

식물 유전자의 과발현 및 발현 억제를 위한 유용 벡터의 제조 및 확인

이영미 · 석혜연 · 박희연 · 박지임 · 한지성 · 방태식 · 문용환*

부산대학교 분자생물학과

Received April 8, 2009 / Accepted June 2, 2009

Construction and Verification of Useful Vectors for Ectopic Expression and Suppression of Plant Genes. Young-Mi Lee, Hye-Yeon Seok, Hee-Yeon Park, Ji-Im Park, Ji-Sung Han, Tae-Sik Bang and Yong-Hwan Moon*. *Department of Molecular Biology, Pusan National University* - The phenotypes associated with a gene function are often the best clue to its role in the plant. Transgenic plants ectopically expressing or suppressing a gene can provide useful information related to the gene function. In this study, we constructed three vectors - pFGL571, pFGL846 and pFGL847 - for the *Agrobacterium*-mediated ectopic expression of plant genes using pPZP211 and modified CaMV 35S, UBQ3 or UBQ10 promoters. The three vectors have several merits such as small size, high copy in bacteria, enough restriction enzyme sites in multi cloning sites and nucleotide sequence information. Analysis of transgenic plants containing GUS or sGFP reporter genes under the control of modified CaMV 35S, UBQ3 or UBQ10 promoter revealed that all of the three promoters showed high activities during most developmental stages after germination and in floral organs. Furthermore, we generated a RNAi module vector, pFGL727, to suppress plant gene expressions and confirmed that pFGL727 is useful for the suppression of a gene expression using rice transgenic plants. Taken together, our new vectors would be very useful for the ectopic expression or the suppression of plant genes.

Key words : Plant, ectopic expression, suppression, promoters, RNAi

서 론

유전체 프로젝트를 통해 여러 생물 종에서 전체 유전자 서열이 밝혀진 후, 이 정보들을 이용하여 각각의 유전자 단위의 기능을 연구하는 유전체학 분야가 생겨났다[24]. 식물의 경우, 유전자의 기능, 특히 생물학적 기능은 해당 유전자가 과발현되거나 발현이 억제된 형질전환체에서 mRNA, 단백질, 대사산물의 양적, 질적 변화를 통해 얻을 수 있다[18]. 따라서 특정 유전자를 과발현 시키거나 또는 발현을 억제하는 방법은 해당 유전자의 생물학적 기능을 알아보는 데 있어서 매우 필요한 요소로 여겨진다.

특정 유전자의 과발현체를 제작하기 위해 다양한 식물체 발현용 벡터들이 개발되어 왔으며, 벡터의 구성 요소 중 특정 유전자의 과발현에 사용되는 프로모터가 특히 중요하다. 식물에서 유전자의 과발현에 사용된 프로모터로는 초기에는 *Agrobacterium*에서 유래한 nopaline synthase (NOS) 유전자의 프로모터나, 식물의 광합성 주요 유전자인 small subunit of ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (RuBP)의 프로모터 등이 있다[15,25,35]. 최근에는 단자엽식물의 경우 과발현을 위한 프로모터로 주로 ubiquitin (UBQ) 또는 actin 유전자의 프로모터가 사용되고 있으며[30,31], 쌍자엽식물의 경우 Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)의 35S 프로모터 또는 UBQ

유전자의 프로모터가 많이 이용되고 있다[19,30,35].

CaMV 35S 프로모터는 식물, 특히 쌍자엽식물에서 유전자의 과발현에 가장 널리 사용되는 프로모터이다. 일반적으로 사용되고 있는 CaMV 35S 프로모터는 약 350 bp의 크기를 가지며, A 도메인(-90~+8)과 B 도메인(-343~-91)의 두 도메인으로 구분된다[2]. B 도메인은 다시 5개의 서브도메인으로 나눌 수 있으며, A 도메인은 core 부분으로 알려져 있는 minimal 프로모터를 포함하고 있다[3,4,10]. B 도메인의 5개 서브도메인들은 각각 다양한 식물 기관에서의 프로모터 활성화에 관여하며, 이들 서브도메인을 A 도메인과 적절히 조합하면 다양한 기관에서 유전자의 발현이 일어난다[3,4]. A 도메인은 -31~-25 부위에 TATA 박스를 포함하고 있으며, 뿌리에서의 강한 발현에 관여한다[2]. A 부위의 -90~-47 부분을 제거할 경우, 발아 후 초기 단계나 성숙한 식물체의 대부분 조직에서 프로모터 활성이 나타나는 것으로 보고되어 있다[3,4,10]. 따라서 식물체 대부분 조직에서의 과발현이 필요한 경우 A의 일부분을 제거한 벡터의 사용이 유리하나, 현재 대부분의 경우에는 전체 CaMV 35S 프로모터를 사용하고 있다.

UBQ는 multigene family로서 여러 생물 종에서 매우 높은 아미노산 서열의 보존성을 보이며, 세포 내에서 단백질의 분해 등을 비롯한 여러 작용에 관여한다[30]. UBQ 유전자들은 대부분의 조직에서 다량으로 발현되므로[8], 식물 유전자의 과발현에 유용한 프로모터로 사용되고 있다[30]. 애기장대에는 14개의 UBQ 유전자들이 보고되어 있으며[6], 그 중 UBQ3, UBQ10, UBQ11 세 유전자는 대부분의 조직에서 지속적으로 발현되고,

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2592, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : moonyh@pusan.ac.kr

5'-untranslated region (5'-UTR)의 같은 위치에 존재하는 인트론은 유전자 발현 조절에 있어서 양적인 부분에 관여하고 있다고 알려져 있다[29]. 이 중 UBQ10 유전자의 프로모터는 식물체 유전자의 과발현에 널리 이용되고 있다[12,32].

유전자의 발현 억제 식물체의 경우 기존의 연구를 통해서 확보된 돌연변이체를 이용하거나, 발현 억제용 벡터를 제조하여 이를 형질전환시켜 만들 수 있다. 최근에 T-DNA의 무작위 삽입 돌연변이체를 대량으로 제작하여 knock-out 돌연변이체 집단을 확보하고 삽입된 T-DNA의 주변 서열을 확인하여 데이터베이스를 만듦으로써, 다양한 유전자들에 대한 돌연변이체 확보가 매우 용이해졌다[24]. 한편, 특정 유전자의 발현을 억제하고자 할 경우엔 antisense나 RNA interference (RNAi) 벡터를 주로 사용하고 있는데, antisense 방법의 경우 유전자 발현 억제의 효율이 낮은 경우가 많아 RNAi 방법을 더 흔히 사용하고 있다[20].

RNAi 방법은 최근에 많은 연구 결과가 보고되고 있는 micro RNA (miRNA)나 small interfering RNA (siRNA)에 의한 gene silencing 원리를 이용한다. miRNA나 siRNA에 의한 gene silencing에서 관찰되는 이중 가닥 RNA는 RNA에 특이적인 서열을 가지는 유전자의 발현을 전사 후 과정에서 억제함으로써 특정 유전자의 발현을 억제할 수 있다[26]. 이를 이용해 발현을 억제시키고자 하는 유전자의 이중 가닥 RNA가 만들어질 수 있는 벡터를 제조하고 식물체에 형질전환시켜 특정 유전자의 발현이 억제된 형질전환체를 제조할 수 있다. 식물에서 RNAi를 이용한 gene silencing은 hairpin 구조를 형성하는 RNA (hpRNA)를 발현시키는 벡터를 제작하여 식물에 형질전환하는 방법으로 이루어지고 있다. hpRNA-생산 벡터의 구조를 살펴보면, 목표 유전자 서열의 전체 또는 일부가 자신과는 관계없는 spacer 서열을 사이에 두고 역으로 반복되어 있으며, 이때 역반복 서열 사이의 spacer로 인트론 서열을 사용하였을 경우 형질전환 식물체에서 gene silencing이 거의 100%에 가깝게 나타날 정도로 그 효율이 매우 높다고 보고되어 있다[27,33]. 또한 형질전환을 통해 돌연변이체를 제작하는데 있어서 표현형이 안정적으로 다음 세대까지 이어지는 것도 매우 중요한데, hpRNA-유도적 RNAi는 애기장대에서 5 세대까지도 충분히 안정적이라고 보고되어 있으며[28], 벼에서도 LGC-1 (Low Glutelin Content-1) 유전자의 RNAi 돌연변이 라인은 20세대가 지나도 안정적으로 돌연변이 형질을 나타낸다고 알려져 있다[21]. RNAi 벡터의 경우 hpRNA 합성을 위한 부위를 서브클로닝 벡터에 클로닝 하여 사용하는 것이 유리할 수 있는데, hpRNA 부위를 클로닝 한 후 이를 형질전환 대상 식물체에 따라 쌍자엽식물 또는 단자엽식물 과발현 벡터로 옮기면 되기 때문이다.

쌍자엽식물의 형질전환에는 *Agrobacterium*을 매개로 하는 방법이 주로 이용되며, 이를 위해 식물 발현용 binary 벡터가 사용된다. 하지만 기존에 binary 벡터로 널리 이용되는

pBIN19이나[5], pGA482, pGA492 [1] 등은 크기가 크고, 벡터의 서열이 완전히 알려져 있지 않으며, 다중 클로닝 부위 (multi cloning sites, MCS)의 제한효소 서열도 충분치 않고, 박테리아 내에 low copy로 존재하는 등 원하는 유전자의 클로닝에 어려움이 있는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위한 binary 벡터로 pPZP binary 벡터들이 개발되었는데 [13], 이들 벡터들은 크기도 일반적인 binary 벡터에 비해 상대적으로 작고, 박테리아 내에서 high copy로 존재하며, MCS에 다양한 제한효소 서열을 가지고 있고, 벡터 전체의 서열도 제공되는 등의 장점을 가지고 있다. 이런 장점을 이용하여 pPZP 벡터를 골격으로 하는 식물체 과발현용 벡터를 제작하여 특정 유전자를 과발현 시킨 연구 결과가 보고된 바 있으나[14,34], 이러한 경우에도 제조된 과발현 벡터의 효율성을 분석한 경우는 거의 없고, 특히 서로 다른 프로모터를 포함하는 pPZP 과발현용 벡터들의 효율성을 비교, 분석한 연구 결과는 보고된 바가 거의 없다.

본 연구에서는, pPZP211 벡터를 골격으로 하고 CaMV 35S 프로모터와 애기장대의 UBQ3, UBQ10 프로모터를 이용하여 쌍자엽식물에서의 유전자 과발현을 위한 벡터를 제조하여 확인하였고, 아울러 유전자 발현 억제에 사용될 수 있는 RNAi 벡터의 골격을 제조하여 그 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

벡터 제작

먼저, 쌍자엽식물용 과발현 벡터를 제작하기 위해, intact CaMV 35S 프로모터(351 bp) [2], 애기장대 UBQ3 프로모터 (1.25 kb), 애기장대 UBQ10 프로모터(0.9 kb) [29] 부위를 PCR로 증폭하여 pPZP211 벡터[13]의 *HindIII-PstI* 위치에 클로닝 하였다. -90~-47 부위가 제거된 modified CaMV 35S 프로모터를 제작하기 위해, -46~+8의 core 부분을 PCR로 증폭하여 pBluescript II KS (pBSIIKS) 벡터(Stratagene, Netherlands)의 *EcdRI-PstI* 위치에 클로닝 하고, 클로닝 된 벡터의 *HindIII-EcdRI* 위치에 CaMV35S 프로모터의 B 도메인(-343~-91)을 클로닝 하였다. 재조합된 modified CaMV 35S 프로모터(B-core 도메인)를 pPZP211 벡터의 *HindIII-PstI* 위치에 클로닝 하였다. pPZP211에 각각 클로닝 된 UBQ3, UBQ10 그리고 modified CaMV 35S 프로모터의 뒷 부위의 *SacI-EcdRI* 위치에 Nos terminator를 클로닝 하여, 제조된 벡터를 각각 pFGL847, pFGL846, pFGL571이라 명명하였다. Modified CaMV 35S 프로모터에 대한 대조군 벡터로 intact CaMV 35S 프로모터::omega 서열::Nos terminator를 pPZP211 벡터에 클로닝 하여 이를 pFGL772라 명명하였다. Omega 서열은 유전자의 전사에는 영향을 미치지 않으며 해독의 효율을 높이는 기능을 가지는 것으로 보고되어 있다[11]. 제조된 벡터의 프로모터 활성을 확인하기 위해, β -glucuronidase (GUS) 유전자의 암호화 부위를 pFGL846,

pFGL847, pFGL571, pFGL772 벡터의 *Bam*HI-*Sad* 위치에 각각 클로닝 하였으며, 다른 리포터 유전자로 synthetic Green Fluorescence Protein (sGFP) [7] 유전자의 암호화 부위를 pFGL571 벡터의 *Pst*I-*Xba*I 위치에 클로닝 하였다.

RNAi 벡터의 제조를 위해, 벼의 *OsEMF1* 유전자 (AF326768)의 세 번째 인트론 부위 중 204 bp를 PCR로 증폭하여 pBSIIKS 벡터의 *Hind*III-*Eco*RI 위치에 클로닝 하여 RNAi 벡터로 사용할 수 있는 pFGL727을 제조하였다. 위 실험의 PCR 과정에 사용된 프라이머는 Table 1에 나타내었다.

식물 재료 및 성장 조건

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 Columbia ecotype을 사용하였다. 애기장대 종자는 70% ethanol에서 1분, 10% clorox에서 10분간 소독한 뒤 증류수로 3회 이상 세척하고, 암상태로 4°C에서 2일 동안 두어 춘화처리를 처리한 다음, vitamin B5, 1.5% sucrose, 0.7% microagar가 포함된 MS (Murashige and Skoog) [22] 배지에 발아하였다. 발아된 애기장대 종자는 22°C의 단일 조건(light 8 hr/dark 16 hr)에서 배양하였고, 10-12일 후 흙으로 옮겨 장일조건(light 16 hr/dark 8 hr)에서 배양하였다.

pFGL727 벡터가 유전자 발현 억제에 이용될 수 있는지 확인하기 위한 형질전환 식물체로는 벼의 유전자에 대한 RNAi 형질전환체를 사용하였다[23]. 이 형질전환체 제조를 위해 *OsDEG10*의 암호화 부위 일부를 pFGL727 벡터에 각각 역방향으로 클로닝 한 후 RNAi 벡터를 제조하였다[23]

식물 형질전환 및 형질전환 식물체 선별

애기장대 형질전환을 위해 제작된 벡터를 freeze-thaw 방법

[17]을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 GV3101로 도입하였고, floral-dipping 방법[9]을 이용하여 애기장대로 형질 전환하였다. 25 mg/l kanamycin이 포함된 MS 배지에서 종자를 받아서 형질전환체를 선별하였다.

벼 형질전환을 위해 제작된 벡터를 freeze-thaw 방법[17]을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 PC2760으로 도입하였고, 벼(Kitake)의 비성숙 embryo로부터 유래된 캘러스에 형질전환하였다[16]. 30 mg/l hygromycin이 포함된 MS 배지에서 종자를 받아서 형질전환체를 선별하였다.

GUS 분석

GUS 활성 분석을 위해, 형질전환 식물체를 X-glcuc 용액[2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, 0.5 mM K₄Fe(CN)₆, 50 mM phosphate (pH 7.0)]에 담가 10분간 진공 처리를 한 후, 37°C에서 6시간 동안 암조건에서 반응시켰다. 반응이 끝난 식물체는 50 mM phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 세척하여 X-glcuc 용액을 제거하고 ethanol (100%):acetic acid (9:1, v/v) 용액을 하루 동안 처리하여 색소 탈색 및 고정을 시켰다.

GFP 분석

GFP 발현 분석은 T₂ 형질전환체를 대상으로 수행하였으며, fluorescence phase microscope (Zeiss Axioskop, Carl Zeiss co. Jena, Germany)를 이용하여 GFP 형광을 관찰하였다. GFP에 대한 흡수파장은 395 nm, 발광파장은 508 nm에서 측정하였다.

RNA 분리 및 semiquantitative RT-PCR

Trizol reagent (Invitrogen, USA)를 사용하여 식물체에서

Table 1. List of primers used in PCR

Amplification targets	Orientation	Sequences	Purpose
CaMV 35S promoter	Forward	5'-GGGAAGCTTTGAGACTTTTCAACAAAG-3'	Cloning
CaMV 35S promoter	Reverse	5'-ATACTGCAGCAGCGTGTCTCTCCAAA-3'	Cloning
CaMV 35S promoter core	Forward	5'-CAAGAATTCGCAAGACCCTTCCTCTAT-3'	Cloning
CaMV 35S promoter B domain	Reverse	5'-GGGGAATTCATCACATCAATCCACTT-3'	Cloning
UBQ3 promoter	Forward	5'-GCGAAGCTTTGTAGACTAAAAAACATAG-3'	Cloning
UBQ3 promoter	Reverse	5'-GCGCTGCAGCTGAAATAAAACAATAGAAC-3'	Cloning
UBQ10 promoter	Forward	5'-GCGAAGCTTTTCCAAGAAATTCAGTATT-3'	Cloning
UBQ10 promoter	Reverse	5'-GCGCTGCAGCTGTTAATCAGAAAACTCA-3'	Cloning
OsEMF1 3rd intron	Forward	5'-AGAGAATTCGGCTTGTCTGAACAGGCTAG-3'	Cloning
OsEMF1 3rd intron	Reverse	5'-GCCAAGCTTTACTAGTGAGGATTCGCTAG-3'	Cloning
sGFP	Forward	5'-CGCATCGAGCTGAAGGGCATC-3'	RT-PCR
sGFP	Reverse	5'-GTCTTTGCTCAGGGCGGACTG-3'	RT-PCR
GAPc	Forward	5'-CCAGCTCTTAACGGAAAGTTG-3'	RT-PCR
GAPc	Reverse	5'-CCTGTTGTCGCCAAC GAA GTC-3'	RT-PCR
OsDEG10	Forward	5'-AGCGGATCGACAAGTTATTG-3'	RT-PCR
OsDEG10	Reverse	5'-AACACAACCAGCACCTCATG-3'	RT-PCR
Rice Actin	Forward	5'-TCATGAAGATCCTGACGGAG-3'	RT-PCR
Rice Actin	Reverse	5'-ACTCAGCCTTGGAATCCAC-3'	RT-PCR

RNA를 분리하였다. 5 µg RNA에 2 unit RNase-free DNase I (Promega, USA)을 처리한 후, 100 pmole poly-T 프라이머, 10 mM dNTP mixture, 200 unit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RNA의 발현량을 확인하기 위해, 합성한 cDNA를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 각 유전자-특이적인 프라이머는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 1 µL cDNA, 1 unit F-taq DNA 중합효소(Solgent, Korea), 25 pmole 프라이머(정방향, 역방향), 0.5 mM dNTP mixture, 5 µl 10x 완충용액에서 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 45초, 56°C에서 45초, 72°C에서 45초의 PCR cycles을 25-30회 반복하여 수행하였다.

결 과

과발현 벡터 및 RNAi 벡터 제작

식물의 특정 유전자의 생물학적 기능을 연구하기 위해서, 대상 유전자의 과발현 또는 발현 억제 형질전환체가 매우 유용하게 사용된다. 이를 위해 애기장대의 세 종류 프로모터를 이용한 과발현 형질전환용 벡터 및 RNAi 벡터를 제조하였으며, 이를 이용한 애기장대 및 벼 형질전환체를 분석하였다.

먼저, CaMV 35S 프로모터, UBQ3 및 UBQ10 프로모터를 대상으로 과발현 벡터를 제조하였다. CaMV 35S 프로모터는 기존에 특정 유전자의 과발현으로 알려져 있으며, 전체 프로모터는 B 도메인과 A 도메인으로 구성되어 있다(Fig. 1A). 하지만 CaMV 35S 프로모터의 B 도메인과 A 도메인 전체를 이용할 경우에는 일부 기관에서만 대상 유전자의 과발현이 나타나므로[3,4] A 도메인의 core 부분만을 B 도메인과 연결시켜 modified CaMV 35S 프로모터를 제작하였다(Fig. 1A). 또한 애기장대에서 대부분의 조직에서 지속적으로 과량 발현되는 프로모터로 알려진 UBQ3 및 UBQ10 프로모터[29]를 포함하는 과발현 벡터를 제작하였다. 쌍자엽식물 과발현용 벡터를 제조하기 위한 binary 벡터로 pPZP211 벡터가 사용되었는데, 이 벡터는 크기가 작고 MCS에 많은 수의 제한효소 부위를 가지고 있으며, 박테리아 내에 copy 수가 많다는 장점을 가지고 있다[13]. Modified CaMV 35S 프로모터, UBQ3 프로모터, UBQ10 프로모터 각각을 Nos terminator와 함께 pPZP211 벡터에 클로닝 하였으며, 프로모터와 terminator 사이에는 5개 또는 7개 제한효소 부위를 가지는 MCS를 두어 과발현 하고자 하는 유전자를 손쉽게 클로닝 할 수 있게끔 하였다(Fig. 1B). Modified CaMV 35S 프로모터, UBQ3 프로모터, UBQ10 프로모터에 대한 제작된 각각의 벡터들을 pFGL571, pFGL846, pFGL847이라 명명하였다(Fig. 1B).

제조된 벡터가 식물체 내에서 유전자를 적절히 과발현 시킬 수 있는지 알아보기 위하여 pFGL571, pFGL846, pFGL847의 각 프로모터 뒷부분에 리포터 유전자인 GUS를 클로닝 하여

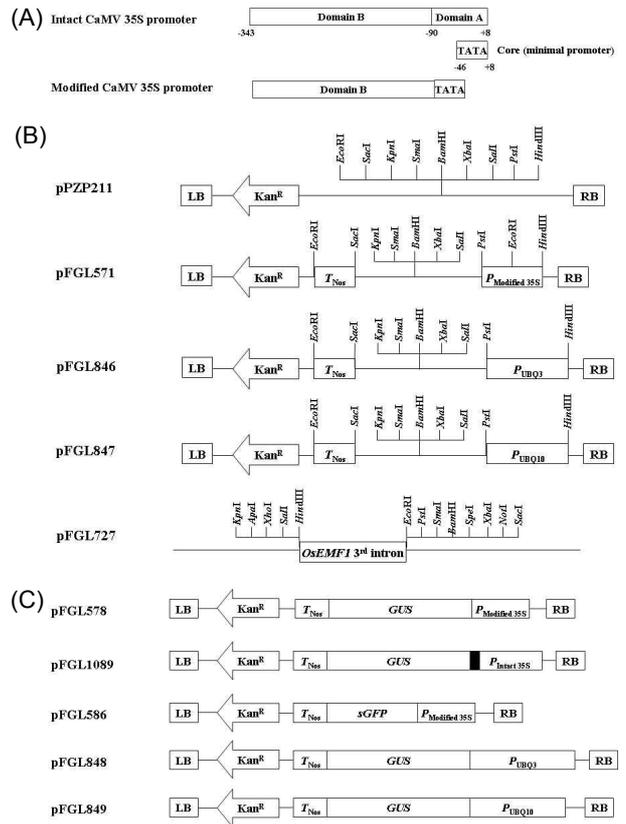


Fig. 1. Schematic maps of ectopic expression and RNAi vectors generated in this study. (A) Subdomains of intact and modified CaMV 35S promoters. (B) Schematic maps of MCS regions of pPZP211, pFGL571, pFGL846, pFGL847 and pFGL727. (C) Schematic maps of promoter::reporter gene::Tnos regions of pFGL578, pFGL1089, pFGL586, pFGL848 and pFGL849. Black box in pFGL1089 represents the omega sequence.

pFGL578, pFGL848, pFGL849를 각각 제조하였다(Fig. 1C). 한편 modified CaMV 35S 프로모터에 대한 대조구 프로모터로 intact CaMV 35S 프로모터::omega 서열을 이용하였으며, 이 서열에 GUS 유전자가 연결된 벡터, pFGL1089를 제조하였다(Fig. 1C). 또한 sGFP의 암호화 부위를 pFGL571의 modified CaMV 35S 프로모터에 연결시킨 pFGL586 벡터를 제조하였고(Fig. 1C), 이를 이용해 GUS 벡터의 결과를 다른 리포터 유전자를 사용하여 재확인하고자 하였다. 이렇게 제작된 벡터들은 모두 야생형 애기장대에 형질전환하였다.

RNAi 벡터의 경우 쌍자엽식물 및 단자엽식물에 모두 사용할 수 있는 RNAi 기본 벡터를 제작하였다. 기존의 연구에서 식물의 인트론을 spacer로 사용할 경우 RNAi 효과가 매우 높다고 알려져 있기 때문에[20], spacer DNA로 벼의 OsEMF1 유전자의 세 번째 인트론을 pBSIIKS 벡터에 클로닝 하였고, 이를 pFGL727이라 명명하였다(Fig. 1B). pFGL727은 인트론 왼쪽 및 오른쪽에 각각 5개 및 8개의 제한효소 부위를 가지고

있어 동일한 서열에 대한 역반복 서열의 클로닝을 쉽게 할 수 있다. 클로닝 된 역반복 서열 부위는 쌍자엽식물용 또는 단자엽식물용 과발현 벡터로 옮겨 식물에 형질전환할 수 있다.

Modified CaMV 35S 프로모터의 발달단계별 활성 분석

pFGL578이 형질전환된 애기장대 T₂, T₃ 세대 형질전환체를 이용하여 modified CaMV 35S 프로모터의 발달단계별 활성을 GUS 발현 분석을 통해 확인하였다. 이때, intact CaMV 35S 프로모터::omega 서열이 포함된 형질전환체를 대조구로 프로모터 활성 분석을 비교하였다.

먼저, T₂와 T₃ 세대 형질전환 식물체들은 매우 유사한 GUS 발현 양상을 보였다. Modified CaMV 35S 프로모터의 경우, 발아한지 7일된 유식물체의 자엽에서 GUS가 약하게 관찰되었으며, 11일, 14일, 21일된 유식물체의 자엽 및 잎에서 강한 GUS 발현이 관찰되었다(Fig. 2A). 한편, 관찰한 모든 발달단계

에서 뿌리에서의 강한 발현이 관찰되었다(Fig. 2A). 반면에 intact CaMV 35S 프로모터::omega 서열의 경우, 발달단계별 GUS 활성 경향은 modified CaMV 35S 프로모터와 비슷하였으나 활성 정도가 상대적으로 낮았다(Fig. 2A). 이러한 결과는 modified CaMV 35S 프로모터가 특정 유전자의 과발현에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

Modified CaMV 35S 프로모터 활성을 sGFP를 리포터 유전자로 이용하여 조사하였다. 먼저 T₁ 형질전환 식물체를 대상으로 GFP의 과발현을 RT-PCR을 수행하여 조사한 결과, 야생형에서는 sGFP 발현이 관찰되지 않았지만, 서로 다른 5개 T₁ 식물체에서는 sGFP의 전사체를 많이 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 이들 T₁ 라인들의 T₂ 식물체를 대상으로 sGFP 활성을 형광현미경으로 분석한 결과, 발아한지 8일 및 15일된 유식물체의 자엽, 하배축, shoot 정단 부위 및 뿌리에서 강한 sGFP signal

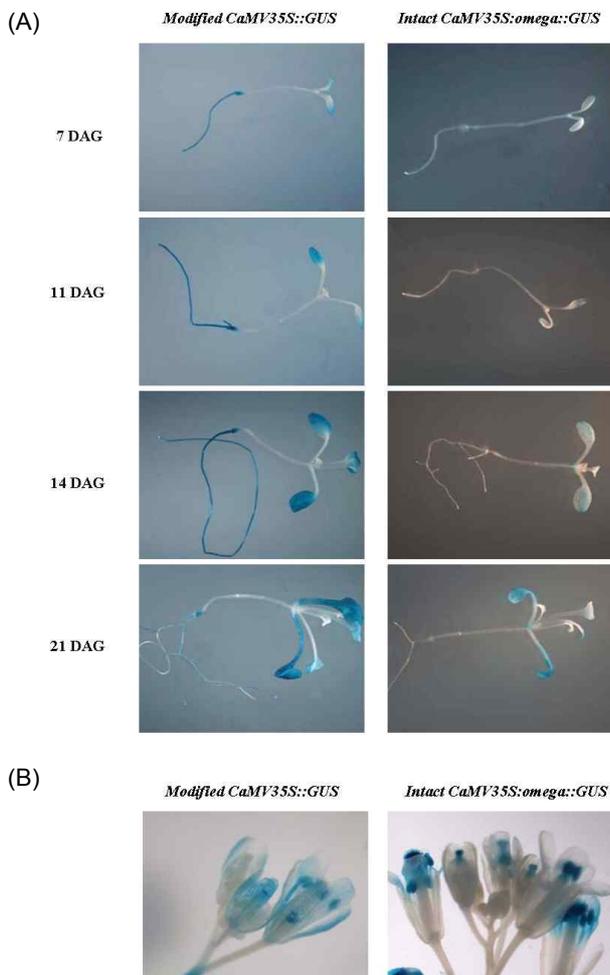


Fig. 2. Analysis of intact and modified CaMV 35S promoter activities in T₂ transgenic plants containing promoter::GUS constructs. (A) GUS activities in 7, 11, 14 and 21 day-old seedlings under short day condition. (B) GUS activities in floral clusters of mature plants.

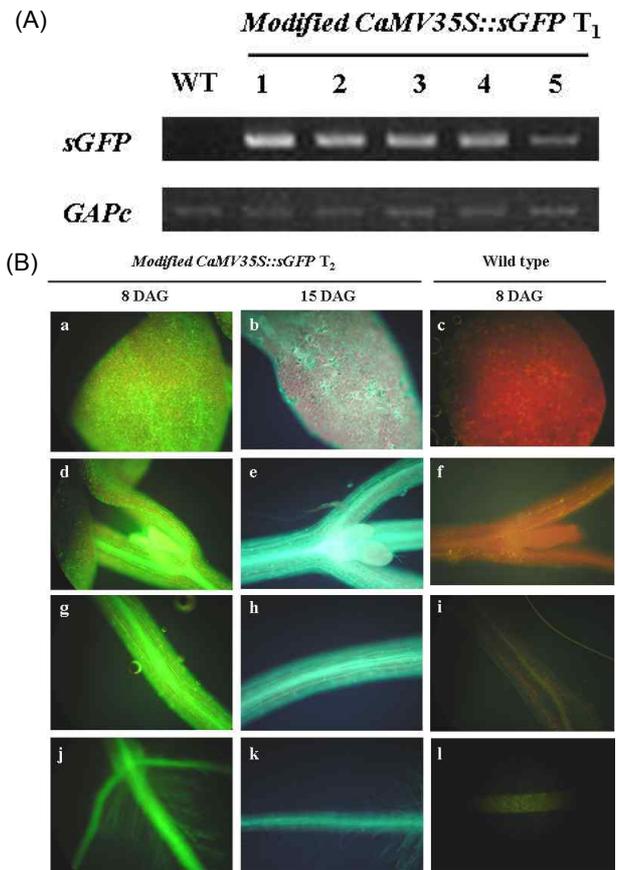


Fig. 3. Analysis of temporal and spatial activities of modified CaMV 35S promoter using sGFP. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of sGFP in the T₁ transgenic plants containing modified CaMV 35S promoter::sGFP. GAPc was used as an internal control. (B) Analysis of sGFP activities in modified CaMV 35S promoter::sGFP T₂ transgenic plants and wild-type plants. Cotyledons (a, b, c), shoot apices (d, e, f), hypocotyls (g, h, i) and roots (j, k, l) at 8 and 15 DAG.

을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 GUS 활성 결과와 유사하며, 따라서 modified CaMV 35S 프로모터는 유식물 단계를 포함한 대부분의 발달단계에서의 과발현에 유용하게 사용될 수 있는 것으로 여겨진다.

Modified CaMV 35S 프로모터의 꽃에서의 활성 분석

성숙한 형질전환 식물체의 꽃에서 GUS 발현 양상을 조사하였다. Modified CaMV 35S 프로모터의 경우, 수술, 암술, 꽃잎 등에서 발현이 관찰된 반면, intact CaMV 35S 프로모터는 수술과 암술에서 GUS 발현이 관찰되었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 modified CaMV 35S 프로모터가 꽃 기관에서의 과발현에도 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

UBQ3, UBQ10 프로모터의 발달단계별 활성 분석

pFGL848과 pFGL849 벡터가 각각 형질전환된 애기장대 T₂ 형질전환 식물체를 대상으로 발달단계별 GUS 활성을 분석하여 UBQ3과 UBQ10 유전자의 프로모터를 각각 포함하는 pFGL846, pFGL847 벡터의 유용성을 조사하였다. 먼저, 서로 다른 최소 4개 T₁ 라인에서 유래한 T₂ 식물체들은 유사한 GUS 발현 양상을 보였으며, UBQ3과 UBQ10 프로모터 형질전환체 모두 관찰된 모든 발달단계의 뿌리에서 강한 GUS 활성을 보였다(Fig. 4A). UBQ3 프로모터의 경우, 발아 후 4일째와 7일째 유식물체의 지상부에는 GUS 활성이 거의 관찰되지 않았으나, 11일된 유식물의 자엽과 14일 및 21일된 식물체의 자엽 및 뿌리에서 GUS 활성이 관찰되었다(Fig. 4A). UBQ10 프로모터의 경우, 7일째 유식물체의 자엽에서 강한 GUS 활성이 관찰되어 UBQ3 프로모터보다 활성이 더 빨리 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4A). 발아 후 11일, 14일, 21일 단계에서의 자엽 및 잎에서의 GUS 활성은 UBQ3 프로모터와 유사한 경향을 보였다(Fig. 4A). 이러한 결과를 바탕으로 UBQ3과 UBQ10 프로모터 모두 유전자의 과발현에 유용하게 사용될 수 있으며, 발아 후 초기 단계부터 유전자의 과발현을 원하는 경우 UBQ3 보다는 UBQ10 프로모터가 더 유용함을 알 수 있었다.

UBQ10 프로모터의 꽃에서의 활성 분석

성숙 식물체의 꽃에서의 UBQ3과 UBQ10 프로모터 활성을 조사하였다. UBQ3 와 UBQ10 프로모터 모두 수술과 암술에서 강한 발현이 관찰되었으며, UBQ3 프로모터의 경우 일부 꽃의 꽃잎에서 활성이 관찰되었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 본 연구에서 제조된 pFGL846과 pFGL847 모두 꽃 기관에서 유전자의 과발현에 유용하게 이용될 수 있음을 의미한다.

RNAi 벡터의 유용성 조사

RNAi 기본 벡터인 pFGL727이 유전자의 발현 억제에 효과적인지 알아보기 위해, pFGL727을 사용하여 제조한 벡의

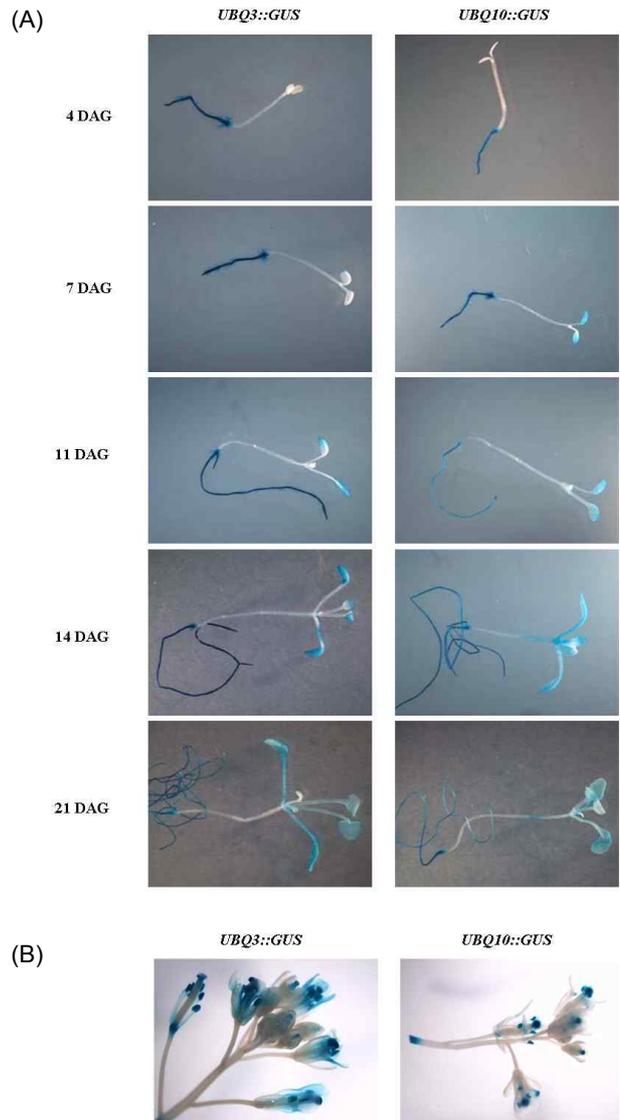


Fig. 4. Analysis of GUS activities in *UBQ3 promoter::GUS* and *UBQ10 promoter::GUS* T₂ transgenic plants. (A) GUS activities in 4, 7, 11, 14 and 21 day-old seedlings under short day condition. (B) GUS activities in floral clusters of mature plants.

OsDEG10 유전자에 대한 RNAi 형질전환 식물체를 분석하였다. *OsDEG10*의 RNAi 형질전환 식물체는 *OsDEG10* 유전자의 역반복 서열을 pFGL727에 클로닝 한 후, 역반복 서열 부위를 단자엽식물용 과발현 벡터인 pGA1611로 클로닝 하였고[23], 이를 벼에 형질전환하여 제조하였다. T₁ 형질전환 식물체 5개를 대상으로 RT-PCR을 수행하여 *OsDEG10* 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 1번, 2번과 5번 세 개 식물체에서 *OsDEG10*의 발현이 야생형에 비해 현저히 감소한 것을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과를 통해 pFGL727이 식물 유전자의 발현 억제에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

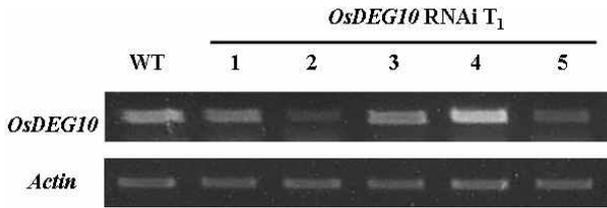


Fig. 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *OsDEG10* gene in rice T_1 transgenic plants containing *OsDEG10* RNAi vector. Rice *Actin* was used as an internal control.

고 찰

식물 유전자의 기능에 대한 연구에서 과발현체 및 돌연변이체를 제조 또는 확보하는 것은 필수적이다[18]. 본 연구에서는 식물, 특히 쌍자엽식물에서 유전자의 과발현에 사용할 수 있는 세 종류의 벡터와 대부분의 식물에서 유전자의 발현억제에 사용할 수 있는 RNAi 기본 벡터를 제조하고 그 유용성을 확인하였다. 특히 과발현용 벡터의 제조에 사용된 pPZP211은 binary 벡터들 가운데 크기가 작고 박테리아 내에서 높은 copy 수로 존재하여 본 연구에서 제조된 벡터들은 박테리아 내에서의 조작이 매우 용이하다[13].

먼저 쌍자엽식물에서 유전자의 과발현에 사용할 수 있는 pFGL571, pFGL846 그리고 pFGL847을 제조하였으며, 이들 벡터는 각각 modified CaMV 35S, UBQ3, UBQ10 프로모터를 포함하고 있다(Fig. 1B). 세 종류의 벡터 모두 MCS에 5개 또는 7개의 제한효소 부위를 가지고 있고, 벡터의 전체 염기서열이 제공되어 원하는 유전자를 쉽게 클로닝 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Fig. 1B). GUS 유전자를 리포터 유전자로 사용하여 세 벡터의 유용성을 형질전환 식물체에서 확인한 결과, modified CaMV 35S, UBQ3, UBQ10의 세 프로모터 모두 애기장대의 여러 발달단계 및 꽃 기관에서 발현됨을 확인하였고(Fig. 2와 4), modified CaMV 35S의 경우 이러한 결과를 sGFP를 리포터 유전자로 사용하여 재확인 하였으며, 전사체 수준에서도 재확인 하였다(Fig. 3). 특히, modified CaMV 35S 프로모터의 경우 intact CaMV 35S::omega 프로모터와 비교했을 때 좀 더 높은 활성을 보였다(Fig. 2B). Intact CaMV 35S::omega 프로모터는 변형되지 않은 CaMV 35S 프로모터에 단백질 발현량을 높이는 것으로 보고된 omega 서열을 첨가한 것으로 CaMV 35S 프로모터 그 자체에 의한 것 보다 발현량을 더 높여주는 것으로 보고되어 있다[19]. 따라서 본 연구의 결과는 pFGL571이 유전자 과발현에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다. 특히, CaMV 35S 프로모터는 대부분의 쌍자엽식물에서 유사한 발현 경향을 보이는 것으로 알려져 있기 때문에 [19,30,35], 본 연구에서 제작한 pFGL571 벡터는 대부분의 쌍자엽식물에서 유전자의 과발현을 위해 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 한편, UBQ3 보다 UBQ10 프로모터의 활성이 더 이른 초기 발달단계에서 관찰되었기 때문에(Fig.

4A), 영양생장 초기 단계부터의 과발현에는 UBQ3 보다 UBQ10 프로모터가 더 유용할 것으로 여겨진다.

식물에서 특정 유전자의 발현 억제에 사용될 수 있는 RNAi 기본 벡터인 pFGL727 벡터를 제조하였다(Fig. 1B). RNAi 방법은 최근에 식물 및 동물 모두에서 특정 유전자의 발현을 억제하는데 매우 효율적인 방법으로 사용되고 있다[20]. 일반적으로 RNAi 벡터는 hairpin 구조의 이중가닥 RNA를 합성할 수 있도록 spacer 서열을 사이에 두고 대상 유전자에 특이적인 역반복 서열이 필요하다[26]. 대상 유전자의 암호화 부위의 일부에 대한 역반복 서열만으로도 효과적이어서[26], 역반복 서열을 만들기 위해 전체 암호화 부위를 사용할 필요가 없다. pFGL727 벡터의 경우 *OsEMF1* 유전자의 세 번째 인트론을 spacer로 사용하였고, spacer의 왼쪽 및 오른쪽으로 각각 5개, 8개의 제한효소 부위가 있어 역반복 서열의 클로닝이 매우 용이할 것으로 판단된다(Fig. 1B). RNAi 벡터를 제조하기 위해, 발현을 억제시키고자 하는 대상 유전자에 대해 동일한 유전자-특이적 부위를 spacer 양쪽에 역반복이 되도록 클로닝 하면 되는데, pFGL727의 경우 spacer 양쪽에 제한효소 부위가 많아 한 종류의 프라이머만으로도 역반복 서열의 클로닝이 가능하다. 즉, 유전자-특이적 부위를 증폭하기 위한 프라이머를 디자인 할 때 DNA의 양쪽에 클로닝에 사용할 제한효소 부위가 각각 2개씩 합성되도록 하면 된다. 예를 들어 증폭된 DNA의 왼쪽에는 *Xhd-BanHI* 부위가, 오른쪽에는 *EcdRI-HindIII* 부위가 생길 수 있도록 한 종류의 정방향 및 역방향 프라이머를 합성한 후, 증폭된 DNA를 먼저 *BanHI*과 *EcdRI*로 처리하여 pFGL727에 클로닝 하고, 클로닝 된 벡터에 동일한 증폭 DNA를 *Xhd*과 *HindIII*로 처리하여 클로닝 하면 역반복 서열을 가진 RNAi 벡터를 만들 수 있다. pFGL727에 클로닝 된 역반복 서열 부위는 쌍자엽식물 또는 단자엽식물 과발현용 벡터에 옮겨 식물체로 형질전환할 수 있다. 쌍자엽식물에 형질전환할 경우 본 연구에서 제조된 pFGL571, pFGL846 또는 pFGL847을 과발현용 벡터로 이용할 수 있을 것이다. 실제로 벼의 *OsDEG10* 유전자를 대상으로 pFGL727 벡터를 이용하여 제조한 벼의 형질전환 식물체에서 발현 억제 효과를 조사한 결과, 5개의 T_1 식물체 중 3개 라인에서 유전자 발현이 확연하게 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 pFGL727이 RNAi 라인 제조를 기본 벡터로 유용하게 이용될 수 있음을 의미한다.

본 연구 결과를 종합할 때, 본 연구에서 제조된 pFGL571, pFGL846 그리고 pFGL847은 쌍자엽식물에서 유전자 과발현에 유용하게 사용될 수 있고, pFGL727은 쌍자엽식물 및 단자엽식물에서 유전자의 발현 억제를 위한 효율적인 RNAi 기본 벡터로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

식물에서 유전자의 기능을 연구하는데 있어서 유전자가 과

발현 되거나 발현이 억제되는 형질전환체는 해당 유전자의 기능과 관련되어 매우 유용한 정보를 제공한다. 본 연구에서는 modified CaMV 35S, UBQ3, UBQ10 프로모터를 pPZP211 벡터에 각각 클로닝 하여 *Agrobacterium*을 매개로 한 과발현 형질전환 식물체 제작에 유용하게 이용할 수 있는 pFGL571, pFGL846, pFGL847을 제조하였다. 이 벡터들은 크기가 작고, 박테리아 내에 high copy로 존재하며, 다중 클로닝 부위에 다양한 제한효소 부위를 가지고 있고, 전체 서열이 알려져 있는 등의 장점을 가지고 있다. GUS 또는 sGFP 리포터 유전자를 포함하는 형질전환 식물체를 제조하여 modified CaMV 35S, UBQ3, UBQ10 프로모터의 활성을 분석한 결과, 세 프로모터 모두 발아 후 대부분의 발달단계와 성숙한 식물체의 꽃 기관에서 높은 활성을 보였다. 한편, 식물에서 유전자 발현 억제에 이용할 수 있는 RNAi 기본 벡터인 pFGL727을 제조하였고, pFGL727을 이용한 벡터 RNAi 형질전환체의 분석을 통해 이 벡터가 유전자의 발현 억제에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다. 연구 결과를 종합해 보면, 본 연구에서 제조한 벡터들은 식물에서 유전자 과발현과 발현 억제에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- An, G. 1986. Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco tissue. *Plant Physiol.* **81**, 86-91.
- Benfey, P. N., L. Ren, and N. H. Chua. 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* **8**, 2195-2202.
- Benfey, P. N., L. Ren, and N. H. Chua. 1990a. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* **9**, 1677-1684.
- Benfey, P. N., L. Ren, and N. H. Chua. 1990b. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* **9**, 1685-1696.
- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711-8721.
- Callis, J., T. Carpenter, C. W. Sun, and R. D. Vierstra. 1995. Structure and Evolution of Genes Encoding Polyubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia. *Genetics* **159**, 921-939.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Christensen, A. H., R. A. Sharrok, and P. H. Quail. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* **18**, 675-689.
- Clough, S. J. and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Fang, R. X., F. Nagy, S. Sivasubramaniam, and N. H. Chua. 1989. Multiple cis Regulatory Elements for Maximal Expression of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter in Transgenic Plants. *Plant Cell* **1**, 141-150.
- Gallie, D. R., D. E. Sleat, J. W. Watts, P. C. Turner, and T. M. A. Wilson. 1987. A comparison of eukaryotic viral 5'-reader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8693-8711.
- Gao, P., Z. Xin, and Z. L. Zheng. 2008. The *OSU1/QUA2/TSD2*-Encoded Putative Methyltransferase Is a Critical Modulator of Carbon and Nitrogen Nutrient Balance Response in Arabidopsis. *PLoS ONE* **3**, e1387.
- Hajdukiewicz, P., Z. Svab, and P. Maliga. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **25**, 989-994.
- Harholt, J., J. K. Jensen, S. O. Sørensen, C. Orfila, M. Pauly, and H. V. Scheller. 2006. ARABINAN DEFICIENT 1 is a putative arabinosyltransferase involved in biosynthesis of pectic arabinan in arabidopsis. *Plant Physiol.* **140**, 49-58.
- Herrera-Estrella, L., M. D. Block, E. Messens, J. P. Hernalsteens, M. V. Montagu, and J. Schell. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* **2**, 987-995.
- Hiei, Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 205-218.
- Hofgen, R. and L. Willmitzer. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* **18**, 9877.
- Holtorf, H., M. C. Guitton, and R. Reski. 2002. Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* **89**, 235-249.
- Holtorf, S., K. Apel, and H. Bohlmann. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 637-646.
- Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 139-143.
- Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura, and T. Nishio. 2003. *Low glutelin content 1*: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* **15**, 1455-1467.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
- Park, H. Y., I. S. Kang, J. S. Han, C. H. Lee, G. An, and Y. H. Moon. 2009. *OsDEG10* encoding a small RNA-binding protein is involved in abiotic stress signaling. *Biochem*

- Biophys. Res. Commun.* **380**, 597-602.
24. Pereira, A. 2000. A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res.* **9**, 245-260.
 25. Sanders, P. R., J. A. Winter, A. R. Bamason, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1543-1558.
 26. Shabalina, S. A. and E. V. Koonin. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 578-587.
 27. Smith, N. A., S. P. Singh, M. B. Wang, P. A. Stoutjesdijk, A. G. Green, and P. M. Waterhouse. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
 28. Stoutjesdijk, P. A., S. P. Singh, Q. Liu, C. J. Hurlstone, P. A. Waterhouse, and A. G. Green. 2002. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* *FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol.* **129**, 1723-1731.
 29. Sun, C. W. and J. Callis. 1997. Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *Plant J.* **11**, 1017-1027.
 30. Wally, O., J. Jayaraj, and Z. K. Punja. 2008. Comparative expression of beta-glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep.* **27**, 279-287.
 31. Wang, J. and J. H. Oard. 2003. Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Rep.* **22**, 129-134.
 32. Weltmeier, F., F. Rahmani, A. Ehlert, K. Dietrich, K. Schütze, X. Wang, C. Chaban, J. Hanson, M. Teige, K. Harter, J. Vicente-Carbajosa, S. Smeeckens, and W. Dröge-Laser. 2009. Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol. Biol.* **69**, 107-119.
 33. Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. B. Wang, D. T. Rouse, Q. Liu, P. S. Gooding, S. P. Singh, D. Abbott, and P. A. Stoutjesdijk. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581-590.
 34. Zhang, H., C. Ransom, P. Ludwig, and S. van Nocker. 2003. Genetic Analysis of Early Flowering Mutants in *Arabidopsis* Defines a Class of Pleiotropic Developmental Regulator Required for Expression of the Flowering-Time Switch Flowering Locus C. *Genetics* **164**, 347-358.
 35. Zheng, X., W. Deng, K. Luo, H. Duan, Y. Chen, R. McAvoy, S. Song, Y. Pei, and Y. Li. 2007. The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Rep.* **26**, 1195-1203.