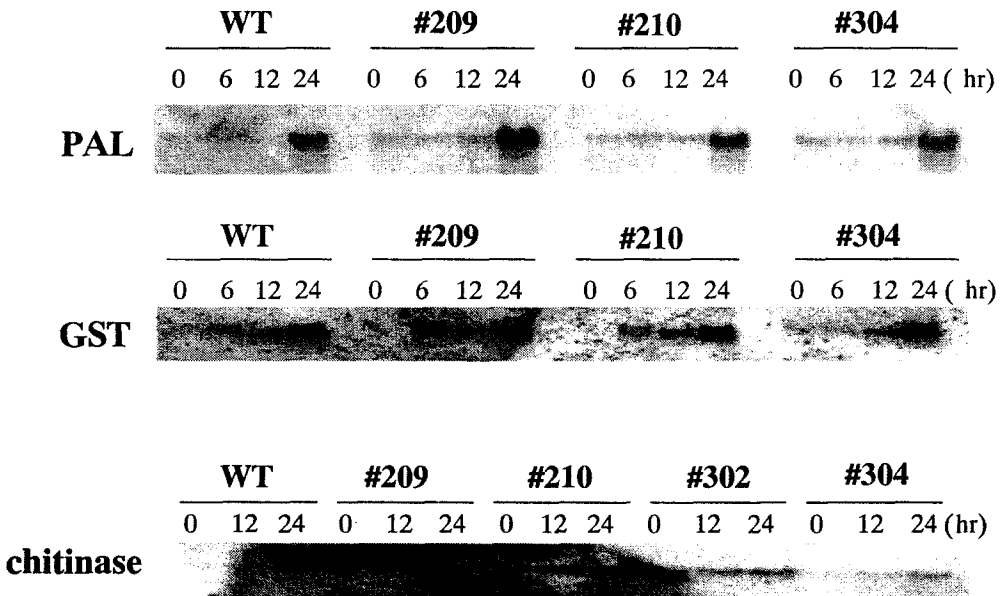
<그림 6> WT 식물체와 BY2 cell line의 chitin 처리시 PAL mRNA 전사 유도 조사

다음 wild-type Xanthi와 형질전환체 T1세대를 파종하여 비정상적으로 발생하는 개체 (아래에서 기술한 형질분석 참조)는 제거하고 정상적으로 자라는 개체만을 선별하여 8-9 leaf stage까지 성장시켰다. 그후 chitin elicitor (100ppm; Sigma T-5894)를 잎에 처리하고 여러 시간 후에 그 잎을 채취하여 즉시 동결시켰다. 그 후 채취한 잎으로부터 total RNA를 분리하여 northern hybridization 실험을 행하였다. probe로는

GST (Glutathione S-transferase), PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase)과 chitinase 유전자 절편을 isotope으로 label하여 사용하였다. 그 결과는 <그림7>에서 보였다.

그 결과 chitin elicitor 처리시의 GST, PAL, chitinase 유전자의 induction 양상이 #209, 210, 302, 304 line과 wild-type 식물체가 매우 유사하였다. 이것은 형질전환체의 chitin signaling이 wild-type과 거의 다르지 않게 수행된다는 것을 시사하며 CHRK1이 chitin signaling을 조절하는 chitin elicitor receptor가 아니라는 사실을 제시한다.

그러나 반면 #209와 #210 line의 많은 개체들이 식물발생이 제대로 이루어지지 않는 형질을 보인다. 그 결과는 아래 수록되어 있다.



<그림 7> chitin elicitor 처리시의 wt과 형질전환식물체체의 GST, PAL, Chitinase 유전자의 induction 양상



## 제4장 CHRK1 형질전환체의 형질분석

### 제1절 서설

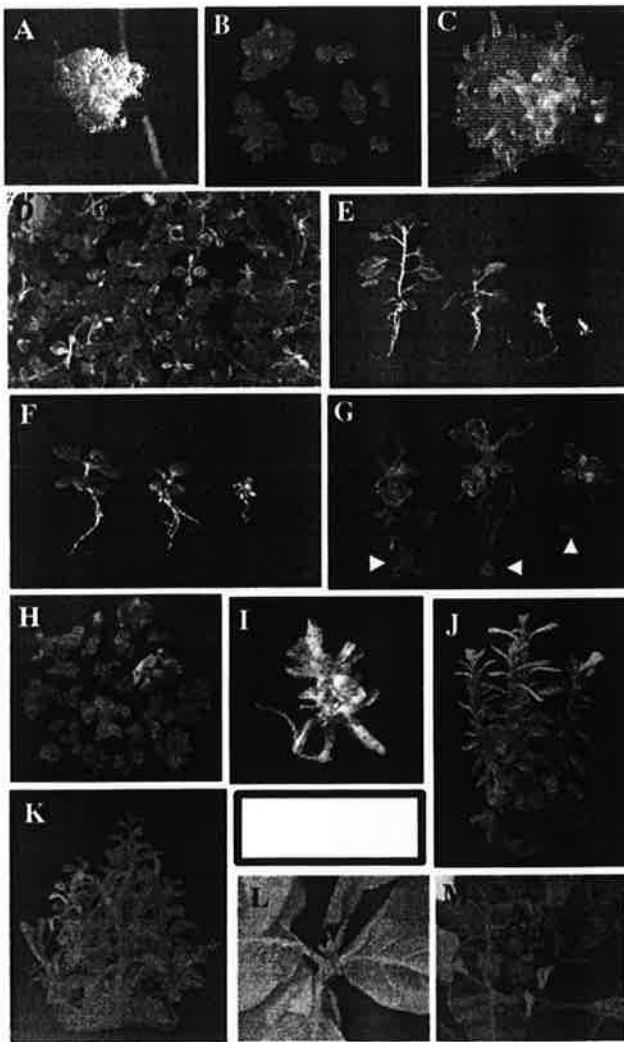
위에서 설명한대로 CHRK1 유전자가 suppression되는 transgenic plants는 식물체의 발생이 매우 비정상적이었다. 즉 유전자 suppression의 강도에 따라 다양한 형질을 보였는데 종자가 발아시 callus로 변하고 yellow cotyledon으로 발생되며 자라지 못하고 결국 1cm 미만의 작은 식물체로 성장이 중지되었다. tissue section 결과는 tissue specificity가 없으며 chloroplast의 발달이 정지되었고 cell division이 증가하여 세포수가 크게 증가하였다는 것을 보인다. 이 결과는 CHRK1 유전자가 suppression되었을 때 종자발아시 조직의 분화가 방해되며 대신 proliferation이 일어난다는 것을 보인다. 또한 CHRK1 유전자는 cytokinin signal pathway와의 관련성을 보인다. 즉 CHRK1은 chitin elicitor 신호전달이 아니라 식물발생 및 분화를 조절하는 receptor kinase 라고 사료된다. 이러한 자세한 결과들을 제2절에서 설명하였다.

### 제2절 CHRK1 형질전환체의 형질분석

#### 1. CHRK1 형질전환체의 비정상적인 식물발생

T1 세대 종자가 발아했을 때 hormone없는 배지에서 약 20%가 캘루스로 변화한다. 캘루스는 처음은 투명하고 불규칙적인 모습으로 출발하나 시간이 지나면서 greening되고 빠르게 증식하며 곧 numerous shoot primordia를 형성하여 자란다. 이들은 kanamycin이 없는 배지에서도 같은 형질을 보인다. (그림 5A-5C, 5H). 또한 어떤 종자는 정상종자보다 느리게 발아하며 작고 노란색의 cotyledon을 가지며 cotyledon이 융합된 경우도 있다. 이 yellow cotyledon은 그 표면이 울퉁불퉁하며 vitrification이 일어나 있다. 며칠후 초록색의 점들이 노란 cotyledon에 나타나기 시작하며 (variegation) 식물의 키 성장이 중지되며 본엽은 작고 가늘며 노랑 또는 흰색을 띤다. 이러한 비정상적인 잎이 불규칙적으로 생성되며 2-3 cm 미만의 식물체로 죽는 경우도 있고 apical dominance가 없어져 bush같은 모습을 한 비정상적인 yellow/white 식물체로 발생하는 경우도 있다 (그림 5D-5F, 5I-5J). 이러한 식물체는 뿌리에 캘

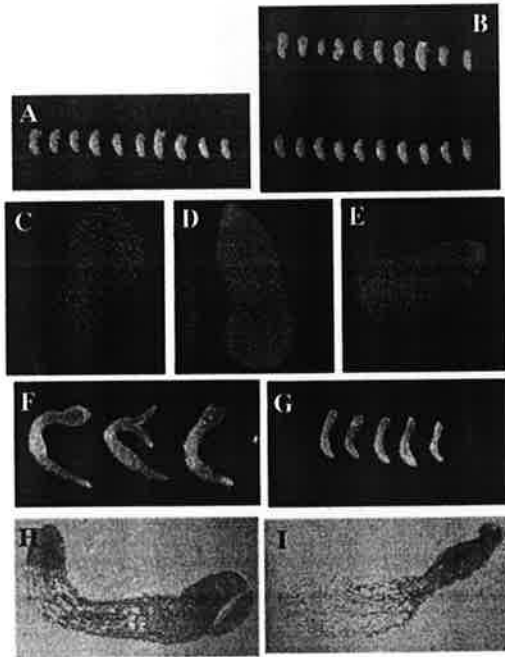
루스를 자주 형성하여 역시 세포의 dedifferentiation과 proliferation이 증가되는 것을 보인다 (그림 5G). shooty callus에서 분리된 각각의 shoot은 호르몬이 없는 배지에서 apical dominance가 없어진 bush같은 모습의 vitrified 식물체로 자란다 (그림 5K). 오직 25-30%의 T1식물체가 이러한 mutant 형질을 나타내며 나머지는 정상적으로 발생한다. 그러나 이런 wild-type sibling이 성체가 되어 개화될 때 많은 식물체의 꽃발달이 비정상적이었다. 꽃 기관의 발달이 비정상적이고 꽃기관 사이의 융합도 일어난다. 또한 stem에서 꽃이 분화되기도 한다.



<그림 5> CHRK1 형질전환체의 형질

## 2. 종자발아 시 dedifferentiation과 cell proliferation이 증가

형질전환 line의 종자를 해부하였을 때 wild-type 담배종자와 형태학상으로 매우 유사하였고 (그림 5A: wild-type, 5B: #209 and #210 line) propidium iodide로 염색한 뒤 confocal microscopy로 검사하였을 때 세포 수와 세포의 나열양상등이 매우 유사하였다 (그림 5C: wild-type, 5D: #209, 5E: #210 line). 그러므로 성숙한 종자시기까지는 형질전환체에 이상이 없으나 종자발아시 비정상적인 형질이 나타나는 것으로 생각된다. 210 line의 경우 종자 발아시 radicle protrusion은 일어나나 곧 발아가 중지되며 root hair 형성은 일어나지 않는다. 그 상태에서 해부하였을 때 wild-type 종자 발아 시와는 달리 embryo의 발생이 중지되어 있으며 endosperm을 사용하지 못하여 여전히 endosperm이 cotyledon 부분을 싸고 있어 cotyledon이 갈변하여 죽는다. 특히 cotyledon과 radicle 사이의 중간부분이 퇴화하였다. 반면 wild-type은 발아시 embryo가 빠르게 성장하며 분화하게 된다. endosperm은 완전히 이용되며 shoot apex는 cotyledon으로 분화하여 녹색을 띄게되며 chloroplast 발생도 왕성하다. Root hair도 왕성하게 형성된다 (그림 5F와 5H: wild-type, 5G와 5I: #210 line).



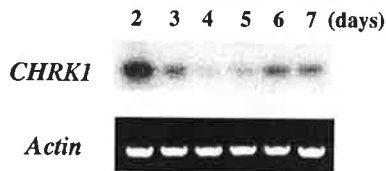
<그림 6> 성숙한 종자내와 발아시의 embryo 모습 (light and confocal microscopy)

즉 비정상적인 배아는 embryo 발생은 정상으로 진행되어 성숙된 종자상태에서는 그 차이가 발견되지 않으나 종자발아 중 발생과 분화가 중지된 상태에서 vitrification 이 일어나며 세포가 팽창하며 미분화된 캘러스를 형성하여 자라게 된다. 담배는 embryo 발생이 torpedo stage까지만 일어나고 종자성숙이 일어나며 종자발아시 cotyledon stage로의 발생이 일어난다. 그러므로 CHRK1 유전자는 종자발아 시 진행되는 마지막 시기의 embryo 발생을 조절한다고 할 수 있다.

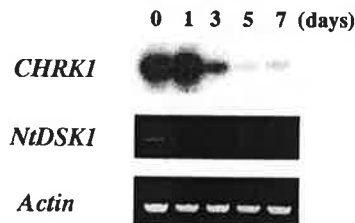
### 3. CHRK1의 종자발아 시 발현 양상

CHRK1 유전자는 종자발아시와 종자발생 중 발현되는 유전자이다. CHRK1 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 종자발아시 여러시기 (2-7 days imbibition; 그림 7A)와 수분후 종자발생 시 여러 시기 (0-7 days after pollination; 그림 7B)에서 RNA를 분리하여 CHRK1 cDNA를 probe로 사용하여 northern blot analysis를 수행하였다. 그 결과 imbibition 2일 째 CHRK1 mRNA가 높게 발현되었으며 수분되지 않은 ovary와 수분 직후 mRNA level이 높았다.

**A**



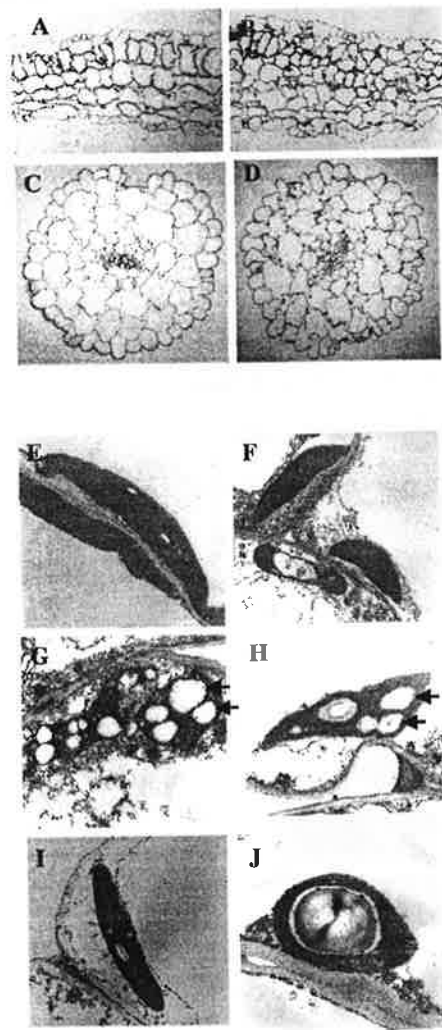
**B**



<그림 7> northern blot analysis

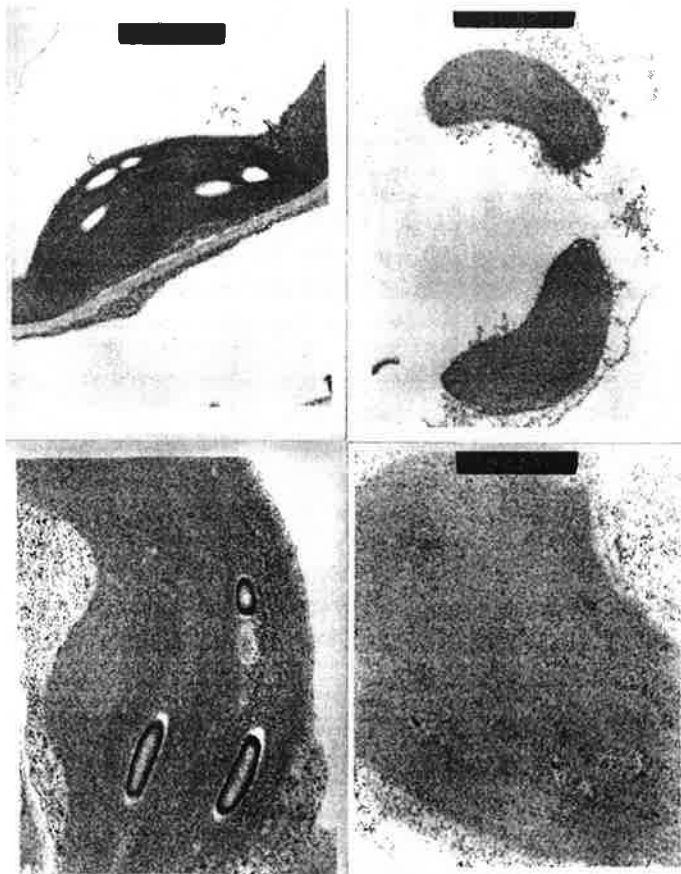
### 4. Cell proliferaion의 증가와 cell specificity 감소 및 비정상적인 엽록체 발달

wild-type과 209번 식물체의 cotyledon과 hypocotyl을 section하여 light microscope로 관찰하였다. wild-type은 cell layer가 뚜렷하여 cell specificity가 유지되는 것을 보였으나 (그림 8A와 8C) #209 line은 cell layer 없고 세포의 크기가 작으며 그 수가 훨씬 많은 형질을 보였다 (그림 8B와 8D). 또한 cotyledon section을 Transmission electron microscope으로 관찰하였을 때 wild-type은 tylakoid membrane stacking이 잘 보이는 초생달 모양의 엽록체가 관찰 되었으나 (그림 8E) 209번과 210번은 chloroplast의 발달이 비정상적이어서 그 크기가 작고 thylakoid membrane stacking이 거의 관찰되지 않았다 (#209:그림 8F와 8G, #210: 그림 8H).



<그림 8> light and transmission electron microscopy

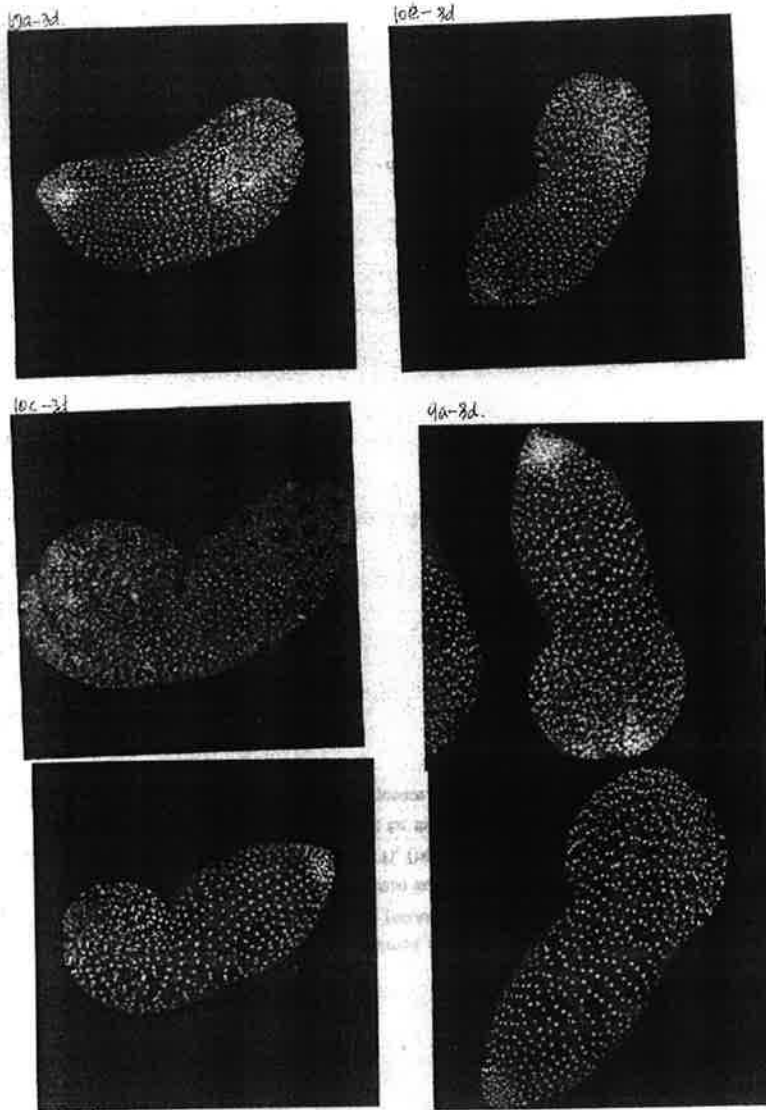
또한 hypocotyle section을 transmission microscope으로 관찰하였을 때 wild-type (그림 8I)과 달리 #209 line (그림 8J)은 거대 starch granule을 포함하는 비정상적인 엽록체가 관찰되었다. close up을 통하여 thylakoid membrane stacking을 관찰하였을 때 wild-type (그림 9 왼쪽)과는 대조적으로 #209 line (그림 9 오른쪽)은 stacking이 거의 이루어지지 않았다.



<그림 9> wild-type과 209번의 cotyledon의 chloroplast 구조 비교

5. CHRK1 형질전환체의 embryogenesis는 정상

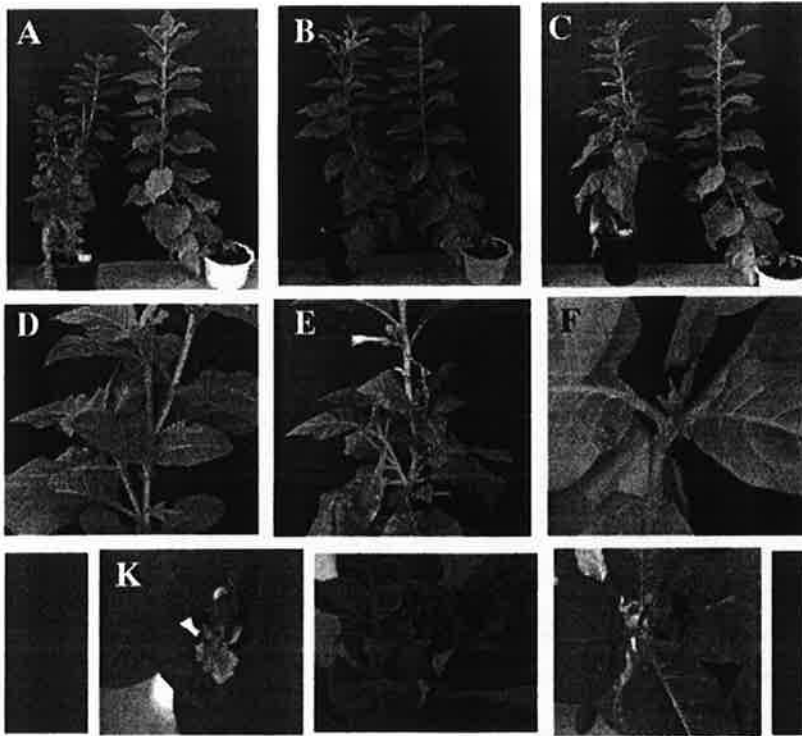
wild-type, 209번, 210번의 성숙한 종자로부터 해부한 embryo는 propidium iodide로 염색한 뒤 confocal microscopy로 검사하였을 때 embryo내의 핵의 수와 핵의 나열양상등이 매우 유사하였다. (그림 10)



<그림 10> embryo의 confocal microscopy를 이용한 관찰

## 6. apical dominance의 breakdown과 비정상적인 꽃발생

CHRK1 형질전환 식물체는 T0와 T1 세대에 걸쳐 apical dominance가 크게 약해져서 결가지가 많이 생성되어 bush phenotype을 보인다 (A: 왼쪽 #210, 오른쪽 wild-type, B: 왼쪽 #203, 오른쪽 wild-type, C: 왼쪽 #209, 오른쪽 wild-type, D: #209, E: #203). 꽃의 발생도 비정상적이어서 꽃이 stem에 발생하며 (F: #210) 꽃기관의 융합, 여러 꽃의 융합 (K-M) 등이 일어난다.



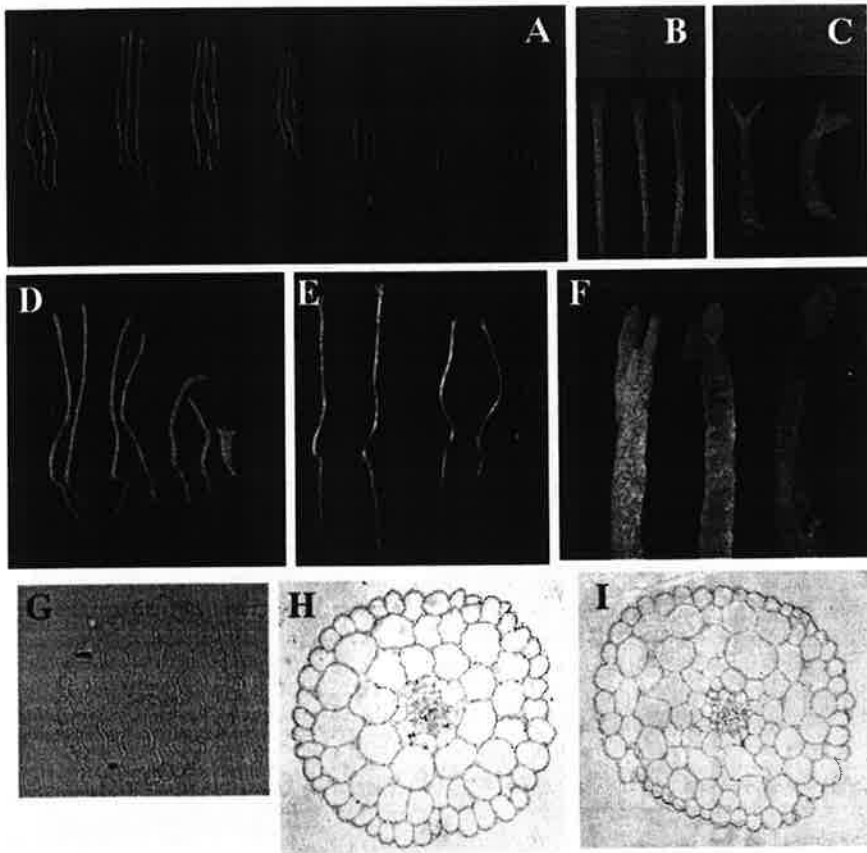
<그림 11> CHRK1 형질전환체의 apical dominance breakdown과 비정상적인 꽃발생

## 7. 비정상적인 skotomorphogenesis

CHRK1 형질전환 식물체의 skotomorphogenesis를 연구하였다. Arabidopsis와 토마토등은 암상태에서 성장할 때 배지에 cytokinin이 존재할 때 부분적으로 deetiolation이 되어 hypocotyl elongation이 방해되며 cotyledon opening, radial expansion등이 일어난다. 담배 seedling에서도 그같은 현상이 일어나는데 cytokinin 양을 늘려가며 암 상태에서 기를 때 점점 hypocotyl 길이가 짧아지고 뚱뚱해진다 (그림 12 A: 왼쪽-->



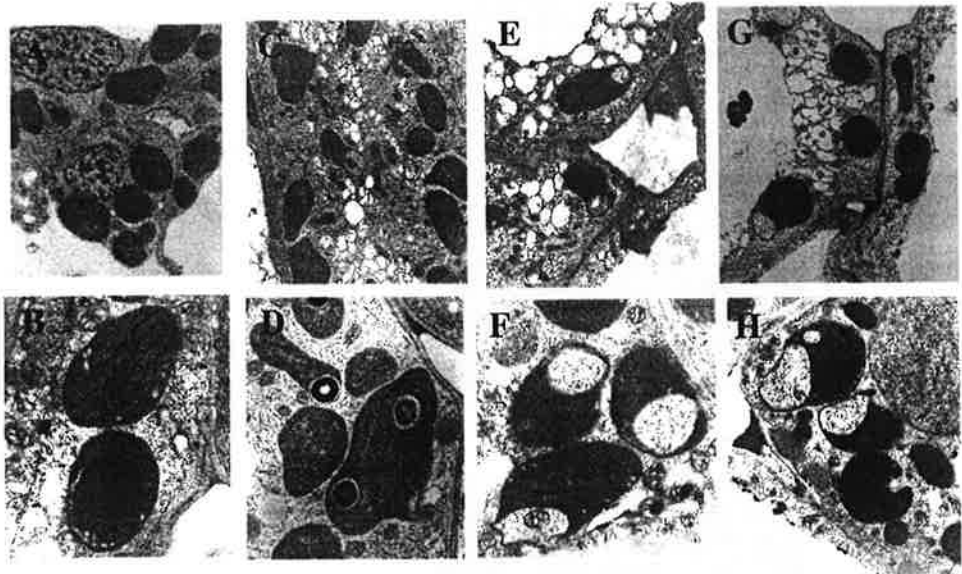
오른쪽: 0 -100 microM cytokinin, B: MS 배지, C: 100 microM cytokinin 첨가배지). 그러나 형질전환체는 cytokinin 없는 배지에서도 deetiolation이 일어나서 hypocotyl elongation이 방해되며 cotyledon opening, radial expansion등이 일어난다 (D: 왼쪽 2개 wild-type; 나머지 #203, E: 왼쪽 2개 wild-type; 나머지 #209, F: deetiolation 된 #203 seedling). 이런 현상들은 형질전환체들이 cytokinin phenotype을 cytokinin 없이 보인다는 것을 의미하며 세포내 cytokinin level 증가나 cytokinin signaling 증가를 시사하고 있다. hypocotyl section의 결과는 cytokinin 처리시 세포의 expansion이 사실적으로 일어난다는 것을 보여준다 (G: wild-type at MS 배지, H: wild-type at cytokinin 100 microM). 형질전환체는 cytokinin 없는 배지에서 cell expansion을 보이거나 cell number도 증가하며 random한 location을 보인다 (I: #203 line at MS 배지).



<그림 12> CHRK1 형질전환체의 skotomorphogenesis

## 8. 암상태에서 키운 식물체의 chloroplast degeneration

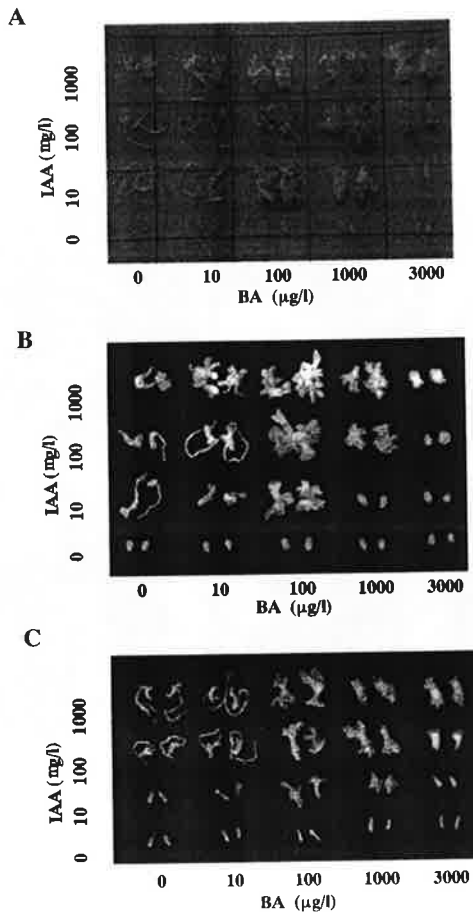
또한 암상태에서 자랐을 때 deetiolation된 CHRK1 seedling은 chloroplast 발생도 매우 다르다. 암상태에서 키운 seedling의 cotyledon section을 transmission electron microscope로 관찰하였다 (그림 13). wild-type은 MS 배지에서 자랐을 때 prolamellar body를 가진 etioplast를 보이나 (A와 B) cytokinin 배지에서 키울 때는 부분적으로 발달한 chloroplast를 보인다 (C and D). 반면 CHRK1 deetiolation된 식물체는 chloroplast가 분해되는 현상을 보이고 많은 storage vacuole이 관찰된다 (E와 F, #203; G와 H, #209 line). 많은 storage vacuole이 축적되는 현상은 cytokinin 배지에서 자란 wild-type 식물체에서도 관찰되는 현상 (C and D)으로 이 실험에서도 역시 CHRK1 형질전환체가 cytokinin phenotype을 cytokinin 없이 보인다는 것을 알수있다.



<그림 13> 암상태에서 키운 식물체의 chloroplast 발생

### 9. 여러 농도의 auxin/cytokinin 배지에서의 organogenesis

cytokinin은 tissue culture 실험에서 shoot 발생을 촉진시키고 root 발생을 억제하는 것이 잘 알려져 있다. CHRK1과 cytokinin 관련성을 좀더 연구하기 위하여 여러 농도의 auxin (IAA)와 cytokinin (BA) 배지에서 hypocotyl segment의 organogenesis를 관찰하였다. 그 결과는 그림 14와 2개의 table에 요약되어 있다. 결론적으로 wild-type (A)에 비하여 CHRK1 형질전환체 (B: #209, C: #210)는 어느 combination의 배지에서도 shoot formation이 촉진된다는 것이다. 더욱이 #210의 경우는 전혀 hormone이 없는 상태에서 shooting이 일어난다 (표 1). 담배의 경우는 tissue segment의 organogenesis에 hormone이 절대적으로 필요하여 CHRK1 형질전환체가 hormone에 독립적으로 organogenesis가 일어난다는 것을 보인다.



<그림 14> 여러 농도의 auxin/cytokinin 배지에서의 organogenesis

<표 1> 여러 농도의 auxin/cytokinin 배지에서의 organogenesis

Line		WT	#203	#209	#210
Hormone					
IAA	BA	(%)	(%)	(%)	(%)
0	0	R (2.7) NR (97.3)	NR (100)	NR (100)	<b>S (21.4)</b> NR (78.6)
	10	R (8.1) NR (91.9)	R (6.7) NR (93.3)	<b>S (3.3)</b> NR (96.7)	<b>S (17.9)</b> NR (82.1)
	100	<b>S (23.1)</b> NR (76.9)	<b>S (46.7)</b> NR (53.3)	<b>S (45.2)</b> NR (54.8)	<b>S (43.3)</b> NR (56.7)
	1000		<b>S (3.3)</b> NR (96.7)	<b>S (3.3)</b> NR (96.7)	<b>S (6.6)</b> NR (93.4)
	3000	NR (100)	NR (100)	NR (100)	NR (100)
10	0	R (67.6) <b>RS (10.8)</b> <b>S (2.7)</b> NR (18.9)	R (6.6) <b>S (10)</b> NR (83.4)	R (43.3) <b>RS (10)</b> <b>S (16.7)</b> NR (30)	R (28.6) <b>RS (7.1)</b> <b>S (17.9)</b> NR (46.4)
	10	R (71.1) <b>RS (15.8)</b> <b>S (5.3)</b> NR (7.8)	R (33.3) <b>RS (10)</b> <b>S (16.7)</b> NR (40)	R (20) <b>RS (16.7)</b> <b>S (33.3)</b> NR (30)	R (16.7) <b>RS (13.3)</b> <b>S (46.7)</b> NR (23.3)
	100	R (2.7) <b>RS (8.1)</b> <b>S (86.5)</b> NR (2.7)	<b>S (83.3)</b> NR (16.7)	<b>RS (3.1)</b> <b>S (81.2)</b> NR (15.6)	<b>S (100)</b>
	1000	<b>S (92.1)</b> NR (7.9)	<b>S (33.3)</b> NR (66.7)	<b>S (21.9)</b> NR (78.1)	C (10) <b>S (70)</b> NR (20)
	3000	<b>S (40)</b> C (2.9) NR (57.1)	NR (100)	NR (100)	<b>S (6.7)</b> NR (93.3)

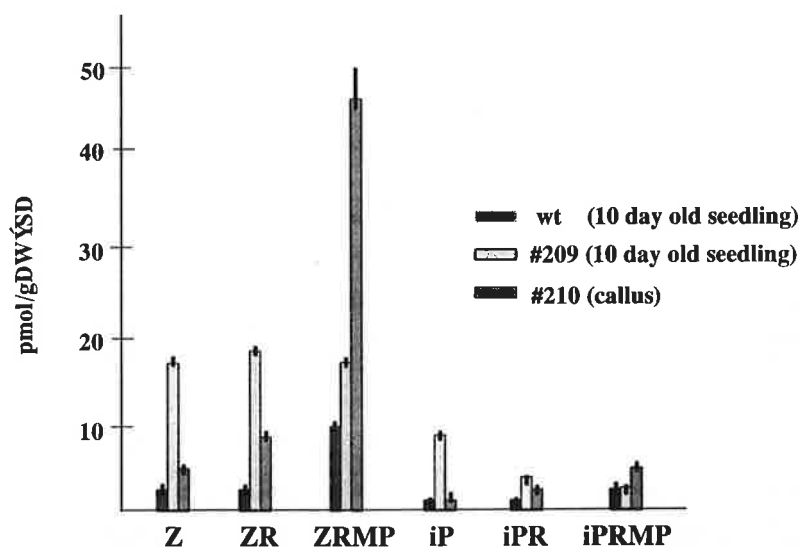
<계속>

Line		WT (%)	#203 (%)	#209 (%)	#210 (%)
Hormone					
IAA	BA				
100 ( $\mu\text{g/L}$ )	0 ( $\mu\text{g/L}$ )	R (78.4) <b>RS (10.8)</b> RC (5.4) <b>S (2.7)</b> NR (2.7)	R (36.7) <b>RS (26.7)</b> <b>S (13.3)</b> NR (23.3)	R (39.4) <b>RS (27.3)</b> RC (18.2) <b>S (9.1)</b> NR (6)	R (10.7) <b>RS (71.4)</b> <b>S (14.3)</b> NR (3.6)
	10	R (37.5) <b>RS (42.5)</b> RC (17.5) <b>SC (2.5)</b>	R (13.3) <b>RS (60)</b> <b>S (13.3)</b> NR (13.3)	R (10) <b>RS (56.7)</b> <b>S (13.3)</b> NR (20)	<b>RS (70)</b> <b>S (30)</b>
	100	<b>RS (52.8)</b> <b>S (36.1)</b> <b>SC (11.1)</b>	<b>S (76.7)</b> <b>SC (16.7)</b> NR (6.6)	<b>S (96.8)</b> RC (3.2)	<b>S (93.6)</b> <b>SC (6.4)</b>
	1000	<b>S (100)</b>	<b>S (93.3)</b> C (6.7)	<b>RS (3.3)</b> <b>S (93.4)</b> NR (3.3)	<b>SC (96.7)</b> C (3.3)
	3000	<b>S (97.2)</b> C (2.8)	<b>S (20)</b> C (80)	<b>SC (93.4)</b> NR (6.6)	<b>SC (76.7)</b> C (23.3)
1000	0	R (7.7) RC (48.7) C (43.6)	R (46.7) <b>RS (36.7)</b> RC (13.3) NR (3.3)	RC (86.8) <b>RS (9.9)</b> C (3.3)	R (25) <b>RS (53.6)</b> RC (21.4)
	10	R (7.7) RC (71.7) <b>RS (5.2)</b> <b>SC (2.6)</b> C (12.8)	R (3.3) RC (23.4) <b>RS (3.3)</b> <b>SC (30)</b> <b>RCS(26.6)</b> C (13.3)	R (3) RC (3) <b>RS (72.7)</b> <b>SC (6.1)</b> <b>S (9.1)</b> C (6.1)	<b>RCS (13.3)</b> <b>RS (43.4)</b> <b>SC (20)</b> <b>S (13.3)</b> NR (10)
	100	RC (5.6) <b>SC (69.4)</b> C (25.0)	<b>RS (6.7)</b> <b>S (76.7)</b> <b>SC (16.6)</b>	<b>S (100)</b>	<b>SC (3.3)</b> <b>S (93.4)</b> C (3.3)
	1000	<b>S (52.8)</b> <b>SC (38.9)</b> C (8.3)	<b>S (6.7)</b> <b>SC (93.3)</b>	<b>S (13.3)</b> <b>SC (86.7)</b>	<b>SC (100)</b>
	3000	<b>SC (55.9)</b> <b>S (44.1)</b>	<b>SC (86.7)</b> C (13.3)	<b>SC (39.4)</b> C (60.6)	<b>SC (96.7)</b> NR (3.3)

[S: Shoot ; R: Root ; C: Callus ; NR: No response ; RS: Root and shoot ; SC: Shoot and callus ; RC: Root and callus ; RCS: Root, shoot, and callus]

## 10. cytokinin measurement

세포 내 cytokinin의 양을 측정하기 위하여 다양한 form의 cytokinin에 반응하는 antibody를 사용하여 ELISA 방법으로 cytokinin 양을 측정하였다. wild-type에 비하여 #209 line은 모든 종류의 cytokinin을 3-5배 함유하고 있었고 #210 line은 trans-zeatinriboside-5'-monophosphate를 특히 높게 함유하고 있었다. 그러나 ethylene 양은 같은 시점에서 잦을 때 wild-type, #209, #210 line에서 큰 차이는 나지 않았다.

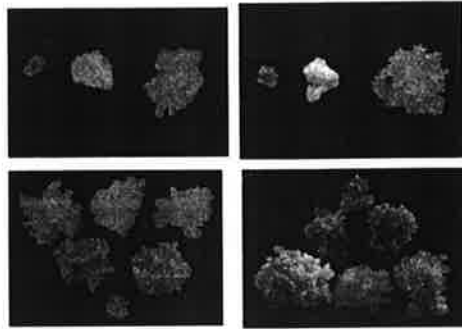


Z: trans-zeatin, ZR: trans-zeatinriboside, ZRMP: trans-zeatinriboside-5'-monophosphate, iP: isopentenyladenine, iPR: isopentenyladenosine, iPRMP: isopentenyladenosine-5'-monophosphate.

<그림 15> 세포내 cytokinin 양 측정

## 11. cytokinin 고농도 배지 위에서의 식물체 반응

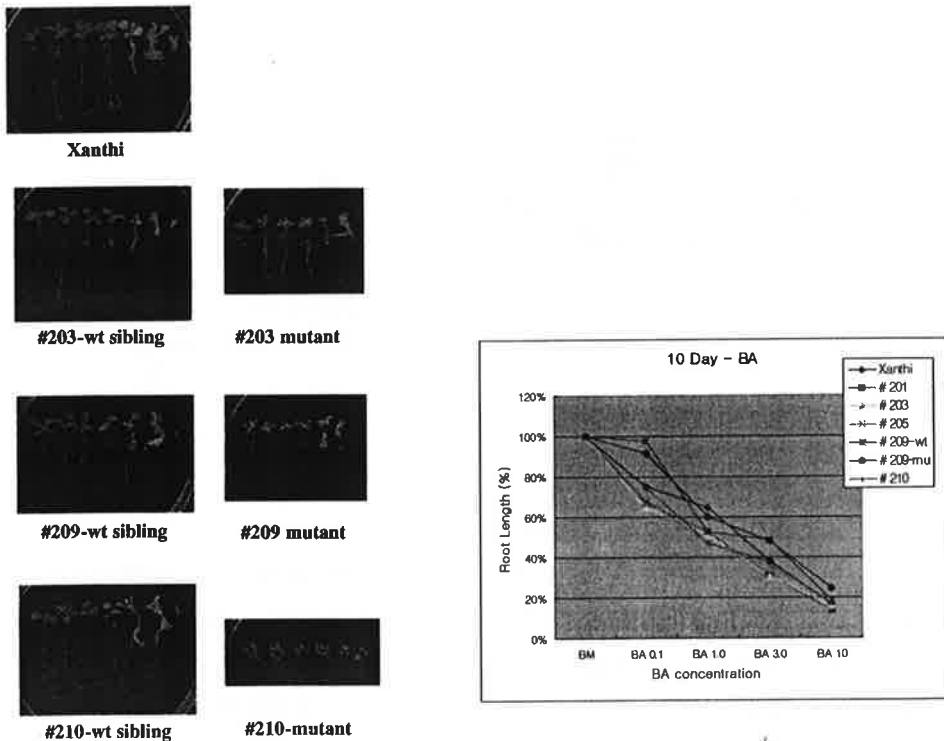
고농도 cytokinin (100 microM BA) 함유 배지에서 적은 수의 wild-type seedling은 캘러스화 하며 그 모습은 CHRK1 형질전환체의 캘러스와 유사하다 (그림 16). CHRK1 형질전환체는 고농도 cytokinin (100 microM BA) 함유 배지에서 massive shoot proliferation이 일어난다 (위왼쪽, wild-type; 위오른쪽, #203; 아래왼쪽, #209; 아래오른쪽, #210). 즉 cytokinin에 대하여 과장된 반응을 보인다.



<그림 16> exaggerated response of CHRK1 transgenic seedlings to cytokinin

### 12. 정상적인 cytokinin sensitivity

형질전환식물체의 cytokinin에 대한 sensitivity를 조사하기 위하여 Root elongation assay를 통하여 여러 농도의 BA에서 root elongation inhibition을 조사하였다. BA 농도는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 microM이다. 각 농도에서의 식물체 모습 변화와 root length를 plot한 것이 그림 17이다.

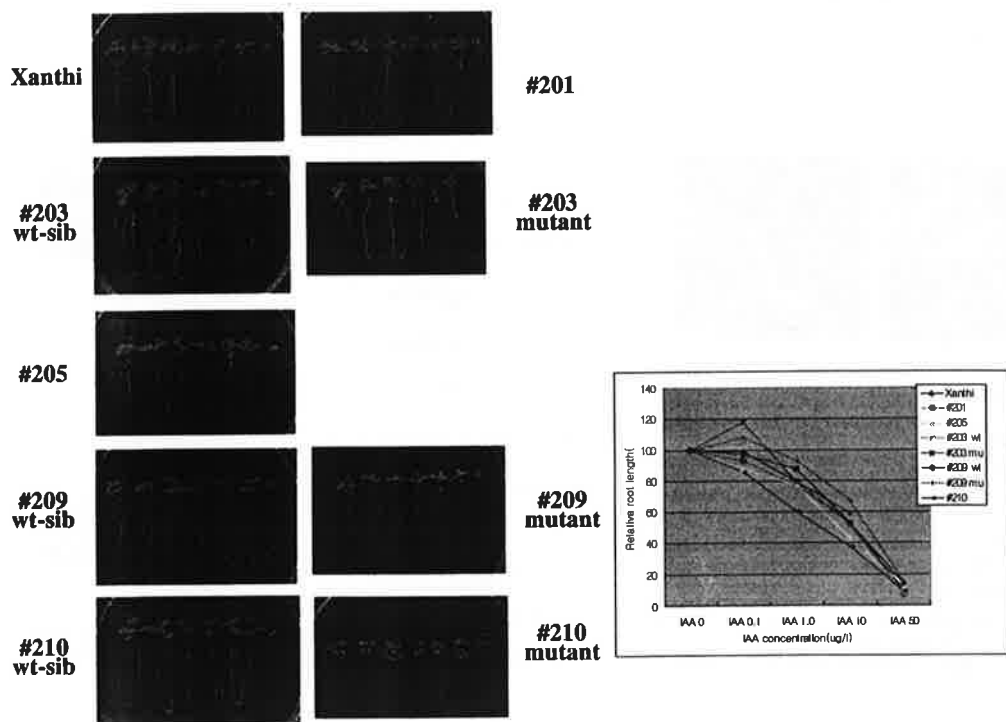


<그림 17> 여러 농도의 BA 배지에서 식물체의 발달과 root length plot

그림 17에 의하면 cytokinin의 농도가 증가하면서 식물생육이 비정상적으로 진행되며 뿌리의 발육이 크게 저해받는 것을 알 수 있다. 그러나 wild-type과 CHRK1 형질전환체 (#201, #201, #205, #209, #210) 간의 root elongation inhibition의 정도는 크게 차이하지 않았다. 즉 cytokinin에 대한 sensitivity는 wild-type과 같았다.

### 13. 정상적인 auxin sensitivity

형질전환식물체의 auxin에 대한 sensitivity를 조사하기 위하여 Root elongation assay를 통하여 여러 농도의 IAA에서 root elongation inhibition을 조사하였다. IAA 농도는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 microM이다. 각 농도에서의 식물체 모습 변화와 root length를 plot한 것이 그림 18이다. 그림 18에 의하면 auxin의 농도가 증가하면서 식물생육이 비정상적으로 진행되며 뿌리의 발육이 크게 저해받는 것을 알 수 있다. 그러나 wild-type과 CHRK1 형질전환체 (#201, #201, #205, #209, #210) 간의 root elongation inhibition의 정도는 크게 차이하지 않았다. 즉 CHRK1 형질전환체의 auxin에 대한 sensitivity는 wild-type과 같았다.



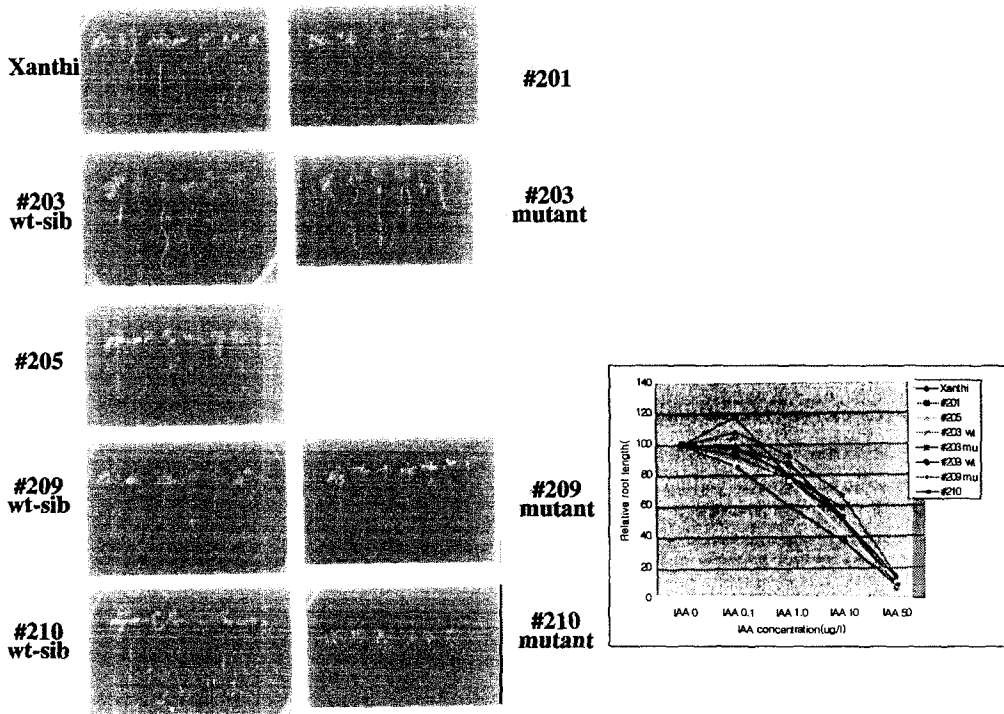
<그림 18> 여러 농도의 IAA 배지에서 식물체의 발달과 root length plot



그림 17에 의하면 cytokinin의 농도가 증가하면서 식물생육이 비정상적으로 진행되며 뿌리의 발육이 크게 저해받는 것을 알 수 있다. 그러나 wild-type과 CHRK1 형질전환체 (#201, #201, #205, #209, #210) 간의 root elongation inhibition의 정도는 크게 차이하지 않았다. 즉 cytokinin에 대한 sensitivity는 wild-type과 같았다.

### 13. 정상적인 auxin sensitivity

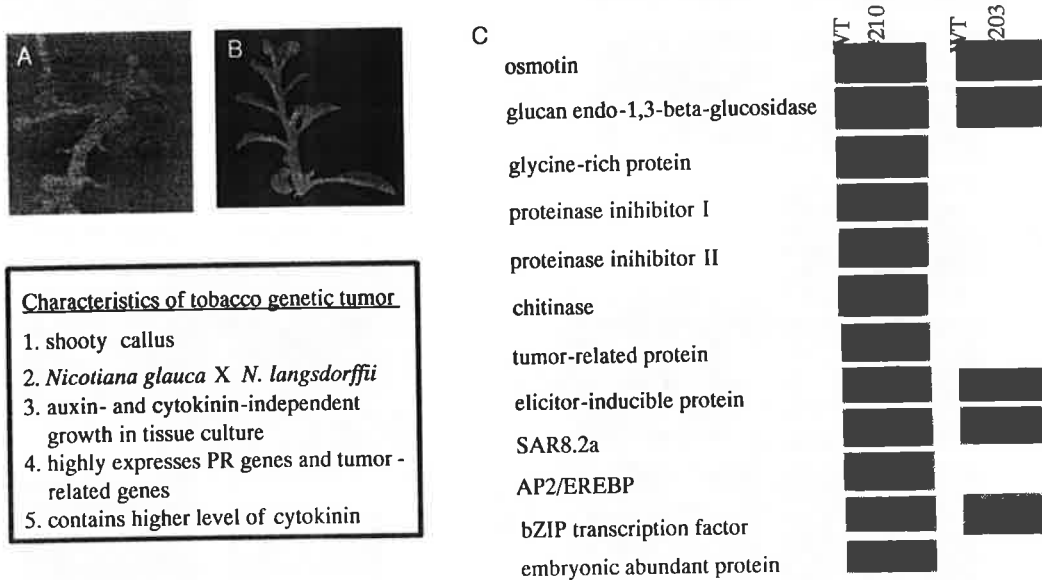
형질전환식물체의 auxin에 대한 sensitivity를 조사하기 위하여 Root elongation assay를 통하여 여러 농도의 IAA에서 root elongation inhibition을 조사하였다. IAA 농도는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 microM이다. 각 농도에서의 식물체 모습 변화와 root length를 plot한 것이 그림 18이다. 그림 18에 의하면 auxin의 농도가 증가하면서 식물생육이 비정상적으로 진행되며 뿌리의 발육이 크게 저해받는 것을 알 수 있다. 그러나 wild-type과 CHRK1 형질전환체 (#201, #201, #205, #209, #210) 간의 root elongation inhibition의 정도는 크게 차이하지 않았다. 즉 CHRK1 형질전환체의 auxin에 대한 sensitivity는 wild-type과 같았다.



<그림 18> 여러 농도의 IAA 배지에서 식물체의 발달과 root length plot

#### 14. CHRK1 캘러스와 tobacco genetic tumor의 유사성

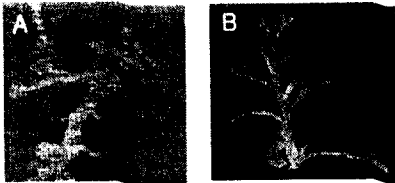
CHRK1 캘러스는 1) shooty callus, 2) hormone-autonomous organogenesis, 3) gene expression profile 면에서 tobacco genetic tumor와 유사하다 (그림 19 A: tobacco genetic tumour; B: CHRK1 callus). tobacco genetic tumour는 *Nicotiana glauca* species 간의 교잡으로 만들어진 hybrid 식물체에서 발생하는데 parent와는 달리 tissue부터 호르몬 없이 organogenesis가 일어나 tumour처럼 성장하는 특징을 가진다. tumour에 높이 발현되는 유전자는 주로 defense에 관련된 PR gene 이고 tumor-related gene 들의 발현도 높다. CHRK1 캘러스의 gene expression 양상을 PCR subtractive cloning과 northern blot analysis로 조사하였다 (그림 18C). 그림에서 보듯이 osmotin, beta-glucosidase, glycine-rich protein, proteinase inhibitor 등 Pathogenesis-Related 유전자들이 #210, #203 callus에서 높이 발현되며 그외 transcription factor들, tumor-related gene과 embryo에서 많이 발현되는 유전자들이 발현된다. 이러한 양상은 tobacco genetic tumour의 gene expression과 매우 유사한 양상이다. 그러므로 CHRK1은 tobacco genetic tumour의 형성에 직간접적으로 영향을 미치지도 모른다.



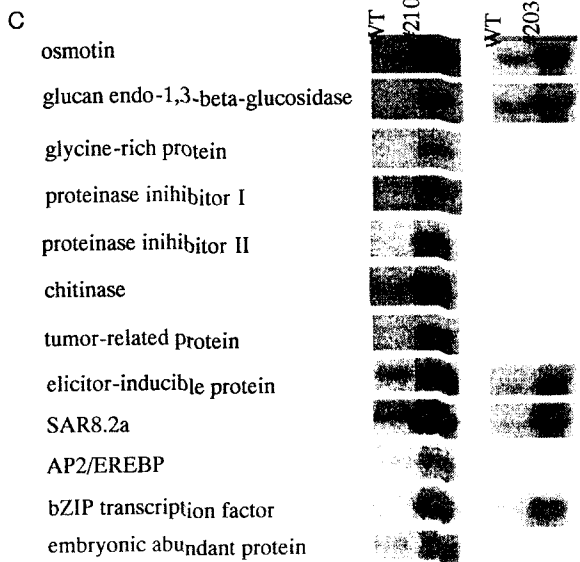
<그림 19> Tobacco genetic tumour와 비교 및 CHRK1 callus의 gene expression

14. CHRK1 캘러스와 tobacco genetic tumor의 유사성

CHRK1 캘러스는 1) shooty callus, 2) hormone-autonomous organogenesis, 3) gene expression profile 면에서 tobacco genetic tumor와 유사하다 (그림 19 A: tobacco genetic tumour; B: CHRK1 callus). tobacco genetic tumour는 Nicotiana species 간의 교잡으로 만들어진 hybrid 식물체에서 발생하는데 parent와는 달리 tissue부터 호르몬 없이 organogenesis가 일어나 tumour처럼 성장하는 특징을 가진다. tumour에 높이 발현되는 유전자는 주로 defense에 관련된 PR gene 이고 tumor-related gene 들의 발현도 높다. CHRK1 캘러스의 gene expression 양상을 PCR subtractive cloning과 northern blot analysis로 조사하였다 (그림 18C). 그림에서 보듯이 osmotin, beta-glucosidase, glycine-rich protein, proteinase inhibitor 등 Pathogeneis-Related 유전자들이 #210, #203 callus에서 높이 발현되며 그의 transcription factor들, tumor-related gene과 embryo에서 많이 발현되는 유전자들이 발현된다. 이러한 양상은 tobacco genetic tumour의 gene expression과 매우 유사한 양상이다. 그러므로 CHRK1은 tobacco genetic tumour의 형성에 직간접적으로 영향을 미치지도 모른다.



- Characteristics of tobacco genetic tumor**
1. shooty callus
  2. *Nicotiana glauca* X *N. langsdorffii*
  3. auxin- and cytokinin-independent growth in tissue culture
  4. highly expresses PR genes and tumor-related genes
  5. contains higher level of cytokinin



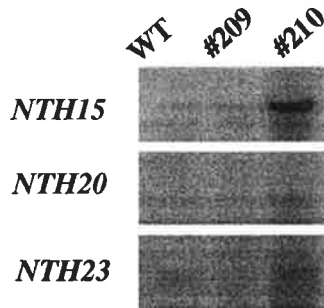
<그림 19> Tobacco genetic tumour와 비교 및 CHRK1 callus의 gene expression

CHRK1 callus는 PR gene이 높이 발현되고 있으며 cell death가 빠르게 진행되고 있다. CHRK1 캘러스를 죽는 세포를 연색할 수 있는 Evans Blue로 staining하였을 때 #210, #203 callus는 짙게 염색 되므로서 callus에서 cell death가 진행된다는 것을 증명하였다 (그림 20 A). 반면 이들 callus는 매우 빠르게 호르몬 없는 배지에서 증식하여 높은 cell division을 보인다. homeobox 유전자들은 shoot meristem등 cell division이 높게 일어나는 tissue에서 특이적으로 발현되는 유전자로 알려져 있다. 세 개의 tobacco homeobox gene의 발현양상을 조사하였을 때 NTH15, NTH20, NTH23 모두 캘러스에서 발현되며 특히 NTH15이 높게 발현된다 (그림 20 B). 이 사실은 CHRK1 callus line은 rapid cell proliferation과 cell death가 동시에 진행된다는 것을 알 수 있다.

A



B



<그림 20> Evans Blue staining과 homeobox gene expression

☆ 결론적으로 CHRK1 suppression mutant는 세포분열이 촉진되었고 세포분화가 감소되어 식물이 비정상적으로 발생되며 세포 내 cytokinin의 양이 크게 증가되었다. 이 사실은 CHRK1의 정상적인 세포내 기능은 세포분열을 control 하므로써 세포가 proliferation에서 differentiation으로 넘어가는 것을 촉진하고 조절하는 것을 시사하고 있다. suppression line 외 CHRK1 overexpressing line (35S-CHRK1-myc)과 PR1 promoter에 의해 조절되는 PR1-GST-CHRK-K expression line들은 T0, T1, T2 세대에 크게 비정상적인 형질은 없었으며 병저항성의 증가도 보이지 않았다. CHRK1 과대발현 형질전환체들 중 몇 line은 키생장이 부분적으로 저해되고 잎의 형태가 작고 길쭉하였다. 이 현상의 분자적 기작에 관하여 현재 연구가 진행 중이다.

# 위탁연구과제

## 벼 형질전환용 Receptor Kinase 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환

연구기관 : 명지대학교

연구책임자 : 김 주 곤

연구원 : 장 인 철

연구원 : 박 미 옥

여 백

# 위탁 연구 과제

## 벼 형질전환용 Receptor kinase 유전자 함유 운반체 개발 및 벼 형질전환

### 제1절 서설

#### 1. 곰팡이 병 저항성 유전자 함유 형질전환 식물체

식물체가 병원체의 침입을 인지하였을 때 그 침입을 국소화 시키기 위해 여러 종류의 방어 메커니즘을 발현하게 되는데 callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase 등의 방어관련 유전자의 발현등이 포함된다. 최근 수년간 식물체의 항병원성 유도 및 발현에 관한 세포적 분자적인 기작연구에 많은 발전이 이루어졌으며 특히 최근의 분자생물학과 식물형질전환기술의 발전에 힘입어 병원체침입의 인지로부터 식물방어체제 유도를 연결하는 신호전달 메커니즘에 관하여 많은 연구 결과가 축적되고 있다. 이러한 분야의 커다란 발전에도 불구하고 아직 가장 핵심적인 의문점들이 그대로 남아있다. 예를 들면 방어기작을 유도하는 신호전달체계에 관한 세포막 receptor의 역할, 관련 분자신호의 기능, 조절 및 전달, 효과적인 저항성에 관련된 2차대사산물의 기능 등을 들수 있다.

식물체가 본질적으로 갖고있는 이러한 방어전략을 이용 혹은 강화하여 곰팡이에 내성을 갖는 식물체를 개발하기 위한 노력이 경주되어 왔는데 chitinase, glucanase 등의 방어관련 단백질들을 식물체에 과대발현하는 것등이 그 대표적인 예이다. 병원균의 공격에 의해 유도되는 chitinase 및  $\beta$ -1, 3-glucanase와 같은 가수분해 효소를 담배, 알팔파, 감자 및 벼를 비롯한 몇몇 식물체에서 분리하였고 (Brogie, 1986; Jones, 1986; Mauch, 1989; Zhu, 1991), 강낭콩으로부터 분리된 chitinase 유전자를 담배에 형질전환하여 *Rhizoctonia solani*에 내성 조사를 하였다 (Brogie, 1991). 최근에는 벼의 chitinase와 알팔파의 glucanase의 유전자를 담배에



서 동시에 발현시켜 *Cercospora nicotianae*에 어느정도 내성을 나타내었다. (Zhu, 1994). *Serratia marcescens*로부터 분리된 키틴 가수분해 효소 유전자를 담배에 도입하고 세포안과 밖에서 각각 발현되도록 함으로써 포장시험에서 *Rhizoctonia solani*에 대한 내성을 조사하였다 (Howie, 1994). 그러나 그러한 노력들은 거의 모두가 실패로 돌아갔고 성공한 경우라하여도 그 효과가 미미하여 실용화단계에 이르지 못했다. 결국 다년간의 시도를 통해 도달한 결론은 한 두가지의 방어관련 단백질의 발현을 통해서도 실용화시킬 정도의 곰팡이 내성을 얻을 수 없다는 사실이다. 즉 식물체가 병원체의 침입에 대응하는 총체적인 방어기작을 이용해야만이 높은 내성을 얻을 수 있으리라 사료된다.

최근의 식물-병원체 상호작용에 관한 연구도 병원체 침입의 신호를 식물체가 어떻게 인지하여 그 신호가 세포내에서 어떻게 전달되어 downstream의 방어관련 유전자의 발현으로 연결되는지에 초점을 맞추고 있다. 그러므로 유전공학을 이용하여 식물체가 병원체 침입의 신호를 더 빨리 인지하게하고 더 강력한 방어기작을 활성화시키는 전략은 높은 내성을 얻는데 가장 탁월한 전략이라 사료되며 전 세계적으로 그의 활발한 시도가 이루어지고 있다.

## 2. 벼 형질전환 연구

유전자 전입 발현에 의한 식물 형질 전환 방법이 1983년부터 개발되어 1986년부터 포장 실험이 실시 되었고 1997년까지 세계적으로 3800여종의 형질전환 작물이 포장시험 중이며 이중 50여종이 이미 상품화 되어 농장에서 재배되고 있다 (James, 1997). 그러나 대부분 유채, 토마토, 감자 등 쌍자엽 식물에 국한되어 있으며 주요 곡물인 밀, 옥수수, 벼 등 단자엽 식물의 경우는 매우 제한적으로 개발되고 있고 특히 벼의 경우는 아직 상업화 단계에 이른 것은 전세계적으로도 한건도 기록되지 않고 있다. 형질 전환 벼의 경우 현재 포장시험 중인 것은 제초제 저항성을 비롯해서 여러 개가 있으며(97 록펠러 재단 벼 유전공학 심포지움 발표, 말레이시아) 국내에서도 농촌진흥청과 공동으로 본 연구팀에서 개발된 제초제 저항성 벼가 개발되어 포장시험까지 마치고 품종으로서의 이용 가능성을 검토하고 있다.

벼 형질전환에 사용되는 기술은 현재 유전자 총 (Particle Gun) 이용법이 널리 사용되고 있으며 (Kim et al, 1994) 최근에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법이 개발되어 있고 (Hiel et al, 1994) 국내에서도 이미 형질전환기술이 정착되어 있다

(Lee et al, 1998; Kim et al., 1998; Jang et al., 1998). 벼 형질전환 기술이 보급되면서, Bt toxin유전자 (Fujimoto et al, 1993) 혹은 Proteinase inhibitor 유전자 (Ray Wu et al, 1994)를 이용한 내충성 벼, chitinase 유전자 도입에 의한 내병성 벼 (Lin et al, 1995), RIP유전자 도입 및 제초제 저항성 벼 (Kim et al, 1998) 등이 개발되어 포장시험중에 있다. 단자엽과 쌍자엽 식물간의 유전자 조절 기작이 서로 상이함으로 단자엽에서 발현 활성이 높은 Actin promoter와 최근 김주곤박사 연구팀에서 개발된 벼 rbcS promoter 및 rbcS promoter에 엽록체 transit peptide가 연결된 것을 사용하면 도입유전자 유래 단백질양이 벼 잎조직에서 총 가용성 단백질의 50%까지 생산됨을 확인하였음(Jang et al., 1998). 또한 과기처 선도기술개발과제로 수행된 벼 게놈연구에서(책임자 은무영 1994 - 1997년 3개년간) 6,000개의 미속종자 발현 유전자를 개발 확보하였고 이중 400여종의 유전자의 기능이 확인되어 있어서 벼의 분자생물학적인 정보가 많이 축적되어 있음.

### 3. 연구목표 및 내용

본 연구에서는 유전공학을 이용하여 식물의 다각적인 자기방어체계를 활성화시키므로써 곰팡이버에 대한 저항성을 도입하려는 새로운 시도로서 우리의 주곡작물인 벼를 대상으로 도열병 등 곰팡이병 저항성을 가진 벼 품종 개발을 목표로 하였다. 곰팡이가 식물에 침입할 때 식물의 방어기작을 유도하는 chitooligosaccharide 신호의 receptor의 성질을 가지는 담배유래의 kinase CHRK1와 그의 변형체 (CHRK-K)의 유전자를 벼 유전자 프로모터에 연결하여 벼 캘루스에 형질전환시킨 후 형질전환체를 선발 도입유전자의 존재 및 발현을 확인하고 도입유전자의 다음세대로의 유전양상을 검색하였다.

## 제2절 벼 형질전환용 운반체 제작

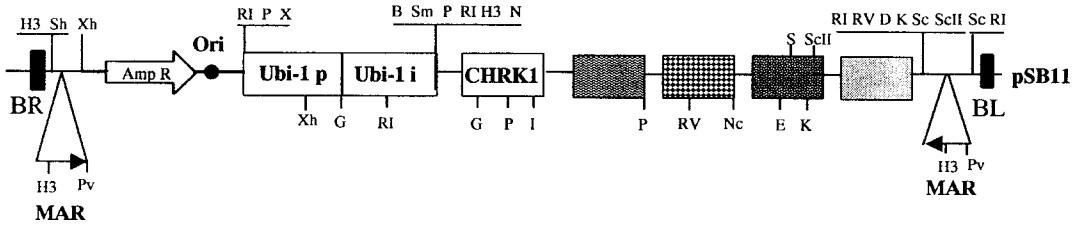
CHRK1은 N-terminal에 chitinase를, C-terminal에 kinase domain을 가지는 receptor kinase로서 chitooligosaccharide 신호의 receptor로서의 성질을 가진다. 즉 CHRK1의 chitinase domain은 ligand인 chitin oligomer와 polymer에 결합하며 chitin elicitor에 의해 autophosphorylation된다. 그러므로 CHRK1은 세포밖에 노출되어 있

는 chitinase domain을 통해 곰팡이 세포벽에서 유래된 chitin과 결합하여 kinase domain을 활성화시키므로써 곰팡이 침입 신호를 세포안으로 전달하여 다각적인 방어 체계 (callose 및 lignin 합성을 통한 세포벽 강화, phytoalexin 축적, 활성산소 생성, proteinase inhibitor, chitinase, glucanase등)의 방어관련 유전자의 발현을 활성화시킨다고 생각된다.

최근 도입유전자의 발현수준이 염색체내 도입부위에 따라 크게 차이가 나타나는 것으로 알려져 있고(Position effect) 따라서 적정수준으로 발현되는 형질전환 식물을 얻기 위해서는 많은 수의 형질전환 개체를 얻은 후 발현분석에 의해 선발하는 수동적인 방법이 사용되어 왔다. 또한 도입유전자가 형질전환 식물체의 세대가 계속되면서 발현을 중지하는 등 발현양상이 달라지는 현상이(gene silencing) 발견되었고 이것은 많은 경우 40% 이상의 자식세대가 영향을 받는 것으로 알려지고 있어서 형질전환 작물을 만들 때 중요한 고려사항이다. 본 연구팀에서는 최근에 이러한 도입유전자 발현의 불안정성을 줄이기 위한 방안으로 닭에서 분리된 MAR (Matrix attachment region)sequence를 형질전환 운반체에 연결하여 확인한 결과 확실한 차이를 보이고 있기 때문에 CHRK1 형질전환운반체 제작시에 MAR를 이용코자 한다.

본 연구에서는 우리의 주곡작물인 벼를 대상으로 도열병 등 곰팡이 병 저항성을 가진 벼 품종을 개발하기 위하여 CHRK1의 유전자를 벼에 도입, 항시 발현시킴으로써 곰팡이의 식물체로의 침투를 식물체가 더 빨리 인지하여 식물본연의 방어체계를 좀더 신속하게 작동하게 하는 운반체 pMJ-UC (그림 1. A)를 제작하였으며 CHRK1 단백질이 항시 활성을 갖는 형태로 그 유전자를 변형시키고, 그 변형유전자를 여러 pathogen이 침입할 시 유도되는 pR1a 프로모터에 연결시킨 운반체 pMJ-PC (그림 1. B)를 제작, 벼에 도입함으로써 어떠한 곰팡이 신호시 식물 방어체계에 관계된 여러 유전자들을 활성화시킴으로써 곰팡이에 내성을 가진 벼를 개발하고자 한다. 이들 운반체의 특징은 MAR sequence를 BR 및 BL 안쪽부위에 장착함으로써 도입유전자의 안정적인 발현을 유도할 수 있고 더 나아가서는 copy number-dependent 한 유전자 발현을 기대할 수 있다. 또한 Ampicillin 저항성을 갖는 대장균 플라스미드를 BR/MAR 안쪽에 갖고 있기 때문에 형질전환 벼를 개발 한 후에 도입유전자 (transgene)의 염색체내 위치를 결정하는데 필요한 flanking DNA 분리가 매우 용이하게 고안되었다.

(A) pMJ-UC



(B) pMJ-PC

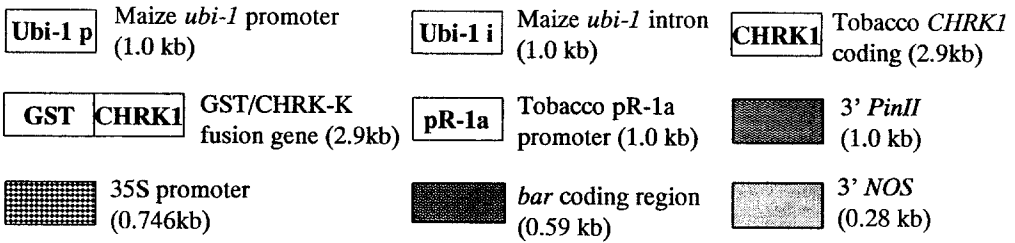
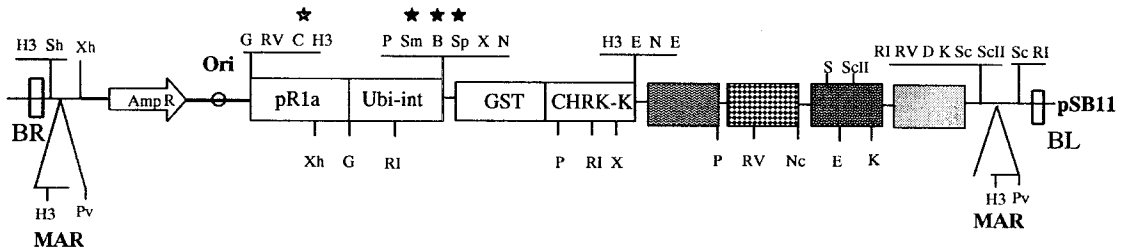


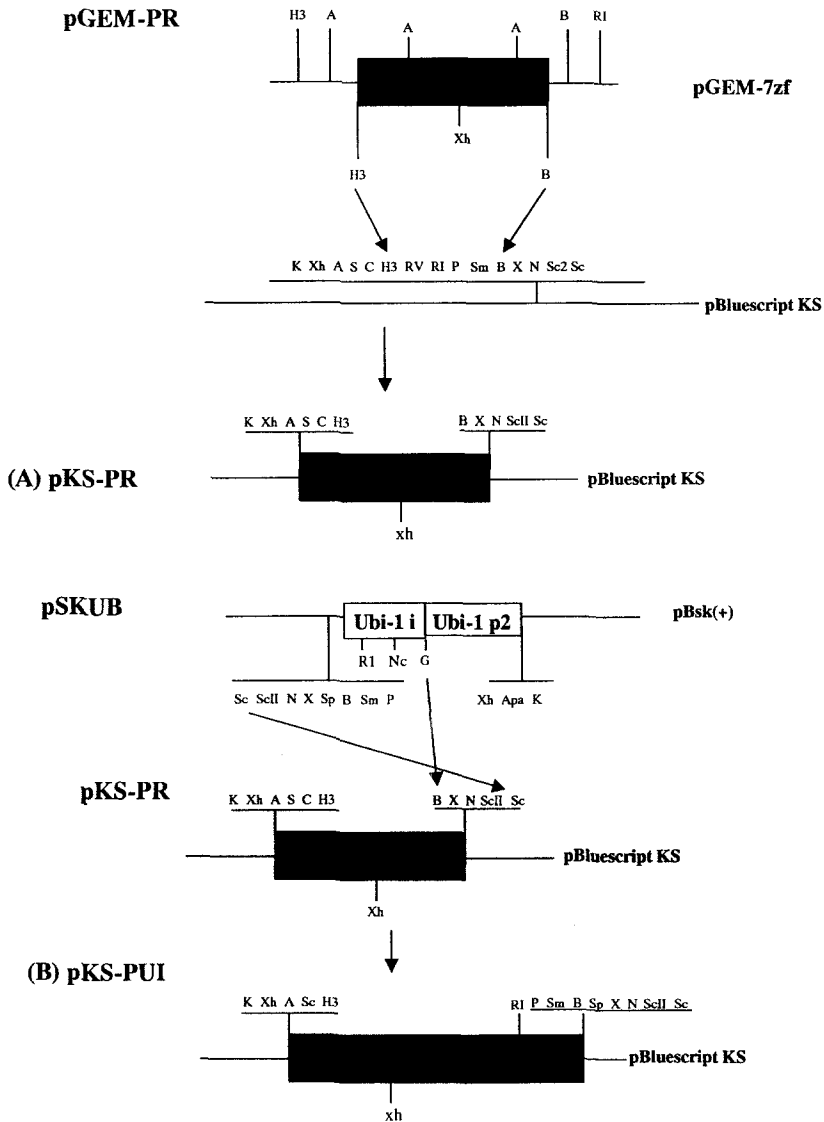
그림 1. Construction of pSBM-UC (A) and pSBM-PC (B)

## 1. pR1a 프로모터를 이용한 CHRK-K 유전자 운반체 pMJ-PC 제작

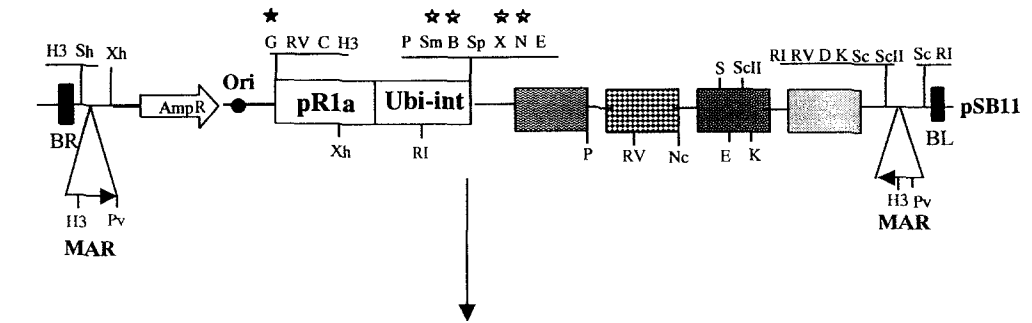
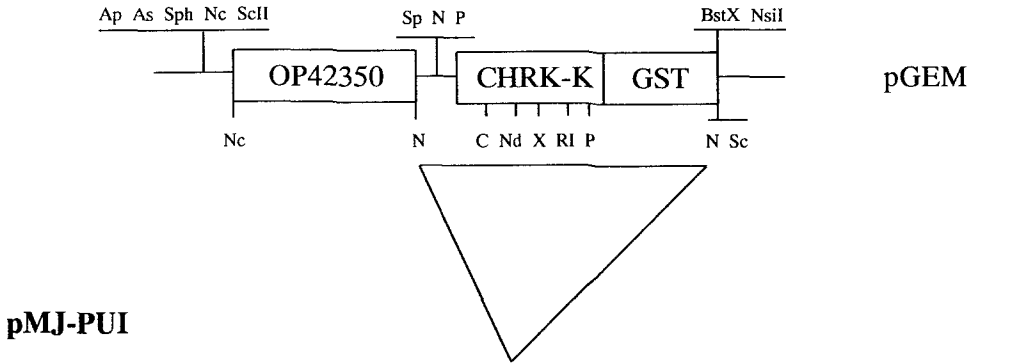
pMJ-PC는 pMJ-UC와 같은 과정으로 외래 유전자를 도입시킬 수 있는 BR 및 BL내에 MAR sequence를 장착하고 BR/MAR 안쪽에 Ampicillin 저항성을 갖는 대장균 플라스미드가 연결되고, 담배의 pR-1a 프로모터에 옥수수 *Ubi-1* intron과 GST/CHRK-K fusion 유전자가 연결되어 있으며 terminator로서는 *PinII* terminator를 사용하였고 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 CaMV 35S 프로모터와 *NOS* terminator에 연결시키고자 한다. 이 운반체의 특징은 여러 pathogen이 식물체에 침입시 항시 활성을 갖는 형태로 변형시킨 GST/CHRK-K fusion 유전자가 발현되 식물방어체계를 항시 활성화시킬 수 있는 장점을 가지고 있고 도입유전자의 염색체내 위치를 결정하는데 필요한 flanking DNA 분리가 매우 용이하다. 일반적으로 쌍자엽의 프로모터가 단자엽 식물에서는 발현수준이 낮기 때문에 쌍자엽인 담배의 pR-1a 프로모터에 단자엽인 옥수수의 *ubi-1* intron부분을 연결시킨 프로모터를 사용해 GST/CHRK-K fusion 유전자가 높은 수준으로 발현될 것으로 기대한다. 또한 항시 활성을 갖는 형태로 kinase domain만을 함유하고 있는 CHRK-K는 GST(glutathione S-transferase) tag와 fusion되어 있어서 GST/CHRK-K을 순수 정제하여 CHRK-K에 대한 항체를 만드는데 이용할 수 있다. 본 연구에서는 여러 pathogen이 식물체에 침입시 항시 활성을 갖는 형태로 변형시킨 GST/CHRK-K fusion 유전자가 발현되 식물방어체계를 항시 활성화시켜 다양한 곰팡이에 내성을 가진 벼를 만들하고자 하였다. 또한 제초제 저항성 유전자를 연결함으로써 식물체가 어느 정도 성장하였을 때 선발 marker로 사용할 수 있을 뿐 아니라 실제 농업에 적용되었을 때도 형질전환체를 구별하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

pMJ-PC 운반체 제작의 전체적인 과정은 pGEM-PR을 제한효소인 *HindIII*와 *BamHI*으로 자른후 이것을 제한효소인 *HindIII*와 *BamHI*으로 자른 것과 연결반응시켜 pKS-PR을 만들고 (그림 2A) pSKUB내에 함유된 *Ubi-1* intron 부분을 제한효소인 *BglII*와 *SacI*으로 자른후 이것을 *BamHI*과 *SacI*으로 자른 pKS-PR과 연결반응시켜 pKS-PUI를 만든다음 (그림 2B) 이것을 *ClaI*과 *BamHI*으로 자른후 *ClaI*과 *BamHI*으로 자른 pMJ21과 연결반응시켜 pMJ-PUI를 만든다 (그림 2C). pGEM-CHRK-K를 제한효소인 *SacI*과 *XhoI*으로 자른후 이것을 OP42350을 *SacI*과 *XhoI*과 compatible end인 *SalI*으로 자른것과 연

결반응시켜 CHRK1 유전자의 3' 말단에 *Xho*I site를 없애고 *Not*I site가 생긴 OGC를 만들고 (그림 2D) 이것을 제한효소인 *Not*I으로 자른후 *Not*I으로 자른 pMJ-PUI와 연결 반응시켜 최종적으로 pMJ-PC 운반체를 만들고자 한다 (그림 2E). 현재까지 수행한 연구내용을 구체적으로 기술하면 다음과 같다.



# OCG



## (E) pMJ-PC

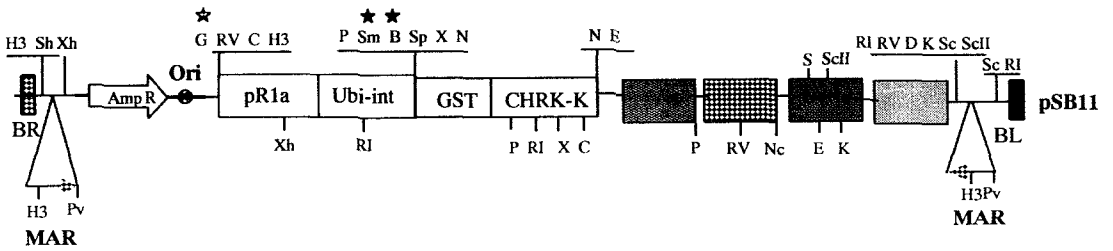


그림 2. Construction of pKS-PR (A), pKS-PUI (B), pMJ-PUI (C), OCG(D), and pMJ-PC(E)

가. pKS-pR 제작

pGEM-pR1a 플라스미드 DNA안의 1.8kb 담배 pR-1a 프로모터를 제한효소인 *Hind*III와 *Bam*HI으로 잘라내고 pBluescript KS 플라스미드 DNA를 제한효소인 *Hind*III와 *Bam*HI으로 잘라내 T4 DNA ligase로 연결반응시켜 제한효소인 *Hind*III와 *Bam*HI으로 잘라 1.8kb DNA 절편을 확인했고 이를 pKS-pR이라 명명했다 (그림 3A, B).

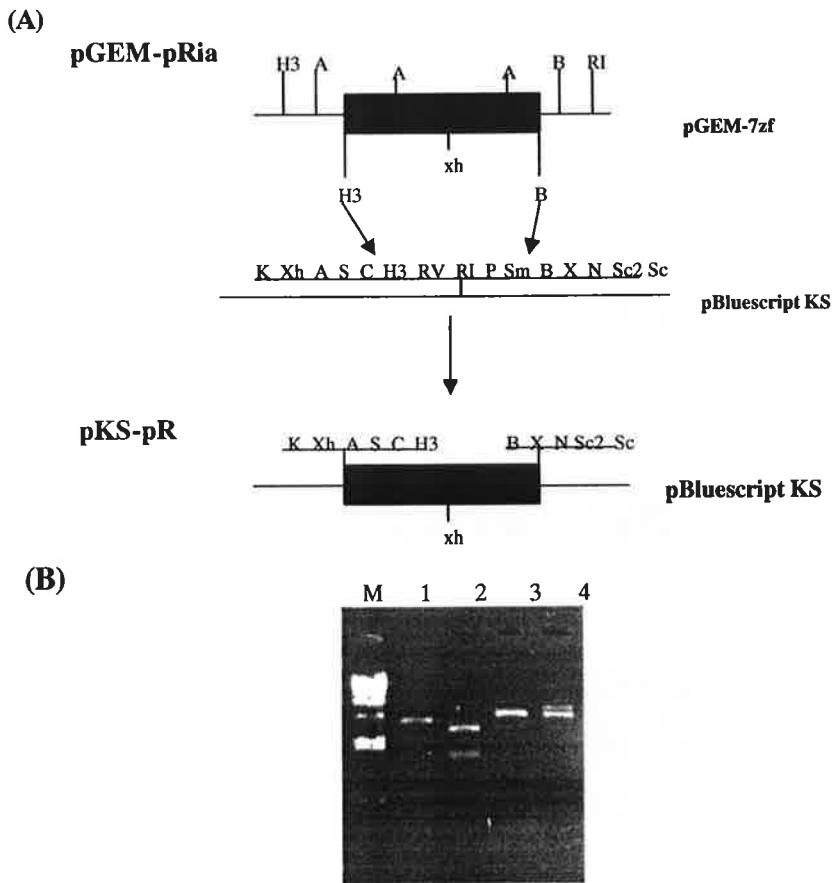


그림 3.construction of pks-pR(A) and Restriction map of pKS-pR  
M: lamda/Hind3, 1: Xho1, 2:Hind3+BamH1, 3:BamH1, 4:HinD3



나. pKS-PUI제작

먼저 제작된 pKS-pR 플라스미드 DNA안의 1.8kb 담배 pR-1a 프로모터를 제한효소인 *SacI*과 *BamHI*으로 잘라내고 pBluescript KS 플라스미드 DNA내의 옥수수 Ubi-1 intron 부분을 제한효소인 *BglII*와 *SacI*으로 잘라내어 T4 DNA Ligase로 연결 반응시켜 제한 효소 *SalI*과 *PstI*으로 잘라 확인 이를 pKS-PUI라고 명명했다. (그림4-A,B)

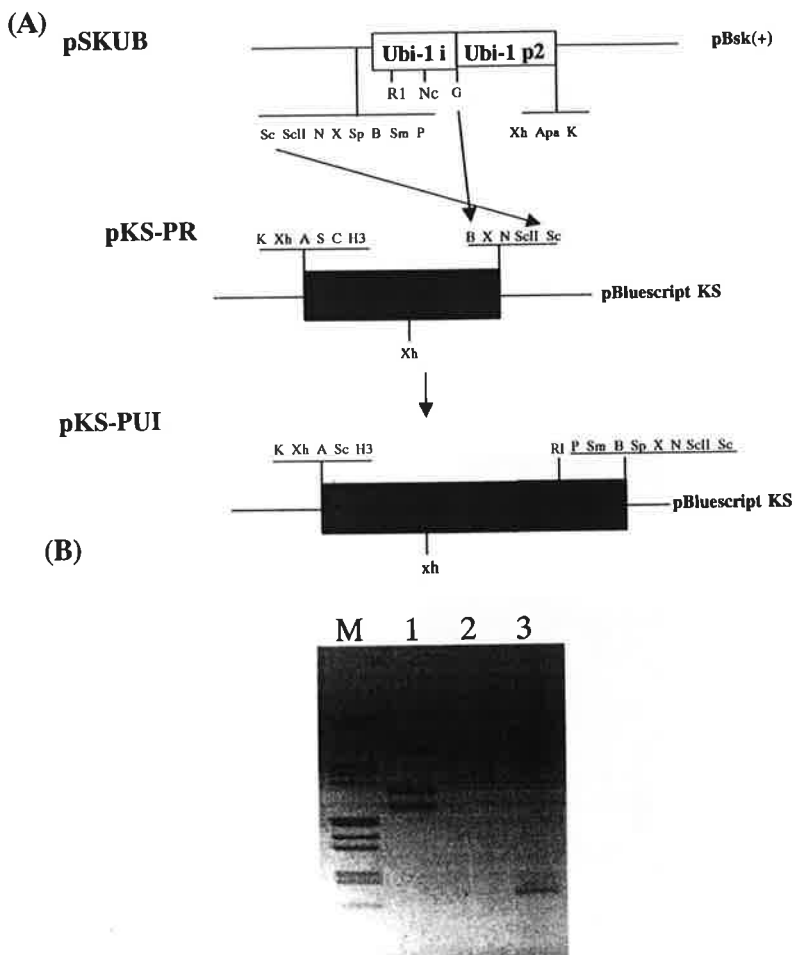
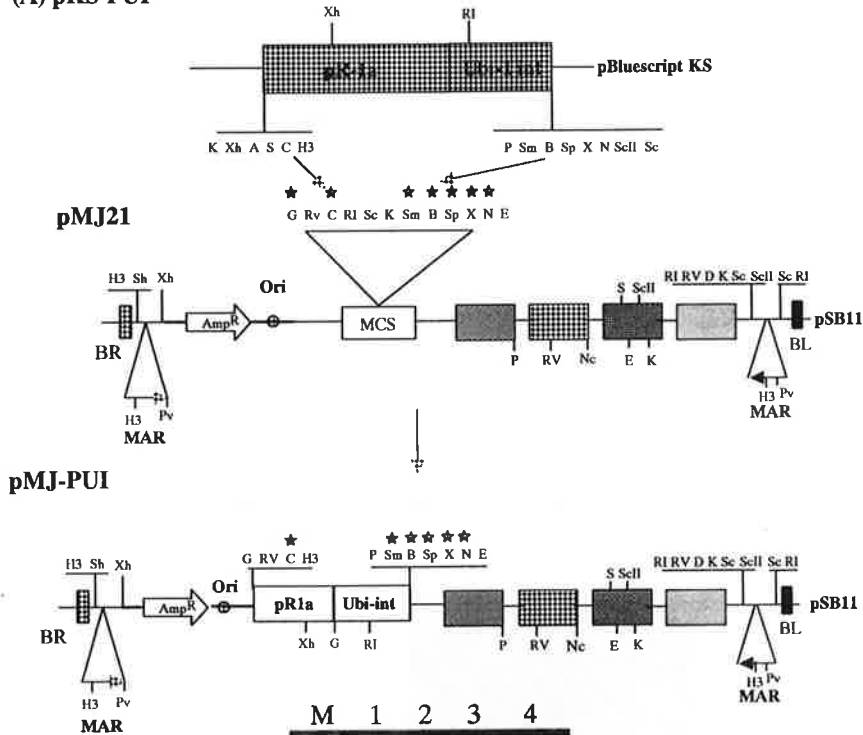


그림 4. Construction of pKS-pUI (A) and Restriction map of pKS-pUI(B)M: lamda/HindIII+EcoRI, 1: uncut, 2;SalI +EcoRI, 3; XhoI+EcoRI

다. pMJ-PUI 제작

먼저 제작된 pKS-PUI 플라스미드 DNA안의 2.9kb pKS-PUI 유전자를 제한효소인 BamHI과 Cla I으로 잘라내고 pMJ-21 vector를 제한효소인 BamHI과 ClaI으로 잘라내 T4DNA Ligase로 연결 반응시켜 제한효소 NcoI으로 잘라 2.7kb DNA절편을 확인했고 이를 pMJ-PUI라고 명명했다(그림 5A, B).

(A) pKS-PUI



(B)



그림 5. Construction of pMJ-pUI (A) and Restriction map of pMJ-PUI (B)  
M: size maker, 1:Uncut, 2: Nco I, 3: Cla I + Xba I, 4: Xho I + Not I

라. OCG 제작

대장균으로부터 추출한 pGEM-CHRK-K 플라스미드 DNA안의 2.3kb 담배에서 유래한 GST/CHRK-K fusion-유전자를 제한효소인 *Soc1*과 *Xho1*으로 잘라내고 OP42350 플라스미드 DNA를 제한효소인 *Soc1*과 *Sa11*으로 잘라내 T4 DNA Ligase로 연결반응시켜 제한효소인 *Not1*으로 잘라 2.3kb DNA 절편을 확인했고 OCG이라 명명했다 (그림 6A, B).

(A) pGEM-CHRK-K

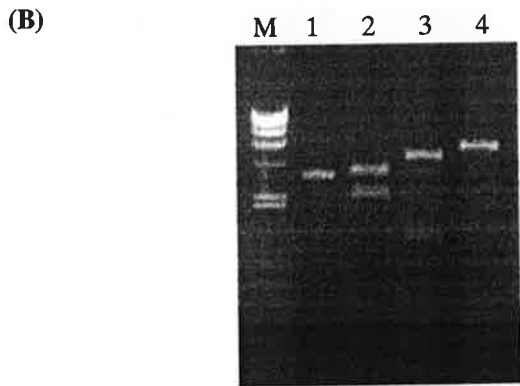
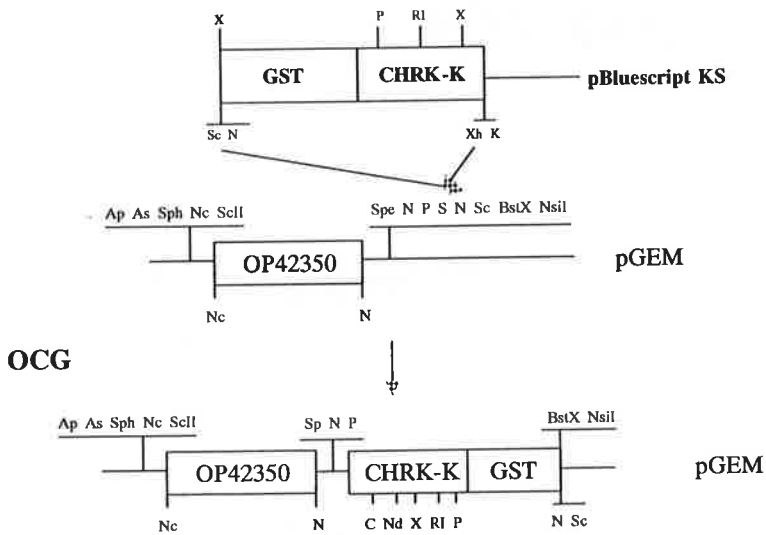


그림 6. Construction of OCG (A) and Restriction map of OCG (B)  
M: size maker, 1:Uncut, 2:Not I, 3: Pst I, 4: EcoR I

마. pMJ-PC 제작

먼저 제작된 OCG 플라스미드 DNA안의 2.3kb GST/CHRK-K fusion유전자를 제한효소인 Not1으로 잘라내고 전 단계에서 만들어진 pMJ-PUI 플라스미드 DNA를 제한효소인 Not1으로 잘라내 T4DNA Ligase로 연결 반응시켜 제한효소Nco11으로 잘라 4.9kb DNA절편을 확인했고 이를 pMJ-PC라고 명명했다(그림 7A, B).

(A) OCG

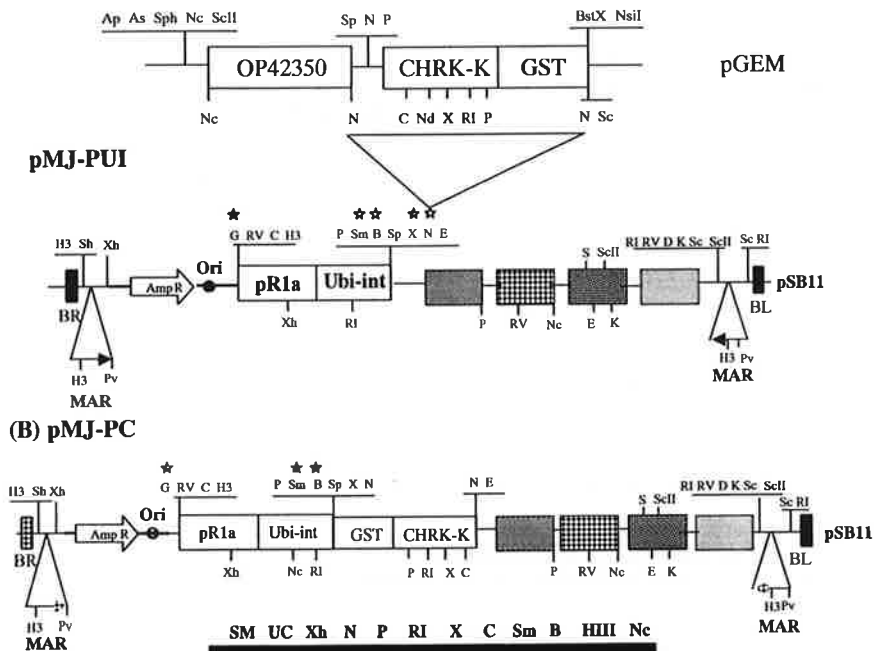


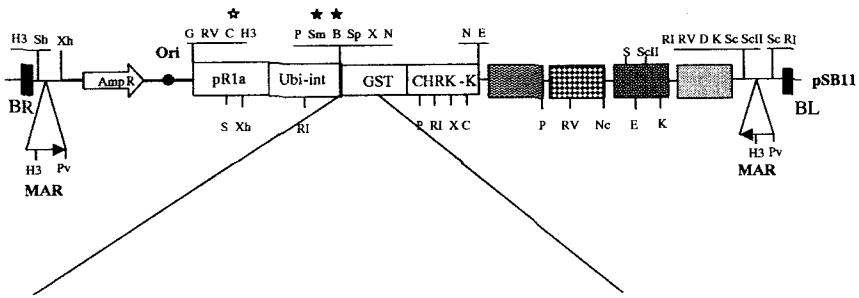
그림 7. Construction of pMJ-PC(A) and Restriction map of pMJ-PC (B)

SM: lambda/HindIII UC : Uncut, Xh: Xho I, N: Not I, P: Pst I, RI: EcoR I, X: Xba I, C : Cla I, Sm: Sma I, B: Bamh I, HIII : HindIII, Nc : Nco I

## 2. Ubi intron과 GST/CHRK-K fusion 유전자의 연결부위의 염기서열 확인

염기서열을 확인을 위한 실험은 Ubi-intron 3' 쪽으로 100base 떨어진 지점에 19개의 염기로 구성된 primer(GCCCTACCTTCATACGCTA)를 제작하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석결과 Ubi intron과 GST/CHRK-K fusion 연결부위가 일치한 결과를 나타내었다. (그림 A)

(A)pMJ-PC



Query: 70 gataacaatttcacacaggvaacagttatcatgtcccctatactagggttattgaaaatt 129  
Sbjct: 228 gataacaatttcacacaggaaacagttatcatgtcccctatactagggttattgaaaatt 287

Query: 130 aaggccctgtgcaaccactcgactcttttgaatatcttgaagaaaaatgaagag 189  
Sbjct: 288 aaggccctgtgcaaccactcgactcttttgaatatcttgaagaaaaatgaagag 347

Query: 190 catttgatgagcgcgatgaaggatgataaatggcgaacaaaaagtgtgattgggttg 249  
Sbjct: 348 catttgatgagcgcgatgaaggatgataaatggcgaacaaaaagtgtgattgggttg 407

Query: 250 gagtttcccaatctccttattatattgatggatgattaaattaacacagctctatggcc 309  
Sbjct: 408 gagtttcccaatctccttattatattgatggatgattaaattaacacagctctatggcc 467

Query: 310 atcatacgttatatagctgac -agcacaacatgttgggtggttgcctcaaaagacgtgca 368  
Sbjct: 468 atcatacgttatatagctgacaagcacaacatgttgggtggttgcctcaaaagacgtgca 527

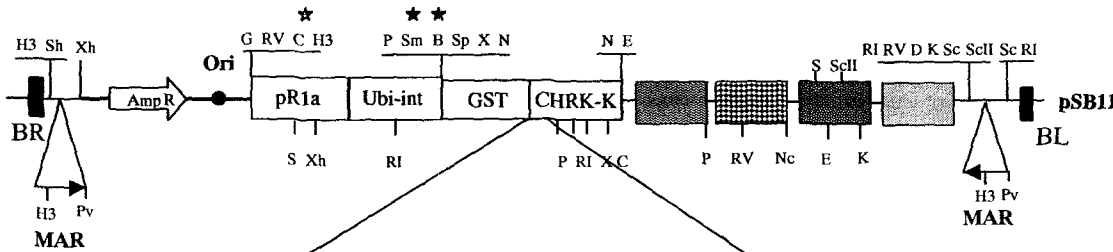
Query: 369 gagattcaatgcttgaaggacgggttttgatattagatacgggtttcgagaattgca 428  
Sbjct: 528 gagattcaatgcttgaaggacgggttttgatattagatacgggtttcgagaattgca 587

Query: 429 tatagtaaagactttgaaactcctcaaagttgatttctt 467  
Sbjct: 588 tatagtaaagactttgaaactcctcaaagttgatttctt 626

### 3. GST와 CHRK-K fusion 부위의 염기서열 확인

염기서열을 확인을 위한 실험은 GST 3' 쪽으로 100base 떨어진 지점에 18개의 염기로 구성된 primer(AGGGCTGGCAAGCCACGT)를 제작하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석결과 GST와 CHRK-K fusion부위가 일치한 결과를 나타내었다. (그림 B)

(B)pMJ-PC



Query: 70 atgaggtcacacttgctcaaagttacagcatgtcaatgttctacaacttcagggatgtt 129  
 Sbjct: 1745 atgaggtcacacttgctcaaagttacagcatgtcaatgttctacaacttcagggatgtt 1804

Query: 130 gcactgaaagagaagagaagatactkatttatgagtacatgccaaataaaagttggatt 189  
 Sbjct: 1805 gcactgaaagagaagagaagatactgatttatgagtacatgccaaataaaagttggatt 1864

Query: 190 tctacctttacgmtccagttacagagcctgcagttagattgtggagacgcgggttcgtat 248  
 Sbjct: 1865 tctacctttacgattccagttacagagcctgcagttagattg -ggagacgcgggttcgtat 1922

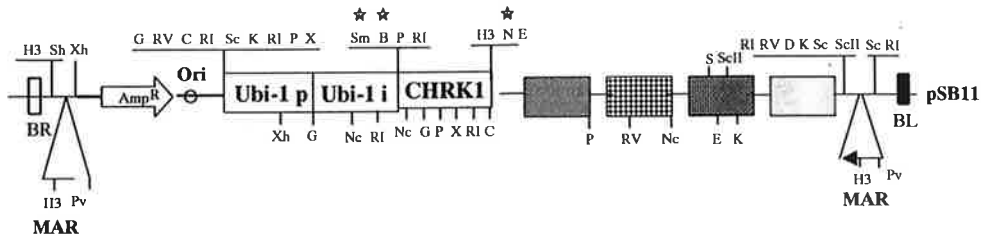
#### 4. 항시발현 프로모터를 이용한 CHRK1 유전자 운반체 pMJ-UC 제작 및 확인

pMJ-UC는 외래 유전자를 도입시킬 수 있는 BR 및 BL내에 MAR sequence를 장착하고 BR/MAR 안쪽에 Ampicillin 저항성을 갖는 대장균 플라스미드가 연결되고, 옥수수의 *Ubi-1* 프로모터와 *Ubi-1* intron이 연결된 fusion promoter에 담배유래의 CHRK1 유전자가 연결되어 있으며 terminator로서는 *PinII* terminator를 사용하였고 선발 마커로서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 CaMV 35S 프로모터와 *NOS* terminator에 연결시키고자 한다. 이 운반체의 특징은 항시 발현하는 벼 *actin* 프로모터보다 훨씬 발현이 좋은 옥수수 *ubi-1* 프로모터/*Ubi-1* intron fusion 프로모터와 MAR sequence를 함유하고 있기 때문에 외래유전자를 벼 전 조직 및 기관에 골고루 높은 수준으로 안정하게 발현시킬 수 있는 장점을 가지고 있고 도입유전자의 염색체내 위치를 결정하는데 필요한 flanking DNA 분리가 매우 용이하다. 본 연구에서는 *ubi-1* 프로모터/*Ubi-1* intron fusion 프로모터에 의해 CHRK1이 항시 전 조직 및 기관에서 높은 수준으로 안정하게 발현시켜 식물의 총체적 방어체계를 항시 유도하여 곰팡이에 내성을 가진 벼를 만들고자 한다. 또한 제초제 저항성 유전자를 연결함으로써 식물체가 어느 정도 성장하였을 때 선발 marker로 사용할 수 있을 뿐 아니라 실제 농업에 적용되었을 때도 형질전환체를 구별하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

pMJ-UC 운반체 제작의 전체적인 과정은 pKS-CHRK1을 제한효소인 *Bam*HI과 *Xho*I으로 자른후 이것을 pET-21a(d+)를 제한효소인 *Bam*HI과 *Xho*I과 compatible end인 *Sa*II으로 자른것과 연결반응시켜 CHRK1 유전자의 3' 말단에 *Xho*I site를 없애고 *Not*I site가 생긴 pET-CHRK1을 제작하고 pSBU2.0내에 함유된 *ubi-1* 프로모터/*Ubi-1* intron fusion 프로모터 부분을 제한효소인 *Eco*RV와 *Bam*HI으로 자른후 이것을 제한효소인 *Sma*I과 *Bam*HI으로 자른 pMJ21과 연결반응시켜 pMJ-U를 만든다.

최종적으로 pET-CHRK1을 *Bam*HI과 *Not*I으로 자른후 이것을 *Bam*HI과 *Not*I으로 자른 pMJ-U와 연결반응시켜 pMJ-UC 운반체를 제작했다. (그림C)

(C) pMJ-UC



SM UC Sm B N B+N Nc K S Sc X C

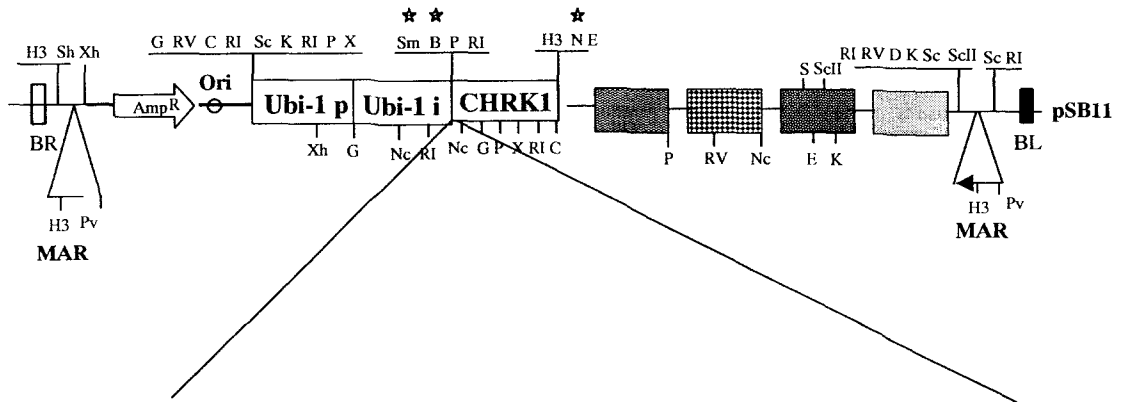


5. Ubi intron과 CHRK 유전자의 연결부위의 염기서열 확인

염기서열을 확인을 위한 실험은 Ubi-intron 3' 쪽으로 100base 떨어진 지점에 19개의 염기로 구성된 primer(GCCCTACCTTCATACGCTA)를 제작하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석결과 Ubi intron과 CHRK연결부위가 일치한 결과를 나타내었다.(그림 D)



**(D) pMJ-UC**



Query: 95 gaattcggcagcagagaatcattttgatcacaaaggaacaagcatacaacaattgaccaa 154  
 Sbjct: 1 gaattcggcagcagagaatcattttgatcacaaaggaacaagcatacaacaattgaccaa 60

Query: 155 ttcaatcttacaagcaaaggggttaggcaaatcaaaaacttagttatagacctttacat 214  
 Sbjct: 61 ttcaatcttacaagcaaaggggttaggcaaatcaaaaacttagttatagacctttacat 120

Query: 215 attgtgttacatggcacttctttggttatgacgggtggtgtatagccagttgggcgtac 274  
 Sbjct: 121 attgtgttacatggcacttctttggttatgacgggtggtgtatagccagttgggcgtac 180

Query: 275 ctgactattctaccagcacatacactttatcaagaataacctgttatcggttacaagg 334  
 Sbjct: 181 ctgactattctaccagcacatacactttatcaagaataacctgttatcggttacaagg 240

Query: 335 cactttaccaagaagttacaaggtgacagttagatatgtcctgctggttctaaaagag 394  
 Sbjct: 241 cactttaccaagaagttacaaggtgacagttagatatgtcctgctggttctaaaagag 300

Query: 395 tattgcttgacatcaagaatctttgctaagaagaatttaactgtttatttcaaatgic 454  
 Sbjct: 301 tattgcttgacatcaagaatctttgctaagaagaatttaactgttita -tttcaaatgic 359

Query: 455 ttcaaaaatctcttctctctcttcttactgttctccgtttt 501  
 Sbjct: 360 ttcaaaaacctcttctctctcttcttactgttctccgtttt 406

### 제3절 제작 운반체를 이용한 벼형질전환

#### 1. 제작운반체의 *Agrobacterium*으로의 도입

벼 형질전환용 운반체(pMJUC와 pMJPC)의 *Agrobacterium*내로의 도입은 intermediate vector (pMJUC와 pMJPC)를 가지고 있는 *E. coli* DH5  $\alpha$ 와 acceptor vector(pSB1)를 가지고 있는 *Agrobacterium* LBA4404사이에 pRK2013을 가지고 있는 conjugal strain인 *E. coli* HB101을 통해 운반체를 전달하는 triparental mating 방법으로 수행하였다.

Triparental mating에 앞서 각각의 균주를 양호한 상태로 사용하기 위해 DH5  $\alpha$ (pMJUC와 pMJPC)를 LB + spectinomycin 50ug/ml(LBS) 고체배지, HB101(pRK2013)을 LB + kanamycin 50ug/ml(LBK) 고체배지에 각각 도말 하여 37°C 배양기에서 하루 동안 배양하였고 LBA4404(pSB1)는 AB + tetracyclin 10ug/ml(ABT)고체배지에 도말한 후 28°C 배양기에서 3일 동안 배양하였다. Triparental mating을 위해 nutrient agar고체배지에 맨 먼저 LBA4404(pSB1)를 도말하고 그 위에 HB101(pRK2013)을 도말한후 마지막으로 DH5  $\alpha$ (pMJUC와 pMJPC)를 도말 하여 세 균주를 잘 섞어준 다음 28°C배양기에서 하루 동안 배양하였다. 그후 섞여있는 세 가지 균주를 AB + spectinomycin 50ug/ml + tetracyclin 10ug/ml(ABST) 액체배지 400ul에 녹인 후 ABST고체배지에 도말 하고 28°C배양기에서 3일 동안 배양한 후 배지 위에 형성된 단일 콜로니를 새로운 ABST고체배지에 옮겨주었다. 두 번 계대배양후 최종적으로 형성된 단일 콜로니를 확보하고 *Agrobacterium*내에서의 co-integration을 확인하는 실험을 실시하였다.

Plasmid DNA의 분리를 위해 빠르고 손쉬운 mini-prep방법을 사용하였다.(Li et al. 1995) ABST 고체배지에서 배양중인 단일콜로니를 취해 YEP + spectinomycin 50ug/ml + tetracyclin 10ug/ml(YEPST) 액체배지 5 ml에 접종한 후 28°C, 200 rpm으로 2일 동안 진탕 배양하였다. 그후 4°C, 4000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 통해 세포 덩어리를 얻은 다음 세포용해를 위해 Sol'n I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA) 200ul와 10mg/ml lysozyme 20ul를 넣고 용해시켰다. Sol'n II (0.2N NaOH, 1% SDS) 400ul를 첨가하고 잘 섞어준다음 얼음에서 15분동안 반응시킨후 Sol'n III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, H<sub>2</sub>O 28.5ml) 300ul 넣고 섞은 후 얼음에서 30분 동안 두었다. 4°C, 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 약 700ul의 상등 액을 취한 다음 페놀용액(pH 8.0) 400ul를 첨가하여 2분간 섞어

주고 chloroform : isoamylalcohol(24:1)을 동량 넣어준 후 2분간 더 섞어주고 위와 동일한 조건에서 원심분리를 실시하여 상등 액을 500ul 취하였다. -20℃에 보관중인 isopropanol을 500ul 첨가하고 -20℃ 냉동실에 1시간동안 DNA를 침전시킨 다음 14,000 rpm으로 10분간 원심분리를 통해 DNA를 얻어낸 후 TE(pH8.0) 60ul에 녹였다. *Agrobacterium*내에서 co-integration된 운반체의 확인을 위해, 분리해낸 플라스미드 DNA를 제한효소 Sal I 으로 절단한 후 비교 분석하였다.

#### 가. pMJ-UC

벼 핵 형질전환용 운반체의 *Agrobacterium*내로의 도입은 intermediate vector (pMJ-UC)를 가지고 있는 *E.coli* DH5a와 acceptor vector(pSB1)를 가지고 있는 *Agrobacterium* LBA4404사이에 pRK2013을 가지고 있는 conjugal strain인 *E.coli* HB101을 통해 운반체를 전달하는 triparental mating 방법으로 수행하였다. *Agrobacterium*내에서 co-integration된 운반체의 확인을 위해, 분리해낸 플라스미드 DNA를 제한효소 Sal I 으로 절단한 후 비교 분석하였다. 대조구로는 pSB1을 제한효소 Sal I으로 절단한 것을 사용하였다. Sal I으로 절단된 pSB1과 cointegrate(pMJ-PC::pSB1)에서 생성되는 DNA단편을 비교함으로써 두 플라스미드가 *Agrobacterium*내에서 cointegration되었음을 증명하였다. 이때 cointegrate에서는 5.3kb band가 사라지고 7.3kb와 3.1kb band가 새로 생김을 확인함으로써 cointegration이 예상대로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

#### 나. pMJ-PC

위 가에서 언급한 동일한 방법으로 제작운반체 (pMJ-PC)의 *Agrobacterium*내로의 도입을 수행하였고 cointegrate에서는 5.3kb band가 사라지고 11.3kb와 3.1kb band가 새로 생김을 확인함으로써 cointegration이 예상대로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

## 2. *Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환

벼 품종으로는 낙동벼(*Oryza sativa*, cv Nakdongbyo)를 사용하였다. 벼 형질전환방법은 *Agrobacterium*를 이용한 벼 형질전환법을 이용하였고 10차에 걸쳐 총 3155개의 캘러스를 형질전환시켰다. 형질전환 후 1차 캘러스를 선발, 2차캘러스 선발을 거쳐 식물체를 재분화하였다.

#### 가. 캘러스 준비

*Agrobacterium*을 매개체로한 벼 형질전환에 필요한 재료로서는 scutellum으로부터 유기된 캘러스가 가장 효율적인 것으로 알려져 있다(Hiei *et al*, 1994). 따라서 scutellum으로부터 캘러스를 유기하기 위하여 벼 품종으로는 낙동벼(*Oryza sativa*, cv Nakdongbyo)를 사용하였다. 형질전환에 앞서 우선 벼 종자로부터 형질전환의 재료인 캘러스를 얻어내기 위해 실험당 약 200개의 종자의 껍질을 벗겨내고 멸균된 삼각플라스크에 담아 70% 에탄올 100ml을 부어 1분간 세계 흔들어 씻어준 후 20% 락스 100ml을 넣고 120rpm의 진탕기 위에서 1시간 소독한 다음 멸균수로 5-6회 씻어내었다. 멸균된 종자를 2N6 캘러스 유기 배지에 치상하고 25℃ 배양기에서 3주간 암배양하였다. 3주후 scutella로부터 유기된 캘러스를 새로운 2N6고체배지로 계대배양하였고 옮긴지 4일된 캘러스를 형질전환에 사용하였다.

#### 나. 균주준비

Co-cultivation시 *Agrobacterium*의 농도는  $3-5 \times 10^9$  cell/ml일때 형질전환이 가장 효율적인 것으로 알려져있다(Hiei *et al*, 1994). *Agrobacterium*의 농도가  $10^9$ cells/ml이 되도록 하기 위해 *Agrobacterium*을 2개의 ABST고체배지에 도말한 다음 28℃ 배양기에서 3일 동안 배양한 후 약 스폰으로 잘 긁어모아 모두 취하여 AAM 액체배지 30ml에 녹인 다음 사용하였다. 이는 spectrophotometer로 측정한 결과 0. D<sub>600</sub>에서 1.8-2.0을 나타냈다.

#### 다. Co-cultivation

4일 계대후 왕성하게 분열한 캘러스를 직경 1-2mm정도의 크기로 자른 뒤 *Agrobacterium*이 들어있는 있는 AAM 액체배지에 3분 동안 담근 후 2N6-AS고체배지 한

plate당 50개씩 co-cultivation하여 25℃ 배양기에서 3일 동안 암배양하였다

라. 캘러스 1차 및 2차 선발

pMJ-UC의 경우 총 988개의 캘러스를 형질전환 시켰다(표 1). 3일 동안 co-cultivation 한후 캘러스로부터 *Agrobacterium*을 없애주기 위해 *Agrobacterium* 치사항생제인 cefotaxime(250mg/l)이 들어 있는 멸균수에 담구어 씻어내고 형질전환된 캘러스를 선발하기위해 2N6-CP 1차선발 고체배지에 옮겨 25℃ 배양기에서 3주 동안 암배양하였다. 3주후 하얗고 왕성하게 분열한 캘러스만을 선발하였다. 1차 선발된 캘러스를 N6-7-CP 2차 선발 고체배지로 옮겨 25℃ 배양기에서 10일 동안 암배양하였다. 10일후 1차 선발된 개의 캘러스중 하얗고 왕성하게 분열한 개의 캘러스를 선발하였다.

Plasmid		Cultivar	Experiment	Co-cultivation	First selection	Second selection
pMJUC	낙동벼	1	470	352	240	
		2	290	171	134	
		3	486	370	320	
		4	231	198	174	
		5	431	398	325	
		6	247	231	211	
		7	215	209	197	
		8	311	296	275	
		9	241	237	221	
		10	233	224	218	
					3155	2686
pMJPC	낙동벼	1	310	210	182	
		2	240	193	181	
		3	450	343	332	
		4	241	211	209	
		5	314	216	211	
		6	266	198	187	
		7	347	356	348	
		8	257	243	238	
		9	211	205	199	
		10	241	238	231	
					2877	2413

<표 1> *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.)

### 3. 벼 형질전환체 분석

본 연구에서는 환경친화적인 농업창출을 위해 기존의 우량품종에 항곰팡이 저항성 유전자들을 쉽게 도입할 수 있는 방법을 개발하여 벼 곰팡이 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 밀접하게 연관되어있는 곰팡이 저항성 유전자를 함유하고 있는 운반체 pMJ-UC와 pMJ-PC를 제작하였다. 이 운반체는 도열병 등 곰팡이 병 저항성을 가진 벼 품종을 개발하기 위하여 CHRK1의 유전자를 벼에 도입, 항시 발현시킴으로서 곰팡이의 식물체로의 침투를 식물체가 더 빨리 인지하여 식물본연의 방어체계를 좀더 신속하게 작동하게 하는 운반체 pMJ-UC와 CHRK1 단백질이 항시 활성을 갖는 형태로 그 유전자를 변형시키고, 그 변형유전자를 여러 pathogen이 침입할 시 유도되는 pR1a 프로모터에 연결시킨 운반체 pMJ-PC를 제작, 벼에 도입함으로써 어떠한 곰팡이 신호식물 방어체계에 관계된 여러 유전자들을 활성화시킴으로서 곰팡이에 내성을 가진 벼를 개발하고자 하였다. 또한 이들 운반체의 특징은 MAR sequence를 BR 및 BL 안쪽 부위에 장착함으로써 도입유전자의 안정적인 발현을 유도할 수 있고 더 나아가서는 copy number-dependent 한 유전자 발현을 기대할 수 있다. 또한 Ampicillin 저항성을 갖는 대장균 플라스미드를 BR/MAR 안쪽에 갖고 있기 때문에 형질전환 벼를 개발 한 후에 도입유전자 (transgene)의 염색체내 위치를 결정하는데 필요한 flanking DNA 분리가 매우 용이하게 고안되었다.

본 연구의 결과로 캘러스에서 유도된 벼 형질전환체 14 개체가 얻어졌으며 이들 T<sub>0</sub> 세대의 벼 형질전환체는 CHRK1 담배 형질전환체에서 관찰된 비정상적인 식물 발생을 보이지 않았다. 현재 T<sub>1</sub> 세대를 증식시키고 있으며 증식이 끝남에 따라 다양한 병원체에 대한 반응도 및 내성 등을 조사할 예정이다.

## 참 고 문 헌

- Bakkers J, Semino CE, Stroband H, Kline JW, Robbins PW** (1997) An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7982-7986
- Baureithel K, Felix G, Boller T** (1994) Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chito oligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J Biol Chem* **269(27)**: 17931-17938
- Becraft PW, Stinard PS, McCarty DR** (1996) CRINKLY4: a TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* **273**: 1406-1409
- Benhamou N** (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* **1(7)**: 233-240
- Bent AF** (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771
- Binns AN, Labliola J, Black RC** (1987) Initiation of auxin autonomy in *Nicotiana glutinosa* cells by the cytokinin-biosynthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* **171**: 539-548
- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ** (1996) *Protein Methods*. Wiley-Liss Inc, New York
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Braun DM, Walker JC** (1996) Plant membrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem Sci* **21(2)**: 70-73
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M** (1998) Substrate tobacco chitinases. *Plant J* **14(2)**, 225-234.
- Busch SJ, Sassone-Corsi P** (1990) Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet* **6(2)**: 36-40
- Cary AJ, Liu W, Howell SH** (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol* **107**, 1075-1082.

- Chaudhury AM, Letham S, Craig S, Dennis ES (1993) *amp1*-a mutation with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis, and precocious flowering. *Plant J* **4**, 907-916.
- Chaplin MF (1986) Monosaccharides. *In* MF Chaplin, JF Kennedy, eds, Carbohydrate Analysis-Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp 3
- Cheong J-J, Hahn MG (1991) A specific, high-affinity binding site for the hepta-beta-glucoside elicitor exists in soybean membranes. *Plant Cell* **3**: 137-147
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **104**, 339-347.
- Clark SE (1996) Plant Cell communication: the world outside the plasma membrane. *Trends Plant Sci* **1**(12): 406-407
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**: 575-585
- De Jong AJ, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A, De Vries SC (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4**, 425-433.
- De Jong AJ, Heldstra R, Spaik HP, Hartog MV, Meijer EA, Hendriks T, Lo Schiavo F, Terzi M, Bisseling T, Van Kammen A, De Vries SC (1993) *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* **5**, 615-620
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 479-501
- Dwyer KG, Kandasamy MK, Mahosky DI, Acciai J, Kudish BI, Miller JE, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1994) A superfamily of S locus-related sequences in *Arabidopsis*: diverse structures and expression patterns. *Plant Cell* **6**(12): 1829-1843
- Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675
- Feng X-H, Dube SK, Bottino PJ, Kung S-d (1990) Restoration of shooty



- morphology of a nontumorous mutant of *Nicotiana glauca* x *N. langsdorffii* by cytokinin and the isopentenyltransferase gene. *Plant Mol Biol* 15: 407-420.
- Fujita T, Kouchi H, Ichikawa T, Syono K (1994) Cloning of cDNAs for genes that are specifically or preferentially expressed during the development of tobacco genetic tumors. *Plant Journal* 5: 645-654.
- Hakala BE, White C, Recklies AD (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 268: 25803-25810
- Harpster MH, Dunsmuir P (1989) Nucleotide sequence of the chitinase B gene of *Serratia marcescens* QMB1466. *Nucl Acid Res* 17: 5395
- He Z-H, Fujiki M, Kohorn BD (1996) A cell wall-associated receptor-like protein kinase. *J Biol Chem* 271: 19789-19793
- He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 39(6): 1189-1196
- Herve C, Dabos P, Galaud J-P, Rouge P, Lescure B (1996) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *J Mol Biol* 258: 778-788
- Hewelt A, Prinsen E, Schell J, Van Onckelen HV, Schmulling T (1994) Promoter tagging with a promoterless *ipt* gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects. *Plant J* 6, 879-891.
- Higuchi R (1990) Recombinant PCR. In MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds, *PCR Protocols*. Academic Press, New York, pp 177-183
- Ichikawa T, Syono K (1991) Tobacco genetic tumors. *Plant Cell Physiol* 32: 1123-1128.
- Ito Y, Kaku H, Shibuya N (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* 12(2): 347-356
- Jinn TL, Stone JM, Walker JC (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich

- repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* **14**(1): 108-117
- Jacobsen JV** (1984) The seed: germination. In *Embryology of Angiosperm* (Johri BM, ed). Springer-Verlag, Berlin.
- Jinn TL, Stone JM, Walker JC** (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* **14**(1): 108-117
- Kakimoto T** (1998) Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 399-403
- Kende H** (1971) The cytokinins. *Int Rev Cytol* **31**: 301-338
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldman KA, Ecker JR** (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of the protein kinase. *Cell* **72**: 427-441
- Kim YS, Lee JH, Yoon GM, Cho HS, Park S-W, Suh MC, Choi D, Ha HJ, Liu JR, Pai HS** (2000) CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol* **123**: 905-915.
- Kobayashi K, Fukuda M, Igarashi D, Sunaoshi M** (2001) Cytokinin-binding proteins from tobacco callus share homology with osmotin-like protein and an endochitinase. *Plant Cell Physiol* **41**: 148-157.
- Kubo M, Kakimoto T** (2000) The *CYTOKININ-HYPERSENSITIVE* genes of *Arabidopsis* negatively regulate the cytokinin-signaling pathway for cell division and chloroplast development. *Plant J* **23**, 385-394.
- Kuranda MJ, Robbins PW** (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 19758-19767
- Lawyton K, Payne G, Moyer M, Ryals J** (1992) Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. *Plant Mol Biol* **19**: 735-743
- Lease K, Ingham E, Walker JC** (1998) Challenges in understanding RLK function. *Curr Opin Plant Biol* **1**(5): 388-392
- Lee H-S, Chung Y-Y, Das C, Karunanandaa B, van Went JL, Mariani C, Kao T-h** (1997) Embryo sac development is affected in *Petunia inflata* plants transformed with an antisense gene encoding the extracellular domain of receptor kinase PRK1. *Sex Plant Reprod* **10**: 341-350
- Lee H-S, Karunanandaa B, McCubbin A, Gilroy S, Kao T-h** (1996) PRK1, a

- receptor-like kinase of *Petunia inflata*, is essential for postmeiotic development of pollen. *Plant J* **9(5)**: 613-624
- Lieberman M** (1979) osynthesis and action of ethylene. *Annu Rev Plant Physiol* **30**: 533-591
- Li J, Chory J** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929-938
- Majeran W, Wollman F-A, Vallon O** (2000) Evidence for a role of ClpP in the degradation of the chloroplast cytochrome b6f complex. *Plant Cell* **12**: 137-149.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chungwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD** (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436
- Martin T, Sotta B, Jullien M, Caboche M, Faure JD** (1997) ZEA3: negative modulator of cytokinin responses in plant seedlings. *Plant Physiol* **114**, 1177-1185.
- Melchers LS, Apotheker M, van der Knaap J, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJC, van den Elzen PJM, Linthorst HJM** (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J* **5(4)**: 469-480
- Molano J, Duran A, Cabib E** (1977) A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal Biochem* **83**: 648-656
- Nandi SK, de Klerk GJM, Parker CW, Palni LMS** (1990) Endogenous cytokinin levels and metabolism of zeatin riboside in genetic tumor tissues and non-tumorous tissues of tobacco. *Physiol Plant* **78**: 197-204
- Nasrallah JB, Stein JC, Kandasamy MK, Nasrallah ME** (1994) Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. *Science* **266**: 1505-1508
- Nishimura A, Tamaoki M, Sakamoto T, Matsuoka M** (2000) Over-expression of tobacco *knotted1* type class1 homeobox genes alters various leaf morphology. *Plant Cell Physiol* **41**: 583-590.
- Park JM, Kang SG, Pih KT, Jang HJ, Piao HL, Yoon HW, Cho MJ, Hwang I-h** (1998) A dynamin-like protein,  $\delta$ DL1, is present in membranes as a

- high-molecular-mass complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**: 763-771
- Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hrebicek M, Aerts JM (1998)** Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* **251**: 504-509
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney TP, Jesse T, Vos P, Uknes S (1997)** The *Arabidopsis NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I $\kappa$ B. *Plant Cell* **9**: 425-439
- Semino CE, Specht CA, Raimondi A, Robbins PW (1996)** Homolgs of the *Xenopus* developmental gene *DG42* are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4548-4553.
- Shikanai T, Shimizu K, Ueda K, Nishimura Y, Kuroiwa T, Hashimoto T (2001)** The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol* **42**: 264-273.
- Shibuya N, Kaku H, Kuchitsu K, Maliarik MJ (1993)** Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. *FEBS Lett* **329**: 75-78
- Song W-Y, Wang G-L, Chen L-L, Kim H-S, Pi L-Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W-X, Zhu L-H, Fauquet C, Ronald P (1995)** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804-1806
- Skoog F, Miller CO (1957)** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118-131
- Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA (1998)** *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Spena A, Prinsen E, Fladung M, Schulze SC, Van Onckelen H (1991)** The indoleacetic acid-lysing synthetase gene of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* induces developmental alterations in transgenic tobacco and

potato plants. *Mol Gen Genet* 227: 205-212

- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB** (1991) Molecular cloning of a putative receptor kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8816-8820
- Su W, Howell S** (1992) A single genetic locus, *ckr1*, defines *Arabidopsis* mutants in which root growth is resistant to low concentrations of cytokinin. *Plant Physiol* 99, 1569-1574.
- Suh, M.C., Choi, D., and Liu, J.R** (1998). Cadmium resistance in transgenic tobacco plants expressing the *Nicotiana glutinosa* L. Metallothionein-like gene. *Mol. Cells* 8(6), 678-684
- Suzuki K, Shinshi H** (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7: 639-647
- Tamaoki M, Kusaba S, Kano-Murakami Y, Matsuoka M** (1997) Ectopic expression of a tobacco homeobox gene, *NTH15*, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol* 38: 917-927.
- Thomas JC, Smigocki AC, Bohnert HJ** (1995) Light-induced expression of *ipt* gene from *Agrobacterium tumefaciens* results in cytokinin accumulation and somatic stress symptoms in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 27: 225-235.
- Thompson JD, Higgins DJ, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid Res.* 22: 4673-4680
- Umemoto N, Kakitani M, Iwamatsu A, Yoshikawa M, Yamaoka N, Ishida I** (1997) The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1029-1034
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ** (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4766-4771.
- von Heijne G** (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* 133: 17-21

- Wang X, Zafian P, Choudhary M, Lawton M** (1996) The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. Proc Natl Acad Sci USA **93**: 2598-2602
- Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, Fujii T, Sakai H, Uchida M, Tanaka H** (1993) Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. J Biol Chem **268**: 18567-18572
- Watanabe T, Suzuki K, Oyanagi W, Ohnishi K, Tanaka H** (1990) Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. J Biol Chem **265**: 15659-15665
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ** (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. Science **270**: 1807-1809
- Yamamoto YY, Matsui M, Ang LH, Deng XW** (1998) Role of COP1 interacting protein in mediating light-regulated gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell **10**: 1083-1094
- Yoon, G.M., Cho, H.S., Ha, H.J., Liu, J.R., and Lee, H.-s.** (1999). Characterization of *NtCDPK1*, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. Plant Mol. Biol. **39**, 991-1001.