

벼 5-methyltryptophan 抵抗性 突然變異體의 特性

이효연 · 강권규* · 노일섭** · 이춘환*** · 권혜경**** · 박현숙*** · 龜谷壽昭*****

Characteristics of Rice Mutants Resistant to 5-Methyltryptophan

Hyo Yeon Lee, Kwon Kyu Kang*, Ill Sup Nou**, Choon Hwan Lee***,
Hye Kyung Kwon****, Hyun Sook Park*** and Tosiaki Kameya*****

ABSTRACT: TR75, a rice (*Oryza sativa* L. var. Sasanishiki) mutant resistant to 5-methyltryptophan (5MT) was segregated from the progenies of its initial mutant line, TR1. The 5MT resistance of TR75 was inherited in the M₈ generations as a single dominant nuclear gene, and was also expressed in callus derived from seeds, roots, and anthers as well as in the seedlings. The callus induced from these organs could grow at 50 mg/l of 5MT, whereas the growth of wild-type callus was completely inhibited even at 25 mg/l. The seedlings of TR75 did not show resistance to L-azetidine-2-carboxylic acid, S-2-aminoethyl-L-cysteine, p-fluoro-DL-phenylalanine. 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.

Key words: Rice, 5-methyltryptophan, Resistant mutant, Free amino acids

우리들의 주식으로 사용하는 대부분의 곡류 작물은 다른 식물에 비해 필수아미노산 함량이 매우 낮다. 예를 들어 lysine은 모든 곡류작물에 있어서 대단히 낮고, 벼, 보리에 있어서는 threonine, 옥수수에서는 thryptophan, 그리고 단백질이 풍부한 콩과 식물에서도 methionine함량이 각각 부족하다고 알려졌다¹⁾. 이런 이유 때문에 곡류 작물의 저장성분의 질적개량에 관한 문제는 유전,

육종학자에 있어서 중요한 연구과제로써 관심이 집중되고 있다. 지금까지 특정의 아미노산을 과잉 생산하는 돌연변이 식물체가 옥수수²⁾, 보리³⁾에서 선발되었다. 이러한 돌연변이 식물체는 특정의 아미노산과 유사한 구조를 가지는 아미노산 아날로그(amino acid analogue)에 대한 저항성 개체를 선발함으로써 가능하게 되었다.

아미노산 아날로그 저항성 식물체가 특정의 아

이 연구는 1994년도 교육부 기초과학 육성연구비의 지원에 의해 수행된 것임(BSRI-94-4408).

순천대학교 농과대학(College of Agriculture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea)

*한국원자력연구소(Radiation Genetic Engineering Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon 305-606, Korea)

**순천대학교 사범대학(College of Education, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea)

***부산대학교 분자생물학과(Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan)

****기초과학연구소(Biomolecule Analysis Group, Korea Basic Science Institute, Taejeon 305-333, Korea)

***** 일본 동북대학 유전생태연구소(Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai, 980, Japan)

〈'95. 7. 18 接受〉

미노산을 과잉생산하는 이유로는 저항성 식물체의 아미노산 생합성 과정에 관여하는 feed back 제어기능에 변화가 생겼기 때문에 일어나는 현상이라고 알려졌다¹⁷⁾. 그러나 고등식물의 아미노산 생합성 경로는 아직도 미지의 부분이 많고, 그러한 문제점을 해결하기 위해서라도 다양한 아미노산 아날로그 저항성 개체의 선발이 필요하다.

본 연구는 tryptophan계 아날로그인 5-methyl tryptophan에 대해 저항성 벼로 선발된 TR¹⁹⁾의 自殖後代개체 중에서 저항성 형질이 단일 우성유전자에 의해 분리된 TR75주의 여러 특성을 조사하였다.

材料 및 方法

공시 재료인 벼(*Oryza sativa* L.) 품종은 일본에서 널리 재배되고 있는 Sasanishiki이며, 이 품종으로부터 5-methyltryptophan (5MT)에 대해 저항성 개체로 선발된 TR¹⁹⁾의 自殖後代 개체 중에서 5MT 저항성 형질이 단일 우성유전자로 분리된 TR75주를 이용하였다.

1. 5MT 배지내의 callus 유도

종자로부터 callus의 유도는 야생형(Sasanishiki)과 TR75를 이용하였다. 먼저 종자의 종피를 벗긴 뒤 70% ethanol에 30초간 침지한 후 2% sodium hypochloride에서 15분간 표면 살균하고 멸균수로 3회 세척한 후에 25mg/l의 5MT와 2mg/l의 2,4-D가 포함된 MS배지¹¹⁾에 치상하였다. 근으로부터 callus의 유도는 상기의 방법과 동일하게 종자를 소독하고 hormone무첨가 MS배지에 종자를 치상한 후, 배양 5일후의 유식물체 근을 5mm로 절단한 후에 25mg/l의 5MT와 2mg/l의 2,4-D가 포함된 MS배지에 치상하였다. 약으로부터 callus를 유도하기 위해서는 전 처리가 필요하다. 먼저 약배양시에 callus의 형성율을 높이기 위하여 1 핵기의 화분립을 주로 사용하였다. 그 방법으로는 지엽(止葉)의 葉耳間長이 6cm 정도 되었을 때 이삭을 止葉의 엽초에 쌓인 상태로 처리하여 파라필름으로 잘 싸 뒤 8℃에서 7일

간 저온처리 하였다. 이삭의 중간 부분의 꽃으로부터 약을 채취하여 25mg/l의 5MT와 2mg/l의 2,4-D가 포함된 B5 배지³⁾에 약을 치상하였다. 배양은 25℃, 4.5W/m²의 광 조건하에서 행하였다.

2. 기관별 callus의 5MT 저항성 조사

종자, 근, 약으로부터 유도된 각 기관의 callus를 각각 생체중 20mg씩 채취하여 0, 25, 50, 100 (mg/l)의 5MT와 2mg/l의 2,4-D를 포함한 MS배지에 각각 치상하였다. callus의 배양은 25℃, 4.5W/m²의 광조건 하에 행하였으며, callus의 증식량은 배양 1개월 후의 생체중에 의하여 측정하였다.

3. 아미노산 아날로그에 대한 TR75의 생육검증

본 실험에 사용된 아미노산 아날로그는 proline계 아날로그인 L-azetidine-2-carboxylic acid (AZCA), Lysine계 아날로그인 S-2-aminoethyl-L-cystine (AEC), phenylalanine계 아날로그인 p-fluoro-DL-phenylalanine (PFP)이다. TR75주의 종자는 callus유도시와 동일한 방법으로 표면 살균한 후 25mg/l의 AZCA, 150mg/l의 AEC, 100mg/l의 PFP를 각각 포함한 수경액 배지¹³⁾에 종자를 20粒씩 치상하였다. AZCA, AEC, PFP의 농도는 예비 실험에서 Sasanishiki의 싹생묘에 대한 생육저해농도를 기준으로 하였다. 생육량은 치상 14일 후에 조사하였으며, 배양조건은 callus유도시와 동일하게 하였다.

4. 유리 아미노산 분석

유리 아미노산 분석에 사용된 종자는 TR75의 M₈세대와 야생형 종자를 이용하였다. 종자 내의 피를 벗긴 뒤 막자사발에서 분쇄하여 분말 1g을 가지고 유리 아미노산을 추출하였다. 유리 아미노산 추출은 Wakasa와 Widholm¹⁵⁾의 방법에 따라 행하였다. 아미노산 측정장치는 Waters-510을 이용하였다.

Table 1. The rate of callus formation derived from the seeds of TR75 and original variety (Sasanishiki) on the MS medium with or without 5MT

Plant material	Medium (MS)	No. of incubated seeds	No. of callus formed	Rate of callus formation
TR75	+5MT	25	21	84%
	-5MT	25	20	80%
Cont.	+5MT	25	0	0%
	-5MT	25	18	72%

+5MT : With 25mg /l 5MT

-5MT : Without 5MT

Table 2. The rate of callus formation derived from the roots of TR75 and original variety (Sasanishiki) on the MS medium with or without 5MT

Plant material	Medium (MS)	No. of incubated roots	No. of callus formed	Rate of callus formation
TR75	+5MT	20	15	75%
	-5MT	20	17	85%
Cont.	+5MT	20	0	0%
	-5MT	20	18	90%

+5MT : With 25mg /l 5MT

-5MT : Without 5MT

Table 3. The rate of callus formation derived from the anther of TR75 and original variety (Sasanishiki) on the MS medium with or without 5MT

Plant material	Medium (MS)	No. of incubated anther	No. of callus formed	Rate of callus formation
TR75	+5MT	about 1000	8	0.8%
	-5MT	"	10	1.0%
Cont.	+5MT	"	0	0%
	-5MT	"	12	1.2%

+5MT : With 25mg /l 5MT

-5MT : Without 5MT

結果 및 考察

1. 5MT배지내의 callus형성을

TR75와 야생형 벼의 종자 및 근으로부터 5MT처리에 따른 callus의 형성율을 조사하였다(표 1, 2). TR75의 종자 및 근의 경우 5MT를 포함한 배지에서의 callus형성율은 각각 80%와 75%이

었으나, 야생형 종자의 callus는 전혀 형성되지 않았으며 뿌리는 배양중 갈변하였다.

약배양에 의한 callus의 형성율은 표 3과 같이 두 처리구 모두에서 낮았으나, TR75식물체의 약으로 부터는 callus가 유도되었고 야생형 식물체의 약으로 부터는 callus의 형성이 전혀 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 TR75 식물체에서 종자, 근, 약의 어느 기관에서도 5MT에 대한 저항성 형질이 세포 수준에서 안정하게 발현되고 있음을

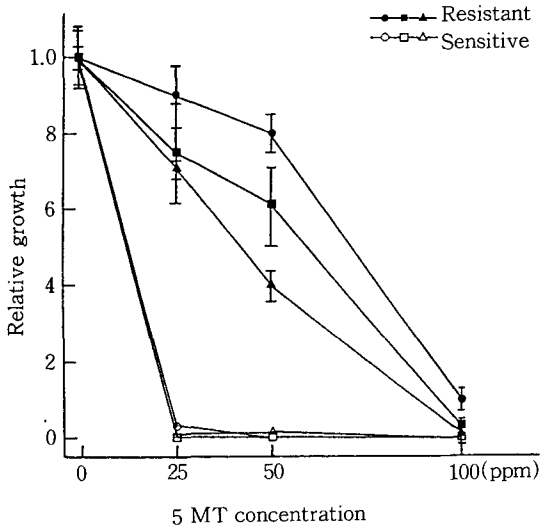


Fig. 1. Effect of 5MT (5-methyltryptophan) on callus growth expressed as fresh weight as compared to that in MS medium. The fresh weight was determined after 1 month. Callus was derived from seed(●,○), root (■,□) and anther (▲,△) of homozygous plant on 5MT resistance and original variety.

보여준 것이다. 이러한 형질은 세포융합시 체세포잡종의 선발 Marker로 이용될 수 있다고 보고되고 있으며^{4,7,8,16)}, 아미노산 아날로그 저항성 기작을 연구하는데 있어서도 유용한 재료로 이용될 것이다.

2. 5MT 저항성 농도의 조사

종자, 근, 약으로부터 유도된 callus가 어느 정도의 농도까지 5MT에 대해 저항성을 갖고 있는지를 조사한 결과(그림 1), 야생형 종자, 근, 약으로부터 유도된 callus는 25mg/l의 5MT에서 증식이 억제되며 배양후 2주째 부터는 갈변화되었다. 그러나 TR75에서 유도된 각 기관의 callus는 50mg/l의 5MT에서도 증식이 왕성하였다. TR75는 원래 5MT 25mg/l 농도에서 선발된 TR1의 自殖後代 식물체이었지만 세포수준의 5MT 저항성 정도는 선발시의 농도와 비교하면 2배 정도 높아진 것을 알게 되었다. 지금까지 이

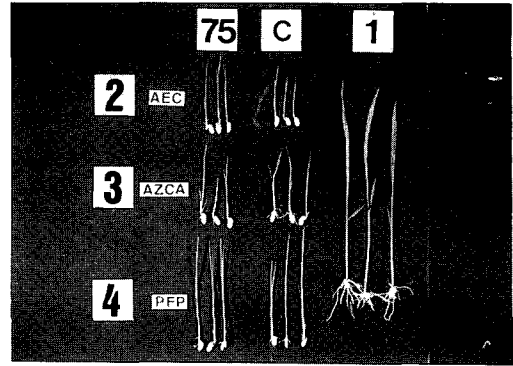


Fig. 2. Growth inhibiting effect of S-2-aminooethyl-L-cysteine (AEC), L-azetidine-2-carboxylic acid(AZCA) and P-fluoro-DL-phenylalanine (PFP) on the seedling length of the TR75 (5MT resistance) and original variety (C; Sasanishiki). Seedlings of 14 days culture in the absence (1) or presense of AEC of 150 mg/l(2), AZCA of 25 mg/l(3), and PFP of 100 mg/l(4).

러한 결과는 다른 아미노산 아날로그 저항성 주에서도 보고되었다.¹²⁾

3. 기타 아미노산 아날로그에 대한 TR-75의 생육반응

5MT 저항성 개체인 TR75는 AZCA, AEC, PFP의 아미노산 아날로그에 대해서는 저항성을 보여주지 않았다(그림 2). 지금까지 아미노산 아날로그 저항성의 생화학적 기구는 1) 약물의 세포내의 투과성 저항, 2) 약물의 불활성화, 3) 약물과 길항하는 대사산물의 농도상승의 3가지 기작이 보고되고 있다⁶⁾. 일반적으로 한 종류의 아미노산 아날로그에 대해 저항성 개체를 선발하였으나 다른 종류의 아미노산 아날로그에 대해서도 저항성을 보이는 경우도 보고되고 있다¹⁾. 이러한 경우는 상기 1)의 경우에 해당하는 저항성 개체로 설명되고 있다. 본 연구에 사용한 TR75는 그림 2와 같이 5MT에 대해서만 저항성을 갖기 때문에 1)에 의한 저항성 기작을 갖는 돌연변이 식물체는 아니라고 판단된다.

Table 4. 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		2.3	
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
Cys2	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

4. TR-75의 유리 아미노산 함량

종자로부터 추출한 유리 아미노산 함량의 분석 결과는 표 4에서 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 발생하기 때문에 서로가 이러한 것을 조절하기 위하여 반응된 결과라고 설명되고 있지만 그 기구에 대해서는 아직 분명하지 않다⁶⁾. 이상의 결과, 본 연구에 사용된 TR75는 상기의 아미노산 아날로그 저항성의 생화학적 기구의 3) 기작에 해당되는 것으로 판단된다.

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. Schaeffer와 Sharpe¹⁴⁾는 벼의 AEC 내성식물의 종자에서 lysine함량이 증가된 것을 보고하였고, Mori¹⁰⁾등은 hydroxyproline내성 벼로부터 종자의 proline 함량이 증가된 것을 보고하였다. 그러나 5MT 내성식물의 自殖後代 개체의 종자에서 tryptophan함량이 증가한 예는 아직 알려진 바 없다. 본 연구에 사용된 TR75는 인간이 실제로 이용하는 부분이 종자이기 때문에 앞으로 농업적인 측면에서도 중요한 육종재료가 될 수 있다. 그리고 아미노산 아날로그 저항성 개체는 특히 미생물의 발효공학 분야에 있어서 효율적인 아미노산 생산을 위한 미생물 육종의 한 분야로써 연구되어 왔다. 그러나 고등식물의 아미노산 생합성 경로는 미생물에 비교해서 아직 미지의 부분이 많다. 그러한 점을 고려하여 볼 때 TR75는 고등식물의 아미노산 대사 경로의 연구 및 5MT 내성 유전자를

cloning 하는데 있어서도 유용한 재료로 생각된다.

摘 要

5-methyltryptophan (5MT) 저항성 벼 (*Oryza sativa* L. var. Sasanishiki)로 부터 선발된 T-

R1의 自殖後代개체 중에서 저항성이 우성형질로 분리된 TR75주를 이용하여 그 식물체의 여러 특성을 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. TR75는 종자, 근, 약에 있어서는 25 mg /1의 5MT가 포함된 MS배지에서 callus가 형성되었으나, 야생형의 경우에는 어느 기관에서도 callus 유도는 일어나지 않았다.
2. 각 기관으로 부터 유도된 TR75의 callus는 50 mg /1의 5MT 배지에서도 저항성을 보여주었지만 야생형의 callus는 25mg /1의 5MT 배지에서 모두 갈변화 하였다.
3. TR75는 3종류의 아미노산 아날로그(L-azetidine-2-carboxylic acid, S-2-aminoethyl-L-cystene, p-fluoro-DL-phenylalanine)에 대해서는 저항성을 갖고 있지 않다.
4. TR75의 유리아미노산 함량은 야생형 종자에 비해 tryptophan, phenylalanine, aspartic acid가 각각 5.0, 5.3, 2.7 배 증가하였으며, 그 외 다른 종류의 아미노산 함량도 1.5~2.0배 증가하였다. 전 아미노산 함량도 약 1.5배 가량 증가하였다. 그러나 alanine과 leucine은 약간 감소하였다.

引用文獻

1. Berlin, J. and J. M. Widholm. 1978. Amino acid uptake by amino acid analoge resistant tobacco cell lines. Z. Naturforsch 33 : 634-640.
2. Bright, S. W. J., J. S. H. Kueh, J. Franklin, E. R. Rognes and B. j. Miflin. 1982. Two genes for threonine accumulation in barley seeds. Nature 299 : 278-279.
3. Gomborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrent requirement of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell Res. 50 : 151-158.
4. Harms, C. T., J. J. Oertl and J. M. Widholm. 1982. Characterization and dominant expression of amino acid analoge resistance markers in somatic hybrid cell lines of *Daucus carota* L. Z. Pflanzenphysiol. 106 : 239-249.
5. Hibberd, K. A. and C. E. Green. 1982. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 559-563.
6. 福井三朗, 山田康之. 1985. 植物培養細胞の變異と選發, アミノ酸およびアミノ酸アナログ耐性. 講談社サイエンティフィック. p37-41.
7. Kameya, T., M. E. Horn and J. M. Widholm. 1981. Hybrid shoot formation from fused *Daucus carota* and *D. capillifolius* protoplast. Z. Pflanzenphysiol. 104 : 459-466.
8. Lee, H. Y. and T. kameya. 1989. Utilization of resistant cell lines to 5-methyltryptophan for cell fusion in rice(*Oryza sativa* L.). Japan J. Breed. 39 : 319-325.
9. Lee, H. Y. and T. Kameya. 1991. Selection and characterization of a rice mutant resistant to 5-methyltryptophan. Theor. Appl. Genet. 82 : 405-408.
10. Mori, S., H. Hasegawa, R. Che, H. Nakanishi and M. Murakami. 1989. Free proline contents in two different groups of rice mutants resistant to hydroxy-L-proline. Theor. Appl. Genet. 77 : 44-48.
11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and

- Physiol. Plant. 15 : 437-497.
12. Negrutiu, I., A. Cattoir-Reynearts, I. Verbruggen and M. Jacobs. 1984. Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris*. Theor. Appl. Genet. 68 : 11-20.
 13. Satake, T. and S. Koike. 1984. Circular dense planting water culture of rice plants, with the purpose of obtaining many uniform panicles of main stems from a pot. Japan Jour. Sci. 52 : 598-600.
 14. Schaeffer, G. W. and F. T. Sharpe. 1981. Lysine in seed protein from S-amin-oethyl-L-cysteine resistant anther-derived tissue cultures of rice. *In Vitro*. 17 : 345-352.
 15. Wakasa, K and J. M. Widholm. 1987. A 5-methyltryptophan resistant rice mutant, MTR1, selected in tissue culture. Theor. Appl. Genet. 74 : 49-54.
 16. White, D. W. R. and I. K. Vasil. 1979. Use of amino acid analoge resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids. Theor. Appl. Genet. 55 : 107-112.
 17. Widholm, J. M. 1972. Cultured *Nicotiana tabacum* cells with analtered anthanilate synthetase which is less sensitive to feedback inhibition. Biochem. Biophys. Acta, 261 : 52-58.