

R2

## T-DNA 삽입 돌연변이체, Under Developed Tapetum 1 Mutant를 이용한 벼 수술 발달 연구

정기홍<sup>PI</sup>, 한민정<sup>1</sup>, 허정혜<sup>1</sup>, 김경파<sup>2</sup>, 황인환<sup>2</sup>, 김연기<sup>3</sup>, 남백희<sup>3</sup>, 안진홍<sup>C1</sup>

<sup>1</sup>포항공과대학교 생명과학과 식물기능유전체 연구실, 포항 790-784, <sup>2</sup>포항공과대학교 생명과학과 식물분자세포학 연구실, 포항 790-784, <sup>3</sup>명지대학교 그린진바이오테크, 용인 449-728

벼는 세계인구의 절반이상이 주식으로 이용하는 경제적 중요성뿐 아니라 생물 정보학적인 자료가 풍부하고, 형질전환이 용이하며, 비교적 작은 유전체 (430M)를 가지고 있어서 단자엽 식물의 모델로서 각광 받고 있다. 최근에는 벼 유전체 전체 염기서열의 대부분이 해독되었고 기능 분석이 용이한 돌연변이체들이 대량으로 만들어지고 있다. 기능 유전체 학문은 유전체 염기분석의 결과로 나온 대량의 유전자들의 기능을 효과적으로 밝히기 위해 필요하다. T-DNA를 이용하여 대량의 삽입 돌연변이체를 만드는 기술은 돌연변이가 유발된 유전자의 주변 염기서열을 보다 쉽게 분리할 수 있는 장점이 있기 때문에 유전자의 기능 연구에 매우 유용하다. 삽입 돌연변이 방법을 이용하여 대량의 유전자 기능을 연구하는 데에는 몇 가지 문제점이 있는데 기능이 중복되는 유전자나 배 발달 초기 또는 배우체 형성시기에 중요한 기능을 하는 유전자들에 대한 기능을 연구하기 힘들다. 이러한 T-DNA 삽입 돌연변이 방법의 문제점들을 보완하기 위해 몇가지 변형된 삽입 인자를 사용하고 있다. 그러한 방법중의 하나로 T-DNA 삽입 절편 주위에 promoter가 없는 보고 유전자 (GUS)를 도입하여 유전자 발현의 특이성을 눈으로 확인이 가능하다. 이러한 특징을 가진 T-DNA 표지 14767개의 라인을 보고 유전자 (GUS)를 이용하여 389개체의 꽃에서 발현을 확인할 수 있었고 그 중에서 벼 수술에서 발현되는 175개체를 찾아서 이들의 발현 양상 및 T-DNA 주변 염기서열을 분석하였다. GUS 실험을 통해서 꽃에서 발현되는 유전자의 약50%가 수술에서 발현을 보이고 있고 거기서 기능을 할 것을 생각 된다. 다음세대에서는 그 175개체에 대해서 수술 관련 표현형 분석이 진행되었고 그 결과 수술발달에 결합이 있는 35개의 돌연변이 개체를 탐색하였고 이들과 T-DNA의 상관 관계를 조사하였다. 그 결과 2개체에서 음성 불임 표현형이 T-DNA와 연관성을 보인다는 것을 밝혔고 그 중에서 under developed tapetum 1 (UDT1) 유전자에 대한 T-DNA 삽입돌연변이체는 basic helix loop helix (bHLH) 영역을 가지고 있는 전자 조절 인자에 삽입이 되었고 보고 유전자 및 RNA 발현 양상으로 보았을 때 감수분열 이후보다 이전에 발현 양이 더 많고 여러시기에 걸쳐서 수술 우선적인 특징을 보였다. 수술의 발달과정상에서 감수분열을 끝내고 다음과정으로 넘어가는 동안에 여러 가지 표현형들이 관찰 되었다. 먼저 화분 모세포의 경우 돌연변이체에서 감수 분열 이후에도 감수 분열 이전형태의 발현만 보이고 그 다음단계로의 발달이 이루어지지 않는 것으로 관찰이 되었다. 이는 돌연변이체가 감수분열이전에 문제가 생겼다는 것을 암시한다. 그리고 정상 식물체에서는 tapetum 층은 수술 외벽 제일 안쪽에 위치하여 감수분열 이후에 급격한 세포증식을 하면서 분화 발달의 과정을 겪지만, T-DNA가 삽입이 된 순종 개체의 경우에 처음부터 tapetum 층이 정상적으로 분화 발달을 하지 못하여 세포증식은 거의 하지 않고 내재된 액포의 부피의 증가에 의해서 층 두께가 두터워지고 결국은 퇴화 된다. 그 결과 tapetum층에 의존해서 발달을 하는 화분이 조기에 퇴화되어 성숙된 수술에 화분이 없는 표현형을 보이게 된다. 위와 같은 결과는 UDT1 유전자가 감수분열 이전에서 이후로 전이가 이루어지는 시점에서 전자 조절인자로서 화분모세포와 tapetum 층의 분화 발달에 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 UDT1 돌연변이의 tapetum에서 보이는 표현형, 즉, tapetum이 비대해지면서 생기는 음성불임 표현형은 수술이 감수분열 시기에 냉해를 받았을 때에 생기는 형태적변화와 유사한 양상을 보이고 있어서 수술 발달이 저온 관련 신호 전달 과정과 연관성이 있을지 모른다. 이러한 가능성의 하나로써 벼에 존재할 것으로 추정되는 165개를 포함하여 식물에 존재하는 300여개의 basic helix loop helix 유전자 게놈도 분석에 의하면 수술 발달 관련 표현형이 확인된 basic helix loop helix 집단내에 저온 관련 신호 전달과정에서 중요한 역할을 하는 애기장대 ICE1유전자가 같은 집단으로 분류되었고 그 외에도 벼에서 여러가지 stress와 관련된 유전자들이 특이하게 이집단에 속한다. 또다른 가능성의 하나로 UDT1 돌연변이에서 표현형이 처음 보이기 시작하는 동시에 꽃에서 냉해에 가장 민감한 시기에 감수분열초기 꽃에서 저온과 관련해서 반응성이 확인된 유전자들이 특히 이시기에만 돌연변이에서 특이하게 발현이 증가하는 하는 것으로 보아 꽃에서 저온관련 신호 전달과정이 수술 발달과 충분히 연관이 있을 것으로 생각된다. 식물에서 수분 및 수정은 자손증식 및 종의 유지를 위해서 아주 중요하고 특히 곡물의 경우에 생산량과 직결되었기 때문에 이러한 과정의 이해가 생산량 향상 및 생명공학기술의 응용을 위해서 매우 중요하다. 특히 벼의 경제적 중요성과 모델 식물로서의 유용성에도 불구하고 수술 발달 및 화분 형성에 관련된 유전자들에 대한 연구가 거의 없는 실정이다. 그래서 본 연구는 수술 발달과정과 화분형성에 중요한 역할을 할 수 있는 유전자들을 대량으로 찾아서 수술 발달 및 화분 형성에 대한 분자수준의 이해를 증진시키기 위해 음성 불임인 UDT1 삽입 돌연변이를 이용한 microarray 분석을 하였고 그 결과 300개 이상의 유전자 발현이 UDT1 돌연변이체에서 3배이상 줄어드는 조절을 받았고 이들 유전자 중에서 전체길이의 전사체가 확인된 것이 240개이고 유전자 기능을 예상 할 수 있는 것이 85개체로 이들을 제외한 대부분은 유전자 서열 정보로는 기능을 예상하기 어려운 것들 이었다. 그리고 이들 중에서 10개 유전자들의 발현을 RNA 수준에서 실제로 확인하였다. 그리고 기관별 발현 양상 분석을 통해서도 이들 유전자 들이 주로 수술 조직에서 발현이 확인 되었으므로 이러한 돌연변이를 이용한 microarray분석으로 관련 유전자의 대량 탐색이 가능 할 것으로 예상된다. 또한, 이들 중에 본 실험실에서 제작되어서 표지가 확인된 T-DNA 삽입돌연변이체에서 삽입 여부를 확인할 수 있었던 것은 48개체로 분석한 전체 대상(307)에서 16%에 해당 되는 것으로 현재 실험실에서 가지고 있는 표지가 확인된 돌연변이체들 벼 전체 유전체의 대량 16%정도로 추정할 수 있다. 그리고 이들이 실제로 음성 불임 표현형과 연관성이 있는지를 확인하기 위한 표현형 분석이 진행중에 있다. 위와 같이 벼의 T-DNA를 이용한 대량의 돌연변이 생성과 microarray를 이용한 기능 분석을 통해서 아직까지 많이 알려지지 않은 단자엽의 수술 발달과정 및 화분형성을 이해하는 데 많은 도움을 줄 것으로 생각된다. 그리고, 이러한 분자수준의 이해를 바탕으로 더욱 수량성이 향상된 품종을 만드는데 기여할 것으로 생각된다.