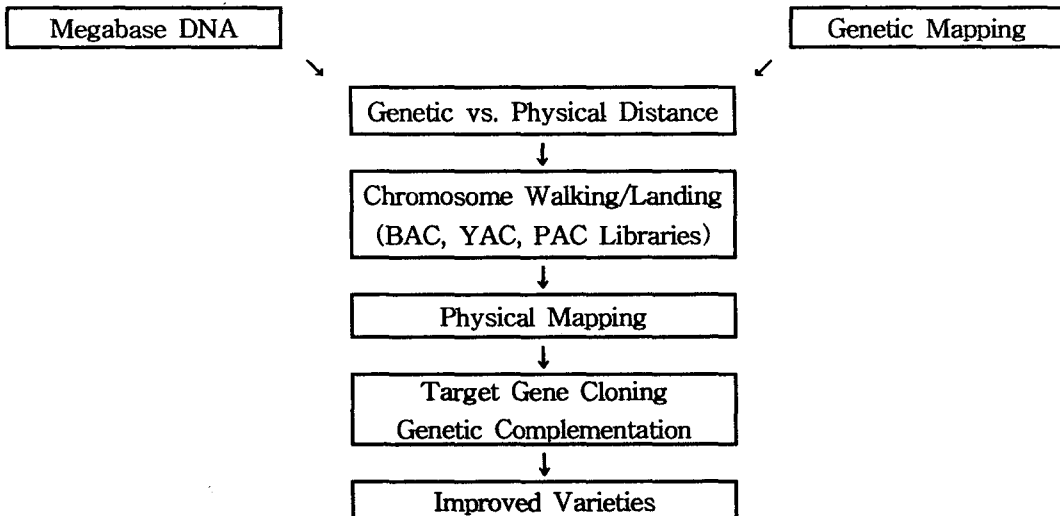


# 유전자 지도를 이용한 유용유전자의 분리 우 성 식 \*

## Map-based Gene Cloning Sung-Sick Woo \*

\* 건국대학교 농업생명과학부(Division of Agriculture and Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, S. Korea)

중요 작물뿐만 아니라 아기장대(*Aarabidopsis*)와 같은 모델식물들에서도 대부분의 유전형질들은 표현형이나 대략적인 기능만이 알려져 있을 뿐, 유전자가 식물체내에서 실제로 어떤 단백질을 합성하고 어떠한 생화학적 기작에 참여하는지에 관한 정보는 제한이 되어 있으므로, 그러한 정보에만 의존한 전략으로는 원하는 유전자를 클로닝 하기가 매우 어렵다. Map-based Cloning 또는 Positional Cloning은 우리가 원하는 목표유전자와 밀접히 연관되어 있는 분자표지와 거대DNA Library(Large Insert DNA Library)를 토대로 목표유전자의 유전체상의 유전적 물리적인 위치를 탐지하여, 표현형을 결정하는 본래의 유전자를 분리할 수 있는 기술로 정의될 수 있다(Paterson and Wing 1993). 성공적인 Map-based Cloning을 위한 필요 조건은 다음과 같다. 1) 고밀도 유전자 연관지도의 개발과 목표유전자에 대하여 밀접하게 연관된 분자표지의 개발, 2) 물리적 유전자지도 작성에 의한 유전적인 거리(cM 단위)를 물리적인 거리(bp 단위)로 전환, 3) BAC(Bacterial Artificial Chromosome) 이나 YAC(Yeast Artificial Chromosome)과 같은 거대DNA Library의 이용, 4) 목표유전자를 식물형질전환을 통하여 최종 확인하는 방법. 최근 식물에서는 Map-based Cloning 방법에 의하여 각종 저항성 유전자(*I2C, Bs2, Cf2, Cf5, Cf9, Cre3, Hs1, Kn, Mi, Mlo, Ndr1, Nim1, NPR1, Pad3, Pib, Pto, Rpm1, Rps2, Rtml, Rps4, Rar1, Xa1, Xa21*)를 비롯하여 생물학적 및 농업적으로 중요한 많은 유전자(*Abi1, Abi2, Abi3, Abi4, Agr1, Aral, Arg1, Axr1, Cad1, Chl, Det1, Det3, Dwarf1, Etr1, Fad3, F664(Mea), Flc, Fus3, GA3, Gnom, Hy1, Ifl1, Ls, Mp, Nor, Pkl, Prt1, Rin, Rsw1, Ttg1, Zmm8, Zmm14, Zll*)들이 클로닝 되고 있다.



오늘날 유전체 연구(Genomics)는 생명현상을 연구하는데 그 접근방법을 새로이 하는 미

래의 연구 분야로서 부각되고 있으며, 유전자 연관지도상의 분자표지는 유전체상의 이정표로서 핵심적인 역할을 하고 있다. 유전체 연구와 더불어 1980년대 중반부터 유전자 클로닝에 획기적인 전략으로 이용되고 있는 Map-based Cloning의 구체적인 방법에 대하여 소개 하고자 한다.

### 목표유전자 부근의 초밀접 분자표지 개발

현재 국내외적으로 많은 중요 작물에서 다양한 분자표지를 이용한 고밀도 유전자 연관지도의 개발이 완료되었거나 활발히 이루어져가고 있으므로 이미 발표된 연관지도를 Framework으로 이용하면 Map-based Cloning이 더욱 효율적이다. 전체 유전체를 고루 포함할 수 있는 기본 분자표지들을 10~20 cM 마다 선발하여 목표유전자와의 연관관계를 검정한 후 인근 영역의 정밀 연관지도를 작성한다. 목표유전자와 분자표지간의 유전적 위치가 확인되면 필요에 따라 목표유전자와 초밀접한 분자표지들을 개발한다. 근동질 계통(Near Isogenic Lines, NILs)을 이용하면 밀접한 분자표지를 손쉽게 개발할 수가 있는데, NILs는 여러 세대에 걸친 여교잡과 선발에 의하여 두 계통간에 목표 유전자좌와 밀접하게 연관된 영역을 제외한 모든 유전체의 조성은 이론적으로 동일하여야 하므로 두 NILs간에 다형성(Polymorphism)을 보이는 분자표지는 반드시 목표유전자 영역과 근접하여 있을 것이다. 역으로 다수의 분자표지를 가지고 두 NILs를 동정하여도 다형성을 보이는 분자표지는 그리 많지 않을 것이므로, 짧은 시간 내에 많은 개체에서 다수의 분자표지를 선발 할 수 있는 RAPD와 AFLP등 PCR에 기초한 High Volume Marker를 이용하는 것이 바람직하다. 이미 개발된 NILs의 활용이 불가능할 경우 Bulk Segregant Analysis(BSA)나 Synthetic DNA Pool Method등의 Pooled-sample Mapping 방법으로 클로닝의 대상이 되는 형질이나 유전자좌 양편에 위치한 분자표지의 다형성으로 분리하고 있는 세대의 개체들을 나누어 각각의 DNA를 합치면 인위적인 DNA근동질을 만들 수 있고 목표유전자좌와 밀접하게 연관된 분자표지를 찾을 수가 있다(Michelmore et al. 1991, Giovannoni et al. 1991).

### 거대DNA의 분리 및 PFGE 분석

고품질의 거대DNA(Megabase-size DNA)를 분리하고 조작하는 기술은 고밀도 연관지도의 작성과 더불어 Map-based Cloning의 핵심 기반기술인데, 거대DNA는 PFGE(Pulsed-field Gel Electrophoresis)를 이용한 물리적 유전자지도 작성과 BAC Library와 같은 거대DNA Library 개발에 필수적인 재료이기 때문이다(Woo et al. 1995). 거대DNA는 핵이나 세포벽을 제거한 원형질체를 Microbead나 Plug 형태의 Agarose Matrix에 고정시킨 후 염색체 수준의 DNA를 제외한 모든 세포질 성분을 제거하여 제작할 수 있는데, 핵으로부터 분리된 DNA는 원형질체로부터 분리된 DNA보다 그 분리과정이 간단하며 세포질(엽록체와 미토콘드리아) DNA의 오염이 더 적어서 식물 거대DNA 분리방법으로 현재 널리 쓰이고 있다(Zhang et al. 1996). 분리된 거대DNA를 유전체내에서 절단할 수 있는 염기서열이 매우 드문 제한 효소들을 이용하여 수십에서 수백 kb의 절편으로 자른 후에, PFGE를 이용하여 분리하고, 목표유전자와 초밀접한 분자표지를 탐침으로 하여 Southern Hybridization을 하면, 목표유전자를 둘러싸고 있는 유전체 영역에서 분자표지들과 목표 유전자간의 유전적인 거리를 실제의 물리적인 거리로 환산하고 Chromosome Walking에 필요한 정보를 얻을 수 있다.

### 거대DNA Library의 제작

거대DNA Library는 효모 염색체의 말단체, 중심체, 그리고 염색체 복제에 필요한 염기서열 등을 이용한 YAC, 그리고 박테리아에 기초한 BAC, PAC(P1-derived Artificial Chromosome), Cosmid 등의 두 그룹으로 크게 나눌 수 있다. YAC은 클로닝할 수 있는 Insert DNA의 크기가 거의 무제한이므로, 인간을 비롯하여 복잡하고도 거대한 고등생물의 유전체를 연구하고 유용유전자를 분리하는데 가장 먼저 이용되었다(Burke et al. 1987). BAC은 인간 유전체의 거대DNA library를 효과적으로 만들기 위하여 1992년 처음 개발되었으며, 식물에서는 최초로 1994년에 수수의 BAC Library가 개발되었다(Woo et al. 1994). YAC Library는 제작에 오랜 시간과 고도의 축적된 기술이 필요하고, 효모의 Chromosome들로부터 YAC DNA의 분리가 까다롭고, 거대 Insert DNA의 안정성에 문제가 있어, 현재는 식물 유전체를 대상으로 하는 대부분의 연구에 BAC이 널리 쓰이고 있다. BAC Library 제작에 이용되는 플라스미드 벡터는 *E. coli*의 F인자로부터 유래하였고, 적절한 *E. coli* Host Line의 선택과 함께 BAC벡터들은 최소한 350kb의 DNA를 안정되게 유지시킬 수 있으며, Library 제작이 상대적으로 용이하고, 표준 플라스미드 체계처럼 개별적인 클론들을 쉽게 분리 동정할 수 있다는 등의 이점을 제공한다. BAC Library를 제작하는 과정은 먼저 거대DNA를 *Hind*III나 *Eco*RI 같은 제한효소로 부분절단한 후, CHEF전기영동을 통해 적절한 크기(100-350kb)의 DNA절편을 선발하고, 동일한 효소에 의하여 절단된 BAC 벡터와 결합한 후, *E. coli* Competent Cell로 Transformation하여 증식한다. 최근에 몇몇 BAC 벡터들은 BAC 식물 형질전환 벡터인 pBIBAC과 같은 특수한 형태로 개발되어져 왔다(Hamilton 1997, Liu et al. 1999). 새로운 벡터중 하나인 pBAC-Indigo는 명백한 Blue/White 선발을 가능케 하는데 이는 로봇을 이용한 고속 대량 Colony Picking 공정에서 매우 중요하다.

### Chromosome Walking/Landing과 Physical Mapping

클로닝 하고자 하는 유전형질을 포함하는 식물체에서 BAC과 같은 거대DNA Library의 이용이 가능하면 목표유전자와 밀접하게 연관된 분자표지로 Library를 동정하여 클론들을 1차로 선발하고 클론의 Insert DNA에서 목표유전자 방향의 말단부위절편을 분리하여 거대DNA Library를 재차 동정하면서 분자표지로부터 목표유전자까지의 유전체 영역을 서로 겹치는 BAC클론들로 Contig를 만들어 연결하는 Chromosome Walking과 물리적 유전자지도 작성을 동시에 수행할 수 있다. 최근에 개발된 Overgo를 이용하면 효과적으로 BAC Contig를 연결할 수 있는데 BAC클론 한쪽 끝의 염기서열정보로부터 Overgo Maker를 이용하여 8bp의 염기서열이 중복되는 1쌍의 Overgo Primer들은 설계하고 한번에 서로 다른 40쌍의 Overgo Primer를 고밀도 BAC필터 검정에 이용할 수 있어 매우 효과적이다(McPherson 1997). 유전체의 크기가 클수록 성공적인 Chromosome Walking의 가능성은 줄어들고 많은 노력이 요구되므로 많은 개체를 가진 분리후대와 NILs나 DNA Pool을 이용하여 분자표지와 목표유전자 사이의 거리가 거대 DNA Library 클론들의 평균 절편크기 보다 작은 초밀접 분자표지를 개발하여 목표유전자를 포함하는 클론을 한번에 선발하는 Chromosome Landing 전략이 더 효과적이며, 많은 작물에서 고밀도 유전자 연관지도가 개발되고 있으므로 Chromosome Landing이 더욱 용이해져 가고 있다(Tanksley et al. 1995). Sequence-tagged Connector(STC) 전략은 전체 유전체의 염기서열해독을 위하여 사전에 거대DNA클론들로 전체 유전체의 물리적 지도를 작성하여야 하는 기존의 방법에서 소요되는 많은 시간과 노력을 절감하기 위하여 제안되었으며(Venter et al. 1996), CUGI(Clemson University Genomics Institute)의 연구팀에 의하여

벼의 염기서열해독에도 이용되고 있다. 평균 130 kb로 벼 유전체의 20배를 포함하는 BAC Library를 제작하고, 모든 BAC클론의 양쪽 말단DNA의 염기서열을 해독하여 BAC End Sequence Database를 만들면, STC가 유전체의 매 3 kb마다 염기서열 이정표로 존재하는 Virtual Map이 완성되어, 특정 BAC클론의 염기서열 정보만으로도 서로 겹치는 BAC클론들을 STC Database에서 찾아 낼 수 있고, FTP 프로그램을 이용한 Fingerprint Database에서 Contig의 연결을 확인 할 수 있다(<http://www.genome.clemson.edu>).

### 목표유전자의 클로닝과 확인과정

Chromosome Walking 이나 Landing이 성공적으로 수행되면 BAC이나 YAC등의 거대DNA절편내의 수많은 후보유전자들 중에서 목표유전자를 탐색하고 분리하여야 하는데, 먼저 거대DNA 클론을 서로 겹치는 작은 DNA절편들로 나눈 후 cDNA Library를 동정하여 후보 cDNA들을 찾아내고, Genomic DNA의 염기서열과 비교 확인하며 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends) 등을 이용하여 Full Length cDNA를 찾아낸다. 찾아낸 cDNA 또는 나누어진 Genomic DNA절편을 식물에 형질전환 하여 클로닝된 유전자의 유전적 상보관계를 증명할 수 있다. Transposon이나 T-DNA를 이용한 Insertional Mutagenesis방법으로 목표하는 형질을 Tagging하였을 때와 비교하여, 이러한 과정에서 더 많은 시간과 노력이 요구되는 것이 Map-based Cloning의 취약점이다. 거대 DNA 형질전환벡터를 이용하면 BAC같은 거대DNA클론 전체를 형질전환에 직접 이용할 수 있어 원하는 유전자를 정확히 포착할 때까지 기다릴 필요가 없고(Hamilton 1997, Liu et al. 1999), AB-QTL 전략에 의하여 개발된 근동질 유전자계통(QTL-NILs)에서 QTL을 직접 클로닝하여 형질전환에 이용할 수도 있을 것이다. 또한 선발된 거대DNA클론을 Shotgun 방법으로 전체 염기서열 해독을 한 후 그 정보를 유전자 은행의 Database와 유전자 예측 프로그램에 적용하여 후보유전자를 선발 할 수도 있다. 선발될 거대DNA클론이나 후보유전자는 목적하는 형질과 분리하지 않음으로 염기서열 정보로 다양한 분자표지를 개발하여 이용하면 Marker-assisted Selection의 효과를 극대화 할 수 있고, 유전체의 유사성을 이용하여 다른 작물에서도 유용한 분자표지로 이용되거나 유사한 유전자를 손쉽게 클로닝 할 수 있는 기회를 제공하게 된다.

### 미래의 유전자 클로닝

벼는 벼과 작물 중 가장 작은 게놈(430 Mb/1C)을 가지고 있으며 그 경제적 가치 뿐만 아니라 벼과 식물 유전체의 유사성과 더불어 분자유전학적 연구에서 모델식물로서도 매우 바람직하므로, 최근 아기장대와 더불어 벼 유전체의 염기서열을 완전히 해독하기 위한 국제공동연구가 진행되고 있다. 유전체의 구조적인 연구(Structural Genomics)가 분자표지개발, 유전자지도작성, 유전자의 물리적 위치 결정 등을 통한 전체 유전체의 염기서열해독으로 완성되어지면, 우리가 유전자의 기능에 기초하여 클로닝(Functional Cloning)한 유전자보다는 알려진 기능과 무관하게 클로닝된 유전자가 대부분을 이룰 것이고, 그러한 유전자들의 정확한 기능을 탐색하고 농업에의 중요성 및 이용방법을 밝히려는 연구(Functional Genomics)가 활발히 이루어질 것이다.

### 인용문헌

1. Burke DT, Carle GF, Olson MV 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236 : 806-811.
2. Giovannoni JJ, Wing RA, Ganai MW, Tanksley SD 1991. Isolation of molecular

- markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res.* 19 : 6553-6558.
3. Hamilton CM 1997. A binary-BAC system for plant transformation with high molecular weight DNA. *Gene* 200 : 107-116.
  4. Liu YG, Shirano Y, Fukaki H, Yanai Y, Tasaka M, Tabata S, Shibata, D 1999. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 6535-6540.
  5. McPherson JD 1997. "Overgo Maker" (<http://genome.wustl.edu/gsc/overgo/overgo.html>).
  6. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 9828-9832.
  7. Paterson AH, Wing RA 1993. Genome mapping in plants. *Curr. Op. Biotech.* 4 : 142-147.
  8. Tanksley SD, Ganai MW, Martin GB 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11 : 63-68.
  9. Venter JC, Smith HO, Hood L 1996. A new strategy for genome sequencing. *Nature* 381 : 364-366.
  10. Woo S-S, Jiang J, Gill BS, Paterson AH, Wing RA 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.* 22 : 4922-4931.
  11. \_\_\_\_\_, Rastogi VK, Zhang H-B, Paterson AH, Wing RA 1995. Isolation of sorghum megabase-size DNA and application for physical mapping and bacterial and yeast artificial chromosome library construction. *Plant Mol. Bio. Rep.* 13 : 82-94.
  12. Zhang H-B, Woo S-S, Wing RA 1996. BACs, YACs and Cosmids. In "Plant Gene Isolation", John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, England, pp75-99.