

631.523
L. - 2

GOVP1200518514

최 종
연구보고서

해바라기 Isoprenoids Pathway 유전자
조작에 의한 천연고무 및 기타
유용물질을 생산하는 경제작물 개발

Development of Natural Rubber/Useful
Compounds-Producing Sunflower by Genetic
Engineering of Isoprenoid Pathways

연구기관
금호생명환경과학연구소
(전남대학교)

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “해바라기 Isoprenoids Pathway 유전자 조작에 의한 천연 고무 및 기타 유용물질을 생산하는 경제작물 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11월 3일

주관연구기관명 : 금호생명환경과학연구소
총괄연구책임자 : 류 병 태 (한경환, 강훈승)
세부연구책임자 : 박 상 호
위탁연구기관명 : 전남대학교
위탁연구책임자 : 정 갑 채

요 약 문

I. 제 목

해바라기 Isoprenoids Pathway 유전자 조작에 의한 천연고무 및 기타 유용 물질을 생산하는 경제작물 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- > 천연고무의 생합성 기작을 규명하고 관련 유전자의 조작을 통해 우리나라와 같은 온대지방에서 재배가 가능한 고효율 고무작물을 개발하는 것이 본과제의 최종목표이다.
- > 해바라기 형질전환 기술을 확보하여 다목적 경제작물로 개량, 보급하여 새로운 산업을 개척할 수 있다. 고급 식용유의 생산, 대체에너지개발, 펄프원료의 수입대체효과등 다양한 산업이 해바라기를 본격적인 경제작물로 개발함으로 가능하게 된다.
- > 국내 고무작물 개발은 농민들에게 새로운 경제작물을 제공하여 기존의 노동집약적인 저 부가가치 작물을 대체하여 농촌경제의 활성화를 이룰 뿐만 아니라 막대한 양의 천연고무 수입대체효과를 거둘 수 있다. 아울러 작황에 따라서는 수출을 통해 국제고무시장 개척도 가능하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- > 환경인자가 천연물질 생산에 미치는 영향을 규명하고 최적조건 확립한다.
- > 천연고무 생합성 과정의 기초 지식의 획득 및 유전자 조작을 위한 기초 판단 자료 확보하고 기존의 관련지식을 최대한 활용하면서 새로운 과학적 발견을 도모하여 고유의 지적소유권을 확보하여 기술사용료의 해외지출을 방지하고 오히려 해외로부터 기술사용료 수입을 추구한다.

> 해바라기에서 조직배양기술 및 형질전환기술을 확보하여 천연고무 이외의 물질생산을 위한 기초를 확립한다.

> 천연고무 생합성에 핵심적인 유전자의 조작 및 이들 유전자를 이용하여 해바라기의 형질전환을 수행한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구결과

1) 고무입자-결합 단백질 (SRPP)을 발현하는 재조합 미생물 (한국특허등록, 국제특허출원)

본 발명은 고무나무(*H. brasiliensis*) 라텍스로부터 유래된, 작은 고무나무 입자에 결합하는 고무입자-결합 단백질(small rubber particle protein, 'SRPP')을 코딩하는 유전자, 전기 유전자로부터 유추되는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP), 전기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터와 이로 형질전환된 재조합 미생물, 및 재조합 SRPP를 이용한 고무의 생합성방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 미생물로부터 발현되는 재조합 SRPP는 고무입자의 존재시 고무합성을 촉진시키므로, 전기 재조합 SRPP를 생물학적 방법에 의한 고무생산에 활용할 수 있을 것이다.

2) 고무나무에서 분리한 이소펜테닐 이인산 이성화효소 및 이를 이용한 고무의 제조 방법 (한국 및 국제특허 등록)

브라질 고무나무(*Hevea brasiliensis*)의 유액의 cDNA 라이브러리에서 이소펜테닐 이인산(IPP) 이성화효소(EC 5.3.3.2) 암호화되는 cDNA 클론을 클로닝하였다. 그 클론은 예상되는 분자량이 26.7 kDa인 234개 아미노산의 펩타이드로 암호화되는 연속적인 오픈 리딩 프레임에 가진다. 추론된 단백질은 4.7의 등전점을 가지는 산성이고 다른 IPP 이성화효소와 높은 서열 동일성을 나타낸다. 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현된 재조합 단백질은 IPP 이성화효소 활성을 나타낸다. 개시제인 알릴 이인산을 제거한 세척된 고무 입자(WRP)를 사용하여 반응 혼합물에 IPP 이성화효소를 첨가하고 시험관내 고무의 생합성 분석을 실행하였다.

3) 애기장대에서 cis-prenyl transferase의 분리, 발현 및 기능분석 - 고무생합성에 관련성 검토

cis-Prenyltransferase는 IPP를 allylic diphosphate에 연속적으로 결합시켜 polyprenyl diphosphates를 만드는 과정을 촉매한다. 본 연구진은 식물체에서 최초로 애기장대에서 이 효소를 만드는 유전자를 분리하여 동정하였다. In vitro 고무 생합성 분석결과 애기장대 cis-prenyl transferase는 고무와 같은 큰 분자량의 polyprenyl diphosphates를 만들지 못하는 것을 밝혔다.

4) 해바라기에서 geranylgeranyl pyrophosphate synthase의 분리, 동정 및 기내발현

Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase는 terpenoid 화합물 생합성의 주요소로서 식물성장 발달과 개체간 상호작용에 중요한 역할을 한다. 본 연구진은 이 효소의 cDNA 해바라기에서 분리 동정하였다. 조직별 발현양상을 연구한 결과 seed imbibition 2일 후부터 발현되며 ABA 처리는 이 유전자의 발현을 억제하였다.

5) 해바라기 재생 및 형질전환

해바라기의 효과적인 형질전환 체계를 확립하기 위하여 과제 시작 단계부터 지속적인 노력을 기울였으며 최근 기존의 방법보다 빠르고 효율적인 형질전환 방법을 개발하여 그 효율을 극대화하는 연구를 진행하였다. 이 방법의 특징은 embryo meristem를 가지고 있는 hypocotyl을 이용하여 shoot가 바로 hypocotyl에서 올라오도록 함으로서 callus를 거치지 않게 하는 것이다. 해바라기의 형질전환을 매우 어렵게 하는 것은 callus에서 식물체 재생 (regeneration)이 원활하지 못하기 때문인데, 본 방법을 도입함으로써 callus에서 shoot로의 재생과정이 생략됨으로서 가장 큰 어려움을 피하면서 또한 시간상 절약을 가져 올 수 있었다. 해바라기의 형질전환체 조기확보와 기술개발체계 확립을 위하여 러시아 모스크바 Russian Academy of Science의 Alex Gaponenko 교수팀과 국제 공동연구를 수행하고 있다.

6) 고무나무의 생리환경적 요인 및 재배기술

무화과(*Ficus carica*)는 아열대성의 반교목성 낙엽 과수로 재배가 쉽고 병해충 피해가 적다. 우리나라에서는 경남, 전남의 남해안 지역과 제주도에서 경제재배가 가능하고 경북 및 전북 일부 지역에서도 재배가 되고 있다. 본 실험에서는 무화과 수액을 일정 간격으로 영암 과수원 및 농과대학 포장에 정식한 무화과로부터 채취하여 무기성분 및 고무함량의 변화를 시기별로 분석하였다.

또한 무화과 나무와 같은 속인 *Ficus benghalensis*의 고무 생합성에 관해서도 연구를 수행하였다.

7) *Ficus benghalensis*에서 천연고무 생합성 특성조사

*Ficus benghalensis*가 천연고무를 생합성하는 것을 최초로 밝히고 latex와 고무입자에서 고무생합성 활성 정도를 조사하였다. Latex의 고무함량은 약 17%이고 GPC 분석은 고무 크기가 약 1,500 kDa 정도되는 것을 밝혔다. 이러한 연구결과는 *Ficus benghalensis*가 대체고무작물로 이용될 수 있는 좋은 후보임을 보여주었다.

8) *Ficus carica*, *Ficus benghalensis*, 및 *Hevea brasiliensis*에서 고무입자의 미세 형태분석 및 단백질 특성 조사

고무생합성은 고무입자의 표면에서 일어난다. 이 고무입자들은 monolayer 세포막으로 싸여있다. 고무입자에 대한 이해를 증진시키기 위하여 the *Ficus carica*, *Ficus benghalensis*, and *Hevea brasiliensis*의 미세구조를 전자 현미경으로 조사하였다. 세 종류의 고무입자들은 모두 구형이었고 입자크기는 Hevea 것이 다른 것보다 작았다. Hevea 고무입자 표면에 있는 24 kDa 단백질과 CPT 단백질이 고무 생합성에 직접적인 역할을 하는 것 같지 않았다.

나. 활용에 대한 건의

Hevea, Guayule, 무화과 나무 및 해바라기 등 고무나무에서 천연고무의 생합성 과정을 규명하고 고무 생합성에 결정적인 역할을 하는 고무중합효소를 규명하는 본 연구의 결과는 천연고무 생산 관련 연구 분야의 활성화에 크게 기여할 것으로 기대된다. 고무중합효소, IPPI, GGPS, FPS 등 관련 유전자들을 해바라기에 이식하여 대상작물 자체의 고무생산 능력을 변경하여 양질의 천연고무를 다량으로 생산하도록 할 계획이다. 이 과정에 새로이 분리된 유전자들은 국제 및 국내특허를 출원하여 국산 기술의 보호를 도모하고, 실용화 연구를 본 과제기간 이후에까지 계속 추진할 예정이다. 형질전환 된 고무생산 작물은 농가에 계약 재배하거나 기업에 의해 집약 재배하여 천연고무의 국내 공급과 함께 수출을 추진하는 등 본 과제의 연구결과를 상업화로 연결시켜 활용 할 예정이다.

SUMMARY

I. Title of the Study

Development of Natural Rubber/Useful Compounds-Producing Sunflower by Genetic Engineering of Isoprenoid Pathway

II. Objectives and Significance of the Study

>The objective of this project was to elucidate the mechanism of rubber biosynthesis and to set up transformation techniques so that we may eventually develop by genetic engineering the rubber-producing crops that can be cultivated in temperate region including Korea.

>Our ultimate goal is to develop multi-purpose economic crop by using sunflower transformation. Sunflower can be genetically engineered to produce edible oil, alternative energy and pulp source.

>Generation of the economic crop may give a profit to farmers.

III. The Scope of the Study

The project is to study the effect of environmental factors on rubber production of rubber-producing plants, to obtain the basic knowledge of rubber biosynthesis process, to isolate the useful genes involved in rubber biosynthesis, to develop the technique for tissue culture and transformation, and finally to introduce the useful genes into sunflower.

IV. Results and Application

1. Results

1) Recombinant microorganism that expresses rubber particle-bound protein (SRPP) - patented in Korea and submitted to USA for patenting

This invention is related to rubber biosynthesis using SRPP-encoding

gene from Hevea, its recombinant protein, transformed microorganism. The recombinant SRPP was found to stimulate rubber biosynthesis in presence of washed rubber particles.

2) Methods to produce natural rubber using isopentenyl pyrophosphate isomerase isolated from Hevea. - patented in USA and Korea

We have cloned isopentenyl pyrophosphate isomerase from cDNA library of Hevea brasiliensis latex. We tested rubber biosynthesis in vitro by adding this enzyme to washed rubber particles.

3) Molecular Cloning, Expression, and Functional Analysis of a *cis*-Prenyl-transferase from *Arabidopsis thaliana* -IMPLICATIONS IN RUBBER BIOSYNTHESIS*

cis-Prenyltransferase catalyzes the sequential condensation of isopentenyl diphosphate with allylic diphosphate to synthesize polyprenyl diphosphates that play vital roles in cellular activity. We have isolated and characterized the first plant *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *In vitro* rubber biosynthesis analysis indicated that the *Arabidopsis cis*-prenyltransferase itself could not catalyze the formation of higher molecular weight polyprenyl diphosphates similar to natural rubber.

4) Cloning, characterization, and heterologous expression of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase from sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase is a key enzyme for the biosynthesis of terpenoid compounds that play vital roles in plant growth and development, and interactions between organisms. We have cloned and characterized a sunflower cDNA encoding GGPP synthase. *In vitro* activity assay using recombinant protein and genetic complementation experiments have shown that the cDNA we cloned encodes for functional GGPP synthase. Gene expression studies using sunflower seedlings showed that the gene was expressed after two days of seed imbibition. Abscisic acid treatment down-regulated the expression of the gene.

5) Regeneration and transformation of sunflower

We have developed the fast and efficient transformation method. The method does not go through regeneration steps of callus but directly induces shoots from embryo meristem of hypocotyls. For more efficient progress of sunflower transformation, we made international collaboration contract with Russian Academy of Science.

6) Cultivation technique of rubber trees and effects of environmental factors on rubber production.

Ficus carica is rubber-producing tree and can be cultivated in southern parts of Korea and Cheju island. We have analyzed seasonal change in mineral and rubber content of *Ficus carica* and *Ficus benghalensis*.

7) Characterization of Natural Rubber Biosynthesis in *Ficus benghalensis*

Natural rubber was identified for the first time in the latex of *Ficus benghalensis*, and the rubber biosynthetic activity in latex and rubber particle was investigated. ¹³C NMR analysis of samples prepared by successive extractions with acetone and benzene confirmed that the benzene-soluble residues were a natural rubber, *cis*-1,4-polyisoprene. The rubber content in the latex of *F. benghalensis* was approximately 17 %. Gel permeation chromatography revealed that the molecular size of the natural rubber from *F. benghalensis* was approximately 1,500 kDa. The high rubber content and large molecular size suggest that *F. benghalensis* is a good candidate for an alternative rubber source.

8) Micromorphological and protein characterization of rubber particle in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis*, and *Hevea brasiliensis*

Rubber biosynthesis takes place on the surface of rubber particles. These particles are surrounded by a monolayer membrane in which the rubber transferase is anchored. In order to gain better insight into whether rubber particles from different plant species share common structural characteristics, the micromorphology of rubber particles from *Ficus carica*, *Ficus benghalensis*, and *Hevea brasiliensis* was examined by electron microscopy. Rubber particles of all three species were spherical in shape, and the size of rubber particles of *H. brasiliensis* was much smaller than that of *F. carica* and *F. benghalensis*. These results indicate that rubber

particles in the three different plant species investigated share some degree of similarity in architecture.

2. Application

Our study that elucidated rubber biosynthesis in Hevea, Guayule, fig tree, and sunflower is expected to contribute to the area of alternative rubber crop development. The genes we have isolated will be transformed into sunflower and the transformants will be evaluated in rubber production. This project will be continued after this project ends until we develop the rubber-producing sunflower crop. Eventually we aim to develop the genetically-engineered sunflower as an alternative rubber crop in Korea.

CONTENTS

Preface	1
Summary (in Korean)	2
Summary	6
Contents	10
Contents (in Korean)	13
Chapter 1. Introduction	16
Section 1. Objectives and significance of the study	16
Section 2. Goals and scope of the study	21
Chapter 2. Current Status of Technique Development	23
Section 1. Developmental status in Korea	23
Section 2. Developmental status in other countries	24
Section 3. Contribution of this project to technique development	26
Chapter 3. Recombinant Microorganism to express SRPP	28
Section 1. Abstract	28
Section 2. Brief description of figures	28
Section 3. Detailed description of the invention	29
Section 4. Examples	36
Section 5. Key effects of invention	42
Section 6. Claims	42
Section 7. Figures	45
Chapter 4. Methods of Rubber Production using IPPi Enzyme	51
Section 1. Abstract	51
Section 2. Brief description of figures	52
Section 3. Detailed description of the invention	53
Section 4. Examples	62
Section 5. Key effects of invention	66
Section 6. Claims	70
Section 7. Figures	74
Chapter 5. Molecular Cloning, Expression, and Functional Analysis of a <i>cis</i> -Prenyl-transferase from <i>Arabidopsis thaliana</i> -IMPLICATIONS IN RUBBER BIOSYNTHESIS*.....	78

Section 1. Abstract	78
Section 2. Introduction	79
Section 3. Materials and Methods	81
Section 4. Results	85
Section 5. Discussion	93
Section 6. References	97
Chapter 6. Cloning, Characterization, and Heterologous Expression of a Functional Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase from Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	99
Section 1. Summary	99
Section 2. Introduction	100
Section 3. Material and Methods	102
Section 4. Results and Discussion	105
Section 5. References	112
Chapter 7. Regeneration and Transformation of Sunflower	116
Section 1. Tissue culture of sunflower	116
Section 2. Optimum condition for sunflower transformation	118
Section 3. Selection and analysis of sunflower transformants	122
Chapter 8. Environmental Factors to Affect Rubber Production.....	127
Section 1. Introduction	127
Section 2. Rubber and mineral analysis of <i>Ficus carica</i> latex	128
Section 3. Abiotic factors to affect rubber content of <i>Ficus</i> <i>carica</i> and <i>Ficus benghalensis</i> latex	134
Section 4. Rubber biosynthesis of <i>Ficus benghalensis</i>	139
Section 5. Microstructure and proteins of rubber particles	142
Section 6. Conclusion	146
Section 7. References	148
Chapter 9. Characterization of Natural Rubber Biosynthesis in <i>Ficus benghalensis</i>	153
Section 1. Abstract	153
Section 2. Introduction	154
Section 3. Results	155
Section 4. Discussion	159
Section 5. Materials and Methods	161

Section 6. References	165
제 10 장 Micro-morphological and Protein Characterization of Rubber Particle in <i>Ficus carica</i> , <i>Ficus benghalensis</i> , and <i>Hevea brasiliensis</i>	175
Section 1. Abstract	175
Section 2. Introduction	176
Section 3. Materials and Methods	178
Section 4. Results	181
Section 5. Discussion	184
Section 6. References	188

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	6
CONTENTS	10
목차	13
제 1 장 연구개발 과제의 개요	16
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	16
제 2 절 연구개발의 세부목표 및 내용	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 1 절 국내의 기술개발 현황	23
제 2 절 외국의 기술개발 현황	24
제 3 절 국내의 기술개발에 차지하는 본 연구 결과의 위치 및 기여도	26
제 3 장 고무입자-결합 단백질 (SRPP)을 발현하는 재조합 미생물	28
제 1 절 요약	28
제 2 절 명세서-도면의 간단한 설명	28
제 3 절 발명의 상세한 설명	29
제 4 절 실시예	36
제 5 절 발명의 효과	42
제 6 절 청구의 범위	42
제 7 절 대표도면	45
제 4 장 고무나무에서 분리한 이소펜테닐 이인산 이성화효소 및 이를 이용한 고무의 제조 방법	51
제 1 절 요약	51
제 2 절 명세서-도면의 간단한 설명	52
제 3 절 발명의 상세한 설명	53
제 4 절 실시예	62
제 5 절 발명의 효과	66
제 6 절 청구의 범위	70
제 7 절 대표도면	74
제 5 장 Molecular Cloning, Expression, and Functional Analysis of a <i>cis</i> -Prenyl-transferase from <i>Arabidopsis thaliana</i> -IMPLICATIONS IN RUBBER BIOSYNTHESIS*	78

제 1 절	Abstract	78
제 2 절	Introduction	79
제 3 절	Materials and Methods	81
제 4 절	Results	85
제 5 절	Discussion	93
제 6 절	References	97
제 6 장	Cloning, characterization, and heterologous expression of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase from sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	99
제 1 절	Summary	99
제 2 절	Introduction	100
제 3 절	Material and Methods	102
제 4 절	Results and Discussion	105
제 5 절	References	112
제 7 장	해바라기 재생 및 형질전환	116
제 1 절	해바라기 조직배양	116
제 2 절	형질전환 최적조건 탐색	118
제 3 절	형질전환체 선발 및 분석	122
제 8 장	고무나무의 생리환경적 요인 및 재배기술	127
제 1 절	서언	127
제 2 절	무화과(<i>Ficus carica</i>) 수액의 고무함량 및 무기성분 분석	128
제 3 절	무화과와 벵갈 고무나무(<i>Ficus benghalensis</i>)수액의 고무 함량에 미치는 환경요인	134
제 4 절	벵갈 고무나무의 천연고무합성의 특성	139
제 5 절	<i>Ficus carica</i> , <i>Ficus benghalensis</i> 및 <i>Hevea brasiliensis</i> 고무입자의 미세형태 및 단백질 특성	142
제 6 절	결론	146
제 7 절	참고문헌	148
제 9 장	Characterization of Natural Rubber Biosynthesis in <i>Ficus benghalensis</i>	153
제 1 절	Abstract	153
제 2 절	Introduction	154
제 3 절	Results	155

제 4 절	Discussion	159
제 5 절	Materials and Methods	161
제 6 절	References	165
제 10 장	Micro-morphological and protein characterization of rubber particle in <i>Ficus carica</i> , <i>Ficus benghalensis</i> , and <i>Hevea brasiliensis</i>	175
제 1 절	Abstract	175
제 2 절	Introduction	176
제 3 절	Materials and Methods	178
제 4 절	Results	181
제 5 절	Discussion	184
제 6 절	References	188

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

천연고무의 생합성 기작을 규명하고 관련 유전자를 분리동정하고 대상 작물의 형질전환기술을 개발하는 것이 당면과제의 목표이며 이러한 신기능 형질전환체를 이용하여 우리나라와 같은 온대지방에서 재배가 가능한 고효율 고무 작물을 개발하는 것이 연구의 최종목적이다.

천연고무는 상업제품 및 의료제품의 제조에 이용되며 특히 고도의 탄력성, 내구성 및 열 저항성을 요구하는 산업제품 이나 방위산업제품의 제조에 필요하다. 현재 세계적으로 사용되고 있는 천연고무는 말레이시아, 태국, 인도네시아 등의 열대지방에서만 재배가 가능한 고무나무에서 생산되며, 우리나라를 비롯한 온대지방 국가에서는 열대지방의 개도국들로부터 전량 수입에 의존하고 있다. 이러한 천연고무의 자국내 생산을 목표로 미국, 일본 등 선진국에서 열대성 고무나무를 대체할 온대성 고무나무를 탐색하고 고무생합성 관련 단백질과 유전자를 찾는 연구를 진행하고 있다. 그러나 천연고무 관련 연구의 가장 큰 약점은 고무생합성에 직접 관여하는 고무중합효소와 그 유전자가 아직 규명되지 않았다는 점이다. 따라서 천연고무 생산 대체작물 개발에 필수적인 고무중합효소를 규명하고 관련 유전자를 대체작물에 이식시킴으로서 국내에서 재배 가능한 형질전환 경제작물을 개발하는 일이 매우 중요하다.

새로운 경제작물을 개발하여 농업분야의 국제경쟁력 강화가 절실하다. 농업시장의 개방화에 따라 많은 국산 농작물들이 외국 농산물에 가격 경쟁력을 잃어가고 무역에서도 농산물 수입의 증가에 따른 적자 폭이 늘고 있는 실정에 비추어 국제적 경쟁력이 있는 새로운 작물을 개발하는 연구가 필요하다.

해바라기는 국내에서 간과하고 있는 중요한 경제작물이다. 채영암등(공예작물학, 1996, 한국방송대학교 출판부)에 따르면, 해바라기는 관상용으로 심기도하지만 그 종실은 그대로 볶아서 식용으로 한다. 종실에는 20-45%의 기름을 함유하고 있어 (박피 종실의 경우 50%) 이것을 착유하여 식용으로 한다. 이 기름은 불포화지방산의 비율이 높은 반건성유로 고급 식용유에 속한다. 해바라기 기름은 공업용으로도 가치가 높

으며, 화장품, 바니스, 비누원료등으로 쓰이며, 디젤엔진의 원료로 쓰일 수 있음이 최근에 밝혀졌다. 디젤보다 발화점이 다소 낮은 문제는 디젤 유와 혼합하여 (20-40%) 사용하면 지장이 없다고 한다. 착유하고 남은 종실은 단백질 함량이 높아 사료용으로 이용된다. 해바라기 줄기는 펄프용으로 이용되기도 한다. 본 과제에서 제안하는 유전공학적 조작들은 이들 유용물질 생산이나 가치를 줄이는 효과를 초래할 가능성은 지극히 낮으며, 오히려 증가시킬 것으로 기대된다. 또한 해바라기는 건물 중 약 1%정도의 천연고무를 생산하는데, 해바라기에서 생산되는 천연고무는 분자량이 낮아 상업적으로 이용되지 못한다. 따라서 고무중합효소 유전자조작을 통한 고 분자량의 천연고무를 생산하는 해바라기 개발이 필요하다.

무화과나무는 온대 및 아열대 과수작물로서 우리나라에서는 전라남도 등의 남부지방에서 과수작물로서 재배되고 있다. 무화과는 다량의 단백질 분해 효소를 함유하고 있어 식후에 먹는 음식으로 적합하며, 최근에는 항암물질의 존재여부에 대한 관심이 고조되면서 그 생산량이 수요에 미치지 못하는 실정이다 (박형순, 전라남도 영암군 삼호면 중앙농장). 무화과나무는 영양번식이 용이하고 우리나라에서 비교적 잘 자라며 (2m/year), 시설재배 등을 이용할 경우 연중 수확이 가능하다. 본 과제 연구팀은 전라남도 목포 일원에서 재배되는 무화과나무에서 천연고무 생산여부를 조사한 결과 그 생산량이나 질이 인디안 고무나무 (*Ficus elastica*)와 비교할 만하다는 결론을 내리고 본 과제에서 본격적으로 연구할 대상으로 선정하였다.

본 과제는 고무생합성 관련 유전자를 규명하고 해바라기 등 대상작물을 유전공학적 기법으로 개량하여 국제적으로 전례가 없는 천연고무 생산이라는 특별한 가치를 지닌 새로운 작물로 개발하여 농민들에게 보급하는 것을 최종목표로 한다. 천연고무의 생합성이 식물 유용물질 생산과정인 Isoprenoids Pathway로부터 파생되며, isoprenoids는 약 2만여 물질을 포함한다 (Chappell, 1995). 이들 중에는 천연고무, menthol, 토코페롤, 스쿠아알렌, 향수원료와 같이 일반인들에게 익숙한 물질도 포함되며, 식물 생장조절물질도 이로부터 비롯된다. 본 과제 수행과정에서는 천연고무 생산뿐만 아니라, 기타 유용 천연물질 등을 생산하는 부수적인 해바라기 개량효과를 노리고 전략을 수립하였다.

1) 기술적 측면

국내에서 고무생산의 길을 열기 위해 극복해야 할 기술적 문제점으로
는 1) 천연고무 생합성 과정의 분자 생화학적 이해, 2) 국내에서 재배가 가능한
고무작물의 개발, 3) 상업적 가치가 있는 분자량 1,000,000이상의 고분자 고무생
산, 4) 무독성 고 수확 형질전환 고무작물의 개발, 5) 형질전환 작물의 본격적 이
용에서 비롯되는 외부 유전자의 유출을 방지하고 생태계 안전을 도모하기 위한
장치마련 등을 들 수 있다.

이 분야는 국제적으로도 아직 연구의 초기단계로서 우리기술의 축적 정
도에 비추어 세계적으로도 경쟁력 우위를 확보할 가능성이 크다. 천연고무는 약
2,000여종의 식물체내에서 생합성되며, 약 1 um크기의 rubber particle로 불리는
subcellular organelle에서 합성, 축적되는 *cis*-1,4-polyisoprene 화합물이다. 현재,
상업용 고무는 유일하게 열대 고무나무 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)에서만
생산되고 있다. 천연고무의 분자량은 생산 식물체에 따라 다양하며 고무의 질은
분자량이 높을수록 좋다. 브라질고무나무 (*Hevea brasiliensis*)와 Guayule
(*Parthenium argentatum*)에서는 질이 좋은 고무가 생산되며 평균 분자량은 약
1,500,000이다 (Cornish *et al.*, 1993). 반면에 우리나라에서 실내 조경수로 널리
알려진 인디안 고무나무(*Ficus elastica*) 등에서는 분자량 200,000 미만의 질이
낮은 고무가 만들어진다. 고무의 생산량도 식물체에 따라 다양하다. 최근에는
천연고무 상품에서 비롯된 치명적인 latex 알레르기가 널리 퍼져 무독성 고무개
발이 절실히 요구된다 (Cornish and Siler, 1996). Guayule에서 채취한 latex는
*Hevea*의 것보다 알레르기를 일으키는 독성이 적은 사실에 비추어, 본 연구과제
의 성공적인 수행은 천연고무의 국내 생산의 길을 열어 현재의 전략적 수요를
충족시킴과 동시에 인체에 무독한(hypoallergenic) 고무개발을 가능하게 한다.

천연고무의 생합성에 관련된 중요 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있
다. 제 2장의 “국내외 관련기술의 현황”란에서 기술된 바와 같이 고무 생합성
관련유전자들의 연구는 일반 isoprenoids biosynthesis 관련유전자들이 주종을 이
루며 고무 생합성에 특이적인 유전자들(rubber biosynthesis specific genes)에
관해서는 연구가 미비하다. 이들 중 rubber polymerase는 가장 핵심적인 유전

자로 추정되나 아직 밝혀지지 않고 있다. 생성되는 고무의 분자량 결정에 중요할 것으로 사료되는 rubber elongation factor에 관한 연구도 부족하다. 특히, 식물체간 고무의 질에 있어서 차이를 설명할 수 있는 기작은 아직 연구된 바 없다. 본 과제에서는 고무나무의 latex sample과 잎에서 발현되는 유전자 및 단백질질을 비교함으로써 이들 문제에 접근하고자 하며, 성공적인 수행의 결과는 고무 생합성 과정에 대한 우리의 지식을 넓히고 국내 고무생산을 위한 유전자조작의 기초 판단자료를 제공할 것으로 기대된다.

식물의 형질전환 기술은 분자생물학적인 연구결과를 실제로 응용을 가능하게 하는 기술로서 본 연구에서도 반드시 극복해야 할 과제이다. 아무리 많은 유용유전자를 확보하였다 할지라도 이들을 목적하는 작물에 이식하여 원하는 대로 형질발현을 시킬 수 없다면 이는 실용적인 기술이 될 수 없다. 식물 형질전환에는 크게 세 가지 요인들이 중요하다: 1) 식물체가 외부유전자를 받아들이고 재분화 하는데 있어서 최적 조건의 개발, 2) 유전자를 이식하는 매개체 (*Agrobacterium*, gene gun 등), 3) 이식된 유전자의 형질전환체내에서의 발현. 최근 들어 형질전환된 대다수의 식물체들이 이식된 유전자들을 제대로 발현하지 못하여 유전공학기법의 실용화에 어려움이 있음을 인식하기 시작하였다. 따라서, 본 과제에서는 형질전환과 관련된 기술을 더욱 발전시켜 이식된 유전자의 안정적, 계획적 발현을 가능케 하는 기술을 개발하고 이를 국내 다른 연구과제들에 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

2) 경제·산업적 측면

천연고무 (cis-1,4-polyisoprene)는 일반 상업용, 의료용, 운수업 및 방위산업등 산업 전 분야에 걸쳐서 활용되고 있는 중요한 재료물질로서 세계적인 수요는 약 600만 톤에 이르고 있으며 전체 고무소비의 35% 정도를 차지한다. 합성고무는 석유화학제품의 부산물로 만들어지는데 모든 고무제품에 이용될 수 없으며, 특히 고도의 flexibility, elasticity, 및 resilience를 요구하는 산업용이나 heavy-duty 타이어 등에는 천연고무가 필히 요구되고 있다 (Bowers, 1990, USDA Technical Report). 우리나라의 천연고무 수입은 연간 약 30만 톤으로 약 3,500억원을 지출하며 매년 증가추세에 있으며 (International Rubber Study

Group 1996년 5월 보고서), 전 세계적으로 개도국들의 고도의 경제성장과 더불어 그 수요는 날로 증가하고 있다. 우리나라를 비롯한 온대지방 국가에서는 전량 열대지방의 개도국들로부터의 수입에 의존하고 있다. 그러나, 경제성장에 따른 노동집약적인 재래식 고무산업의 기피와 고무나무의 벌목 등으로 인하여 천연고무 생산량은 감소추세이다. 이로 말미암은 천연고무의 가격인상은 필연적이며, 공급부족으로 인한 문제점까지 제기되고 있는 실정이다.

세계적으로 제한된 석유매장 자원을 감안할 때 대체고무의 개발은 지속적인 국가 경제활동 및 국민 생활편의를 위해 필연적이다. 합성고무는 천연고무에 비해 생산단가가 낮은 편이나 원료인 석유의 공급과 가격변동에 직접적으로 영향을 받으므로 원료고무의 안정적 공급에 문제가 될 수 있다. 따라서 국내에서 재배 가능한 고무작물 개발은 농민들에게 새로운 경제작물을 제공하여 기존의 노동집약적인 저 부가가치 작물을 대체하여 농촌경제의 활성화를 이룰 뿐만 아니라 막대한 양의 천연고무 수입대체효과와 함께 수출을 통한 국제고무 시장 개척도 가능하다.

3) 사회·문화적 측면

고무제품은 우리의 일상생활에서 편의용품이 아니라 필수품이다. 이들 제품이 없이는 단 하루도 생활을 영위할 수 없는 상황에서 고갈되어 가는 석유매장 자원에서 비롯되는 합성고무에 장기적, 안정적 고무공급을 기대할 수 없다. 이미, 미국등 선진국에서는 석유자원 고갈에 대비하여 대체에너지 및 고무 등의 기술개발에 박차를 가하여 대체에너지 분야에서는 일부 성과를 거두고 있는 실정이다.

고무는 식량안보에 못지 않은 중요 원료물질이다. 급변하는 현대 국제질서 속에서 국가적 생존과 번영은 오로지 기술개발을 통한 국제 경쟁력의 우위를 확보, 유지하는 길밖에는 없다. 지속적인 경제활동을 통해 기술개발의 역력이 축적되며, 이를 위해서는 원료물질의 안정적 확보를 위한 경쟁에서 이겨야만 한다. 뿐만 아니라, 국토 방위산업에서 고무원료가 차지하는 중요성에 비추

어 이의 안정적 공급은 우리의 국방안보에도 직결되어 있다. 세계 2차대전 당시 일본이 동남아시아 수로를 차단하게 되어 천연고무 수입의 길이 막히는 경험을 계기로 미국에서는 국내에서 생산 가능한 대체고무의 개발에 박차를 가하여 수 천 종의 고무 생산 가능성이 있는 식물을 수집, 연구하여 온 결과 약 100,000톤의 천연고무를 이들 식물로부터 생산한 바 있으나, 대전의 종식과 합성고무 기술의 개화로 인해 이들 연구는 사실상 중단되었다가 근래에 다시 주목을 받고 있다.

우리의 필수품 공급을 열대지방의 개도국들의 손에 의존할 수 없다. 세계의 기술 평준화 추세에 따라 이들 개도국들도 고도의 경제성장을 이루면서 저 부가가치 노동집약적인 재래식 고무농업을 기피하여 천연고무 생산이 현저하게 줄어들고 있다. 따라서, 과거에 석유 생산국들이 석유파동을 일으킨 사례에 비추어 이들 고무 생산 국가들이 천연고무의 공급회소가치를 이용한 경제 무기화할 가능성도 있다. 본 연구의 성공적 수행은 이처럼 중요한 원료물질의 국내 생산기술을 개발하여 천연고무의 안정적 공급에 기여할 것으로 사료된다.

제 2 절 연구개발의 세부목표 및 내용

1. 연구개발의 목표

유전자 조작을 통한 고무생산 작물을 개발하기 위하여 천연고무 생합성 과정을 이해하고 관련 유전자를 분리, 확보한다. 기존의 관련지식을 최대한 활용하면서 새로운 과학적 발견을 도모하여 고유의 지적소유권을 확보하여 기술사용료의 해외지출을 방지하고 오히려 해외로부터 기술사용료 수입을 추구한다. 무화과 및 해바라기에서 관련 유전자의 분리 및 동정을 통하여 국내 고무작물로 육성할 목표로 해바라기에서 관련 유전자를 확보하여 사용하므로 외국의 유전자에 의존하지 않고 자체 유전자를 이용하여 효과적인 기술개발을 도모하고자 한다.

분리동정한 천연고무 생합성에 핵심적인 유전자들을 대상작물에 도입

하고자 해바라기 등 대상작물의 형질전환 기술을 개발한다. 형질전환 해바라기의 포장시험 및 천연 고무생산 실용화 가능성을 타진하기 위하여 여러 가지 환경인자가 천연고무 생산에 미치는 영향을 규명하고 최적조건을 확립한다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

상기의 연구목표를 위해 본 과제는 1) 고무중합 유전자 및 고무 생산성 결정 유전자 규명 (제1세부과제), 2) 해바라기 형질전환 기술개발 (제2세부과제), 3) 고무생합성에 미치는 환경요인 분석 (위탁과제) 등으로 구성되어 있다.

제1세부과제에서는 *Hevea*에서 latex에 특이적으로 발현하는 유전자들을 분리하고 고무 생합성에 관련된 유전자들을 탐색하고 제2세부과제에서는 대상작물의 조직배양 및 형질전환기술을 개발하고 위탁과제에서는 고무 생산에 미치는 환경적요인 (저온, 빛조건, 수분상태, 계절적 변이)에 따른 고무생산량 조사한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

국내에서는 아직 천연고무 생합성에 관한 직접적인 연구는 없었다. 본 과제가 진행된 지난 5년 동안 국내.외의 고무생산 관련 연구동향에 큰 변화는 없으며 연관된 분야의 특허나 논문이 많이 발표되지도 않았다. 국내에서는 현재 천연고무 생합성에 관한 연구가 전무하며, 본 연구팀은 국내에서 재배 가능한 천연고무를 생산하는 경제작물을 개발하고자 지난 5년간 여러 가지 연구를 수행하여 많은 결과를 얻었다. *Hevea* 고무나무의 latex에 발현되는 고무 생합성 관련 유전자를 다수 분리하였으며, 특히 고무중합효소로 추정되는 단백질을 동정하고 그 유전자를 분리하여 대장균을 이용한 발현을 통하여 재조합 단백질을 얻어 그 기능을 조사하는 실험을 진행하고 있다. 또한 국내에서 쉽게 재배 가능한 무화과 나무에 다량의 천연고무가 함유되어 있다는 사실을 처음으로 밝혀내어 궁극적인 대상작물로 이용할 수 있는 가능성을 얻었다. 또한 식물 유전자 조작 연구의 최종결실을 위해서 꼭 필요한 식물의 형질전환 체계를 확립하기 위하여 대상작물의 기내 재분화 조건을 최적화하고 *Agrobacterium* 및 *bambardment*를 이용한 유전자 이식기술 확립에 주력하고 있다. 지금까지 본 연구진의 가장 큰 연구성과로 여겨지는 고무중합효소로 추정되는 유전자의 분리는, 세계의 다른 연구진에서 얻지 못했던 것으로 고무생합성 관련 연구의 핵심사항이며 이를 이용한 지속적인 연구가 필요하다.

본 연구진은 지난 5년 동안의 연구결과 고무생산작물로 규명된 무화과나무의 고무입자 단백질을 분석하여 새로운 단백질을 찾고 이들 서로 다른 단백질이 각각 다른 식물체에서 고무의 분자량을 조절한다는 가능성을 제시하였다. 본 연구팀은 그동안의 연구를 통하여 천연고무 연구분야의 경쟁력을 확보하였으며, 과제의 최종 목적을 달성하기 위해 가능한 모든 연구수행 방법을 활용하여 성공적인 과제수행을 위한 노력을 계속하고 있다. 식물 유전자조작 연구의 최종결실을 밭에서 이룩하기 위해서는 목적하는 작물에 유전자를 안정적으로 이식하고 발현시키는 기술의 확립을 소홀히 할 수 없으며 연구의 초기단계에서부터 고려되어야 한다. 본 연구

진은 이미 대상작물인 해바라기의 기내 재분화를 위한 최적조건을 확립하였고, 유전자 이식기술을 확립하였으며 현재는 형질전환 효율을 극대화시키는 연구를 진행하고 있다.

제 2 절 외국의 기술개발 현황

Hevea 고무나무를 대상으로 한 연구는 아직까지 *Hevea latex*의 allergy에 관여하는 단백질을 규명하는 연구가 주종을 이루고 있으며, 고무중합효소의 정체를 규명하는 연구결과는 아직 보고되지 않고 있다. 본 연구팀과 공동연구를 하고 있는 말레이시아 국립고무연구소에서는 *Hevea*의 형질전환체계를 개발하여 여러 가지 유전자를 이식시키는 시도를 하고 있다. 이 기술은 아직 확립되지는 않았지만 지속적인 연구와 개발을 통하여 본 과제팀에서 분리한 유전자들의 기능을 분석하는데 유용하게 이용될 것으로 생각된다. 최근에는 단순한 고무생산보다는 무독성 latex등의 value-added 천연고무의 개발에 주력하고 있으며, 고무나무가 많은 량의 latex수액을 생산하는 점에 착안하여 형질전환된 고무나무에서 의약품 생산 등에 관심을 가지고 연구가 진행 중에 있다 (Dr. H.Y. Yeang, Personal communication). 국립 말레이시아 고무연구소 팀에서는, 고무입자 단백질 중 고무합성억제 및 촉진인자를 분리하였으며, 촉진인자는 eukaryotic Initiation Factor 5A (eIF-5A)와 sequence homology를 가지고 있음을 밝혀냈다 (F. Yusof; personal communication, Rubber Research Institute of Malaysia).

싱가포르에서는 국립 싱가포르 대학교를 중심으로 한때 고무 생합성 관련 유전자를 연구하였으나 중요 연구자들이 떠나면서 현재는 이 분야에 연구활동이 미미한 실정이다 (Dr. M.L. Chye; personal communication, Hong Kong 대학교). 한때에는 미국의 N.-H. Chua박사가 이 대학연구소의 고문으로 있으면서 연구발전을 도왔으나 현재에는 관련 연구에 활동이 없다.

미국에서는 아리조나대학교, 아리조나주립대학교, Genetech사, Goodyear사, 농무성, Texas A&M대학교 등에서 연구를 진행하였거나 진행 중에 있다.

Arizona대학교에서는 Dr. Janice Bowers가 미 농무성 연구과제로 천연고무 생산 가능한 식물체에 관한 조사분석을 하여 연구보고서로 제출한 바 있다. 이 보고서에서는 국내 고무공급의 전략적, 경제적 중요성을 강조하였으며 미국 내 식물체 중에서는 Guayule이 가장 경제성이 높은 것으로 결론을 내렸다. 아리조나주립대학교에서는 Backhaus박사 그룹에서 Guayule을 모델로 하여 관련 연구를 진행 중에 있다. 이들은 cDNA library를 제작하여 관련유전자 선별을 진행하고 있으며, 고무입자의 주요 단백질이 P₄₃₀라는 사실을 발표하기도 하였다 (Pan *et al.*, 1995). Genetech 사는 San Francisco에 위치한 생명공학 관련회사로서 1980년대에 고무 생합성 관련 효소들의 단백질 분리 동정에 연구를 하여 몇 개의 논문을 발표하였으나 현재로는 관련 연구활동이 알려지지 않고 있다. Goodyear사는 미국내에서 굴지의 타이어 생산업체로서 업종의 성격상 천연고무 연구에 관심을 보이는 것은 당연하다. 이 회사 연구진은 rubber polymerase라고 claim하는 DNA sequences로 특허(US patent PCT/US 90/05735)를 획득하였으나, 어떠한 의미에서도 이는 전체 rubber polymerase가 분리된 것으로 볼 수 없으며 이들의 특허에서도 완전한 유전자로 주장하지는 않고 있다. 그 이후 이들 연구진으로부터는 후속 연구결과가 없는 것으로 미루어 연구진전이 없거나 기업 비밀 보호 차원에서 공개를 하지 않는 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구진의 판단으로는 국내 자체 기술개발이 필연이며 고무원료의 국가경제, 안보 및 국민 생활편의 차원의 중요성에 비추어 이같은 기술개발은 한 기업의 이윤추구 차원이 아니라 국가적 차원에서 지원이 이루어 져야한다. 미국 농무성에서는 자체 연구시설을 이용하여 대체고무 개발을 국가적으로 주도하여 오고 있다. 이는 에너지성의 대체 에너지 개발과 같은 맥락으로 받아들여진다. 과거 1970년대 석유파동을 경험한 이후 점차 고갈되어 가는 석유자원에 전적으로 의존하는 합성고무에 국가 기간 산업을 방치할 수 없기 때문이다. 캘리포니아 Albany에 위치한 농무성 연구소에서는 Katrina Cornish박사를 중심으로 유전 공학적 기법을 이용한 대체고무 개발을 하고 있다. Cornish박사는 아리조나주립대학교의 Backhaus박사와 같이 Guayule을 이용한 고무생산 연구를 하였으며 농무성으로 옮긴 이후에도 같은 수준으로 연구를 계속하여 많은 성과를 거두었다. 최근 성과중의 하나는 저질의 고무를 생산하는 인디안 고무나무 (*Ficus elastica*)의 고무입자 단백질이 guayule이나 *Hevea* 고무 particle 단백질과 비슷하다는 사실을 밝혀냈다(Siler

and Cornish, 1991). 이들 연구의 한계는 첫째, 아직 관련 유전자들에 관한 이해가 부족하고; 둘째, 유전자조작에 대한 뚜렷한 전략이 제시되어 있지 않으며; 셋째, 목적 수종인 Guayule에서 형질전환 기술이 확립되어 있지 않다는 것이다. Utah대학의 Dale Poulter박사 연구팀이 Rubber polymerase를 분리하기 위한 노력을 경주하고 있으나 아직 결실여부는 알려지지 않고 있다. 2002년도 부터 미국은 해바라기를 북미지역에서 재배 가능한 대체 고무생산 작물로 개발하기 위하여 미국과 캐나다의 5개 연구기관에 4년간 250만 달러의 연구비를 지원하고 있다. 연구 총 책임자는 Colorado State University의 Calvin H. Pearson 교수이며 USDA의 Katrina Cornish박사, California 대학의 Jay Keasling박사, Arizona 대학의 Denis T. Ray 박사, 및 Alberta 대학의 John Vederas 박사도 핵심 멤버로 참여하고 있다. DuPont 회사도 고무 생합성 유전자를 규명하는데 몇 년간 많은 투자를 하였으나 현재는 중단된 상태이다.

일본에서는 1996년 8월에 국제 심포지엄을 개최하여 Isoprenoids 생화학 분야에서 28개의 주 발표와 22개의 포스터를 통해 관련 연구의 현재상황을 집약한 바 있다 (International Symposium on Isoprenoid Biochemistry, Japan August 20-24, 1996).

제 3 절 국내외 기술개발에 차지하는 본 연구 결과의 위치 및 기여도

상기한 바와 같이 국제적으로 고무 생합성 기작에 대한 연구를 오랫동안 하여 옴으로서 지식의 진전을 상당히 보고 있다. 본 연구진은 지난 5년 동안 분자생물학적 생화학적 기술 진보를 이루며 그 생합성 기작에 대한 이해를 상당히 증진시켰다. 핵심유전자 몇 개를 분리하여 학술발표와 국제 특허등록을 하였으며 국내에서 재배 가능한 고무 생산작물로 해바라기뿐만 아니라 무화과 나무와 *Ficus benghalensis*의 고무생산 여부를 최초로 규명하였다. 고무를 생합성하는 유전자는 cis-prenyl transferase의 일종일 것으로 추정하여

*Arabidopsis*에서 이 유전자의 isoform을 식물체에서는 최초로 분리 동정하여 고무생합성과의 관계를 점검하였다. 이러한 연구결과는 DuPont 등 여러 국제 학술 연구진전에 직접적인 기여를 하였으며 유수 연구팀들이 cis-prenyltransferase 유전자를 *Hevea*에서 찾아 고무 생합성에서의 역할을 규명하는 기반을 마련하였다. 본 연구진은 가장 핵심 유전자인 고무생합성 유전자 분리 및 동정에 상당한 진전을 이루었으며 지식기반과 기술력의 국내 소유권 확보를 위하여 노력하고 있다.

제 3 장 고무입자-결합 단백질(SRPP) 을 발현하는 재조합 미생물

대한민국특허: 번호0302100 (2001년 6월 29일 등록)

미국, 유럽, 일본 특허 출원중

발명자: 한경환, 강훈승, 오수경, 초우켄씨, 파리다유소프, 앵홍잇

출원인: 금호석유화학(주), Malaysian Rubber Board

제 1 절 요약

본 발명은 고무나무(*H. brasiliensis*) 라텍스로부터 유래된, 작은 고무나무 입자에 결합하는 고무입자-결합 단백질(small rubber particle-associated protein, 'SRPP')을 코딩하는 유전자, 전기 유전자로부터 유추되는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP), 전기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터와 이로부터 형질전환된 재조합 미생물, 및 재조합 SRPP를 이용한 고무를 생합성방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 미생물로부터 발현되는 재조합 SRPP는 고무입자의 존재시 고무합성을 촉진시키므로, 전기 재조합 SRPP를 생물학적 방법에 의한 고무생산에 활용할 수 있을 것이다.

제 2 절 명세서-도면의 간단한 설명

도 1은 SRPP cDNA의 염기서열 및 그로부터 유추되는 아미노산 서열을 나타내는 그림이다.

도 2는 SRPP의 하이드로퍼시(hydrophathy) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 SRPP와 다른 고무합성 관련 단백질들의 아미노산 서열을 비교하여

나타낸 그림이다.

도 4a는 재조합 발현벡터 pGEX-SRPP의 유전자 지도이다.

도 4b는 재조합 발현벡터 pRSET-SRPP의 유전자 지도이다.

도 5a는 GST-SRPP 융합단백질을 발현하는 재조합 대장균(E.coli) XL-1 Blue/pGEX-SRPP(KCTC 0595BP)의 세포추출액을 전기영동한 SDS-PAGE 결과이다.

도 5b는 재조합 SRPP를 발현하는 재조합 대장균(E.coli) XL-1 Blue/pRSET-SRPP(KCTC 0596BP)의 세포추출액을 전기영동한 SDS-PAGE 결과이다.

도 6a는 재조합 SRPP 농도에 따라 고무입자 내로 혼입되는 [14C] IPP가 증가됨을 보여주는 그래프이다.

도 6b는 항-SRPP 항체 농도에 따라 고무입자 내로 혼입되는 [14C] IPP가 감소함을 보여주는 그래프이다.

제 3 절 발명의 상세한 설명

3-1 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 고무입자-결합 단백질을 발현하는 재조합 미생물에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 고무나무(H. brasiliensis)의 라텍스로부터 유래된, 작은 고무나무 입자에 결합하는 고무입자-결합 단백질(small rubber

particle-associated protein, 'SRPP')을 코딩하는 유전자, 전기 유전자로부터 유추되는 재조합 SRPP, 전기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터와 이로 형질전환된 재조합 미생물, 및 재조합 SRPP를 이용한 고무의 생합성방법에 관한 것이다.

고무(rubber, cis-1,4-polyisoprene)는 일종의 이소프레노이드(isoprenoid) 중합체로서, 약 2,000 종의 식물에서 다양한 양과 질의 고무가 생산되지만, 그의 생리학적인 기능은 알려져 있지 않다(참조: Backhaus, R. A., Rubber formation in plants: a mini-review, Israel Journal of Botany, 34:283-293, 1985). 고무는 튼튼한 타이어 뿐만 아니라, 신축성, 유연성 및 탄력성이 요구되는 기타 산업용 자재의 재료로 사용되어 왔다. 고무나무(*Hevea brasiliensis*)는 다량으로 양질의 고무를 생산할 뿐만 아니라 생산된 고무를 회수하기도 용이하기 때문에, 유일한 상업적인 천연 고무 원료로서 선호되어 왔다. 그러나, 고무에 대한 수요의 증가와 더불어 고무나무의 식수면적의 감소 및 고무에 대한 치명적인 라텍스(latex) 알러지로 인하여, 고무 생합성에 관한 연구에 대한 관심과 고무 대체물의 개발에 대한 필요성이 증가되어 왔다.

고무나무에서 고무의 생합성은 고무나무의 점액질에 접해있는 분화된 도관인 유액균사(laticifer)의 세포질(cytoplasm)인 라텍스 중에 부유되어 있는 고무입자의 표면에서 일어난다. 고무나무의 수액을 받는 동안, 유액균사 내의 높은 압력은 라텍스를 밀어내는데, 전기 라텍스는 30 내지 50%(w/w)의 시스-1,4-폴리이소프렌(cis-1,4-polyisoprene)을 포함하고 있다. 전기 라텍스를 원심분리하면, 고무입자를 포함하는 상층, 물질대사 활성분획인 중간층(일명 'C-세럼'이라고도 불리움), 및 '루토이드(lutoid)'라 불리우는 소포체를 포함하는 하층의 세 분획으로 분리된다.

고무나무의 라텍스로부터 200개 이상의 고무 생합성과 관련된 발현 서열 표지(expressed sequence tag)가 규명되었는 바, 쿠쉬(Kush) 등은 라텍스에서 몇몇 고무합성-관련 유전자들이 발현됨을 밝힐 수 있었다(참조: Kush, A. et al., Laticifer-specific gene expression of *Hevea brasiliensis*(rubber tree), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 87:1787-1790, 1990). 특히, 고무의 신장 인자(rubber elongation factor, REF)는 고무합성에 관여하는 효소로서 유액균사에서 높은 수준으로 발현된다(참조: Dennis, M. S. and Light, D. R., Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis, J. Biol. Chem., 264:18608-17, 1989;

Goyvaerts, E. et al., Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*, *Plant Physiol.*, 97:317-321, 1991). 전사된 유전자를 매우 활발히 단백질로 해독하기 위한 기구(machinery)로서, 투피(Tupy) 등은 유액세포 내에 리보솜과 폴리솜이 존재함을 보고한 바 있다(참조: Tupy et al., Ribosomal and polyadenylated RNA content of rubber tree latex, association with sucrose level and latex pH, *Plant Science*, 55:137-144, 1988). 또한, 아로키아라(Arokiaraj) 등은 아그로박테리움-매개 형질전환법에 의하여 도입된 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase) 리포터 유전자가 형질전이된 고무 식물체의 라텍스에서 발현됨을 관찰하였다(참조: Arokiaraj et al., CaMV 35S promoter directs β -glucuronidase expression in the laticiferous system of transgenic *Hevea brasiliensis*(rubber tree), *Plant Cell Reports*, 17:621-625, 1998).

한편, 고무나무의 라텍스에서 발현되는 유전자들은 그들이 코딩하는 단백질에 따라 세 부류로 구분될 수 있는데, 첫째 부류는 헤베인(hevein), 키티네이즈(chitinase), β -1,3-글루카네이즈(glucanase) 및 히버(HEVER)와 같은 방어-관련 단백질들(defense-related proteins)을 코딩하는 유전자이고(참조: Broekaert et al., Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree(*Hevea brasiliensis*), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 87:7633-7637, 1990; Martin, M. N., The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of chitinases and chitinases/lysozymes, *Plant Physiology*, 95:469-476, 1991; Chye, M. L. and Cheung, K. Y., Beta-1,3-Glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*, *Plant Mol. Biol.*, 29:397-402, 1995; Sivasubramaniam, S. et al., Characterisation of HEVER, a novel stress-induced gene from *Hevea brasiliensis*, *Plant Mol. Biol.*, 29:173-8, 1995); 둘째 부류는 REF, HMGCoA 환원효소 및 파네실 다이포스페이트(farnesyl diphosphate) 합성효소와 같은 고무합성-관련 단백질들을 코딩하는 유전자이며(참조: Goyvaerts, E. et al., Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*, *Plant Physiol.*, 97:317-321, 1991; Chye, M. L. et al., Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: hmg1 and hmg3 are differentially expressed, *Plant Mol. Biol.*, 19:473-484, 1992; Adiwilaga, K. and Kush, A., Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree(*Hevea brasiliensis*), *Plant Mol. Biol.*, 30:935-946, 1996); 셋째 부

류는 Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5 및 Hev b 7과 같은 라텍스 알러젠을 코딩하는 유전자이다(참조: Yeang, H. Y. et al., The 14.6 kd rubber elongation factor(Hev b 1) and 24 kd(Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98:628-639, 1996; Akasawa, A. et al., A novel acidic allergen, Hev b 5, in latex. Purification, cloning and characterization, *J. Biol. Chem.*, 271:25389-93, 1996; Slater, J. E. et al., Identification, cloning, and sequence of a major allergen(Hev b 5) from natural rubber latex(*Hevea brasiliensis*), *J. Biol. Chem.*, 271:25394

고무입자는 실험실적 조건에서 고무를 합성하는 데 있어 필수적인 요소로서(참조: Lynen, F., Biochemical problems of rubber biosynthesis, *J. Rub. Res. Inst. Malaya*, 21:389-406, 1969), 지금까지 이루어진 표지된 이소펜틸닐 피로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate, IPP)를 사용한 실험실적 고무합성 시험 결과들은 모두 고무입자가 고무합성에 반드시 필요함을 보여주었다. 데니스(Dennis)와 라이트(Light)는 일종의 고무입자-결합 단백질(rubber particle-associated protein, RPP)인 REF가 실험실적 조건에서의 고무 신장에 필요함을 밝힌 바 있다(참조: Dennis, M. S. and Light, D. R., Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 264:18608-17, 1989). 영(Yeang) 등은 지름이 10 μ m 이하인 작은 고무입자에 강하게 결합되어 있는 24kDa RPP(small rubber particle-associated protein, SRPP) 즉, Hev b 3가 라텍스 알러젠임을 규명하였다(참조: Yeang, H. Y. et al., The 14.6 kd rubber elongation factor(Hev b 1) and 24 kd(Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98:628-639, 1996; Yeang, H. Y. et al., Amino acid sequence similarity of Hev b 3 to two previously reported 27- and 23-kDa latex proteins allergenic to spina bifida patients, *Allergy*, 53:513-519, 1998). 또한, 팬(Pan) 등은 고무 생산 식물의 일종인 과울고무나무(guayule)에서 가장 풍부하게 존재하는 53kDa RPP가 알렌(allene) 옥사이드 합성효소로 알려진 사이토크롬 P450임을 규명하였는 바(참조: Pan, Z. et al., The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450, *J. Biol. Chem.*, 270:8487-8494, 1995), 전기 53kDa RPP가 고무 생합성에 필수적인 것으로 알려져 있다(참조: 미국특허 제 5,633,433호).

상술한 사실들로 미루어 볼 때, 고무입자의 표면에 고무 중합효소가 위치하고 있을 가능성이 높는데, 전기 고무 중합효소는 사이토솔(cytosol)로부터 친수성 기질을 획득하면서 고무입자의 내부로 소수성 중합체를 중합하여 나간다. REF와 SRPP는 주요 RPP로서 고무 생합성 기구(machinery)의 필수적인 구성요소일 수 있다.

SRPP는 이분척추(spina bifida) 환자에서 알러지 반응을 유발하며, 일부 아미노산 서열만이 밝혀져 있을 뿐(참조: Yeang, H. Y. et al., The 14.6 kd rubber elongation factor(Hev b 1) and 24 kd(Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 98:628-639, 1996; Yeang, H. Y. et al., Amino acid sequence similarity of Hev b 3 to two previously reported 27- and 23-kDa latex proteins allergenic to spina bifida patients, Allergy, 53:513-519, 1998), 유전자는 아직까지 클로닝되지 않았다. 따라서, SRPP의 기능 및 특성에 대한 연구 및 산업적인 응용 가능성을 위하여, 유전자를 클로닝하고 분석하여야 할 필요성이 절실하였다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 SRPP 유전자를 클로닝하고 SRPP의 고무합성과 관련된 기능을 밝히고자 예의 연구노력한 결과, 고무나무(*H. brasiliensis*)의 라텍스로부터 전체 길이의 SRPP cDNA를 클로닝하여, 그의 특성과 그로부터 유추되는 아미노산 서열을 결정하는 한편, 전기 cDNA를 포함하는 발현벡터 및 이로 형질전환된 재조합 미생물을 제조한 데 이어, 전기 재조합 미생물로부터 발현시켜 수득된 재조합 SRPP가 고무합성을 촉진시킴을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 첫번째 목적은 SRPP cDNA를 제공하는 것이다.

본 발명의 두번째 목적은 전기 cDNA로부터 유추되는 아미노산 서열을 가지는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)을 제공하는 것이다.

본 발명의 세번째 목적은 전기 cDNA를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 네번째 목적은 전기 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다섯번째 목적은 재조합 SRPP를 이용하여 고무를 생합성하는 방법을 제공하는 것이다.

3-2 발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

본 발명자들은 고무나무(*H. brasiliensis*)의 라텍스 cDNA 라이브러리로부터, 지름이 10 μ m 이하인 작은 고무입자에 강하게 결합되어 있으며, Hev b 3 단백질로도 알려져 있는 24kDa 단백질 즉, SRPP(small rubber particle-associated protein)를 코딩하는 cDNA 전장을 분리하고 특성을 규명하는 한편, 전기 cDNA로부터 유추되는 아미노산 서열을 결정하였다. SRPP cDNA는 총 910bp로, 83bp 5'-UTR(untranslated region), 615bp 유전자 개방해독틀(open reading frame, 'ORF'), 및 18bp 폴리(A) 테일을 포함하는 212bp 3'-UTR로 구성되어 있으며, 794bp 위치에서 시작하는 추정적인 폴리 아테닐화 신호(AATAA)를 가지고 있다. 한편, 전기 cDNA로부터 유추되는 SRPP 단백질은 총 204 개의 아미노산으로 구성되며 계산상 분자량은 약 22.4kDa이다. SRPP 단백질은 산성(pI=4.8)을 띠는 소수성 단백질로서, 세포질 내에 위치한다. SRPP는 REF(GenBank Accession No. P15252)와 72%, 불가리스(*P. vulgaris*)의 스트레스-연관 단백질(stress-related protein)(PvSRP, GenBank Accession No. 1326163)과 68%, 그리고 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) F1N21.4(GenBank Accession No. 2670320)와 48%의 서열상동성을 보인다. SRPP, REF 및 PvSRP의 아미노산 서열은 38 내지 65번째 아미노산에 해당하는 부위에 보존영역(conserved region)을 가지고 있으나, 전기 보존영역은 지금까지 알려진 어떠한 기능적 영역과도 일치하지 않는다.

본 발명에 의하여 제공되는 재조합 발현벡터 pGEX-SRPP와 pRSET-SRPP는 전기 910bp SRPP cDNA를 각각 pGEX 벡터의 EcoRI-XhoI 부위와 pRSET 벡터의 BamHI-PvuII 위치에 각각 삽입하여 제조된다. 전기 pGEX-SRPP에서는 글루타치온 S-트랜스퍼라아제('GST')와 SRPP의 융합단백질이 IPTG에

의하여 유도되는 tac 프로모터의 조절 하에 발현되며, 전기 pRSET-SRPP에서는 SRPP만이 단독으로 T7 프로모터의 조절 하에 발현된다. 본 발명자들은 전기 pGEX-SRPP와 pRSET-SRPP로 대장균(E. coli) XL-1 Blue를 형질 전환시킨 다음, 이들을 각각 대장균(E. coli) 'XL1-Blue/pGEX-SRPP'와 'XL1-Blue/pRSET-SRPP'라 명명하고, 1999년 3월 30일자로 국제기탁기관인 생명공학연구소(KRIBB)에 기탁번호 'KCTC 0595BP'와 'KCTC 0596BP'로 기탁하였다.

재조합 SRPP는 일반적인 재조합 단백질의 제조방법에 따라 전기 재조합대장균 XL1-Blue/pGEX-SRPP 또는 XL1-Blue/pRSET-SRPP를 앰피실린을 포함하는 LB 배지에서 IPTG로 단백질 발현을 유도하면서 배양한 다음, 세포균질액을 제조하고, 이를 원심분리하여 상등액을 회수함으로써 용이하게 수득할 수 있다. 또한, 이와 같이 수득한 재조합 SRPP를 고무입자를 포함하는 고무합성 반응완충액에 가하고 반응시킴으로써, 실험실적 조건에서 고무를 용이하게 생산할 수 있다.

구체적으로, 반응완충액에 고무나무 라텍스 또는 세척된 고무입자(washed rubber particle, WRP)와 재조합 SRPP를 첨가하고, 20 내지 37℃에서 2 내지 12시간동안 반응시킴으로써 고무를 생합성시킬 수 있으며, 이때, 반응완충액은 단백질의 분해를 억제시키는 당업계 통상의 단백질 반응용 완충액을 사용할 수 있으며, 재조합 SRPP의 첨가에 따라 고무의 생합성 양이 증가되므로, 재조합 SRPP의 첨가량 또는 반응완충액 내의 바람직한 혼합비는 중요하지 않으나, 전체적인 효율을 고려할 때, 되도록 고농도의 재조합 SRPP를 첨가시키는 것이 경제적이다. 또한, 재조합 SRPP는 서열번호 2에 제시한 cDNA를 포함하는 발현벡터에 의하여 발현시킬 수 있으며, 발현벡터는 식물체 발현용 발현벡터, 세균 발현용 발현벡터, 효모 발현용 발현벡터 또는 진균 발현용 발현벡터로 작제할 수 있다. 이에 따라, 전기 cDNA를 포함하는 발현벡터는 숙주로서 식물체, 세균, 효모 또는 진균에 도입되어 발현되어질 수 있으며, 다른 단백질과 융합된 융합단백질 또는 재조합 SRPP만의 비융합단백질의 형태로 발현될 수 있다. 고무합성 반응시에도 마찬가지로, 융합단백질 또는 비융합단백질 형태의 재조합 SRPP를 사용할 수 있으며, 상술한 바와 같이 순수하게 분리 정제된 재조합 SRPP를 반드시 사용해야 할 필요없이 숙주의 세포균질물로부터 원심분리에 의하여 수득한 상등액을 바로 반응에 사용할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시

에는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

제 4 절 실시예

실시예 1: 고무나무 라텍스 cDNA 라이브러리의 제조

실시예 1-1: RNA의 분리 및 라텍스 cDNA 라이브러리의 제조

말레이시아 국립고무연구소(Selangor, Malaysia)로부터 입수한 성숙 고무 식물체(*H. brasiliensis*, RRIM600)로부터 라텍스와 잎을 수득하였다. 라텍스는 고무나무로부터 수득시 상온 또는 0°C에서 동량의 2X RNA 추출 완충용액 (0.1M Tris · HCl/0.3M LiCl/0.01M EDTA/10% SDS, pH 9.5)과 지속적으로 혼합하였다. 이와 같이 수득한 라텍스 시료는 액체질소에 보관하였다.

전기 라텍스 시료로부터 Qiagen RNeasy Plant Minikit(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)를 사용하여 쿠쉬(Kush) 등의 방법에 따라 RNA를 추출한 다음(참조: Kush, A. et al., Laticifer-specific gene expression of *Hevea brasiliensis*(rubber tree), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 87:1787-1790, 1990), Oligotex-dTTM mRNA kit(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)를 사용하여 폴리(A)+ RNA를 분리하였다. 이어서, Uni-ZAP II 파아지 벡터(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 포함하는 cDNA 라이브러리 키트를 이용하여 제조자의 지시에 따라 전기 폴리(A)+ RNA로부터 라텍스 cDNA 라이브러리를 구축하였다. 결과적으로 약 5 x 10⁷개의 재조합 파아지들을 포함하는 라텍스 cDNA 라이브러리가 구축되었다.

실시예 1-2: cDNA 라이브러리 스크리닝

라텍스 cDNA로부터 잎 cDNA를 제외한 서브트랙티드(subtracted) cDNA 라이브러리를 사용한 예비 실험에서, 유추된 아미노산 서열이 이미 부분적으로

알려진 바 있는 SRPP 즉, Hev b 3의 아미노산 서열과 일치하는 발현된 서열 표지(expressed sequence tag, 'EST')를 발견하였다. 전기 EST 클론의 서열을 참조하여 SRPP 유전자의 +185로부터 +211까지의 염기서열에 해당하는 5'-caaggacatatctgggccattaaaacc-3'의 SRPP 프라이머(참조: 서열번호 1)를 제작하였다. 이어서, 전기 SRPP 프라이머와 T7 프라이머를 각각 상류(upstream) 프라이머와 하류(downstream) 프라이머로 사용하여, 전기 실시예 1-1로부터 수득한 라텍스 cDNA 라이브러리로부터 SRPP cDNA를 DNA 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭하였다. 이때, PCR은 5분간의 예열 단계를 거친 후, 94°C 30초, 50°C 30초 및 72°C 2분을 한 주기로 하여 총 30회 반복 수행되었으며, 72°C에서 10분간 최종 신장(extension) 반응을 거쳤다. PCR 반응으로부터 수득한 500bp 크기의 SRPP 유전자 절편을 프로브로 사용하여, 1/100로 희석된 전기 라텍스 cDNA 라이브러리를 스크리닝하였다. 그 결과로, 스크리닝에서 총 10개의 클론이 양성반응을 보였으며, EcoRI 제한효소 처리에 이은 아가로오스 젤 전기영동 결과, 이들 각각은 약 0.8 내지 1.0kb 크기의 삽입 DNA를 가지고 있는 것이 확인되었다. 그 중 약 1.0kb DNA 절편을 포함하고 있는 클론을 선택하여 이로부터 삽입 DNA를 용이하게 서브클로닝하고자, 전기 실시예 1-1에서 사용한 cDNA 라이브러리 키트의 제조사(Stratagene, La Jolla, CA, USA)가 공급하는 방법에 따라 생체내 조건에서의 절단(in vivo excision)을 수행하여, Uni-ZAP II 파아지 벡터로부터 약 1.0kb 크기의 삽입 DNA를 포함하는 파아지미드(phagemid)가 절단(excision)되어 나오도록 하였다. 이와 같이 수득한 파아지미드를 'pSRPP'라 명명하였다.

실시예 1-3: cDNA 클론의 서열분석

전기 pSRPP에 들어있는 cDNA 절편의 염기서열을 분석하고자, pSRPP로부터 유래되었으며 대장균(E.coli) 숙주 XL-1 Blue/pSRPP에 들어있는 플라스미드를 샘브룩 (Sambrook) 등의 알칼리 용혈 방법에 따라 위자드 플라스미드 분리키트(Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit, Promega, USA)를 이용하여 수득하였다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press). 이어서, 형광물질로 표지된 M13 프라이머와 역(reverse) 프라이머를 포함하는

ALFexpress AutoRead Sequencing Kit(Pharmacia Biotech, Sweden)를 사용하여, 서열분석 반응을 수행한 다음, ALF 자동염기서열분석기(Perkin Elmer, USA)로 염기서열을 결정하였다. 그 결과, pSRPP에 삽입되어 있는 DNA 절편의 정확한 크기는 910bp(참조: 서열번호 2)로, 83bp 5'-UTR(untranslated region), 615bp 유전자 개방 해독틀(open reading frame, 'ORF'), 및 18bp 폴리(A) 테일을 포함하는 212bp 3'-UTR로 구성되어 있으며, 794bp 위치에서 시작하는 추정적인 폴리아데닐화 신호(AATAA)를 가지고 있음이 밝혀졌다(참조: 도 1).

전기 서열번호 2의 염기서열로부터 유추되는 단백질(참조: 서열번호 3)은 총 204 개의 아미노산으로 구성되며 계산상 약 22.4kDa의 분자량을 가질 것으로 예상된다(참조: 도 1). 또한, 전기 단백질은 REF(pI=5.04)와 유사하게 산성(pI=4.8)을 띠며, 유추된 아미노산 서열의 하이드로퍼시 분석 결과는 SRPP가 소수성 단백질임을 제시하였다(참조: 도 2). TMpred 알고리즘을 사용한 막 통과부위 분석을 통하여 SRPP가 지질이중막을 가로지를 만큼 큰 막 통과 나선부위를 가지고 있지 않음을 알 수 있었으며, PSORT 프로그램(K. Nakai, Osaka University, Japan)을 사용한 컴퓨터 분석 결과는 SRPP가 세포질 내에 위치함을 제시하였다(certainty=0.65).

한편, Clustal W 프로그램을 사용하여 SRPP와 다른 단백질들 간의 아미노산 서열 상동성을 분석한 결과, SRPP는 REF(GenBank Accession No. P15252)와 72%, 불가리스(*P. vulgaris*)의 스트레스-연관 단백질(stress-related protein)(PvSRP, GenBank Accession No. 1326163)과 68%, 그리고 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) F1N21.4(GenBank Accession No. 2670320)와 48%의 서열상동성을 보였다. 전기 PvSRP는 방어 기작에 관여하며 스트레스 또는 상처에 의하여 유도되는 것으로 짐작되고 있으며, F1N21.4의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. SRPP, REF 및 PvSRP의 아미노산 서열은 38 내지 65번째 아미노산에 해당하는 부위에 보존영역(conserved region)을 가지고 있으나, 지금까지 알려진 어떠한 기능적 영역과도 일치하지 않았다(참조: 도 3).

실시예 2: 재조합 SRPP의 발현

SRPP 발현벡터를 제조하고자, 전기 실시예 1-3의 pSRPP 플라스미드를 제

한효소 EcoRI과 XhoI으로 처리하여 SRPP cDNA를 잘라내었다. 전기 cDNA 절편을 pGEX 벡터(Pharmacia, Sweden)의 EcoRI-XhoI 부위 또는 pRSET 벡터(Invitrogen, USA)의 BamHI-PvuII 위치에 각각 삽입하여, 재조합 발현벡터 pGEX-SRPP와 pRSET-SRPP를 제조하였다(참조: 도 4a 및 도 4b). 전기 pGEX-SRPP에서는 글루타치온 S-트랜스퍼라아제('GST')와 SRPP의 융합단백질이 IPTG에 의하여 유도되는 tac 프로모터의 조절 하에 발현되는 반면, 전기 pRSET-SRPP에서는 SRPP만이 단독으로 T7 프로모터의 조절 하에 발현된다. 한편, 전기 pGEX-SRPP와 pRSET-SRPP로 대장균(E. coli) XL-1 Blue를 형질전환시킨 다음, 이들을 각각 대장균(E. coli) 'XL1-Blue/pGEX-SRPP'와 'XL1-Blue/pRSET-SRPP'라 명명하고, 1999년 3월 30일자로 국제기탁기관인 생명공학연구소(KRIBB)에 기탁번호 'KCTC 0595BP'와 'KCTC 0596BP'로 기탁하였다.

전기 재조합 대장균 XL1-Blue/pGEX-SRPP(KCTC 0595BP)와 XL1-Blue/pRSET-SRPP(KCTC 0596BP) 각각을 50mg/L 암피실린을 포함하는 LB 배지에서 30°C의 온도 조건으로 정상시기(mid-stationary phase)에 이를 때까지 배양하였다. 그런 다음, IPTG를 0.1mM의 농도로 첨가하고, 4시간 더 배양하였다. 이후의 모든 과정은 4°C에서 수행되었다. 전기 배양액으로부터 세포를 회수하여 0.1M 인산칼륨 완충액(pH 7.4)에 현탁한 다음, 5,000 X g에서 10분간 원심분리하여 세포를 다시 회수하였다. 회수된 세포를 전기와 동일한 완충액 중에서 초음파분쇄기로 파쇄하였다. 이로부터 수득한 세포균질액을 10,000 X g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고, 램리(Laemmli)의 표준방법에 따라 SDS-PAGE를 실시한 다음(참조: Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 277:680-685, 1970), 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) R-250으로 염색하였다. 이하에서는 전기와 같이 세포균질액으로부터 분리된 상등액을 단순히 '세포추출액'이라 칭하기로 한다.

그 결과, 대장균 XL-1 Blue/pGEX-SRPP(KCTC 0595BP)로부터는 약 48kDa의 GST-SRPP 융합단백질이(참조: 도 5a), 그리고 대장균 XL-1 Blue/pRSET-SRPP(KCTC 0596BP)로부터는 약 24kDa의 재조합 SRPP가 발현됨을 확인하였다(참조: 도 5b). 도 5a 및 도 5b에서, M열은 단백질 분자량 마커를; C열은 단백질 발현이 유도되지 않은 대장균의 세포추출액을; 그리고, I열은 IPTG로 단백질 발현을 유도한 대장균의 세포추출액을 각각 전기영동한

결과를 나타낸다.

실시예 3: 실험실적 조건에서의 고무 생합성 시험

SRPP가 고무 생합성에 관여하는지 여부를 조사하기 위하여, 고무나무 C-세럼(Hevea C-serum) 및 세척된 고무입자(washed rubber particle, 'WRP')를 사용하는 실험실적 조건에서의 고무 생합성 시험을 수행하였다: 먼저, 종래의 방법에 따라 원심분리와 부유(floatation)을 반복하여 WRP를 제조하였다(참조: Cornish, K. and Backhaus, R. A., Rubber transferase activity in rubber particles of guayule, *Phytochemistry*, 29:3809-3813, 1990; Siler, D. J. and Cornish, K., A protein from *Ficus elastica* rubber particles is related to proteins from *Hevea brasiliensis* and *Parthenium argentatum*, *Phytochemistry*, 32:1097-1102, 1993). 즉, 고무나무(*H. brasiliensis*)로부터 추출된 라텍스를 같은 부피의 세척 완충액(100mM Tris-HCl, 5mM MgSO₄, 10mM DTT, 0.1mM PMSF)과 혼합한 다음, 40,000 X g에서 2시간 동안 원심분리하였다. 맑은 유액 즉, C-세럼을 취하고 난 다음, 상층에 있는 고무입자를 회수하고, 전기 세척 완충액으로 수회 반복세척하여 WRP를 수득하였다. 이어서, 종래의 공지된 방법에 따라 실험실적 조건에서의 고무입자 생합성 시험을 수행하였다(참조: Cornish and Backhaus, 1990; Siler and Cornish, 1993). 즉, 전기 WRP 10mg과 전기 실시예 2에서 수득한 GST-SRPP 융합 단백질을 발현하는 재조합 대장균 XL-1 Blue/pGEX-SRPP(KCTC 0595BP)의 세포로부터 수득된 세포추출액을 반응완충액(100mM Tris-HCl, pH 7.5, 80 μ M [14C]IPP(55mCi mmmol⁻¹), 20 μ M FPP, 1mM MgSO₄, 1mM DTT)에 가하여, 총 반응액의 부피를 50 μ l로 맞춘 다음, 25 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 반응시켰다. 이때, 대조군으로는 IPTG에 의한 단백질 발현유도를 거치지 않은 대장균 및 GST를 발현하는 pGEX 벡터로 형질전환된 대장균의 세포균질액으로부터 분리된 상등액을 사용하였다. 전기 반응혼합물에 25mM EDTA를 가하여 반응을 중지시키고, 여과법 또는 벤진 추출법으로 고무 내로 혼입된 [14C]IPP의 양을 측정하였다. 여과법을 위해서는 반응이 완료된 반응혼합물을 0.02 또는 0.1 μ m 아노디스크 막(anodisc membrane, Whatman, USA)으로 여과한 다음, 전기 막을 1M HCl과 95% 에탄올로 반복 세척하였다(참조: Cornish, K. and Backhaus, R. A., Rubber transferase activity in rubber particles of guayule, *Phytochemistry*, 29:3809-3813, 1990). 그런 다음, 세척된 막에 남아있는 방사

능을 LSC(liquid scintillation counter, Beckman)로 측정하였다. 한편, 벤젠 추출법을 위해서는 반응이 완료된 반응혼합물을 두 배 부피의 벤젠으로 3회 연속 추출한 다음, 이로부터 수득한 벤젠 추출액을 Ready Solv HP scintillation cocktail(Beckman)과 혼합하고, LSC로 방사능을 측정하였다. 그 결과, 고무 내로 혼입된 [14C]IPP의 양이 SRPP의 농도에 따라 증가함이 확인되었다(참조: 도 6a). 도 6a에서, (■)는 GST-SRPP를 발현하는 재조합 대장균의 세포추출액을 사용한 경우를 나타내고; (◆)는 IPTG 유도를 거치지 않은 재조합 대장균의 세포추출액을 사용한 경우를 나타내며; (▲)는 GST만을 발현하는 재조합 대장균의 세포추출액을 사용한 경우를 나타낸다.

실시예 4: 항-SRPP 항체에 의한 고무합성 저해

SRPP가 고무의 생합성에 관여하는지 여부를 재확인하고자, 본 발명의 재조합 SRPP로 면역된 토끼의 혈청으로부터 다클론 항체를 제조하고, 역시 재조합 SRPP로 면역된 마우스로부터 단일클론 항체를 제조하였다. 그런 다음, 전기 항체들이 C-세럼을 사용한 고무 생합성을 저해하는 정도를 측정하였다. 이때, 대조군으로는 면역되지 않은 혈청을 사용하였다. 고무 생합성 반응 조건은 재조합 대장균의 세포추출액 대신 C-세럼을 5 μ l 첨가하고, 항체 또는 혈청을 도 6b에 표시한 양만큼 추가로 첨가한 점을 제외하고는 전기 실시예 3과 동일하였다(참조: 도 6b). 그 결과, 도 6b에서 보듯이, SRPP 단백질에 의하여 생성된 다클론 및 단일클론 항체는 대조군 혈청에 비하여 고무합성을 상당한 수준으로 저해하였으며, 특히 다클론 항체를 사용한 경우에 저해정도가 더 컸다. 도 6b에서, (◆)와 (●)는 각각 면역되지 않은 토끼와 마우스의 혈청을 사용한 경우를 나타내고; (▲)와 (■)는 각각 단일클론 항체와 다클론 항체를 사용한 경우를 나타낸다. 다클론 항체의 저해정도가 더 큰 것은 SRPP가 REF와 유사한 아미노산 서열을 가지기 때문에, 다클론 항체가 SRPP 뿐만 아니라 REF와 교차반응을 일으킨데 기인하는 것으로 사료된다. 전기 실시예 3과 실시예 4의 결과는 SRPP가 고무 생합성에 직접적으로 관여함을 강력하게 제시하고 있다.

제 5 절 발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 고무나무 라텍스로부터 유래된, 작은 고무나무 입자에 결합하는 고무입자-결합 단백질(small rubber particle-associated protein, 'SRPP')을 코딩하는 유전자, 전기 유전자로부터 유추되는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP), 전기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터와 이로 형질전환된 재조합 미생물, 및 재조합 SRPP를 이용한 고무의 생합성방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 미생물로부터 발현되는 재조합 SRPP는 고무입자의 존재시 고무의 생합성을 촉진시키므로, 전기 재조합 SRPP를 생물학적 방법에 의한 고무생산에 활용할 수 있을 것이다.

제 6 절 청구의 범위

청구항 1

고무나무(*H. brasiliensis*)의 라텍스에 존재하는 지름 $10\mu\text{m}$ 이하의 작은 고무입자에 결합하는 고무입자-결합 단백질(small rubber particle-associated protein, 'SRPP')을 코딩하는 서열번호 2에 개시한 cDNA.

청구항 2

제 1항의 cDNA로부터 유추되는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP).

청구항 3

서열번호 2의 cDNA를 포함하며 도 4a의 유전자 지도를 가지는 것을 특징으로 하는, 글루타치온 S-트랜스퍼라아제와 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)의 융합단백질을 발현하는 재조합 발현벡터 pGEX-SRPP.

청구항 4

서열번호 2의 cDNA를 포함하며 도 4b의 유전자 지도를 가지는 것을 특징으로

로 하는, 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)을 발현하는 재조합 발현벡터 pRSET-SRPP.

청구항 5

제 3항의 재조합 발현벡터 pGEX-SRPP로 형질전환된 재조합 대장균(E. coli) XL-1 Blue/pGEX-SRPP(KCTC 0595BP).

청구항 6

제 4항의 재조합 발현벡터 pRSET-SRPP로 형질전환된 재조합 대장균(E. coli) XL-1 Blue/pRSET-SRPP(KCTC 0596BP).

청구항 7

고무나무 라텍스 또는 세척된 고무입자(washed rubber particle, WRP)와 재조합 고무입자-결합 단백질(small rubber particle-associated protein, 'SRPP')을 단백질 반응용 완충액에 첨가하고, 20 내지 37℃에서 2 내지 12시간동안 반응시켜 고무를 수득하는 단계를 포함하는 재조합 고무입자-결합 단백질을 이용한 고무의 생합성방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)은 제 1항의 cDNA 서열을 포함하는 발현벡터에 의하여 형질전환된 숙주로부터 발현되는 것을 특징으로 하는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)을 이용한 고무의 생합성 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)은 융합단백질 또는 비융합단백질인 것을 특징으로 하는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)을 이용한 고무의 생합성방법.

청구항 10

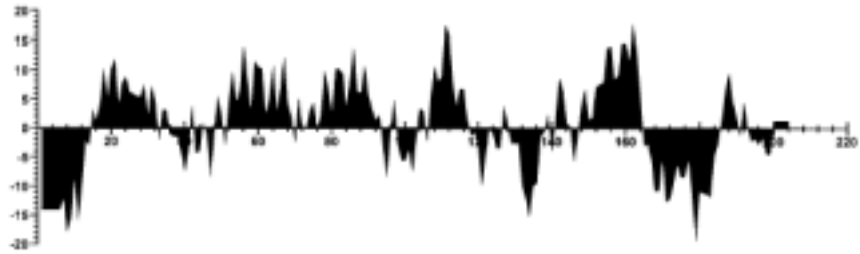
제 8항에 있어서, 숙주는 식물체, 세균, 효모 또는 진균인 것을 특징으로 하는 재조합 고무입자-결합 단백질(SRPP)을 이용한 고무의 생합성방법.

제 7 절 대표도면

도면1

```
2   cagtgTTTTcGaaaggcaaatctTTTTcAaaacttcagcgactgogTTTTgaatttGt
60  gatTTTtaaggaaattTTTcaattatgGctgaagggTgaggaagagaggctaaagtat
      M A E E V E E E R L K Y
119 ttggatttTgtGcagggctggagtttatGctgtagattctTTctcaactctctacct
      L D F V R A A G V Y A V D S F S T L Y L
179 tatgccaaggacatatctggTccattaaaacctggTgtGatactattgagaatgtggTg
      Y A K D I S G P L K P G V D T I E N V V
239 aagacogtggttactcctgtttattatattcccttgaggctgtcaagtttGtagaCaaa
      K T V V T P V Y Y I P L E A V K F V D K
299 acggTggatgtatcggtcactagcctagatggcgttGttccccagttatcaagcaggTg
      T V D V S V T S L D G V V P P V I K Q V
359 tctgocaaacttactcggtagctcaagatgctcaagaaTtGttcttGatgtggcttct
      S A Q T Y S V A Q D A P R I V L D V A S
419 tcagtttcaacactggTgtGcaggaaggcGcaaaagctctGtaagctaatcttgaacca
      S V F N T G V Q E G A K A L Y A N L E P
479 aaagctgagcaatgtcggtcattacctggcgtGccctcaataagctgcactagtctct
      K A E Q Y A V I T W R A L N K L P L V P
539 caagTggcaaatgtagtTgtGccaacogctgtttatttctctGaaaagtcaacgtgtt
      Q V A N V V V P T A V Y F S E K Y N D V
599 gttcgtggcactactgagcaggatataGagtgtcctcttatttgcctttgttGccact
      V R G T T E Q G Y R V S S Y L P L L P T
659 gagaaaattactaaggTgtttggagatgaggcatcataatctgcactggatttGgttatt
      E K I T K V F G D E A S *
719 tatctattgtgagctTTTTtatatgtacttattcagtgTttagaaTaagtctttggTggT
779 gtgttttgatgtggaataaaggccaattgcattgtTggTcaatataaattatgtata
839 acatttctgatttgagTtggaaTctaaaggTTTTattaagaatggatggactaaaaaaa
899 aaaaaaaaaa
```

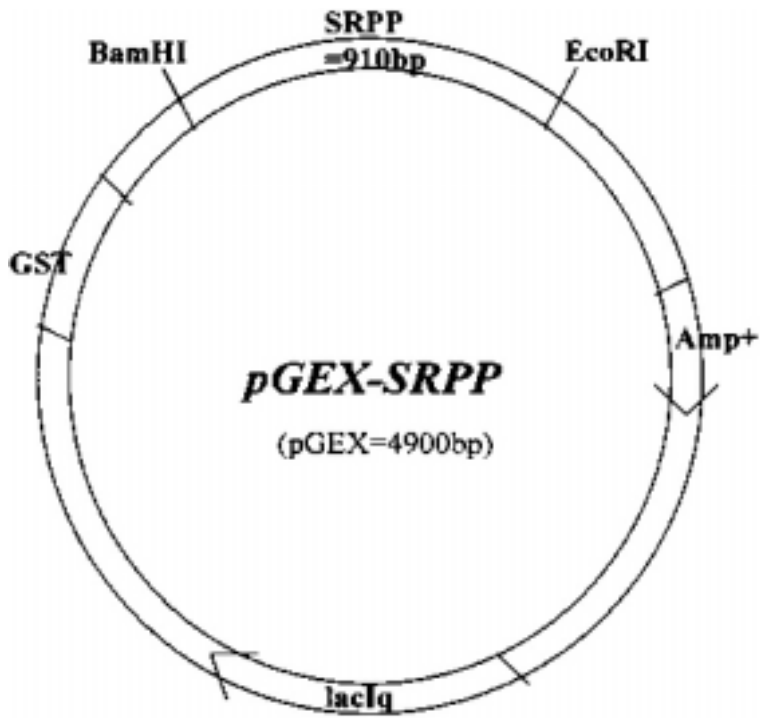
도면2



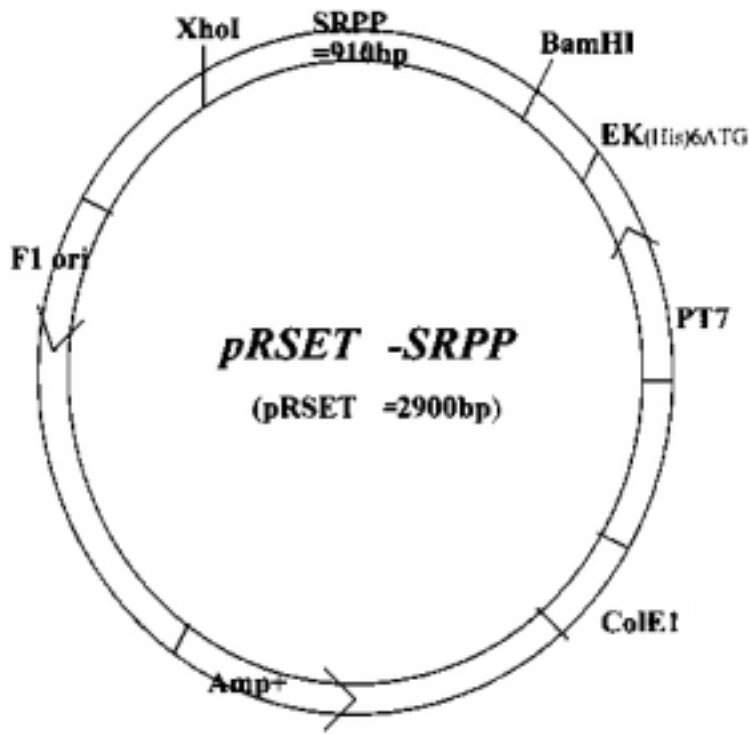
도면3

SRPP	1	MAE	VE	E	-	-	-	-	-	-	ER	LKYL	D	F	RA	A	G	V	Y	AV	D	S	F	S	T	L	Y	L	Y	A	K	D	I	S	G	F	40										
REF	1	MAE	DE	D	N	Q	Q	Q	Q	Q	L	G	L	K	Y	L	G	E	A	D	A	T	Y	A	Y	T	T	E	S	N	V	L	F	A	K	D	K	S	G	F	45						
PVSRP	1																																							16							
SRPP	41	L	K	P	G	V	D	T	I	E	N	V	K	T	Y	V	T	P	V	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81							
REF	46	L	Q	P	G	V	D	T	I	E	L	Q	P	V	K	N	V	A	P	L	N	R	P	S	Y	I	P	N	G	A	L	K	F	V	D	S	T	V	A	S	V	T	I	I	90		
PVSRP	17	L	K	P	G	V	N	T	V	D	A	V	K	T	V	V	A	P	V	D	R	F	H	L	V	R	V	L	L	K	Y	A	D	R	-	-	-	-	-	-	-	-	57				
SRPP	82	D	G	V	P	F	V	I	N	Q	S	A	Q	T	Y	S	M	A	Q	D	A	F	-	R	I	S	L	D	V	A	S	S	F	N	T	G	V	Q	E	G	A	K	A	125			
REF	91	D	R	S	L	P	P	I	V	K	D	A	S	I	Q	V	V	S	A	T	R	A	A	P	-	E	A	A	R	S	L	A	S	S	L	P	G	-	-	-	-	-	-	-	-	125	
PVSRP	58	D	R	H	V	P	S	N	X	K	R	V	S	S	Q	A	R	S	M	V	S	E	V	R	R	D	G	S	T	F	A	K	T	A	Y	S	-	-	-	-	-	-	-	-	93		
SRPP	126	L	Y	A	N	L	E	P	K	A	E	Q	Y	A	I	T	W	R	A	L	N	K	L	F	L	V	P	Q	V	A	N	V	V	E	T	A	V	Y	F	S	E	K	Y	N	170		
REF	126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	125		
PVSRP	94	-	-	-	-	K	Y	E	P	T	A	E	Q	C	A	V	S	A	M	R	K	L	N	Q	L	F	L	P	P	Q	V	A	N	A	M	L	E	K	A	Y	C	T	E	K	Y	N	135
SRPP	171	D	N	V	R	G	T	T	E	O	G	V	R	V	S	S	V	L	P	L	P	T	E	K	I	T	K	V	F	G	D	F	A	S	204												
REF	126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	138	
PVSRP	136	E	N	I	V	S	S	A	E	K	G	V	R	V	S	A	V	L	P	L	V	P	T	E	K	I	A	K	V	F	S	G	N	167													

도면 4a

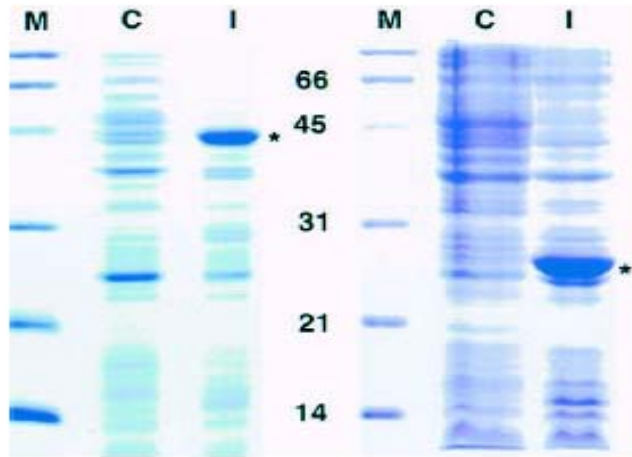


도면4b

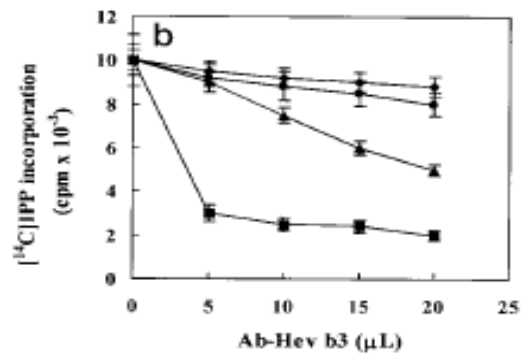
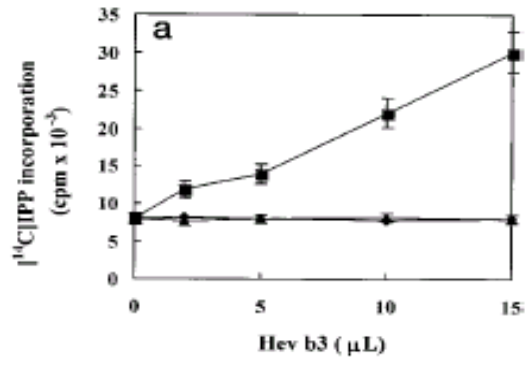


도면5a

도면5b



도면6a 및 도면6b



제 4 장 고무나무에서 분리한 이소펜테닐 이인산 이성화효소 및 이를 이용한 고무의 제조 방법

대한민국특허: 출원번호 10-1999-0016724, 공개번호 특2000-0067734

미국특허: US6,316,695 (2001년 11월 13일 등록)

발명자: 한경환, 강훈승, 오수경, 신동호, 양재모

출원인: 금호석유화학(주)

제 1 절 요약

브라질 고무나무(*Hevea brasiliensis*)의 유액의 cDNA 라이브러리에서 이소펜테닐 이인산(IPP) 이성화효소로(EC 5.3.3.2) 암호화되는 cDNA 클론을 클로닝하였다. 그 클론은 예상되는 분자량이 26.7 kDa인 234개 아미노산의 펩타이드로 암호화되는 연속적인 오픈 리딩 프레임을 가진다. 추론된 단백질은 4.7의 등전점을 가지는 산성이고 다른 IPP 이성화효소와 높은 서열 동일성을 나타낸다. 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현된 재조합 단백질은 IPP 이성화효소 활성을 나타낸다. 개시제인 알릴 이인산을 제거한 세척된 고무 입자(WRP)를 사용하여 반응 혼합물에 IPP 이성화효소를 첨가하고 시험관내 고무의 생합성 분석을 실행하였다. 재조합 IPP 이성화효소가 고무 생합성에 있어서 염기성 5-탄소 이소프렌 단위의 중요 활성화 단계인 IPP에서 DMAPP로의 전환을 촉진하는 촉매 작용을 한다는 결과가 나타났다. 서던 분석(Southern analysis)으로 IPP 이성화효소가 브라질 고무나무의 두 유전자에 의해 암호화된다는 것을 확인했다. 노던 블랏 분석(Northern blot analysis)에서 유액으로부터 단 하나의 하이브리다이징 밴드가 검출된 반면에 잎 조직으로부터 다른 크기의 두 전사물(1.2 kb와 0.6 kb)이 검출되었다. 네일(nail)로 상처낸 나무의 분출된 유액과 잎 조직에서 추출된 RNA를 분석한 결과 상처가 IPP 이성화효소의 전사 수준을 변화시키지 않는다는 것이 나타났다.

제 2 절 명세서-도면의 간단한 설명

도 1은 IPIHb의 내부단편(internal fragment)으로 시험한 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*) 잎 계층의 DNA의 서던블랏을 나타낸 것으로써, 여기서 레인 B, E, 및 X는 각각 BamHI, EcoRI, 및 XhoI로 전체 DNA를 분해한 것에 상응한다.

도 2는 IPIHb 전사물의 노던 블랏 분석을 나타낸 것으로써, 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)의 잎과 유액에서 분리한 전체 RNA를 32P로 표기된 IPIHb cDNA의 내부 단편과 하이브리다이제이션하였다. 도 2에 있어서, 하부 그림은 전체 RNA와 같은 양을 로딩(loading)하는 블랏팅(blotting)전의 자외선 하에서 에티뉼 브롬화물로 염색된 rRNA를 나타낸다. 레인 C와 T는 각각 처리하지 않은 대조군과 상처난 시료에 상응한다. 상처의 영향을 위하여, 다섯 개의 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)는 베어낸 사면을 따라 그 위에 여섯 개의 네일(nail)로 상처를 낸 반면에, 다른 다섯 대조군 나무에는 상처를 내지 않았다. 상처를 낸 후 약 16 시간이 되었을 때 각각의 나무에서 유액과 잎 시료를 채취하였다.

도 3은 IPP 이성화효소 활성의 분석 결과를 도시한 것으로써, 5 μ L의 효소액과 20 μ M의 [14C]IPP를 포함하는 50 μ L의 반응혼합물에서 IPP 이성화효소 분석을 실행하고 산에 불안정한 생성물의 방사능을 액체 섬광 계수기(liquid scintillation counter)로 측정하였다. 각각의 값은 3회 실험의 평균치이고; 효소 미첨가(No enzyme)는 세포 배양액 추출물이 없는 것; C-크루드(C-crude)는 IPTG 유도 없이 GST-IPIHb 융합단백질을 발현하는 세균성 세포의 추출물; 크루드(Crude)는 IPTG에 의해 유도된 세포 배양액의 추출물; C-정제(C-purified)는 IPTG 유도를 하지 않는 세포의 정제된 GST-IPIHb 융합단백질; 정제(Purified)는 IPTG에 의해 유도된 세포의 정제된 GST-IPIHb 융합단백질이다.

도 4는 (a) 시간 경과 및 (b) 농도에 따른 IPP 이성화효소의 효소활성을 나타낸 것으로써, 5 μ L의 정제된 GST-IPIHb 융합단백질을 포함하는 50 μ L의 반응 혼합물로 시간 경과 실험에 대한 IPP 이성화효소의 분석을 수행하고 효소량을 달리하여 10분 동안 반응을 진행시켰다.

도 5는 시험관내 고무 생합성에 대한 IPP 이성화효소의 영향을 나타낸 것으로써, 신장하는 고무 사슬로의 [14C]IPP의 결합을 고무 생합성에 효율

적인 개시 분자인 FPP 없이 10mg의 WRP와 5 μ L의 지시된 효소액을 포함하는 50 μ L의 반응혼합물에서 측정하였다. 각각의 값은 3회 실험의 평균치; WRP는 WRP 만으로 고무 분석한 것; WRP+FPP는 WRP와 FPP로 분석한 것; -WRP는 WRP없이 정제된 GST-IPIHb 융합단백질로 분석한 것; C-정제(C-purified)는 IPTG 유도를 하지 않는 세포의 정제된 GST-IPIHb 융합 단백질과 WRP로 분석한 것; 정제(Purified)는 IPTG 유도성 세포의 정제된 GST-IPIHb 융합단백질과 WRP로 분석한 것이다.

제 3 절 발명의 상세한 설명

3-1 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 브라질 고무나무(Hevea Brasiliensis)에서 분리한 이소펜테닐 이인산 이성화효소와 이를 이용하여 고무를 제조하는 방법에 관한 것이다.

이소프레노이드 생합성 경로는 모든 살아있는 생물에 편재하고 세포의 구조, 전자전달, 광합성, 세포간의 신호전달, 유기체간의 상호작용에 있어 극히 중대한 역할을 하는 23,000개 이상의 화합물을 생산한다(Ramos-Valdivia et al., 1997). 수개의 중요한 화합물류는 스테롤, 카로티노이드, 돌리콜, 유비퀴논, 프레닐화된(prenylated) 단백질을 포함하는 이러한 복잡한 경로에서 과생된다(Hahn and Poulter, 1995). 이러한 화합물들은 모두 같은 빌딩 블록인 이소펜테닐 이인산(IPP)에서 과생된다. 대부분의 진핵생물에서 IPP는 메발론산 경로를 거쳐 아세틸-CoA의 세 분자들로부터 합성된다(Chappell, 1995). 최근에 메발론산과 독립된 개별적인 경로가 세균과 식물에서 발견되었다(Lichtenthaler et al., 1997; Romer et al., 1993). 이러한 경로에는 글리세르알데하이드 인산, 피루베이트(pyruvate) 및 디하이드록시아세톤 인산과 같은 3-탄소 전구체가 이용된다. IPP 이성화효소(IPI)는 IPP가 고도의 친전자성 이성체인 디메틸알릴 이인산(DMAPP)으로 상호전환하는데 촉매 작용을 한다. 이러한 두 이성체는 이소프레노이드 화합물들의 합성에서 기질로 제공된다.

이소프레노이드 생합성의 생물공학은 에센셜 오일, 약제, 고무 및 왁스와 같은 식물 화합물들의 공업적 가치 때문에 큰 관심거리가 된다. IPP와

DMAPP의 상호전환이 같은 IPP 이성화효소에 의해 촉매 될지라도 그 평형에서는 DMAPP를 생산한다(Sun et al., 1998). 이러한 이성화 반응은 이소프레노이드 생합성에 대해 속도를 제한하는 단계일 것이다. 외인성 IPI 유전자의 발현은 대장균에서 이소프레노이드 생합성을 증진시킨다(Kajiwara et al., 1997). 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)의 HMGC_oA 환원효소로 형질전환시킨 유전자전환 담배 식물은 스테롤을 대조군 식물이 생산하는 양의 6배까지 과잉생산한다(Schaller et al., 1995).

천연고무(시스-1,4-폴리이소프렌)는 많은 공업적 용도에 있어 중요한 생원료이다. 비록 약 2,000종의 식물에서 고무가 생산되지만(Backhaus, 1985), 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)는 나무에 고무가 풍부하고 우량품질이며 수확이 쉽기 때문에 주로 천연고무의 공업적 원천이 되어왔다. 수요의 증가에 따라 고무 재배원의 면적이 감소한 것이 고무 생합성의 연구와 다른 고무 원천의 개발에 대한 연구를 야기시켰다. 고무 생합성의 첫 번째 단계는 IPP 이성화효소에 의해 IPP가 DMAPP로 이성화하는 반응이다. 고무 전이효소(또는 폴리메라아제)라 불리는 효소에 의해 촉매되는 5-탄소 중간물질의 연속적인 헤드-투-테일(head-to-tail) 축합반응이 고무를 산출한다고 여겨져 왔다. IPP 이성화효소 활성은 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)의 고무 유액의 C-세럼에서 발견되었다(Koyama et al., 1996; Tangpakdee et al., 1997). IPP 이성화효소의 활성부위에 직접적인(site-directed) 특이 저해제인 3,4-옥시도-3-메틸-1-부틸 이인산(OMBPP)이 존재하면 시험관내 고무 분석에서 IPP가 고무로 결합하는 것을 저해한다(Cornish, 1993).

IPP 이성화효소는 카로티노이드, 성장 조절기 및 천연고무를 포함하는 모든 이소프레노이드의 생합성에서 필수적인 단계인 IPP가 DMAPP로 전환하는 반응을 촉매한다. 이 효소는 광범위하게 다양한 생물들로부터 연구되어 왔다(Ramos-Valdivia et al., 1997). 고등 식물에서 IPP 이성화효소는 캡시쿰 크로모플라스트(*Capsicum* chromoplasts: Dogbo and Camara, 1987), 신코나 로부스타(*Cinchona robusta*)의 세포 현탁액(Ramos-Valdivia et al., 1997) 및 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*: Koyama et al., 1996)로부터 정제되고 특징 지워져 왔다. 지금까지 고등식물의 IPP 이성화효소의 서열이 문헌에 나타난 것은 거의 없었다. 고등 식물의 IPP 이성화효소에 대한 완전한 유전자는 아라비도시스(*Arabidopsis*: Campbell et al., 1997)와 클라키아 종(*Clarkia* spp.: Blanc et al., 1996; Blanc and Pichersky, 1995)의 두 개화식물들에 대해서만 유일하게 알려져 있다. 부분적인 서열은 담배에 대해서도 알려져 있다.

(Accession No. Y09634). 그러나 어떤 유전자도 고무 생합성에 관련되는지 여부를 조사하지 않았다.

IPP에서 DMAPP로의 이성화반응이 고무 생합성의 첫 번째 단계이므로 IPP 이성화효소는 고무 생합성에서 중요한 역할을 할 가능성이 있다. IPP 이성화효소 활성이 헤비아(Hevea) 유액의 밀동과 C-세럼 입자에서 관찰되었지만(Tangpakdee et al., 1997), IPP 이성화효소로 암호화되는 cDNA와 그 단백질은 헤비아 고무나무에서 분리되거나 연구되지 않았다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명에서는 PCR에서 얻은 탐침(probe)을 이용하여 유액의 cDNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 유전자를 클로닝하였다. 고무 생합성에서 IPP 이성화효소가 중대한 역할을 한다고 여겨짐에도 불구하고, 그 유전자는 30-50%(wt/wt)의 시스-1,4-폴리이소프렌(고무)을 포함하는 유액에서 풍부한 전사물로 발현되지 않는 것 같다. 개별적인 연구에서 우리는 브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)의 유액에서 유전자 발현 프로파일(profile)을 연구하기 위하여 245의 발현된 서열 태그(ESTs)를 얻었다(Han et al., 1999). IPP 이성화효소를 암호화하는 유전자가 ESTs중에서 확인되지 않았다. 게다가 유액의 cDNA 라이브러리의 1×10^6 또는 더 작은 플러크(plaque)를 스크리닝한 최초의 시도는 하이브리다이징 cDNA 클론을 생산하는데 실패하였다. 2×10^6 이상의 플러크를 스크리닝한 후에 두 하이브리다이징 클론을 얻었다. DMAPP가 이소프레노이드 생합성에서 전구물질이고 반드시 이소프레노이드가 합성되는 세포에 존재하기 때문에, 유액에서 IPIHb의 낮은 전사 수준은 예상 밖의 결과였다.

3-2 발명의 구성 및 작용

유전자 분리

브라질 고무나무(*H. brasiliensis*)의 유액 cDNA 라이브러리를 이용한 IPP 이성화효소 유전자를 증폭하기 위하여 아라비돕시스 탈리아나(*A. thaliana*: Campbell et al., 1997)의 cDNA에 기초하여 PCR 프라이머(다운스트림)를 구성하고 M13 역 프라이머(업스트림)와 함께 사용하였다. PCR로 IPP 이성화효소의 암호화 영역의 부분적인 서열을 증폭하였다. PCR에 의해 유전

자를 클론하기 위하여 서열정보로부터 두 PCR 프라이머(IPP-L1 및 IPP-L2)를 디자인하였고 벡터(M13 정 및 역)프라이머와 조합하여 사용하였다. IPP-L2(다운스트림)와 M13 역(업스트림)프라이머를 이용한 PCR 반응에서 약 700-bp의 단편을 산출하였다. 그러나 IPP-L1(업스트림)과 M13 정(다운스트림) 프라이머로는 증폭된 생산물을 얻지 못했다. 700-bp의 PCR 단편은 아라비도시스 탈리아나(*A. thaliana*)의 cDNA 서열과 높은 서열 동일성을 나타냈고 같은 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는데 탐침으로 사용되었다. 모두 2×10^6 의 플러크를 스크리닝하였다. 그 플러크들을 탐침에 하이브리디제이션시키고 생체내 절제하였다. 그 결과 생성된 완전한 cDNA를 포함하는 파지미드와 그 유전자를 IPIHb로 명명하였다. 그 DNA 서열은 1,288 bp이고, 예상 분자량이 26.7 kDa인 234 아미노산의 펩티드를 암호화하는 연속적인 오픈리딩 프레임(open reading frame, ORF)을 갖는다(서열번호 1과 서열번호 2). 추론된 단백질은 아라비도시스 탈리아나(*A. thaliana*)의 IPP 이성화효소의 등전점(pI = 6.0)보다 낮은 4.7의 등전점을 가지는 산성이다.

IPP 이성화효소의 유전자에 대한 서던 분석

IPP 이성화효소 유전자의 카피수(copy number)를 결정하기 위하여 하이브리디제이션 탐침으로 700-bp의 PCR로 증폭한 IPIHb 단편을 사용하여 서던블랏 하이브리디제이션 분석을 수행하였다. 계놈의 DNA를 BamHI, EcoRI, 및 XhoI으로 분해하였다. 이러한 효소들은 IPIHb의 암호화 영역 내에 제한부위를 가지지 않는다. 최하 55°C와 최고65°C의 엄격한 조건하에서 각각의 제한 분해물로부터 두 하이브리다이징 밴드가 관찰되었다(도 1). 이러한 결과는 IPP 이성화효소가 헤비아 고무나무에서 다중성 유전자에 의해 암호화된다는 것을 암시한다. 이것은 문헌에서의 관찰결과를 확인하는 것이다. 캠벨 등은 IPP 이성화효소를 암호화하는 두 cDNA 클론을 보고하였고 그 두 유전자가 작은 유전자족으로부터 파생되는 것이라고 추정하였다(Campbell et al., 1997). IPP 이성화효소의 다중성 동질체(isoform)는 클라르키아 브리웨리(*C. breweri*: Blanc et al., 1996)와 신코나 로부스타(*C. robusta*: Ramos-Valdivia et al., 1997)에서 설명되고 있다. 따라서 각각의 동질체의 특이적 역할이 알려지지 않았지만 IPI 동질체의 존재는 고등식물들의 일반적인 특징이다. IPIHb의 ORF 업스트림(upstream) 바로 가까이에 연속적인 71-아미노산이 존재하는 것은 부세포의 세포소기관으로 적중되는 동질체(들)가 있다는 것을 나타낸다.

IPIHb에 대한 mRNA의 발현

유액과 잎조직에서 IPP 이성화효소 유전자의 발현을 조사하였다. 유액의 블랏(blot)에서 단 하나의 하이브리다이징 밴드(10 kb)가 검출된 반면, 잎조직의 전체 RNA를 포함하는 블랏에서 다른 크기의 두 전사물이 탐침에 하이브리다이징되었다(도 2). 상처처리와 IPP 이성화효소의 유도능력을 시험하기 위하여 상처낸 브라질 고무나무들로부터 잎과 유액 시료를 얻었다(Oh et al., 1999). 상처난 나무들의 분출된 유액과 잎조직에서 추출된 RNA의 분석결과 상처가 IPP 이성화효소의 발현 수준을 변화시키지 않는 것으로 나타났다(도 2).

대장균에서 발현된 IPP 이성화효소의 기능분석

헤비아 IPP 이성화효소로 암호화되는 클로닝된 cDNA를 더 특징 지우기 위하여 GST-IPIHb 융합 유전자를 구성하여 pGEX-IPIHb를 생산하였다. pGEX의 발현 시스템은 조 세균 분해물(crude bacterial lysates)로부터 융합단백질을 간단히 정제할 수 있는 방법이다. GST-IPIHb 융합단백질의 발현과 정제는 SDS-PAGE에 의하여 모니터하였다(자료는 나타내지 않았음). IPP 이성화효소의 효소적 활성은 세포 추출물이나 정제된 GST-IPIHb 융합단백질을 이용하여 분석하였다. 대조군 실험에는 IPTG에 의해 발현유도를 하지 않는 동일한 세균의 추출물이나 GST 단백질만을 암호화하는 cDNA를 운반하는 pGEX가 주입된 대장균의 배양액을 사용하였다.

IPP에서 DMAPP로의 전환은 반응혼합물에서 산에 불안정한 알릴 이인산으로부터 발생하는 방사능의 증가로 확인하였다. 도 3에 나타난 것과 같이 효소가 없는 반응혼합물에 대해 기본수준(basal level)의 방사능이 관찰되었다. IPTG 유도를 하지 않는 세포의 효소를 포함하는 반응 혼합물에 대해 비슷한 기본 수준의 방사능이 검출되었다. 반대로 IPTG에 의해 유도된 세포의 정제된 GST-IPIHb 융합단백질이나 조추출물을 포함하는 반응혼합물에서는 방사능의 현저한 증가가 관찰되었다. 정제된 GST-IPIHb 융합단백질을 이용한 시간 경과 실험에서 산에 불안정한 ¹⁴C 알릴 이인산의 방사능이 반응 시간에 따라 증가하는 것이 분명하게 나타났다(도 4a). 또한, 정제된 GST-IPIHb 융합단백질의 반응혼합물에 첨가된 양에 따라 방사능이 증가하는 것을 관찰하였다(도 4b). 산에 불안정한 ¹⁴C 알릴 이인산에서 발생하는 방사

능의 시간과 농도에 따른 증가는 GST-IPIHb 융합단백질에 의한 시험관내 IPP에서 DMAPP로의 전환이 일어났음을 나타낸다. 이러한 결과는 본 발명의 cDNA 클론이 GST-IPIHb 융합단백질의 부분으로써 기능적인 IPP 이성화효소를 암호화한다는 것을 나타낸다.

시험관내 고무 생합성에 필요한 IPP 이성화효소

새로운 고무 사슬의 형성은 GGPP, FPP, GPP 및 DMAPP와 같은 개시 분자에 IPP가 축합되어 일어난다. 그러므로 시험관내 고무 생합성의 활성 분석에 대한 일반적인 절차에서 반응혼합물에 개시제인 알릴 이인산중 하나가 포함된다. 고무 생합성에 대한 IPP 이성화효소의 역할을 시험하고 분리된 cDNA가 기능성 IPP 이성화효소를 암호화하는지에 대해 더 확인하기 위하여 개시제인 알릴 이인산을 제거하고 WRP에 IPP 이성화효소를 첨가한 반응 혼합물을 이용하여 시험관내 고무를 생합성 분석을 실행하였다. WRP를 포함하는 반응혼합물에서 고무 생합성에 효과적인 개시 분자인 FPP가 필요하다는 것이 분명하게 나타났다(도 5). GST-IPIHb 융합 단백질에 대한 같은 cDNA 클론을 가진 비유도성 대장균 세포의 세균추출액을 포함하는 반응 혼합물은 [14C]IPP 결합의 기본수준을 나타냈다. 반대로, 정제된 GST-IPIHb 융합단백질과 WRP를 포함하는 반응혼합물에서는 고무로 [14C]IPP 결합의 현저한 증가가 관찰되었다(도 5). WRP가 없는 반응혼합물에서는 고무로의 [14C]IPP 결합이 관찰되지 않았고 WRP와 GST-IPIHb 융합단백질을 포함하는 반응혼합물에서 방사능이 증가한 것은 새로운 고무사슬의 합성으로 인한 것이다. 이러한 결과는 본 발명의 cDNA 클론으로부터 암호화된 GST-IPIHb 융합단백질이 고무생합성에서 5-탄소 이소프렌 기본단위의 중요한 활성 단계인 IPP에서 DMAPP로의 전환에 있어서 촉매로 작용을 한다는 것을 나타낸다.

본 발명에서는 IPP 이성화효소를 암호화하는 능력이 있는 DNA 서열 (IPIHb DNA 서열)을 분리하였고, IPIHb DNA 서열을 포함하는 하이브리드 벡터와 형질전환된 숙주를 제공한다.

본 발명의 범위에 있어서, "IPIHb"는 헤비아 브라질리엔시스(*Hevea brasiliensis*)에서 분리된 IPP 이성화효소를 언급하는 것이다. 여기에서 사용되는 "하이브리드 벡터(Hybrid vector)"는 IPIHb를 생산할 능력이 있는 헤비아나 다른 생물의 DNA 또는 cDNA를 가진 플라스미드, 박테리오파지, 식물 바이러스 또는 다른 벡터들로부터 DNA 결합(ligation)에 의해 형성되는 벡터

를 언급하는 것이고, 그러한 식물이나 다른 생물들은 여기서 총괄적으로 "식물 원료" 라고 언급한다.

본 발명의 실시예에서, 예를 들면 헤비아의 식물 원료들은 cDNA를 생산하는데 사용된다. cDNA 라이브러리는 식물 원료의 전체 RNA에서 분리된 mRNA 서열에 근거하여 구성된다. cDNA의 첫 번째 가닥은 분리된 mRNA를 주형으로 사용하고, 올리고 dT 서열을 프라이머(primer)로 사용하고, 역전사효소를 사용하여 효소에 의해 합성할 수 있다. 첫 번째 가닥의 cDNA를 구성한 후에 cDNA의 두 번째 가닥은 첫 번째 가닥의 cDNA를 주형으로 사용하고, 효소로 DNA 폴리메라아제를 사용하여 효소에 의해 합성할 수 있다. 그 결과 생성된 이중가닥의 cDNA 분자를 적절한 벡터에 삽입하여 cDNA 라이브러리를 생산한다.

그 결과 생성된 cDNA 라이브러리를 IPIHb 유전자에 특이적인 핵산 탐침(IPIHb 유전자 특이 탐침)을 사용하여 IPIHb 유전자의 완전한 서열에 대하여 스크리닝할 수 있다. IPIHb 유전자를 포함하는 세포를 증식시키고 IPIHb를 암호화하는 다량의 DNA 서열을 추출할 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에서, IPIHb 유전자의 동정을 위한 핵산 탐침을 IPP 이성화효소의 특이적 프라이머를 사용하여 cDNA 라이브러리의 PCR 증폭에 의해서 생산한다.

IPIHb 유전자에 대해 특정한 라벨된 핵산 탐침과 하이브리디제이션한 식물 cDNA 또는 다른 생물의 cDNA를 확인하고 분리할 수 있다. 분리된 DNA를 벡터 DNA에 결합하여 하이브리드 벡터를 생산할 수 있다. 하이브리드 벡터는 적절한 숙주를 형질전환하고 숙주에서 IPP 이성화효소의 생산을 유도하는 데 사용된다.

본 발명의 범위에서 사용하기 적합한 벡터는 숙주세포로 전이되거나 숙주세포를 감염할 수 있고 숙주세포내에서 복제 가능한 플라스미드 또는 바이러스이다. 바람직한 실시예에서, 하나의 적합한 벡터는 벡터 DNA의 중요한 영역에 완전한 IPIHb DNA 서열을 삽입하여 운반할 수 있는 능력을 가진 것이다.

적절하게 형질전환된 숙주는 IPIHb DNA 서열을 발현할 수 있는 능력을 가진 것이다. 바람직한 실시예에서 적절하게 형질전환된 숙주는 IPP를 고무로 전환하는 촉매작용을 할 수 없는 것이다. 그러한 숙주는 식물, 세균 또는 진균류일 수 있다. 식물 숙주는 담배(tabacco) 종, 풀(grass) 종 또는 사

철(perennial)식물 종과 같은 1년생 식물일 수 있다. 세균은 예를 들어 대장균, 바실러스 종(Bacillus species) 또는 아그로박테리움 종(Agrobacterium species)과 같은 세균일 수 있다. 진균류는 락타리우스 종(lactarius species)과 아스퍼질러스 종(Aspergillus species)의 그룹에서 선택된다.

본 발명의 다른 실시예에서는 프로모터(promoter)의 조절하에 유전자를 배열하도록 IPIHb 유전자를 포함하는 DNA 단편을 적절한 프로모터에 결합시킬 수 있다. 적절한 프로모터는 형질전환된 숙주에서 기능할 수 있는 것이다. 예를 들어 형질전환된 숙주가 식물이라면 노팔린 합성효소(nopaline synthetase)에 대한 프로모터인 Pnos와 같은 식물 프로모터에 IPIHb 유전자를 결합시키고, 형질전환된 숙주가 세균이라면 IPIHb 유전자를 대장균의 trp 또는 tac 프로모터와 같은 세균성 프로모터에 결합시킨다. 선택적으로 IPIHb 유전자는 콜리플라워 모자이크 바이러스의 16S와 35S 프로모터와 같은 바이러스성 프로모터에 결합시킬 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 게놈의 DNA 라이브러리 대신에 cDNA 라이브러리를 전체 RNA에서 분리된 mRNA를 사용하여 구성한다. 전체 RNA는 식물 원료로부터 쿠시 등에 의한 방법과 실질적으로 동일한 방법으로 얻는다(Kush et al. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 1787-1790 (1990)). mRNA를 분리하기 위해 식물 원료는 고무를 합성하는 능력이 있는 식물이나 생물로부터 얻을 수 있다. 예를 들어 헤비아 나무가 유액에서 고무를 생산한다면 IPIHb를 암호화하는 mRNA를 헤비아의 유액에서 얻을 수 있다.

여기서 mRNA의 분리에는 mRNA의 3' 말단에 존재하는 폴리(A)그룹이 이용된다. 3' 말단은 다른 RNA 종으로부터 mRNA를 분리하는데 사용된다. 셀룰로오스 칼럼상의 T 잔기와 mRNA의 폴리(A)그룹의 결합에 의하여 올리고(dT) 셀룰로오스 칼럼의 크로마토그래피로 분리한다. 결합되지 않은 RNA는 칼럼에서 유리되어 세척되고 mRNA는 A-T 결합(duplex)을 불안정하게 하는 완충용액으로 용출할 수 있다. 그 다음 RNA의 농도는 분광광도계로 측정한다. 분리된 mRNA는 첫 번째 가닥의 cDNA분자를 합성하는데 주형으로 사용된다. 차례로 cDNA의 첫 번째 가닥은 DNA의 두 번째 가닥을 합성하는데 주형으로 사용된다(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, Cold Spring Harbor, N.Y. 1987).

예를 들어 λ 벡터와 같이 벡터내 DNA의 중요하지 않는 영역에 완전한 유전자를 가질 수 있고 숙주 세포에서 복제하는 능력이 있는 적합한 벡터

는 DNA 단편과 결합하여 재조합 DNA 분자의 라이브러리를 산출할 수 있다. 이러한 재조합 분자를 시험관내 패키징(packaging)하여 재조합 클론으로 이루어진 감염성 파지 스톡(phage stock)을 얻을 수 있다. cDNA 라이브러리가 cDNA를 발현한다면 이러한 방법으로 구성된 재조합 DNA 라이브러리를 핵산탐침이나 항체를 이용한 고무생합성에서 중요한 다른 유전자들과 IPIHb 유전자의 분리에 사용할 수 있다.

IPIHb 유전자의 검출을 위한 핵산 탐침은 예를 들어 종래 기술에 의한 바이오틴의 일부분이나 3' 또는 5' 말단에 [³²P]-인산으로 탐침을 라벨링함으로써 매우 적은 양의 유전자를 검출하기 위해 수식할 수 있다 (Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, Cold Spring Harbor, N.Y. 1987). 방사능 표기는 통상적으로 뉴 잉글랜드 뉴클리어 또는 아메르삼 사의 유용한 3' 또는 5' 말단 라벨링 키트(labeling kit)를 사용하여 수행한다. DNA 라이브러리에서 IPIHb 유전자는 라벨된 탐침과 하이브리디제이션하여 동정할 수 있다.

본 발명의 다른 실시예에서 헤비아 cDNA 라이브러리를 포함하는 재조합 λ파지는 [³²P]로 라벨된 IPIHb의 특정 올리고뉴클레오티드를 사용하여 샘브룩 등(Sambrook et al., loc. cit.)의 방법에 따라 스크리닝한다.

IPIHb 유전자를 가지며 IPIHb 유전자의 특이 탐침과 양성 반응하는 클론을 분리하고 cDNA 라이브러리 키트에 의한 프로토콜(protocol)에 따라 생체내 절제에 의해 플라스미드 내로 전환시킨다. 파지 DNA를 플라스미드로 전환시키는 이러한 방법은 헤비아 cDNA 라이브러리가 그러한 생체내 절제를 위해 디자인된 스트라타진사(Stratagene)의 유니-젯 II 벡터(Uni-ZAP II vector)내로 구성될 때 실행할 수 있다. 그 플라스미드는 이러한 유전자를 다량으로 생산하기 위하여 대장균으로 전이되고 보전된다. IPIHb 유전자를 가진 플라스미드를 포함하고 있는 대장균 세포들을 증식하여 다량의 IPIHb DNA 서열을 생산한다. 이러한 DNA를 종래의 기술로 형질전환된 숙주에서 추출할 수 있다.

본 발명은 헤비아 고무 미립자 단백질(IPIHb)을 암호화하는 DNA 서열과 재조합 DNA 분자 및 재조합 단백질의 생산방법, 서열을 포함하는 벡터, 생산된 재조합 단백질의 배양 및 재조합 단백질의 생산에 중요한 물질들에 관한 것이다. 고무 생합성에 대해 사실상 IPIHb와 같은 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 IPIHb를 암호화하는 DNA 서열을 제공한다.

IPIHb를 암호화하는 cDNA를 포함하는 분리된 재조합 벡터를 다른 진핵 또는 원핵 생물의 숙주로 전이할 수 있고, 그 숙주안에서 IPIHb DNA가 발현되어 고무 생합성을 위한 기능성 IPIHb를 생산할 것이다.

제 4 절 실시예

다음의 실시예는 본 발명의 특징을 더 자세히 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 한정짓는 것은 아니다.

4-1 (실시예1)

식물 원료

말레이시아의 쉘랑고르에 위치한 말레이시아 고무 연구소에서 성장한 성숙된 고무 식물들(H. brasiliensis clone RRIM600)에서 유액과 잎 시료를 얻었다. 고무나무에 칼자국을 내어 스며 나오는 유액을 실온이나 얼음에서 같은 부피의 2 X RNA 추출 완충용액(0.1M 트리스·염산, 0.3M 염화리튬, 0.01M EDTA, 10% SDS, pH 9.5)에 계속적으로 혼합하면서 받았다(Han et al., 1999). 수집한 시료를 액상 질소에서 냉동시키고 드라이 아이스에 넣어 실험실로 수송하였다.

전체 RNA와 폴리(A)+ RNA의 분리

키아젠사(Qiagen Inc)의 키아젠 르네시 플랜트 미니키트(Qiagen Rneasy Plant Minikit)를 사용하여 유액에서 RNA를 추출하였다(Oh et al., 1999). 키아젠사의 올리고텍스-dTTM mRNA 키트(Oligotex-dTTM mRNA kit)를 사용하여 폴리(A)+RNA를 분리하였다.

브라질 고무나무 IPP 이성화효소(IPIHb)의 PCR 증폭

유액의 cDNA 라이브러리를 주형으로 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 아라비돕시스 IPP 이성화효소의 +606bp~+629bp의 서열에 상응하는 PCR 프라이머(IPP-A2)를 디자인하였다. IPIHb cDNA의 단편을 증폭하는데 사용한 프라이머는 IPP-A2(5'-GTAATCAAGTTCATGCTCTCCCA-3')와 M13 역 프라이머이다. PCR은 72°C에서 5분간 열로 전처리하고 94°C에서 30

초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회 반복하고 72°C에서 7분간 최후 증폭하여 수행하였다. PCR 생성물을 아가로스 겔에서 잘라내고 키아젠사의 키액스II 아가로스겔 추출 키트(QUAEX II Agarose Gel Extraction Kit)로 정제하였다. 정제된 PCR 생성물을 프로메가사(Promega)의 pGEM??-T 벡터에 삽입하였다. 플라스미드를 변종 XL1-블루 대장균에 형질전환시키고 분리하여 서열을 확인하였다. 헤비아 IPP 이성화효소의 PCR에서 증폭된 서열에 기초하여 다운스트림 프라이머로 IPP-L1 (5' - T A T G A G C T A C T C C T T C A G C A A C G C T C T - 3') 과 IPP-L2(5'-ATCAAGTTCATGCTCTCCCACTTTC-3')의 두 프라이머를 디자인하였다. IPP-L1과 IPP-L2 프라이머를 각각 M13 정(forward) 및 역(reverse) 프라이머와 함께 사용하였다.

유액 cDNA 라이브러리의 구성 및 스크리닝

상기에 설명된 것과 같이 유액에서 얻은 폴리(A)+ RNA를 사용하여 스트라타진사의 유니-랩II 벡터내에 cDNA 라이브러리를 구성하였다. 유액 cDNA 라이브러리로부터 부분적인 IPP 이성화효소 단편을 증폭하기 위해 프라이머(IPP-L2, 다운스트림)와 M13 역 프라이머(업스트림)를 사용하였다. 유액 cDNA 라이브러리의 2×10⁶ 플러크를 스크리닝하기 위해 700-bp PCR 생성물을 사용하였다(Oh et al., 1999). 탐침에 하이브리디제이션된 cDNA 클론을 cDNA 라이브러리 키트에 의한 프로토콜에 따라 생체내 절제하고 서열을 확인하였다. 완전한 cDNA 삽입물을 가지는 클론을 분리하여 IPIHb라고 명명하였다.

cDNA 클론의 염기서열과 컴퓨터 분석

프로메가사의 위자드 플러스 SV 미니프레프스 DNA 정제 시스템 키트(Wizard?? Plus SV Minipreps DNA Purification System kit)를 사용하여 알칼리 용해 방법(Sambrook et al., 1989)으로 염기서열 반응에 대한 플라스미드 DNA를 얻었다. 형광성 염료로 라벨된 M13 정 또는 역 프라이머(키트에 의해 제공된)를 사용하여 파머시아사(Pharmacia Biotech)의 알프 익스프레스 자동판독 염기서열 키트(ALF Express AutoRead Sequencing kit)로 염기서열 반응을 수행하였다. 퍼킨 엘머사(Perkin Elmer Co.)의 알프 자동 염기서열기(ALF automatic sequencer)로 전기영동하여 뉴클레오티드 서열을 얻었

다.

4-2 (실시예 2)

상처 처리

베어낸 사면을 따라 그 위에 여섯 네일(nail)로 상처를 낸 고무 나무에서 유액과 잎 시료를 얻었다(Oh et al., 1999).

서던블랏분석과 노던블랏분석

성숙한 브라질 고무나무(*H. brasiliensis* RRIM600) 잎조직의 게놈의 DNA를 얻었다(Oh et al., 1999). 게놈의 DNA(8-10 μ g)를 바람직한 제한효소로 분해하고 0.8 % (w/v)의 아가로스 겔에서 전기영동하여 크기별로 분별하고 블랏팅하고 UV 방사로 아머삼사(Amersham Life Science)의 하이본드-N(Hybond-N) 나일론 막에 교차결합하였다. 노던블랏에서는 20 μ g의 전체 RNA를 1.2% 아가로스-포름알데하이드 겔상에서 전기영동하고 서던 블랏에서와 같이 교차결합하였다. 두 하이브리제이션을 위한 탐침으로는 PCR에서 얻은 32P로 표기된 700-bp의 IPIHb cDNA의 단편을 사용하였다. 노던분석은 55 $^{\circ}$ C에서 서던분석은 65 $^{\circ}$ C에서 18시간동안 0.9M 염화나트륨, 50mM 인산나트륨(pH 7.6), 5 mM EDTA, 0.4% (w/v) SDS, 5 X 덴하르츠 용액(Denhardt's solution), 200 μ g 연어 정충(salmon sperm) DNA에서 하이브리제이션하였다. 엄격하게 최하 55 $^{\circ}$ C 또는 최고 65 $^{\circ}$ C에서 0.5 X SSPE, 0.1% SDS에서 두 번 그리고 0.1 X SSPE, 0.1% SDS에서 두 번씩 블랏(blot)을 세척하였다. 그 막을 70 $^{\circ}$ C에서 X-ray 필름에 밤새 노출하였다.

4-3 (실시예 3)

대장균에서 IPIHb 단백질의 발현

IPIHb 유전자를 파머시아사의 pGEX(IPTG-유도성 발현벡터)의 EcoRI-XhoI 부위에 클로닝하여 pGEX-IPIHb를 구성하였다. pGEX-IPIHb로 형질전환된 대장균 XL1-블루를 50mg/L의 암피실린이 포함된 루리아 브로스(Luria Broth; LB)에서 강하게 통기하여 30 $^{\circ}$ C에서 중앙정지상(mid-stationary phase)까지 배양하였다. 0.1 mM의 농도가 되게 IPTG를 배양액에 첨가한 후 다시 6시간 동안 배양하였다. 이후의 모든 단계는 4 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 원

심분리(5000 X g, 10 min)하여 얻은 세포를 0.1M의 인산칼륨(pH 7.4)으로 세척한 후 초음파로 분쇄하였다. 0.1M의 인산칼륨(pH 7.4)을 포함하는 1ml의 완충용액에서 30초 동안 초음파 처리하는 것을 30초 간격으로 6회 반복하였다. 균질된 시료를 10분 동안 10,000 X g으로 원심분리하고 그 상등액을 램리의 표준방법(Laemmli, 1970)에 따라 12.5%의 석판겔(slab gels)로 SDS-PAGE하였다. 단백질을 쿠마시 브릴리안트 블루 R-250(Coomassie Brilliant Blue R-250)으로 염색하였다. 파머시아사의 글루타치온 세파로스 4B 친화성 매트릭스(Glutathione Sepharose 4B affinity matrix)를 사용하여 그 융합단백질을 친화성 정제하였다.

IPP 이성화효소 활성의 분석

알릴 이인산의 산성에 대한 불안정성에 기초하여 분석을 실시하였다(Satterwhite, 1985). 반응혼합물은 총부피 50 μ l로 pH7.5, 100mM 트리스-염산, 1.5mM 염화마그네슘, 1.5mM 염화망간, 2mM DTT, 25mM KF, 20 μ M 아머샴사의 [14C]IPP (55 mCi mmol⁻¹) 및 적당량의 효소액을 포함한다. 30°C에서 10분 동안 반응시킨 후 200 μ L의 메탄올:염산(4:1, v/v)과 0.1 μ L의 물을 첨가하여 37°C에서 15분 동안 반응을 진행시켰다. 알릴 생성물을 2 X 200 μ l의 톨루엔으로 추출하였다. 화합된 추출물을 베크만사(Beckman)의 레디 솔브 HP 섬광 콕테일(Ready Solv HP scintillation cocktail) 4ml와 혼합하고 베크만사의 LS 6500 액체 섬광 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다.

시험관내 고무생합성 분석

원심분리/부양(centrifugation/flotation)절차를 반복하여 세척된 고무 입자(WRP)를 준비하였다(Cornish and Backhaus, 1990; Siler and Cornish, 1993). 반응혼합물의 시험관내 고무 생합성 활성을 상기에 설명된 방법으로 측정하였다(Cornish and Backhaus, 1990; Siler and Cornish, 1993). pH 7.5, 100mM 트리스-염산, 80 μ M 아머샴사의 [14C]IPP (55 mCi mmol⁻¹), 20 μ M FPP, 1mM 황산마그네슘 및 1mM DTT를 포함하는 50 μ l의 반응혼합물에 WRP를 첨가하여 25°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 고무생합성에 대한 IPP 이성화효소의 역할을 조사하기 위하여, 고무생합성의 유용한 개시분자인 FPP를 반응혼합물에서 제거하고 그 대신에 IPP를 고무생합성의 개시분자중 하나인 DMAPP로 전환시키기 위해 적당량의 IPP 이성화효소를 첨가하였다. 대

조균에는 고무 전이효소 활성화에 필요한 Mg²⁺ 이온과 킬레이트를 형성하는 25mM의 EDTA를 반응혼합물에 첨가하였다. 그 결과 생성된 [14C]IPP가 결합된 고무의 양을 여과법 또는 벤젠 추출법으로 측정하였다. 여과법에 서는 반응혼합물을 와트만사(Whatman)의 0.02 또는 0.1μm의 아노디스크 막(anodisc membrane)을 통하여 여과하고 그 필터를 1M의 염산과 95% 에탄올로 여러번 세척하여 세척된 필터에 잔재해 있는 방사능을 베크만사의 액체 섬광 계수기로 측정하였다(Cornish and Backhaus, 1990). 벤젠 추출법에 서는 반응혼합물을 2배 부피의 벤젠으로 3번 추출하고 벤젠 추출물을 베크만사의 레디 솔브 HP 섬광 각테일과 혼합하여 액체 섬광 계수기로 방사능을 측정하였다.

제 5 절 발명의 효과

상술한 바에 의하면 본 발명은 고무의 생합성에 중요한 역할을 하는 브라질 고무나무(Hevea Brasiliensis)에서 분리한 IPP 이성화효소와 이를 이용하여 고무를 제조하는 방법을 제공하는 이점이 있다.

- <110> Korea Kumho Petrochemical Co. Ltd.
- <120> Isopentenyl diphosphate isomerase from Hevea Brasiliensis
- <130> P99-5-42
- <160> 2
- <170> KOPATIN 1.0
- <210> 1
- <211> 1288
- <212> DNA
- <213> IPIHb (IPP isomerase from Hevea brasiliensis)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (209)..(910)

<400> 1

caccactcgc ctictaaatg cccacgccac caccagactc tcgtcctcgc ttcctcctc 60

tgcttctcct cgttattctt actttctctc tacccaattt gccctcctt ctctcattca 120

attccctcta actcttaaac ctctgtctac ctcttcgttc tctagggtat tttcgtcttc 180

tccatctgca atcaccgcta cttccacc atg ggt gag gct cca gat gtc ggc 232

Met Gly Glu Ala Pro Asp Val Gly

1 5

atg gat gct gtc cag aaa cgc ctc atg ttc gac gat gaa tgc att tta 280

Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu

10 15 20

gta gat gag aac gat ggt gtt gtt ggt cat gct tcc aaa tat aat tgt 328

Val Asp Glu Asn Asp Gly Val Val Gly His Ala Ser Lys Tyr Asn Cys

25 30 35 40

cat ttg tgg gaa aat att ttg aag ggg aac gca tta cat aga gct ttt 376

His Leu Trp Glu Asn Ile Leu Lys Gly Asn Ala Leu His Arg Ala Phe

45 50 55

agc gta ttt ctc ttc aac tca aaa tat gag cta ctc ctt cag caa cgc 424

Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg

60 65 70

tct ggg aca aag gtg aca ttc ccg ctt gta tgg aca aac act tgc tgt 472

Ser Gly Thr Lys Val Thr Phe Pro Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys

75 80 85

agt cat cct ctg tac cgt gaa tct gag ctt att gat gag gat gct ctt 520

Ser His Pro Leu Tyr Arg Glu Ser Glu Leu Ile Asp Glu Asp Ala Leu

90 95 100

ggt gtg aga aat gct gca caa agg aag ctt ttc gat gag ctt ggt atc	568
Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg Lys Leu Phe Asp Glu Leu Gly Ile	
105 110 115 120	
cct gct gaa gat gtt cca gtt gat cag ttt act cca cta gga cgt ata	616
Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp Gln Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile	
125 130 135	
cta tat aag gcg tcc tcc gat gga aag tgg gga gag cat gaa ctt gat	664
Leu Tyr Lys Ala Ser Ser Asp Gly Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp	
140 145 150	
tat ctg ctc ttt ata gtc cgt gat gtt aat gta aat cca aac cct gat	712
Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp Val Asn Val Asn Pro Asn Pro Asp	
155 160 165	
gag gta gct gat gta aag tat gtt aac cgg gat cag ttg aag gag ctc	760
Glu Val Ala Asp Val Lys Tyr Val Asn Arg Asp Gln Leu Lys Glu Leu	
170 175 180	
ttg agg aag gcg gat tct ggc gag gaa ggt ata aat ttg tca cct tgg	808
Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gly Glu Glu Gly Ile Asn Leu Ser Pro Trp	
185 190 195 200	
ttt aga cta gtt gtg gac aac ttc ttg ttg aaa tgg tgg gaa aat gtc	856
Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe Leu Leu Lys Trp Trp Glu Asn Val	
205 210 215	
gaa aat ggg aca ctc aag gaa gca gtt gac atg aaa acg att cac aag	904
Glu Asn Gly Thr Leu Lys Glu Ala Val Asp Met Lys Thr Ile His Lys	
220 225 230	
ttg agt tgagataaat atctatacag aatcaaattt gattgtggca tcacctgtag	960
Leu Ser	

ctttattatt tgaataaatt tggtaatgic agttgtaaac gagttagcct ttctttgctg 1020
 ttgtggctgt tagcctggtc caaagttaca ttaaattttt tgatgtttcc tgaaagcagc 1080
 tgggcagttc tgatattgta acttagattt ggctcccatc atttaaaact gaataaggag 1140
 attttcactt ccittatata cttaaattgg aggaattttt ttgtctcccc ttgttgagat 1200
 cttttttcgg ggtgaggaca ttgttatttg ttttgttatg aatcaagtga gactggctat 1260
 tcaagcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1288

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> IPIHb (IPP isomerase from *Hevea brasiliensis*)

<400> 2

Met Gly Glu Ala Pro Asp Val Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu
 1 5 10 15
 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Gly Val Val
 20 25 30
 Gly His Ala Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Trp Glu Asn Ile Leu Lys
 35 40 45
 Gly Asn Ala Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys
 50 55 60
 Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Gly Thr Lys Val Thr Phe Pro
 65 70 75 80
 Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Tyr Arg Glu Ser
 85 90 95
 Glu Leu Ile Asp Glu Asp Ala Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg
 100 105 110

Lys Leu Phe Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp
115 120 125
Gln Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Ser Ser Asp Gly
130 135 140
Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp
145 150 155 160
Val Asn Val Asn Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Val Lys Tyr Val
165 170 175
Asn Arg Asp Gln Leu Lys Glu Leu Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gly Glu
180 185 190
Glu Gly Ile Asn Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe
195 200 205
Leu Leu Lys Trp Trp Glu Asn Val Glu Asn Gly Thr Leu Lys Glu Ala
210 215 220
Val Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Ser
225 230

제 6 절 청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 헤비아 IPP 이성화효소를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 2

서열번호 1의 핵산서열을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 3

45°C에서 0.45M 염화나트륨, 0.04M 구연산나트륨, 0.1% 두테실 황산

나트륨에 의한 엄격한 세척조건하에서 청구항 1의 핵산분자에 하이브리디제이션하여 분리한 핵산분자.

청구항 4

45°C에서 0.45M 염화나트륨, 0.04M 구연산나트륨, 0.1% 두테실 황산나트륨에 의한 엄격한 세척조건하에서 청구항 2의 핵산분자에 하이브리디제이션하여 분리한 핵산분자.

청구항 5

청구항 1의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 6

청구항 2의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 헤비아 IPP 이성화효소를 암호화하는 핵산 분자를 프로모터 분자에 효과적으로 결합시킨 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 헤비아 IPP 이성화효소를 암호화하는 핵산 분자를 프로모터 분자에 효과적으로 결합시킨 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 프로모터는 세균 프로모터, 식물 프로모터 및 바이러스 프로모터로 이루어진 그룹에서 선택된 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 프로모터는 세균 프로모터, 식물 프로모터 및 바이러스 프로모터로 이루어진 그룹에서 선택된 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 벡터는 숙주에 전이되어 존재가능하고 숙주내 복제가능한 것임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 벡터는 숙주에 전이되어 존재가능하고 숙주내 복제가능한 것임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 숙주는 핵산 분자를 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 청구항 11의 벡터를 함유하는 형질전환된 숙주.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 숙주는 핵산 분자를 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 청구항 12의 벡터를 함유하는 형질전환된 숙주.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 숙주는 식물, 세균, 효모 및 진균류로 이루어진 그룹에서 선택된 것임을 특징으로 하는 형질전환된 숙주.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 숙주는 식물, 세균, 효모 및 진균류로 이루어진 그룹에서 선택된 것임을 특징으로 하는 형질전환된 숙주.

청구항 17

청구항1의 핵산 분자를 제공하는 단계와 상기 핵산분자를 숙주세포에 전이하여 형질전환된 숙주 세포를 생산하는 단계와 상기 형질전환된 숙주를 적절한 배지에 배양하여 IPIHb를 생산하고 상기 IPIHb를 이용하여 시험관내 고무 합성을 촉진하는 단계로 이루어진 시험관내 고무의 제조방법.

청구항 18

청구항 2의 핵산 분자를 제공하는 단계와 상기 핵산분자를 숙주세포에 전이하여 형질전환된 숙주 세포를 생산하는 단계와 상기 형질전환된 숙주를 적절한 배지에 배양하여 IPIHb를 생산하고 상기 IPIHb를 이용하여 시험관내 고무 합성을 촉진하는 단계로 이루어진 시험관내 고무의 제조방법.

청구항 19

청구항 1의 핵산 분자를 제공하는 단계와 상기 핵산분자를 숙주세포

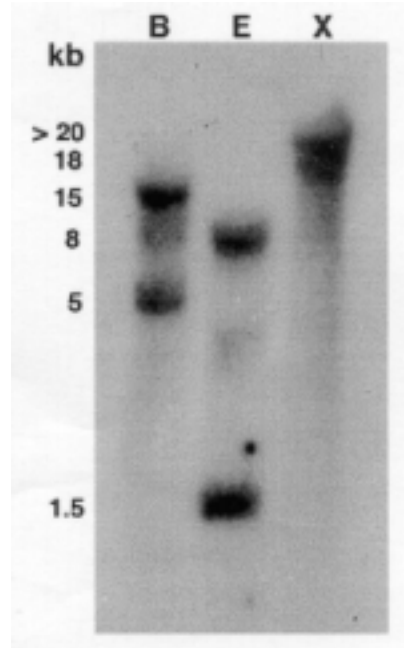
에 전이하여 형질전환된 숙주 세포를 생산하는 단계와 상기 형질전환된 숙주를 생체내 고무의 생산을 위하여 적합한 환경에서 배양하는 단계로 이루어진 생체내 고무의 제조방법.

청구항 20

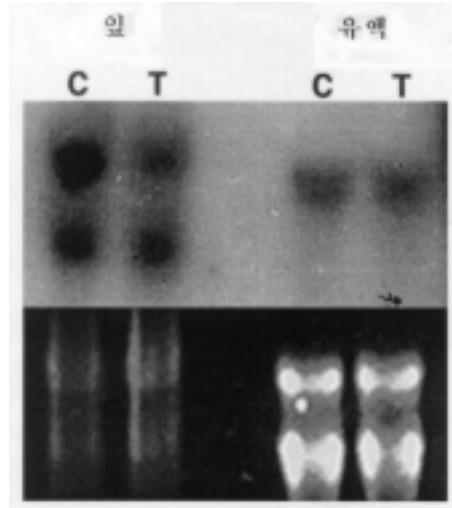
청구항 2의 핵산 분자를 제공하는 단계와 상기 핵산분자를 숙주세포에 전이하여 형질전환된 숙주 세포를 생산하는 단계와 상기 형질전환된 숙주를 생체내 고무의 생산을 위하여 적합한 환경에서 배양하는 단계로 이루어진 생체내 고무의 제조방법.

제 7 절 도 면

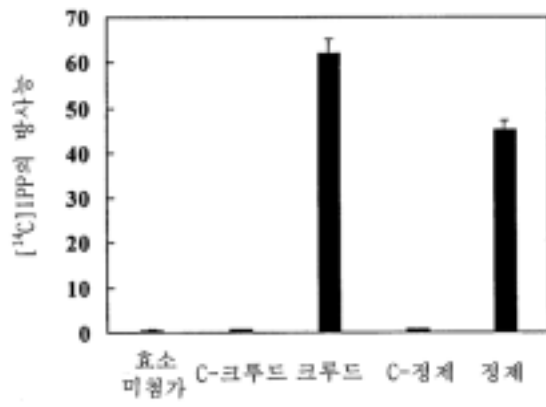
도면1



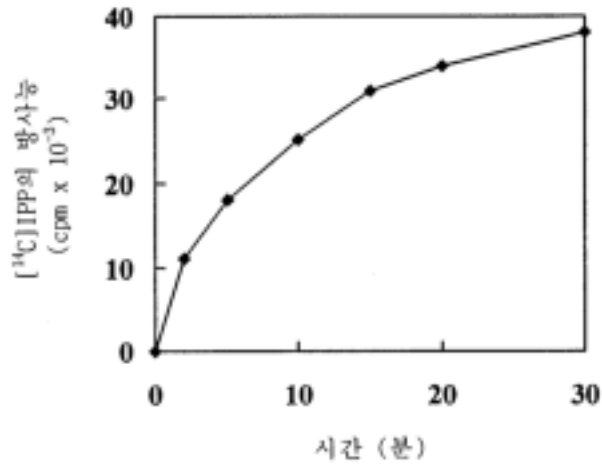
도면2



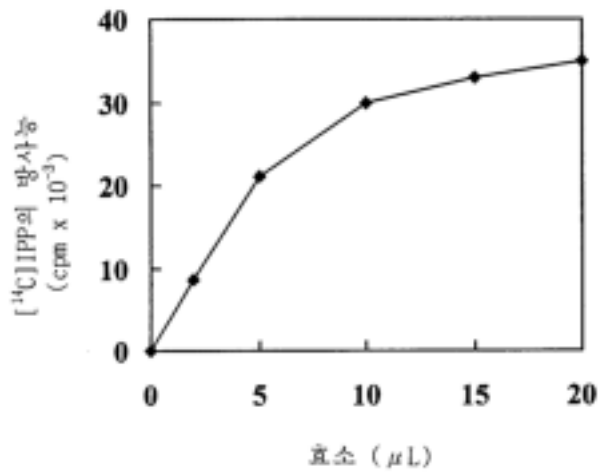
도면3



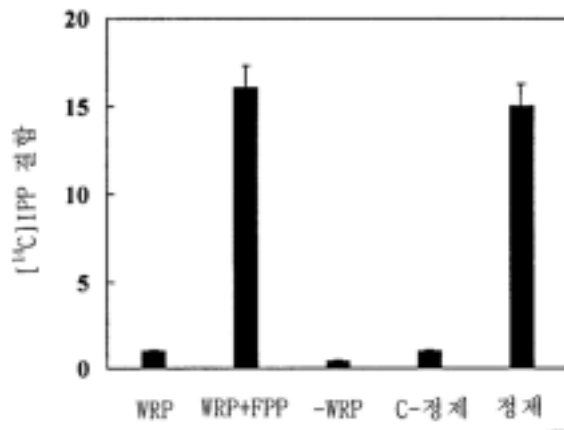
도면4a



도면4b



도면 5



제 5 장 Molecular Cloning, Expression, and
Functional Analysis of a *cis*-Prenyl-transferase
from *Arabidopsis thaliana* -IMPLICATIONS IN
RUBBER BIOSYNTHESIS*

Published in J. of Biological Chemistry 275: 18482-18488 (2000)

Soo Kyung Oh, Kyung Hwan Han, Stephen B. Ryu, and Hunseung Kang

Kumho Life & Environmental Science Laboratory, 1 Oryong-dong, Buk-gu,
Gwangju, 500-712 Korea

I. ABSTRACT

cis-Prenyltransferase catalyzes the sequential condensation of isopentenyl diphosphate with allylic diphosphate to synthesize polyprenyl diphosphates that play vital roles in cellular activity. Despite potential significance of *cis*-prenyltransferase in plant growth and development, no gene of the enzyme has been cloned from higher plants. Using sequence information of the conserved region of *cis*-prenyltransferase cloned recently from *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, and yeast, we have isolated and characterized the first plant *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Sequence analysis revealed that the protein is highly homologous in several conserved regions to *cis*-prenyltransferases from *M. luteus*, *E. coli*, and yeast. *In vitro* analyses using the recombinant protein overexpressed in *E. coli* revealed that the enzyme catalyzed the formation of polyprenyl diphosphates ranging in carbon number from 100 to 130 with a predominance of C120. The enzyme exhibited a higher affinity for farnesyl diphosphate than for geranylgeranyl diphosphate, with the *K_m* values being 0.13 and 3.62 mM, respectively, but a lower affinity for isopentenyl diphosphate, with a *K_m* value of 23 mM. *In vitro* rubber biosynthesis

analysis indicated that the *Arabidopsis cis*-prenyltransferase itself could not catalyze the formation of higher molecular weight polyprenyl diphosphates similar to natural rubber. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis showed that the gene was expressed at low levels in *Arabidopsis* plant, in which expression of the *cis*-prenyltransferase in leaf and root was higher than that in stem, flower, and silique. These results indicate the tissue-specific expression of *cis*-prenyltransferase and suggest a potential role and significance of the enzyme in the polyisoprenoid biosynthesis in plants.

*** This work was supported in part by Agricultural Research Promotion Center, Korean Ministry of Agriculture, Grant 297066-5.**

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AF162441.

1 The abbreviations used are: FPP, farnesyl diphosphate; ACPT, *Arabidopsis cis*-prenyltransferase; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; GPC, gel permeation chromatography; IPP, isopentenyl diphosphate; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcriptase-PCR; IPTG, isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside; bp, base pair(s).

II. INTRODUCTION

Prenyltransferase is an enzyme that catalyzes the synthesis of linear prenyl diphosphates involved in the biosynthesis of various isoprenoid compounds, including sterols, carotenoids, terpenes, quinones, glycosyl carrier lipids, prenyl proteins, and natural rubber. Based on the configuration of isoprene units in the final reaction products, prenyltransferases are classified into two classes: *trans*- and *cis*-prenyltransferase. In both prokaryotes and eukaryotes,

trans-prenyltransferases catalyze the formation of isoprenoid compounds, such as geranyl diphosphate (C10), farnesyl diphosphate (FPP1; C15), and geranylgeranyl diphosphate (GGPP; C20), which serve as initiating molecules to produce many other longer chain length isoprenoid compounds necessary for cellular growth and survival. The structural genes for FPP synthase (1–6) and GGPP synthase (7–13) have been cloned and characterized from various organisms. In addition, the genes for hexaprenyl diphosphate synthase (14), heptaprenyl diphosphate synthase (15), octaprenyl diphosphate synthase (16), solanesyl diphosphate synthase (17), and decaprenyl diphosphate synthase (18) have been cloned. Mutational analyses and x-ray crystallographic investigations of the structure of *trans*-prenyltransferase revealed the importance of several amino acid residues in the conserved domains for the mechanism of chain length determination (19–23).

In contrast, only three *cis*-prenyltransferase genes have recently been cloned. Two genes are the structural genes for undecaprenyl diphosphate synthase, which catalyzes the formation of undecaprenyl diphosphate (C55) that serves as a glycosyl carrier lipid during the biosynthesis of cell wall polysaccharide components in *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* (24–26). The other is the gene encoding a *cis*-prenyltransferase involved in the biosynthesis of dolichols used for the glycosylation of proteins in yeast (27). In addition to these genes whose functions have been verified by *in vitro* and *in vivo* analyses, several other hypothetical proteins from diverse sources have been suggested to be *cis*-prenyltransferases based on the sequence alignments (Refs. 25 and 27 and GenBank™ accession numbers therein). Although the *cis*- and *trans*-prenyltransferases catalyze similar reactions of the sequential condensation between isopentenyl diphosphate (IPP) and allylic diphosphates in the presence of Mg²⁺ ions, no similarity in the sequence was found between *cis*- and *trans*-prenyltransferases. The *cis*-prenyltransferases cloned from *E. coli*, *M. luteus*, and yeast and other hypothetical proteins share a low level of sequence homology (~30% identity) among them. Several regions with highly conserved amino acid sequences were,

however, identified. In order to understand the genomic structure of *cis*-prenyltransferase and to verify the role of these conserved amino acid sequences for the catalytic activity of the enzyme, it is necessary to identify and clone more genes for *cis*-prenyltransferase from different organisms including animals and plants. In addition, it is of critical importance to test whether *cis*-prenyltransferase could catalyze the formation of higher molecular weight polymers similar to natural rubber (*cis*-1,4-polyisoprene), which is synthesized by the action of a rubber polymerase or rubber transferase that catalyzes the sequential condensation of IPP with allylic diphosphates similar to *cis*-prenyltransferase. In this study, using the sequence information of the conserved regions of *cis*-prenyltransferases isolated from microorganisms, we isolated and characterized a full-length cDNA encoding *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, thus designated ACPT. The deduced amino acid sequence is highly homologous in several conserved regions to that of *cis*-prenyltransferases from *M. luteus*, *E. coli*, and yeast. *In vitro* analysis of the recombinant protein revealed that the enzyme catalyzed the formation of polyprenyl diphosphates with predominant carbon number C120. *In vitro* rubber biosynthesis analysis indicated that the *Arabidopsis cis*-prenyltransferase itself could not catalyze the formation of high molecular weight polyprenyl diphosphate such as natural rubber.

III. MATERIALS AND METHODS

Plant Material and RNA Isolation

A. thaliana samples were obtained from mature plants grown under controlled greenhouse conditions. Total RNA was extracted by using a plant RNA isolation kit, and mRNA was isolated by using the Oligotex-dTy mRNA kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Amplification of ACPT

First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription with 0.5 mg of total RNA. Two primers, AC1 (59-TGGATGGGAACCGGAGATGGGCC-39) and AC2 (59-TTCTCCACTTGTCCCTAATCATTAA-39), were designed according to the sequence information of *cis*-prenyltransferase from *E. coli*, *M. luteus*, yeast, and *Arabidopsis* genomic sequences (accession no. AC003040). PCR was performed using 10 ml of the first-strand cDNA and two primers. PCR was performed for 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 72 °C, with a 5-min preheat and a 7-min final extension at 72 °C. The PCR product was used to screen the *Arabidopsis* cDNA library.

Screening of cDNA Library

The pGAD 424 library containing *Arabidopsis* cDNA inserts was a gift from G. T. Choi. The PCR product was used to screen 4 3 10⁶ colonies of the cDNA library. Colony hybridization was performed at 60 °C in 23 SSC hybridization solution (32). The cDNA clones hybridized to the probe were sequenced. One clone carrying a full-length cDNA insert was chosen and designated pACPT.

Sequencing of cDNA Clones

Plasmid DNA for sequencing reactions was prepared by the alkaline lysis method (28) by using the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega). The sequence was determined by the dideoxy chain termination method using the dye Terminator cycle sequencing kit and ABI prismy 310 DNA sequencer (Perkin-Elmer).

Analysis of ACPT Gene Expression by Northern Blot and Quantitative RT-PCR

Total RNAs of various tissues were prepared using RNA isolation kit (Quiagen) and were treated with DNase I to remove contaminating genomic DNA. Tissues were collected from 4-week-old *Arabidopsis* plants except young leaf (5 days) and old leaf (8 weeks). For Northern blot, total RNA (10 mg) was subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose-formaldehyde gel and blotted as for Southern blot. A ³²P-labeled full-length ACPT

cDNA was used as a probe. For quantitative RT-PCR, the first-strand cDNA was synthesized from total RNA (3 mg) by using reverse transcriptase and oligo(dT). A 200-unit reverse transcriptase (RT), 1.3 RT buffer, 0.5 mM dNTP, and 0.5 mg of oligo(dT) primer (Promega) were added to the heat-denatured total RNA. After reverse transcription for 1 h at 37 °C, the first-strand cDNA was used for PCR performed in standard conditions: 5 min at 95 °C; 35 cycles (94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s); 7 min at 72 °C. Two primers, 59-GCGAGGATGGGTTACAAAGC-39 (208 region) and 59-TTCCCCAATTCTCTGTGGAG-39 (414 region), were used for RT-PCR. As a control, 18 S ribosomal RNA standard primers (Ambion) were used. An equal volume of each PCR sample was separated by 1.2% agarose gel electrophoresis.

Heterologous Expression and Purification of ACPT Protein in E. coli

The ACPT gene was cloned in the *Bam*HI *Eco*RI site of pET-22b(1) (Novagen) to construct pET-ACPT. The *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET-ACPT was grown to midstationary phase in TB medium (1.2% bactotryptone, 2.4% yeast extract, 0.4% glycerol, and 10% potassium phosphate solution) containing 500 mg/ml carbenicillin at 30 °C with vigorous aeration. The cultures were induced by adding IPTG to a concentration of 1mM and then incubating for another 2 h. All subsequent steps were carried out at 4 °C. The cells were harvested, washed with 0.1 M potassium phosphate (pH 7.4) by centrifugation (5000 \times g, 10 min), and then disrupted by sonication. The expressed proteins were purified using Ni21-nitrilotriacetic acid-agarose (Quiagen). The lysate was incubated with Ni21-nitrilotriacetic acid slurry at 4 °C for 60 min, and the mixture was loaded to a column. The column was washed four times with washing buffer, and the proteins were then eluted with 0.5 ml of elution buffer. The lysate was subjected to SDSpolyacrylamide gel electrophoresis according to the standard method of Laemmli (30).

Western Blot Analysis

The purified protein was separated by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membrane by electroblotting, and the membrane was blocked with 5% skim milk in phosphate-buffered saline with 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature. After washing, the membrane was incubated with Penta Anti-His antibody (Quiagen) for 1 h, and the proteins were detected using anti-mouse IgG/horseradish peroxidase and enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

Assay of ACPT Activity

Enzyme activity was measured in a 50-ml reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 20 mM FPP, and 80 mM [¹⁴C]IPP (55 mCi mmol⁻¹, Amersham Pharmacia Biotech). The reaction was initiated by the addition of indicated amounts of the recombinant enzyme. The mixture was incubated for 1 h at 30 °C and then treated with 1-butanol saturated with water to extract the products of the prenyltransferase reaction. The butanol phase was collected and washed with water saturated with NaCl. The extract was mixed with Ready Solv HP scintillation mixture (Beckman), and the radioactivity was determined by a liquid scintillation counter (Beckman).

Analysis of ACPT Reaction Products

The washed organic extract was dried under N₂, and the residues were hydrolyzed to the corresponding alcohols with potato acid phosphatase according to Fujii *et al.* (31). The alcohols were extracted with hexane and analyzed by TLC on a reverse phase RP-18 plate (Merck) with a solvent system of acetone/H₂O (19:1). Normal phase TLC of the reaction products was also carried out on a Silica Gel-60 plate (Merck) with a solvent system of 1-propanol/aqueous NH₃/H₂O (6:3:1). The distribution of ¹⁴C-labeled reaction products on the TLC plate was analyzed by a Bio-image analyzer BAS 1500 (Fuji). The positions of authentic standards were visualized with *p*-anisaldehyde spray reagent (Sigma).

In Vitro Rubber Assay and Product Analysis

Rubber biosynthetic activity of the enzyme was measured according to the procedure as described (29), which is similar to the method used for the *cis*-prenyltransferase assay described above. After incubation for 5 h at 25 °C, the reaction products were extracted with benzene and dried under N₂. The extract was dissolved in tetrahydrofuran, filtered through a membrane of 0.4- μ m porosity, and analyzed using a gel permeation chromatography (GPC). Gel permeation chromatography was carried out in a Waters high performance liquid chromatograph using three columns in series, a mixed bed polydivinylbenzene column with molecular weight cut-off from 100 to 10,000 (Jordi) and two polystyrene-divinyl-benzene copolymer gels having an exclusion limit of 4 \times 10⁷ and 6 \times 10⁴ (Supelco). Measurements were made at 35 °C using tetrahydrofuran as eluent at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, and the reaction product was monitored by an evaporative light scattering detector (Alltech). The effluents were collected at 0.5-min intervals and assayed for radioactivity. The molecular weight of the reaction product was estimated by comparing the elution profile of the sample to that of standard *cis*-polyisoprene or polystyrene.

IV. RESULTS

Isolation and Characterization of ACPT Gene

PCR and cDNA library screening were employed to clone the gene. The fragment of the ACPT gene (0.5 kilobase pairs) was obtained by RT-PCR and used to screen 4 \times 10⁶ colonies of the cDNA library. Seven positive colonies were selected in the first screening, and of these only one colony was hybridized to the ACPT probe in the second screening. Sequence analysis showed *cis*-Prenyltransferase from *A. thaliana* 18483 that the cDNA insert was 1062 bp long and contained a 909-bp open reading frame. The ACPT contains a 26-bp-long 5'-untranslational region and a 127-bp-long 3'-untranslational region including a poly(A) tail of 33 bp. The ORF encodes for a 303-amino acid polypeptide with a predicted

molecular mass of 33 kDa (Fig. 1). The deduced protein is basic with an isoelectric point of 8.05, which is similar to that of undecaprenyl pyrophosphate synthase in *M. luteus* (pI 5 8.58) and *RER2* (for return to the endoplasmic reticulum) gene in yeast (pI 5 7.75). Hydrophathy and transmembrane motif analyses of the deduced amino acid sequence show that ACPT is hydrophilic and has N terminus transmembrane helices large enough to span the lipid bilayers (data not shown), in contrast to other *cis*-prenyltransferases from yeast, *M. luteus*, and *E. coli* that do not have transmembrane helices. The predicted amino acid sequence of the ACPT has low similarity to those of *cis*-prenyltransferases from *E. coli* (SWISS-PROT Q47675; 30% identity), *M. luteus* (accession no. AB004319; 30% identity), and yeast *S. cerevisiae* (accession no. AB013497; 28% identity) (Fig. 2). Several regions with identical or highly conserved amino acids are, however, identified throughout the sequence. These conserved domains are likely to be functionally important for the catalytic activity and mechanism of chain elongation by *cis*-prenyltransferase.

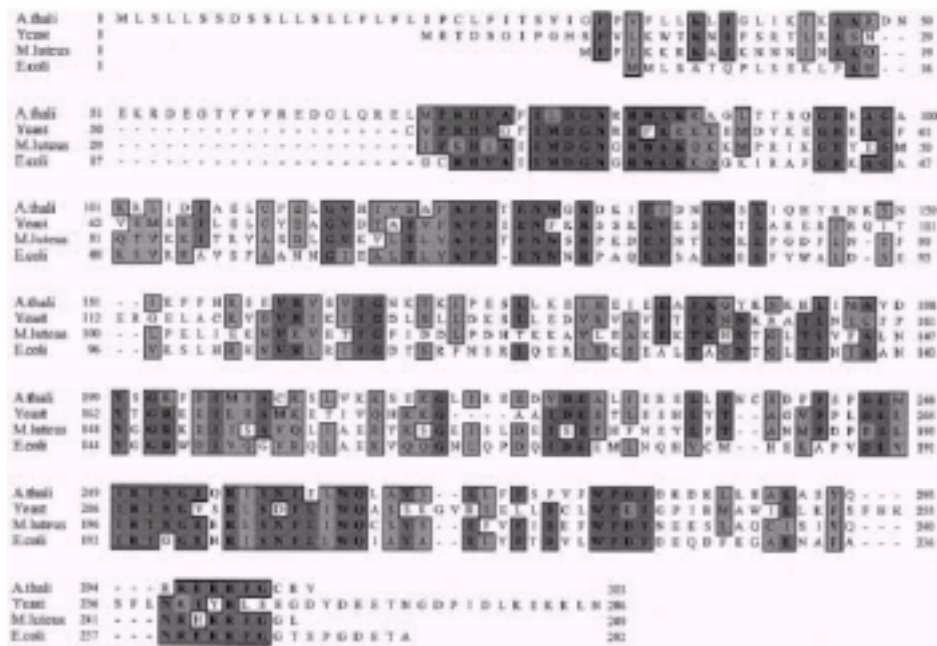


FIG. 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of ACPT with *cis*-prenyltransferase from *E. coli* (accession no. P12252), *M. luteus* (accession no. AB004519), and yeast (accession no. AB013497). The alignment was made using the ClustalW program. Gaps in the sequences are indicated by dashes. Numbers of amino acids are indicated on the right.

Expression of the ACPT Gene

Our initial attempt to check the expression pattern of ACPT gene by Northern blot analyses failed due to the extremely low level of gene expression. Therefore, we performed a RT-PCR using total RNAs obtained from different tissues. The cycle number for RT-PCR was chosen in the linear range of PCR for the products. As shown in Fig. 3, the predicted size of 207 bp for ACPT was detected in all of the tissues used. Varied expression levels were observed among the different tissues. The expression of ACPT in root and leaf was higher than that in stem, flower, and silique. When the intensity of RT-PCR product in young leaf (5 days old) was set at 100 by Eagle-eye software (Stratagene), the relative intensities of RT-PCR products in other tissues were quantified as follows: mature leaf, 75; old leaf, 76; root, 51; stem, 28; flower, 33; and silique, 18. In order to modulate the amplification efficiency of PCR template and to compare the expression levels of the *cis*-Prenyltransferase from *A. thaliana* 18484 ACPT gene, a control reaction using the 18 S primers and

Competimery provided by the manufacturer (Ambion) were performed. The ratio between 18 S primer and Competimer was 2:8, which is designed to detect the rare transcripts (Ambion). The intensities of the PCR products of ACPT in different tissues were weaker than that of control 18 S ribosomal RNA (Fig. 3), indicating that ACPT is expressed in an extremely small amount in *Arabidopsis* plant.



FIG. 3. RT-PCR analysis of RNA transcripts extracted from various tissues. The RT-PCR products for ACPT and control 18 S rRNA were separated on 1.2% agarose gel. The sizes of amplified bands are indicated at the right. R, root; S, stem; L, leaf; F, flower; Si, silique; Y, young leaf; O, old leaf.

Overexpression of the Recombinant ACPT in E. coli

In order to characterize the *cis*-prenyltransferase from *A. thaliana*, the enzyme was overexpressed in *E. coli* by using a pET-22b(1) expression system. Our first attempt to overexpress the recombinant ACPT based on the pGEX expression system failed, possibly due to a toxic effect of the gene that is involved in cell wall biosynthesis of host cells. Therefore, we used the pET-22b(1) expression system containing the *pelB* signal sequence to the N terminus of the ACPT gene so that the translated protein could be secreted to the periplasmic region. After inducing the *E. coli* with IPTG, the cells were harvested and disrupted by sonication. Since the *cis*-prenyltransferase is a membrane-bound protein, it was necessary to treat Triton X-100 at a 1% concentration to solubilize the protein from the membranes. The proteins were purified by using a His tag affinity column from the supernatant and analyzed by SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 4). The major band at an expected size of 36 kDa (ACPT plus His tag) was clearly observed in the extract from the IPTG-induced cells. In contrast, no band was observed in the extract from the same *E. coli* cells but without IPTG induction. Since we do not have the antibody for ACPT, it was not feasible to directly detect the ACPT

protein by Western blot. However, Western blot analysis of the ACPT-His tag fusion protein using the His tag antibody revealed that the major protein of 36 kDa in size is the translated product of the pET-ACPT construct (Fig. 4).

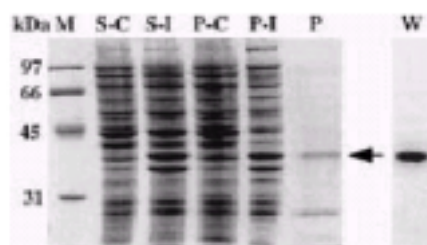


FIG. 4. Overexpression of ACPT in *E. coli*. The pET-22b(+) expression vector was constructed, in which the ACPT gene is fused to *poB* signal sequence in order to localize the recombinant protein into periplasmic region and transformed into *E. coli* BL21. The cell was induced by the addition of 0.1 mM IPTG, and ACPT proteins were purified by a His tag column. S-C, supernatant control without IPTG induction; S-I, supernatant after IPTG induction; P-C, pellet control without IPTG induction; P-I, pellet after IPTG induction; P, purified after IPTG induction; W, Western with His tag antibody; M, molecular weight markers. An arrow indicates the migration of ACPT.

Substrate Specificity and Characterization of ACPT

To determine whether the gene we have cloned is really the *cis*-prenyltransferase, a standard activity assay of *cis*-prenyltransferase was performed with IPP and FPP as substrates. In a time course experiment using the recombinant enzyme, it was clearly noted that [14C]IPP incorporation increased linearly with incubation time up to 3 h (data not shown). It was also observed that [14C]IPP incorporation increased with the amount of enzyme added in the reaction mixture (data not shown). Since Mg²⁺ ion is known to be required for the activity of *cis*-prenyltransferase from *E. coli* (25), the effect of Mg²⁺ ion on catalytic activity of ACPT was investigated. No activity was observed in the absence of Mg²⁺ ion, and a rapid increase of enzyme activity was detected with the addition of Mg²⁺ ion up to 2 mM. A further addition of Mg²⁺ ion inhibited the activity (Fig. 5). Triton X-100 was absolutely required for the activity of bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthase (25). During the purification of recombinant ACPT, Triton X-100 was necessary to solubilize the protein from membrane. To test whether Triton X-100 is necessary for

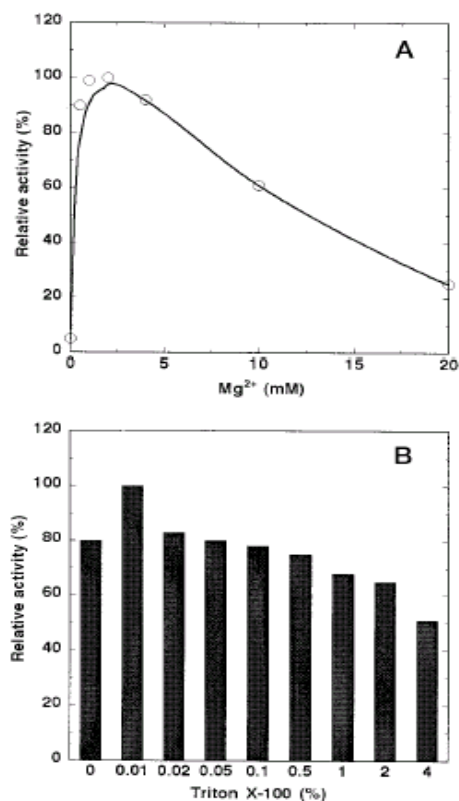


FIG. 5. Effects of Mg²⁺ and Triton X-100 on the enzymatic activity. *cis*-Prenyltransferase assay was performed in 50 μ l of standard reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 10 μ M FPP, 60 μ M [¹⁴C]IPP, 20 mM KF, 5 μ l of enzyme solution and the indicated amount of MgCl₂ (A) or 1 mM MgCl₂ and the indicated amount of Triton X-100 (B). After incubation at 30 °C for 1 h, the reaction products were extracted with butanol, mixed with scintillation mixture, and subjected to liquid scintillation counting. Each value is the mean of three separate experiments.

the activity of the enzyme, we investigated several times the ACPT activity with varying concentration of Triton X-100. Maximum activity was observed at 0.01% Triton X-100. However, the purified enzyme showed about 80% activity in the absence of Triton X-100 (Fig. 5), indicating that ACPT is not strictly dependent on Triton X-100 for its activity. The substrate specificities of ACPT were investigated with different amounts of allylic diphosphate substrates (Fig. 6). The substrate concentrations were

plotted against the total extractable radioactivities. Between the two initiating molecules tested (*trans,trans*-FPP and *trans,trans,trans*-GGPP), *trans,trans*-FPP was a better substrate than *trans,trans,trans*-GGPP, with enzyme saturation being achieved at 2 and 10 mM, respectively (Fig. 6). The condensing substrate, IPP, was a poor substrate, since the enzyme saturation was achieved at 200 mM. The data from Fig. 6 were used to calculate K_m and V_{max} values for the different substrates, according to Lineweaver-Burk analysis. The enzyme exhibits a higher affinity for *trans,trans*-FPP than for all-*trans*-GGPP, with the K_m values being 0.13 and 3.62 mM, respectively. The enzyme shows a lower affinity for IPP, with a K_m of 23 mM.

Products of the ACPT Reaction

The purified enzymes were incubated with FPP and [¹⁴C]IPP, and the reaction products were analyzed on TLC and GPC. The products formed were subsequently extracted, dephosphorylated enzymatically, and separated using reverse phase TLC (Fig. 7). The dephosphorylated reaction products migrated more slowly than the polyprenol standard with carbon number of 90, indicating that ACPT synthesized polyisoprenes with carbon number higher than 90. In order to determine the size distribution of polyisoprenes, the reaction products extracted with butanol were analyzed by GPC. The effluents were collected at 0.5-ml intervals, and their radioactivities were measured by liquid scintillation counter. The peak activity was observed at the point that corresponded to the polyisoprene with carbon number C120. In order to test whether ACPT can catalyze the formation of higher molecular weight polyisoprenes such as natural rubber, an *in vitro* rubber biosynthesis assay was conducted. Gel permeation chromatography analysis of the benzene extract of the reaction products indicated that the predominant reaction product of ACPT was prenyl diphosphate with carbon number 120, and no polymers with higher molecular size was produced. This result suggests that ACPT itself could not catalyze the formation of higher molecular weight rubber-like polymers.

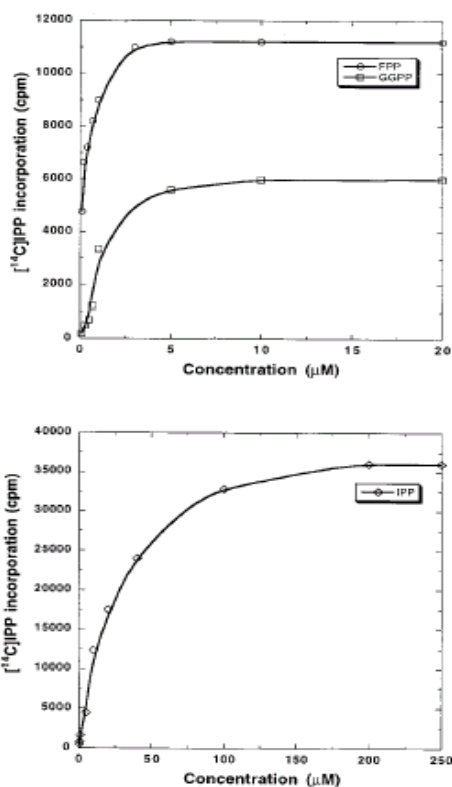


FIG. 6. Substrate specificity of ACPT. Purified ACPT was incubated with increasing amounts of FFP and GGPP and saturated amounts of IPP (*top*) and increasing amounts of IPP and saturated amounts of FFP (*bottom*). The amount of product formed was plotted against substrate concentration.

V. DISCUSSION

The plant *cis*-prenyltransferase from *A. thaliana* shares a common feature in its primary structure to *cis*-prenyltransferases from *E. coli*, *M. luteus*, and yeast. A number of conserved domains are identified throughout the sequence. However, the potential significance of these domains in substrate binding and catalytic activity remains to be investigated. The DDXXD motif conserved for the allylic substrate and IPP bindings in *trans*-prenyltransferase is not present in *cis*-prenyltransferase. For *trans*-prenyltransferase, aspartate residues are involved for the liganding of multiple Mg²⁺ ions required for the substrate binding (19–23). Absence of

the conserved DDXD motif in *cis*-prenyltransferase suggests that the catalytic mechanism of the enzyme is different from that of

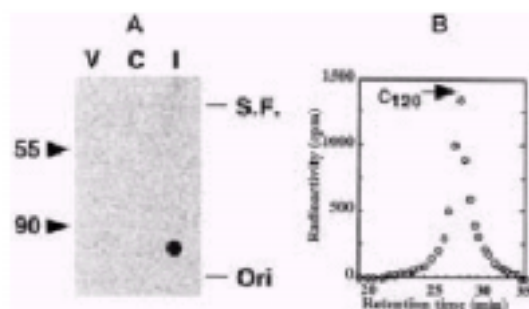


FIG. 7. Analysis of the ACPT reaction products *in vitro*. A, after extraction and dephosphorylation, the polyprenols were separated on reverse phase-TLC with a solvent system of acetone/water (29:1). The plate was exposed on image plate and analyzed by a Bio-image analyzer BAS 1500 (Fuji). V, vector only after IPTG induction; C, pET-ACPT construct without induction; I, pET-ACPT construct after induction; S.F., solvent front; Ori, origin. The numbers on the left indicate the positions of authentic polyprenol standards. B, the reaction extract was subjected to GPC, the fractions were collected at 0.5-ml intervals, and the radioactivity of each fraction was counted.

trans-prenyltransferase. The gene related to ACPT we have cloned by PCR and cDNA library screening has been reported as a hypothetical protein based on an *Arabidopsis* genomic sequence analysis. The amino acid sequence of ACPT with 303 amino acids is identical to the hypothetical protein in chromosome II BAC F26B6 (accession no. AC003040) with 290 amino acids, except 13 extra amino acids in ACPT and a few mismatch in N terminus. The ACPT also shares a high sequence homology (30% identity) with the hypothetical protein in chromosome II P1 MJB20 (accession no. AC007584), which is relatively short with 260 amino acids and lacks the corresponding amino acids in its N terminus. In order to investigate the copy number of *cis*-prenyltransferase in *Arabidopsis*, high molecular weight total DNA was prepared by using a plant genomic isolation kit (Omega Biotek), digested with appropriate restriction enzymes, blotted on a nylon membrane by capillary method, and was subjected to Southern blot analysis. The presence of these two related genes with high sequence homology was supported by two to three signals in Southern blot analysis of the genomic DNA of *A. thaliana* (data not shown).

Arabidopsis cis-prenyltransferase contains additional 30 amino acids in N terminus compared with the enzymes from *E. coli*, *M. luteus*, and yeast. Hydrophathy and PSORT analyses revealed that this extra N-terminal amino acid sequence of ACPT is hydrophobic and has transmembrane helix motif, which contrasts with other *cis*-prenyltransferases from *E. coli*, *M. luteus*, and yeast that do not contain the motif. During the purification of ACPT, we were not able to detect the enzyme in the soluble fraction of the cell lysate in the buffer not containing Triton X-100. The addition of Triton X-100 to the cell lysis buffer was required to solubilize the enzyme from the membranes and to purify the recombinant protein. These results suggest that ACPT does exist in association with membrane in plants. The enzyme displayed higher affinity for *trans,trans*-FPP than for all-*trans*-GGPP (Fig. 6). This characteristic was also observed in *cis*-prenyltransferase from rat liver microsome (33). We do not have direct evidence for the biological function of *cis*-prenyltransferase in plants. The prokaryotic *cis*-prenyltransferase, undecaprenyl diphosphate synthase, catalyzes the formation of undecaprenyl diphosphate (C55) that serves as a glycosyl carrier lipid during the biosynthesis of cell wall polysaccharide components (24–26). The eukaryotic *cis*-prenyltransferase is involved in the biosynthesis of dolichols that are used for the posttranslational glycosylation of proteins (27). In the analysis of ACPT transcripts in *Arabidopsis*, we were not able to detect the mRNA by Northern blot analysis. Our RTPCR analysis of the transcripts indicated that ACPT is expressed in low levels in various tissues including leaf, stem, flower, and silique, but at slightly higher levels in roots and leaves. The tissue-specific expressions suggest a functional role of the enzyme in *Arabidopsis* growth and development. Rubber polymerase or rubber transferase belongs to a family of *cis*-prenyltransferases that catalyze the formation of polyprenyl diphosphates by sequential condensation of IPP to allylic diphosphate. Our primary interest is to identify *cis*-prenyltransferase involved in rubber biosynthesis. The present data revealed that *Arabidopsis cis*-prenyltransferase itself could not catalyze the formation of rubber. It is possible that in addition to *cis*-prenyltransferase other factors such as rubber elongation factor and termination factor are required for the

synthesis of rubber. It is also possible that a rubber polymerase is an entirely different protein from *cis*-prenyltransferase, as suggested by Oh *et al.* (29). Identification and isolation of more *cis*-prenyltransferases from different rubber producing plant species are necessary to further determine whether *cis*-prenyl-transferase is related to rubber polymerase. We are currently searching for the related genes of *cis*-prenyltransferase from various rubber producing plant species. In conclusion, we have isolated and characterized the first plant *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. The deduced amino acid sequence is highly homologous in several conserved regions to those of *cis*-prenyltransferases from *M. luteus*, *E. coli*, and yeast. *In vitro* analysis of the recombinant protein overexpressed in *E. coli* revealed that the enzyme catalyzes the formation of polyprenyl diphosphates with predominant carbon number C120. *In vitro* rubber biosynthesis analysis indicated that *cis*-prenyltransferase could not catalyze the formation of higher molecular weight polyprenyl diphosphates such as natural rubber. The *cis*-prenyltransferase was expressed in low levels in all tissues of *Arabidopsis* tested, but at slightly higher levels in roots and leaves, and only barely in siliques. The results described here represent an important step in understanding the primary structure of *cis*-prenyltransferase in higher plants and provide a basis for the further investigation of the catalytic mechanism of chain elongation in polyprenyl diphosphates biosynthesis.

Acknowledgments

We are grateful to G. T. Choi for providing the *Arabidopsis* cDNA library and to M. H. Lee for help in growing *Arabidopsis*. We thank Pill-Soon Song for critical reading of the manuscript.

VI. REFERENCES

1. Pan, Z., Herickhoff, L., and Backhaus, R. A. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 196–204
2. Wilkin, D. J., Kutsunai, S. Y., and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4607–4614
3. Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 355–363
4. Anderson, M. S., Yarger, J. G., Burck, C. L., and Poulter, C. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19176–19184
5. Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., and Nishino, T. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 995–1000
6. Adiwilaga, K., and Kush, A. (1996) *Plant Mol. Biol.* **30**, 935–946
7. Zhu, X., Suzuki, K., Okada, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997) *Plant Cell Physiol.* **38**, 357–361
8. Zhu, X., Suzuki, K., Saito, T., Okada, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, M., and Kawamukai, M. (1997) *Plant Mol. Biol.* **35**, 331–341
9. Math, S. K., Hearst, J. E., and Poulter, C. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6761–6764
10. Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 6704–6712
11. Chen, A., and Poulter, C. D. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 399–404
12. Ohnuma, S., Suzuki, M., and Nishino, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14792–14797
13. Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., and Macino, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5854–5859
14. Ashby, M. N., and Edwards, P. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13157–13164
15. Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18396–18400
16. Asai, K., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Okada, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 340–345

17. Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Suzuki, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 5992–5998
18. Suzuki, K., Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 496–505
19. Ohnuma, S., Hirooka, K., Tsuruoka, N., Yano, M., Ohto, C., Nakane, H., and Nishino, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26705–26713
20. Ohnuma, S., Narita, K., Nakazawa, T., Ishida, C., Takeuchi, Y., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30748–30754
21. Ohnuma, S., Hirooka, K., Hemmi, H., Ishida, C., Ohto, C., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18831–18837
22. Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A.-M., Komaya, T., Ogura, K., and Nishino, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10087–10095
23. Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D., and Sacchettini, J. C. (1994) *Biochemistry* **33**, 10871–10877
24. Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19476–19481
25. Apfel, C. M., Takacs, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., and Keck, W. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 483–492
26. Kato, J.-I., Fujisaki, S., Nakajima, K.-I., Nishimura, Y., Sato, M., and Nakano, A. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 2733–2738
27. Sato, M., Sato, K., Nishigawa, S.-I., Hirata, A., Kato, J.-I., and Nakano, A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 471–483
28. Yang, S. F. (1969) *Plant Physiol.* **44**, 1203–1204
29. Oh, S. K., Kang, H., Shin, D. H., Yang, J., Chow, K. S., Yeang, H. Y., Wagner, B., Breiteneder, H., Han, K. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17132–17138
30. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
31. Fujii, H., Koyama, T., and Ogura, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **712**, 716–718
32. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
33. Ericsson, J., Thelin, A., Chojnack, T., and Dallner, G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19730–19735

제 6 장 Cloning, characterization, and heterologous expression of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase from sunflower (*Helianthus annuus*L.)

Published in J. Plant Physiol. 157. 535-542 (2000)

Soo-Kyung Oh, In Jeong Kim, Dong Ho Shin, Jaemo Yang, Hunseung Kang, and Kyung-Hwan Han

Kumho Life and Environmental Science Laboratory, 1 Oryong-dong, Puk-gu, Gwangju, 500-712 Korea

I. Summary

Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase is a key enzyme for the biosynthesis of terpenoid compounds that play vital roles in plant growth and development, and interactions between organisms. We have cloned and characterized a sunflower cDNA encoding GGPP synthase. Sequence analysis showed that the gene contained a 1071-bp open reading frame coding for a peptide of 356 amino acid residues with a calculated molecular mass of 38.7 kDa. The predicted amino acid sequence of this sunflower GGPS has high similarity to other plant GGPP synthases (63–79%). *In vitro* activity assay using recombinant protein and genetic complementation experiments have shown that the cDNA we cloned encodes for functional GGPP synthase. Gene expression studies using sunflower seedlings showed that the gene was expressed after two days of seed imbibition. Abscisic acid treatment down-regulated the expression of the gene.

Key words: geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase *Helianthus annuus* isoprenoid.

Abbreviations: ABA abscisic acid. DMAPP dimethylallyl pyrophosphate. FPP farnesyl pyrophosphate. GGPP geranylgeranyl pyrophosphate. IPP isopentenyl pyrophosphate. MS Murashige and Skoog.

Introduction

The isoprenoid biosynthesis pathway in plants is responsible for the synthesis of a diverse group of compounds that are required not only for normal growth and development (primary metabolites), but also for adaptive responses of the plant to environmental challenges (secondary metabolites). Primary metabolites include sterols, carotenoids, growth regulators, and prenyl side-chains of dolichols, quinones, and proteins (Chappell 1995). Secondary metabolites from isoprenoid pathway include monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) is an essential precursor for biosynthesis of several holoterpenoids (carotenoid, kaurene, and diterpenes) and meroterpenoids (side chain of chlorophylls, tocopherols, and quinones). GGPP synthase (EC 2.5.1.29) catalyzes a farnesyl pyrophosphate (FPP) branching reaction with the condensation of FPP and isopentenyl pyrophosphate (IPP) to produce GGPP, and is regarded as an important branch point enzyme in terpenoid biosynthesis. The C₂₀ GGPP serves as the immediate precursor for carotenoids which are essential in light absorption for photosynthesis and in protection of the photosystems from photooxidation (Frank and Cogdell 1996). Carotenoids are also important precursors for biosynthesis of the plant growth regulator abscisic acid (Walton and Li 1995). These pigments also serve as animal feed additives (Marusich and Bauerfeind 1981), potential anticancer agents (Mayne 1996), and important colorants in the cosmetics and food industries (Klauri and Bauerfeind 1981). The first committed step of the carotenoid pathway is the formation of phytoene, which is the C₄₀ skeleton of plant carotenoid pigments, from two molecules of GGPP. GGPP is formed by the sequential addition of three molecules of IPP to one molecule of dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). These

reactions are catalyzed by the GGPP synthase (GGPS). This enzyme belongs to a family of prenyl transferase enzymes that are classified according to the length of the final product. In the carotenogenic bacterium *Erwinia uredovora*, a chromosomal gene cluster capable of directing carotenoid biosynthesis has been isolated and characterized (Misawa et al. 1990). This gene cluster consists of phytoene synthase (*crtB*), GGPP synthase (*crtE*), phytoene desaturase (*crtI*), zeaxanthin β -glucosidase (*crtX*), lycopene cyclase (*crtY*), and β -carotene hydroxylase (*crtZ*). Expression of these *crt* genes in *E. coli* cell results in carotenoid production. Plant GGPS genes have been cloned from *Arabidopsis* (Scolnik and Bartley 1994, Zhu et al. 1997a, b), *Capsicum annuum* (Kuntz et al. 1992), *Catharanthus roseus* (accession no. X92 893), and *Lupinus albus* (Aitken et al. 1995). The size of the reported GGPS proteins varies, ranging from 34.3 to 41.0 kDa. This size variation is mainly due to the divergence in N-terminal sequences. Comparison of the amino acid sequences of GGPS from a variety of organisms has shown that GGPP synthases contain several domains with highly conserved amino acid residues (Zhu et al. 1997 a, b). These regions are also conserved in other prenyltransferases (Koike-Takeshita et al. 1995). In *Arabidopsis*, six isoforms of GGPS have been identified (Zhu et al. 1997a, b). GGPS proteins are localized in different subcellular compartment, such as cytosol, mitochondria (Zhu et al. 1997 b), plastids (Kuntz et al. 1992), and vacuoles. While many plant GGPS genes have been isolated and structurally characterized, the expression pattern of the gene has attracted little attention. In *Arabidopsis* and mustard, GGPS is constitutively expressed during seedling development when carotenoid and chlorophyll contents are highly increased (von Lintig et al. 1997). On the other hand, the gene expression was strongly up-regulated during chromoplast conversion upon fruit ripening in bell pepper (Kuntz et al. 1992). Huguency et al. (1996) observed that pepper GGPS was induced by mechanical wounding. After soybeans, sunflower is the second most important oil crop worldwide and has potential values for both food and energy production. Metabolic engineering of the crop through the manipulation of isoprenoid biosynthesis is therefore of great commercial importance. As a first step toward the

genetic manipulation of terpenoid pathway in sunflower, we have isolated and characterized a cDNA encoding a functional sunflower GGPS. In this report, we show that the gene is expressed as early as 2 days after germination and downregulated by ABA treatment.

Material and Methods

Materials and plant growth conditions

Open-pollinated sunflower seeds were purchased locally and germinated in a greenhouse. The plants were watered daily. For abscisic acid (ABA) treatment, 5-day old seedlings were transferred to a liquid MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA. Whole plants were harvested after each treatment time period and used for total RNA extraction.

Isolation and analysis of nucleic acid

Northern and Southern blot analyses were performed as described by Oh et al. (1999). Genomic DNA (8–10 μg) was prepared from leaf tissues of 14-day old seedlings, digested with the indicated restriction enzymes, and size-fractionated by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels, blotted, and cross-linked to Hybond-N Nylon membrane (Amersham Life Science, Little Chalfont, England) by UV radiation. For the Northern blot, twenty micrograms of total RNA were electrophoresed on a 1.2% agarose-formaldehyde gel, transferred, and cross-linked as for the Southern blot. The probe for both hybridizations was the ^{32}P -labelled coding region of sunflower GGPS. Hybridization was for 18 h, at 55 °C for Northern and 65 °C for Southern, in 0.9 mol \cdot L $^{-1}$ sodium chloride, 50 mmol/L sodium phosphate (pH 7.6), 5 mmol/L EDTA, 0.4% (w/v) SDS, 5 \times Denhardt's solution, and 200 μg salmon sperm DNA. The blot was washed at either 55 °C for low stringency or 65 °C for high stringency, twice in 0.5 \times SSPE, 0.1% SDS, and twice in 0.1 X SSPE, 0.1% SDS. The membrane was exposed to an X-ray film overnight at 70°C.

Cloning and sequencing of sunflower GGPS gene

We constructed a sunflower cDNA library from a 14-day old seedling using Uni-ZAP II. cDNA library kit (Stratagene, La Jolla, CA). A degenerate primer, CA(T/C)GA(T/C)GA(T/C)(T/C)TICCI(T/G)(G/C)IATGGA (upstream), designed from an aspartate-rich domain in GGPS from *Capsicum annuum* (Kuntz et al. 1992) and *Lupinus albus* (Aitken et al. 1995), and T7 primer (downstream) were used to amplify GGPS gene from the cDNA library. PCR was performed for 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, and 2 min at 72 °C, with a 5 min pre-heat and a 10 min final extension at 72 °C. The PCR product was used to screen 5 × 10⁵ plaques of the same cDNA library used in the PCR. After secondary screening, four positive clones were obtained and further analyzed. One of these clones contained 1246-bp cDNA. The clone was subjected to *in vivo* excision according to the protocol provided by the cDNA library kit. The resulting phagemid was designated pHaGGPS. 537 Sunflower geranylgeranyl pyrophosphate synthase The 5′-end of the sunflower GGPS was determined by the 5′-RACE technique using the MarathonTM cDNA amplification kit (CLONTECH Laboratory). Ten µg of poly(A)+ RNA from 14-day old sunflower seedling was reverse-transcribed according to the manufacturer's recommendations. An anchor oligonucleotide (AP1 adaptor, provided by the kit) was then ligated to both ends of the cDNA using T4 DNA ligase. The 5′-end of the sunflower GGPS cDNA was amplified by PCR using a forward primer complementary to the AP1 adaptor, and a reverse gene specific primer (5′-AGAGCTTTATGGACAGAATTACCC-3′) complementary to the nucleotide sequence +260 to +284 in sunflower GGPS cDNA. PCR was performed under the same conditions described above. The resulting PCR product was gel-purified and cloned into pGEM.-T vector (Promega, Madison, WI) and sequenced using ALF automatic sequencer (Perkin Elmer Co.). A full-length GGPS cDNA was amplified by PCR from the cDNA pool with AP1 adapter, using a forward primer complementary to the 5′-end of the GGPS cDNA and a reverse primer complementary to the 3′-AP1 adaptor. The amplified full-length GGPS cDNA was then cloned into pGEM.-T vector.

Heterologous expression and purification of GGPS from *E. coli*

The sunflower GGPS gene from pHaGGPS was cloned in the *EcoRI*/*XhoI* site of pGEX (an IPTG-inducible expression vector, Pharmacia) to construct pGEX-GGPS. The *E. coli* XL1-Blue transformed with pGEX-GGPS was grown to mid-stationary phase in Luria Broth (LB) containing 50 mg/L ampicillin at 30 °C with vigorous aeration. The cultures were induced by adding IPTG to a concentration of 0.1mmol/L and then incubated for another 6 hours. All subsequent steps were carried out at 4 °C. The cells were harvested and washed with 0.1mol/L potassium phosphate (pH 7.4) by centrifugation (5000 *gn*, 10 min), and were then disrupted by sonication. The sonication was carried out for six cycles of 30 s bursts, followed by 30 s intervals in 1mL of buffer containing 0.1mol/L potassium phosphate (pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 10,000 *gn* for 10 min and the supernatant was used to determine GGPS activity. The lysate was subjected to SDS-PAGE with 12.5% slab gels according to the standard method of Laemmli (1970). Proteins were stained by Coomassie Brilliant Blue R-250.

Analysis of GGPS activity and reaction product

GGPP synthase activity was measured in bacterial extracts. Assays were carried out in 0.5mL of 50 mmol/L potassium phosphate, pH 7.4, containing 1 mmol/L MgCl₂, 0.1% (w/v) Triton X 100, 5 μmol/L FPP, 10 μmol/L [14C]IPP (1.17μCi μmol⁻¹), and suitable amounts of enzyme proteins. After incubation at 30 °C for 4 hrs, the reaction mixture was dried under vacuum. The products of prenyl pyrophosphate were hydrolyzed to corresponding alcohols with 2 units of potato acid phosphatase (Sigma) at 37 °C overnight. The liberated alcohols were extracted with hexane and analyzed by reverse-phase TLC using RP-18F254S plates (Merck) in a solvent system of acetone:water (9 : 1, v/v). The TLC plates were exposed on an image plate and analyzed with a BAS 1500 PhosphoImager (Fuji). The radioactive products were identified by comparing with authentic standards visualized with p-anisaldehyde spray reagent (Sigma).

Carotenoid production in *E. coli*

E. coli strain DH10B harboring the plasmid pACCAR25.crtE was generously provided by Dr. M. Kawamukai (Shimane University, Japan). The resulting phagemid (pBS-GGPS) from *in vivo* excision of the Uni-Zap library clone with sunflower GGPS cDNA insert was transformed into this *E. coli* DH10B/pACCAR25.crtE. The transformants were plated on LB agar medium containing 50 mg/L ampicillin, 30 µg/mL chloramphenicol and 1mmol/L IPTG for 3–4 days at 28°C.

Results and Discussion

Cloning and characterization of a cDNA encoding sunflower GGPS

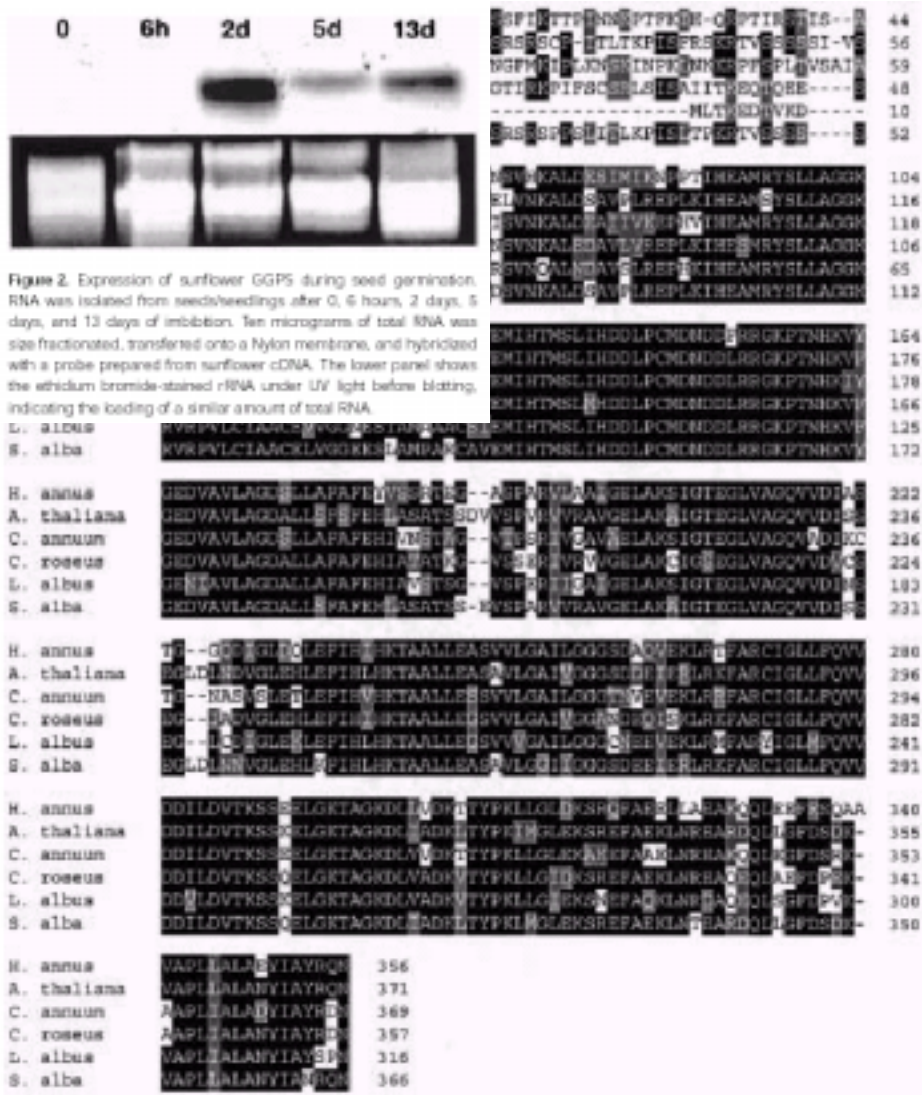
A PCR product (ca. 0.9 kb long) was obtained using a degenerate primer designed from an aspartate-rich domain in other plant GGPP synthases. This PCR-generated fragment showed high sequence similarity to the known GGPS sequences and was used to screen 5 × 10⁵ plaques of the same cDNA library used in the PCR. The cDNA inserts, in the range of 1.0–1.3 kb, from ten plaques hybridized to the probe were sequenced. It was found that none of the plaques had a cDNA insert with transcription start codon found in other GGPS sequences. The cDNA clone with 1.3-kb insert was selected for *in vivo* excision. The resulting phagemid (pHaGGPS) contained 1246-bp cDNA insert. This cDNA clone has an ORF lacking the first methionine. We therefore performed a 5′-RACE PCR reaction (Marathon cDNA amplification kit from CLONTECH Laboratory) using freshly isolated total RNA from 14-day old sunflower seedlings. The 5′-RACE reaction yielded an amplification product with 64 more bases, including the initiation codon. We designed 5′-primer based on the sequence obtained from the 5′-RACE. A full-length cDNA of sunflower GGPS was then obtained from PCR reaction using the 5′-primer and AP1 primer of the Marathon kit. The amplified product was cloned into pGEM.-T vector, sequenced using ALF automatic sequencer (Perkin Elmer Co.), and registered in Gen-Bank (accession no. AF020 041). Northern blot analysis showed that the cDNA insert in pHaGGPS hybridized to a mRNA

species of ca. 1.3kb as expected.

The sequence contained a 1071-bp ORF encoding a peptide of 356 amino acids with a predicted molecular mass of 38.7 kDa. The deduced protein is slightly acidic with an isoelectric point of 5.8, which is similar to that of the *C. annuum* GGPS (pI = 5.1) and the CRTE enzymes (pI between 5.2 and 6.6) (Kuntz et al. 1992). Transmembrane region analysis of the amino acid sequences using TMpred algorithm indicated two strong transmembrane helices, in-to-outside from 1 to 19 and out-to-inside from 242 to 262. A computer analysis by the PSORT program (K. Nakai, Osaka University, Japan) for protein sorting signals and localization sites suggests that sunflower GGPS might be localized in mitochondria. The predicted amino acid sequence of the sunflower GGPS has high similarity to those of *Arabidopsis thaliana* (63 %, accession no. AB000 835), *Capsicum annuum* (79%, accession no. X80267), *Lupinus albus* (69%, accession no. U15778), and *Sinapis alba* (75%, accession no. X98795). The alignment of several plant GGPP synthases shows that the N-terminal signal peptide region is highly diverse, while the regions implicated in enzyme activity show high identity (Fig. 1). This suggests that different GGPP synthases have their own characteristic signal peptide for targeting different intracellular locations. Plant GGPP synthases are known to be located in cytosol, mitochondria, and plastids (Kuntz et al. 1992, Zhu et al. 1997b).

Southern analysis

To determine the copy number of the GGPS gene, Southern blot hybridization analysis was performed using the coding region of GGPS as a hybridization probe. The genomic DNA was digested with *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hind*III. These enzymes do not have restriction sites inside the coding region of GGPS. Two hybridizing bands were observed from each restriction digest under high (65 °C) as well as low (55 °C) stringency conditions (data not shown). Six isoforms of GGPS have been reported from *Arabidopsis* (Zhu et al. 1997a, b). Although the identity varies (ranging from 25 to 79 %), they all share the domains with highly conserved sequences. However, Zhu et al. (1997 a) observed only a single hybridizing band in their *Arabidopsis* genomic Southern hybridization



probed with one of the six genes (GGPS6). When we used the same restriction enzymes, we detected two hybridizing bands in sunflower genomic DNA blot hybridization. Badillo et al. (1995) also reported multiple hybridizing bands from *C. annuum* genomic DNA blot hybridized with GGPS cDNA. At the same time, they showed that the GGPS gene is not

interrupted by intron in *C. annuum* plant. Taken together, our results suggest that two genes per haploid genome encode GGPP synthase and that there is no other closely related gene in sunflower.

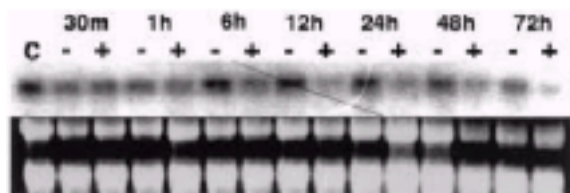


Figure 3. Effect of ASA on the accumulation of sunflower GGPS mRNA in young sunflower seedlings. The 5-day old seedling was placed in a test tube (25 mm in diameter) containing liquid MS medium supplemented with different levels of ASA as indicated in Material and Methods. After each time interval, seedlings with (+) or without (-) ASA treatment were frozen for mRNA analysis by Northern blotting and hybridization with radiolabelled probes prepared from sunflower GGPS cDNA. The lower panel shows the ethidium bromide-stained rRNA under UV light before blotting, indicating the loading of similar amount of total RNA.

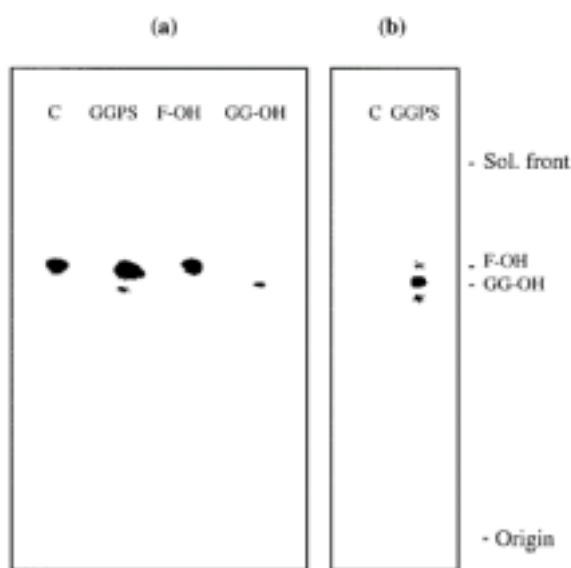


Figure 4. (a) TLC chromatogram and (b) autoradiography of reverse phase TLC of GGPS reaction products. The prenyl pyrophosphates produced *in vitro* by GGPS were hydrolyzed to corresponding alcohols by potato acid phosphatase and the liberated alcohols were analyzed by reverse-phase TLC. The positions of reaction products and authentic standards were visualized with p-anisaldehyde spray reagent, and the distribution of radioactivity was determined by Fuji BAS Phosphorimager. The extracts from cells expressing GGPS after IPTG induction produced GGPP; whereas the control extracts prepared from cells harboring the same GGPS expressing vector, but without IPTG induction, did not show detectable amounts of GGPP synthesis. F-OH, farnesol; GG-OH, geranylgeraniol; C, control; sol. front, solvent front.

Expression of sunflower GGPS gene

We investigated the expression of the GGPS gene during the developmental stages of germination. Total RNA was extracted and analyzed from the seeds with 0, 6 h, 2 d, 5 d, and 13 d of imbibition. No detectable signal was found in the blot after 6 hours of imbibition. However, one strongly hybridizing band was detected after two days of imbibition (Fig. 2). Differential expression of GGPS has been reported previously. The strong

expression of GGPS was observed in pepper fruit during the early ripening period (Kuntz et al. 1992) and the expression level decreased as the fruit became fully ripe (Hugueney et al. 1996). GGPS transcript was detected in white mustard seedlings which had been germinated and grown for three days in the dark (von Lintig et al. 1997). The transcript levels remained constant during de-etiolation in white light. Sunflower GGPS began to show its strong expression as early as 2 days after seed imbibition, suggesting that GGPS is involved in metabolic activities during germination. Geranylgeranyl diphosphate represents a key intermediate in the synthesis of photosynthetically relevant compounds, such as chloroplasts, carotenoids, quinones, and tocopherols. The exact nature of GGPS involvement during seed germination is not known. In order to assess the effect of abscisic acid on the transcript level of GGPS gene, we treated the plants with $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA. Analysis of the RNA extracted from the treated plants showed that the ABA treatment down-regulated the expression of sunflower GGPS (Fig. 3). This result suggests that the GGPS is not likely involved in any ABA-induced function. This is an unexpected result. Although Birkenmeier and Ryan (1998) showed that ABA is not a primary signal for defense gene activation, several observations have led to a hypothesis that ABA is a key component in the defense-signaling cascade (Wasternack and Parthier 1997), including wound-induced signaling (Pena-Cortes and Willmitzer 1995). GGPS was induced by mechanical injury in pepper fruits (Hugueney et al. 1996). In our experiments with five day-old seedlings, the addition of ABA ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) to the liquid MS medium down-regulated the expression of sunflower GGPS gene. The inhibitory effect increased as the time period increased. One possible explanation for this down-regulation is that the exogenously provided ABA may have played a role in feedback regulation of GGPS. GGPS is a key enzyme for the biosynthesis of carotenoids, an important precursor for ABA biosynthesis (Walton and Li 1995). However, we currently do not have any evidence to support this. Understanding the biological significance of this down-regulation by ABA requires further studies.

Heterologous expression and functional activity of sunflower GGPP synthase

In order to test the functional activity of the cDNA clone we isolated, we constructed a GST-GGPS fusion gene on the plasmid pGEX-GGPS. Overproduction of the fusion protein (ca. 64 kDa) upon IPTG induction was observed in lysates from *E. coli* cells harboring the expression vector (data not shown). Catalytic activity of the expressed GGPS was assayed by reverse-phase TLC. The prenyl pyrophosphates produced *in vitro* by the recombinant GGPS were hydrolyzed to corresponding alcohols by potato acid phosphatase, and the liberated alcohols were analyzed by reverse-phase TLC using RP-18F254S plates (Merck) in a solvent system of acetone:water (9 : 1, v/v). Figure 4 shows a thin layer chromatogram of the polyprenols visualized with p-anisaldehyde, and an autoradiogram of the [¹⁴C]-labeled reaction products. Conversion of IPP and FPP into GGPP was observed for the extracts from cells expressing GGPS after IPTG induction (Fig. 4). In contrast, extracts prepared from cells harboring the same GGPS expressing vector but without IPTG induction did not show detectable amounts of GGPP synthesis. Analysis of the reaction products by reverse-phase TLC verified that GGPP was the major product of the reaction, and confirmed that sunflower cDNA encodes the active GGPS. In addition to GGPP, small amounts of a farnesyl diphosphate and other higher prenyl pyrophosphates were also detected. This multiple product formation was also observed with *Arabidopsis* GGPS enzyme (Zhu et al. 1997a, b). A possible explanation for the radioactive FPP synthesis is that some of the radioactive IPP was converted to DMAPP by an *E. coli* IPP isomerase present in the crude extract. This DMAPP served as a substrate for the GGPS to make GGPP as observed by Ohnuma et al. (1996). The radioactive FPP in Figure 4 may be due to the incomplete conversion of the precursor to GGPP. Another possibility, although very small, is that GGPP is degraded to FPP during phosphatase treatment at 37 °C overnight. The activity of the sunflower GGPS gene was further confirmed by complementation with the chromosomal *crt* gene cluster of the carotenogenic bacteria *E. uredoovora*. The plasmid pACCAR25.crtE carries the *crt* gene cluster where the *crtE* is deleted. The *crtE* gene encodes for

the GGPP synthase (Math et al. 1992, Sandmann and Misawa 1992). *E. coli* cells harboring this plasmid do not produce carotenoids. When these cells were transformed with the plasmid (pBSGGPS) expressing functional sunflower GGPS, yellow carotenoids were accumulated in the transformed cells (data not shown). This result indicates that sunflower GGPS can substitute the *crtE* gene in the *E. uredovora* carotenogenic cluster. The amount of the yellow color from *E. coli* cells harboring pACCAR25.crtE and pBS-GGPS was comparable to that of *E. coli* harboring pCRTE. This result further confirms that the sunflower cDNA clone encodes a functional GGPP synthase. Plant GGPS genes have been reported from several plant species. However, only two *Arabidopsis* genes were proven to encode a functional GGPP synthase (Zhu et al. 1997a, b).

We showed that the sunflower GGPS gene is functional and can complement the bacterial GGPS gene in *E. coli*. This gene can therefore be used in any metabolic engineering efforts that aim to alter the level of plant metabolites downstream of GGPP synthesis. This pathway is essential to the biosynthesis of a wide variety of natural products in plants. Bioengineering for the production of such essential compounds in plant requires an understanding of the multiple pathway fluxes involved and specific manipulation of one or more enzyme activities to achieve the desired changes. Bioengineering plant metabolism has recently been reviewed (Dixon et al. 1996, 1998, McCaskill and Croteau 1997). Shintani and DellaPenna (1998) reported that the vitamin E content of plants can be elevated through overexpression of γ -tocopherol methyltransferase in *Arabidopsis* plant. Our results contribute to the understanding of terpenoid biosynthesis, and provide a platform for genetic engineering of crops for the production of essential natural products.

Acknowledgements. This work is supported in part by a grant (No. 297066 5) to K-H Han from the Agricultural Research Promotion Center, Korean Ministry of Agriculture, and by Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd. We thank Dr. Patrick Gulick at Concordia University in Canada for his help with degenerate primer design, and Dr. Mel Koelling at Michigan State University for his critical reading of the manuscript.

References

- Aitken SM, Attucci S, Ibrahim RK, Gulick PJ (1995) A cDNA encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase from white lupin. *Plant Physiol* 108: 837–838
- Badillo A, Steppuhn J, Deruere J, Camara B, Kuntz M (1995) Structure of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Capsicum annuum*. *Plant Mol Biol* 27: 425–428
- Birkenmeier GF, Ryan CA (1998) Wound signaling in tomato plants. Evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiol* 117: 687–693
- Bonk M, Hoffmann B, von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem* 247: 942–950
- Chappell J (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 521–547
- Dixon RA, Howles PA, Lamb C, He XZ, Reddy JT (1998) Prospects for the metabolic engineering of bioactive flavonoids and related phenylpropanoid compounds. *Adv Exp Med Biol* 439: 55–66
- Dixon RA, Lamb CJ, Masoud S, Sewalt VJ, Paiva NL (1996) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses a review. *Gene* 179: 61–71
- Frank HA, Cogdell RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol* 63: 257–264

Hugueney P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, A DH, Camara B (1996) Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol* 111: 619–626

Klaui H, Bauerfeind JC (1981) Carotenoids as food color. In: Bauerfeind JC (ed) *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, London, pp 47–317

Koike-Takeshita A, Koyama T, Obata S, Ogura K (1995) Molecular cloning and nucleotide sequences of the genes for two essential proteins constituting a novel enzyme system for heptaprenyl diphosphate synthesis. *J Biol Chem* 270: 18396–18400

Kuntz M, Romer S, Suire C, Hugueney P, Weil JH, Schantz R, Camara B (1992) Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J* 2: 25–34

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685

Marusich WL, Bauerfeind JC (1981) Oxycarotenoids in poultry feed. In: Bauerfeind JC (ed) *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, London, pp 319–462

Math SK, Hearst JE, Poulter CD (1992) The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6761–6764

Mayne ST (1996) Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J* 10: 690–701

McCaskill D, Croteau R (1997) Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 55: 107-146

Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6704-6712

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479

Oh SK, Kang HS, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han K-H (1999) Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein (SRPP) from *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem* 274: 17132-17138

Ohnuma S, Hirooka K, Hemmi H, Ishida C, Ohto C, Nishino T (1996) Conversion of product specificity of archeobacterial geranylgeranyldiphosphate synthase. *J Biol Chem* 271: 18831-18837

Pena-Cortes H, Willmitzer L (1995) The role of hormones in gene activation in response to wounding. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 395-414

Sandmann G, Misawa N (1992) New functional assignment of the carotenogenic genes *crtB* and *crtE* with constructs of these genes from *Erwinia* species. *FEMS Lett* 90: 253-258

Scolnik PA, Bartley GE (1994) Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for geranylgeranyl pyrophosphate synthase. *Plant Physiol* 104: 1469-1470

Shintani D, DellaPenna D (1998) Elevating the vitamin E content of plants

through metabolic engineering. *Science* 282: 2098–2100

von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* 12: 625–634

Walton DC, Li Y (1995) Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 140–157

Wasternack C, Parthier B (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* 2: 302–307

Zhu X, Suzuki K, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H (1997 a) Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol* 38: 357–361

Zhu XF, Suzuki K, Saito T, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M (1997b) Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol Biol* 35: 331–341

제 7 장 해바라기 재생 및 형질전환

제 1 절 해바라기 조직배양

해바라기는 재분화가 보고되어 있으나 재현성이 낮고, 품종간, 배양조건별, 시료간 변이가 심한 것으로 유명하다. 또한, 유전공학적 기법을 이용한 유전적 조작을 위해서는 효율적인 재분화체계가 필수적이다. 본 과제에서도 이와 같은 문제를 초반에 직면하여, 이들 문제를 극복하고 다양한 품종에 쉽게 적용될 수 있는 재분화 체계 개발에 주안 점을 두고 여러 가지 조건을 시험하여 효율적인 재분화체계의 개발에 성공하였다. 이 재분화 체계의 핵심적인 요인은 발아중인 종자에서 embryo meristem과 primordial leaf (미성숙 옆편)을 이용하는 것이며, 기타 중요한 조건은 기본배지, 발아 후 시료채취 시점과 식물생장조절물질의 종류와 농도 등 이었다 (Shin et al., manuscript in review). 이 재분화 방법을 수원 농업과학기술원 종자은행에서 분양받은 품매수분된 (open pollinated) 20개 품종에 적용한 결과 전체 품종으로부터 평균 70%의 재분화율을 보여서 이 재분화체계가 효율적임을 증명하였다 (표 1).

두가지 (Embryo meristem vs. primordial leaf) 시료간 차이는 Shoot 재분화율에서는 차이가 없으나, 시료당 재분화되는 Shoot의 숫자는 Embryo meristem에서 많았다 (표 2). 해바라기 재분화에 다른 중요한 요소는 Cytokinin 종류와 농도로서, 시험한 네가지 성장조절물질 (BAP, 2-iP, kinetin, Zeatin) 중 BAP가 2 uM 농도에서 가장 효과적이었다 (Data not included). 기본 배지로는 시험한 네가지 (Anderson, MS, WPM) 중 MS 배지가 가장 효과적이었다.

표 1. 본 과제에서 개발한 해바라기 재분화 방법을 이용하여 19개 한 재분화 시험결과. 표는 최소 25개의 샘플로 3반복 실험의 결과임.

Genotype (Acc. No.)	Hight (cm)	Seed yield / plant(g)	Percent explants producing shoot		Average number of shoots per explant	
			EM	PL	EM	PL
301001	156	110	79	72	8.2	3.7
301005	256	141	68	57	9.4	3.1
301016	263	165	64	66	7.4	3.5
301022	144	75	97	76	9.4	4.2
301028	202	115	67	68	12.0	6.2
301030	189	112	83	63	9.4	3.9
301031	188	75	70	83	9.5	8.7
301064	163	63	80	71	7.5	5.7
301065	160	50	61	83	6.7	5.0
301067	172	50	65	68	7.6	4.8
301068	156	95	35	71	6.2	5.9
301074	142	58	33	79	7.1	4.0
301079	215	119	73	64	9.8	4.0
301096	169	88	94	65	8.2	4.7
301116	183	125	75	60	6.7	4.8
301121	165	92	87	92	7.4	4.9
KS-21-1	n/a	n/a	57	68	7.5	3.0
Mean			70.7	71.1	8.28	4.82

표2. 해바라기에 있어서 공시 시료의 종류 (Embryo meristem vs. Primordial leaf)가 재분화에 미치는 영향. 아래표는 표1의 20 Genotype를 이용한 재분화체계 시험으로부터 공시재료별로 나누어 통계분석을 하였으며, 분석에는 각 Genotype 별 평균치를 사용하였음.

Explant type	% Shoot \pm SE	# Shoot \pm SE
Embryo meristem	70.3 \pm 3.9	8.29 \pm 0.33
Primordial leaf	70.3 \pm 2.9	4.59 \pm 0.33
P-value (LSD)	0.000	0.981

제 2 절 형질전환 최적조건 탐색

해바라기 형질전환을 위한 최적 조건을 찾기 위해 C58 pMP90 pKH200을 이용하여 Agrobacterium과 explants의 적정 접종 시간을 조사하였다. 2일 동안 발아한 해바라기 종자를 Agrobacterium 용액 상에서 옮겨 EM과 PL을 분리한 후 다양한 시간동안 배양하여 co-culture 배지로 옮겨 2일간 배양하였다. 이들 explants를 SSIM-I에 옮겨 3일간 배양한 후 GUS assay solution에 옮겨서 광학현미경 하에서 GUS activity를 측정하였다. 그 결과 표 5와 같이 EM과 PL 모두 1-5시간 정도의 접종시간이 필요한 것으로 나타났다.

적정 co-culture time을 조사하기 위해 각 explants를 1시간 동안 Agrobacterium 용액 속에서 접종한 후 co-culture 배지에 옮긴 후 다양한 시간 동안 co-culture 한 후 SSIM-I 배지에서 3일간 배양한 후 GUS assay를 실시하였다. 그 결과 3일간의 co-culture가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그러나 계속된 shoot regeneration에서 3일 이상의 co-culture는 이들 explants로부터의 shoot 유도를 억제하고 상당한 explants가 과도한 균의 성장에 의해 죽는 것으로 나타났다. 따라서, EM, PL등을 이용한 해바라기의 형질전환에 있어 2일 정도의 co-culture 시간이 적당한 것으로 나타났다 (표 6).

표 3. Gus stain from sunflower explants inoculated on agrobacterium suspension during different inoculation time

Time	EM			PL		
	Total explants	GUS staining explants	Total GUS spot	Total explants	GUS staining explants	Total GUS spot
0 hr	50	24	122	72	6	34
1 hr	57	36	341	60	34	202
3 hr	54	36	306	72	44	358
5 hr	51	33	117	32	32	198
7 hr	51	27	111	80	26	172
12 hr	51	0	0	78	0	0

표 4. Gus stain from sunflower explants co-cultured with agrobacterium during different times

Time	EM			PL		
	Total explants	GUS staining explants	Total GUS spot	Total explants	GUS staining explants	Total GUS spot
0 day	30	6	6	30	6	6
1 day	30	0	0	30	0	0
2 day	30	18	60	30	3	3
3 day	30	24	147	30	15	27
5 day	30	20	76	30	9	21

해바라기의 형질전환의 효율을 증가시키기 위해 explant에 다양한 wound를 처리한 후 agrobacterium 용액을 접종하였다. Needle wound를 위하여 2일간 발아한 종자를 agrobacterium 용액 상에서 EM과 PL을 분리한 뒤

26GX1/2 needle을 이용하여 광학현미경 하에서 상처를 주었다. 그 후 1시간 동안 배양 후 co-culture 배지로 옮겼다. 또한 sea sand와 glass bead wounding을 위해 분리된 explants를 10ml의 배양관 으로 옮긴 후 450-600uM 의 glass bead와 50-70 mesh의 sea sand를 첨가하고 300uL의 agrobacterium을 첨가하였다. 2분 간 강하게 교반한 후 1mL의 agrobacterium을 첨가한 후 1시간 동안 배양하여 co-culture 배지로 옮겼다. Bombardment wounding을 위해 explants를 MS liquid 배지에서 분리한 뒤 SCCM 배지의 2.5cm circle 안으로 옮겼다. 0.6um tungsten particle을 이용하여 28inHg, 6cm 거리에서 bombardment wounding을 주었다. 이들 explants를 agrobacterium 용액으로 옮긴 후 1시간 동안 배양한 뒤 co-culture 배지로 옮겼다. GUS activity를 측정된 결과 모든 wounding이 대조구에 비해 높은 형질전환 효율을 보였고 특히 glass bead와 bombard wounding이 높은 효과를 보였다 (표 7). 그러나 계속된 실험에서 bombardment에 의한 강한 wounding은 explants의 shoot 형성을 억제하였으며 특히 과도한 균의 성장에 의해 고사하는 explant가 많았다.

표 5. Gus stain from sunflower explants infected to the agrobacterium with different wound treatment such as needle, sea sand, glass bead and bombard.

	EM			PL		
	Total explants	GUS staining explants	Total GUS spot	Total explants	GUS staining explants	Total GUS spot
Control 1	39	26	149	42	3	10
Needle	27	21	141	27	17	169
Sea sand	28	28	307	33	17	264
Glass bead	25	24	258	34	29	397
Bombard	35	22	286	37	32	541
Control 2	26	22	275	34	15	134

위의 조건 외에 균의 적정 접종농도, co-culture 배지, agrobacterium induction time, 해바라기 종자의 aging, explants type등 여러 조건들을 조사하였으나 이들은 해바라기의 형질전환에 있어 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 explants의 pre-culture를 조사한 결과 GUS activity의 증가 및 형질전

환 효율이 크게 증가하였으나 shoot regeneration이 억제되고 explants의 callus화 및 vitrification이 크게 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이들 explants를 이용한 pre-culture를 통한 형질전환은 어려움이 있을 것으로 밝혀졌다. 위의 결과를 토대로 볼 때 EM과 PL을 이용한 형질전환은 균은 Induction media에서 1시간 정도 균의 virulence를 유도한 뒤 OD600=0.5-1.0 정도로 접종 농도를 조절하는 것이 좋다. 또한 해바라기 종자는 2일간 기내에서 발아시킨 것이 적당하며 그 이상 발아된 종자는 PL의 경우 재분화 능력을 상실하는 것으로 나타났다. 또한 해바라기의 다양한 부분을 이용하여 형질전환을 시도하였으나 해바라기의 재분화 능력이 apical meristem 부분으로 국한되어 있어 leaf, stem, root, petiole, hypocotyl 등에서는 재분화가 전혀 이루어지지 않았다. 또한 EM, PL 그리고 cotyledon의 경우 co-culture 동안 갈변되어 형질전환이 억제되고 explants가 죽고 균의 성장이 억제되는 문제가 발생하지만 이것은 co-culture의 경우 낮은 농도의 agar를 사용하여 explants 절단 부분을 적당히 피복 함으로써 극복되었다. 위의 결과를 바탕으로 pH 200을 이용하여 해바라기의 형질전환 실험을 실시하였을 경우 glass bead를 통한 wounding의 경우 약 3% 정도의 형질전환 효율을 보였다 (표 8). 그러나 해바라기의 life time에 비해 기내의 선발 기간이 길어 In-vitro flowering이 많이 나타나며 온실로 전환하였을 경우에도 빠른 flowering에 의해 완전한 성장을 못하고 화판이 작아 형질전환체의 종사 생성이 되지 않았다. 이상의 확립된 형질전환 방법을 토대로 Hevea 고무나무에서 분리한 SRPP 및 REF 등 고무 생합성에 관계된 유전자를 pBI121 binary vector에 결합한 후 Agrobacterium GV3101 균주를 이용하여 형질전환을 실시하였다 (표 8). 3차 kanamycin selection과 rooting 과정을 거쳐 선발된 식물체를 온실로 옮겨 성장시킨 후 해당 유전자의 발현을 specific primer를 이용한 PCR 방법으로 조사하였으나, SRPP와 REF가 형질전환된 해바라기를 얻지 못하였다.

따라서 현재 이와 같은 문제를 극복하기 위해 지금까지 시도한 모든 조건을 최적화하고 High virulence 능력을 가진 균주를 이용한 형질전환 방법과 빠른 선발을 위한 높은 농도의 항생물질 선발을 시도하고 있다. 또한 종자 발아를 통하지 않고 직접 seed embryo를 분리하여 형질전환에 이용할 수 있는 방법을 찾고 있다. 그 외 embryonic axes (EA)을 이용한 direct bud transformation의 가능성을 조사하고 있다. 또한 최근에 sonication을 이용한 형질전환 방법 (SAAT)이 새로이 개발되었는데 이를 이용한 해바라기의 형질전환 방법을 연구하고 있다.

표 6. Sunflower transformation of SRPP and REF by using EM, PL and cotyledon

Explants	pKH200			SRPP			REF		
	EM	PL	Cot	EM	PL	Cot	EM	PL	Cot
Total explants	534	619	419	402	521	466	433	532	454
Second selected shoot	127	38	45	55	59	51	65	31	66
Final selected shoot	6	4	3	3	1	2	2	2	3

제 3 절 형질전환체 선발 및 분석

1) Hypocotyl의 meristem을 이용한 해바라기의 형질전환

해바라기의 효과적인 형질전환 체계를 확립하기 위하여 과제 시작 단계부터 지속적인 노력을 기울였으며 최근 기존의 방법보다 빠르고 효율적인 형질전환 방법을 개발하여 그 효율을 극대화하는 연구를 진행하였다. 이 방법의 특징은 embryo meristem를 가지고 있는 hypocotyl을 이용하여 shoot가 바로 hypocotyl에서 올라오도록 함으로서 callus를 거치지 않게 하는 것이다. 해바라기의 형질전환을 매우 어렵게 하는 것은 callus에서 식물체 재생 (regeneration)이 원활하지 못하기 때문인데, 본 방법을 도입함으로써 callus에서 shoot로의 재생 과정이 생략됨으로서 가장 큰 어려움을 피하면서 또한 시간상 절약을 가져 올 수 있었다.

Hypocotyl의 embryo meristem 부분을 bombardment로 상처를 주거나 따로 분리한 embryo meristem은 glass beads로 상처를 주었다. Wound와 병행하여 vacuum이나 sonication을 첨가하여 형질전환의 향상을 도모하였으며, 10 가지의 다른 방법을 시도한 결과 다음의 결론을 얻었다. Bombardment에 vacuum

이나 sonication을 부가하여도 부가하지 않은 것과 큰 차이가 없었다. Bombardment로 상처를 주고 Agrobacterium 배지에 2 시간동안 incubation 하는 것이 효율이 좋았으며 형질전환 효율을 높이기 위해 식물체를 cutting한 후 Agrobacterium 배양액에 곧 바로 옮겼다. Gus-staining 하여 본 결과 예상과는 달리 shoots 에서는 Gus 발현이 거의 되지 않았고 오히려 아랫부분 hypocotyl의 callus에서 positive gus-staining이 보였다. Shoots가 나오는 hypocotyl의 위 부분이 아니라 callus가 형성되는 hypocotyl 아랫부분에서 Gus-staining이 많이 되는 것을 이용하여 다음과 같은 새로운 방법을 자체 개발하였다.

먼저 해바라기 종자로부터 seed coat를 제거한 후 70% EtOH 와 20% Chlorax로 표면살균을 실시하였다. 표면 살균된 종자를 GM배지(0.8% agar)로 옮긴 후 26°C, 16/8시간 광 조건에서 2일 동안 발아 시켰다. 해바라기에 유전자 형질전환을 위해 REF와 SRPP 유전자를 35S promoter와 NPT II 유전자를 가진 pBI121 plasmid 또는 pCAMBIA와 결합한 후 Agrobacterium tumefaciens C58 GV3101 strain에 옮겼다. 이들 세균을 50mg/l Gentamycin, 50mg/l Kanamycin, 50mg/l Rifampicin이 첨가된 YPD 액체배지로 옮겨 25°C, 140 rpm 조건에서 하루 배양하였다. 배양된 세균은 3000 x g에서 원심 분리하여 pellets를 모은 후, Induction Media (MS basal salts, 100µM acetosyringone, 10mM galactose, 10mM glucose, 50mM MES)에 OD600 =1로 재 현탁 하여 같은 배양조건에서 1시간 배양하였다.

Agrobacterium 용액 속에서 해바라기 종자로부터 embryo meristem (EM) 이 붙어있는 hypocotyl를 acetosyringone이 함유된 MS media에 1시간 동안 치상하였다. 곧바로 agrobacterium 배지용액에 2시간동안 천천히 shaking시켜 주면서 incubation 하였다. 이들 explants를 치상하여 SCCM (1/5MS, 2µM BA, 100µM acetosyringone)로 옮겨서 25°C에서 co-culture 하였다. 그 후 explants를 SSIM-I (MS, 2µM BA, 250mg/l cefotaxim) 배지로 옮겨 26°C, 16/8시간 광조건 하에서 7-14일간 배양하여 Gus-staining함으로서 형질전환된 shoots를 1차 선발하였다. 1차 선발에서 hypocotyl의 아랫부분의 callus에서 보다 윗부분의 shoot에서 높은 형질전환율을 보였다. 지금까지 이 방법을 이용하여 표 3과 같은 결과를 얻었다. 그림 5는 이상의 새로운 방법을 이용하여 형질전환된 해바라기의 GUS 염색 결과를 나타내며, 본 연구팀에서 새로 개발한 형질전환 기술은 shoot에서 형질전환 되는 것으로 callus의 재생단계를 거치지 않아도 되기 때문에 매우 효율적인 방법으로 그동안 어려움을 겪어 왔던 해바라기 형질전환을 극복하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

표 7. Agrobacterium GV3101과 pBI121, pCAMBIA를 이용한 형질전환 효율

Vector	Pre-incubation	Gus-stained number / Total sample number	
		Callus	Shoot
pBI121	Acetosyringone	76/103	15/28
	Casaminoacid	25/55	0/3
pCAMBIA1301	Acetosyringone	92/131	28/51
	Casaminoacid	27/115	27/115

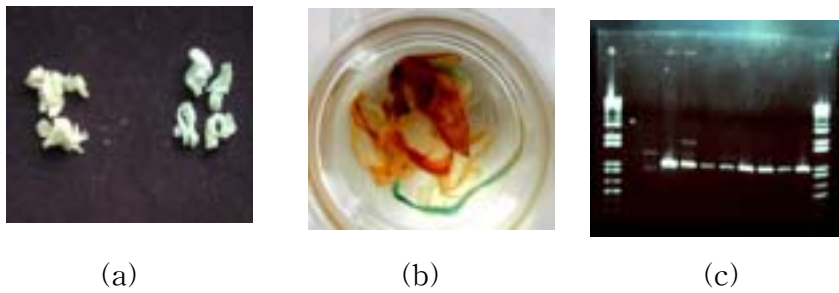


그림 1. 해바라기의 형질전환과 검정. (a)과 (b)는 형질전환된 해바라기 새싹과 seedlings를 gus-staining한 것이고, (c)는 선별된 형질전환 해바라기를 GUS-specific primer를 이용한 PCR방법으로 확인한 것이다.

2) Hypocotyl를 이용한 형질전환의 단점과 보완

Hypocotyl을 사용하여 형질전환하였을 때 한가지 단점은 Hypocotyl에서 뿌리의 생장이 잘 되지 않는 것이다. 여러 가지 식물뿌리 촉진 호르몬을 처리하여 시도하여 보았으나 해결하기가 어려웠다. 본 연구에서는 형질전환 처리하기 전 뿌리부분을 잘라내지 아니함으로써 이러한 문제점을 해결할 수 있었다.

이러한 문제해결로 인하여 선별된 형질전환된 식물체를 빠른 시간 내에 soil pot 으로 이식할 수 있었고 성공적으로 성숙한 식물체로 키웠으며 이들 형질전환체의 T₂ 세대 씨앗을 수확하였다.

이와 함께 효과적인 형질전환체 선별 시스템도 매우 중요한 과정이다. 형질전환 처리 후 Hypocotyl에서 새로운 shoot들이 나올 때 antibiotic을 함유한 배지에 옮겨 키운 뒤 형질전환된 식물체만 배지에서 성장하기 때문에 선택적 선발을 할 수 있다. 본 실험결과 해바라기의 경우 kanamycin이 좋지 않은 선별 antibiotic으로 확인되어 현재 여러 다른 transformation vectors사용에 따른 각각 특이한 antibiotics의 최적 처리 조건을 잡고 있다.

3) 고무생합성에 관련한 유전자들의 형질전환

이와 같은 GUS 유전자를 이용한 실험결과를 바탕으로 GV3101 Agrobacterium을 이용하여 GUS와 고무유전자 (GHS) 모두 들어있는 pCAMBIA vector를 도입하였다. 새로운 shoot가 hypocotyl의 meristem에서 유도되면 soil pots로 옮겨서 자라게 하였다 (그림). 60여개의 shoots 중에서 7개의 shoots가 GUS-specific primers와 GHS-specific primers로 PCR 반응하였을 때 positive band를 보였다 (그림). 이들 T₁ 세대의 씨앗을 파종하여 얻은 T₂ 세대의 씨앗을 받아 같은 방법으로 PCR을 하였을 때 그중 하나만 약한 positive band를 보였다. 이러한 결과에 비추어 우리가 얻은 형질전환체가 세대에 걸쳐 안정적인 형질전환을 이루지 못한 것으로 생각되며, 현재 고무생합성 유전자를 이식한 형질전환 해바라기를 계속 확보하고 있으며 세대간 유전자의 안정적인 발현을 위한 효과적인 방안이 필요하다.



그림 2. GUS와 GHS 유전자를 이식한 형질전환 해바라기를 soil pot로 옮겨 T1 세대에서의 유전자 발현을 GUS-specific primers (가운데)와 GHS-specific primers (오른쪽)를 이용한 PCR을 통하여 확인하였다.

HMGCoA reductase 유전자를 이용하여 해바라기를 형질전환할 계획이다. 유전자 조작에 의한 HMGCoA 환원효소의 활성증가는 형질전환된 담배 식물체내에서 전체 sterols 함량을 최고 6배까지 증가시킨 보고가 있으므로 (Schaller *et al.*, 1995), 해바라기에서 이 효소의 활성증가는 고무생합성에 필요한 substrate 농도의 증가로 이어지는 것을 확인하였으므로 이 유전자를 이용하여 해바라기에 형질전환하고 있다. 한편 Hevea 고무나무에서 분리한 cis-prenyltransferase는 고무생합성에 직,간접적으로 영향을 줄 것으로 예상되므로 이 유전자를 또한 해바라기에 형질전환하고 있다.

3) 국제협력연구를 통한 해바라기의 형질전환 시스템 확립

해바라기의 형질전환체 조기 확보와 기술개발체계 확립을 위하여 국제협력체계를 구축하였다. 러시아 모스크바 Russian Academy of Science의 Alex Gaponenko 교수팀과 해바라기의 형질전환체를 공동으로 개발하기로 하였다.

제 8 장: 고무나무의 생리환경적 요인 및 재배기술

제 1절 : 서 언

천연고무는 약 2,000여종의 식물체내에서 생합성되며, 약 $1\mu\text{m}$ 크기의 rubber particle로 불리는 subcellular organelle에서 합성, 축적되는 cis-1,4-polyisoprene 화합물이며 현재 상업용 고무는 유일하게 열대 고무나무 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)에서만 생산되고 있다. 그러나 최근 천연고무 상품에서 비롯된 latex 알레르기가 퍼져 무독성 고무의 생산이 요구된다 (Cornish and Siler, 1996). 천연고무를 생산하는 고무나무의 대체작물로서 가능성이 있는 식물로서 guayule (*Parthenium argentatum*)에 대한 연구가 상당히 이루어져 있다. 1947년에 Benedict et al.은 수분 stress가 guayule에서 고무의 생합성을 촉진하였다고 보고한 바 있으며, 그 후에는 Macrae et al. (1986)도 광도 및 온도가 고무의 생합성에 영향 한다고 보고하였으며, 또한 고무의 생합성에 관련하여 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase와 rubber transferase activity가 온도가 낮아지는 가을과 겨울에 현저하게 증가한다는 점도 보고되었다(Ji et al., 1993). 또한 Norton et al. (1991)은 guayule를 조직 배양하여 callus를 대상으로 광조건과 저온조건을 부여한 바 식물체가 고무를 합성하는 배경을 환경적인 stress에 적응하기 위한 수단으로 식물이 고무를 생합성하고 있다는 점을 암시하고 있다. 하지만 guayule 역시 미국에서 자라는 식물로 우리나라에서 이용되기는 어렵기 때문에 본 실험에서는 우리나라의 남부지방에서 쉽게 재배될 수 있는 무화과를 선택하였다.

무화과(*Ficus carica*)는 아열대성의 반교목성 낙엽 과수로 재배가 쉽고 병해충 피해가 적으며 연평균 기온이 15°C 이고 겨울 온도가 -9°C 이상인 지역에서 재배가 가능하다. 우리나라에서는 경남, 전남의 남해안 지역과 제주도에 경계재배가 가능하고 경북 및 전북 일부 지역에서도 재배가 되고 있다. 본 실험에서는 무화과 수액을 일정 간격으로 영암 과수원 및 농과대학 포장에 정식한 무화과로부터 채취하여 무기성분 및 고무함량의 변화를 시기별로 분석하였다. 또한 무화과나무와 같은 속인 *Ficus benghalensis*(벵갈고무나무)의 고무 생합성에 관해서도 연구를 수행하였다.

제 2절 : 무화과 수액의 고무함량 및 무기성분

1) 계절에 따른 무화과 수액내의 고무함량 변화 및 품종간의 비교

전남대학교 농과대학에 조성한 무화과 과수원에서 최소한 월별로 1회 무화과 수액을 채취하여 고무함량의 변화를 조사하였다. 수액은 과실과 엽에서 얻을 수 있는 수액을 구분하여 고무함량을 측정하였다. 본 실험은 영암에 있는 무화과 과수원과 전남대학교에 조성한 무화과의 수액, 완도시험장에서 공시한 품종을 분석하였으며 엽과 과실을 구분하여 시료를 채취하여 분석하였다. 그림 1은 1년 간에 걸쳐 무화과 엽과 과실의 수액내 고무의 함량을 나타낸 것으로서 전체적으로는 과실이 엽 부분보다 높은 함량을 보이고 있다.

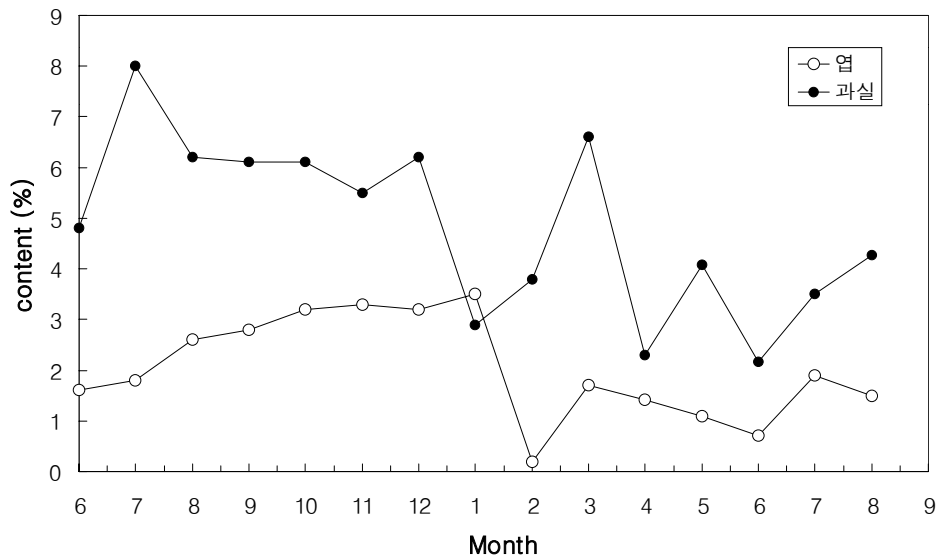


그림1. 계절에 따른 고무함량의 변화

과실의 경우 1월부터 그 함량이 줄어들어 2월까지 낮은 함량을 보이고 있지만 엽의 경우에는 과실보다 1달 늦은 양상을 보이고 있다. 이는 고무의 생합성에 영향하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase와 rubber transferase activity가 온도가 낮아지는 가을과 겨울에 현저하게 증가한다는

보고와 반하는 내용으로 나타났다. 이 결과와 함께 저온에 따른 고무함량에 대한 실험결과에서 처리와 대조구의 차이를 보지 못한 것에도 주목할 필요가 있다. 아직은 명확하지 않지만 환경에 따른 고무함량의 변화는 있는 것으로 보이며 적정조건을 밝히기에는 많은 실험들이 진행되어야 할 것으로 보인다. 또한 완도에서 공시한 4 품종에 관하여 고무함량을 측정된 결과 주목할 만한 결과를 발견하였다(그림 2). 현재 포장 내에 정식되어 있는 봉래시와 비교하여 브룬스윅에는 전체적인 함량이 높았으며 브라운 터키에는 고무의 함량이 과실보다는 오히려 엽에서 높은 것으로 나타났다.

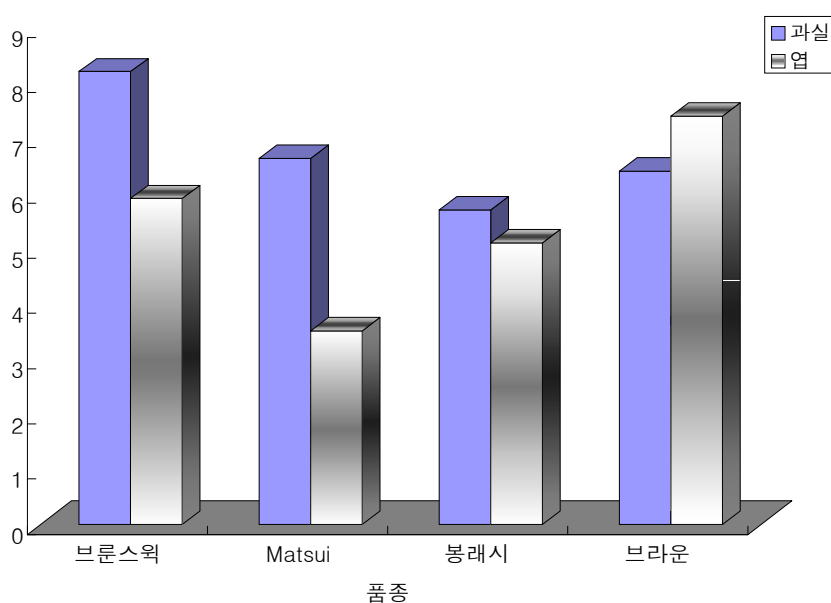


그림 2. 무화과 품종별 고무함량의 차이

2) 무화과 수액내의 무기성분과 당함량의 분석

무화과 수액의 무기성분은 유도결합 플라즈마 원자발광분광기로 3개월마다 분석하였다. 본 실험에서는 각 품종간 무기함량을 비교함으로써 고무함량과 무기함량의 함수관계를 밝히는 데 목적이 있으며 본 실험에서는 완도에서 채취한 4 가지 품종의 수액을 유도결합 플라즈마 원자 발광분광기로 양

이온을 중심으로 분석하였다(표 1). 표1에서 보는 바와 마찬가지로 가리를 제외하고는 무화과 엽과 과실 수액내의 무기성분 함량은 큰 차이가 없었다. 고무나무 (*Hevea*)와 비교하면 Ca와 Mg이 현저히 높은 것이 특징이다. 또한 미량 원소인 Mn과 Zn은 무화과에서 현저히 낮았다.

<표. 1 품종별 무기이온의 함량 (ppm)>

품종	이온	Ca	K	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
		브룬스 워	과실	115.8	2,589.3	0.150	0.800	2,770.6
	엽	137.4	1022	0.185	0.970	3813.0	0.090	0.63
Matsui	과실	82.3	2,334.1	0.170	0.550	2,839.1	0.110	1.44
	엽	128	350.2	0.415	0.935	3584.0	0.125	0.61
봉래시	과실	86.7	1,436.8	0.150	0.710	3,155.8	0.020	0.90
	엽	128	350.2	0.145	0.935	3584.0	0.125	0.61
브라운	과실	75.8	1,967.1	0.200	0.940	2,823.6	0.060	0.56
	엽	116.2	370.0	2.600	1.005	3898.0	0.085	0.60
Hevea		8.92	816.5	0.27	0.27	587	7.45	13.75

전남대학교 농과대학 구내의 plastic house에 재식되어 있는 무화과에서 3개월 간격으로 수액을 채취하여 무기함량을 분석하였다(표 2).

표 2. 계절별 무기이온의 함량 (ppm)

		Ca	K	Cu	Fe	Mg	Mn
엽	1/8	216.05	1,580.2	-	-	4,760	-
	4/13	100.45	496.4	0.66	1.17	3,367	0.19
	7/22	-	387.9	0.855	2.865	4379.33	0.235
과실	1/8	41.2	494.6	0.235	0.36	3,803	-
	4/13	128.40	937.39	0.69	0.91	3,554	0.21
	7/22	-	2864.17	0.695	1.36	2509.5	0.19

전체적으로 Mg이 가장 높은 농도로, 그리고 K도 다른 무기원소에 비하여 훨씬 많은 양으로 존재하였다. Ca도 비교적 높은 함량으로 분석되고 있으나 온

도가 높은 여름에는 전혀 검출이 되지 않았다. 엽 수액의 K 농도는 온도가 높아질수록 낮아지나, 과실 수액에서는 반대로 점차로 높아지는 경향이였다. 미량원소인 Cu, Fe 및 Mn에서는 특별한 경향을 나타내지는 않았다. 말레이시아에서 생산되는 고무나무의 수액과 비교하면 무화과에서 Ca과 Mg이 현저하게 높은 것이 발견되지만, 고온기에 Ca가 전혀 검출되지 않는 점과 유사한 면이 있다. 일반적으로는 Ca를 제외하고는 각종의 무기성분은 phloem내의 함량이 xylem내의 함량보다 훨씬 높다. Sap 내의 변이의 폭으로 보아 Ca영양에 대한 보다 면밀한 분석이 필요할 것으로 사료된다. 당분석은 수액을 2 μ m membrane filter에 통과시킨 후 아래와 같은 조건하에서 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 분석하였다. 당의 분석은 1당 2g 정도로 낮은 양으로 존재하는 것으로 보이며 계절에 따라 크게 변화하지 않았다.

3) 건조스트레스가 무화과의 고무함량에 미치는 영향

토양내의 수분함량 변이에 따른 무화과 과실내의 고무함량변화를 규명하고자 20 l의 포트에 무화과를 정식하고 수분공급을 pF=2.0이상이 되도록 관수를 제한하였다. Porometer를 이용하여 기공저항을 측정하였고, infrared thermometer로 엽온을 측정하여 대기온도와의 차이를 구하였다. 또한 관수 제한 후 7일째(pF=2.5)되는 시점에서 무화과의 과실을 채취하여 고무함량을 분석하였다.

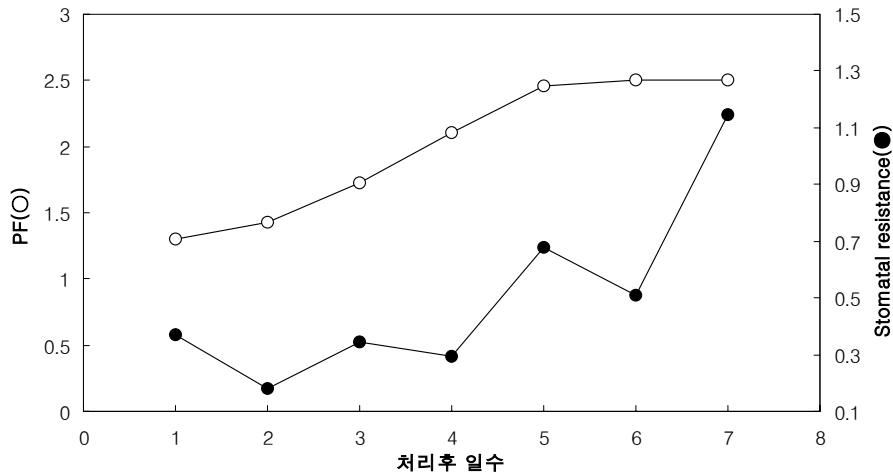


그림 3. 수분제한에 따른 토양수분과 기공저항의 변화

토양에 관수를 해야할 시점은 pF=2.2로써 관수를 제한해서부터 4일째에 pF=2.0이상이 되었다. 그러나 기공저항은 극단적으로 건조해진 관수제한 7일째를 제외하고는 특별히 변화를 보이지 않았다. 일반적으로 목본성 식물은 초본성 식물에 비하여 기공의 개폐의 변화가 심하지 않으며 무화과도 이러한 범주에 속하는 것으로 판단된다. 엽온의 변화도 관수를 제한하지 않은 경우와 대동소이한 점으로 보아 초본성 식물과는 차이가 있는 것으로 보인다. 관수를 제한한 건조처리 7일 후의 고무함량은 약 5%내외로써, 대조구인 3%정도보다 다소 증가하였으나 착과하여 있는 가지를 절단하여 극단적인 건조상태가 유도된 경우에는 대략 8~10%까지 고무함량을 증가시킬 수 있었다.

4) 무화과 줄기의 해부학적인 특징과 고무의 분포

무화과 줄기의 해부학적인 특징과 고무의 분포를 광학현미경과 전자현미경(SEM)으로 조사하였다. 무화과 줄기의 관찰용 시료 제작은 무화과의 줄기로부터 5 x 5 x 5mm 크기의 목편을 제작한 다음, 4% gluteraldehyde + 1% paraformaldehyde (in 0.1 M cacodylate buffer)로 실온에서 4시간 고정시켰다. 이어서 alcohol 계열로 순차 탈수 시킨 뒤 critical point drying을 실시하였다. Ion sputter를 사용하여 시료의 표면을 gold coating한 후, 주사형 전자현미경(Hitachi S-2400)을 사용하여 가속전압 15 μ V에서 관찰하였다.

광학현미경 관찰용 시료제작은 무화과의 줄기로부터 5 x 5 x 5mm 크기의 목편을 4% gluteraldehyde + 1% paraformaldehyde (in 0.1 M cacodylate)로 4시간 고정 후 alcohol로 탈수한 후 paraffin에 포매시켰다. Sliding microtome을 사용하여 10~20 μ m의 절편을 제작, xylol로 paraffin을 제거한 후 lugol solution으로 염색하였다. Alcohol 계열로 탈수시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

무화과 줄기의 해부학적 특성을 관찰하기 위하여 광학현미경을 사용하여 관찰한 결과는 그림 4에 나타난 바와 같다. 1년생 무화과나무는 형성층(cambium)을 중심으로 그 윗부분에는 사부(phloem)와 수피가 위치하고 있으며 형성층 아랫쪽으로는 목부(xylem)가 형성되어 있다. 목부는 2차 목부와 1차 목부로 나누어지며 1년생이므로 여타의 목본식물에 비하여 1차 목부가 잘 발달되어 있다. 해부학적으로 무화과 도관의 분포도는 산공재에 속하며(그림 5) 축방향 유조직은 도관을 에워싸고 있는 주위상, 익상, 연합익상 및 대상의 모습을 나타내고 있다(그림 6) 방사조직은 1~5열로 이루어져 있으며 lugal 용

액으로 염색한 결과, 무화과나무의 고무는 축방향 유세포와 방사유세포에 집중적으로 분포하였다(그림 7). 반면 목섬유와 도관세포에는 전혀 존재하지 않았다.

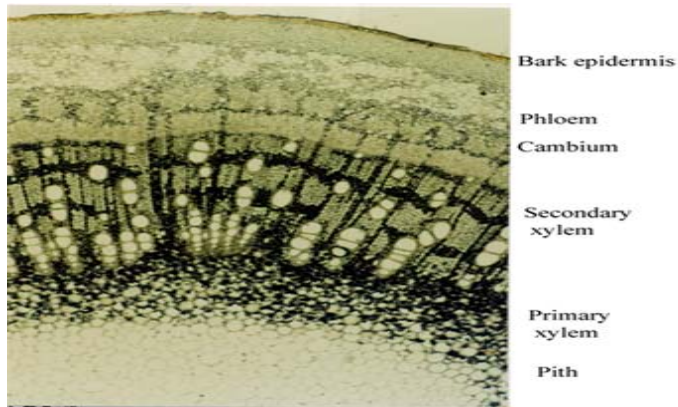


그림 4. 무화과 줄기의 횡단면

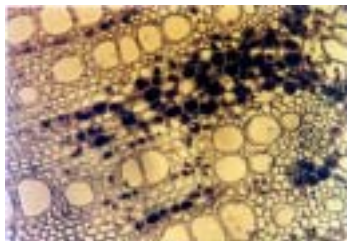


그림 5. 무화과 줄기의 고무 분포도

그림 6. 2년생 무화과 줄기의 횡단면

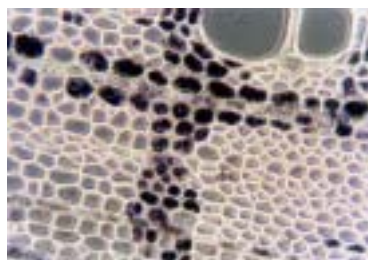


그림 7. 2년생 무화과 줄기의 고무분포

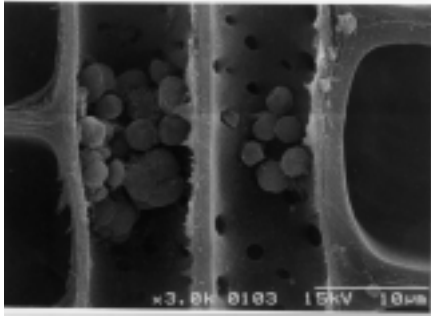


그림 8. 무화과 줄기내의 고무입자



그림 9. 무화과 줄기내의 고무입자

고무나무(*Hevea brasiliensis*)에서는 고무 입자가 latex와 2차 대사산물을 합성하는 latex vessel에 국한되어 있지만 guayule (*Parthenium argentatum*)에서는 보통의 유세포(parenchyma cell)에 축적된다. 즉 나무의 종류에 따라 고무가 생성되는 위치가 상이하다. 무화과도 guayule와 비슷하게 대부분의 고무 입자 (검정색으로 염색된 부분)는 유세포에 분포하고 있으며 고무나무와 같이 특수하게 분화된 세포는 존재하지 않았다(그림 8). 전자현미경 관찰결과 무화과의 고무 particle의 크기는 대체로 2~3 μ m의 크기였으나, 5 μ m 크기의 particle도 아울러 관찰되었으며, 이 5 μ m 크기의 particle은 3~4개의 particle이 함께 모아진 상태로 존재하므로써 rubber particle이 거대 분자화됨을 시사하였다. 이와 같은 현상은 그림 9에 확연히 나타나 있는데, 여기에서는 0.5 μ m 크기의 작은 particle들이 관찰됨으로써 rubber particle이 거대 분자화되는 것을 보여주었다. 흥미롭게도 rubber particle의 직경이 작은 것은 모두 구형(球形)이었으나, 크기가 큰 거대 particle은 구형이 아닌 형태를 보여주었다.

제 3절: 무화과와 벵갈고무나무의 고무함량에 미치는 환경 요인

고무를 생산하는 식물의 종류는 많이 알려져 있으나 기본적인 mechanism은 아직도 불분명한 점이 많다. 특히 환경 요인이 식물의 고무생산에 미치는 영향에 대해서는 상반된 연구 결과를 볼 수 있다. 일반적으로 수분

혹은 저온 스트레스와 같은 환경 조건에 식물이 노출되면 고무의 생합성이 높아지며 rubber transferase activity도 증가한다고 보고되어 있다. 그러나 고무 수량이 높은 지역의 기후 특징을 보면 충분한 양의 비가 자주 오며 온도의 변이가 적고 습도가 높다고 한다. 고무생산을 좌우하는 조건으로는 latex flow 양과 latex내의 고무함량일 것이다. 최근의 보고에 의하면 *Hevea brasiliensis*의 latex 양을 조사한 결과, 고무나무의 1주당 19.8~90.5g으로서 변이가 아주 심하다고 지적하였다. 또한 latex의 수집 전 1일, 7일 및 30일간의 최고 온도가 이러한 변이의 32, 42 및 63%를 설명할 수 있다고 하였다.

본 연구에서는 무화과나무와 벵갈 고무나무의 latex를 주기적으로 채취하여 고무함량을 분석하였고 또한 latex내의 각종 무기성분함량을 inductively coupled plasma spectrophotometer로 분석하였다. 초기의 실험 결과에 의하면 단기적인 스트레스 처리에 의한 고무 함량의 변화는 기대하기 어려워서 장기적으로 고무함량을 분석하였다 또한 포트에서 생육시킨 무화과나무를 저온 처리하여 고무 함량을 분석하였다. 전남대학교 농과대학 포장에 재식되어 있는 무화과나무와 벵갈고무나무의 latex를 1주일 간격으로 채취하여 분석한 결과를 그림 1에 나타냈다.

2001년도 6월부터 8월말까지의 분석 결과에 의하면 무화과나무의 고무함량은 2~4%로 큰 변화가 없으며, 벵갈고무나무는 무화과나무의 고무 함량보다는 높지만 분석 일에 따라 5~16%로서 변이의 폭이 컸다. 2000년도에는 벵갈고무나무에서 17%의 함량을 기록한 적이 있었으나 대체적으로 10%이하의 수준이었으며 2001년도에도 10%를 상회한 적은 많지 않았다. 2001년도의 결과를 보면 벵갈고무나무에서는 온도가 높은 8월 초 중순에 고무 함량이 높아지며 야간기온이 저하하는 8월 하순에는 급격히 고무 함량이 감소하였다.

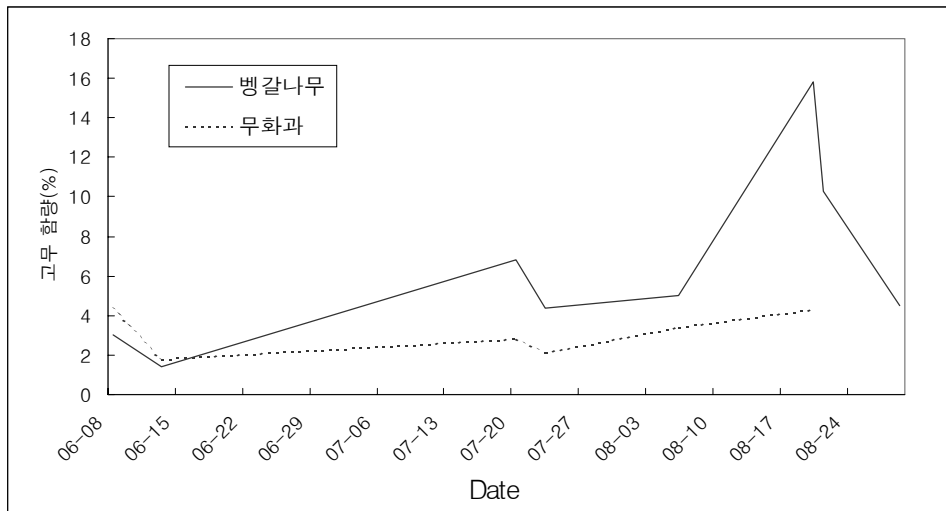


그림 1. 계절적인 요인에 따른 무화과와 벵갈고무나무 latex내의 고무 함량

온도에 따른 무화과나무 latex내의 고무함량의 변화를 구명하기 위하여 포트에 재식된 무화과를 10°C로 조정된 저온실로 옮긴 후 고무 함량을 측정하였다(그림 2). 그림 1에서도 나타난 바와 같이 무화과나무의 latex에는 2~4%정도의 고무가 존재하였고, 또한 저온 처리 일수가 길어질 수록 고무함량은 감소하는 결과를 보였다. 다른 연구보고에 의하면 Guayule (*Parthenium argentatum*)의 경우, 고무 생산에 미치는 조건으로 품종간 차이, 식물체의 나이 발달 및 성숙 정도, 양수분의 유효도, 기상 조건 및 병해의 유무, 계절적인 요인 및 휴면 등 여러 가지 조건이 관여한다고 보고하였다. 또한 미국 Texas에서 재배한 Guayule의 rubber polymerase activity는 10월 - 12월에는 큰 차이가 없으나 1월에는 큰 폭으로 증가하였다고 보고된 바 있다.

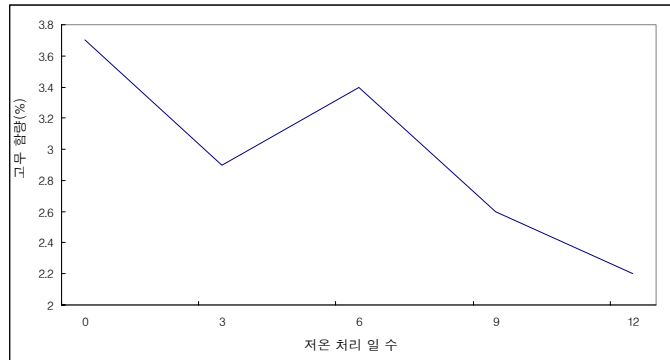


그림 2. 저온 처리가 무화과 latex내의 고무 함량에 미치는 영향

본 연구진의 연구결과 Latex내의 Mg함량은 고무 생합성을 조절하는 주요 요인으로 밝혀지고 있으며, 대체적으로 *Hevea brasiliensis*에는 무화과에 비하여 약 1/5 ~ 1/6 수준으로 낮게 함유되어 있음이 밝혀졌다. 따라서 주기적으로 채취한 무화과나무와 벵갈고무나무의 latex내의 Mg함량을 ICP로 분석하여 고무함량과의 상관 관계를 그림 3에 나타냈다.

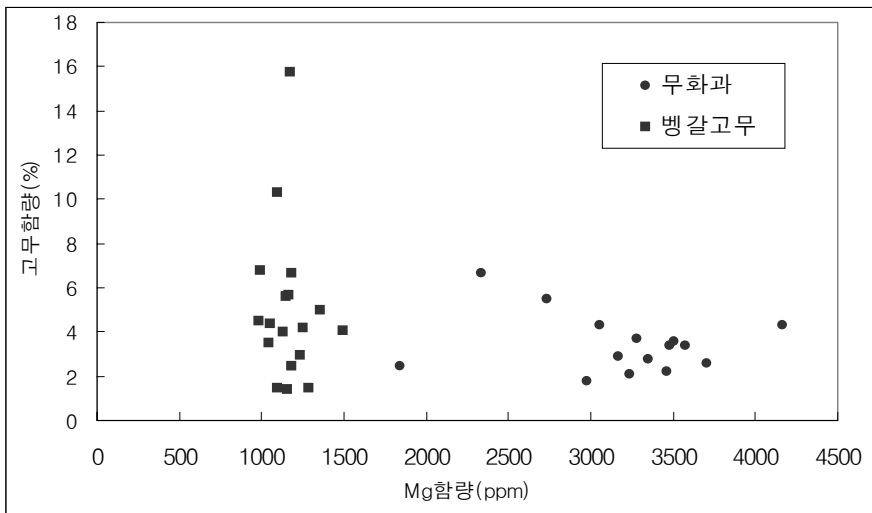


그림 3. 무화과나무와 벵갈고무나무 latex의 Mg함량과 고무 함량과의 상관관계

확실한 것은 무화과나무는 3,000 ~ 4,000ppm의 Mg을 함유하는데 반하여 뽕갈고무나무는 1,000 ~ 1,500ppm으로 종간의 차이는 인정할 수 있으나 Mg함량 자체가 고무함량의 변화를 나타내는 지표는 되지 못하였다. 즉 뽕갈고무나무의 경우 고무함량은 2 ~ 16%의 큰 폭의 변이를 보였으나 Mg함량은 1000 ~ 1500ppm으로 거의 일정한 수준을 나타냈다.

그림 4는 무화과나무와 뽕갈고무나무의 latex내의 K함량과 고무 함량의 상관 관계를 나타낸 것이다. 그림 3에서 나타낸 바와 같이 Mg함량의 경우는 species에 따라 차이는 있었지만 latex 채취일에 따라 함량의 차이는 심하지 않았다. 그러나 K의 경우는 무화과나무에서는 100 ~ 2,300 ppm까지 변이의 폭이 대단히 컸고 흥미로운 점은 무화과나무를 저온처리하면 특히 K의 함량이 아주 높아진 것이다.

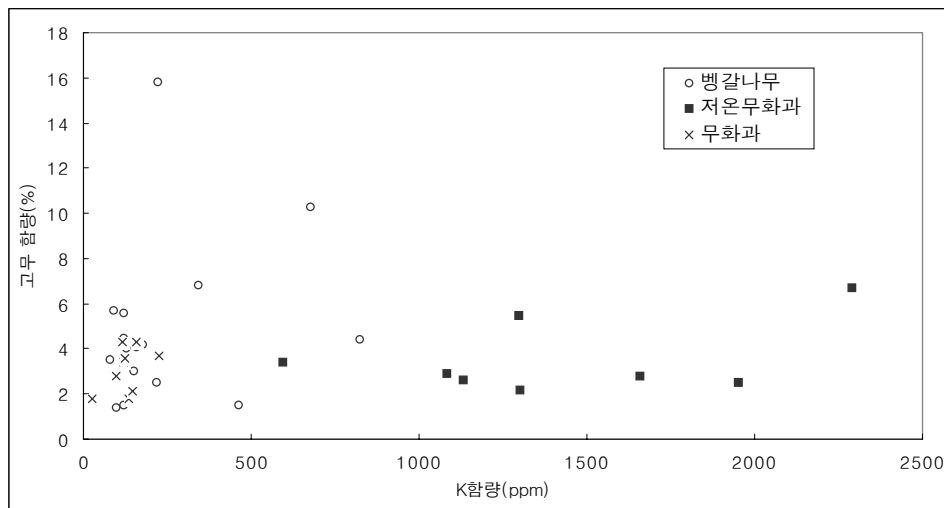


그림 4. 무화과나무와 뽕갈고무나무 latex의 K함량과 고무함량과의 상관관계

고무의 생산성을 결정하는 중요한 요소의 하나는 latex의 재생정도이며 체내의 대사활성 latex의 65 ~ 70%는 수분이므로, 수분대사, 기후조건 등이 식물체의 고무 생산을 좌우하는 요인으로 작용할 수 있다고 고려된다.

제4절 : *Ficus benghalensis*의 천연고무 합성 특성

*Hevea brasiliensis*를 제외한 천연고무를 생산하는 식물 종으로는 guayule (*Parthenium argentatum* Gray)가 있으며 상업적으로도 가능성이 있음이 증명되고 있다. 그러나 guayule는 사막지대에서 생육을 하는 종류이므로 우리나라의 조건에서는 재배하기가 어려워서 대체작물로 사용하기가 불가능하다. 현재 우리나라에서 관상용으로 재배되고 있는 *Ficus benghalensis*(벵갈고무나무)도 수액을 채취하여보면 *H. brasiliensis*와 비슷한 특성을 나타내고 있는 것으로 보인다. 따라서 본 실험에서는 *F. benghalensis*의 천연고무 합성에 대한 특성을 생화학적 및 해부학적으로 검토하였다.

1) *F. benghalensis*에서 합성된 천연고무의 생화학적 특성

아세톤과 벤젠을 사용하여 추출한 분획을 ^{13}C NMR을 사용하여 분석한 결과 천연고무인 것으로 확인되었다(그림1).

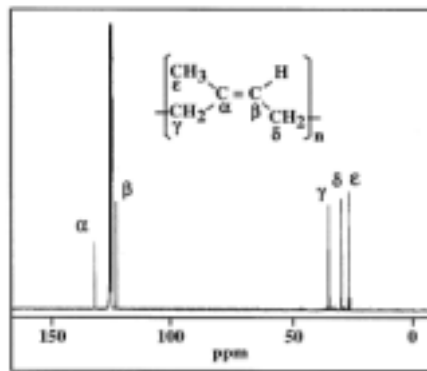


그림1. *F. benghalensis*로부터 얻은 벤젠추출물의 ^{13}C NMR 스펙트럼

확인된 천연고무의 분자량을 측정하기 위해서 gel permeation chromatography를 수행하였으며 그 결과 *H. brasiliensis*와 매우 비슷하였다(그림2).

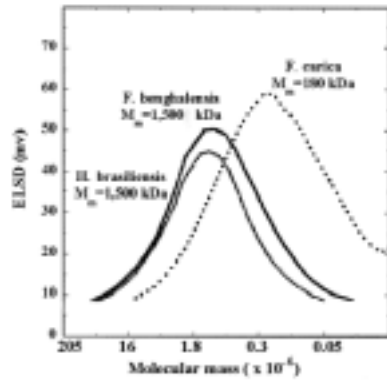


그림2. *F. benghalensis*, *F. carica* 및 *H. brasiliensis*로부터 분리된 천연고무의 분자량의 분포

*F. benghalensis*의 고무합성의 활성도를 측정하기 위하여, rubber transferase의 활성을 측정하였다. Rubber transferase의 활성은 IPP의 동화정도로써 표현하였는바, 효소를 5분간 끓이거나, 낮은 온도인 0°C로 처리하거나, FDP를 제거한 경우 및 EDTA를 첨가한 대조구의 경우는 낮은 활성도를 보였으나 고무생합성에 필요한 모든 요소가 들어있는 시료(complete)에서는 높은 활성도를 보였는바, 이점은 *F. benghalensis*와 결합되어 있는 효소는 IPP의 중합을 촉매 한다는 것을 암시한다.

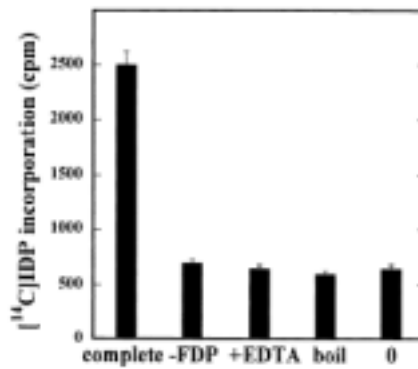


그림3. *F. benghalensis* 고무입자의 rubber transferase의 활성

Mg 이온은 rubber polymerase의 활성화에 필수적이므로 [^{14}C]IPP의 동화에 미치는 Mg의 영향을 검토하였다. 그림 4-B에 나타낸 바와 같이 적절한 Mg 농도는 0.5mM이며 10mM 이상에서는 IPP동화를 완전히 억제하였다. 또한 5mM EDTA는 [^{14}C] IPP의 동화를 크게 촉진시켰으나 그 이상의 농도에서는 점차로 감소하였다.

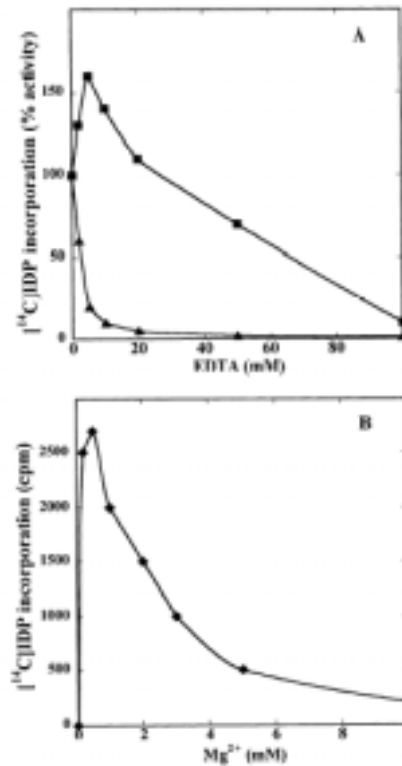


그림4. *F. benghalensis*(■)와 *H. brasiliensis*(▲)의 EDTA의존 IPP의 동화(A)와 Mg 이온농도의 영향(B)

수용성 및 고무입자와 관련된 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다(그림5). 그 결과 *F. benghalensis*의 latex는 31 KDa와 55 KDa에서 확실한 band를 보여주었고, 20~50 KDa 사이에도 몇 개의 band가 확인되었다. 이러한 양상은 *F. carica*와는 비슷하지만 *H. brasiliensis*와는 현격한 차이를 나타내었다.

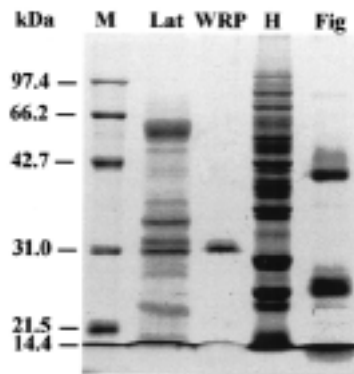


그림5. *F. benghalensis*, *H. brasiliensis* 및 *F. carica*의 latex와 non-specific IDP를 제거(WRP)한 단백질의 전기영동. Lat: *F. benghalensis* latex, WRP: *F. benghalensis*의 세척한 고무입자(washed rubber particle) H: *H. brasiliensis*의 latex Fig: *Ficus carica*의 세척한 고무입자 M: marker

제5절 : *F. carica*, *F. benghalensis* 및 *H. brasiliensis* 고무입자의 미세형태 및 단백질의 특성.

고무의 생합성은 고무입자의 표면에서 일어나며 일중막으로 되어 있는 고무입자에는 rubber transferase가 존재한다. 고무입자에서 transferase를 분리하면 활성을 상실하며, 따라서 고무입자와 고무입자에 결합된 단백질에 대한 연구는 중요한 의미를 갖는다.

본 연구에서는 *F. carica*, *F. benghalensis*와 *H. brasiliensis*의 고무입자의 미세형태를 SEM으로 관찰 비교하였으며, 또한 고무입자에 포함되어 있는 단백질의 유사성을 파악하기 위하여 western analysis와 TEM-immunogold cytochemistry 기법을 사용하였다. 특히 24 KDa인 SRPP(small rubber particle)가 *H. brasiliensis*에서 고무합성에 중요한 역할을 하고 있다는 점에 비추어, 그리고 CPT(cis-prenyltransferase) 단백질도 rubber transferase의 기능을 갖고 있는 점에 비추어, 이 두 가지의 단백질이 고무입자에 존재하는가를 조사하였다.

1) 고무입자의 크기와 모양

세 가지 species로부터 분리한 고무입자의 모양은 주로 구형이었다 (그림1-3). 입자의 크기는 다소 변이가 있었으나 *Hevea*가 가장 변이 폭이 컸으며 0.4-0.75 μm , 0.25-0.35 μm 및 0.08-0.2 μm 의 크기로 구분이 가능하였다. *F. carica*와 *F. benghalensis*의 입자는 2가지 크기로 구분이 되었으나 *F. benghalensis*의 입자가 *carica*보다 더 큰 경향이였다.

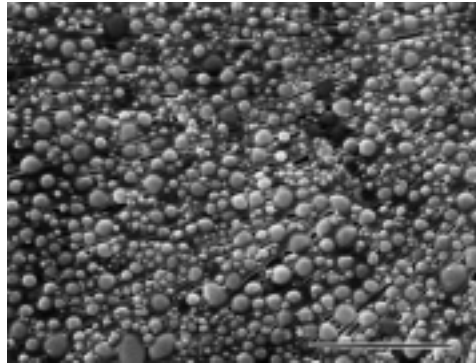


그림1. *H. brasiliensis*의 고무입자. 입자는 구형이며 크기는 다양함. bar=5 μm

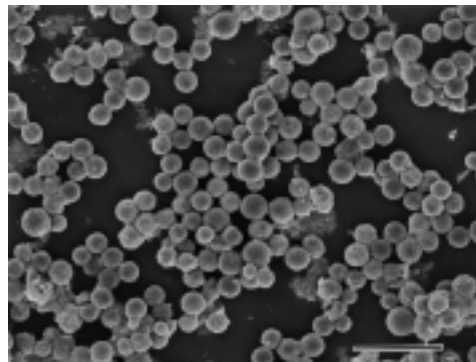


그림2. *F. carica*의 고무입자. *Hevea*보다 입자는 훨씬 크며 일반적으로 균일함.

Bar=20 μm

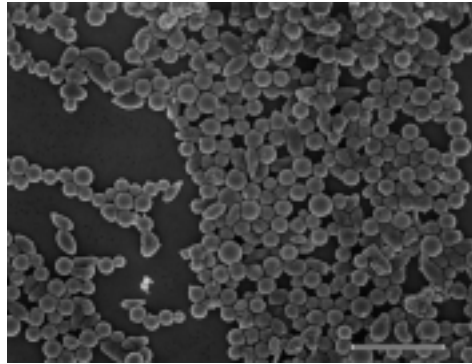


그림3. *F. benghalensis*의 고무입자. 입자의 크기는 *Hevea*보다는 크지만 *carica* 와 비슷하며, 구형과 더불어 장방형인 것도 있음. Bar=20 μ m

2) 고무입자의 표면에 부착하여 있는 단백질의 western analysis

*H. brasiliensis*의 고무입자의 고무합성에 중요하다고 알려져 있는 SRPP로 명명되어 있는 24 KDa 단백질이 *F. carica*와 *F. benghalensis* 고무입자에도 존재하는지를 조사하고 rubber transferase와 비슷한 작용을 하는 cis-prenyltransferase가 세가지 species의 고무입자에 존재하는지를 파악하기 위하여 western analysis를 수행하였다(그림4).

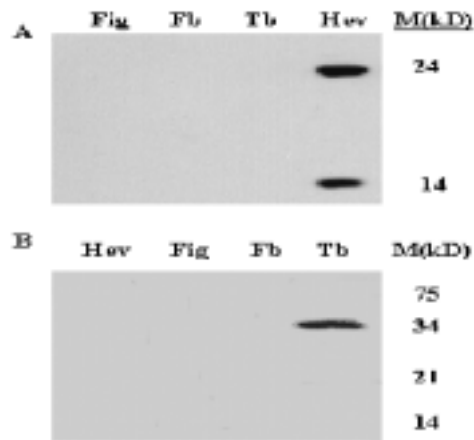


그림4. 고무입자 단백질의 western analysis. A : 24 KDa 단백질
B : cis-prenyltransferase. Hev, *H. brasiliensis*; Fig, *F. carica*; Fb, *F. benghalensis*; Tb. tobacco

그림 4A에 나타난 것처럼 *Hevea*의 24 KDa와 F.와 14 KDa 단백질은 24 KDa antibody와는 반응하였다. 그러나 *F. carica*와 *F. benghalensis*는 24 KDa antibody와는 전혀 반응하지 않았다. 이러한 점으로 보아 *Hevea* 고무나무에 많이 존재하는 24 KDa 단백질은 고무를 생산하는 다른 species와는 상이한 것으로 판단된다. 그림 4B에서 보는 바와 같이 cis-prenyltransferase(CPT) antibody는 세가지 species와 전혀 반응하지 않았다. CPT는 모든 식물에 존재하므로 담배 잎으로부터 추출한 단백질에는 반응하였다. 이러한 점으로 보아 CPT는 식물체에서 고무 생합성에 중요한 단백질은 아닌 것으로 생각된다.

3) 고무입자의 표면에 존재하는 단백질의 immunogold labelling

24 KDa 단백질 antibody와 이어서 gold-labeled secondary antibody로 처리한 고무입자를 TEM으로 조사한 결과, *H. brasiliensis*는 강력하게 gold-labelling이 이루어졌으나(Fig.5), *F. carica*와 *F. benghalensis*는 전혀 labelling이 되지 않았다(Fig.6). 이 결과 또한 *H. brasiliensis*에 존재하는 SRPP 단백질이 모든 고무 생합성 식물체에 공통적으로 존재하는 단백질이 아니라는 사실을 뒷받침하는 것이다.

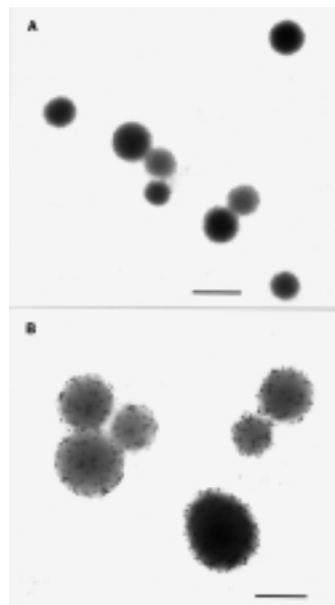


Fig.5. *H. brasiliensis*의 24 KDa 단백질 antibody의 immunogold-labelling

A : Bar=500nm B : Bar=200nm

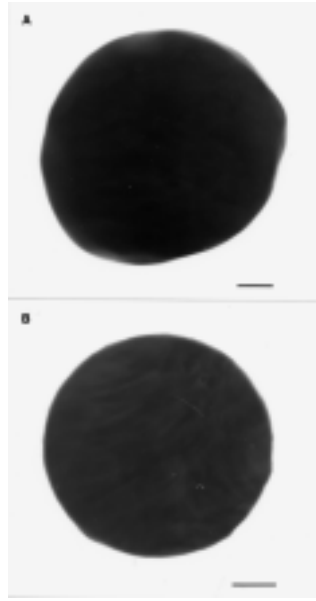


Fig.6. *F. carica*(A)와 *F. benghalensis*(B)의 24 KDa 단백질 antibody의 immunogold-labelling Bar=500nm

제6절 : 결 론

본 실험에서 사용한 천연고무합성이 이루어지는 식물재료로는 주로 무화과(*F. carica*)와 벵갈고무나무(*F. benghalensis*)로서, 무화과는 현재 주로 남부지방에서 과수의 일종으로 재배되고 있으며, 벵갈고무나무는 관상용으로 꽃트에서 일부 재배되어 있을 뿐이다. 미국에서는 사막지대에서 생육하고 있는 guayule (*Parthenium argentatum*)에서 천연고무가 합성되므로 이에 대한 연구가 이루어지고 있으나 *Hevea brasiliensis*에 비하여는 양 및 질적에서 아직까지는 상업적으로 이용되고 있지 못하다. 본 연구에서는 무화과와 벵갈고무나무의 수액을 채취하여 고무함량 및 무기성분 함량 변이를 추적하였고 환경요인에 따른 변화 양상을 규명하였다. 무화과의 수액을 엽과 과실에서 채취하여 고무함량을 분석한 결과를 보면 과실이 엽보다 높은 함량을 보였으며 저온에 의해서 고무의 함량은 감소하였고 품종간의 차이도 존재하는 것으로 판단된다. 무화과 수액의 무기성분함량을 *Hevea*와 비교하여 보면 Ca과 Mg 함량이 현저

히 높았으며 Mn와 Zn은 무화과에서 현저하게 낮은 것이 특징이었다. 건조처리를 실시하여 무화과의 고무함량에 미치는 영향을 검토한 결과, 대조구보다 다소 증가하였으나, 수분부족으로 인한 농축의 영향인 것으로 판단된다.

*Ficus benghalensis*에서는 고무함량이 높을 때는 16~17% 까지도 분석이 된 적은 있으나 대체적으로 10% 내외의 함량을 나타냈다. 특히 온도가 높은 8월 초 중순에 고무함량이 높아지며 야간기온이 낮아지면 고무함량이 급격히 감소하는 경향이었다. *F. benghalensis*의 latex에 포함되어 있는 벤젠추출물은 ¹³C NMR로 확인한 결과 천연고무임이 확인되었으며 molecular size는 대략 1,500 KDa이었다. 천연고무의 함량이 비교적 높고, 또한 고무의 분자량이 *H. Brasiliensis*와 비교할 만큼 큰 점으로 미루어 *F. benghalensis*가 천연고무 합성 대체작물로 사용될 가능성이 있음을 보였다.

또한 *F. carica*, *F. benghalensis* 및 *H. brasiliensis*의 고무입자의 미세형태를 SEM으로 비교하였으며, 고무입자에 포함되어 있는 단백질의 유사성을 파악하기 위하여 western analysis와 immunogold-labelling을 실시한 결과, Hevea에 많이 존재하는 24 KDa 단백질은 다른 2가지 종의 식물에는 존재하지 않았으며 cis-prenyltransferase는 식물체에서 고무생합성에 중요한 요소는 아닌 것으로 생각된다.

제 7절 :참고문헌

Attanyaka D.P.S.T.G., Kekwick R.G.O. and Franklin F.C.H. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 1079-1081.

Backhaus R .A. (1985) Rubber formation in plants - a mini review. *Israel J. Bot.*, **34**, 283-293.

Backhaus R.A., Cornish K., Chen S.F., Huang D.S. and Bess V.H. (1991) Purification and characterization of an abundant rubber particle protein from guayule. *Phytochem.*, **30**, 2493-2497.

Bahri ARS, Hamzah S. (1996) Immunocytochemical localization of rubber membrane protein in *Hevea* latex. *Journal of Natural Rubber Research* **11**, 88-95.

Benedict C.R., Madhavan S., Greenblatt G.A., Venkatachalam K.V. and Foster, M.A. (1990) The enzymatic synthesis of rubber polymer in *Parthenium argenteatum* Gray. *Plant Physiol.*, **92**, 816-821.

Benedict, H. M., W. L. Mc Rary and M. C. Slattery. (1947) Response of guayule to alternating periods of low and high moisture stress. *Bot. Gaz.* 108 : 535 - 549

Bowers J.E. (1990) Natural rubber producing plants for the United States (Beltsville, Md.: National Agricultural Library)

Coligan J. E. (1996) in *Current Protocols in Protein Science*, eds. Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T., Willey, New York, vol. 1, pp. 11.3.1-11.3.13.

Condon JM, Fineran BA. (1989) The effect of chemical fixation and dehydration on the preservation of latex in *Calystegia silvatica*

(Convolvulaceae): examination of exudate and latex *in situ* by light and scanning electron microscopy. *Journal of Experimental Botany* 40, 925-939

Cornish K. (1993) The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferase in *cis*-1,4- polyisoprene biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 267-271.

Cornish K. and Backhaus R.A. (1990) Rubber transferase activity in rubber particles of guayule. *Phytochem.*, **29**, 3809-3813.

Cornish K., Siler D.J. and Grosjean O.K.K. (1994) Immunoinhibition of rubber particle- bound *cis*-prenyltransferases in *Ficus elastica* and *Parthenium argentatum*. *Phytochem.*, **35**, 1425-1428.

Cornish K. and Siler D.J. (1996) Characterization of *cis*-prenyl transferase activity localized in a buoyant fraction of rubber particles from *Ficus elastica* latex. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 377-384.

Dennis M.S. and Light D.R. (1989) Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18608-18617.

Duch M.W. and Grant D.M. (1970) Carbon-13 chemical shift studies of the 1,4-polybutadiens and the 1,4-polyisoprenes. *Macromolecules* **3**, 165-174.

Fahn A. (1990) *Plant anatomy*. p. 544. Pergamon Press, Oxford

Gahan P.B. (1984) *Plant histochemistry and cytochemistry*. p. 301. Academic Press, London.

Gomez JB, Hamzah S. (1989) Particle size distribution in *Hevea* latex-some observations on the electron microscopic method. *Journal of Natural Rubber Research* **4**, 204-211.

Goyvaerts E., Dennis M., Light D. and Chua N.H. (1991) Cloning and

sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol.*, **97**, 317-321.

Hasma H. (1991) Lipids associated with rubber particles and their possible role in mechanical stability of latex concentrates. *Journal of Natural Rubber Research* **6**, 105-114.

Hocking, P.J. (1980) The composition of phloem exudate and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Groh). *Ann. Bot.* 45: 633-643

Inoue T. and Osatake H. (1988) A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: t-butyl alcohol freeze drying method. *Arch. Histol. Cytol.*, **51**, 53-59.

Ji W., Benedict C.R. and Foster M.A. (1993) Seasonal variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium argentatum* in the chihuahuan desert. *Plant Physiol.*, **103**, 535-542.

Kang H., Kang M.Y. and Han K. H. (2000a) Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree (*Ficus carica*). *Plant Physiol.*, in press.

Kang H, Kim YS, Chung GC. (2000b) Characterization of natural rubber biosynthesis in *Ficus benghalensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 979-987.

Katsumoto T, Naguro T, Tino A, Takagi A. (1981) The effect of tannic acid on the preservation of tissue culture cells for scanning electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* **30**, 177-182.

Kim YS, Wi SG, Griinwald C, Schmitt U. (2002) Immuno electron

microscopic localization of peroxidases in the differentiating xylem of *Populus*. *SPP. Holzforschung* **56**, 355-359.

Lynen F. (1969) Biochemical problems of rubber synthesis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **21**, 389-406.

Macrae, s., M. G. Gilland and J. van Staden. (1986) Rubber Production in guayule : Determination of rubber producing potential. *Plant Physiol.* **81** : 1027 - 1032

Norton, R. A., D. N. Radin and E. Rodriguez. (1991) Environmental and chemical effects on growth, resin and rubber production in guayule tissue cultures. *Phytochemistry* **30** : 2615 - 2618

Ogura K, Koyama T. (1998) Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chemical Reviews* **98**, 1263-1276.

Oh S.K., Kang H., Shin D.H., Yang J., Chow K.S., Yeang H.Y., Wagner B., Breiteneder H. and Han K.H. (1999) Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17132-17138.

Ok SK, Han KH, Ryu SB, Kang H. (2000) Molecular cloning, expression, and functional analysis of a *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*: implication in rubber biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 18482-18488

Pan Z., Durst F., Werck-Reinchhart D., Gardner H.W., Camara B., Cornish K. and Backhaus R.A. (1995) The major protein of guayule rubber particle is a cytochrome P450: Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8487-8494.

Pate, J. S. (1975) Exchange of solutes between phloem and xylem and

circulation in the whole plant. In Encyclopedia of Plant Physiology. ed. M. H. Zimmermann and J. A. Milburn. pp. 451- 473.

Reddy A.R. and Das V.S.R. (1988) Enhanced rubber accumulation and rubber transferase activity in guayule under water stress. *J. Plant Physiol.*, **133**, 152-155.

Siler D.J. and Cornish K. (1993) A protein from *Ficus elastica* rubber particles is related to proteins from *Hevea brasiliensis* and *Parthenium argentatum*. *Phytochemistry* **32**, 1097-1102.

Siler D.J. and Cornish K. (1994) Identification of *Parthenium argentatum* rubber particle proteins immunoprecipitated by an antibody that specifically inhibits rubber transferase activity. *Phytochemistry* **36**, 623-627.

Simionescu N, Simionescu M. (1976) Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. *Journal of Cell Biology* **70**, 608-621.

Stipanovic R.D., O'Brien D.H., Rogers C.E. and Hanlon K.D. (1980) Natural rubber from sunflower. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1322-1323.

Wood DF, Cornish K. (2000) Microstructure of purified rubber particles. *International Journal of Plant Science* **161**, 435-445.

Yeang HY, Yip E, Hamzah S. (1995) Characterization of zone 1 and zone 2 rubber particles in *Hevea brasiliensis* latex. *Journal of Natural Rubber Research* **10**,

Yusof, F. Audley B.G., Ismail F. and Walker J.M. (1998) A rapid assay for the incorporation of isopentenyl diphosphate in rubber biosynthesis. *J. Rubb. Res.*, **1**, 48- 66.

제 9 장 Characterization of Natural Rubber Biosynthesis in *Ficus benghalensis*

Published in Plant Physiology and Biochemistry 38:979-987 (2000)

Hunseung Kang¹, Yoon Soo Kim², and Gap Chae Chung³

¹ Kumho Life and Environmental Science Laboratory, 1 Oryong-dong, Puk-gu, Kwangju, 500-712, Korea

² Department of Forest Products and Technology, and

³ Division of Applied Plant Science, Biotechnology Research Institute, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

Natural rubber was identified for the first time in the latex of *Ficus benghalensis*, and the rubber biosynthetic activity in latex and rubber particle was investigated. ¹³C NMR analysis of samples prepared by successive extractions with acetone and benzene confirmed that the benzene-soluble residues were a natural rubber, *cis*-1,4-polyisoprene. The rubber content in the latex of *F. benghalensis* was approximately 17 %. Gel permeation chromatography revealed that the molecular size of the natural rubber from *F. benghalensis* was approximately 1,500 kDa. The high rubber content and large molecular size suggest that *F. benghalensis* is a good candidate for an alternative rubber source. Examination of latex serum from *F. benghalensis* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed a small number of proteins with major proteins of 31 kDa and 55 kDa in size. The 31 kDa protein was predominant in catalytically-active rubber particles. Determination of metal ion concentration in latex and a comparison of the effect of EDTA on *in vitro* rubber biosynthesis in *F. benghalensis*, *Ficus carica* and *Hevea brasiliensis* suggest that the divalent metal ion present in latex serum is an important physiological factor controlling the rubber biosynthetic activities in these plant species. Microscopic examination revealed that the rubber in *F. benghalensis* occurred in a series of laticifer cells located in concentric zones in the inner bark of stems and branches.

Key words: *Ficus benghalensis*. latex. natural rubber. rubber biosynthesis. rubber particle

Abbreviations: FPP, farnesyl diphosphate; GPC, gel permeation chromatography; IPP, isoprenyl diphosphate; RP-TLC, reverse phase TLC; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; THF, tetrahydrofuran; WRP, washed rubber particle.

INTRODUCTION

Natural rubber (*cis*-1,4-polyisoprene) is a polymer composed of 320 to 35,000 isoprene molecules and is widely used in the manufacture of various industrial and medicinal products requiring elasticity, flexibility, and resilience. Among more than 2,000 natural rubber producing plant species, the Brazilian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the only commercial source, due to its high rubber content and excellent quality (Backhouse, 1985). However, the diminishing acreage of rubber plantations and the life-threatening allergies to the latex based products of *H. brasiliensis*, coupled with an increasing demand for high quality rubber, has forced a search for alternative natural rubber producing plants. In recent years, guayule (*Parthenium argentatum* Gray), which accumulates rubber in parenchyma cells and contains a high molecular weight rubber, comparable to *H. brasiliensis* (Bowers, 1990), has been proposed as a viable commercial alternative for hypoallergenic latex (Cornish, US patent No 5717050; 5580942).

Despite the important place of natural rubber in various industrial and medicinal products, the molecular mechanism of rubber biosynthesis in most rubber-producing plants has not been studied in detail. In particular, the question of what determines the molecular size of rubber in rubber-producing plants has not yet been answered. In order to understand the molecular mechanism of rubber biosynthesis, it is useful to investigate other rubber-producing plants, and to characterize and compare the enzymes related to rubber biosynthesis in the different plant species. Recently, we have identified fig tree (*Ficus carica*) as an alternative

rubber-producing temperate plant and reported that the high level of divalent metal ion in the latex serum of fig tree exerts different rubber biosynthetic activities in *F. carica*, distinct from *H. brasiliensis* (Kang *et al.*, 2000).

Ficus benghalensis is a plant growing in the tropical area of Asia, and has not been studied for rubber production. In this report we investigated for the first time the content and molecular size of natural rubber in *F. benghalensis*, and found that *F. benghalensis* contains a high amount of good quality natural rubber. Analysis of the proteins in the latex serum of *F. benghalensis* revealed that only a small number of proteins were present in the latex serum of *F. benghalensis*, and that 31 kDa protein was a predominant protein in catalytically-active rubber particles. Analysis of major divalent cations showed that Mg²⁺ content in *F. benghalensis* was considerably lower than in *F. carica*, and that divalent metal ion is an important physiological factor controlling the rubber biosynthetic activities in the latex of rubber producing plant species. Microscopic examination of tissues involved in rubber biosynthesis revealed the presence of latex in laticifers in the bark, which may be a useful morphological character for easy tapping of the latex.

RESULTS

13C NMR revealed that the benzene extract is a natural rubber

Natural rubber was obtained by successive extraction with acetone and benzene, and the benzene extracts were analyzed using 13C NMR. After collecting the NMR spectrum for the benzene extracts dissolved in C6D6, the 13C NMR spectrum was referenced relative to the central peak of C6D6 at 128.5 ppm. As shown in figure 1, five characteristic peaks with chemical shifts of 135.6, 124.8, 32.6, 27.0, and 23.0 ppm were observed. These peaks arise from two ethylenic, two methylene, and the methyl carbon atoms of the *cis*-1,4-polyisoprene (Duch and Grant, 1970). A peak at 29.6 ppm typical for high molecular weight straight-chain hydrocarbons was not observed in the 13C NMR spectrum. These NMR spectra confirmed that the benzene-soluble fraction is a natural rubber.

Content and molecular weight of the natural rubber in *F. benghalensis*

The rubber content in the latex of *F. benghalensis* was calculated from four replicate analyses. The latex of *F. benghalensis* contained about 17 % (w/v) of natural rubber. In comparison, *H. brasiliensis* latex contains about 32 % (w/v) of natural rubber (Kang *et al.*, 2000). To estimate the molecular size of the natural rubber in *F. benghalensis*, the benzene-soluble residue was subjected to a gel permeation chromatography. The molecular weight distribution profile of the rubber in *F. benghalensis* was quite similar to that in *H. brasiliensis* (fig. 2). The weight average molecular mass (Mw) of the rubber in the latex of *F. benghalensis* and *H. brasiliensis* was 1,500 kDa, while the Mw of the rubber in *F. carica* is 180 kDa (Kang *et al.*, 2000).

Rubber biosynthetic activity in the washed rubber particles of *F. benghalensis*

To investigate the rubber biosynthetic activity in *F. benghalensis*, WRPs were prepared and their *in vitro* activities tested. Rubber particles of *F. benghalensis* showed large amounts of nonspecifically-incorporated IPP being physically trapped into WRP, as observed in *F. elastica* and *F. carica* rubber particles (Cornish and Siler, 1996; Kang *et al.*, 2000). We therefore examined the background levels of IPP trapped by WRP for each analysis, and used this background value to correct for each measurement. In order to confirm that the increase of IPP incorporation resulted from the action of rubber transferase associated with the WRP, a series of incubations containing WRP, FPP and EDTA were performed.

The incubation product of the reaction mixture containing *F. benghalensis* WRP and EDTA still contained fairly high amounts of radioactivity, indicating that the *F. benghalensis* rubber particle exhibited relatively high levels of nonspecific IPP trapping. Either boiling the rubber particles for 5 min (or heating at 60°C for 10 min) to destroy rubber transferase or incubating the reaction mixture at 0°C did not promote IPP incorporation above a basal level (fig. 3). Removing FPP, an efficient, initiating molecule for rubber biosynthesis, from the reaction mixture

resulted in a marked decrease in [14C]IPP incorporation (fig. 3). These results suggest that enzyme(s) associated with the *F. benghalensis* rubber particles catalyzed the condensation of IPP into rubber and that the [14C]IPP is incorporated into newly synthesized rubber chains.

Metal ion concentration and rubber biosynthetic activity in the latex of *F. benghalensis*

Since Mg²⁺ ion is necessary for the activity of rubber polymerase, the effect of Mg²⁺ ion on [14C]IPP incorporation was investigated in the reaction mixture containing WRP and different amounts of Mg²⁺ ion. The optimum Mg²⁺ concentration for *F. benghalensis* WRP was 0.5 mM. The IPP incorporation was completely inhibited at Mg²⁺ concentration higher than 10 mM (fig. 4B). In a recent report by Kang et al. (2000), Mg²⁺ ion concentration in the latex of *F. carica* and *H. brasiliensis* was compared and the effect of EDTA on the rubber biosynthetic activity in these two plant species was analyzed. We therefore proceeded to test the effect of EDTA on rubber biosynthesis in the latex of *F. benghalensis*. EDTA was added to the reaction mixture containing the latex of *F. benghalensis*, and the rubber biosynthetic activity was assessed. Addition of EDTA up to 5 mM greatly increased [14C]IPP incorporation into rubber, and a gradual decrease in the [14C]IPP incorporation was detected at higher EDTA concentrations (fig. 4A). For *F. carica* latex, a marked increase in [14C]IPP incorporation was observed by the addition of EDTA up to 15–20 mM (Kang *et al.*, 2000). In contrast, a significant reduction in [14C]IPP incorporation was observed for the latex of *H. brasiliensis* at concentrations of EDTA equal to or higher than 5 mM (fig. 4A). These results suggest that different concentration of divalent ion in the latex of *F. benghalensis*, *F. carica*, and *H. brasiliensis* affected the rubber biosynthesis in these plant species.

To examine if different levels of divalent ions affect the rubber biosynthetic activity in *F. benghalensis*, *F. carica*, and *H. brasiliensis*, the concentrations of divalent metal ions in the latex of these plant species were analyzed. Analyses revealed that Mg²⁺ ion concentration in the latex of *F. benghalensis*, *F. carica*, and *H. brasiliensis* were approximately 1,000 ppm, 3,000 ppm, and 590 ppm, respectively (Table 1). These results indicate

that the increasing effect of EDTA on rubber biosynthesis in the latex of *F. benghalensis* and *F. carica* resulted from the removal of excess magnesium ion present at much higher concentration than would be beneficial for optimum activity.

Major proteins in the latex of *F. benghalensis* involved in rubber biosynthesis

The latex of *F. benghalensis* contains several distinct proteins in which 31 kDa and 55 kDa proteins are the most abundant proteins (fig. 5). In addition, several weaker proteins between 20 and 50 kDa were also observed. This simple protein profile for the latex of *F. benghalensis* is similar to that of *F. carica*, but contrasts with the *H. brasiliensis* protein profile that contains more than 100 different molecular sized proteins. To investigate which protein(s) are involved in rubber biosynthesis, the proteins associated with WRP assayed for rubber biosynthetic activity in figures 3 and 4 were analyzed. SDS-PAGE analysis showed that many soluble proteins in the latex, and proteins loosely associated with rubber particles were removed during the extensive washing cycle for preparing the WRP. Catalytically-active *F. benghalensis* WRP contained an abundant protein with a molecular mass of 31 kDa (fig. 5). In comparison, *F. carica* WRP contains two major proteins of about 25 and 40 kDa in size.

Partial amino acid sequence of the 31 kDa protein was determined. Our initial attempt to obtain N-terminal sequence of the protein did not give any sequencing result, indicating that the N-terminus of the 31 kDa protein was blocked. We then sequenced the trypsin-digested peptide fragments of the 31 kDa protein. Internal amino acid sequence analyses showed that the amino acid sequences of fragment 1 (IVGNVGDQWSDLLGTDH), fragment 2 (ATNDNLLIAGYR), and fragment 3 (LVDGGFRRK) were not related to any other suggested rubber transferases or rubber elongation factor.

Microscopic observation of tissues involved in rubber biosynthesis

Latex in *F. benghalensis* occurred in a series of cells usually termed as "laticifers" (Fahn, 1990). The laticifers in *F. benghalensis* were located in concentric zones in the inner bark of stem and branches. The

arrangement of laticifers was confined to the phloem, but not to the xylem (fig. 6A). Laticifers occurring in the pith consisted of simple series of elongated cells and they were not branched in radial direction (fig. 6B). The end walls of laticifers remained intact (fig. 6C).

DISCUSSION

The latex of *F. benghalensis* contains about 17 % (w/v) of natural rubber. This rubber content is not as high as that in *H. brasiliensis*, but is much higher than other rubber producing plants which contain less than 10 % of the natural rubber (Bowers, 1990). Since the amounts of latex in plant and rubber content in the latex vary, depending on the physiological conditions of plants influenced by environments (Ji *et al.*, 1993; Reddy and Das, 1988), it is of interest to further investigate seasonal variations in the amounts of natural rubber in *F. benghalensis*. The molecular size of natural rubber produced in plants is one of the key factors determining the economic value of rubber. The weight average molecular mass of rubber in *F. benghalensis* is 1,500 kDa, which is quite similar to that found in the commercial rubber tree, *H. brasiliensis*. Since *F. benghalensis* contains a high amount of good quality rubber, it is of critical interest to further investigate *F. benghalensis* as an alternative rubber producing plant.

The molecular size of rubber is determined by the action of enzymes and/or factors such as rubber transferase and the rubber elongation factor. Since different plant species produce various sizes of rubber, it is of critical importance to investigate such factors in different plant species and to obtain information concerning what determines the molecular weight of natural rubber in plants. The enzymes and/or factors necessary for rubber biosynthesis are tightly associated with the rubber particles in *H. brasiliensis* (Cornish, 1993), guayule (Benedict *et al.*, 1990; Cornish and Backhaus, 1990), *F. elastica* (Cornish and Siler, 1996), and *F. carica* (Kang *et al.*, 2000). A 375 kDa protein in *F. elastica* (Siler and Cornish, 1993, 1994; Cornish *et al.*, 1994) and a 48.5 kDa protein in guayule (Backhaus *et al.*, 1991) were suggested to be a rubber transferases based

on the presence of these proteins in the rubber particles. However, the 48.5 kDa protein in guayule was subsequently sequenced to be a P450 allen oxide synthase (Pan *et al.*, 1995). A 14 kDa protein tightly associated with large rubber particles in *H. brasiliensis* was suggested as a rubber elongation factor (Dennis and Light, 1989), and its gene has been cloned (Attanyaka *et al.*, 1991; Goyvaerts *et al.*, 1991). However, the direct role of the 14 kDa protein in rubber biosynthesis has not been proven. More recently, Oh *et al.* (1999) have isolated a *H. brasiliensis* cDNA encoding a major rubber particle protein tightly associated with small rubber particles (designated SRPP), and demonstrated that SRPP plays a positive role in rubber biosynthesis. Although a direct involvement of these proteins in rubber chain elongation has not been demonstrated, these proteins are associated with biosynthetically active rubber particles. Our analysis shows that the protein profile in the latex of *F. benghalensis* is simple in comparison to that of *H. brasiliensis* which contains more than 100 different sizes of proteins. SDS-PAGE analysis of the catalytically active *F. benghalensis* rubber particle showed that a 31 kDa protein is the most abundant (fig. 5). Partial peptide sequencing of the 31 kDa protein revealed that this protein is not related to any other suggested rubber transferase or rubber elongation factor. Although we do not have direct evidence indicating that the major protein of 31 kDa in size is involved in rubber biosynthesis in *F. benghalensis*, the presence of this protein in enzymatically-active rubber particles suggests that the 31 kDa protein may be a rubber transferase in *F. benghalensis*. Further experiments with the isolated gene and the recombinant protein would be necessary to test the role of this protein in rubber biosynthesis in *F. benghalensis*.

Rubber polymerase or rubber transferase (EC 2.5.1.20) requires a divalent ion for activity, and the concentration of Mg²⁺ in the latex serum may affect the activity of rubber transferase. It has been shown that the optimum Mg²⁺ concentration for [14C]IPP incorporation into rubber *in vitro* for *H. brasiliensis* and *F. carica* is 2 mM and 1 mM, respectively (Lynen, 1969; Yusof *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2000). The present analyses show that the optimum Mg²⁺ concentration for [14C]IPP incorporation into rubber for *F. benghalensis* WRP is 0.5 mM. Given that the optimum Mg²⁺ concentrations for [14C]IPP incorporation into rubber for *F. benghalensis*,

F. carica and *H. brasiliensis* WRPs are quite similar, *F. benghalensis* latex and *F. carica* latex containing 1,000 ppm (40 mM) and 3,000 ppm (120 mM) Mg²⁺ ions (Table 1), respectively, do not present an optimum environment for rubber transferase activity. Our analyses clearly indicated that the addition of EDTA up to 5 mM to *F. benghalensis* latex increased the IPP incorporation, whereas a marked reduction in IPP incorporation was observed by the addition of 5 mM EDTA to *H. brasiliensis* latex (fig. 4A). In our previous study, addition of 15–20 mM EDTA to *F. carica* latex resulted in a marked increase in IPP incorporation (Kang *et al.*, 2000). These results suggest that rubber biosynthetic activities in various plant species depend on the amount of Mg²⁺ ion in latex.

In conclusion, *F. benghalensis* contains a high amount of good quality natural rubber comparable to the commercial rubber tree, *H. brasiliensis*. Catalytically active rubber particle contains a major protein of 31 kDa in size, suggesting that this protein may be a rubber transferase. The present results also show that different physiological conditions, including divalent metal ions in the latex serum, are an important factor in determining different rubber biosynthetic activities. Rubbers are produced in a series of laticifer cells located in concentric zones in the inner bark of stems and branches, which is a practically useful morphological character for easy tapping of the latex. We identify *F. benghalensis* as a natural rubber producing plant, and provide a basis for its use as a biotechnologically amenable and commercially viable natural rubber producing plant.

MATERIALS AND METHODS

Extraction of natural rubber. The latex of *F. benghalensis* was collected directly from trees grown in greenhouses. The latex of *H. brasiliensis* was collected from the Rubber Research Institute of Malaysia, and shipped to this laboratory on dry ice. The rubber was extracted by the acetone–benzene extraction method as described elsewhere (Stipanovic *et al.*, 1980; Ji *et al.*, 1993). For the analysis of rubber in latex, acetone was added directly to the latex sample, and the sample was vortexed. The homogenized sample was centrifuged at 8,000 rpm for 5 min and the

acetone supernatant was decanted. The pellet was extracted once more with acetone. Rubber was then extracted from the pellet by homogenizing it with benzene in a homogenizer followed by centrifugation. This procedure was repeated twice. After centrifugation at 8,000 rpm for 5 min, the benzene fraction was subjected to rotary vacuum evaporation to remove the solvent. The percentage of rubber in latex was determined by weighing the residues from the benzene extraction.

¹³C NMR spectroscopy. For NMR measurements, the dried rubber extracts were dissolved in 0.4 mL of 99.5 % C₆D₆ (Sigma). NMR spectra were obtained on a Bruker AMX-300 MHz spectrometer at 24°C. Approximately 5,000 scans were accumulated with a spectral width of 20,000 Hz. The spectra were referenced relative to C₆D₆ (128.5 ppm).

Gel permeation chromatography. The rubber samples in tetrahydrofuran (THF) were filtered through a membrane of 0.4 μm porosity before GPC analysis. Gel permeation chromatography was carried out in a Waters high performance liquid chromatography using three columns in series, a mixed-bed polydivinylbenzene column with molecular weight cutoffs from 100 to 10,000 k (Jordi), and two polystyrene-divinyl-benzene copolymer gels having an exclusion limit of 4 × 10⁷ and 6 × 10⁴ (Supelco). Measurements were made at 35°C using THF as an eluent at a flow rate of 0.8 ml per min, and the rubber was monitored by an evaporative light scattering detector (Alltech). The weight average molecular weight (M_w) of the rubber was estimated by comparing the elution profile of the sample to the molecular weight distribution profile of standard polystyrene and polyisoprene.

Preparation of washed rubber particles. The latex from *F. benghalensis* was collected directly into an ice-cold buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgSO₄, 10 mM DTT, and 0.1 mM PMSF. The latex was centrifuged at 30,000 × g for 1 h at 4°C. The creamy upper layer of rubber particle was collected, resuspended in the same buffer containing 12% glycerol, and recentrifuged. The supernatant serum fraction and the sedimented heavy particles were discarded. This washing procedure was repeated three times as described (Cornish and Backhaus, 1990; Siler and

Cornish, 1993). The buoyant rubber particles recovered after washing in wash buffer containing 12% glycerol, which was designated as washed rubber particle (WRP), were stored at 20°C until use or were suspended in a sample buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM MgSO₄, and 5 mM DTT.

Isolation and gel electrophoresis of the proteins. The whole latex containing soluble and rubber particle-associated proteins was analyzed by SDS-PAGE. Rubber particle proteins were solubilized by incubating rubber particles in a detergent solution containing 0.1 % Triton X-100 and 1 % SDS. The detergent treated suspension was mixed with a gel loading buffer, heated at 95°C for 5 min, and the denatured proteins were separated on a SDS-12% PAGE. After electrophoresis, proteins were detected by visualization with a Coomassie blue.

Protein microsequencing. The proteins separated by SDS-PAGE were transferred to polyvinylidene difluoride membrane, and were visualized with Coomassie blue stain. The peptide samples were analyzed by Edman sequencing chemistry by using a Procise cLC protein sequencing system (Perkin Elmer Biosys.). For internal amino acid sequencing, in-gel peptide digestion was employed with trypsin (Coligan, 1996). The digested samples were applied to a HPLC equipped with Sephasil C18 (2.1 × 10 cm) column, and the peptide were separated by using a linear gradient of mobile phase A (0.1% TFA in D₂O) and mobile phase B (0.1% TFA in acetonitrile). The peptide fragments were collected and sequenced.

In vitro rubber biosynthesis assay. Rubber biosynthetic activity *in vitro* was determined by the methods previously described (Cornish and Backhaus, 1990; Siler and Cornish, 1993). Latex or WRP of *F. benghalensis* and *H. brasiliensis* were incubated in 50 l of reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 M [14C]IPP (55 mCi mmol⁻¹, Amersham), 20 M FPP, 1 mM MgSO₄ and 1 mM DTT for 5 h at 25°C. For control experiments, 25 mM of EDTA was added to the reaction mixture to chelate Mg²⁺ necessary for rubber transferase activity. The resulting [14C]IPP-incorporated rubber was quantified by using a benzene extraction method as described (Oh *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2000). The reaction

mixture was extracted three times with two volume of benzene, the benzene extract was mixed with a Ready Solv HP scintillation cocktail (Beckman), and the radioactivity was determined with a liquid scintillation counter. The radioactivity determined in the presence of 25 mM EDTA was used to correct for the [¹⁴C]IPP non-specifically trapped by WRP.

Metal ion analysis. Latex was collected under ice by cutting the tree surface and was filtered through a 0.45 m PVDF membrane filters (Whatman). Mineral concentrations were determined using an inductively-coupled plasma spectrometer (Thermo Jarrell Ash Corporation, Franklin, MA., USA).

Microscopic analysis. Unfixed tissue sections were directly stained with a saturated solution of Sudan III in 70% (v/v) aqueous ethanol for 30 min (Gahan, 1984). Sections rinsed in 50% (v/v) aqueous ethanol solution were mounted in glycerin jelly and observed under light microscopy. For scanning electron microscopy (SEM) observation, wood blocks were fixed with 2% (w/v) glutaraldehyde and 2% (w/v) paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer (pH 7.4) overnight at 4°C. The fixed samples were washed with the same buffer and then post-fixed with osmium tetroxide for 2 h at 4°C. Samples dehydrated with a graded ethyl alcohol were substituted with t-butyl alcohol and then freeze-dried (Inoue and Osatake, 1988). Samples were examined under SEM (Hitach S-2400) after coating with gold.

Acknowledgements. We thank Hoong Yeet Yeang at the Rubber Research Institute of Malaysia for providing us with *H. brasiliensis* latex. We thank Young Sun Cho at Kwangju Institute of Science and Technology for assistance with NMR spectroscopy. We thank Myung Hee Nam at Korea Basic Science Institute for the analysis of peptide sequence. This work was supported in part by ARPC Grant No. 297066-5 from the Korean Ministry of Agriculture.

REFERENCES

- Attanyaka D.P.S.T.G., Kekwick R.G.O. and Franklin F.C.H. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 1079-1081.
- Backhaus R .A. (1985) Rubber formation in plants - a mini review. *Israel J. Bot.*, **34**, 283-293.
- Backhaus R.A., Cornish K., Chen S.F., Huang D.S. and Bess V.H. (1991) Purification and characterization of an abundant rubber particle protein from guayule. *Phytochem.*, **30**, 2493-2497.
- Benedict C.R., Madhavan S., Greenblatt G.A., Venkatachalam K.V. and Foster, M.A. (1990) The enzymatic synthesis of rubber polymer in *Parthenium argentatum* Gray. *Plant Physiol.*, **92**, 816-821.
- Bowers J.E. (1990) Natural rubber producing plants for the United States (Beltsville, Md.: National Agricultural Library)
- Coligan J. E. (1996) in *Current Protocols in Protein Science*, eds. Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T., Willey, New York, vol. 1, pp. 11.3.1-11.3.13.
- Cornish K. (1993) The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferase in *cis*-1,4- polyisoprene biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 267-271.
- Cornish K. and Backhaus R.A. (1990) Rubber transferase activity in rubber particles of guayule. *Phytochem.*, **29**, 3809-3813.
- Cornish K., Siler D.J. and Grosjean O.K.K. (1994) Immunoinhibition of rubber particle- bound *cis*-prenyltransferases in *Ficus elastica* and *Parthenium argentatum*. *Phytochem.*, **35**, 1425-1428.
- Cornish K. and Siler D.J. (1996) Characterization of *cis*-prenyl transferase

activity localized in a buoyant fraction of rubber particles from *Ficus elastica* latex. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 377-384.

Dennis M.S. and Light D.R. (1989) Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18608-18617.

Duch M.W. and Grant D.M. (1970) Carbon-13 chemical shift studies of the 1,4-polybutadiens and the 1,4-polyisoprenes. *Macromolecules* **3**, 165-174.

Fahn A. (1990) *Plant anatomy*. p. 544. Pergamon Press, Oxford

Gahan P.B. (1984) *Plant histochemistry and cytochemistry*. p. 301. Academic Press, London.

Goyvaerts E., Dennis M., Light D. and Chua N.H. (1991) Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol.*, **97**, 317-321.

Inoue T. and Osatake H. (1988) A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: t-butyl alcohol freeze drying method. *Arch. Histol. Cytol.*, **51**, 53-59.

Ji W., Benedict C.R. and Foster M.A. (1993) Seasonal variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium argentatum* in the chihuahuan desert. *Plant Physiol.*, **103**, 535-542.

Kang H., Kang M.Y. and Han K. H. (2000) Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree (*Ficus carica*). *Plant Physiol.*, in press.

Lynen F. (1969) Biochemical problems of rubber synthesis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **21**, 389-406.

Oh S.K., Kang H., Shin D.H., Yang J., Chow K.S., Yeang H.Y., Wagner B.,

Breiteneder H. and Han K.H. (1999) Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17132-17138.

Pan Z., Durst F., Werck-Reinchhart D., Gardner H.W., Camara B., Cornish K. and Backhaus R.A. (1995) The major protein of guayule rubber particle is a cytochrome P450: Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8487-8494.

Reddy A.R. and Das V.S.R. (1988) Enhanced rubber accumulation and rubber transferase activity in guayule under water stress. *J. Plant Physiol.*, **133**, 152-155.

Siler D.J. and Cornish K. (1993) A protein from *Ficus elastica* rubber particles is related to proteins from *Hevea brasiliensis* and *Parthenium argentatum*. *Phytochemistry* **32**, 1097-1102.

Siler D.J. and Cornish K. (1994) Identification of *Parthenium argentatum* rubber particle proteins immunoprecipitated by an antibody that specifically inhibits rubber transferase activity. *Phytochemistry* **36**, 623-627.

Stipanovic R.D., O'Brien D.H., Rogers C.E. and Hanlon K.D. (1980) Natural rubber from sunflower. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1322-1323.

Yusof, F. Audley B.G., Ismail F. and Walker J.M. (1998) A rapid assay for the incorporation of isopentenyl diphosphate in rubber biosynthesis. *J. Rubb. Res.*, **1**, 48- 66.

Table 1. Comparison of metal ion content (ppm) in the latex of *F. benghalensis*, *H. brasiliensis*, and *F. carica*

Species	Mg	K	Ca	Cu	Fe	Mn
<i>F. benghalensis</i>	1,009	420	64.0	0.34	0.44	0.53
<i>H. brasiliensis</i>	587	816	8.9	0.27	0.27	7.45
<i>F. carica</i>	3,000	1,903	267.6	1.15	0.23	0.10

The latex was filtered through a membrane with 0.45 μ m porosity, and subjected to a inductively-coupled plasma spectrometer. All values are averages based on three determinations.

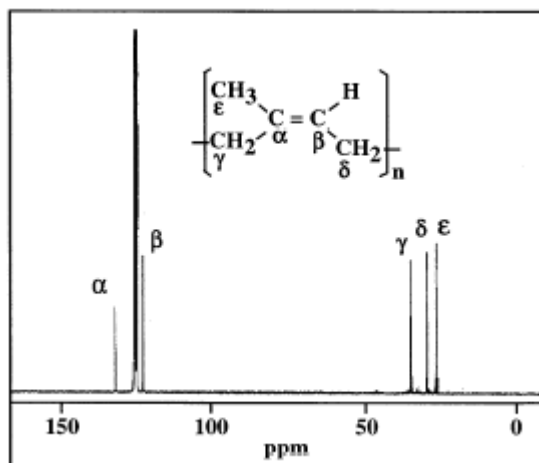


Figure 1. ¹³C NMR spectra of the rubber extracted from the latex of *F. benghalensis* in C₆D₆. About 5,000 scans were collected at a spectral width of 20,000 Hz. Representative peaks for *cis*-1,4-polyisoprene are indicated as α , β , γ , δ , and ϵ .

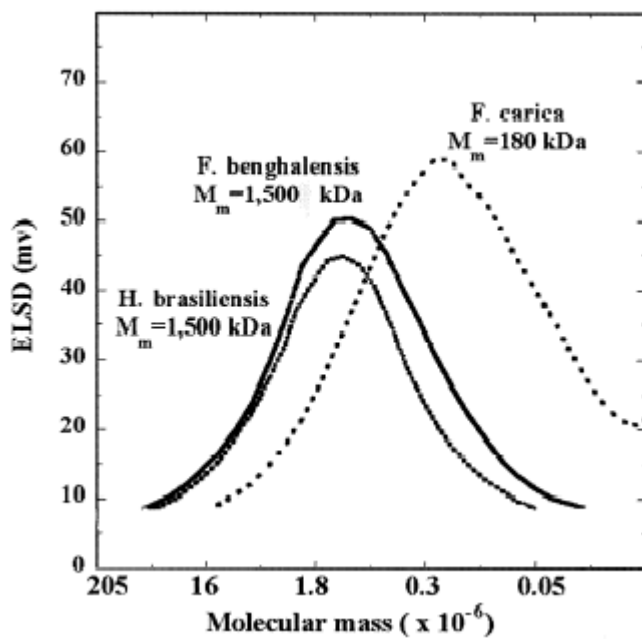


Figure 2. Molecular weight distribution of the rubber extracted from the latex of *F. benghalensis*, *H. brasiliensis*, and *F. carica*. Rubbers were extracted with benzene and subjected to a gel permeation chromatography. The effluent was monitored by an evaporative light scattering detector.

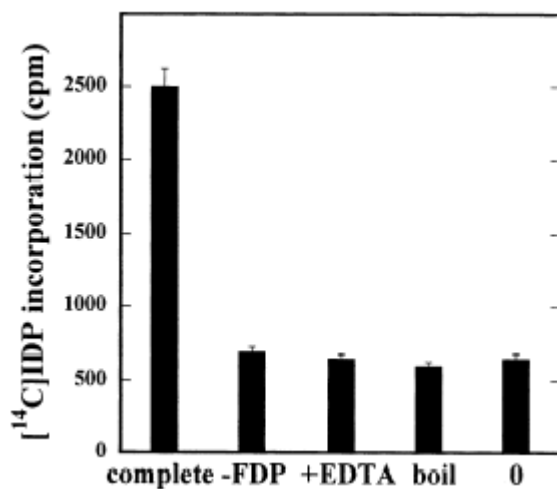


Figure 3. Rubber transferase activity in washed rubber particle of *F. benghalensis*. Reactions were carried out in 50 μ l of 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 1 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 20 mM FPP, 60 μ M [14C]IPP (55 mCi mmol⁻¹), and 5 mg WRP. Reactions were performed at 25°C for 5 h, the rubbers were extracted with benzene, and the resulting radioactivities of the 14C-labeled rubber were measured by a liquid scintillation counter; -FPP, without FPP; +EDTA, with 25 mM EDTA; Boil, WRP boiled for 5 min; 0, reaction at 0°C.

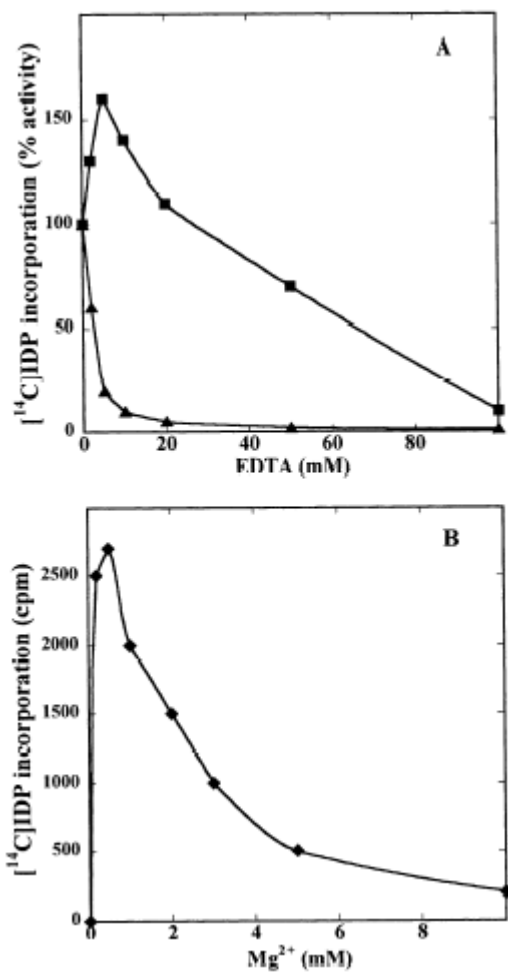


Figure 4. (A) EDTA dependent IPP incorporation in the latex of *F. benghalensis* (□) and *H. brasiliensis* (△), and (B) effect of Mg^{2+} ion on rubber transferase activity of *F. benghalensis* WRP. Reactions were carried out as described in figure 3 in 50 μl reactions containing 5 μl latex serum to evaluate the effects of EDTA (A) and 5 μg WRP to determine the effects of Mg^{2+} (B).

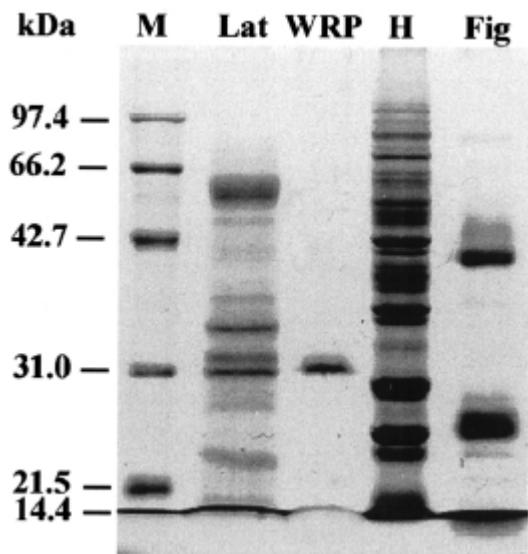


Figure 5. Analysis of the proteins in the latex and WRP of *F. benghalensis*, *H. brasiliensis*, and *F. carica* by SDS-12% PAGE. Rubber particle proteins were solubilized by incubating WRP in a detergent solution containing 0.1 % Triton X-100 and 1 % SDS. After electrophoresis, proteins were detected by Coomassie Blue staining. Lat, *F. benghalensis* latex; WRP, *F. benghalensis* washed rubber particle; H, *H. brasiliensis* latex; Fig, *Ficus carica* WRP; M, marker.

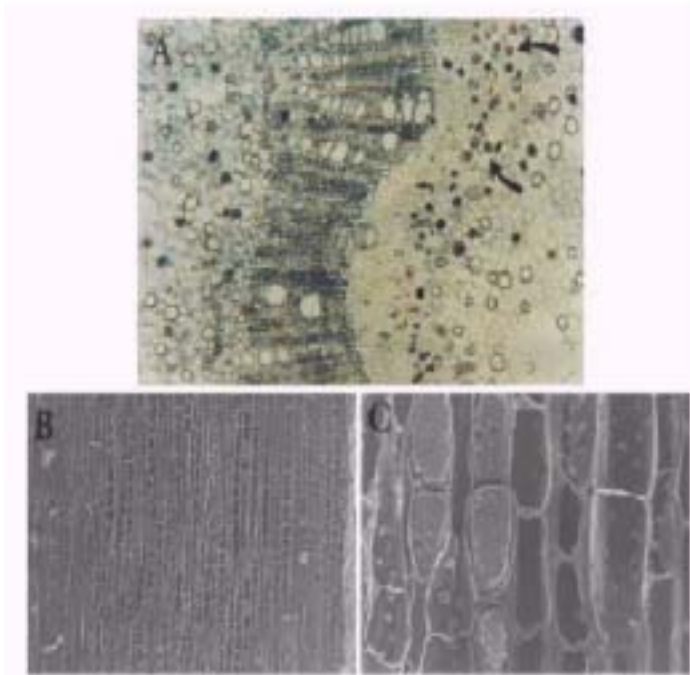


Figure 6. Microscopic examination of tissues involved in rubber biosynthesis. (A) Cross section of *F. benghalensis*. Note the arrangement of laticifers in the phloem and the pith (x 50). (B) SEM micrograph of laticifers in radial direction. Note the occurrence of latex in the simple series of elongated cells. (C) End walls of laticifers.

제 10 장 Micromorphological and protein characterization of rubber particle in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis*, and *Hevea brasiliensis*

Accepted to J. of Experimental Botany (2002, in press)

Adya P. Singh 1, **Seung Gon Wi** 1, **Gap Chae Chung** 2, **Yoon Soo Kim**1, and **Hunseung Kang** 2,3

1 Department of Forest Products and Technology,

2 Division of Applied Plant Science and Agricultural Plant Stress Research Center, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju, 500-757 Korea, and

3 Kumho Life & Environmental Science Laboratory, 1 Oryong-dong, Buk-gu, Gwangju, 500-712 Korea

Abstract

Rubber biosynthesis takes place on the surface of rubber particles. These particles are surrounded by a monolayer membrane in which the rubber transferase is anchored. In order to gain better insight into whether rubber particles from different plant species share common structural characteristics, the micromorphology of rubber particles from *Ficus carica*, *Ficus benghalensis*, and *Hevea brasiliensis* was examined by electron microscopy. Rubber particles of all three species were spherical in shape, and the size of rubber particles of *H. brasiliensis* was much smaller than that of *F. carica* and *F. benghalensis*. In addition, investigations were undertaken to compare the cross reactivity of the antibody raised against either the *H. brasiliensis* major rubber particle protein of 24 kD size, which is suggested to be involved in rubber biosynthesis, or the *cis*-prenyltransferase (CPT) which has an activity similar to rubber transferase, and catalyzes a sequential condensation of isopentenyl diphosphate with allylic diphosphate. Both Western analysis and TEM-immunogold labeling studies showed that rubber particles of *F. carica* and *F. benghalensis* do not contain the 24 kD-protein which is

present abundantly on the surface of *Hevea* rubber particles. None of the rubber particles in *F. carica*, *F. benghalensis* and *H. brasiliensis* contained the CPT, suggesting that the CPT itself could not catalyze the formation of high molecular weight rubber. These results indicate that rubber particles in the three different plant species investigated share some degree of similarity in architecture, and that the 24 kD-protein present on the surface of *Hevea* rubber particle and the CPT themselves are not the core proteins necessary for rubber biosynthesis.

Key words: electron microscopy, *Ficus benghalensis*, *Ficus carica*, *Hevea brasiliensis*, immuno-localization, micromorphology, rubber particle, rubber particle protein.

Abbreviations: CPT, *cis*-prenyltransferase; CPD, critical point drying; IDP, isopentenyl diphosphate, SEM, scanning electron microscopy, TEM, transmission electron microscopy

Introduction

The surface of rubber particles contains the enzymes and/or factors necessary for rubber biosynthesis, and is the place where rubber biosynthesis occurs. Rubber particle is a globular particle in which the hydrophobic rubber polymers are surrounded by a monolayer membrane containing various kinds of lipids, proteins, and other components (Hasma and Subramaniam, 1986; Hasma, 1991; Siler *et al.*, 1997; Cornish *et al.*, 1999; Wood and Cornish, 2000). Since rubber transferase, the key enzyme for rubber biosynthesis, is one of the proteins associated with the monolayer membrane, it is considered a membrane protein. It loses its activity once it is isolated from rubber particles. Therefore, in an effort to identify the rubber transferase and/or additional factors important for rubber biosynthesis, many research groups have investigated rubber particles and the proteins associated with them in *Hevea brasiliensis* (Attanyaka *et al.*, 1991; Cornish, 1993; Dennis and Light, 1989; Goyvaerts *et al.*, 1991; Light and Dennis, 1989; Oh *et al.*, 1999), *Parthenium argentatum* Gray (guayule) (Backhaus *et al.*, 1991; Benedict *et al.*, 1990;

Cornish and Backhaus, 1990; Cornish *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1995; Siler and Cornish, 1993), *Ficus elastica* (Cornish and Siler, 1996; Siler and Cornish, 1994), *Ficus carica* (Kang *et al.*, 2000a), and *Ficus benghalensis* (Kang *et al.*, 2000b).

Despite continued efforts to identify rubber transferase, the nature of this extremely interesting enzyme has not yet been verified. In *H. brasiliensis* a 14 kD-protein tightly associated with the large rubber particles was suggested to be a rubber elongation factor (Dennis and Light, 1989), and its gene has been cloned (Attanyaka *et al.*, 1991; Goyvaerts *et al.*, 1991). However, the direct role of this protein in rubber biosynthesis has not been proven. More recently, Oh *et al.* (1999) have isolated a cDNA from *H. brasiliensis* which encodes a major rubber particle protein of 24 kD, tightly associated with small rubber particle (designated SRPP). They demonstrated that the SRPP plays a positive role in isopentenyl diphosphate (IDP) incorporation into rubber polymer. In guayule the most abundant rubber particle protein of 48.5 kD size was sequenced to be a P450 allen oxide synthase (Pan *et al.*, 1995). Based on a series of cross-specific immunoinhibition analyses, a 375 kD-protein was suggested to be a rubber transferase in *F. elastica* (Cornish *et al.*, 1994; Siler and Cornish, 1993,1994). Proteins present in the latex and rubber particles of *F. benghalensis* have been analyzed, and the protein of 31 kD size was found to be the most abundant in catalytically-active rubber particles (Kang *et al.*, 2000b).

Since the surface of rubber particles is the place where rubber biosynthesis takes place, it is of importance to investigate the structure of rubber particles and to characterize the rubber particle-associated proteins in various plant species, not only to identify the rubber transferase and/or additional important factors for rubber biosynthesis but also to understand the relationship between the size or composition of rubber particles and the quality of final rubber products. The microstructures and particle size distribution of rubber particles from *H. brasiliensis*, *P. argentatum*, *F. elastica*, and *Euphorbia lactiflua* have been examined by various electron microscopic techniques (Gomez and Hamzah, 1989; Yeang *et al.*, 1995; Cornish *et al.*, 1999; Wood and Cornish, 2000). However, studies involving

immunolocalization of membrane proteins are limited. Bahri and Hamzah (1996) used immunogold labeling technique in conjunction with electron microscopy to confirm the presence of the 14 kD- and 24 kD-proteins on the surface of *H. brasiliensis* rubber particles.

In this study, we examined the micromorphology of rubber particles from *F. carica* and *F. benghalensis*, the *Ficus* species recently identified as rubber producing plants by our group (Kang *et al.*, 2000a; 2000b), and compared it with that from *H. brasiliensis*. In addition, to understand whether rubber particles of these three plant species contain similar proteins, the presence of rubber particle proteins deemed important was investigated by Western analysis and transmission electron microscopy (TEM)-immunogold cytochemistry. One of the proteins investigated in this study was the 24 kD-protein designated as SRPP. This major rubber particle protein in *H. brasiliensis* has been suggested to be involved in rubber biosynthesis (Oh *et al.*, 1999). The other protein was the *cis*-prenyltransferase (CPT) which has a catalytic activity similar to rubber transferase. It catalyzes a sequential condensation of IDP with allylic diphosphate, but produces the shorter chain length polyprenyl diphosphates ranging in carbon number from C50 to C120 (Ogura and Koyama, 1998). It was therefore important to investigate the presence of these proteins on the surface of rubber particles in *H. brasiliensis*, *F. carica*, and *F. benghalensis*, and we used biochemical and TEM-immunogold techniques to obtain the information.

Materials and Methods

Plant Material

The latex samples of *F. carica* and *F. benghalensis* were obtained from the plants grown in a greenhouse maintained at 30°C under constant light. *H. brasiliensis* latex was obtained from the Rubber Research Institute of Malaysia. The latex was collected directly into the ice-cold buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgSO₄, and 5 mM dithiothreitol.

Preparation of washed rubber particles

The latex of *H. brasiliensis* was centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4 °C, and the latex of *F. carica* and *F. benghalensis* was centrifuged at 10,000 g for 5–10 min at 4 °C. The top creamy fraction of rubber particle was collected, resuspended in the same buffer, and recentrifuged. The rubber particles of *F. carica* and *F. benghalensis* sedimented during the washing cycle, whereas the *Hevea* rubber particle remained afloat. The non-rubber fractions were discarded, and this washing procedure was repeated three times as described previously (Cornish and Backhaus 1990, Siler and Cornish 1993; Kang *et al.*, 2000a). The washed rubber particles were stored at 20 °C until use, or were used directly for Western and immunogold label analyses.

Western blot analysis

Rubber particle proteins were solubilized by incubating the rubber particles in a detergent solution containing 0.1% (w/v) Triton X-100 and 1% (w/v) SDS. The detergent-treated suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, and the supernatant fraction was separated by SDS-12% PAGE. The gels were subsequently used for Western blotting where the proteins in the gel were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. For the detection of the 24 kD-protein, the membrane was incubated with the buffer containing the polyclonal rabbit antibody raised against the 24 kD-protein from *H. brasiliensis* as described earlier (Kang *et al.*, 2000a). For the detection of the *cis*-prenyltransferase, the polyclonal rat antibody was raised against the synthetic peptide (DLMIRTSGEQRISNF) in which the sequence was designed based on the conserved amino acid sequence of CPTs from plants and microorganisms, which corresponds to the positions from 246 to 260 of *Arabidopsis* CPT (Oh *et al.*, 2000). After three cycles of washing with TBS-T buffer or PBS-milk, respectively, the membrane was incubated for 1 h with anti-IgG antiserum conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech). After a further three cycles of washing with the same buffer, the proteins on the membrane were detected by the enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

Electron microscopy

The shape and diameter of rubber particles were determined by scanning electron microscopy (SEM). Initial attempt to characterize particle shape and diameter using critical point drying (CPD), a widely used method for studying biological materials, proved unsuccessful, because this method caused severe collapse of particles. A novel air-drying method that we developed specifically for this work, and which proved most suitable, is described here. The purified rubber fraction from freshly collected latex was fixed in 3% glutaraldehyde in 50 mM sodium cacodylate buffer (containing 1% tannic acid) for 1 h at room temperature. After washing in several changes of buffer, the samples were post-fixed in 1% aqueous osmium tetroxide also for 1 h at room temperature, and subsequently washed in several changes of distilled water. A small drop of the suspension (appropriately diluted) was air dried on a piece of cover glass. The cover glass was then placed on a stub applied with a double-sided tape, sputter-coated with gold and examined with a Hitachi S-2400 SEM.

Immunocytochemistry

Our initial attempts to process samples using the fixation procedures used routinely for immunocytochemical work were not successful. Neither the paraformaldehyde-glutaraldehyde (2.5%: 0.5%) combination nor glutaraldehyde (3%) alone could stabilize the spherical form of rubber particles. Glutaraldehyde-tannic acid combination, as used for SEM work, was effective in keeping the natural form of rubber particles: however, gold-labeling was poor and non-specific. The method that worked well was fixation with osmium tetroxide. Details of this fixation method and immuno-labeling procedures are described below.

The purified rubber fraction from *H. brasiliensis*, *F. carica*, and *F. benghalensis* was fixed with 1% osmium tetroxide (in 50 mM sodium cacodylate buffer) for 1 h at room temperature. After washing in buffer, a small drop of the rubber was placed on formvar coated nickel grids and air-dried. Procedure for immuno-gold labeling was similar to that described by Kim *et al.* (2002). Prior to treatment with the primary antibody, grids were sequentially floated on drops of glycine (in PBS buffer), distilled water, PBS buffer, and normal goat serum (NGS)-PBS buffer. Grids from all samples were treated with 24 kD-protein antibody (1:200 dilution) and

CPT antibody (1:100 dilution) for 90 min at 37 °C. After sequential wash in PBS–nonfat milk–tween 20, PBS, and Tris–HCl, samples were treated with following gold conjugated (10 nm) secondary antibodies (1:20 dilution) for 2 h at room temperature. Samples exposed to the 24 kD–protein antibody were treated with anti–rat IgG and those exposed to the CPT antibody were treated with anti–rabbit IgG. Samples were then washed sequentially with TBS–tween 20, TBS, Tris–HCl, and distilled water. For control, samples were processed as above, except that they were not incubated with the primary antibodies. Grids were air–dried and examined with a JEOL JEM1010 TEM.

Results

Comparison of the shape and size of rubber particles

Rubber particles of all three species, *H. brasiliensis*, *F. carica*, and *F. benghalensis*, were predominantly spherical in shape (Figs. 1–3). Only in *F. benghalensis* some particles were also elongated, but this appears to have been induced by centrifugation and thus is not a normal shape. Although several size populations of particles were observed for all species examined, the range was greatest for *Hevea*, which also had the smallest size particles. Only marginal differences were observed between *F. carica* and *F. benghalensis* size populations as well as the size of individual particles. For *Hevea* (Fig.1), it was possible to categorize particles into three size groups: largest particles with a diameter range of 0.4–0.75 μ m, intermediate size particles with a diameter range of 0.25–0.35 μ m, and smallest particles with a diameter range of 0.08–0.2 μ m. The particles of *F. carica* (Fig. 2) and *F. benghalensis* (Fig. 3) could be categorized into two size groups, although the size range for largest particles of *F. benghalensis* was somewhat greater as compared to *F. carica*. Also, largest particles of *F. carica* were slightly larger than those of *F. benghalensis*. Smaller size particles were less abundant than larger size particles for both species. The largest particles of *F. carica* measured 3.7–6.5 μ m in diameter, and those of *F. benghalensis* measured 3.0–6.0 μ m. The smaller particles of *F. carica* measured 1.6–3.0 μ m and those of *F. benghalensis* measured 1.6–2.3 μ m.

Western analysis of the proteins on the surface of rubber particles

The presence of the two proteins, the 24 kD-protein designated as SRPP and the *cis*-prenyltransferase, was investigated by Western analyses. The 24 kD-protein is a major rubber particle protein in *H. brasiliensis* and is suggested to be involved in rubber biosynthesis and the *cis*-prenyltransferase has a similar catalytic activity like rubber transferase and catalyzes a sequential condensation of IDP with allylic diphosphate to produce the polyprenyl diphosphates ranging in carbon number from C50 to C120 in microorganisms and *Arabidopsis*. We specifically wanted to probe whether the rubber particles of *F. carica*, *Hevea* rubber tree, and *F. benghalensis* contain the two proteins on their surface. The proteins tightly associated with the rubber particles after extensive washing were solubilized in a detergent solution, separated on denaturing gel, and were reacted with either the 24 kD-protein antibody or the CPT antibody. As shown in Figure 4A, the 24 kD- and the 14 kD-proteins on *Hevea* rubber particles cross-reacted with the 24 kD-protein antibody. The cross-reactivity of both the 24 kD- and the 14 kD-proteins with the polyclonal antibody raised against the 24 kD-protein was well established, since the 24 kD- and 14 kD-proteins share a high degree of sequence homology in their amino acid sequences (Oh *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2000a). In contrast, neither the *F. carica* proteins nor the *F. benghalensis* proteins reacted with the 24 kD-protein antibody. These results indicate that the 24 kD-protein abundantly present on the rubber particles of *Hevea* rubber tree is not a common protein necessary for rubber biosynthesis in rubber producing plants.

For the detection of the *cis*-prenyltransferase, the polyclonal rat antibody was raised against the synthetic peptide (DLMIRTSGEQRISNF) in which the sequence was designed based on the conserved amino acid sequence of CPTs from plant and microorganisms, and corresponds to the positions from 246 to 260 of *Arabidopsis* CPT (Oh *et al.*, 2000). Figure 4B shows that the CPT antibody did not react with any of the proteins isolated from the rubber particles of *F. carica*, *H. brasiliensis*, and *F. benghalensis*. Since the CPT is ubiquitous in all living organisms, the protein extract isolated from tobacco leaves was used as a positive control. The tobacco leaf protein of about 32 kD in size was clearly reacted with

the CPT antibody. The absence of cross-reactivity of the proteins isolated from *F. carica*, *H. brasiliensis*, and *F. benghalensis* with the CPT antibody indicates that *cis*-prenyltransferase does not reside on the surface of rubber particles, and is not a key determinant necessary for rubber biosynthesis in plants.

Immunogold labeling of the proteins on the surface of rubber particles

The TEM examination of rubber samples, which had been incubated with the 24 kD-protein antibody and subsequently treated with gold conjugated secondary antibody, provided evidence for intense gold labeling of *H. brasiliensis* rubber particles, and absence of labeling of *F. carica* and *F. benghalensis* rubber particles. Several *H. brasiliensis* rubber particles are shown at low magnification in Figure 5A. At this magnification gold particles were just detected as small, electron dense granules associated exclusively with rubber particles, and there were no indications of any background labeling. Gold particles were attached to the margins of all rubber particles, and in case of smaller particles, which are less dense, gold particles appeared to be also distributed all over the surface. Gold particles labeling are more clearly visible in the high magnification view in Figure 5B. The size of rubber particles is variable in the population shown in this figure. All rubber particles were intensely labeled, and numerous gold particles were associated with the margins of the particles. Where resolvable, gold particles could also be seen all over the surface of rubber particles. There appeared to be no difference between large and small rubber particles of *H. brasiliensis* with regard to labeling intensity. However, confirmation of this point will require quantification, which was not undertaken in this work. Evidence of complete absence of gold labeling of *F. carica* and *F. benghalensis* rubber particles is presented in Figure 6. TEM examination of rubber samples, which had been incubated with the CPT antibody and subsequently treated with gold conjugated secondary antibody, did not show any gold labeling of rubber particles in all species examined (data not shown).

Discussion

Observations of the size, form and architecture of rubber particles, and characterization of the proteins on the surface of rubber particles are of great importance to understand the mechanism of rubber chain elongation and chain length determination, and in relation to the properties of the final rubber products. It is to be indicated at the outset that microscopic characterization of rubber particles is difficult (Condon and Fineran, 1989) probably because the membrane which encloses rubber material within individual particles is highly sensitive to chemical treatments employed in conventional microscopy preparations. Aldehydes destabilize latex particles, rendering them susceptible to fusion, and dehydrating agents, such as acetone and ethanol, cause extraction of internal contents (Condon and Fineran, 1989). It is therefore not surprising that our initial attempts to process rubber samples by conventional preparation methods for SEM and TEM observations were unsuccessful. Tannic acid is known to stabilize some tissue components against extraction (Simionescu and Simionescu, 1976), which was used as an additional fixative mixed with aldehyde. Tannic acid has also been used to increase osmification of tissue culture cells (Katsumoto *et al.*, 1981). In our SEM work, initial fixation was with a combination of glutaraldehyde and tannic acid, and post-fixation with osmium tetroxide. It appears that a combination of these treatments stabilized rubber particles adequately for them to withstand the forces of surface tension generated during air-drying. Interestingly, the same fixation procedure used in conjunction with CPD failed to stabilize particles, large populations of which were severely collapsed. It is likely that the bounding membrane was not completely stabilized and became leaky during the ethanol-dehydration step of CPD, resulting in the extraction of the internal contents of rubber particles, and their consequent collapse. This highlights the importance of developing a suitable method for preserving rubber particles in their natural size and form, because these together with compositional characteristics are likely to be important factors in determining the properties of rubber in industrial processing.

The shape and size distribution of the rubber particles detected in this study compare well with the previously reported results (Gomez and

Hamzah, 1989; Cornish *et al.*, 1993; Wood and Cornish, 2000). Among the three plant species examined, *H. brasiliensis*, producing high molecular weight rubber, had the smallest rubber particles and *F. carica*, producing low molecular weight rubber, had the largest rubber particles. This correlation of particle size with molecular weight is consistent with the previous report that higher molecular weights were associated with the smaller rubber particles (Yeang *et al.*, 1995).

Conventionally, a mixture of paraformaldehyde and glutaraldehyde has been used to fix biological materials in immuno-TEM studies. In the fixation medium, these components are used in such a proportion that a proper balance between adequate fixation of cell components and the antigenicity is achieved. However, in our immuno-TEM work, glutaraldehyde based fixation resulted in poor stabilization of rubber particles and non-specific gold labeling. The fixation of rubber fraction directly in osmium tetroxide was proved to be most satisfactory method. Although for immunocytochemistry this is not a fixative of choice because of concerns that it may adversely affect tissue antigenicity, the high labeling intensity of *H. brasiliensis* rubber particles, which had been incubated in the 24 kD-protein antibody, suggests that immunogenic properties of the bounding membrane of rubber particles were not affected by osmium fixation, and this is a suitable fixation method for rubber material.

The surface of rubber particles contains the enzymes and/or factors necessary for rubber biosynthesis, and is the place where rubber biosynthesis occurs. In an effort to identify the key enzyme, rubber transferase and/or additional factors, for rubber biosynthesis, many research groups have investigated the rubber particles and the proteins associated with the rubber particles. In *H. brasiliensis* the 14 kD- and 24 kD-proteins tightly associated with rubber particles has been suggested to be involved in rubber biosynthesis (Dennis and Light, 1989; Attanyaka *et al.*, 1991; Goyvaerts *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 1999). Our study has provided additional information by investigating whether the 24 kD-protein found on the surface of *Hevea* rubber particles is also present on the rubber particles of *F. carica* and *F. benghalensis*. The observations presented here clearly

indicate that the rubber particles of *F. carica* and *F. benghalensis* do not contain the 24 kD-protein found in *H. brasiliensis* (Figs. 5 and 6). The absence of the 24 kD-protein in *F. carica* and *F. benghalensis* implies that the 24 kD-protein, the most abundant protein in rubber tree, is not a universal protein required for rubber biosynthesis in rubber-producing plant species. It has been suggested that the 24 kD-protein designated as SRPP plays a positive role in rubber biosynthesis (Oh *et al.*, 1999). If this protein is a rubber transferase or forms a rubber transferase complex, the similar protein should be present on the rubber particles of every rubber producing plant species. We could not find cross-reactivity of the rubber particle proteins isolated from *F. carica* and *F. benghalensis* with the 24 kD antibody, which implies that the 24 kD-protein is not a rubber transferase required for rubber chain elongation.

Prenyltransferase is an enzyme that catalyzes the synthesis of linear prenyl diphosphates involved in the biosynthesis of various isoprenoid compounds including natural rubber. Based on the configuration of isoprene units in the final reaction products, prenyltransferases are classified into two classes: *trans*- and *cis*-prenyltransferase. Rubber transferase belongs to a family of CPT that catalyze the formation of polyprenyl diphosphates by sequential condensation of IDP to allylic diphosphate. The plant CPT gene has recently been cloned from *Arabidopsis*, and the analysis has shown that the *Arabidopsis* CPT catalyzes the formation of polyprenyl diphosphates with predominant carbon number C120. (Oh *et al.*, 2000). No CPT genes from rubber producing plants have been as yet isolated. Therefore, it is of critical importance to isolate the CPT from rubber producing plant species, and to test if the CPT could catalyze the formation of higher molecular weight polymers similar to natural rubber. Our present Western and immunogold label analyses showed that the rubber particles of all three plant species tested, *F. carica*, *H. brasiliensis*, and *F. benghalensis*, do not contain the CPT. This implies that CPT itself is not a part of the rubber transferase complex.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant (No. R11-2001-003104-0) from Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) to the Agricultural Plant Stress Research Center, and by a grant (No. 297066-5) from the Agricultural Research Promotion Center, Korea Ministry of Agriculture. Adya Singh is grateful to KOSEF for the Brain Pool Scientist Award.

References

- Attanyaka DPSTG, Kekwick RGO, Franklin FCH. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biology* 16, 1079–1081.
- Backhaus RA, Cornish K, Chen SF, Huang, DS, Bess VH. 1991. Purification and characterization of an abundant rubber particle protein from guayule. *Phytochemistry* 30, 2493–2497.
- Bahri ARS, Hamzah S. 1996. Immunocytochemical localization of rubber membrane protein in *Hevea* latex. *Journal of Natural Rubber Research* 11, 88–95.
- Benedict CR, Madhavan S, Greenblatt GA, Venkatachalam KV, Foster MA. 1990. The enzymatic synthesis of rubber polymer in *Parthenium argentatum* Gray. *Plant Physiology* 92, 816–821.
- Condon JM, Fineran BA. 1989. The effect of chemical fixation and dehydration on the preservation of latex in *Calystegia silvatica* (Convolvulaceae): examination of exudate and latex *in situ* by light and scanning electron microscopy. *Journal of Experimental Botany* 40, 925–939.
- Cornish K. 1993. The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferase in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* 218, 267–271.
- Cornish K, Backhaus RA. 1990. Rubber transferase activity in rubber particles of guayule. *Phytochemistry* 29, 3809–3813.
- Cornish K, Siler DJ. 1996. Characterization of *cis*-prenyl transferase activity localized in a buoyant fraction of rubber particles from *Ficus elastica* latex. *Plant Physiology and Biochemistry* 34, 377–384.
- Cornish K, Siler DJ, Grosjean OK. 1994. Immunoinhibition of rubber particle-bound *cis*-prenyltransferases in *Ficus elastica* and *Parthenium*

argentatum. *Phytochemistry* 35, 1425-1428.

Cornish K, Siler DJ, Grosjean OK, Goodman N. 1993. Fundamental similarities in rubber particle architecture and function in three evolutionarily divergent plant species. *Journal of Natural Rubber Research* 8, 275-285.

Cornish K, Wood DF, Windle JJ. 1999. Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogenous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane. *Planta* 210, 85-96.

Dennis MS, Light DR. 1989. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*: Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 264, 18608-18617.

Gomez JB, Hamzah S. 1989. Particle size distribution in *Hevea* latex—some observations on the electron microscopic method. *Journal of Natural Rubber Research* 4, 204-211.

Goyvaerts E, Dennis MS, Light DR, Chua NH. 1991. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology* 97, 317-321.

Hasma H. 1991. Lipids associated with rubber particles and their possible role in mechanical stability of latex concentrates. *Journal of Natural Rubber Research* 6, 105-114.

Hasma H, Subramaniam A. 1986. Composition of lipids in latex of *Hevea brasiliensis* clone RRIM 501. *Journal of Natural Rubber Research* 1, 30-40.

Kang H, Kang MY, Han KH. 2000a. Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree. *Plant Physiology* 123, 1133-1142.

Kang H, Kim YS, Chung GC. 2000b. Characterization of natural rubber

biosynthesis in *Ficus benghalensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 979–987.

Katsumoto T, Naguro T, Tino A, Takagi A. 1981. The effect of tannic acid on the preservation of tissue culture cells for scanning electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 30, 177–182.

Kim YS, Wi SG, Grünwald C, Schmitt U. 2002. Immuno electron microscopic localization of peroxidases in the differentiating xylem of *Populus*. *SPP. Holzforschung* 56, 355–359.

Light DR, Dennis MS. 1989. Purification of a prenyltransferase that elongates *cis*-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Journal of Biological Chemistry* 264, 18589–18597.

Ogura K, Koyama T. 1998. Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chemical Reviews* 98, 1263–1276.

Ok SK, Han KH, Ryu SB, Kang H. 2000. Molecular cloning, expression, and functional analysis of a *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*: implication in rubber biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18482–18488.

Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han KH. 1999. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17132–17138.

Pan Z, Durst F, Werck-Reinhardt D, Gardner HW, Camara B, Cornish K, Backhaus RA. 1995. The major protein of guayule rubber particle is a cytochrome P450: Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *Journal of Biological Chemistry* 270, 8487–8494.

Siler DJ, Cornish K. 1993. A protein from *Ficus elastica* rubber particles is related to proteins from *Hevea brasiliensis* and *Parthenium argentatum*.

Phytochemistry 32, 1097–1102.

Siler DJ, Cornish K. 1994. Identification of *Parthenium argentatum* rubber particle proteins immunoprecipitated by an antibody that specifically inhibits rubber transferase activity. *Phytochemistry* 36, 623–627.

Siler DJ, Goodrich-Tanrikulu M, Cornish K, Stafford AE, Mckeen TA. 1997. Composition of rubber particles of *Hevea brasiliensis*, *Parthenium argentatum*, *Ficus elastica*, and *Euphorbia lactiflua* indicates unconventional surface structure. *Plant Physiology & Biochemistry* 35, 881–889.

Simionescu N, Simionescu M. 1976. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. *Journal of Cell Biology* 70, 608–621.

Wood DF, Cornish K. 2000. Microstructure of purified rubber particles. *International Journal of Plant Science* 161, 435–445.

Yeang HY, Yip E, Hamzah S. 1995. Characterization of zone 1 and zone 2 rubber particles in *Hevea brasiliensis* latex. *Journal of Natural Rubber Research* 10, 108–123.

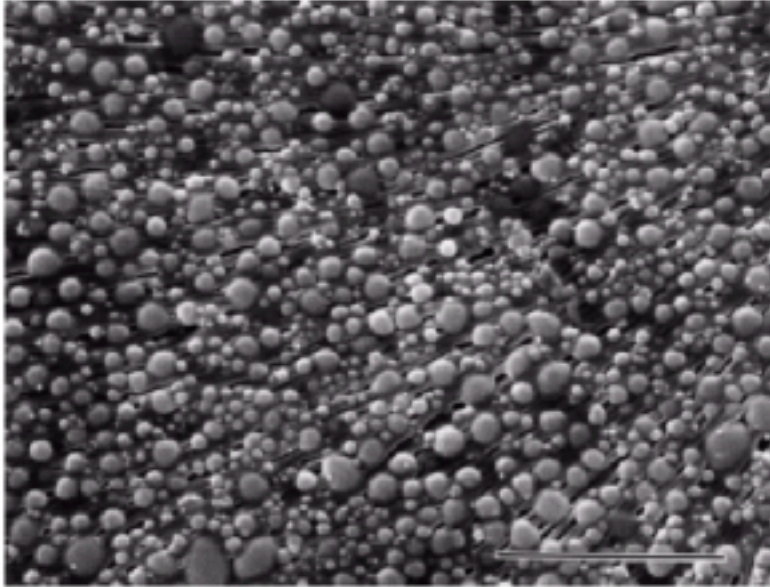


Fig. 1. *H. brasiliensis* rubber particles. The particles are spherical and vary greatly in their size. SEM. Bar = 5 μ m

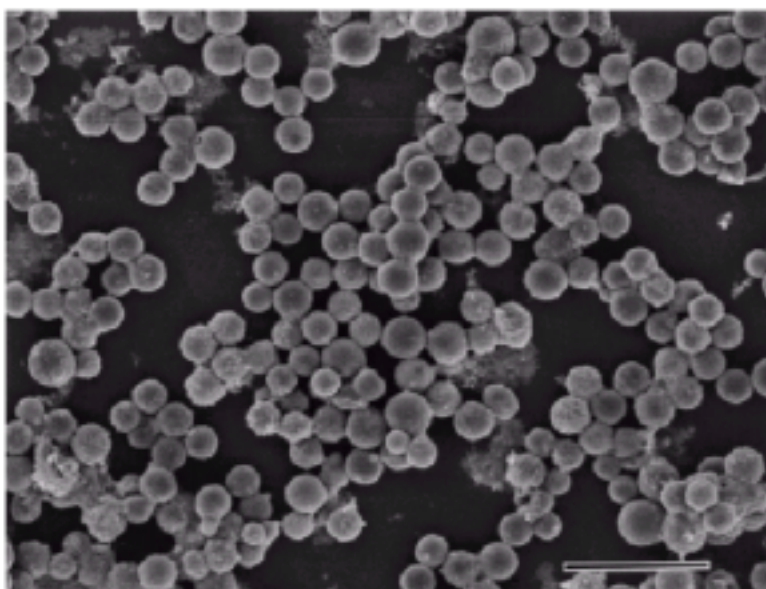


Fig. 2. *F. carica* rubber particles. The particles are much larger than *Hevea* rubber particles and less variable in their size. SEM. Bar = 20 μm

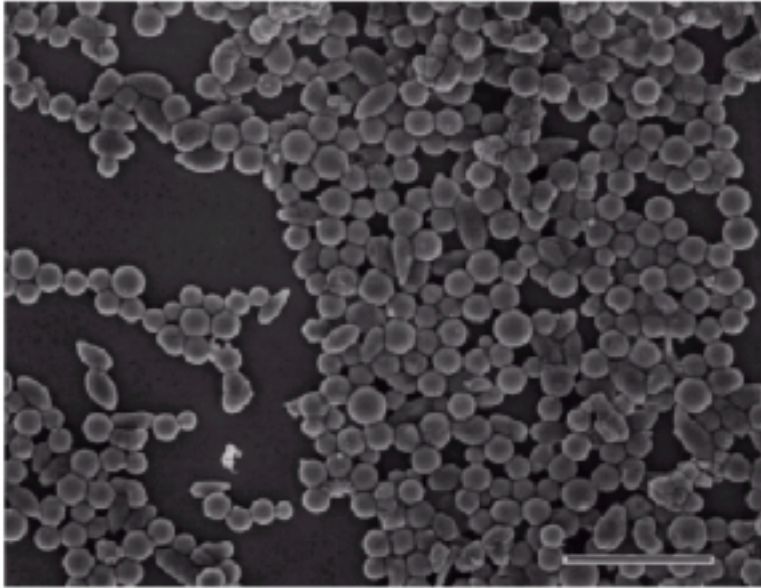


Fig. 3. *F. benghalensis* rubber particles. The particles are much larger than those of *H. brasiliensis* but are similar in size to *F. carica*. Majority of particles are spherical, but some are oblong. SEM. Bar = 20 μ m



Fig. 4. Western analyses of the solubilized rubber particle proteins. The proteins were separated on SDS-12% polyacrylamide gel and transferred to the membranes, which were reacted with the antibody raised against either the 24 kD-protein (A) or the *cis*-prenyltransferase (B). Hev, *H. brasiliensis*; Fig, *F. carica*; Fb, *F. benghalensis*; Tb, tobacco.

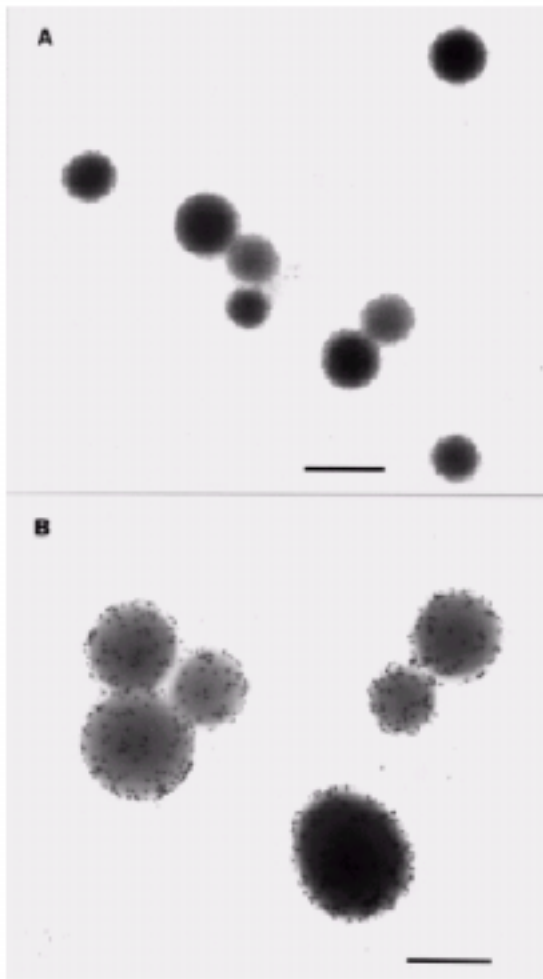


Fig. 5. *H. brasiliensis* rubber particles which had been incubated with the 24 kDa-protein antibody and subsequently treated with gold conjugated secondary antibody. All rubber particles are intensely labeled, and there is virtually no background labeling. (A) Gold particles appear small at this magnification but are distinguishable. TEM. Bar = 500 nm (B) At this high magnification gold particles are clearly visible, and are associated with the margin of rubber particles. In less dense rubber particles, gold particles can also be seen over the entire surface. TEM. Bar = 200 nm

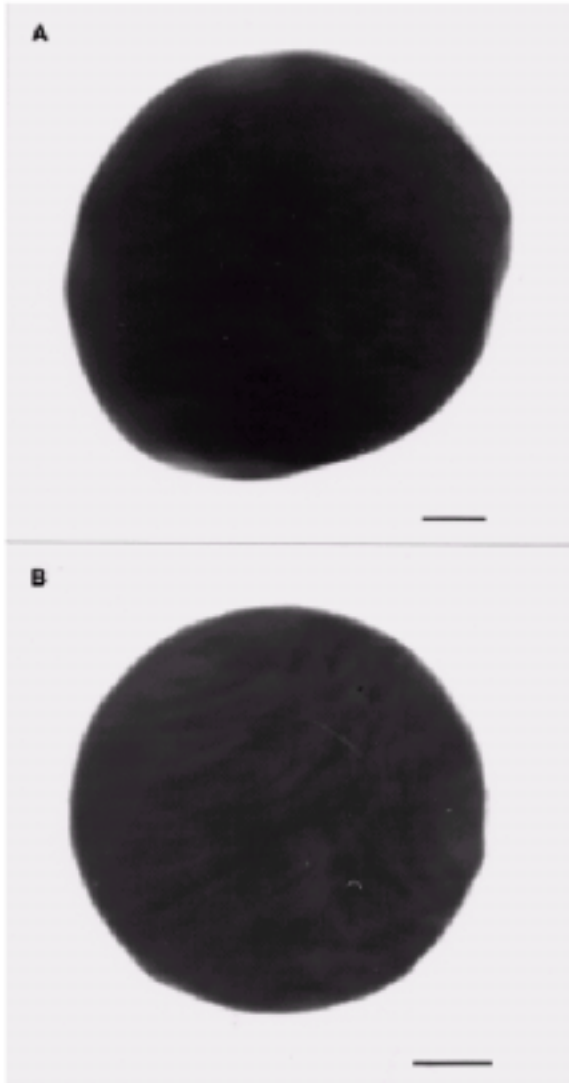


Fig. 6. The rubber particles of (A) *F. carica* and (B) *F. benghalensis*, which had been incubated with the 24 kD-protein antibody and subsequently treated with gold conjugated secondary antibody. There is complete absence of gold labeling. TEM. Bar = 500 nm