

종자내 아미노산 합성 조절 유전자에 관한 연구

임용표* · 서미정 · 조수진 · 이정희 · 이효연 · 高岩文雄²

충남대학교 농과대학 원예학과, ¹순천대학교 농과대학 자원식물학과, ²일본 농업생물자원연구소 세포정보실

Amino Acid Biosynthesis and Gene Regulation in Seed

Yong Pyo LIM*, Mi Chung SUH, Soo Jin CHO, Jung Hee LEE, Hyo Yeon LEE¹, and Fumio TAKAIWA²

Department of Horticulture, Chung Nam National University, Taejon, 305-764, Korea:

¹Department of Resource Plant, Suncheon National University, Suncheon, 505-742, Korea: and

²Laboratory of Cell Genetics, National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibarake 305, Japan

Human and monogastric animals can not synthesize 10 out of the 20 amino acids and therefore need to obtain these from their diet. The plant seed is a major source of dietary protein. It is particularly important in their study to increase nutritional quality of the seed storage proteins. The low contents of lysine, asparagine and threonine in various cereal seeds and of cysteine and methionine in legume seeds is due to the low proportions of these amino acids in the major storage proteins, we have tried to apply the three strategies; (1) mutagenesis and selection of specific amino acid analogue resistance, (2) cloning and expression study of lysine biosynthesis related gene, (3) transformation of lysine rich soybean glycinin gene.

The 5-methyltryptophan (5MT) resistant cell lines, SAR₁, SAR₂ and SAR₃ were selected from anther derived callus of rice (*Oryza sativa* L. "Sasanishiki"). Among these selected cell lines, two (SAR₁ and SAR₃) were able to grow stably at 200 mg/L of 5MT. Analysis of the free amino acids in callus shows that 5MT resistant cells (SAR₃) accumulated free tryptophan at least up to 50 times higher than those that of the higher than of SAS. These results indicated that the 5MT resistant cell lines are useful in studies of amino acid biosynthesis.

TR75, a rice (*Oryza sativa* L. var. Sasanishiki) mutant resistant to 5MT was segregated from the progenies of its initial mutant line, TR1. The 5MT resistant of TR75 was inherited in the M₈ generations as a single dominant nuclear gene. The content of free amino acids in the TR75 homozygous seeds increased approximately 1.5 to 2.0 fold compared to wild-type seeds. Especially, the contents of tryptophan, phenylalanine and aspartic acid were 5.0, 5.3 and 2.7 times higher than those of wild-type seeds, respectively.

The content of lysine is significantly low in rice. The lysine is synthesized by a complex pathway that is predominantly regulated by feedback inhibition of several enzymes including asparaginase, aspartate kinase, dihydrodipicolinate synthase, etc. For understanding the regulation mechanism of lysine synthesis in rice, we try to clone the lysine biosynthetic metabolism related gene, DHPS and asparaginase, from rice.

We have isolated a rice DHPS genomic clone which contains an ORF of 1044 nucleotides (347 amino acids, Mr. 38,381 daltons), an intron of 587 nucleotides and 5' and 3'-flanking regions by screening of rice genomic DNA library. Deduced amino acid sequence of mature peptide domain of GDHPS clone is highly conserved in monocot and dicot plants whereas that of transit peptide domain is extremely different depending on plant species. Southern blot analysis indicated that GDHPS is located two copy gene in rice genome. The transcripts of a rice GDHPS were expressed in leaves and roots but not detected in callus tissues. The transcription level of GDHPS is much higher in leaves indicating enormous chloroplast development than roots.

Genomic DNA clones for asparaginase genes were screened from the rice genomic library by using plaque hybridization technique. Twelve different genomic clones were isolated from first and second screening, and 8 of 12 clones were analyzed by restriction patterns and identified by Southern Blotting. Restriction enzyme digestion

patterns and Southern blot analysis of 8 clones show the different pattern for asparaginase gene. Genomic Southern blot analysis from rice were done. It is estimated that rice has at least 2-3 copy of asparaginase gene. One of 8 positive clones was subcloned into the pBluescript SK(+) vector, and was constructed the physical map.

For transformation of lysine rich storage protein into tobacco, soybean glycinin genes are transformed into tobacco. To examine whether glycinin could be stably accumulated in endosperm tissue, the glycinin cDNA was transcriptionally fused to an endosperm-specific promotor of the rice storage protein glutelin gene and then introduced into tobacco genomic via *Agrobacterium*-mediated transformation. Consequently the glycinin gene was expressed in a seed- and developmentally-specific manner in transgenic tobacco seeds. Glycinin were targeted to vacuole-derived protein bodies in the endosperm tissue and highly accumulated in the matrix region of many transgenic plant (1.4% of total seed proteins). Synthesized glycinin was processed into mature form, and assembled into a hexamer in a similar manner as the glycinin in soybean seed. Modified glycinin, in which 4 contiguous methionine residues were inserted at the variable regions corresponding to the C - terminal regions of the acidic and basic polypeptides, were also found to be accumulated similarly as in the normal glycinin. There was no apparent difference in the expression level, processing and targeting to protein bodies, or accumulation level between normal and modified glycinin.

식물의 종자는 식물에 있어서 번식이나 전파를 위한 기관일 뿐 아니라 인간이 수확하는 주요 식물 조적이기도 하다. 종자에 존재하는 단백질의 양은 건중량의 10%(곡류) ~ 40%(몇몇 콩과 작물과 증류)로 다양하고, 음식으로 섭취하는 단백질의 주원료를 이루고 있으며, 이러한 저장단백질들은 종자의 총 단백질 양을 결정 할 뿐 아니라 최종 이용되는 단백질의 질(quality)도 결정하므로 대단히 중요하다.

사람과 포유동물은 20여가지 필수아미노산 중 10개를 만들어 낼 수 없기 때문에 필수아미노산을 음식에서 섭취해야 한다. 그러나 이러한 종자 단백질이 함유하고 있는 필수아미노산 중에서 lysine, threonine, tryptophan 등은 전세계적으로 식량의 가장 큰 원천이 되는 곡물에서 그 함유량이 충분하지 못하다.

특히 벼의 경우 배유 내의 저장단백질내에는 사람과 동물에게 꼭 필요한 필수아미노산인 tryptophan과 lysine이 다른 작물에 비해 매우 적게 함유되어 있다. 이러한 요인 때문에 육종학자들은 곡류내 영양성분의 질적 향상을 위해 계통선발 및 그에 따른 지베형질을 동정하기 위해 많은 노력을 기울여 왔다. 그러나 재배품종 및 유전자원내에서 질적으로 향상된 벼의 선발은 커다란 성과를 거두지 못하였으며, 다만 교배육종법에 의한 맛에 관련된 인자의 도입에는 성공한 예가 많이 있다. Lysine과 threonine의 영양적 중요성 때문에 그들 물질대사 조절은 생화학 및 유전적으로 그리고 최근에는 분자적 수준에서 집중적으로 연구되어져 왔다. 새

균에서와 같이 고등식물은 aspartate 경로에서 lysine과 threonine 합성에 관여하는 효소가 상세하게 연구되고 있으며(Bryon, 1980), tryptophan의 경우는 주로 세균과 곰팡이에서 연구가 이루어져 있다. Shikimic 경로에 대한 생합성과정 및 주요 효소의 분자생물학적연구는 *E. coli*의 돌연변이 연구에 의해 이루어져 각종 주요 효소의 유전자들이 cloning되어 있으며, 식물의 경우는 *E. coli*의 유전자를 이용한 *Arabidopsis*에서의 cloning과 아미노산 analogue를 이용한 돌연변이연구로 그 기초를 밝히고 있다.

본 연구에서는 이와 같이 필수 아미노산인 lysine과 tryptophan 합성의 복잡한 생화학적 조절기작에 관해 언급하고, 특히 벼의 종자 내에서 이의 대량 생산을 위한 돌연변이 육종 및 분자생물학적 접근과 단백질공학의 이용가능성에 대하여 논하기로 한다.

돌연변이를 이용한 고 Tryptophan 벼 품종개발

고농도의 아미노산 및 아미노산 아날로그에 대하여 저항성 변이체로 선발되어진 식물체에서는 아미노산을 과잉생산 하는 변이체가 존재한다고 알려져 있다. 일본에서 화학적 처리에 의한 새로운 돌연변이 유도체계 및 유전적 변이 창출에 이용되는 벼의 수분수정 시기 중에 돌연변이원의 처리를 통하여 많은 돌연변이체를 확보할 수 있게 되었고, 그 후 수분 수정시 EMS처리에 의해 얻어진 고빈

도의 돌연변이체로부터 5-methyltryptophan (5MT) 내성변이체의 선발에 성공하였다.

아미노산 과잉생산주 선발에 의한 품종을 육성한 예는 국내외적으로 연구되어진 바가 없다. 다만, 미국과 일본 등에서는 조직배양 및 세포배양을 이용하여 제초제, 약제 등에 내성을 가진 변이체 세포의 선발을 많이 행하고 있다. 지금까지 보고되어진 고농도 아미노산 및 아미노산 아날로그에 대해 선발되어진 저항성 변이체는 다음과 같다.

Table. 1. Selection of amino acid analogue resistant cell line

Plant	Source	Mutagen	Increased Amino Acid	Year
Tobacco	callus	EMS	Methionin	1970
Tobacco	protoplast	EMS	Lysine	1973
Tobacco	haploid callus	UV	"	1980
Carrot	callus	MNNG	-	1982
Carrot	"	UV	Tryptophan	1983
Alfalfa	"	EMS	Methionin	1981
Maize	seed	NaN ₃	Threonin	1982
Barley	"	NaN ₃	-	1979
Rice	"	EI	Proline	1986
Rice	"	EI	Tryptophan	1991

이와 같이 선발된 돌연변이체로부터 인간이 주식으로 하는 종자의 수준에 아미노산 함량이 높은 변이주를 얻고, 선발된 변이체를 육종의 모본 또는 고등식물의 아미노산 대사경로의 연구소재로써 이용하기 위해서는 세포와 개체수준에서도 발현되고, 다음 세대에도 유전되어야 한다. 그러나 아직까지 식물체가 재분화해서, 재분화된 식물체에서 저항성이 발현하고 다음 세대의 유전양식까지 해명한 연구 결과는 보고된 바 없다.

본 연구에서 사용한 재료는 callus 및 수분수정 시기에 EMS 처리를 하여 얻어진 5MT저항성 종자를 이용하여 종자 level에서 선발되어 저항성 형질이 다음 세대까지 유지하는 것으로써 이러한 재료로부터 5MT에 대해 저항성 벼로 선발된 TR의 특성을 조사하고, 이의 자식후대 개체 중에서 저항성 형질이 단일우성유전자에 의해 분리된 TR75주의 여러 특성을 조사하였다.

5MT 저항성 캘러스의 선발

5MT 농도에 대한 캘러스의 생육 저해 효과는 5MT 2.5mg/L의 처리구에서 약 90% 가까이 생육이 억제되었다. 그리고 50 mg/L 이상의 5MT를 포함한 배지에서는 캘러스의 생육이 완전히 억제되었고, 캘러스도 갈변하였다. 아미노산 고체 선발 배지에 치상한 배양세포(5×10⁶세포)중에서 1개월 후에 생장이 매우 활발한 계통의 캘러스가 선발되어 각각 SAR₁, SAR₂, SAR₃라고 명명했다.

1) 5MT 저항성 및 안정성

5MT 50 mg/L배지에서 선발된 SAR₁, SAR₂, SAR₃의 3계통의 5MT 저항성 캘러스가 유전적 변이에 의해 출현한 것인가를 조사한 결과 SAR₁, SAR₃는 5MT를 함유한 배지에서 여전히 안정된 저항성을 보여 주었고, 선발시의 농도와는 달리 5MT 200 mg/L까지도 저항성을 나타내었으며, SAR₂의 경우에는 5MT를 포함하지 않는 배지에서 계대배양했을 때 점차로 저항성이 소실되었다(Fig 1). SAR₂와 같이 일정 조건하에서만 5MT저항성을 보여준 캘러스의 경우에는 유전적 변이가 아닌 후생적 변이라고 생각된다. SAR₂와 같이 세포의 유전정보에 의해 저항성을 갖지 않고 일정 조건하에

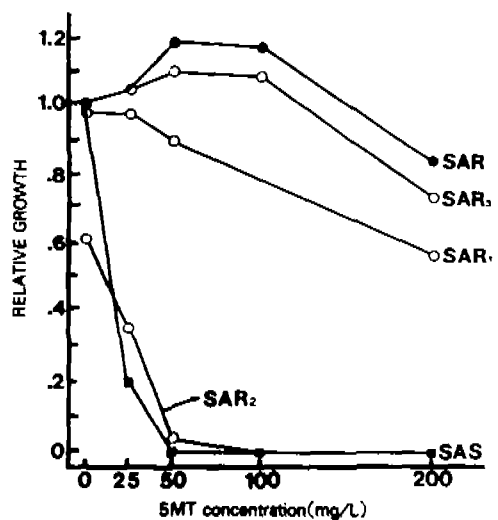


Figure 1. Stability of selected cell lines resistant to 5MT. 5MT resistance was determined after 2 months of culture on medium with or without 50 μ g/L 5MT. SAR and SAR₃ were cultured on medium with 5MT continuously. SAR₁(R₁, R₂, R₃): Resistant cell lines cultured without 5MT for 2 months. SAS: Nonselected cell.

서만 저항성을 보여주었던 것은 담배(Flick et al., 1981; Carison, 1973)와 알팔파(Reish et al., 1981) 등의 식물에서도 이미 보고되었고, 아미노산 이외의 저항성 세포의 선발에서도 자주 일어나는 현상이다(Dix and Street, 1975). 그러나 일부의 저항성 캘러스는 그 저항성이 안정되어 캘러스로부터 재분화된 식물체에 있어서도 그 저항성이 유지되는 것으로 보고되었다(Widholm, 1976).

2) 5MT 저항성 캘러스의 유리 아미노산 분석

5MT 저항성 캘러스인 SAR3의 유리 아미노산 함량의 변화를 보면(Table 2), 먼저 5MT에 길항하는 tryptophan 함량은 비저항성 캘러스(SAS)에 비해 58배 증가하였고, 그 외 대사와 직접 관계없는 asparagine, glutamine, glycine이 SAS에 비해 2배정도 증가하였다. 그러나 arginine만은 감소하였다.

이와 같이 대사 아날로그에 대하여 직접 길항하지 않는 다른 아미노산 함량이 동시에 증가된 이유는 특정한 아미노산만이 증가하면 체내의 아미노산 함량의 불균형을 초래하기 때문에 그것을 방지하기 위하여 세포가 반응한 결과라고 알려져 있지만(복정·산전, 1985), 그 원인에 대해서는 아직 분명하지는 않다.

이상의 결과로부터 SAR₁, SAR₃는 유전적 변이에

의해서 얻어진 돌연변이 캘러스이며, 그 저항성도 안정되어 있고, 아미노산 함량도 증가되었다.

TR75의 5MT 저항성

Tryptophan계 아날로그인 5MT callus의 선발과 결합하여, 수분 수정시 EI처리후 받은 종자에 대해 5MT처리를 통하여 획득된 5MT 저항성 벼로 선발된 TR (Lee and Kameya, 1991)의 자식후대개체 중에서 저항성 형질이 단일우성유전자에 의해 분리된 TR75주를 선발하여 이의 여러 가지 특성을 조사하였다.

TR75와 야생형 벼의 종자 및 근으로부터 유도된 callus가 25 mg/L의 5MT에서 증식이 억제되며 배양 후 2주째부터는 갈변화 되었다. 그러나 TR75에서 유도된 각 기관의 callus는 50 mg/L의 5MT에서도 증식이 왕성하였다. TR75는 원래 5MT 25 mg/L 농도에서 선발된 TR1의 자식후대 식물체이었지만 세포수준의 5MT 저항성 정도는 선발시의 농도와 비교하면 2배 정도 높아진 것을 알게 되었다. 지금까지 이러한 결과는 다른 아미노산 아날로그 저항성 주에서도 보고되었다.

TR-75의 유리 아미노산 함량

종자로부터 추출한 유리 아미노산 함량의 분석 결과는 Table 3에서 보여주었다. 먼저 5MT에 직접 길항하는 tryptophan의 함량은 야생주에 비교하여 5배 가량 높은 것이 판명되었고, phenylalanine은 5.3배, aspartic acid는 2.7배 높았으며, 대부분의 유리 아미노산 함량이 1.5~2.0배 가량 증가하였다. 전 아미노산 함량도 약 1.5배 가량 증가하였다. 그러나 alanine과 leucine은 약간 감소하였다. 이와 같이 대사 아날로그인 5MT에 직접 길항하는 tryptophan 이외의 다른 종류의 아미노산이 증가된 이유는 특정의 아미노산만이 증가되었을 경우 아미노산 pool의 불균형이 발행하기 때문에 서로가 이러한 것을 조절하기 위하여 반응된 결과라고 설명되고 있지만 그 기구에 대해서는 아직 분명하지 않다.

지금까지 여러 종류의 아미노산 아날로그를 이용하여 세포 및 유식물 수준에서 저항성 개체를 선발하여 왔으나, 그 중에서 종자에 포함된 아미노산 함량이 증가된 예는 그다지 많지 않다. Schaeffer

Table 2. Free amino acid contents of 5MT-resistant (SAR₃) and nondelected cells (SAS). Numbers given a mole/g fresh weight.

Amino acid	Nondelected cels (SAS)	Resistant cell (SAR ₃)
ASP	51.72	254.46
THR	104.72	166.90
SER	136.12	282.11
GLU	155.93	714.80
GLY	251.67	635.80
ALA	361.65	712.48
CYS	78.39	134.64
VAL	192.40	304.71
MET	54.47	112.31
ILU	109.90	168.56
LEU	167.98	256.42
TYR	93.32	133.63
PHE	87.16	147.97
LYS	217.03	208.24
HIS	66.49	93.82
TRY	24.34	1370.75
AGR	997.51	618.38
Total	3150.15	6350.98

와 Sharpe (1981)는 벼의 S-aminoethyl-L cysteine내성식물의 종자에서 lysine함량이 증가된 것을 보고하였고, Mori 등(1989)은 hydroxyproline 내성 벼로부터 종자의 proline함량이 증가된 것을 보고하였다. 그러나 5MT 내성식물의 자식후대 개체의 종자에서 tryptophan함량이 증가한 예는 아직 알려지지 않았다. 본 연구에 사용된 TR75는 인간이 실제로 이용하는 부분이 종자이기 때문에 앞으로 농업적인 측면에서도 중요한 육종재료가 될 수 있으며, 고등식물의 아미노산 대사 경로의 연구 및 5MT내성 유전자를 cloning 하는데 있어서도 유용한 재료로 생각된다.

Table 3. The content of free amino acids of TR75 and original variety (Sasanishiki). Numbers given are in nmol/g dry weight

Amino acid	Sasanishiki seeds	TR75 Seeds	Ratio of TR75 to Sasanishiki
Cys		23	
Asp	66.8	180.8	2.71
Glu	238.9	370.0	1.55
Ser	56.0	127.9	1.81
Gly	73.6	104.7	1.42
His	36.9	66.7	1.81
Arg	132.1	178.5	1.35
Thr	32.4	59.4	1.83
Ala	429.8	386.4	0.90
Pro	89.2	160.0	1.79
Tyr	45.8	75.9	1.66
Val	53.3	79.8	1.50
Met	15.2	27.0	1.78
Cys	0.8	1.1	1.40
Ile	15.6	25.0	1.60
Leu	36.4	24.4	0.67
Phe	9.9	53.0	5.34
Trp	18.0	91.4	5.08
Lys	14.3	23.0	1.61
Total	1,365	2,037.8	1.49

Lysine 합성관련 주요 효소의 생리적 활성과 관련 유전자의 Cloning

Lysine과 Threonine 합성의 생화학적 조절

고등식물의 aspartate 경로에서 주요 효소들이 몇

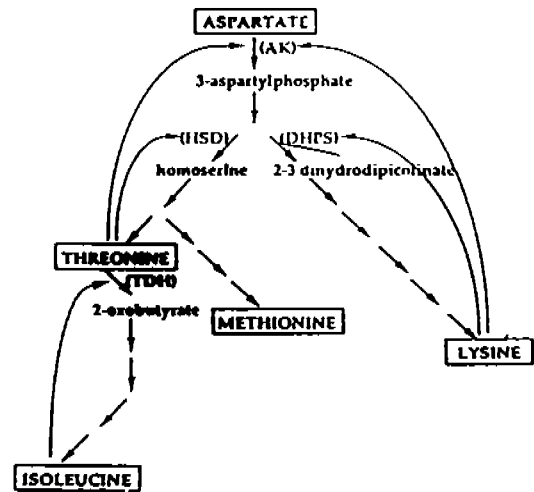


Figure 2. Biosynthetic pathway of aspartate family pathway.

몇 최종산물의 feedback inhibition에 의해 조절된다 (Figure 2). 이 경로의 첫 번째 효소인 aspartate kinase (AK) 활성은 lysine과 threonine에 의해 feedback inhibition된다. Lysine은 dihydrodipicolinate synthase (DHPS)의 활성도 억제한다. 반면 threonine은 homoserine dehydrogenase (HSD) 활성도를 억제한다.

Aspartate 경로에서 주요 조절효소

1) Asparaginase

Asparagine은 식물체내에서 nitrogen의 수송 및 대사에 관련된 주된 화합물으로써, nitrogen을 수송하는 화합물로 알려진 ureid보다 용해도가 더 크며, glutamine보다 더 안정된 화합물일 뿐만 아니라 하나의 carbon에 결합한 nitrogen 함유비율이 다른 화합물에 비해 가장 높으므로 nitrogen을 수송하는 화합물으로써 가장 적합한 구조를 하고 있다. 다른 조직으로부터 수송되어 온 asparagine은 식물체의 nitrogen sink 조직에서 L-asparaginase 효소에 의해 aspartate와 ammonia로 분해되며, 분해된 aspartate와 ammonia는 아미노산, 폴리펩티드 그리고 다른 nitrogen을 함유한 화합물의 합성에 이용된다. Asparaginase의 활성은 생육이 활발한 잎 조직과 종자에서 처음으로 조사되었으며, 콩을 비롯한 여

러 다른 콩과 식물의 잎에서 K^+ 의 존재 하에서 활성을 가지는 asparaginase와 *Lupinus*의 종자에서 K^+ 이 존재하지 않아도 활성을 갖는 두 종류의 asparaginase가 존재하는 것으로 보고되었으며, 이 두 종류의 asparaginase는 면역학적으로 서로 다른 특성을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한 다른 필수 아미노산 lysine, threonine, methionine 그리고 isoleucine 등은 asparagine으로부터 asparaginase에 의해 분해된 aspartate를 전구체로 이용하여 합성된다. 최근에 asparaginase의 경우에는 *Arabidopsis*와 *Lupin*에서 genomic DNA 및 cDNA가 cloning되었다. 그러나 이러한 효소의 활성을 조절하는 기작이나 nitrogen assimilate distribution과 sink strength 사이의 연관관계에 대해서는 거의 밝혀진 사실이 없다.

2) Aspartate kinase

Aspartate 경로에서 첫 번째 효소인 AK는 모든 최종 아미노산 합성에 꼭 필요하다(Figure 1). AK는 ATP가수분해와 함께 aspartate phosphorylation을 촉매해서 3-aspartyl phosphate를 형성한다.

식물체들이 일반적으로 최소한 2, 3개의 AK isozyme을 가지고 있다. 대부분의 식물에서 AK활성도는 lysine과 threonine에 의해 억제된다. Barley에서 AK활성도는 3개 isozyme의 peak로 분리될 수 있는데(Rognes et al., 1983), AK-I은 threonine에 의해 억제되는 반면, AK-II와 AK-III은 lysine에 의해 억제된다. 마찬가지로, 당근의 2개 AK isozyme중 하나는 lysine에 민감한 반면, 다른 것은 threonine에 민감하다(Sanako and Komamine, 1978). 옥수수에서 2, 3개 AK isozyme 역시 보고되어 졌다(Doston et al., 1989; Azevedo et al., 1992).

적어도 식물에 있는 몇 가지의 AK isozyme은 AK와 HSD활성도를 지닌 두 가지 기능을 가진 단백질인 듯 하다(Wilson et al., 1991; Azevedo et al., 1992). 당근의 두 가지 기능을 하는 효소의 아미노산서열분석은 *E. coli* AK-I/HSD isozyme과 매우 밀접하게 관련되어 있음을 보여준다. 식물체내 두 가지 기능을 가진 AK/HSD가 있다는 것은 이런 효소들의 진화론적 측면에서 특히 흥미 있을 것이다. 왜냐하면 모든 세균에서 그런 두 가지 기능을 가진 효소를 가지지는 않기 때문이다(Cohen and Saint-Girons, 1987). 식물체에 두 가지 기능을 가진

AK/HSD isozyme이 존재한다는 것은 cloning 및 cDNA분석에 의해 추정되었다(Weisemann and Matthews, 1993; Ghislain et al., 1994; Muehlbauer et al., 1995).

3) Dihydrodipicolinate Synthase

DHPS는 3-aspartic semialdehyde가 pyruvate로 응축되어서 2,3-dihydrodipicolinate를 형성하는 lysine생합성에 유일한 첫 번째 반응을 촉매 한다. 식물체에서 aspartate 경로의 주요 조절효소 중에서, DHPS는 lysine에 의한 feedback inhibition에 가장 민감하다. DHPS는 식물체의 lysine에 민감한 AK보다 lysine inhibition에 50배 더 민감하다. 그리고 *E. coli* DHPS보다는 100배 민감하다. DHPS는 밀(Kumpaisal et al., 1987), 담배(Ghislain et al., 1990), 옥수수(Frisch et al., 1991), 완두(Dereppe et al., 1992)에서 순수 분리되었고, DHPS cDNA와 유전자는 몇몇 식물체중에서 clone되어 왔다(Kaneko et al., 1990; Frish et al., 1991; Vauterin and Jacobs, 1994). Southern blot 결과 옥수수도 몇 가지 DHPS 유전자를 가지고 있을 것이라는 것을 암시하며(Frisch et al., 1991), 밀에서도 두개의 다른 DHPS cDNA가 clone되었다(Kaneko et al., 1990).

4) Homoserine Dehydrogenase (HSD)

HSD는 threonine, methionine과 isoleucine생합성에 관련된 첫 번째 반응과 3-aspartic semialdehyde가 homoserine으로 전환되는 것을 촉매 한다. 고등식물은 적어도 threonine에 민감한 형태와 민감하지 않은 형태, 2가지 형태를 일반적으로 가진다(Bryan, 1980; Lea et al., 1985). HSD는 다양한 식물에서 거의 균질하게 순수분리 되어왔다. 당근의 HSD는 기내에서 배지에 threonine이 있느냐에 따라 threonine에 민감한 trimer형태에서 threonine에 민감하지 않은 dimer형태로 가역적으로 상호전환 될 수 있다(Matthews et al., 1989). *In vivo*에서 이런 상호전환이 일어날때, threonine 생합성조절을 돕는지에 대해서는 아직까지 알려진 것이 없다. 순수 정제된 HSD의 동정(Wilson et al., 1991; Azevedo et al., 1992)과 cDNA clone (Weisemann and Matthews, 1993; Ghislain et al., 1994; Muehlbauer et al., 1995)을 통해서 HSD효소와 AK가 하나의 단백질로 연결되어 있다는 것을 확인했다.

벼로부터의 Lysine합성 관련 유전자의 Cloning

1) 벼의 DHPS유전자 cloning

실험에 사용되어진 벼는 *Oryza sativa* (strain Nipponbare)를 사용하였고 DNA 분리는 Dellaporta 등(1984)의 방법을 이용하였으며, probe DNA의 제조는 EST에 의해 확보된 DHPS 유전자의 partial cDNA C954를 일본 농업생물자원연구소에서 분양 받아 사용하였다.

벼의 잎조직으로부터 DNA를 분리하여 제한효소 *Sau3AI*으로 부분 절단한 다음 Lambda GEM-12 genomic cloning vector (Promega, USA)의 *Bam*HI 위치에 cloning된 유전자는 램을 사용하여 plaque 혼성화반응을 수행하였다.

Probe를 이용하여 plaque 혼성화반응의 1차 선별 결과, 강한 positive signal을 나타내는 1개의 clone을 얻었으며 이로부터 2차 선별을 통하여 4개의 positive plaque (D1, D2, D3, D4)를 선별하였다. Plaque 선별에 사용된 동일한 유전자를 probe로 사용하여 Southern 혼성화반응을 수행한 결과, 이 clones은 DHPS의 cDNA에 상응하는 유전자를 함유하고 있음을 확인하였다. 이 중 D3 plaque로부터 분리된 DNA를 *Sac*I으로 절단하여 4.5kb의 밴드를 pBluescript SK(+)의 *Sac*I 자리에 클로닝하여 GDHPS라 명하였다. 이것을 *Hind*III와 *Kpn*I자리를 이용해서 exonucleaseII로 한 방향으로 deletion시킨 후 염기서열을 분석하였다(Figure 3).

벼에서 cloning한 GDHPS 염기서열은 3,116 nucleotides로 1,206bp의 5'-flanking region과 379bp 3'-flanking region, 그리고 587 nucleotides의 intron을 사이에 가진 1,044 nucleotides (347 amino acid, Mr. 38,381 daltons)의 ORF를 포함하고 있다.

전사개시 codon을 알아보기 위해 sense primer로 5'-untranslated region의 -40에서 -58 부위를, antisense primer로 transit peptide domain의 88~108 부위를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 여기서 증폭된 166bp의 DNA절편을 염기서열 분석한 결과, 반복되는 전사정지코돈 TGA가 DHPS를 encoding하고 있는 ORF의 5' untranslated 부위에 위치하기 때문에, 증폭된 GDHPS의 1-3 nucleotide의 ATG codon이 전사개시 codon으로 결정되었다.

GDHPS의 eukaryotic promoter element를 살펴본 결과 translation start site의 -429에서 -444

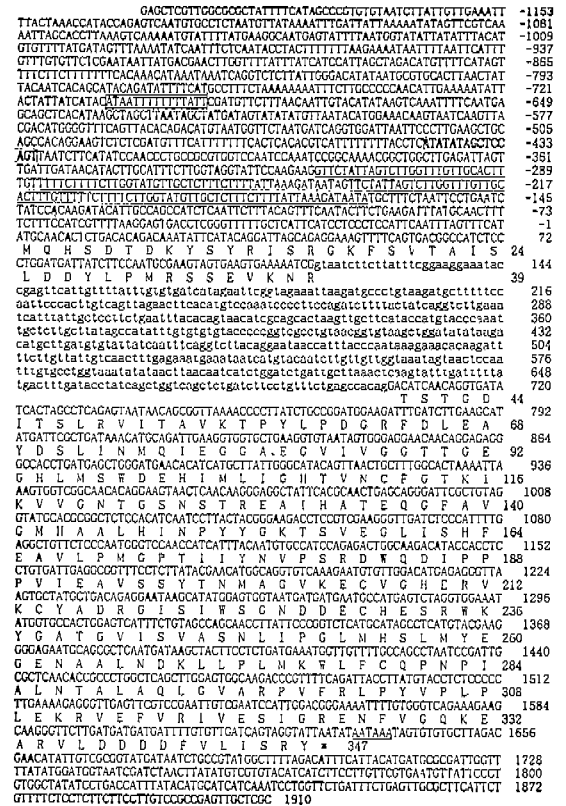


Figure 3. Nucleotide and deduced amino sequences of GDHPS. The single-underlineds represent the direct repeating sequence regions. The putative TATA and AT-1 element are single- and double-boxed, respectively. The dashed box indicates a putative transit peptid in amino terminal portion of the predicted protein. Asterisk indicates the translational stop codon. The double-underlined nucleotide sequence represents a likely polyadenylation site in the 3'-untranslated region of the transcript.

nucleotide upstream region에 putative TATA box가 존재하였고, 빛에 의해 조절되는 유전자에서 AT-1 protein binding sequence element로 알려진 'AATA(TT)TTTTTATT'가 5'-flanking region에 존재하였다. 또한 5'-flanking region은 -316bp에서 -165bp까지의 76bp의 direct repeating sequence를 포함하고 있었다. Pre-mRNA의 coding sequence는 각각 5'과 3' end 각각에 -GT와 AG-가 보존된 하나의 intron에 의해 나누어져 있었다. 3' flanking region에 polyA signal인 AATAAA를 함유하고 있었다(Figure 3).

GDHPS의 ORF는 38,381 dalton의 분자량과 pI 5.6의 376 아미노산 잔기로 구성되어 있다. ORF의

GDHPS	MQH-----SDTKYSY-----	11
DHPSW	MPYLPPRPHPHPTSLRSASPSPPFFFPAGTSRGRLOPVVSGHS	50
DHPSW2	M-----MAAGPTANPCVRLGKAPGA---LAPPRALRSAAAPLASH-	41
DHPSM	M-----ISPTNLLPAKRIIPVNSGGAATASPSPPVAARPRRLPSGLQS	44
DHPSAT	MSALKN-YGLISIDSLHFPFRNQLQSYK-----	28
DHPSFO	MAAMKS-YSMCSRESLDLFPFHNCVDNYK-----	28
	*	
GDHPS	--RISRGKFSVTAISLDDYLPMSRSEVKNRITSGDITLSRLVITAWKTPYL	59
DHPSW	ASRVSKGKFAVAALTDLDYLPMBRSTEVKNRTSDGIKSLRLITAWKTPYL	100
DHPSW2	--RVGRGKFSAAAITDDYLPMBRSTEVKNRTSDGIKSLRLITAWKTPYL	89
DHPSM	VT--GRGKVSLSAALITDDYLPMBRSTEVKNRTSDDIITRLRLITAWKTPYL	92
DHPSAT	-R-NAKVVSPVIAAVVFNHLPMBRSLDEKKNRTSDDIITRLRLITAWKTPYL	76
DHPSFO	-RRSGKWRPPOAAVKNLHLPMBRSEVKNTSADKSLRLITAWKTPYL	77
 * * * * * * * * * . * * * * . * * * *	
GDHPS	PDGRFDLEAYDSLIMQIEGGAEGVIVGGTTEGHLASWDEHIMLIGHTV	109
DHPSW	PDGRFDLEAYDSLINTQINGGAEGVIVGGTTEGHLASWDEHIMLIGHTV	150
DHPSW2	PDGRFDLEAYDSLINTQINGGAEGVIVGGTTEGHLASWDEHIMLIGHTV	139
DHPSM	PDGRFDLEAYDSLIMQIEGGAEGVIVGGTTEGHLASWDEHIMLIGHTV	142
DHPSAT	PDGRFDLAYDIDLINTQINGGAEGVIVGGTTEGHLASWDEHIMLIGHTV	126
DHPSFO	PDGRFDLEAYDALVMQIANGAEGVIVGGTTEGGLASWDEHIMLIGHTV	127
	*****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *	
GDHPS	NCFGTKIKVIGNTGCSNTRERAIHATEGFAVGMHAALHINPYGKTSVEG	159
DHPSW	NCFGANIKVIGNTGCSNTRERAHATEGFAVGMHAALHINPYGKTSVEG	200
DHPSW2	NCFGTNIKVIGNTGCSNTRERAIHASEGFAVGMHAALHINPYGKTSVEG	189
DHPSM	NCFGSRIKVIGNTGCSNTRERAHATEGFAVGMHAALHINPYGKTSVEG	192
DHPSAT	NCFGGRIKVIGNTGCSNTRERAIHATEGFAVGMHAALHINPYGKTSVEG	176
DHPSFO	NCFGSSIKVIGNTGCSNTRERAIHATEGFAVGMHAALHINPYGKTSVEG	177
	*****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *	
GDHPS	LISHFEAVLPMGPTIIVNVPSCRDFQDIPPPVIEAVSSYDMAGKVCVGH	209
DHPSW	LISHFEVLPMPGPTIIVNVPSCRDSQDIPPPVIEALSSYSMAGKVCVGH	250
DHPSW2	LISHFEVLPMPGPTIIVNVPSCRQDIPPAVIEALSTYPMAGKVCVGH	239
DHPSM	MISHFEAVLPMGPTIIVNVPSCRASQDIPPEVILAIISGYTMAGKVCVGH	242
DHPSAT	MNAHFQTLMLMGPTIIVNVPSCRQDIPPPVIFKLSQPMAGKVCVGH	226
DHPSFO	MVSHFDSVLPMPGPTIIVNVPSCRQDIPPPVIVHTIAGSFLAGKVCAGAN	227
 * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *	
GDHPS	ERVKCYADRGISIVNSGNDDECHSRWYKATGTVISVANLIPGLMSLSLAF	259
DHPSW	ERVKCYTKGKISIVNSGNDDECHSRWYKATGTVISVANLIPGLMSLSLAF	300
DHPSW2	ERVKCYTKGKISIVNSGNDDECHSRWYKATGTVISVTSNLPGLMSLSLAF	289
DHPSM	ERVKHYAKKISIVNSGNDDECHSRWYKATGTVISVTSNLPGLMSLSLAF	292
DHPSAT	NKVEETTKGIVNSGNDDECHSRWYKATGTVISVTSNLPGLMSLSLAF	276
DHPSFO	DRVEETTKGIVNSGNDDECHSRWYKATGTVISVTSNLPGLMSLSLAF	277
 * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *	
GDHPS	EGENALNKLKLLPLAKLFCQPNPIALNTALAGLQVAVRPFRLPYVPLPL	309
DHPSW	EGENALNKLKLLPLAKLFCQPNPIALNTALAGLQVAVRPFRLPYVPLPL	350
DHPSW2	EGENALNKLKLLPLAKLFCQPNPIALNTALAGLQVAVRPFRLPYVPLPL	339
DHPSM	KGENALNKLKLLPLAKLFCQPNPIALNTALAGLQVAVRPFRLPYVPLPL	342
DHPSAT	EGENALNKLKLLPLADLFCQPNPIALNTALAGLQVAVRPFRLPYVPLPL	326
DHPSFO	EGENALNKLKLLPLIDLFCQPNPIALNTALAGLQVAVRPFRLPYVPLPL	327
 * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *	
GDHPS	EKRVEFVRIEIVGRENFGQKEARVLDLDDDFVLSR-Y	347
DHPSW	EKRVEFVRIEIVGRENFGQKESRVLDDDFVLSR-Y	388
DHPSW2	EKRTEFVRIEIVGRENFGQKEARVLDLDDDFVLSR-Y	377
DHPSM	EKRAEFVRIEIVGRENFGQKEAR-----F	368
DHPSAT	SKRIEFVRLVKEIVGRENFGQKEDRVDVLDLDDDFVLSR-Y	364
DHPSFO	AQRVEFVNLVKIVGRENFGQKEDVLDLDDDFVLSR-L	366
 * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *****. * * * * . *	

Figure 4. Comparison of the amino acid sequence among GDHPS and plant DHPSs. Asterisks and points indicate perfectly conserved and well conserved amino acids, respectively. Dashed indicated gaps introduced to maximize alignment. DHPSW, DHPSW2, DHPMS, DHPSAT, and DHPSFO are cDNA clones isolated from wheat, maize, *Arabidopsis*, and poplar, respectively. These nucleotide sequence data will appear in the EMBL, GenBank, and DDJB Nucleotide Sequence Databases under the accession numbers "M60598", "M60599", "X52850", and "X72971", respectively.

deduced amino acids는 세균과 식물의 DHPS (Frisch et al., 1991; Kaneto et al., 1990; Richaud et al., 1986; Vauterin and Jacobs, 1994; and Yeh et al., 1988)와 서로 유사하였다. DHPS는 식물의 엽록체에서 기능을 수행하기 때문에 이 ORF는 엽록체 targeting에 필요한 21 아미노산으로 구성된 transit peptide와 성숙된 peptide domain인 326 아미노산으

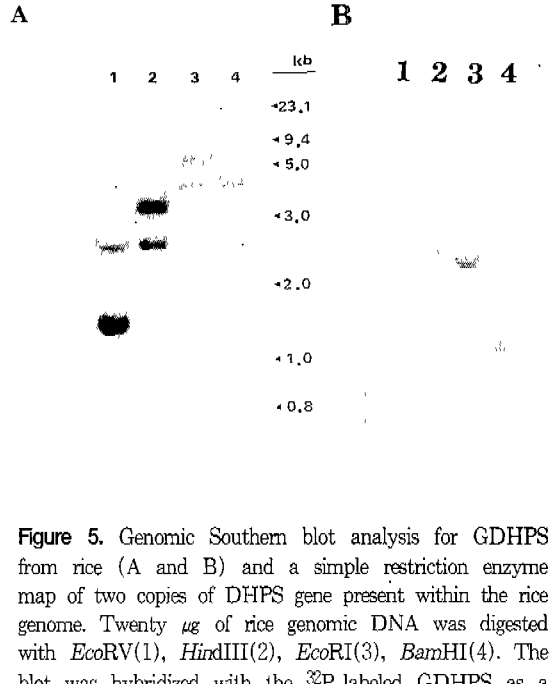


Figure 5. Genomic Southern blot analysis for GDHPS from rice (A and B) and a simple restriction enzyme map of two copies of DHPS gene present within the rice genome. Twenty μ g of rice genomic DNA was digested with *EcoRV*(1), *HindIII*(2), *EcoRI*(3), *BamHI*(4). The blot was hybridized with the 32 P-labeled GDHPS as a specific probe (A) and reused in hybridization containing 32 P-labeled GDHPS (B)

로 구성되어 있다. Transit peptide로 절단되는 부위는 Thr-21과 Ala-22사이로 예상되었다.

GDHPS의 아미노산서열을 비교한 결과 밀의 pDA17과 pDA08-26, 옥수수 ZMDHPS, *Arabidopsis*, 포플러 DHPS에서 각각 87%, 83.9%, 83.6%, 71.5% 그리고 70.06%의 유사성을 보였다 (Figure 4).

GDHPS clone의 mature peptide domain의 deduced amino acid sequence는 단자엽과 쌍자엽 식물에서 높이 보존된 반면에 transit peptide domain은 식물마다 큰 차이를 보였다. GDHPS의 transit peptide domain과 cDNA clone의 hydropathy 분석 (Kyte and Doolittle, 1982)결과 GDHPS와 밀의 PDA17의 transit peptide domain은 대개 친수성인 극성과 전하를 갖는 아미노산으로 구성되어 있는 반면, *Arabidopsis*의 DHPS는 소수성이며, 옥수수의 ZMDHPS와 포플러의 DHPS는 친수성과 소수성 domain을 갖는 것을 확인했다.

벼내의 GDHPS 유전자의 수를 확인하기 위하여 Southern blot분석을 실시하였다. RCDHPS probe를 이용하였을 때 *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*와 *PstI* 절단시 1개의 major band와 1개의 minor band가 관찰

C L R

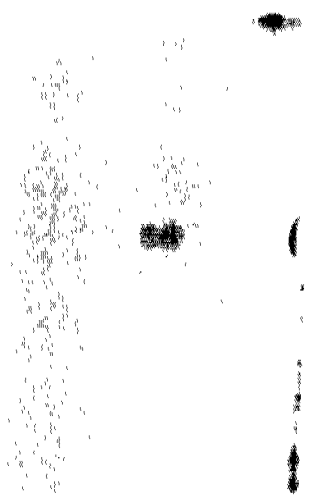


Figure 6. Northern hybridization pattern for the GDHPS gene transcripts. Poly(A⁺) RNA was isolated from rice calli (C), leaves (L) and roots (R). Point five μ g of each RNA preparation was applied to an agarose/formaldehyde gel electrophoresis and hybridized to the ³²P-labeled GDHPS gene. The size of transcripts is about 2.0kb.

되었다. RT-PCR로 증폭된 166bp GDHPS의 probe를 이용하였을 때도 역시 1개의 major band와 1개의 minor band가 관찰되었다(Figure 5). 그러나, RCDHPS probe로 혼성화된 minor band의 크기는 각 제한효소로 digest한 lane에 GDHPS 특정 probe와 결합한 주요 band 크기에 정확하게 대응되었다. 2개의 Southern blot 분석으로 DHPS 유전자는 아마 GDHPS와 RCDHPS 유전자로 2개의 copy가 벼 genome내에 구성되어 있고, DHPS peptide domain의 제한효소 site는 매우 비슷하지만 transit peptide domain과 3'UTR은 매우 다르다는 것을 암시했다.

다른 조직에서 GDHPS 유전자 발현여부를 알아보기 위해서 20 μ g total RNA와 GDHPS에 특이적인 probe로 northern 분석이 행해졌을 때, 잎에서만 희미한 northern band가 검출되었다. 그러나, 잎과 뿌리의 2.0 Kb 크기의 northern band가 대략 0.5 μ g poly[A⁺] RNA로 진행된 northern 분석에서 관찰될 수 있었다. poly[A⁺] RNA가 northern hybridization에서 사용되었을 지라도, GDHPS 유전자의 전사체가 암상태에서 2,4-D 1 mg/L가 보충된 배지에서 유기된 callus에서 발견되지 않았다(Figure 6). 그러므로, Southern analysis에서 보여준 벼 genome 내에 존재하는 두 종류의 유전자는 식물 조직에 의해서 특이하게 발현된다는 것을 알았다. GDHPS 전사체는 엽록체 발육이 왕성하게 진행되는 잎에서 높은 수준으로 발현되는 반면, callus에서는 발현되지 않

거나 매우 낮은 수준으로 발현된다.

현재 본 DHPS의 cDNA를 cloning하여 염기서열 분석중이며, 종자내 발현양상을 구명하기 위하여 종자 발육 단계별 northern blot 및 *in situ* hybridization을 실시하고 있고, 이 DHPS의 promoter분석을 위하여 promoter deletion 연구를 위해 promoter 재조합을 실시하고 있다.

2) Asparaginase의 Cloning

벼의 잎조직으로부터 제작된 Lambda GEM-12 genomic cloning vector (Promega, USA)의 유전자는 행을 사용하여 plaque 혼성화반응을 수행하였으며, probe는 EST에 의해 확보된 asparaginase 유전자의 partial cDNA를 일본 농업생물자원연구소에서 분양 받아 사용하였다.

Plaque 혼성화반응을 수행하여 1차 선별한 결과, 강한 positive signal을 나타내는 12개의 clone들을 얻었다. 이 12개의 클론을 2차 선별하기 위하여 plaque 혼성화반응을 수행하여 12개의 클론을 순수하게 분리할 수 있었으며, 그 중 8개의 클론으로부터 phage DNA를 분리하여 Southern blot분석을 수행한 결과, 8개의 clones은 각각 asparaginase의 cDNA에 상응하는 유전자를 함유하고 있음을 확인하였으며, 각각의 8개의 클론들은 서로 다른 제한효소 부위를 가지므로 각 클론은 multigene family의 한 member이며, 식물체의 발달 과정이나 서로 다른 조직 부위에서 발현될 가능성이 있다고 사료되었다.

8개의 서로 다른 클론들이 asparaginase에 homology를 보임에 따라 genome내에 asparaginase의 copy 수를 밝히고자 Southern blot을 수행하였다(Figure 7). 벼의 genomic DNA를 *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*으로 처리하여 전기영동을 수행한 다음 Southern blot 분석을 수행하였다. *EcoRI*으로 절단된 경우 20 kb와 11 kb 위치에서 2개의 major band가 나왔으며, *PstI*의 경우 9.0 kb, 4.5 kb, 3.5 kb 그리고 2.8 kb 위치에서 4개의 major band가 나왔으며, *HindIII* 처리의 경우는 9.0 kb 그리고 5.0 kb 위치에서 2개의 major band가 관찰되었으며, *BamHI*처리구의 경우 23.0 kb, 10.0 kb 그리고 9.5 kb 3개의 major band가 관찰되었다. 또한 각각의 효소 처리구에서 수개의 minor band 관찰되므로 asparaginase유전자는 적어도 벼 게놈 내에 2-3

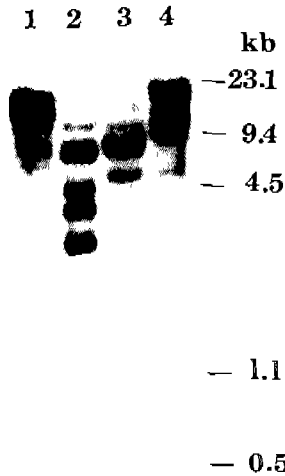


Figure 7. Genomic Southern blot analysis for asparaginase gene of rice. Twenty μ g of rice genomic DNA was digested with *EcoRI*(1), *PstI*(2), *HindIII*(3), and *BamHI*(4). The blot was hybridized to the rice cDNA corresponding to asparaginase gene as a probe.

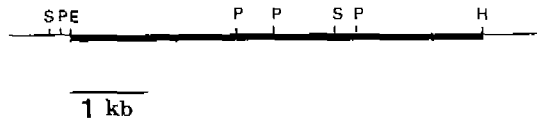


Figure 8. Restriction map of pASP1. — indicates pBSSK(+) vector and — indicates rice genomic DNA fragment containing asparaginase gene. E: *EcoRI*, H: *HindIII*, P: *PstI*, and S: *SacI*.

copy가 존재하는 것으로 생각된다. 이는 *Lupinus*에서 K^+ 이 존재여부에 따라 활성이 다른 두종류의 asparaginase가 존재하는 것으로 보고된 바와 같이 벼에서도 두 종류 이상의 유전자가 존재하는 것이 아닌가 사료된다.

Asparaginase 유전자를 함유하고 있는 것으로 사료되는 8개의 genomic 클론중 1개의 클론을 선택하여 A7으로 명명하고 phage DNA를 분리한 다음, *EcoRI/HindIII*를 이용하여 이중효소로 절단한 다음 전기영동하여 약 5.5 kb에 해당하는 DNA절편을 pBluescript SK(+) 벡터의 *EcoRI/HindIII*위치에 삽입하였다. 이렇게 제조된 재조합 plasmid를 pASP1으로 명명하였다. pASP1을 다양한 제한효소 *AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SacI*, *XhoI*으로 절단하고, *HindIII*, *PstI* 그리고 *SacI* 제한효소를 사용하여 이중 또는 삼중 효소로 절단한

다음 전기영동하여 asparaginase의 cDNA를 probe로 이용하여 Southern blot분석을 수행하여 pASP1의 제한효소 지도를 작성하였다(Figure 8).

제한효소 지도를 토대로 asparaginase genomic clone의 염기서열을 분석하기 위하여 pASP1을 제한효소 *PstI*과 *SacI*으로 부분 절단하여 subcloning 하였다. 이 clone들은 각각 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단한 후 exonuclease III와 SI nuclease를 이용하여 deletion clone을 작성하였다. 이 clone의 염기서열은 현재 분석중이다.

고 Lysine 함유 저장단백질의 형질전환

종자의 저장단백질은 성숙한 종자의 protein body에서 합성되고 축적된다. 쌍자엽식물의 주요 저장단백질은 salt-soluble globulin이고, 반면 단자엽식물의 종자 저장단백질은 alcohol-soluble prolamins과 salt-soluble globulin이다. 이런 유전자의 조직특이성은 단자엽식물과 쌍자엽식물 사이에서 매우 다르다. 예를 들어, 쌍자엽식물의 globulin유전자는 배조직에 특이적으로 발현되는 반면, 단자엽식물의 prolamins과 globulin유전자는 배유조직에서 발현된다(Shotwell and Larkins, 1989).

최근 종자단백질의 양과 질의 향상을 위해서 유전공학적인 방법을 이용하고 있다. 그중 하나의 분자적수준에서의 시도는 우리가 원하는 아미노산이 풍부한 단백질을 암호화한 외래유전자를 목적하는 식물체로 옮기는 것이다. 종자단백질의 질을 변화시키기 위해서 유전자는 강력한 종자특이 promoter 조절하에 발현되어야 할 것이고, 외래단백질은 상당한 수준으로 축적되어야만 할 것이다.

콩의 중요한 종자 저장단백질은 glycinin과 β -conglycinin이다. Glycinin은 식품에 사용하기 위한 기능적 특성뿐만 아니라, 영양적 가치면에서 β -conglycinin보다 우수하다(Millerd, 1975). Glycinin은 또 곡류종자에 한정된 아미노산인 lysine을 높은 함량으로 가지고 있다. 그러므로 glycinin 유전자는 영양적 질을 향상시키기 위해서 단자엽식물체로 옮겨진 대표적인 유전자중의 하나이다. 전에 우리는 단백질공학을 통해 glycinin의 영양적, 기능적 가치를 향상시키는 데 성공했다(Kim, et al. 1990; Utsumi, et al. 1993; Katsube, et al. 1994). 그리고,

CaMV 35S promoter에 의해 조절, 발현되는 변형된 glycinin이 비록 낮은 수준으로 축적되기는 하나(종자 총 단백질의 0.1% 이하), 형질전환 담배종자에서 성숙한 형태로 가공되고 hexamer를 스스로 만든다는 것이 관찰되었다(Utsumi, et al. 1993). 이런 관찰결과는 이상적인 식품의 질을 가진 변형된 glycinin을 생산해내는 작물을 창조할 수 있다는 가능성을 보여준다.

본 연구에서는, 유전공학을 이용해서 곡류종자의 영양적 질을 향상시키기 위한 계획의 일환으로, glycinin이 형질전환 담배 종자의 배유조직에 특이적으로 높은 수준의 대두 glycinin을 축적하는 것을 시도하였다. 정상인 것과 변형된 glycinin은 대두종자의 glycinin과 비슷한 방법으로 형질전환 담배의 배유조직에서 합성·가공되고, 축적되는 것을 보여주었다. 이것은 쌍자엽식물에서 종자저장단백질이 단자엽식물체의 배유 특이적 promoter의 조절하에 배유조직에서 높은 수준으로 축적된 첫번째 증거가 될 것이다.

정상과 변형된 Glycinin 유전자의 형질전환

27bp 5' non-coding염기와 1,488bp 또는 1,506bp의 coding 염기 및 189bp 3' non-coding염기로 구성된

정상적 및 변형된 preproglycinin Aldblb cDNA를 베타 저장단백질 glutelin *GluB-1*유전자의 -1,302와 +18위치사이의 5' flanking영역에 융합한 후, binary Ti plasmid vector pBI101에 삽입시켰다(Figure 9). 이런 chimeric construct는 *Agrobacterium*을 매개로 한 leaf disc 형질전환을 이용해서 담배 내로 도입되었다.

잎 DNA는 정상적인 것과 변형된 glycinin construct의 kanamycin저항성 식물체에서 분리하였고, 1.7kb preproglycinin cDNA를 ³²P로 표지해서 혼성화한 결과, 1-6개의 복사본이 담배 내에 삽입된 것으로 나타났다. 몇 개의 형질전환식물체에서 예상되지 않는 크기의 band가 관찰되었는데, 이것은 *Agrobacterium*이 담배 내로 형질전환되는 동안 유전자 재배열이 일어났다는 것으로 추정된다. Glutelin promoter와 glycinin cDNA로 구성된 chimeric 유전자의 시기, 장소 특이적 발현에 대해 조사하기 위해서 정상인 것과 변형된 glycinin유전자가 형질전환된 식물체의 종자, 잎, 줄기에서 RNA를 분리하여 northern blot을 실시한 결과 mRNA 수준은 15DAF에서 25DAF로 가면서 증가되었다. 정상적인 것과 변형된 glycinin construct간 시기별 pattern에는 큰 차이가 없었다(Figure 10).

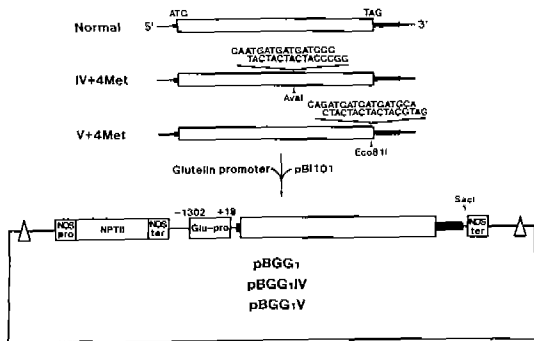


Figure 9. Schematic representation of the normal and modified glycinin cDNAs and binary plasmids for their chimeric genes. Open and shaded boxes indicate coding region and 5' and 3' non-coding regions of glycine cDNA, respectively. NOS-pro, NPTII, NOS-ter and Glu-pro are nopaline synthase promoter and neomycin phosphotransferase II gene, nopaline synthase gene terminator and glutelin promoter, respectively. Triangles are right and left borders of T-DNA.

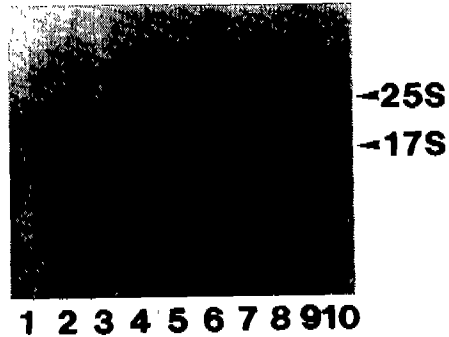


Figure 10. Northern blot analysis of maturing seed, leaf and stem RNAs of transgenic tobacco plants. Total RNA was isolated and fractionated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel containing formaldehyde and then blotted onto nylon membrane. The RNA was hybridized with the coding region of AlaBib preproglycinin cDNA. Arrow heads indicate the position of 25S and 17S ribosomal RNAs. Lane 1, 15 DAF (days after flowering); lane 2, 20 DAF; lane 3, 25 DAF; lane 4, leaf; lane 5, stem in IV+4Met glycinin; lane 6, 15 DAF; lane 7, 20 DAF; lane 8, 25 DAF; lane 9, leaf; lane 10, stem in normal glycinin.

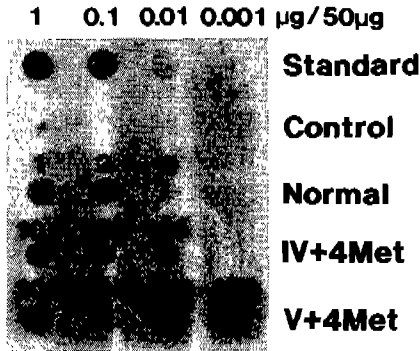


Figure 11. Detection of the expressed proteins by dot blotting. The extracts of matured seeds of transgenic tobacco plants with the normal and modified glycine cDNAs were analyzed by immunoblotting. Between 0.001 and 1 µg of purified glycinin mixed with 25 µg proteins of seed extract of untransformed tobacco plants was used as standard. The numbers above each dot indicate individual plants transformed with the normal and modified glycinin cDNAs.

발현된 Glycinin의 면역학적 검출

형질전환 담배종자에서 추출한 protein을 glycinin의 존재여부를 알아보기 위해서 dot blot에 의해 면역학적으로 분석한 결과 glycinin이 건조한 종자의 총단백질의 0.02-4% 정도 축적됨을 알 수 있었다 (Figure 11). 다수의 형질전환담배를 이용해서 발현 수준을 검토해 보았을 때 정상적인 것(23개체)과 변형된 glycinin V+4Met(34개체)를 포함한 형질전환 담배식물체는 0.02-4% 정도의 glycinin protein을 생산하며, 그 중 65% 이상(각각 15개체와 23개체)의 식물체들에서는 건조한 종자에서 1% 이상의 glycinin이 축적되었다. 가장 높은 수준은 정상, IV+4Met, 및 V+4Met 모두에서 약 4% 정도였다. 이것은 CaMV 35S promoter에 의해 직접적으로 조절되는 것과 비교해 볼 때 40배나 높은 수준이다 (Utsumi, et al. 1993). 많은 종자저장단백질이 각기 다른 종자 특이적 promoter의 조절하에 형질전환식물체에서 합성되어져 왔으며, 종자 내에 축적된 단백질 수준이 0.003-2%인 것으로 보고된 바 있다 (Beachy, et al. 1985; Sengupta-Gopalan, et al. 1985; Okamuro, et al. 1986; Sturm, et al. 1988; Higgins, et al. 1988; Williamson, et al. 1988; Robert, et al. 1989; Bogue, et al. 1990; Ohtani, et al. 1990). GluB-

1 promoter와 glycinin cDNA로 구성된 chimeric 유전자의 높은 수준의 발현은 강력한 GluB-1 promoter의 사용에 기인했을 것이다. 또 다른 설명으로는 배유조직이 chimeric protein의 축적에 적합하다는 것으로 제시될 수 있다.

형질전환 담배의 성숙한 건조종자에서 발현된 glycinin이 스스로 모여 hexamer로 되는지의 여부를 관찰하기 위해서 단백질추출물을 sucrose density gradient centrifugation 및 2-mercaptoethanol이 없는 ADS-PAGE로 분리후, anti-proglycinin serum을 이용해서 immunoblotting을 실시한 결과, 담배종자에서 발현된 glycinin이 피자식물인 대두종자와 같은 방식으로 hexamer로 모이게 됨을 보였다. Proglycinin이 성숙한 형태로 변환되었는지를 조사하기 위해서 sucrose density gradient centrifugation와 2-mercaptoethanol이 있는 SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose로 옮긴 뒤 anti-proglycinin serum과 반응시킨 결과 전구물질에서 성숙한 형태의 변화가 대두종자와 비슷한 방법으로 형질전환 담배종자의 배유조직에서 일어난다는 것을 알 수 있었다.

대두 Glycinin의 합성 및 축적장소

Glycinin 분포양상을 보기 위해서 immunological tissue print에서 합성된 glycinin은 배를 둘러싸고 있는 배유조직에 제한된 것을 보여주었다(Figure 12). 이런 축적 양상은 *GluB-1* promoter에 의해 조절되는 GUS 염색양상과 일치하였다. 따라서 대두 glycinin 유전자는 성숙한 종자에서 특이적으로 발현되고, 그것의 해독된 산물은 벼 glutelin promoter의 조절하에 배유조직에서 고도로 축적된다는 결론을 내릴 수 있었다. 이것은 Sengupta-Gopalan 등 (1985)과 Higgins 등(1988)에 의해 legume저장단백질이 담배 내에서 배가 아닌 다른 조직에서 발현된다고 보고되었을지라도, 쌍자엽식물의 저장단백질이 많은 양과 특이적으로 배유조직에 축적되는 첫번째 증거가 되었다. 단자엽식물의 배 특이 promoter에 의해 발현될 때 형질전환 담배종자의 배유조직에서 chimeric protein의 저장에는 제한이 없었다. 축적양식은 산성과 염기성 polypeptide의 C 말단부분에서 변형에 의해서 바뀌지는 않는다는 것을 덧붙여 설명할 수 있었다.

Glycinin을 성숙한 종자의 protein body로 모으는

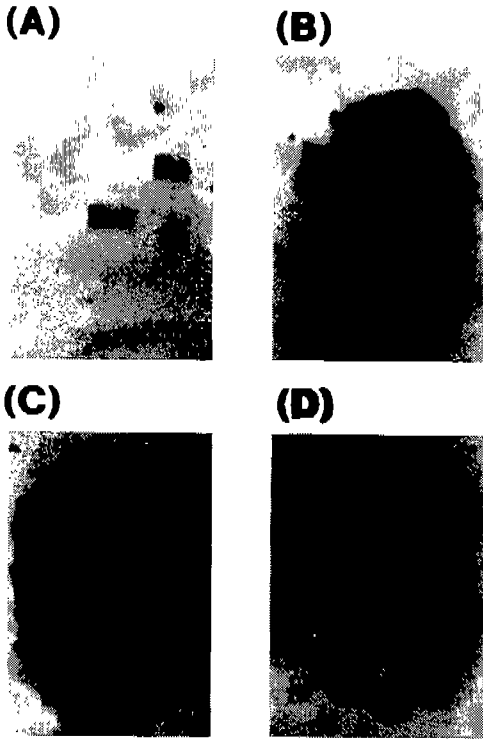


Figure 12. Histochemical localization of the expressed glycinin in matured seed. Plants of the seed section of untransformed (A), Normal (B), IV+4Met (C) and V+4Met (D) were treated with anti-glycinin serum, followed by a goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate. Em, embryo; En, endosperm.

것이 목적이기 때문에, immunogold 전자현미경법으로 관찰한 결과 표지는 배유의 protein body 기질에 한정되고 내부 crystalloid에는 없는 것으로 나타났다. 이것은 퇴화된 glycinin을 포함해서 합성된 모든 glycinin이 형질전환 담배종자의 protein body기질에서 모아지는 것으로 생각된다. Immunoreactive물질은 정상식물의 배세포나 조직의 protein body에서 검출되지 않았다. 부가적으로, 산성과 염기성 polypeptide의 C말단부분 glycinin이 변형되어도 protein body내 축적양상은 변화되지 않았다. 이런 결과는 액포로 보내는데 필요한 기작이 산성과 염기성 polypeptide의 C말단 구조와 관계가 없는 것으로 설명된다. 첨가적으로, 우리의 관찰결과는 배유 특이적인 베타 glutelin promoter의 조절하에 대두 glycinin합성이 단백질이 이동 및 축적되는 기작에는 영향을 주지 않는 것을 보여주고 있다.

REFERENCES

- Azevedo, R.A., R.J. Smith, and P.J. Lea. 1992. *Phytochemistry* 31 : 3371-3374
- Beachy R.N., Z.L. Chen, R.B. Horsh, S.G. Rogers, N.J. Hoffmann, and R.T. Fraley. 1985. *EMBO J.* 4 : 3320-3324
- Bogue M.A., R.A. Von der Haar, M.L. Nuccio, L.R. Griffing and T.L. Thomas. 1990. *Mol. Gen. Genet.*, 221 : 49-57
- Bryon, J.K. 1980. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 5, B.J. Mifflin, ed (New York; Academic Press), pp. 403-452
- Carison P.S. 1973. *Science* 180 : 1336-1368
- Cohen, G.N., and I. Saint-Girons. 1987. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, ed (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 429-444
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1984. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1: 2
- Dereppe, C., G. Bold, O. Ghisalba, E. Ebert, and H.P. Schar. 1992. *Plant Physiol.* 98 : 813-821
- Dix P.J., and H.E. Street. 1975. *Plant Sci Lett* 5 : 231-237
- Doston, S.B., D.A. Somers, and B.G. Gengenbach. 1989. *Plant Physiol.* 91 : 1602-1608
- Flick C.E., R.A. Jensen, and D.A. Evans. 1981. *Z. Pflanzenphysiol* 103 : 239-245
- Frish, D.A., A.M. Tommey, B.J. Gengenbach, and D.A. Somers. 1991. *Mol. Gen. Genet.* 228 : 287-293
- Ghislain, M., V. Frankard, and M. Jacobs. 1990. *Planta* 180 : 480-486
- Ghislain, M., V. Frankard, D. Vandenbossche, B.F. Matthews, and B. Jacobs. 1994. *Plant. Mol. Biol.* 24 : 835-851
- Higgins T.J.V., E.J. Newbigin, D. Spencer, D.J. Ulewellyn, and S. Craig. 1988. *Plant Mol. Biol.*, 11 : 683-695
- Kaneko, T., T. Hashimoto, R. Kumpaisal, and Y. Yamada. 1990. *J. Biol. Chem.* 265 : 17451-17455
- Katsube T., A.B. Gidamis, J. Kanamori, I.J. Kang, S. Utsumi, and M. Kito. 1994. *J. Agric. Food Chem.*, 42 : 2639-2645
- Kim C.-S., S. Kamiya, T. Sato, S. Utsumi, and M. Kito. 1990. *Protein Eng.*, 3 : 725-731
- Kumpaisal, R., T. Hashimoto, and Y. Yamada. 1987. *Plant Physiol.* 85 : 145-151
- Lea, P.J., R.M. Wallsgrove, and B.J. Mifflin. 1985. In *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, G.C. ed London: Chapman and Hall, pp. 197-226

- Lee H.Y., and T. Kameya. 1991. *Theor. Appl. Genet.* 82 : 405-408
- Maliga P. 1984. *Plant Physiol* 35 : 519-542
- Matthews, B.F., M.J. Farrar, and A.C. Gray. 1989. *Plant Physiol.* 91 : 1569-1574
- Millerd A. 1975. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26 : 53-72
- Mori, S., H. Hasegawa, R. Che, H. Nakanishi, and M. Murakami. 1989. *Thoe. Appl. Genet.* 77 : 44-48
- Muehlbauer, G.J., D.A. Somers, B.F. Matthews, and B.G. Gengenbach. 1995. *Plant Physiol.* 106 : 1303-1312
- Ohtani T., J.C. Wallace, G.A. Thompson, G. Galili, and B.A. Larkins. 1990. *Plant Mol. Biol.*, 16 : 117-128
- Okamuro J.K., K.D. Jofuku, and R.B. Goldberg. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 8240-8244
- Richaud, F., C. Richaud, P. Ratet, and J.C. Patte. 1986. *J. Bacteriol.* 166 : 297-300
- Reish B., S.H. Duke, and E.T. Bingha. 1981. *Theor. Appl. Genet.* 59 : 89-94
- Robert L.S., R.D. Thompson, and R.B. Flavell. 1989. *Plant Cell* 1 : 569-578
- Rognes, S.E., S.W.J. Bright, and B.J. Miflin. 1983. *Planta* 157 : 32-38
- Sanako, K., and A. Komamine. 1978. *Plant Physiol.* 61 : 115-118
- Schaeffer, G.W. and F.T. Sharpe. 1981. *In Vitro.* 17 : 345-352
- Sengupta-Gopalan C., N.A. Reichert, R.F. Barker, T.C. Hall, and J.D. Kemp. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3320-3324
- Shotwell M.A., and B.A. Larkins. 1989. In; *The Biochemistry of Plants*, Vol. 15, A Comprehensive Treatise, A. Marcus (Ed.), Academic Press, pp. 297-345
- Sturm A., T.A. Voelker, E.M. Herman, and M.J. Chrispeels. 1988. *Planta*, 175 : 170-183
- Utsumi S., A.B. Gidamis, J. Kanamori, I.J. Kang, and M. Kito, 1993. *J. Agric. Food Chem.*, 41 : 687-691
- Vauterin, M., and M. Jacobs. 1994. *Plant Mol. Biol.* 25 : 545-550.
- Weisemann, J.M., and B.F. Matthews. 1993. *Plant Mol. Biol.* 22 : 301-312
- Widholm J.M. 1976. *Can J Bot* 54 : 1523-1629
- Williamson J.D., G. Galili, B.A. Larkins, and S.B.G. Gelvin. 1988. *Plant Physiol.*, 88 : 1002-1007
- Wilson, B.J., A.A. Gray, and B.F. Matthews. 1991. *Plant Physiol.* 97 : 1323-1328
- Yeh P., A.M. Sicard, A.J. Sinskey 1988 *Mol. Gen. Genet.* 212 : 105-111
- 福井三郎, 山田康之. 1985. 植物培養細胞の變異と選抜. 講談社 サイエンスライヴ pp 37-41