

## 옥수수 의 색소 발현에 관련된 조직 특이성 조절유전자 R locus에 관하여

임용표  
(한국인삼연구소)

## Tissue Specific Gene Regulation of The Anthocyanin Synthesis Regulator Gene R in Maize

Lim, Yong-Pyo  
(Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon)

### Abstract

The R locus of maize is one of several genes that regulate the anthocyanin pigments throughout the body of the plant and seed. The R gene product may regulate pigment deposition by controlling the expression of the flavonoid biosynthetic gene pathway in a tissue-specific manner. To understand the basis for tissue specific regulation and allelic variation at R, the molecular study has been done by cloning a portion of the R complex by transposon tagging with Ac. R specific probe were cloned from the R-nj mutant induced by Ac insertion mutagenesis. From southern analysis of R-r complex using the R-nj probe, the structure of R-r was proposed that R-r contains the three elements, (P)(Q)(S). These elements may organize as the inversion triplication model which (S) sequence was inverted in relation to (P) and (Q). The R-sc derived from R-mb or R-nj was cloned with R-nj probe, and molecular genetical data showed that R-sc contains tissue specific and tissue nonspecific area, and the sequencing of R-sc are progressed now.

## 서 론

옥수수(玉蜀黍)는 고등식물의 유전학 연구 재료로서 가장 훌륭한 system으로 알려져왔다 (Coe and Neuffer, 1977). 옥수수는 10쌍의 염색체로 구성된 2배체 식물이며 표지 유전자가 매우 많이 알려져 있으며 자웅이화로 구성되어 있어 교배가 수월하다. 각 옥수수대 (ear)내에 수백개의 개체집단으로 형성되어 유전자의 분석이 용이하다. 중복수정에 의해 2배체 배와 3배체의 배유를 함께 생산함으로써 배유의 표현형으로 배의 유전자형을 추정할 수 있다. 또한 3배체 배유는 교배의 방법을 조절함으로써 유전자의 dosage효과를 구명할수 있기도 하다. 유전자 probe, recombinant library, RFLP marker (Helentjaris *et al.*, 1986), 다량의 유전자 stock 등은 여러 연구에 옥수수의 사용을 가능케 하는 요인이기도 하다. 유전자의 분석 특히 Ac/Ds system을 이용한 transposition events를 연구하기 위하여는 excision과 integration 모두를 인지할수 있는 표지 유전인자의 유무가 대단히 중요하다. 이러한 표지 유전자로서 적색과 자주색의 표현형을 조절하는 anthocyanin색소 합성에 관여하는 유전자들이 많이 이용되어 왔다. 이러한 색소의 합성에 관여하는 유전자의 발현은 색소의 수준 또는 분포의 변화를 눈으로 식별이 가능함에 따라 유전형질의 변화를 용이하게 탐지할수 있다.

적어도 14개의 다른 loci가 색소의 합성, 색소의 분포의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Coe and Neuffer, 1977). 그중 P와 R locus는 이러한 색소 pattern의 조절 기능에 관여하는 조절 유전자로 알려져 있다(Styles and Ceska, 1977; Styles *et al.*, 1973). P locus는 pericarp, cob의 색소를 조절하며 동시에 silk의 flavonoid 물질의 생산을 조절한다. R locus 역시 식물체와

종자에 anthocyanin 색소 발현을 조절하는 대표적인 유전자이다.

R 유전자는 적어도 2가지 방법에 의해 색소의 발현을 조절한다. 첫째로 R 유전자는 여러 조직내에 식물의 developmental stage에 따라 시간적 공간적 특이성적 발현을 한다. 둘째로, 활성화된 R 유전자는 색소 발현 구조 유전자 발현의 초기와 말기 단계(C2와 bronze gene)의 정상 활성화를 위해 요구되며 아마도 기작의 다른 단계 (A1, A2, C, bronze-2 gene)의 유전자 발현에도 관여하는 듯하다. 따라서 R 유전자는 조직 특이성 양식으로 anthocyanin 합성 유전자 기작의 발현을 조절함에 의해 색소의 형성을 조절하는 대표적인 조절 유전자이다.

본 연구에서는 이러한 조직 특이성 조절 유전자 R locus의 구조와 유전분석에 대하여 논하고 controlling element Ac/Ds를 이용한 유전자의 cloning, 유전자의 구조 분석, 그리고 이러한 조절 유전자에 의한 특이한 유전양식에 관하여 그동안 연구된 자료를 가지고 논하기로 한다.

## 본 론

### 1. Anthocyanin 합성 유전자

옥수수 호분층내의 anthocyanin 색소 합성에 대한 유전자의 역할은 gene interaction에 관한 교과서적인 예로서 오래전부터 알려져 있다. 한 쌍의 complementary gene으로서 옥수수의 aleurone color factors c와 r가 알려진 이래 (East and Hayes, 1911) 70여년 동안 anthocyanin 색소 합성에 관한 연구가 활발히 이루어졌다.

적어도 7개의 다른 염색체에 mapping된 11개의 loci가 anthocyanin 합성에 요구되며, 이 유전자는 a, a2, bz, bz2, c, c2, pr, dek1, r, b, 그리고 vp이다.

dek1는 배발생(Neuffer and Sheridan, 1981), vp는 휴면 (Robertson, 1955) 과 함께 색소 합성에 관여하는 pleiotropic효과를 가진다. 최근의 증거로는 r과 b는 언급한 바와 같이 조절 유전자로서의 기능을 가지며 나머지는 구조 유전자로서 색소 합성 과정에서 c, c2, a, a2, bz, bz2, pr의 순서로 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한 증거는 모든 가능한 돌연변이 조합을 이용하여 (Reddy and Coe, 1962), single과 double mutant에 의한 intermediater의 분석 (Coe, 1955, Kirby and Styler, 1970, Reddy and Reddy, 1971, Styles and Ceska, 1972, 1977), anthocyanin 합성 효소 UFGT에 관한 다른 종류의 mutant의 효과 연구 (Dooner and Nelson, 1977, 1979), 그리고 외부로부터 공급된 전구 물질에 대한 돌연변이주의 반응 (McCormick, 1978)등에 의해 밝혀졌다.

Anthocyanin은 flavonoid 계통의 phenolic compounds에 속하며 flavone의 C-15 skeleton을 기본 구조 단위로 하고 있다(그림 1). Flavonoid 의 합성은 primary metabolites로서 phenyl alanin과 tyrosine과 같은 phenyl propanoid aromatic acid로부터 시작된다 (그림 2). 고등식물에서는 이러한 amino acid가 단백질 합성에 이용됨과 동시에 cinnamic acid로 바뀌어 2차 대사 물질로 flavonoid와 lignin과 같은 화합물로 전환되는 다른 대사 과정이 존재한다. Phenyl alanine으로부터 cinnamic acid derivatives로 변화되는 3단계 대사 과정은 모든 phenylpropanoid pathway 에

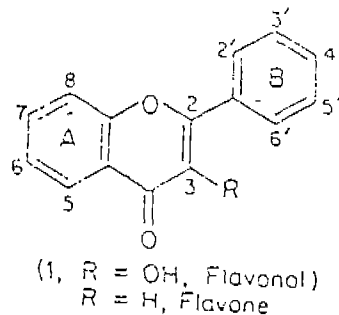


Fig. 1. Common structure of flavonoid derivatives.

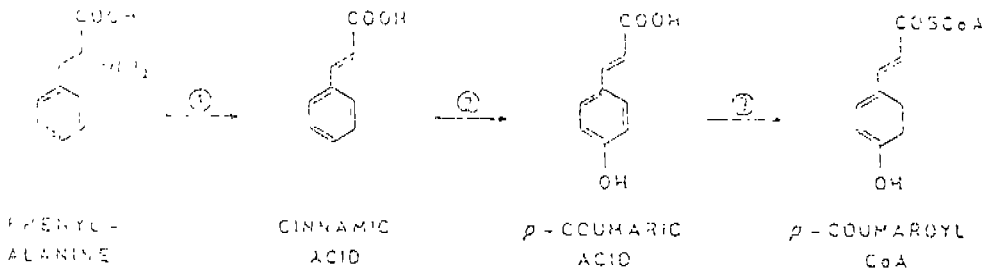


Fig. 2. The scheme of general phenylpropanoid metabolism.

공통적이며 general phenylpropanoid metabolism이라 한다. 그림 2의 1번 효소는 phenylalanine ammonia lyase (PAL), 2번 효소는 cinnamic acid hydroxylase, 3번 효소는 p-coumaroyl CoA ligase를 보여 주고 있다.

Flavonoid합성에 매개되는 중요한 다른 2효소는 Chalcone Synthase (CS)와 UDP-glucose;flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT)이다(그림 3). CS는 초기에는 FS로 알려진 효소로서 활성 전구체 p-coumaroyl CoA와 malonyl CoA로부터 C-15 flavonoid skeleton의 합성을 촉매한다. 초기에는 생성물이 flavone으로 생각되었으나 (Kreuzaler and Hahlbrock, 1975; Kreuzaler *et al.*, 1979), 최근에는 효소 반응의 주요 생성물은 isomeric chalcone으로 알려졌다 (Heller and Hahlbrock, 1980; Sutfeld and Wiermann, 1980). CS의 구조 유전자는 여러가지 돌연변이 연구와 생화학적 연구를 거쳐 c2임이 밝혀진 바 있다 (Dooner, 1983). UFGT는 flavonoid합성의 마지막 단계에 관여하며 3-OH 위치에 flavonoid의 glucosylation에 관여한다. Anthocyanin합성 효소 UFGT의 유전적 조절에 대해 Larson과 Coe (1968)이 bz 화분으로부터 UFGT 활성이 없는 것으로 보고한 이래 Bz가 UFGT의 구조 유전자임이 밝혀 졌다 (Larson and Coe, 1977; Dooner and Nelson, 1977).

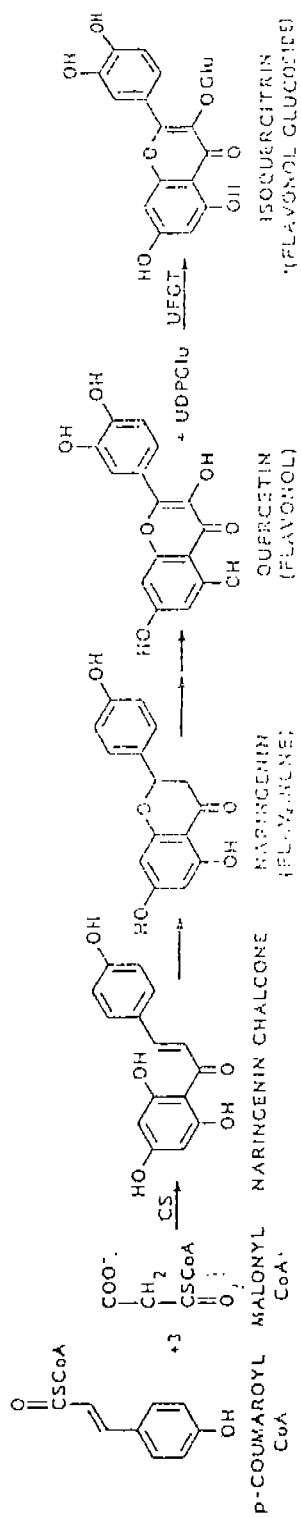


Fig. 3. Reaction catalyzed by chalcone synthase (CS) and UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT).

## 2. R 유전자에 관한 유전학적 연구

R 유전자는 10번 염색체의 long arm의 말단 부분의 1/3 위치에 존재하며 적어도 12개의 조직부위의 색소발현에 영향을 하는 것으로 알려져 있으며 각 allele의 표현형은 표1에 주어져 있다(Brink, 1958 ; Styles *et al.*, 1973). 특히 표1의 최초의 4가지 allele type에 대하여는 Emerson(1921)에 의해 최초로 보고되었는데 이 유전자가 적색과 자색 결정에 관여하며 호분층의 착색과 동시에 식물체의 착색에도 관여함을 보고하였다. Emerson은 이러한 상호 관계에 따른 표현형의 구분을 4가지 주요 형질로 분리하여 R-r (colored seed, colored plant), R-g (colored seed, colorless plant), r-r (colorless seed, colored plant), r-g (colorless seed, colorless plant)로 도식하였다. R-r; standard allele은 tandem duplication과 관련되어 있다. 한 요소는 종자의 호분층내 anthocyanin합성에 관여하며 다른 요소는 유묘와 식물체에의 착색과

Table 1. Types of allele at the R locus and their effects in aleurone and other plant parts (Coe and Neuffer, 1976)

Allele type	Aleurone color with all color factors present	Aleurone color in one dye from allele	Embryo or scutellum color	Seedling and plant color with <i>b P<sup>+</sup></i>	Notes
<i>R-r</i>	purple	mottled		purple	Paramutable; (P) (S)
<i>R-g</i>	purple	mottled		colorless	Paramutable; (p) (S) or (S)
<i>r-r</i>	colorless	colorless	colorless	purple	(P) (s) or (P)
<i>r-g</i>	colorless	colorless	colorless	colorless	(p) (s) etc.
<i>R-ch</i>	dilute purple	mottled		deep purple	Paramutable; (P) (S) and others
<i>R-mb</i>	marbled	marbled		colorless	Paramutagenic
<i>R-nj</i>	navajo§	navajo§	purple§	purple	
<i>R-sc</i>	purple	purple	purple	colorless	From <i>R-st</i> ; some are paramutagenic
<i>R-cm</i>	purple	purple	purple	colorless	From <i>R-r<sup>b</sup></i> ; some are paramutagenic
<i>R-st</i>	stippled	stippled	stippled	colorless	Paramutagenic
<i>r-ch</i>	colorless	colorless		deep purple	
<i>r-x</i>	colorless			colorless	Deficiency from <i>R-r</i>

§Expressed as purple to red pigment (disregarding green) in roots, mesocotyl, coleoptile, lower leaf sheaths, tassel glume face, anthers, and silks, often but not always in concert in all of these tissues for a particular allele (see text); in pericarp with *P-B W* color is expressed as red streaks (for *R-r* or *r-r*) or cherry-red to purple (for *R-ch* or *r-ch*).  
 ¶"Paramutagenic" alleles cause "paramutable" alleles to be reduced in expression, as discussed in a separate section; (P) and (S) represent components for plant color and seed color, respectively (see text).  
 §Color restricted to the crown portion of the aleurone tissue; one specific allele, *R-nj Cuba*, determines exceptionally strong color in the embryo (see text).

관련된다(Styles *et al.*, 1973). 식물 요소 (P)와 종자 요소 (S)라 불리는 이 두 요소는 유전적으로 R-complex내에서 분리된 유전자로 작용하며 meiotic recombination에 의해 R-g와 r-r로 각각 표현된다. R-r에 관한 유전 기작은 각 조직 특이성 요소들이 DNA조각의 tandem duplication상태로 존재한다고 제안된 바 있다(Stadler, 1951). 중복 염기 서열 의 정도는 알려져 있지 않으나 이 model에 근거하면 displaced synapsis와 crossing over에 의해 상당 수준의 recombination이 일어남을 보인다. Flanking marker를 이용한 유전 분석에서 (P)는 R-complex내에서 proximal에 (S)는 distal에 존재한다 (Dooner and Kermicle, 1971, 1976). R-complex내의 (P)와 (S)의 연관 위치는 recombinant의 빈도와 형에 의해 추정되었다. 또한 intragenic recombination이 관찰 됨에 따라 R component 사이에는 상당 수준의 homology가 있음이 추정되었다 (Donner and Kermicle, 1976).

이러한 4가지 표현형 외에도 지리적으로 격리된 여러지역에서 수집된 복잡한 형태의 allele들이 존재한다. R-ch의 경우는 예외적으로 강한 pericarp색 (cherry)을 가지며 다른 pattern allele로 R-mb, R-st, R-nj등이 있다. 이 allele들은 호분층 조직내에 색소의 분포형태가 각자 특이한 양상을 보여준다. R-mb(marbled)은 명확한 경계와 함께 큰 얼룩의 형태를 띄우며 R-st (stippled)는 작고 날카로운 color sector를 나타낸다. R-nj(navajo)의 경우는 옥수수 잎의 crown영역에 한정되어 경계면이 명확치 않은 색깔을 나타낸다. R-sc(self color)은 옥수수 알의 모든부위가 색을 띄고 있는데 R-st과 R-mb로 부터 돌연변이에 의해 발생한다(Ashman, 1960 ; Weyers, 1961). 이외에도 수많은 연관 allele들이 존재하며 특히 paramutation 현상과 연결되어 복잡한 유전현상을 보여준다. 본 연구에서는 이러한 복잡한 형태의 조직특이성 발현을 보이는 R complex의 cloning을 위해 Ac/Ds controlling element를 이용한 tagging을 시도하였다.



### 3. Ac/Ds Controlling Element

Ac와 Ds는 옥수수에서 고전적으로 알려진 대표적인 유동 유전자이다. Autonomous Ac element는 auto-transposition이 가능하며 Ds transposition도 Ac의 활성이 요구된다. Ac가 없는 상태에서는 Ds는 일정하다. 양 element는 유전자 내에 삽입될 수 있으며 unstable mutation을 유기한다. 일반적으로 element가 삽입되면 유전자 활성은 억제되거나 사라지며 element가 그 locus로부터 excision되면 full로 또는 부분적으로 그 기능이 회복된다. 표현형적으로 이것은 여러 세포내에서 여러 개의 excision element에 의해 유전자 발현의 variegated pattern을 나타낸다. Ac element의 수가 세포내에 증가 할 수록 transposition은 억제되거나 developmentally delay된다 (dosage 효과).

Ac는 여러 실험실에서 이미 cloning되었으며 그림4에서와 같이 8 bp의 direct duplicated target site와 함께 11 bp의 불완전 terminal inverted repeat를 양 끝에 가진

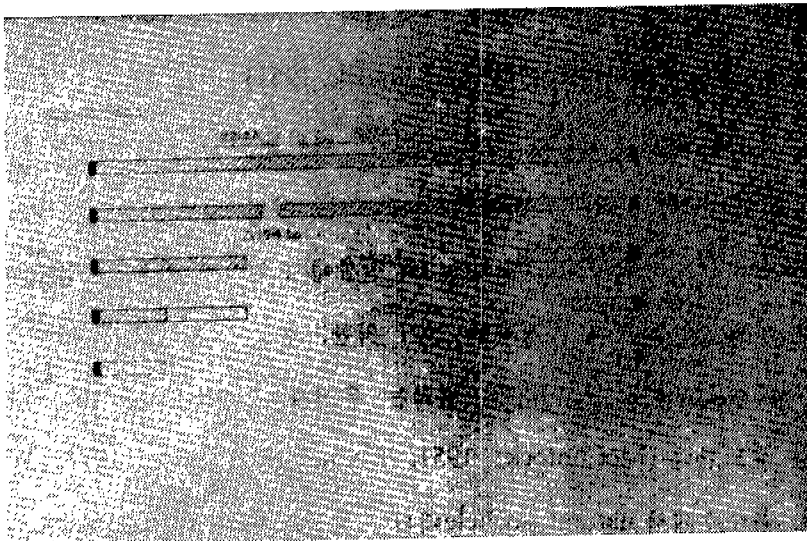


Fig. 4. Molecular structure of Ac and Ds elements in maize.

4564 bp의 DNA조각이다 (Pohlman *et al.*, 1984; Muller-Neuman *et al.*, 1985). 모든 clone된 Ac element는 같은 크기와 염기 서열을 가지며 Ac의 transposase는 여러 개의 ORF의 splicing을 통한 3.5 kb poly A H<sup>+</sup> h n mRNA를 생산하는 것으로 알려져 있다 (Kunze *et al.*, 1987).

Ds element는 다양하며 몇몇은 autonomous transposition과 관련된 transpose기능이 없어진 Ac의 부산물로 되어 있으며 (Fedoroff *et al.*, 1983; Doring *et al.*, 1984), 다른 Ds는 inverted repeat와 flanking direct duplication는 같으나 Ac의 다른 부위에 약간의 homology를 가질 뿐이다(Sachs *et al.*, 1983; Wessler *et al.*, 1986). Ds element의 양 type은 Ac의 trans-activation에 의해 excision/integration을 할 수 있다. Multiple inverted repeats를 함유한 composite Ds element는 염색체의 breakage events와 연관된다 (Doring *et al.*, 1984). 염색체 절단을 유기하는 Ds의 이러한 능력은 transposable element의 초기 발견을 이끌었다 (McClintock, 1948, 1950). 배유 세포에서의 Ds-induced chromosomal breakage는 Ds로부터 말단 부위에 있는 표지 유전자의 상실을 일으키는 breakage-fusion-bridge cycle을 유기시키며 일련의 dicentric/acentric chromosome fragmentation 현상이 일어나게 된다 (McClintock, 1951).

Ac와 Ds element는 결실, 중복, 전좌, 역위를 포함한 염색체의 재정렬에 관련된다 (McClintock, 1978). 이러한 element는 자연 집단내 유전변이를 유기하는 genome reorganization과 gene duplication 현상에 요인으로 작용하는 듯 하다. 특히 excision에 의해 그 위치에 부정확한 염기 치환, 결실, 삽입을 결과한다 (Schwarz-Sommer *et al.*, 1985). 이러한 변화는 유전자의 효소적 활성이 다른 allelic variation을 유도한다 (McClintock, 1951; Dooner and Nelson, 1977; Wessler *et al.*, 1986). 옥수수에서 natural isoallele내의 분자구조 변이는 transposable element의 excision에 의한 결과로 설명된다 (Schwarz-Sommer *et al.*, 1985).

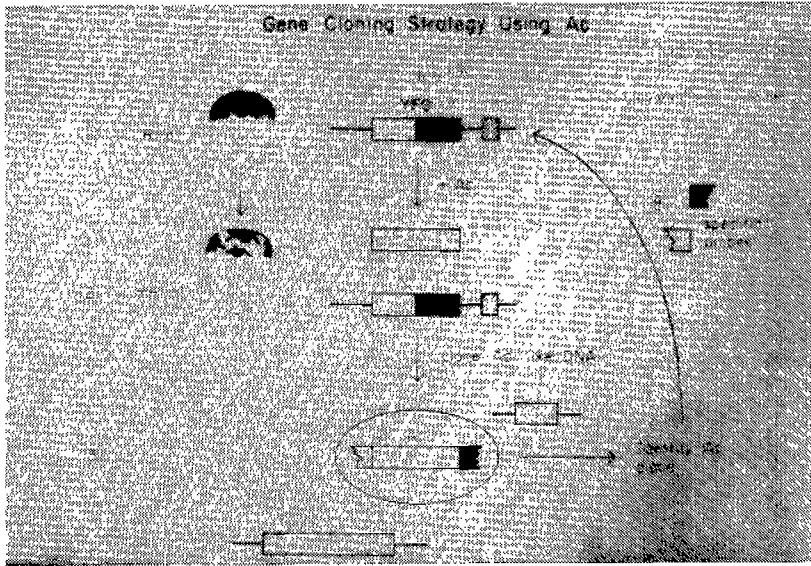


Fig. 5. Gene cloning strategy using Ac tagging.

본연구에서는 이러한 Ac/Ds system을 이용해서 transposon tagging방법을 시도하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이 첫단계로 흥미있는 유전자(R-nj)에 Ac를 삽입을 유기한다. 표현형으로 R-nj의 색소 분포가 variegation형태를 띄우게 되므로 쉽게 mR-nj를 얻을수 있다. 얻어진 돌연변이주의 DNA를 분리 하여 Sau3A1 partial digestion후 lambda vector에 packing한후 Ac DNA probe를 이용하여 양성반응을 보이는 clone을 선발해 낸다. 선발된 clone으로 부터 Ac DNA 양 옆에 존재하는 R-nj의 구조 유전자를 subcloning하여 이 DNA조각을 specific probe로 하여 정상적인 R-nj line으로 부터 위의 방법을 반복하여 R-nj 유전자를 cloning하게 된다. 이상에 언급한 transposon tagging방법에 의해 필요로 하는 많은 유전자를 아주 쉽게 cloning할 수 있다.

#### 4. Cloning of R locus

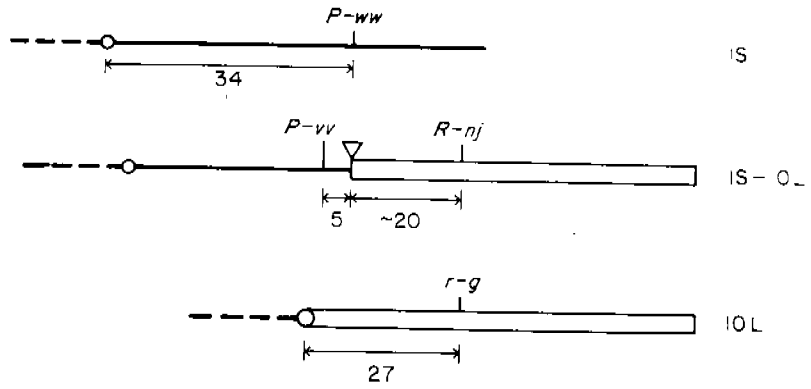


Fig. 6. Strategy for moving Ac into the R-nj complex using a chromosomal translocation between chromosome 1 and 10.

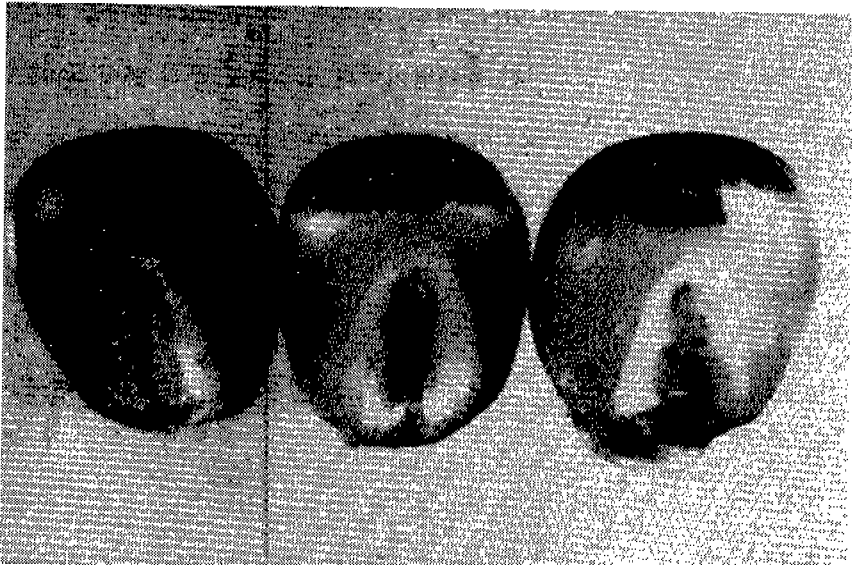


Fig. 7. Phenotype of R-sc (left), R-nj (middle), and mR-nj (right).

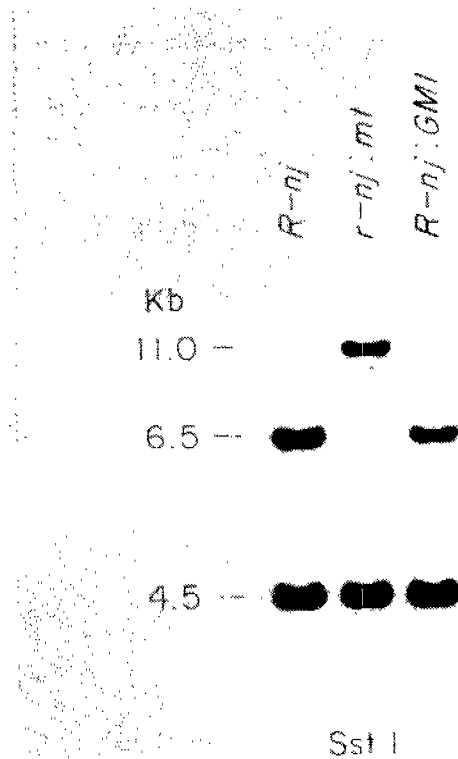


Fig. 8. Southern analysis of R-nj:ml induced by Ac insertion mutagenesis.

옥수수 R 유전자의 생성물이 아직 밝혀지지 않았기 때문에 R 유전자의 기능에 대한 어떤 정보도 알려지지 않은 상태이다. R에서의 조직 특이성 조절 과 allelic variation의 기본 기작을 밝히기 위하여 Ac를 이용한 transposon tagging 방법도 도입하여 R locus를 cloning하기로 하였다. Fedoroff *et al.*(1984)에 의해 최초로 확립된 방법을 쫓아서 Ac probe를 만들었으며 Greenblatt에 의해 분리된 Ac-suppressed R-nj complex를 사용하였는데 R-nj에 Ac를 옮기는 전략은 P locus(p-vv)에 있는 doner Ac element를 가진 1번 염색체와 R-nj 또는 R-sc allele 를 가진 10번 염색체가 상호 전좌된 개체를 이용했다(그림6). Ac는 염색체내에서 쉽게 transposition 하므로 (Van Schaik and Brink, 1959; Greenblatt and Brink, 1962; Greenblatt,

1984), target site와 donor element 를 cis 상태로 결합시킴으로서 R에 Ac의 삽입 빈도를 획기적으로 증대시킬 수 있다. 78,000 kernal 중에서 R에 insertion된 7개의 돌연 변이 개체를 분리했다(그림7).

본 연구에서는 7개의 돌연변이체중 r-nj:m1로 명명된 1개체를 선택하였다. r-nj:m1 allele은 순계인 W23에 8세대 역교잡하였으며, genomic blot analysis에 의해 r-nj:m1이 분리되는 sibling progeny를 분석하여 돌연 변이와 동시에 분리되는 PvuII digestion에 민감한 11kb SstI fragment를 선발하였는데(그림 8), 그 실험 방법을 보면 EMBL3에 Ac-homologous 조각을 cloning하여 Ac의 2.5kb PvuII 조각을 probe로 하여 28개의 양성 반응 clone을 획득하였다. 이 PvuII 조각과 이 clone(pR-nj:1)으로부터 Ac의 일부가 함유된 한 clone(Ac28)이 probe로 이용되었으며 이 probe를 이용하여 11kb SstI 조각을 선별해 내었다. 부가적으로 pR-nj:1을 이용하여 R-sc allele에서 25개의 Ds insertion을 확인할 수 있어 이 pR-nj:1을 R-specific probe로 결론지었다.

## 5. R allele의 분자 유전학적 해석

R-r 또는 연관 allele로부터 DNA를 분리하여 pR-nj:1을 probe로 이용하여 R-complex의 (P)와 (S)의 분자 유전학적 관계를 분석하기 위하여 genomic blot을 수행하였다. (P)와 (S)를 함유한 R-r allele는 HindIII처리후 probe pR-nj:1에 대해 3.5, 4.0 kb의 band와 그리고 미약한 hybrid로 보이는 4.5kb, 총 3개의 band가 확인되었다(그림 9). R-r로부터 유래된 R-g:1과 r-r:n46 allele에서는 intralocus recombination에 의해 그림 9에서 보는 것과 같이 R-g:1는 (P)기능이 상실되고 r-r:n46은 (S)기능이 상실된 것으로 추정된다.

양 allele는 R-r에 인접한 표지인자의 교환을 보이는 염색체에서 분리되었다.

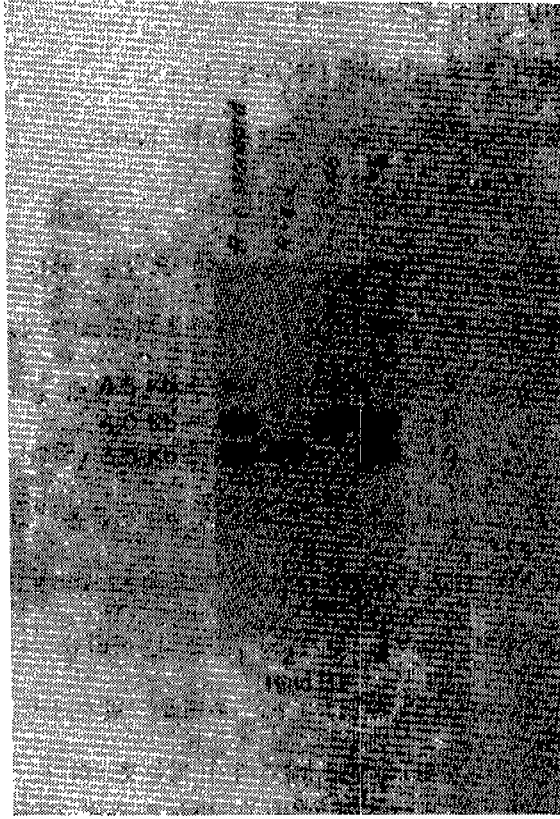


Fig. 9. Southern analysis of R-r and derivative alleles using pR-nj:ml probe.

HindIII로 처리된 r-r:n46과 R-g:1 DNA는 R-r에서 보인 3개의 band중 일부가 상실된 것을 보여 주는 데 r-r:n46에서는 3.5와 4.5 kb band가 없어졌고 R-g:1에서는 4.0kb band가 없어졌다. 이러한 결과로서 4.0kb band는 (P)기능, 3.5와 4.5kb band는 (S)기능과 관련이 있는 것으로 추정하였다.

다른 형태의 돌연 변이 allele로서 인접 표지 인자의 교환과 관계가 없는 r-r allele인 r-r:n35를 검토하여 보았다. 이 allele는 duplication의 각 요소내 위치한 두번째 표지인자(Isr)의 양 copy가 그대로 남아 있다는 사실에 기초하여 유전적으로 duplication의 상실이 없이 (S)로부터 (s)로 돌연 변이된 것으로 알려져 있다(Dooner

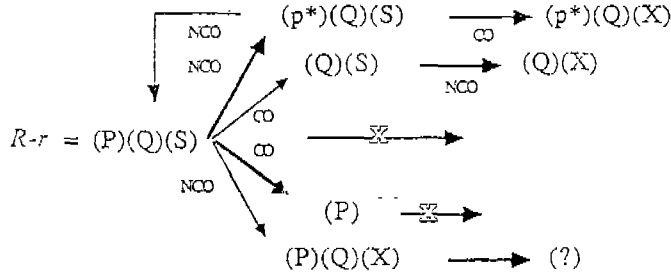
and Kermicle, 1976). 인접 표지 인자의 변경과 연관된 R-g:1, r-r:n46과 같은 allele는 Isr 한 copy가 상실되어 있다. r-r:n35 DNA가 HindIII처리후 pR-nj:1으로 blot했을 때 3.5kb band와 4.0kb band가 존재했으며 4.5kb band는 나타나지 않아 4.5kb DNA는 (S)기능과 연관되는 것으로 추정되었다.

일련의 자료로부터 (P)와 (S)의 구조에 대한 요약을 한다면 R-g:1에서 (P)기능의 상실과 4.0kb조각의 상실을 통해서 (P)는 4.0kb 조각으로 추정되며 r-r:n46과 r-r:n35 allele에서 (S)기능의 상실과 blot된 band의 유무를 연결해 볼때 4.5kb조각이 (S)와 연관되는 듯 하다. 3번째 DNA조각(3.5kb)은 (P) 또는 (S)와 displaced synapsis를 할수있는 부가적인 R component로 생각되어져 이 이름을 (Q)라 명명하였다. 이 homology가 (P)(S)(Q)의 순으로 되어 있다면 reciprocal recombination은 아마도 r-g allele로 분류될 (Q) derivative를 유기할수 있으나 이러한 r-g 후대는 발견된 바 없다(Dooner and Kermicle, 1971). r-g 후대를 발견하지 못함에 따라 이 R complex의 구조는 (P)(Q)(S)의 순으로 배열되어 있는듯 하다. Model에 따르면 R-g:1은 (Q)(S), r-r:n46은 (P), r-r:n35는 (P)(Q) allele로 추정 된다.

이 model은 R-r homozygote로 부터 (Q)를 가진것과 안가진 2가지의 r-r과 R-g allele 즉 4가지 조성이 가능하다. R-r의 triplication model을 확립하기 위하여 HidIII와 다른 여러 제한효소를 이용하여 여러가지 R-r derivatives를 조사하였다 (그림 10). 모든 cross-over R-g allele는 (Q)와 (S)를 가지고 있었으며 많은 경우에 (P) band가 분자량이 다른 위치에 존재했다. 모든 cross-over r-r allele은 (P)를 가지고 있었다. 그러나 non-crossover r-r allele은 (P)와 (Q)를 가지고 있었으며 몇몇은 분자량이 다른 위치에 (S) band를 가지고 있었다. 이러한 위치가 변화된 band들은 recombination break point를 함유하고 있는 것을 보여준다. 그러나 예외적으로 나타나는 cross-over R-g와 r-r allele로 인하여 triplication model은 약간의 수정이 필요하다. 즉 R-g allele은 (Q)를 가지나 r-r은 그렇지 않기 때문에 이것은 crossing

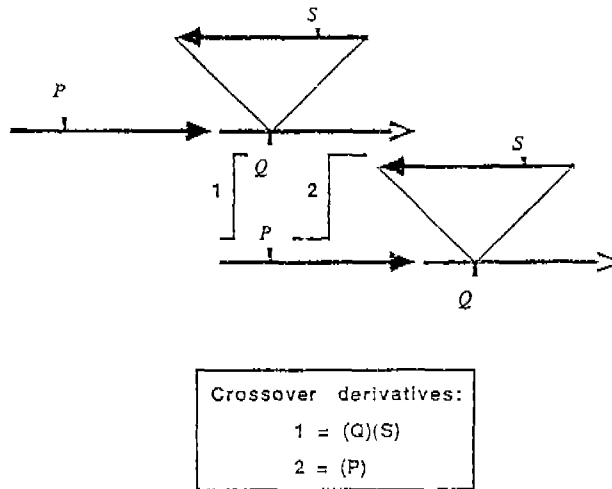


Molecular Classification of R-r Derivatives



R-r derivative alleles are classified in this diagram by the presence of restriction fragments that correspond to (P), (S), and (Q) sequences. Loss of (P) or (S) fragments is replaced by novel bands that represent fusions between two components (e.g. recombination between (S) and (Q) fragments). The size of the arrows correspond to the relative frequencies that these alleles are recovered. Alleles are derived with (CO) or without (NCO) exchange of flanking markers. (Q)-only alleles are colorless plant, colorless seed and are derived from R-r in two steps. Note that alleles that retain a single component (e.g. (P)-only alleles are stable and do not "mutate" further.

Fig. 10. Flow diagram summarizing the results of Southern analysis and genomic cloning data on R-r and derivative allele.



We propose that R-r is organized as a triplication structure with (P) and (Q) repeats organized in direct orientation and the (S) repeat inverted with respect to (P) and (Q). (S) must also be flanked by (Q) sequences to allow both proximal and distal recombination between (P) and (Q) repeats to generate (P) only alleles and (Q)(S) alleles by interchromosomal recombination. Intrachromosomal recombination can occur between the inverted (S) repeat and direct repeats of (P) or (Q) to yield R-r derivatives without exchange of flanking markers. This would explain why R-g and r-r alleles are recovered without crossing-over and without relatively high mutation rates. Since cross-over (P) alleles have lost the inversion, it would explain why these alleles do not mutate any further.

Fig. 11. Triplication model for R-r.

over가 (S)와 다른 요소사이에서 억제되고 있는 것을보여준다. 예를들면 (S)의 염기서열이 그림11와 같이 (P)와 (Q)와 연관하여 inversion 되어 있다면 interchromosomal recombination은 기 관찰된 recombinant allele을 유기할 수 있다. 더욱이 (S)의 역위는 (P)와 (S) 또는 (Q)와 (S) 사이의 recombination을 위한 intrachromosomal pairing을 방해하지 않을 것이다. 이 model은 R-r로 부터 얻어진 non-crossover type을 설명하며 자연발생적 돌연변이율보다 높은빈도로 나타나는 현상을 설명할 수 있다. 또한 (P)와 관련하여 (S)의 역위는 (P)와 (S) 사이의 intragenic recombination 현상이 유전적으로 발견되지 않았음을 이론적으로 시사하고 있다. 이 inversion model은 R-r의 모든 유전자료들을 만족하게 해석할 수

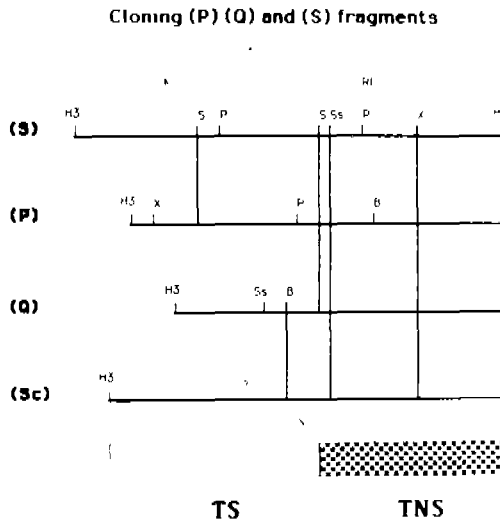


Fig. 12. Restriction map of R-r component (S), (P), (Q), and (Sc). TS and TNS indicate the tissue specific and nonspecific regions, respectively.

있다.

(P)(Q)(S)의 분자구조를 구명하기 위하여 cloning된 (S)(P)(Q) 그리고 (Sc)의 제한효소 지도를 작성한바 그림 12와 같았으며 각 요소간 상당한 동질성을 가지고있음을 보여주고있다. 특히 (Sc)와 비교하여 조직특이성 영역보다는 조직 비특이성 영역이 더 상호간 homology가 높은것을 보여주고 있다. 이 (P)(Q)(S)의 DNA염기 서열 분석이 현재 진행중에 있으며 동시에 EMBL4에 cloning된 genomic DNA로 부터 각 요소를 선발해 내고 partial digestion에 의해 제한효소 지도 작성과 함께 chromosome walking을 통해 전 R locus의 분자구조 해석을 진행하고있다.

#### 6. R-sc 유전자의 조직특이성과 비특이성 영역

R locus와 같이 복합적인 유전자군을 함유하는 allele은 분석이 용이하지 않다. 이 locus는 식물의 다양한 조직내의 색소양상을 조절하며 실제로 이러한 조직특이성의 기작은 거의 밝혀져 있지 않다. 이러한 locus 유전자의 생성물은 알려지지 않은 생화학적 기능을 수행한다. locus의 돌연변이 없이도 복합 cistron이 존재하는지, 이러한 duplicate 영역의 기능이 무엇인지 유전자의 생성물의 성격이 무엇인지 알 수 없다. 그러한 locus의 분석에 이상적인 전략은 그 locus의 saturation mutagenesis에 의해 그들의 developmental potential에 대한 돌연변이 유전자의 분석이다. 더욱 훌륭한 방법은 쉽게 분리될 수 있는 표지인자를 이용한 insertion mutagenesis이다. Ac excision과 같이 insertion element가 부정확하게 excision된다면 염기서열의 대체, 미소한 deletion/insertion과 같은 현상에 의해 구조유전자에의 amino acid code의 부가, non-sense mutation, missense와 frame shift mutation과 promoter영역의 미소한 돌연변이등이 일어나게 된다. 이러한 돌연변이는 만약 locus가 multicistronic하다면 생화학적 연구에 의한 유전자의 기능, 표현형의 조직특이성 조절기작의

Defining the TS Region of R

(Kermicle 1987)

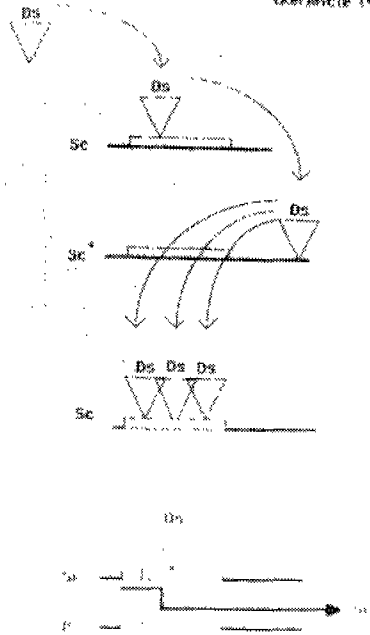


Fig. 13. The strategy for defining the tissue specific region of R.

문자수준에서의 구명등이 가능하게 된다. Kermicle(1988)은 그림 13에서와 같이 R-sc 유전자의 Ds insertion mutagenesis에 의한 r-sc를 선발하였고 Ac trans-activation에 의해 Ds가 excision되어 R-sc가 회복된 돌연변이주를 선발한 후 이 Ds를 다시 Sc에 재삽입하여 50여개 이상의 r-sc를 선발하였다. Ds insertion r-sc와 (P)를 교배하여 intragenic recombination을 유기시켰을 때 Ds insertion (P)와 R-sc가 나올 것이 예상될 수 있다. 그러나 실제로는 놀랍게도 2가지 형의 recombinant가 생성되어졌으며 그 첫째는 위에서 언급한 Ds insertion (P)와 R-sc으로서 Ds insertion된 부위가 조직비특이성 발현영역인 것으로 밝혀졌으나 다른 유형의 경우는 recombinant가 전혀 발견되지 않았다. 이 경우 r-sc(Ds)/(P)와 colorless를 교배하여 옥수수 알에서 color를 띄우는 빈도를 조사해 본 결과 모든

insertion site의 map이 한군데로 일치하는 현상을 보였다. 이 현상은 Ds가 r-sc의 조직특이성 발현영역에 위치하여 R-sc의 기능이 상실된 것으로 추정되었다. 또한 이러한 physical map과 genetic map의 불일치는 실제로 옥수수의 1cm의 DNA 크기가 1-2000kb로 추정되는데 비해 R-sc의 경우는 1cm이 4.9kb로 계산되어 recombination이 결코 임의적인 작용이 아님을 암시하고 있다. 이러한 R-sc의 tissue specific region(TS)와 tissue non specific region(TNS)의 분자구조를 밝히기 위하여 pR-nj;ml probe를 이용한 방법과 Ds의 transposon tagging에 의한 방법을 통해 BamHI 조각을 cloning 하였으며 (11kb) Ds insertion mutagenesis에 의하면 약 4kb 위치에 있는 SstI의 upstream영역이 조직특이성 영역과 관련되고 downstream은 조직 비특이성 영역과 연결되는 것 같다 (그림 12). 현재 약 11kb의 R-sc clone을 DNA sequencing 중이며 약 7kb 정도가 현재 완성되었으며 금후 전 염기서열이 밝혀지면 조직특이성에 관한 분자수준의 해석이 가능하리라 생각된다.

## 결 론

옥수수의 anthocyanin 색소합성에 관여하는 조직특이성 조절유전자인 R locus의 유전학적 배경과 분자수준에서의 접근을 시도하여본 바 아직까지 조직특이성 발현에 관한 궁극적인 해답은 얻지 못하였으나 R locus 자체가 tandem duplication의 형태로 (P)(Q)(S) 세가지 요소가 homology를 가지며 식물체내 발현을 상호조절함을 밝힐 수 있었다. 특히 이 R locus의 구조가 inversion triplication model로 모든 가능한 유전현상이 해석될 수 있었으며 금후 cloning된 세 요소의 sequencing과 chromosome walking을 통한 전 R locus의 구조가 밝혀진다면 R locus의 생성물의

기능과 기작, 조직특이성의 조절기작, R complex 발현에 미치는 promoter를 포함한 요인들이 밝혀지게 될 것이다. 특히 R-sc의 DNA 염기서열이 거의 밝혀져감에 따라 조직특이성(TS) 영역과 조직 비특이성(TNS) 영역의 분자수준적 해석과 함께 Ac/Ds transposable element의 insertion excision 기작과 recombination 기작의 구명에 일조할 수 있을 것이다.

본고에서는 언급하지 않았지만 R locus의 paramutation 현상과 imprinting효과, transposable element의 dosage효과, phase variation, presetting 문제등 여러가지 문제들에 대하여 R 유전자는 접근할 수 있는 좋은 자료로서 이용될 수 있다고 생각되며 다른 기회에 이에대한 연구자료를 보고키로 한다. 금후 실험은 이러한 R locus의 각 요소의 sequencing, chromosome walking, promoter연구, R-sc의 sequencing 및 product의 기작구명, 조직특이, 비특이성 영역의 분자적 해석등이 수행될 것이며 부가적으로 Ac/Ds의 타 식물체내에서의 발현, transposon tagging 방법에 의한 유용유전자 bulk cloning등이 현재 수행되고 있다.

## 참 고 문 헌

1. Ashman, R.B. 1960. Stippled aleurone in maize. *Genetics* 45:19-34.
2. Brink, R.A. 1956. A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* 41:872-889.
3. Coe, E.H., Jr. 1955. Anthocyanin synthesis in maize: the interaction of A2 and Pr in lecoanthocyanin accumulation. *Genetics* 40:568(abstr.)
4. Coe, E.H., Jr. and M.G. Neuffer, 1977. The genetics of corn. In Sprague G.F. ed. *Corn and Corn Improvement*, Amer. Soc. Agr. Inc. Madison, Wisc. pp.111-223.
5. Dooner, H.K. 1983. Coordinate genetic regulation of flavonoid biosynthetic enzymes in maize. *Mol. Gen. Genet.* 189:136-141.

6. Dooner, H.K., and J.L. Kermicle. 1971. Structure of the R-r tandem duplication in maize. *Genetics* 67:427-436.
7. Dooner, H.K., and J.L. Kermicle. 1976. Displaced and tandem duplications in the long arm of chromosome 10 in maize. *Genetics* 82:309-322.
8. Dooner, H.K., and O.E. Nelson. 1977. Controlling element induced alteration in UDP glucose:flavonoid glucosyltransferase, the enzyme specified by the bronze locus in maize. *Biochem. Genet.* 15:509-515.
9. Dooner, H.K., and O.E. Nelson. 1979. Interaction among C, R, and Vp in the control of the Bz glucosyltransferase during endosperm development in maize. *Genetics* 91:309-315.
10. Doring, H.P. Tillmann, E. and P. Starlinger. 1984. DNA sequence of the maize transposable element Dissociation. *Nature* 307:127-131.
11. East, E.M., and H.K. Hayes. 1911. Inheritance in maize. *Conn. Agric. Exp. Sta. Bull.* 167.
12. Emerson, R.A., 1921. The genetic relations of plant colors in maize. *Cornell Agric. Exp. Sta. Mem.* 39.
13. Fedoroff, N.V., S. Wessler, and M. Shure. 1983. Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell.* 35:235-242.
14. Fedoroff, N. V., D. B. Furtek, and O. E. Nelson. 1984. Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element Ac. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3825-3829
15. Greenblatt, I.M. and R.A. Brink, 1962. Twin mutations in medium variegated pericarp maize. *Genetics* 47:489-501.
16. Greenblatt, I.M. 1984. A chromosomal replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, modulator, in maize. *Genetics* 108:471-485.
17. Helentjaris, T., M. Slocum, S. Schaefer, and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 72:761-769.
18. Heller, W., and K. Hahlbrock. 1980. Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:617-619.
19. Kermicle, J. L. 1988. Recombinant mutable alleles of the maize R gene. pp 81-89. In. Nelson, O. ed., *Plant Transposable Elements*, Plenum Press. NY.
20. Kirby, L.T., and E.D. Styles. 1970. Flavonoids associated with specific gene action in maize and the role of light in substituting for the action of a gene. *Can. J. Genet.* 12:934-940.

21. Kreuzaler, F., and K. Hahlbrock. 1975. Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. *Eur. J. Biochem.* 56:205-213.
22. Kreuzaler, F., H. Ragg, W. Heller, R. Tesch, I. Witt, D. Hammer, and K. Hahlbrock. 1979. Flavonoid synthase from *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.* 99:89-96.
23. Kunze, R., U. Stochaj, J. Laufs, and P. Starlinger. 1987. Transcription of transposable element Activator (Ac) of *Zea mays* L. *EMBO J.* 6:1555-1563.
24. McClintock, B. 1948. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 47:155-169.
25. McClintock, B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 36:344-355.
26. McClintock, B. 1951a. Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16:13-47.
27. McClintock, B. 1951b. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 50:174.
28. McClintock, B. 1978. Mechanism that rapidly reorganize the genome. *Stadler Symp.* 10:25-48.
29. McCormick, S. 1978. Pigment synthesis in maize aleurone from precursors fed to anthocyanin mutants. *Biochem. Genet.* 16:777-786.
30. Muller-Neuman, M., J. I. Yoder, and P. Starlinger. 1985. The DNA sequence of the transposable element Ac of *Zea mays*. *Mol. Gen. Genet.* 198:19-24.
31. Neuffer, M.G., and W.F. Sheridan, 1981. A group of new mutants defective in kernel development - the dek mutants. *MGCNL* 55:29-30.
32. Orton, E.R. and R.A. Brink, 1966. Reconstitution of the variegated pericarp allele in maize by transposition of Modulator back to the P locus. *Genetics* 53:7-16.
33. Pohlman, R., N. V. Federoff, and J. Messing. 1984. The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator. *Cell* 37:635-643.
34. Reddy, A.R., and G.M. Reddy. 1971. Chemo-genetic studies of leuco-anthocyanin in a maize mutant. *Cur. Sci.* 40:335-337.
35. Robertson, D.S. 1955. The genetic of vivipary in maize. *Genetics* 20:1-10.
- W. L. Gerlach. 1983. Maize Ac/Ds controlling elements: a molecular viewpoint. *Maydica* 28:289-302.
36. Schwarz-Sommer, Zs., A. Gierl, H. Cuypers, P. A. Peterson, and H. Saedler. 1984. Plant transposable elements generate the DNA sequence diversity needed in evolution. *EMBO J.* 4:591-597.



37. Stadler, L.J. 1951. Spontaneous mutation in maize. CSH Symp. Quant. Biol. 16:49-63.
38. Styles, E.D. and O. Ceska. 1972. Flavonoid pigments in genetic strains of maize. Phytochem. 11:3019-3021.
39. Styles, E.D., O. Ceska, and K-T. Seah. 1973. Developmental differences in action of R and B alleles in maize. Can. J. Genet. Cytol. 15:59-72.

## 저 자 약 력

### 임 용 표 (林容杓) 박사

- 1956. 11. 13. 생
- 1979 서울대학교 원예학과 (농학사)
- 1982 서울대학교 대학원 원예학과 (농학석사)
- 1984 서울대학교 대학원 원예학과 (박사과정 수료)
- 1987 미국 Rhode Island대학교 식물과학과 (Ph. D.)
- 1979 - 80 농촌진흥청 원예시험장
- 1982 - 84 농촌진흥청 농업기술연구소 유전과
- 1987 - 88 미국 Yale대학교 생물학과 박사후과정
- 1988 - 현재 한국인삼연초연구소 유전생리부 선임연구원