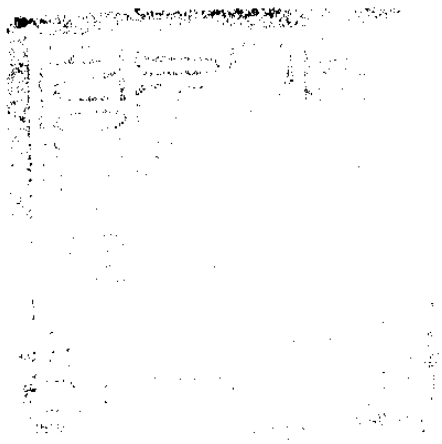
遺傳子 操作에 의한 新植物 創出:
大豆 貯藏蛋白質의 營養學的 價値 增進

Production of Transgenic Plant by Genetic Engineering:
Improvement for Nutritional Quality of Soybean Storage Protein

研 究 機 關

農 業 技 術 研 究 所



科 學 技 術 處

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "유전자 조작에 의한 신식물 창출 : 대두 저장 단백질의 영양학적 가치 증진" 과제의 1차년도 최종 보고서로 제출합니다.

1990 년 4 월 일

주관연구기관명 : 농업기술연구소
총괄연구책임자 : 정 태 영
연 구 책임자 : 최 양 도
연 구 원 : 이세영 이종섭
황영수 이부영
최순영 최상봉
이수영 안지훈
김정호 이수열

요 약 문

I. 제 목

유전자 조작에 의한 신식물 창출 : 대두 저장 단백질의 영양학적 가치 증진

II. 연구개발의 목적 및 중요성

두류나 곡류의 종자에 함유된 저장 단백질은 우리가 섭취하는 단백질의 약 70%를 공급해 준다. 그러나 인간이 섭취하는 식품 단백질은 직접 간접으로 모두 종자 식물의 저장 단백질에서 비롯된다. 따라서 현재까지 대두, 강낭콩, 완두콩 등의 두류 및 옥수수, 밀, 벼 등의 곡류에서 저장 단백질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 영양 단백질의 질은 이들이 함유하고 있는 아미노산의 조성에 의해 결정되는데 영양학적 관점에서 보면 식물 종자의 저장 단백질은 동물 단백질과 달리 한 두 종류의 필수 아미노산이 결핍되어 다른 것에서 이들을 공급받아야 하는 단점이 있다. 예를들면 두류 단백질에는 methionine과 cysteine 그리고 tryptophan이, 곡류 단백질에는 lysine과 tryptophan이 결핍되어 영양학적으로 균형있는 단백질을 공급해 줄 수 있는 종자의 개량이 요구되어 왔다. 특히 원산지가

우리나라를 비롯한 만주 지방으로 우리나라의 기후와 토질이 대두 재배에 적합하고, 우리나라를 포함한 동양권에서 주된 식품 및 사료 작물로 사용되어 오는 대두의 경우 이러한 영양가를 증진시키기 위한 연구는 매우 바람직하고 또 시급하다. 저장 단백질의 수확량과 영양학적 질을 향상시키기 위해 돌연변이법 이라든가 교잡 및 자연선별법에 의한 고전적 육종 방법이 오랜 세월 동안 수행되어 왔으며 어느 정도 성공을 거두고 있지만 만족할만한 신품종은 아직 얻지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 최근 발달한 유전공학 및 세포생물학적 방법을 이용하여 저장단백질 유전자를 분리한 후 이를 조작하여 결핍된 아미노산을 code하는 유전자를 삽입, 치환하거나 다른 식물계에 존재하는 유전자를 대두에 도입하거나, 혹은 새로운 인공 유전자를 합성 도입시키는 등 매우 특이적이며 정확하게 설계 계획된 방법에 의해 영양가가 향상된 신품종을 창출하고저 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

유전자 조작과 세포의 형질 전환에 의해 영양가치가 증진된 신품종 대두를 창출하기 위한 본 연구의 1차 년도인 현년도의 연구개발의 내용 및 범위는 다음과 같다. 첫째, 유전자의 조작을 위해 대두의 주된 저장 단백질 glycinin의 유전자를 분리한 후 염기서열을 결정하여 유전자의 구조를 분자수준에서 규명한다. 둘째, 단백질의 필수 아미노산 조성이 향상된 인공 유전자를 합성한 후 그

특성을 규명한다. 셋째, 형질전환을 위해 대두의 세포배양 조건, 형질전환 방법 및 재분화에 의해 완전한 대두 식물체의 재생조건을 확립한다. 이러한 연구결과는 다음 2차년도에서 유전자 조작 및 형질전환에 직접 활용될 것이다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 1차년도 연구 결과는 다음과 같다.

1. 대두의 주된 저장 단백질 glycinin 유전자를 분리하기 위하여 대두 종자의 cDNA 유전자 은행과 대두의 genomic 유전자 은행을 제조하였다.
2. Glycinin에 대한 항체를 이용한 면역 선별법에 의해 대두 glycinin A2B1a를 code하는 cDNA 유전자를 분리하였다.
3. cDNA 유전자를 이용한 핵산 선별법에 의해 glycinin의 genomic 유전자를 분리 하였다.
4. 이들 clone들을 subcloning한 후 DNA 염기서열을 결정하여 유전자의 구조를 규명하였다.
5. 필수 아미노산 methionine과 tryptophan 함량이 매우 높은 인공 유전자를 합성 하였다.
6. 인공유전자의 구조를 확인하고 E. coli에서 발현을 확인하였다.
7. 유전자 도입에 의한 대두의 형질 전환을 위해 대두의 세포 배양

조건을 검토 하였다.

8. marker 유전자를 가진 Agrobacterium을 감염시킨 후 primary node 배양법을 시도하여 kanamycin에 저항성을 보이는 대두 식물체를 얻었다.

이러한 1차년도 연구 결과의 활용 방안은 다음과 같다.

1. 대두 저장단백질 glycinin의 cDNA 유전자와 합성한 인공유전자는 유전자 조작에 의해 필수 아미노산의 조성이 향상된 재조합 단백질 생산에 활용될 수 있다.
2. 대두 저장단백질 glycinin의 genomic clone은 유전자의 발현 조절 부위를 포함 하고 있어서 대두를 이용하여 유용물질을 대량 생산하는데 활용할 수 있다.
3. 대두 세포의 형질전환 및 재분화에 의해 대두 식물체를 얻는 기술은 지금까지 model system으로 사용해온 담배를 넘어서서 직접 유용 작물의 형질전환에 활용 할 수 있다.

이상의 활용 방안은 계속되는 2차 및 3차년도 연구에서 추구하고 있으므로 그 결과를 기대해 보도록 한다.

SUMMARY

To improve a nutritional quality of soybean seed storage protein, genetic engineering approaches are being attempted; isolation and modification of the storage protein genes, with modified genes transformation of soybean, and regeneration of soybean transgenic plant. The results of the 1st year studies are as follows;

1. Construction of seed cDNA and genomic libraries of soybean.
2. Isolation of cDNA and genomic clones for soybean seed protein, glycinin.
3. Determination of the glycinin gene structure by nucleotide sequencing.
4. Synthesis of the artificial gene encoding proteins rich in essential amino acids such as methionine, tryptophan and lysine.
5. Confirmation of synthetic gene structure and expression characteristics.
6. Establishment of tissue culture conditions for soybean.
7. Transformation and regeneration of transgenic soybean with the marker gene, neomycin phosphotransferase II.

These results are utilized in pursuing studies; modification and recombination of isolated genes, introduction of recombinant genes into soybean, and regeneration of soybean transgenic plant.

CONTENTS

Chapter I. Introduction 12

Chapter II. Materials and Methods 15

Chapter III. Results and Discussion 24

1. Isolation of glycinin gene 24

a. Isolation of glycinin cDNA clone and subcloning . . 24

b. Nucleotide sequence of glycinin cDNA clone G1A1F . . 26

c. Isolation of glycinin genomic clone 30

d. Regulatory region of glycinin A2B1a genomic clone . 34

e. Structure of glycinin Gy1 genomic clone 37

2. Synthesis of artificial gene 46

a. Design of oligonucleotide encoding essential amino acids 46

b. Cloning of synthetic oligonucleotide encoding essential amino acids 48

c. Confirmation of synthetic gene by nucleotide sequencing 52

d. Expression of synthetic gene by fusion protein . . . 56

3. Cell culture, transformation and regeneration of transgenic soybean 59

a. Induction of somatic embryo from immature embryo . . 59

b. Shoot induction by cotyledonary node culture
and transformation 62
c. Shoot induction from coteledon and transformation . . 66
References 69

목 차

제 1 장 서 론 12

제 2 장 재료 및 방법 15

제 3 장 결과 및 고찰 24

제 1 절 Glycinin 유전자 분리 24

가. Glycinin cDNA 유전자 분리 및 subcloning 24

나. Glycinin cDNA clone G1A1F의 염기서열 26

다. Glycinin genomic 유전자의 분리 30

라. Glycinin A2B1a 유전자의 조절 부위 구조 34

마. Glycinin Gy1 유전자의 구조 37

제 2 절 인공 유전자의 합성 46

가. 필수 아미노산을 code하는 oligonucleotide의 design 46

나. 필수 아미노산을 code하는 합성 oligonucleotide의 cloning 48

다. Cloning된 인공 합성 DNA의 DNA 염기서열의 확인 . 52

라. Fusion protein으로서 인공단백질의 발현 56

제 3 절 대두의 형질전환 및 재분화 59

가. Immature embryo로부터 somatic embryo의 유도 . . 59

나. 자엽절 배양에 의한 신초군의 유도 및 Agrobacterium의 매개에 의한 형질전환 62

다. 자엽으로부터 신초군의 유도 및 Agrobacterium의
매개에 의한 형질전환 66
참고문헌 69

제 1 장 서 론

지난 15년 동안 획기적이고 기본적인 유전공학 기술인 유전자 cloning과 DNA sequencing 기술의 발달로 분자 수준에서 유전기작을 이해할 수 있게 되었을 뿐만 아니라 이 지식을 실제 유전자 조작을 통해 응용함으로써 인류의 복리 증진에 무한한 가능성을 보여주고 있다. 식물학 분야에서 유전 공학적 기술의 응용이 가능한 분야는 작물의 광합성 효율 증대, 질소 고정 능력 부여, 저장 단백질의 양과 질의 증진, 해충과 병원균에 대한 저항성 증진, 환경 요인에 대한 내성 증진 등 이다. 이들에 관계되는 유용 유전자를 추출하고 조작하여 다른 식물체 내에 도입함으로써 식물의 형질 전환을 통해 유용작물의 품종을 개량하는 것은 농업에서 새로운 녹색 혁명으로까지 불리어지고 있다. 다른 분야에 비해 식물을 이용한 농업 분야가 유전공학의 응용으로 커다란 효과가 기대되는 이유는 식물만이 간직하고 있는 태양 에너지 고정 능력과 재분화 능력으로 무한한 에너지원을 확보하고 있을뿐 아니라 유용유전자가 도입되어 형질전환된 세포로부터 완전한 성체를 유도하여 신식물을 창출할 수 있기 때문이다.

두류나 곡류의 종자에 함유된 저장단백질은 우리가 섭취하는 단백질의 약 70i 공급해 준다. 그러나 인간이 섭취하는 식품 단백질은 직접 간접으로 모두 종자 식물의 저장 단백질에서 비롯된다. 따라서 현재까지 대두, 강낭콩, 완두콩 등의 두류 및 옥수수, 밀, 벼

등의 곡류에서 저장 단백질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 영양단백질의 질은 이들이 함유하고 있는 아미노산의 조성에 의해 결정되는데 영양학적 관점에서 보면 식물 종자의 저장단백질은 동물 단백질과 달리 한 두 종류의 필수 아미노산이 결핍되어 다른 것에서 이들을 공급받아야 하는 단점이 있다. 예를 들면 두류단백질에는 methionine과 cysteine 그리고 tryptophan이, 곡류단백질에는 lysine과 tryptophan이 결핍되어 영양학적으로 균형있는 단백질을 공급해 줄 수 있는 종자의 개량이 요구되어 왔다. 특히 대두는 원산지가 우리나라를 비롯한 만주 지방으로 우리나라의 기후와 토질이 대두 재배에 적합하고, 우리나라를 포함한 동양권에서 주된 식품 및 사료작물로 사용되어 오는 대두의 경우 이러한 영양가를 증진시키기 위한 연구는 매우 바람직하고 또 시급하다. 저장 단백질의 수확량과 영양학적 가치를 증진시키기 위해 돌연변이법 이라든가 교잡 및 자연선별법에 의한 고전적 육종 방법이 오랜 세월 동안 수행되어 왔으며 어느 정도 성공은 거두고 있지만 한정된 germplasm 과 교잡의 생물학적 한계 때문에 만족할 만한 성과는 아직 얻지 못하고 있다.

따라서 본 연구에서는 최근 발달한 유전공학 및 세포생물학적 방법을 이용하여 저장단백질 유전자를 분리하여 결핍된 아미노산을 code하는 유전자를 삽입, 치환하거나, 다른 식물계에 존재하는 유전자를 도입하거나, 혹은 새로운 유전자를 합성 도입시키는 등 매우 특이적이며 정확하게 설계 계획된 방법에 의해 영양가가 향상된 신품종 대두를 창출하고자 한다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 본 연구의 1차 년도인 현년도에는 대두 저장단백질의 유전자를 분리하여

그 구조를 규명하고 필수 아미노산 조성이 향상된 인공 유전자를 합성하여 그 구조와 발현 특성을 확인하며 형질전환을 위해 대두의 세포배양 조건, 형질전환 방법 및 재분화 조건을 확립하고자 하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 대두 시료

대두 저장단백질의 유전자 분리에 사용한 대두(Glycine max) 시료는 서울대학교 농과대학 부속 실험농장에서 재배한 '팔달' 품종을 사용하였다. 대두의 세포 배양, 형질 전환 및 재분화 연구를 위해서는 단엽, 팔달 및 황금을 사용하였다.

2. Strains and plasmids

형질전환과 plasmid 유지를 위하여 E.coli HB101 혹은 MC1061 strain을 사용하였다. Subcloning 을 위해서는 pUC18 을 사용하였다. E.coli 발현형 vector pHK414를 인공 유전자 cloning 및 polymerization에 이용하였고 unfused protein으로의 발현을 위하여 pINIIIA3 plasmid를 이용하였다. 인공유전자의 효모 발현에 사용하였다.

3. 배지

E.coli 균주는 LB배지에서 배양하였다. LB는 trypton 10g, yeast extract 5g, sodium chloride 10g을 1L에 포함하고 있으며 plasmid를 포함하는 E.coli는 여기에 50ug/ml의 ampicillin을 첨가한 것을 사용하였다.

4. DNA 조작

E.coli 형질전환, DNA 분리, 제한효소 사용, cloning 방법, Southern blotting 등은 Maniatis et al.의 방법 (1982) 에 따라 실행하였다.

5. 대두 저장단백질 유전자 분리

대두 저장단백질 유전자는 우선 그의 cDNA를 분리한 후 이것을 probe로 사용하여 genomic 유전자를 분리하였다. cDNA 유전자 은행은 Gubler and Hoffman (1983) 의 방법을 변형하여 사용하였다. Phenol extraction과 oligo(dT)-cellulose chromatography에 의해 대두의 mRNA를 분리한 후, reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하고 이를 lamda gt11 expression vector에 삽입하여 expression

library를 조성하였다 (Kim and Choi 1989a,b). 대두의 주된 저장단백질 glycinin을 순수 분리한 후 이것을 토끼에 주사하여 항체를 얻은 후 immunoscreening 방법에 의해 cDNA expression library로 부터 cDNA clone을 분리하였다. 이 cDNA는 대두 단백질의 coding sequence는 모두 가지고 있으나 생체 내에서 유전자 발현을 조절하는 조절 인자 부위를 갖고 있지 못하므로 이 cDNA를 probe로 활용하여 genomic clone을 분리하였다.

대두의 잎에서 분리한 DNA를 사용하여 EMBL 3 vector에 genomic library를 제작하였고, 핵산 선별법에 의해 발현 조절 인자를 포함한 genomic clone을 분리하였다 (Benton and Davis, 1977).

6. 대두 저장단백질 유전자 검정

핵산 선별법에 의해 분리된 genomic clone이 실제 glycinin 유전자를 포함하고 있는지를 확인하기 위하여 이 clone으로부터 DNA를 분리한 후 Southern blotting 및 DNA sequencing을 실시하였다. Recombinant phage DNA는 DEAE-cellulose chromatography (Helms et al. 1987) 방법에 의해 분리하였으며 Southern blotting은 Maniatis et al.(1982)의 방법에 따라 실시하였다. DNA sequencing은 Sanger (1977)의 dideoxynucleotide chain termination 방법을 이용하였다.

7. E. coli 에서 인공유전자의 발현.

E.coli에 cloning된 인공유전자들은 IPTG에 의하여 유도되었다. LB+Ap 배지에서 transformant를 mid-log 단계까지 배양한 후 IPTG를 최종 1mM 농도로 첨가한 다음 5시간 동안 유도 발현시켰다. 배양한 E. coli를 원심분리하여 회수하여 lysozyme을 넣고 lysis 시킨 후 sample buffer에 넣어 5분간 끓인 다음 SDS-PAGE를 행하였다.

8. 미성숙 배로부터 체세포의 유도

대두 (Glycine max)의 품종으로는 단엽, 팔달 그리고 황금을 사용하였다. 이들 종자 를 포트에 파종하여 종자형성을 유도하였다. 길이가 3-5 mm의 자엽을 지닌 미성숙 배 를 채취하여 10% chlorox에 15 분간 처리하여 살균하고 멸균된 증류수로 3회 세척한 후 배축을 제거하여 여러 호르몬 조합과, 20 g/1 surose, 0.8% (w/v) agar가 함유된 MS 배지 (유도 배지)에 adaxial surface가 아래로 향하게 치상하여 암소에서 28 C를 유지하면서 배양하였다. 배지는 멸균하기 전에 pH 5.8 로 맞추었다. Somatic embryo의 유도를 위한 호르몬의 최적조건을 선별하기 위하여 10 mg/1 2,4-D, 20 mg/1 2,4-D, 10mg/1 2,4,5-T, 2.5 mg/1 2,4-D + 2.5 mg/1 2,4,5-T 의 조합을 사용하였다. 30 일간 배양한 후 1 개 또는 2 - 8 개의 embryo를 96 g/1 sucrose, 0.5% (w/v) activated charcoal, 0.8% agar를 함유한 MS 배지(성숙

배지)로 옮겨 연속광 하에 28 C로 유지하면서 성숙시켰다. 다른 한편 황금의 미성숙 배에서 배축을 제거하고 NH4NO3 와 KNO3 의 농도를 반으로 줄이고 B5 배지의 비타민, 5 mg/l adenine sulfate, 2 mg/l cysteine-HCl, 1 mg/l calcium pantothenate, 1 mg/l biotin, 1 mg/l glycine 그리고 8 mg/l a-naphthanleneacetic acid (a-NAA), 0.6 % agar를 함유한 MS 배지 (Table 1)에 adaxial surface가 아래로 향하게 치상하여 26 C를 유지하면서 암조건에서 somatic embryo를 유도하였다. 유도된 somatic embryo를 호르몬이 없는 MS 배지에서 온도를 26 C로 유지하면서, 연속광 하에서 발아를 유도하였다.

9. 자엽절(cotyledonary node)배양에 의한 신초군의 유도 및 Agrobacterium의 매개에 의한 형질전환

단엽, 팔달 그리고 황금의 종자를 10% chlorox에 20 분간 침적시켜 표면살균하고 멸균된 증류수로 3 회 세척한 후 B5 기본배지에 1.126 mg/l, 6-benzylaminopurine(BA) 20 g/l sucrose, 6 g/l agar가 함유된 배지 (B5B, Table 2)에 파종하였다. 파종한 종자를 16:8의 광주기하에서 온도를 26 C로 유지하면서 발아시켰다. 14 일간 키운 후 2-3 mm의 상배축, 하배축, 자엽만 남도록 절단하여 B5B 배지에서 신초를 유도하였다. 한차례 계대배양하여 신초의 수를 조사하였다. 대두세포로의 유전자 도입은 Agrobacterium의 매개에 의한 방법을 사용하였다. 도입 하고자 하는 유전자는 cauliflower

Table 1. Compositions of modified MS medium used induction of somatic embryo from immature embryo.

Constituent	Concentration (mg/l)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
KNO_3	950
NH_4NO_3	825
KH_2PO_4	170
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	22.3
KI	0.83
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
$CuSO_4 \cdot 6H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
Na2-EDTA	37.3
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
Sucrose	30000
Myo-Inositol	100
Nicotinic acid	1
Pyridoxine-HCl	1
Thiamine-HCl	10
Adenine sulfate	5
Cystein-HCl	2
Calcium-pantothenate	1
Biotin	1
Glycine	1
α-NAA	8
agar	6000

Table 2. Compositions of B5 medium used shoot induction from cotyledonary node segment.

Constituent	Concentration (mg/l)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250
$CaCl_2 \cdot 7H_2O$	150
KNO_3	2500
$(NH_4)_2 \cdot 4H_2O$	134
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10
KI	0.75
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
$CuSO_4 \cdot 6H_2O$	0.025
H_3BO_3	3
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
Fe-EDTA	43
Sucrose	20000
Myo-Inositol	100
Nicotinic acid	1
Pyridoxine-HCl	1
Thiamine-HCl	10
BA	1126
agar	6000

mosaic virus의 35S promoter와 토마토의 단백질 분해효소 억제제 I 유전자 사이에 조작된 chimeric gene (CaMV 35S-Inhibitor I) 으로 이를 Agrobacterium tumefaciens의 Ti-plasmid에서 유도된 vector인 pGA482에 cloning하였다. 이렇게 조작된 plasmid를 pJSL231이라고 명명하였으며 pJSL231을 helper로 E.coli 균주 HB101(pRK2013)을 사용한 triparental mating 방법으로 E. coli 에서 Agrobacterium 균주인 A208로 이동시켰다. 단엽종자를 14 일간 발아시킨 다음 자엽절의 배양에서와 같은 방법으로 자엽절을 절취하고 LB 배지에서 12 시간 배양한 A208 가 0.1 ml, B5B 액체배지가 1 ml가 든 petri dish에 28 C, 암상태에서 48 시간동안 같이 배양하였다. 2 일간 배양한 후 자엽절을 100 ug/ml kanamycin, 500 ug/ml carbenicillin이 포함된 B5B 고형배지로 옮겨서 10 일간 26 C에서 16:8의 광주기로 하여 배양하였다. 이 자엽절을 B50 고형배지로 옮겨 3 - 4 주간 배양한 뒤 생성된 신초를 50 ug/ml kankmycin을 함유한 호르몬이 없는 1/2 고형배지에서 뿌리를 유도하였다.

10. 자엽으로부터 신초군의 유도 및 Agrobacterium의 매개에 의한 형질전환

단엽종자를 70% 에탄올에 2분간 처리하고 10% chlorax에서 20 분간 침적시켜 표면살균하고 멸균된 증류수로 3 회 세척한 후 0.8% water agar에서 온도를 25 C, 16:8 광 주기하에서 발아시켰다. 5

일후에 자엽을 절단하여 B5 salt, 20 mg/l sucrose, 1.15 mg/l BA 그리고 8 g/l Difco agar가 함유된 B5BA 배지에 axial surface가 아래로 향하게 배양함으로써 신초형성을 유도하였다. 2 주후에 형성된 신초를 간직한 자엽을 BA가 첨가되지 않은 B50 배지로 옮겼다. 유도된 신초군을 절단하고 이를 1/2 B50 배지에서 배양함으로써 뿌리를 유도하였다.

Agrobacterium의 매개에 의한 단엽의 형질전환은 다음과 같이 수행 하였다. 표면살균된 단엽종자를 0.8 % water agar에서 발아시키고 5 일후 자엽을 절단하여 LB배지에서 12 시간 배양한, pJSL231을 지닌 A208이 0.1ml, B5BA 액체배지 가 1 ml가 든 petri dish에서 온도를 28 C로 유지하면서 암상태로 48 시간 동안 같이 배양하였다. 48 시간 동안 배양한 후 자엽을 100 ug/ml kanamycin, 500 ug/ml carbenicillin이 함유된 B5BA 고형배지로 옮겨서 2 주간 26 C, 16:8의 광주기하에서 신초를 유도하였다. 유도된 신초를 다시 B50 배지로 옮겨서 신초의 신장을 증진시켰다. 신장된 신초를 절단하여 50 ug/ml kanamycin이 함유된 1/2 B50 배지에서 뿌리를 유도하였다.

제 3 장 결 과 및 고 찰

제 1 절 Glycinin 유전자의 분리

가. Glycinin cDNA 유전자 분리 및 subcloning

대두의 주된 저장단백질 glycinin 의 cDNA 유전자를 분리하기 위하여 대두 종자에서 분리한 mRNA를 사용하여 lamda gt11 expression library를 합성하였다. 이 cDNA 유전자 은행은 앞으로도 대두 종자의 유전자를 분리하는데 매우 유용하게 활용될 수 있다. 대두 종자에서 glycinin A- 와 B-polypeptide를 순수 분리하여 항체를 제조한 후 이를 이용한 항체선별법에 의해 glycinin cDNA clone을 선별하였다. 양성 반응을 보이는 phage plaque을 2차, 3차 반복 선별하여 plaque을 순수 분리하였다. 이들 recombinant phage 들로부터 phage DNA를 분리하여 cDNA insert size를 분석한 후 insert size가 약 1.7 kbp로 가장 긴 clone을 G1A1F clone 이라고 명명하였다. G1A1F clone의 insert는 내부에 두개의 EcoRI site 가 있어서 EcoRI으로 처리하였을 경우 689bp, 285bp, 710bp의 3개 fragment로 절단된다. 실험의 편의를 위해서 이들을 각각 분리하여 plasmid vector pUC18에 subcloning하고 p1A1S, M, L 이라고 명명하였으며 이후의 실험에 사용하였다 (Figure 1).

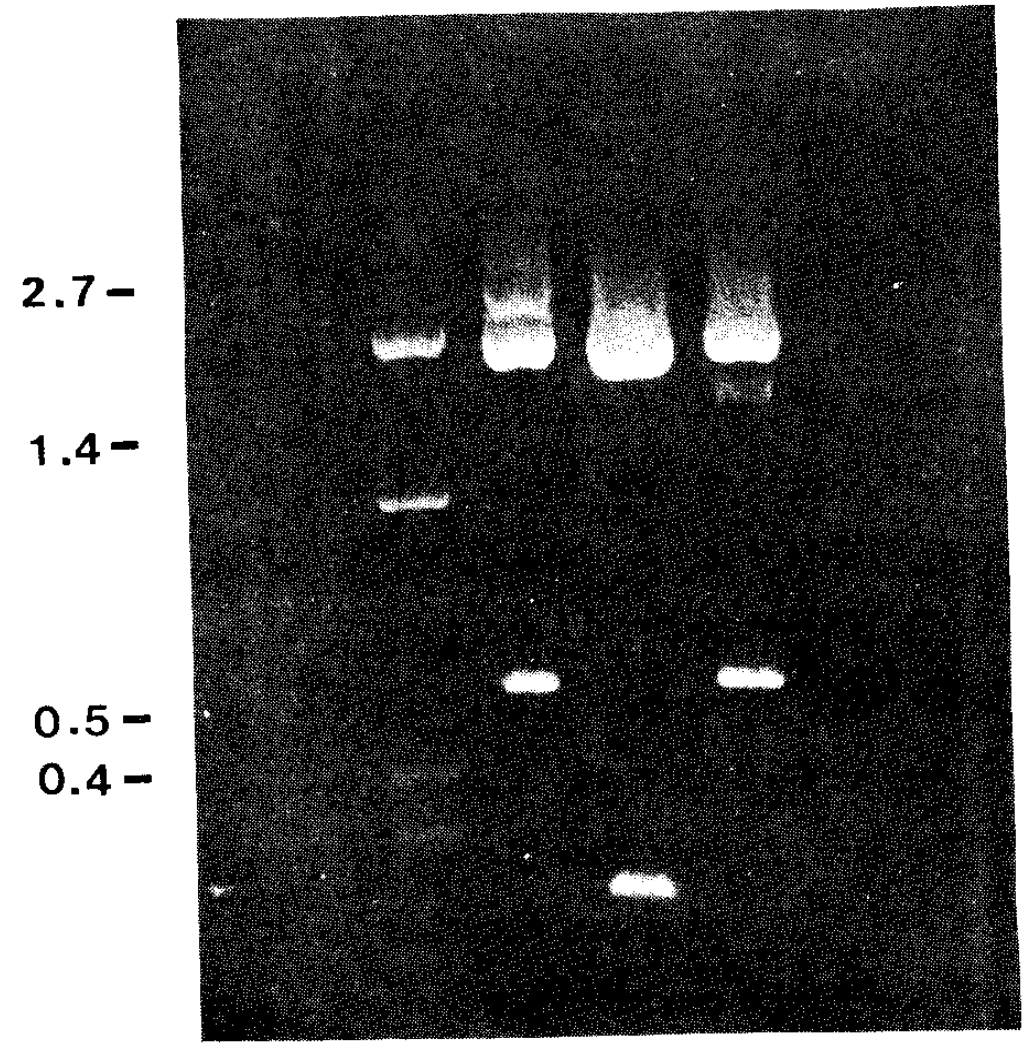


Figure 1. The insert analysis of the glycinin cDNA clone G1A1 and its subclones.

pG1A1S,M,L : Subclone of the 688, 281, 715 bp Eco RI fragment of G1A1

나. Glycinin cDNA clone G1A1F의 염기서열

G1A1F clone에 의하여 code되는 glycinin subunit을 확인하기 위하여 G1A1F clone의 제한효소 지도와 염기서열을 결정하였다 (Figure 2, Figure 3). cDNA 유전자는 1455bp의 open reading frame을 포함하고 있으며 485개의 아미노산을 code하고 있다. 염기서열로부터 아미노산 서열을 연역해 본 결과 G1A1F clone은 glycinin A2B1a (Marco et al. 1984; Staswick et al. 1984)를 code하는 full-length cDNA clone 임을 알 수 있었으며 A2- 와 B1a-polypeptide를 순서대로 모두 포함하는 것을 알 수 있었다. 아미노산 서열중 보고된 단백질의 아미노산 서열과는 7개의 차이를 보이고 있는데 이들은 단백질의 polymorphism 으로 여겨진다. A- 와 B-polypeptide coding region 사이에 4개의 아미노산으로 되어있는 linker가 존재하는데 이들은 대두 종자 내에서 단백질이 저장될 때 절단 제거되는 것으로 여겨진다. 이 cDNA 유전자에 의해 code 되어지는 단백질의 N-terminal에 존재하는 18 개의 아미노산은 glycinin subunit A2B1a의 A2-polypeptide에는 존재하지 않는데 이들은 glycinin subunit A2B1a의 signal peptides로 여겨진다. B-polypeptide의 C-terminal에도 A2B1a의 B1a- polypeptide에는 존재하지 않는 5 개의 아미노산이 더 존재하는데 이는 아마도 대두 종자 내에서 glycinin subunit mRNA로 부터 직접 단백질이 합성된 후 이 primary translate가 post-translational modification에 의해 완전한 A2- 와 B1a-polypeptide로 변형되는 과정에서 제거되는 것으로

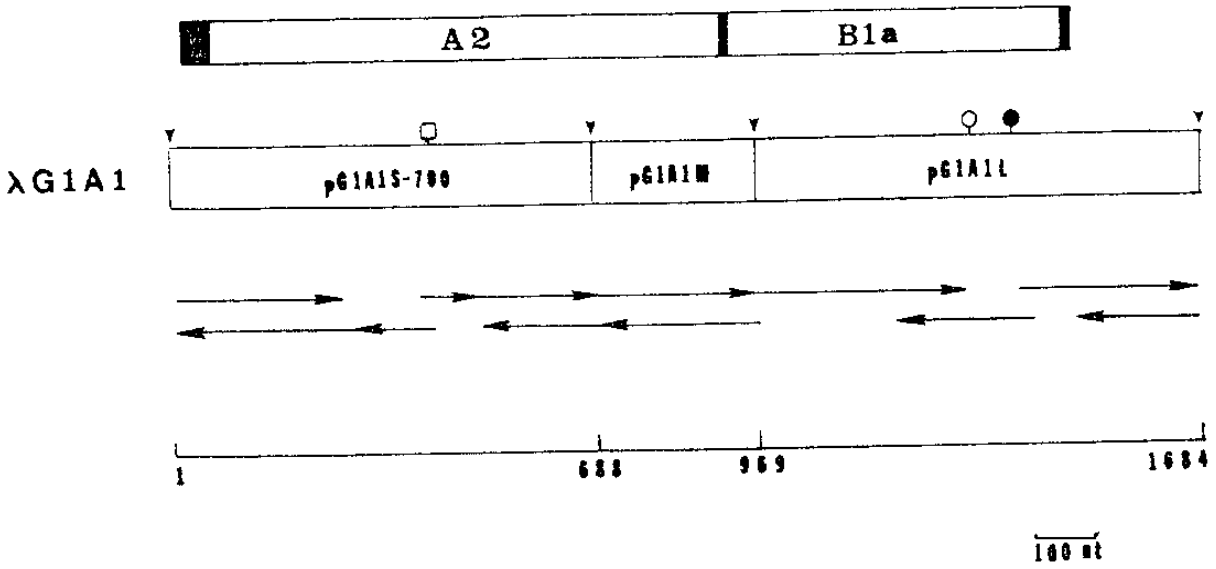


Figure 2. The nucleotide sequencing strategy and the structure of G1A1 glycinin cDNA clone. Three EcoRI restriction fragments of G1A1 cDNA insert were subcloned into pUC18 as indicated (pG1A1S-700, pG1A1M, pG1A1L). The nucleotide sequences were determined as indicated by the arrows. Relationship to A- and B-polypeptides of glycinin subunit A2B1a is shown by comparison of deduced amino acid sequences.

file name : A2-FIG
Sequence : G1A1 (1684 bp)

```
1     ctttgaacactcatcacc ATG GCC AAG CTT GTT CTT TCC CTT TGT TTC CTT CTT TTC AGT GGC TGC TTC GCT CTG AGA GAG CAG    84
                         met ala lys leu val leu ser leu cys phe leu leu phe ser gly cys phe ala Leu Arg Glu Gln
                                                                                                  A2

85    GCA CAG CAA AAT GAG TGC CAG ATC CAA AAG CTG AAT GCC CTC AAA CCG GAT AAC CGT ATA GAG TCG GAA GGT GGG TTC ATT GAG   168
      Ala Gln Gln Asn Glu Cys Gln Ile Gln Lys Leu Asn Ala Leu Lys Pro Asp Asn Arg Ile Glu Ser Glu Gly Gly Phe Ile Glu

169   ACC TGG AAC CCT AAC AAC AAG CCA TTC CAG TGT GCC GGT GTT GCC CTC TCT CGC TGC ACC CTT AAC CGC AAT GCC CTT CGT AGA   252
      Thr Trp Asn Pro Asn Asn Lys Pro Phe Gln Cys Ala Gly Val Ala Leu Ser Arg Cys Thr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Arg Arg
                                              Ser

253   CCT TCC TAC ACC AAC GGT CCC CAG GAA ATC TAC ATA CAA CAA GGT AAT GGT ATT TTT GGC ATG ATA TTC CCG GGT TGT CCT AGC   336
      Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Pro Gln Glu Ile Tyr Ile Gln Gln Gly Asn Gly Ile Phe Gly Met Ile Phe Pro Gly Cys Pro Ser

337   ACT TAT CAA GAG CCG CAA GAA TCT CAG CAA CGA GGA CGA AGC CAG AGG CCC CAA GAC CGT CAC CAA AAG GTA CAT CGC TTC AGA   420
      Thr Tyr Gln Glu Pro Gln Glu Ser Gln Gln Arg Gly Arg Ser Gln Arg Pro Gln Asp Arg His Gln Lys Val His Arg Phe Arg
                                              Cys

421   GAG GGT GAT TTG ATC GCA GTG CCT ACT GGT GTT GCA TGG TGG ATG TAC AAC AAT GAA GAC ACT CCT GTT GTT GCC GTT TCT ATT   504
      Glu Gly Asp Leu Ile Ala Val Pro Thr Gly Val Ala Trp Trp Met Tyr Asn Asn Glu Asp Thr Pro Val Val Ala Val Ser Ile

505   ATT GAC ACC AAC AGC TTG GAG AAC CAG CTC GAC CAG ATG CCT AGG AGA TTC TAT CTT GCT GGG AAC CAA GAG CAA GAG TTT CTA   588
      Ile Asp Thr Asn Ser Leu Glu Asn Gln Leu Asp Gln Met Pro Arg Arg Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu

589   AAA TAT CAG CAG CAG CAG CAA GGA GGT TCC CAA AGC CAG AAA GGA AAG CAA CAA GAA GAA GAA AAC GAA GGA AGC AAC ATA TTG   672
      Lys Tyr Gln Gln Gln Gln Gln Gly Gly Ser Gln Ser Gln Lys Gly Lys Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Ser Asn Ile Leu
                      Glu

673   AGT GGC TTC GCC CCT GAA TTC TTG AAA GAA GCG TTC GGC GTG AAC ATG CAG ATA GTG AGA AAC CTA CAA GGT GAG AAC GAA GAG   756
      Ser Gly Phe Ala Pro Glu Phe Leu Lys Glu Ala Phe Gly Val Asn Met Gln Ile Val Arg Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Glu

757   GAG GAT AGT GGA GCC ATT GTG ACA GTG AAA GGA GGT CTA AGA GTC ACA GCT CCA GCC ATG AGG AAG CCA CAG CAA GAA GAA GAT   840
      Glu Asp Ser Gly Ala Ile Val Thr Val Lys Gly Gly Leu Arg Val Thr Ala Pro Ala Met Arg Lys Pro Gln Gln Glu Glu Asp

841   GAT GAT GAT GAG GAA GAG CAG CCA CAG TGC GTG GAG ACA GAC AAA GGT TGC CAA CGC CAA AGC AAA AGG AGC AGA AAT GGC ATT   924
      Asp Asp Asp Glu Glu Glu Gln Pro Gln Cys Val Glu Thr Asp Lys Gly Cys Gln Arg Gln Ser Lys arg ser arg asn Gly Ile
                                                                                                  B1a

925   GAT GAG ACC ATT TGC ACA ATG AGA CTT CGC CAA AAC ATT GGT CAG AAT TCA TCA CCT GAC ATC TAC AAC CCT CAA GCT GGT AGC   1008
      Asp Glu Thr Ile Cys Thr Met Arg Leu Arg Gln Asn Ile Gly Gln Asn Ser Ser Pro Asp Ile Tyr Asn Pro Gln Ala Gly Ser

1009  ATC ACA ACC GCC ACC AGC CTT GAC TTC CCA GCC CTC TGC GTT CTC AAA CTC AGT GCC CAG TAT GGA TCC ATC CGC AAG AAT GCT   1092
      Ile Thr Thr Ala Thr Ser Leu Asp Phe Pro Ala Leu Cys Val Leu Lys Leu Ser Ala Gln Tyr Gly Ser Ile Arg Lys Asn Ala
                                                      Ser Leu                                     Leu
```

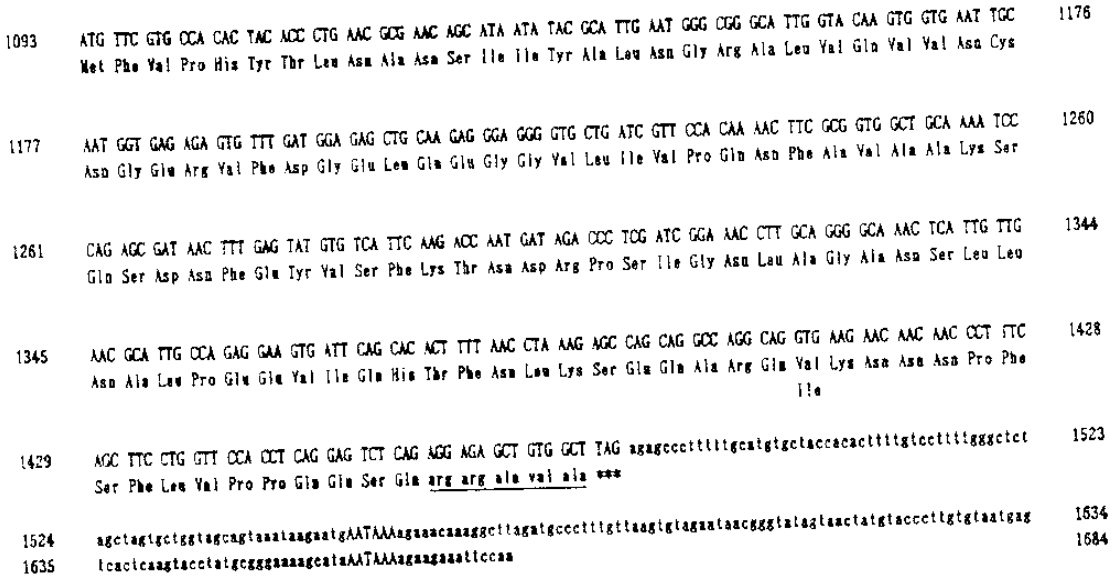


Figure 3. Nucleotide sequence of the glycinin A2B1a cDNA clone. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence are shown. Parts of polypeptides processed out post-translationally are shown as shadows. N-terminal part of the open reading frame corresponds to the A2-polypeptide and C-terminal part to the B1a-polypeptide.

여겨진다. 3′ 부위에는 211 bp의 non- coding sequences가 존재하고 polyadenylation signal인 AATAAA도 존재하는 것으로 보아 이 clone의 3′ 끝은 실제 유전자의 끝부분임을 알 수 있었다.

다. Glycinin genomic 유전자의 분리

Glycinin genomic 유전자를 분리하기 위하여 대두 genomic library를 합성하였다. 대두 잎에서 total genomic DNA를 분리한 후 Sau3A 제한효소로 부분절단한 후 EMBL 3 vector에 삽입하고 in vitro packaging 하여 library를 합성하였다. 이 유전자 은행은 앞으로도 대두의 다른 genomic 유전자를 분리하는데 매우 유용하게 활용할 수 있다. 이 유전자 은행에서 pG1A1S를 probe로 사용하여 plaque hybridization에 의해 Glycinin 유전자를 가지고 있는 phage를 분리하고 G47이라 명명하였다. 이 clone으로부터 phage DNA를 분리한 후 EcoRI, BamHI, SalI, 그리고 이들의 조합인 E+B, E+B, B+S등으로 각각 처리하여 agarose 전기영동을 실시하였다 (Figure 4). 이 clone이 glycinin gene을 가지고 있는지 그리고 그 부위를 확인 규명하기 위해서 pG1A1L 및 pG1A1S을 이용하여 Southern blotting을 실시하였다 (Figure 5, Figure 6). 이 clone의 전체 insert size는 약 15 kbp 정도이며 signal을 나타내는 각 band 들의 pattern 및 크기로 보아서 이 clone은 glycinin A2B1a subunit을 code하는 유전자를 포함하여 이와 염기서열이 유사한 다른 glycinin 유전자를

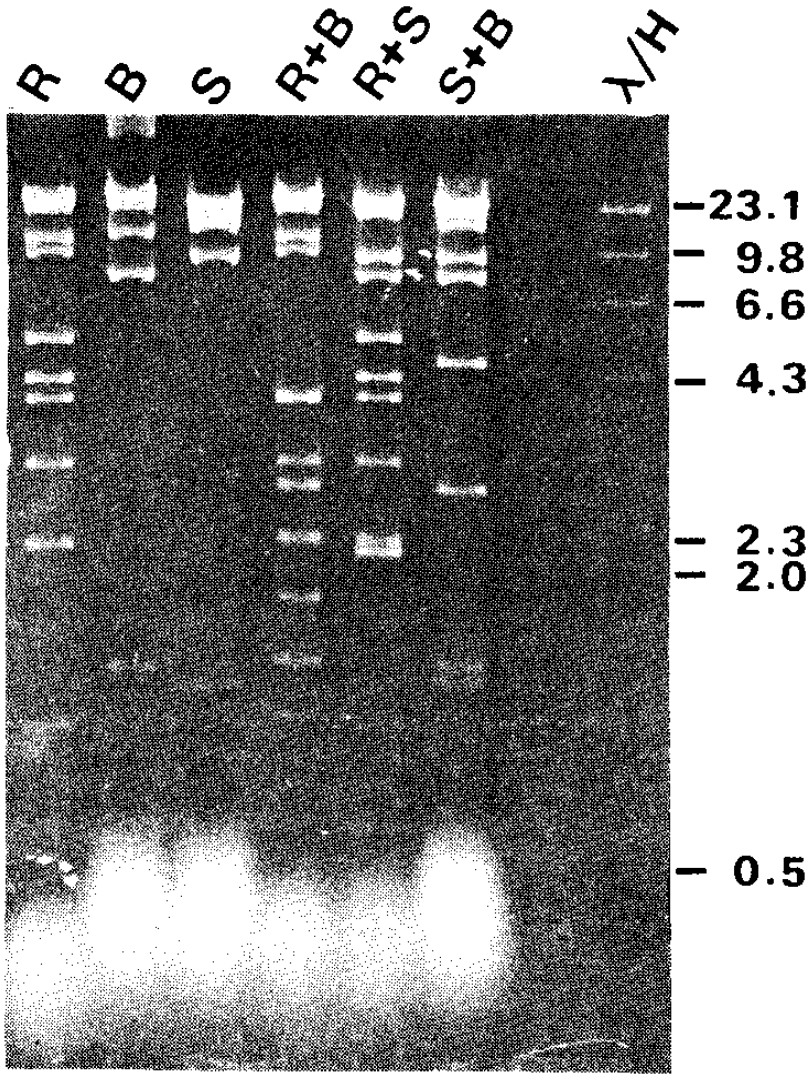


Figure 4. Restriction fragments analysis of the genomic clone encoding glycinin subunit. Recombinant phage DNA was subjected to the digestion with restriction enzyme and analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis.

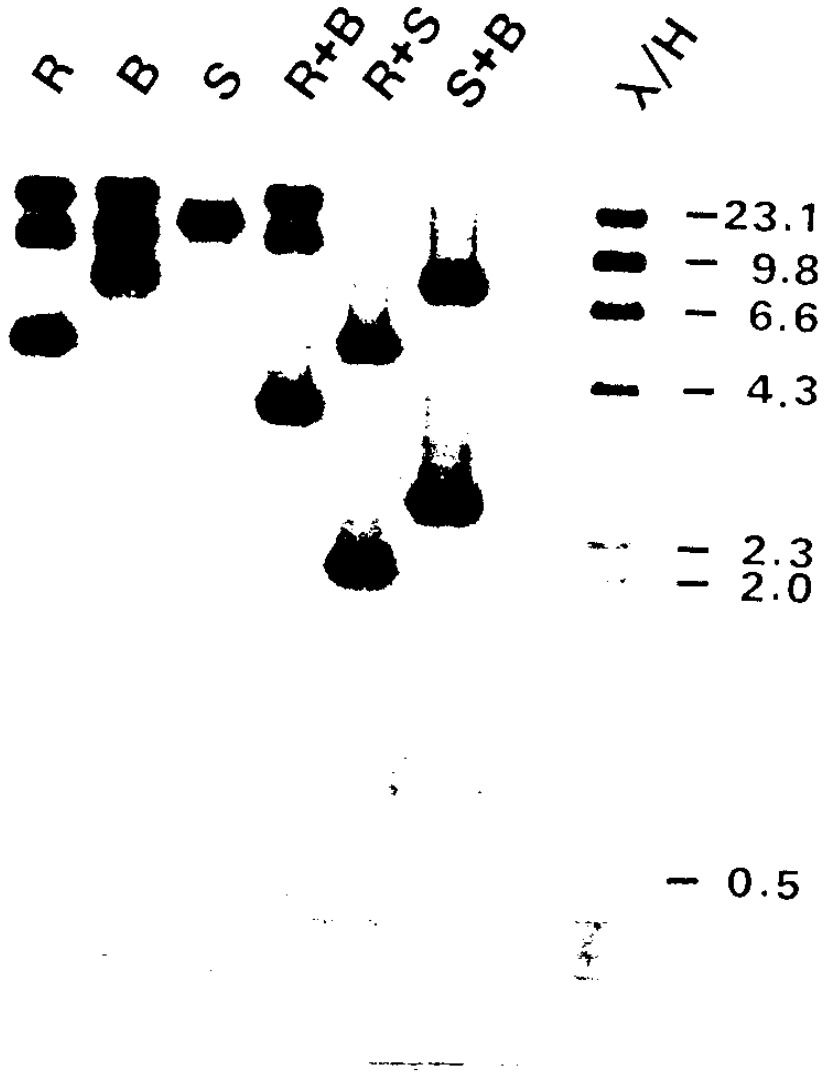


Figure 5. Southern blot analysis of the genomic clone encoding glycinin subunit. Restriction fragments of Figure 4 was analyzed by Southern blot with the cDNA fragment encoding C-terminal of A2B1a.

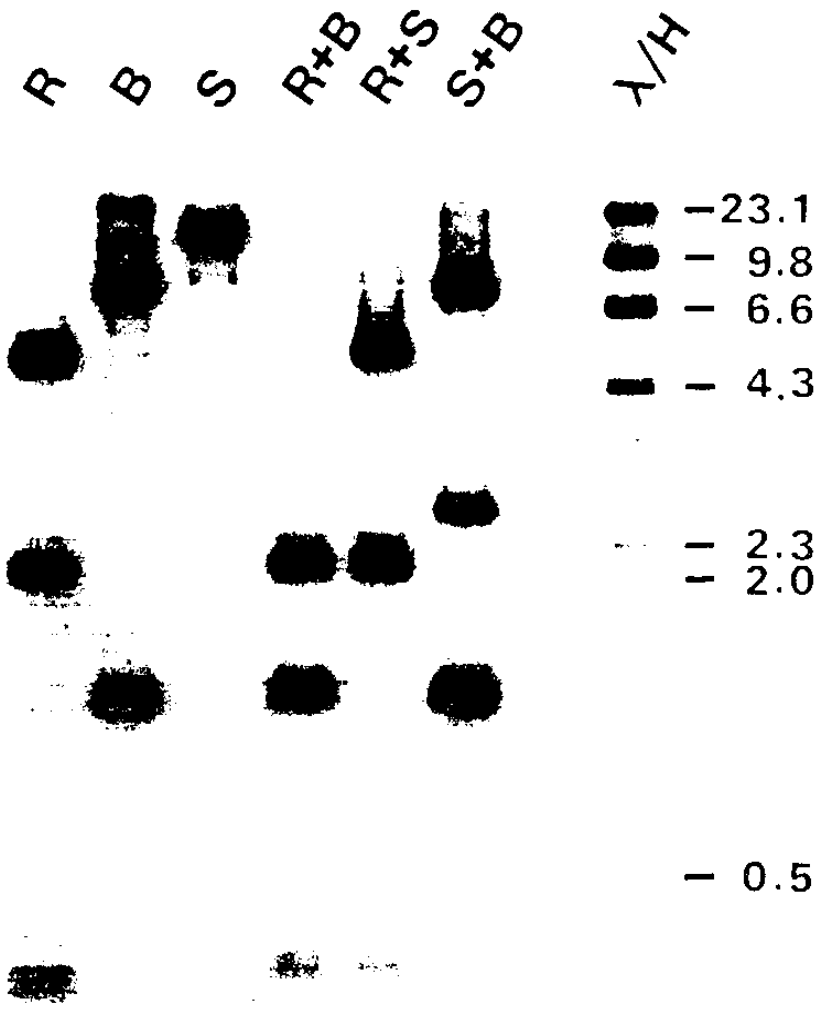


Figure 6. Southern blot analysis of the genomic clone encoding glycinin subunit. Restriction fragments of Figure 4 was analyzed by Southern blot with the cDNA fragment encoding N-terminal of A2B1a.

가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 hydridization 조건을 변화시켜 가며 Southern blotting 에 의해 유전자 지도를 작성한 결과는 Figure 7 에 나타난 바와 같으며 이 clone G47 은 두개의 glycinin 유전자 Gy1 과 Gy2 가 나란히 배열되어 있는 것을 알 수 있었다.

라. Glycinin A2B1a 유전자의 조절 부위 구조

Glycinin 유전자의 발현 조절 메카니즘을 연구하고자 glycinin A2B1a 를 code 하는 Gy2 유전자의 promoter region을 분리하였다. G47 DNA를 BamHI과 HindIII로 double digestion한 후 약 400 bp의 DNA를 분리하여 pBH400이라 명명하였다. 이 subclone 의 염기서열을 결정한 결과는 Figure 8 과 같다. pBH400은 glycinin Gy2 유전자 의 promoter region을 포함하고 있는데 transcription initiation site인 +1 site를 기준으로 하였을 경우 약 -330 bp 위치에서 부터 translation initiation site와 아미노산 4개를 code하는 위치까지를 포함하고 있다. 그러므로 pBH400은 glycinin A2B1a의 유전자 발현을 조절하는 부위에 포함될 것으로 생각되어진다. 진핵세포 유전자에서 공통으로 존재하는 TATA box와 유사 CAT box가 존재하며 종자 단백질 유전자에서 발견되는 RY repeat (CATGCAT)가 한번, HAACACAMH가 두번 존재하고 legumin consensus sequence가 한번, embryo factor binding sequence가 3번 존재하였다. 이외에도 SV40 enhancer sequence (GTGGWWWG)가 5번 반복하고 conglycinin enhancer (AVCCCA)가 5번

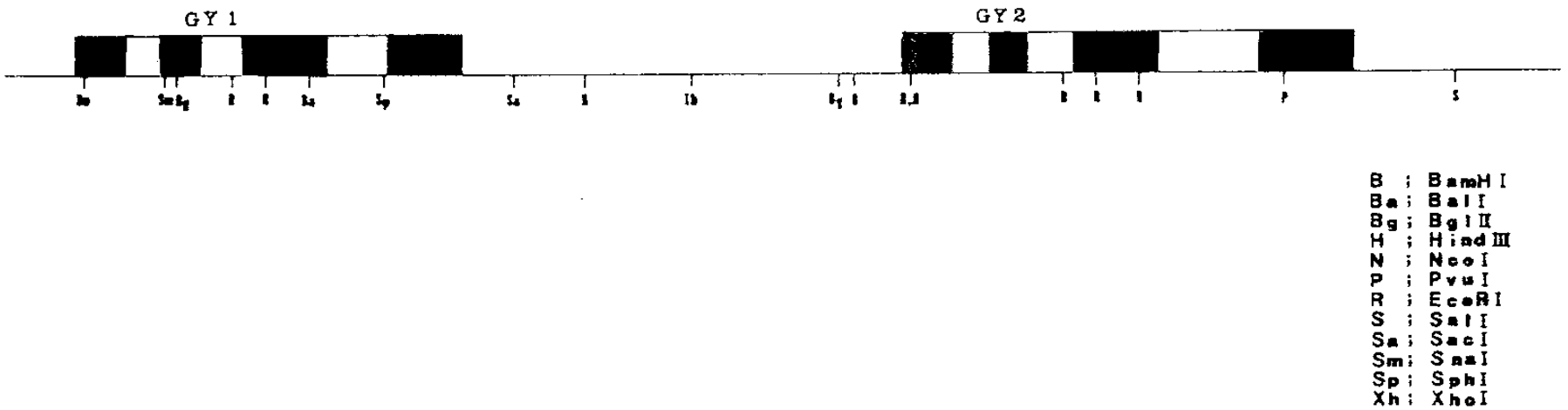


Figure 7. Structure and restriction fragment mapping of the clone G47 encoding glycinin gene, Gy1 and Gy2.

; pBH400
; 5′ UPSTREAM REGION OF GLYCININ GY2

-328 GGATCCCATCTATTGTCACACGGTGTATTATATAATTTCATATGTCATAAACC -276

-275 CGCCGAACATGAAATGAAAGCATTGTCCCCCTCTCCACCAGCGTTTTCTGGCAAT -221

-220 TGCATGCAATACAAACACACTTGGTATTTGTCACATAATGTTGATGTCGAACTGT -166

-165 CGAAGCCACCTCACACCCATGAACTTAATGAGGTGTAACACACAAGGCTTCCATA -111

-110 GCCATGCATACTGAAGAATGTCTCAAGCTCAGCACCCCACTCCTGTGACGTGTCC -56

-55 CTCACCCACCTTCCTCTCTTCCCTATAAATAACCACGCCTCAGGTTCTCCGCTTC -1

+1 ACAACACAAACATTCTCTCCATTGTCTTTGAACACTCATCACC ATG GCC AAG CTT
Met Ala Lys Leu

Figure 8. Nucleotide sequence of the genomic clone of glycinin subunit A2B1a, Gy2. The 5' flanking region of the gene is shown. Nucleotide numbering starts from transcriptional initiation site, +1, and to backward. Several consensus sequence elements are noted.

반복하였다. 그러나 동시에 vicilin consensus sequence (GCCACCTC)가 존재하기도 한다 (Table 3). 그러나 이러한 인식 부위는 그 자체로서는 그리 큰 의미를 지니지 못하며 이러한 조절 인자의 기능을 검정하기 위하여 transgenic plant를 이용한 in vivo 실험이 계속되어야 할 것이다.

마. Glycinin Gy1 유전자의 구조

대두의 주된 저장단백질 glycinin 을 code 하는 genomic 유전자 Gy1 의 염기 서열과 그 구조는 Figure 9와 같다. 본 연구에서 분리한 clone 은 5′ 쪽에 1041bp의 유전자 발현 조절 부위를 포함한 non-coding 부위와 3′ 쪽에 731bp 의 terminator 부위 를 포함한 non-coding 부위 그리고 그 중간에 2386bp 의 coding 부위로 이루어져 있다. Coding 부위는 4 개의 exon 과 3 개의 intron 으로 이루어져 있다. Exon 들의 길이는 각각 338, 254, 558, 593 bp 로 95, 85, 186, 129 개의 아미노산을 code 함으로 모두 495개의 아미노산을 code 한다. Intron 들의 길이는 각각 228, 291, 381bp 로 이루어져 있으며 exon 과 intron junction 은 GT/AG 로 consensus sequence 와 일치하였다. 5′ 부위는 진핵세포 유전자의 promoter 에 해당하는 TATAAT 와 GAAG box 를 포함하여 Table 3 에서 지적한 바와 같이 Gy2 에서와 마찬가지로 여러가지 조절 인자들을 포함하고 있다. 3′ 부위는 polyadenylation signal 을 포함하고 있어서 역시 진핵세포

Table 3. Sequence elements found in glycinin gene Gy2

sequence	position	characteristics	references
CATGCAT (CATGCAT)	-105	seed protein specific	Dickinson et al. 1988
AAACACACT TAACACACA (HAACACAMH)	-204 -126	seed protein specific	Goldberg 1986
TCCATAGCCATGCA TACTGAAGAATGTC (TCCATAGCCATGCA TGCTGAAGAATGTC)	-109	legumin box	Gatehouse et al. 1986
GCCACCTC (GCCACCTC)	-158	vicilin box	Gatehouse et al. 1986
ATCCCA AACCCG CCCCCT CACCCA ACCCCA (AVCCCA)	-324 -276 -246 -149, -50 -74	conglycinin enhancer	Chen et al. 1986
TATT ATATAA AATTTCAT AT AACTTAATGAG (AATTTAATTAA)	-299 -291 -140	embryo factor binding	Jofuku et al. 1987
GTGTATTA TTGGTATT GAGGTGTA GTGTAACA GTGACGTG (GTGGWWWG)	-303 -196 -133 -129 -63	SV 40 enhancer	Weiher et al. 1983
TATAAAT (TATAAAT)	-29	TATA Box	Proudfoot 1979
GAAT (GAAT)	-94	AGGA Box	Messing et al. 1982
CACCAUGGC (AACAAUGGC)	+45	translation initiation	Lutcke et al. 1987

Sequence: b: GY1 Range: 1 4158

1 TAT ATA TTT TTC TAT TTT CAA AGA AGT AAA TCA TGA GCT TTT 42

43 CCA ACT CAA CAT CTA TTT TTT TTC TCT CAA CCT TTT TCA CAT 84

85 CTT AAG TAG TCT CAC CCT TTA TAT ATA TAA CTT ATT TCT TAC 126

127 CTT TTA CAT TAT GTA ACT TTT ATC ACC AAA ACA AAC AAC TTT 168

169 AAA ATT TTA TTA AAT AGA CTC CAC AAG TAA CTT GAC ACT CTT 210

211 ACA TTC ATC GAC ATT AAC TTT TAT CTG TTT ATA AAT ATT ATG 252

253 TGA TAT AAT TTA ATC AAA ATT AAC CAC AAA CTT TCA TAA AAG 294

295 GCC TTA TAA GCA TGC ATT TAA TAA GCA AAA ACA ACT CAA TCA 336

337 CTT TCA TAT AGG AGG TAG CCT AAG TAC GTA CTC AAA ATG CCA 378

379 ACA AAT AAA AAA AAA GTT GCT TTA ATA ATG CCA AAA CAA ATT 420

421 AAT AAA ACA CTT ACA ACA CCG GAT TTT TTT TAA TTA AAA TGT 462

463 GCC ATT TAG GAT AAA TAG TTA ATA TTT TTA ATA ATT ATT TAA 504

505 AAA GCC GTA TCT ACT AAA ATG ATT TTT ATT TGG TTG AAA ATA 546

547 TTA ATA TGT TTA AAT CAA CAC AAT CTA TCA AAA TTA AAC TAA 588

589 AAA AAA AAT AAG TGT ACG TGG TTA ACA TTA GTA CAG TAA TAT 630

631 AAG AGG AAA ATG AGA AAT TAA GAA ATT GAA AGC GAG TCT AAT 672

673 TTT TAA ATT ATG AAC CTG CAT ATA TAA AAG GAA AGA AAG AAT 714

715 CCA GGA AGA AAA GAA ATG AAA CCA TGC ATG GTN CCC TCG TCA 756

757 TCA CGA GTT TCT GCC ATT TGC AAT AGA AAC ACT GAA ACA CCT 798

799 TTC TCT TTG TCA CTT AAT TGA GAT GCC GAA GCC ACC TCA CAC 840

841 CAT GAA CTT CAT GAG GTG TAG CAC CCA AGG CTT CCA TAG CCA 882

883 TGC ATA CTG AAG AAT GTC TCA AGC TCA GCA CCC TAC TTC TGT 924

925 GAC GTT GTC CCT CAT TCA CCT TCC TCT CTT CCC TAT AAA TAA 966

967 CCA CGC CTC AGG TTC TCC GCT TCA CAA CTC AAA CAT TCT CCT 1008

1009 CCA TTG GTC CTT AAA CAC TCA TCA GTC ATC ACC ATG GCC AAG 1050
MET Ala Lys

1051 CTA GTT TTT TCC CTT TGT TTT CTG CTT TTC AGT GGC TGC TGC 1092
Leu Val Phe Ser Leu Cys Phe Leu Leu Phe Ser Gly Cys Cys

1093 TTC GCT TTC AGT TCC AGA GAG CAG CCT CAG CAA AAC GAG TGC 1134
Phe Ala Phe Ser Ser Arg Glu Gln Pro Gln Gln Asn Glu Cys

1135 CAG ATC CAA AAA CTC AAT GCC CTC AAA CCG GAT AAC CGT ATA 1176
Gln Ile Gln Lys Leu Asn Ala Leu Lys Pro Asp Asn Arg Ile

1177 GAG TCA GAA GGA GGG CTC ATT GAG ACA TGG AAC CCT AAC AAC 1218
Glu Ser Glu Gly Gly Leu Ile Glu Thr Trp Asn Pro Asn Asn

1219 AAG CCA TTC CAG TGT GCC GGT GTT GCC CTC TCT CGC TGC ACC 1260
Lys Pro Phe Gln Cys Ala Gly Val Ala Leu Ser Arg Cys Thr

1261 CTC AAC CGC AAC GCC CTT CGT AGA CCT TCC TAC ACC AAC GGT 1302
Leu Asn Arg Asn Ala Leu Arg Arg Pro Ser Tyr Thr Asn Gly

1303 CCC CAG GAA ATC TAC ATC CAA CAA GGT CCA TCT TGT CCA AAC 1344
Pro Gln Glu Ile Tyr Ile Gln Gln G

1345 TTC ACA TAT AAA TAT ATA ATA GAC TTA AAT ATG TTT AAG GGT 1386

1387 TTG ATA AAT GAG GGA ATT TTA TTT TAG ATT TTT AAT AAT TTT 1428

1429 TTT TGT TTT GAG TTT TTA TAT ATT AAA ATT TTT GTT TTG ATT 1470

1471 TCT TCC ATA TGA CGT AAC ATA ATC ATA TCA TTG ATA ATG TTG 1512

1513 GGT TCC TAA TTT TTG TTT GTT TGT TGT TTT GTA ATA TGA ATA 1554

1555 GGT AAG GGT ATT TTT GGC ATG ATA TAC CCG GGT TGT CCT AGC 1596
ly Lys Gly Ile Phe Gly MET Ile Tyr Pro Gly Cys Pro Ser

1597 ACA TTT GAA GAG CCT CAA CAA CCT CAA CAA AGA GGA CAA AGC 1638
Thr Phe Glu Glu Pro Gln Gln Pro Gln Gln Arg Gly Gln Ser

1639 AGC AGA CCA CAA GAC CGT CAC CAG AAG ATC TAT AAC TTC AGA 1680
Ser Arg Pro Gln Asp Arg His Gln Lys Ile Tyr Asn Phe Arg

```
1681 GAG GGT GAT TTG ATC GCA GTG CCT ACT GGT GTT GCA TGG TGG      1722
     Glu Gly Asp Leu Ile Ala Val Pro Thr Gly Val Ala Trp Trp

1723 ATG TAC AAC AAT GAA GAC ACT CCT GTT GTT GCC GTT TCT ATT      1764
     MET Tyr Asn Asn Glu Asp Thr Pro Val Val Ala Val Ser Ile

1765 ATT GAC ACC AAC AGC TTG GAG AAC CAG CTC GAC CAG ATG CCT      1806
     Ile Asp Thr Asn Ser Leu Glu Asn Gln Leu Asp Gln MET Pro

1807 AGG GTG AGC CAC ATA GCA ATA TTA GAT ATT ATA ATT CTT TAA      1848
     Arg

1849 AGG TTT AAA TAT CAT TTT AGT TCG TGG AGT TGC ACT TTC TAA      1890

1891 TTT AGT ACC TAT AGA TTA AAA TAT GCC AAT TGA ATG ATC CTT      1932

1933 ATA GTT GTG TTT TTT TAT CCA ATT TGG TTC TTG TCT TGA AAT      1974

1975 AAA TGG ACA ATA TTG TAG CTG ATA AAA AAA GGA AAC TGG ACT      2016

2017 ACA TTG TAA CGT TAA GAT TAG AAT TCT TAA GTT CTA ATA CTA      2058

2059 GCT GGT TAC AGA TTG ACA ACT ATT TGT TTT GAC AAT TCT TGG      2100

2101 CAG AGA TTC TAT CTT GCT GGG AAC CAA GAG CAA GAG TTT CTA      2142
          Arg Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu

2143 AAA TAT CAG CAA GAG CAA GGA GGT CAT CAA AGC CAG AAA GGA      2184
     Lys Tyr Gln Gln Glu Gln Gly Gly His Gln Ser Gln Lys Gly

2185 AAG CAT CAG CAA GAA GAA GAA AAC GAA GGA GGC AGC ATA TTG      2226
     Lys His Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Gly Ser Ile Leu

2227 AGT GGC TTC ACC CTG GAA TTC TTG GAA CAT GCA TTC AGC GTG      2268
     Ser Gly Phe Thr Leu Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Ser Val

2269 GAC AAG CAG ATA GCG AAA AAC CTA CAA GGA GAG AAC GAA GGG      2310
     Asp Lys Gln Ile Ala Lys Asn Leu Gln Gly Glu Asn Glu Gly

2311 GAA GAC AAG GGA GCC ATT GTG ACA GTG AAA GGA GGT CTG AGC      2352
     Glu Asp Lys Gly Ala Ile Val Thr Val Lys Gly Gly Leu Ser

2353 GTG ATA AAA CCA CCC ACG GAC GAG CAG CAA CAA AGA CCC CAG      2394
     Val Ile Lys Pro Pro Thr Asp Glu Gln Gln Gln Arg Pro Gln
```

```
2395 GAA GAG GAA GAA GAA GAA GAG GAT GAG AAG CCA CAG TGC AAG      2436
     Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Lys Pro Gln Cys Lys

2437 GGT AAA GAC AAA CAC TGC CAA CGC CCC CGA GGA AGC CAA AGC      2478
     Gly Lys Asp Lys His Cys Gln Arg Pro Arg Gly Ser Gln Ser

2479 AAA AGC AGA AGA AAT GGC ATT GAC GAG ACC ATA TGC ACC ATG      2520
     Lys Ser Arg Arg Asn Gly Ile Asp Glu Thr Ile Cys Thr MET

2521 AGA CTT CGC CAC AAC ATT GGC CAG ACT TCA TCA CCT GAC ATC      2562
     Arg Leu Arg His Asn Ile Gly Gln Thr Ser Ser Pro Asp Ile

2563 TAC AAC CCT CAA GCC GGT AGC GTC ACA ACC GCC ACC AGC CTT      2604
     Tyr Asn Pro Gln Ala Gly Ser Val Thr Thr Ala Thr Ser Leu

2605 GAC TTC CCA GCC CTC TCG TGG CTC AGA CTC AGT GCT GAG TTT      2646
     Asp Phe Pro Ala Leu Ser Trp Leu Arg Leu Ser Ala Glu Phe

2647 GGA TCT CTC CGC AAG GTA CGT ACA TCA TTC ATC AAA GAT CAA      2688
     Gly Ser Leu Arg Lys

2689 CAT ACA TTT ATA CAT TAA ACT AAT ATT TGT TGC CAA ATA TTT      2730

2731 ATT AAT TTT ATT GAT AAT TAA TTT TTT TAG AAA ATT TGT TTG      2772

2773 ATC ACT TTT AAT GGA GTC TTT CAT CTT AAT TAC ATT ATT TAT      2814

2815 ACT TAG ACT AAT GAT TTA TTG ATT AAT AAT AAT CTT AGA TAC      2856

2857 ACT ATA AAA TGT GTG ACG GAG TTA TCT TAA CAC TTG CAT GGA      2898

2899 TTC TAT CTT TTC TGT CTT TAT ATA TAG AAA TAG AGA GAA AAA      2940

2941 AAA AGA AAA GAT TGA TGA AAA AAG CAA AAC AAA AAA TAG TAT      2982

2983 TAT TAT AAA AAT ATT GGA TGA ATT TGT TGT TGA CTC TTG CAT      3024

3025 GCA TTG ATG TAC GAT GCA GAA TGC AAT GTT CGT GCC ACA CTA      3066
                                Asn Ala MET Phe Val Pro His Tyr

3067 CAA CCT GAA CGC GAA CAG CAT AAT ATA CGC ATT GAA TGG ACG      3108
     Asn Leu Asn Ala Asn Ser Ile Ile Tyr Ala Leu Asn Gly Arg

3109 GGC ATT GAT ACA AGT GGT GAA TTG CAA CGG TGA GAG AGT GTT      3150
     Ala Leu Ile Gln Val Val Asn Cys Asn Gly Glu Arg Val Phe
```

3151 TGA TGG AGA GCT GCA AGA GGG ACG GGT GCT GAT CGT GCC ACA 3192
Asp Gly Glu Leu Gln Glu Gly Arg Val Leu Ile Val Pro Gln

3193 AAA CTT TGT GGT GGC TGC AAG ATC ACA GAG TGA CAA CTT CGA 3234
Asn Phe Val Val Ala Ala Arg Ser Gln Ser Asp Asn Phe Glu

3235 GTA TGT GTC ATT CAA GAC CAA TGA TAC TCC CAT GAT CGG CAC 3276
Tyr Val Ser Phe Lys Thr Asn Asp Thr Pro MET Ile Gly Thr

3277 TCT TGC AGG GGC AAA CTC ATT GTT GAA CGC ATT ACC AGA GGA 3318
Leu Ala Gly Ala Asn Ser Leu Leu Asn Ala Leu Pro Glu Glu

3319 AGT GAT TCA GCA CAC TTT CAA CCT AAA AAG CCA GCA GGC CAG 3360
Val Ile Gln His Thr Phe Asn Leu Lys Ser Gln Gln Ala Arg

3361 GCA GAT AAA GAA CAA CAA CCC TTT CAA GTT CCT GGT TCC ACC 3402
Gln Ile Lys Asn Asn Asn Pro Phe Lys Phe Leu Val Pro Pro

3403 TCA GGA GTC TCA GAA GAG AGC TGT GGC TTA GAG CCC TTT TTG 3444
Gln Glu Ser Gln Lys Arg Ala Val Ala TER

3445 TAT GTG CTA CCC CAC TTT TGT CTT TTT GGC AAT AGT GCT AGC 3486

3487 AAC CAA TAA ATA ATA ATA ATA ATA ATG AAT AAG AAA ACA AAG 3528

3529 GCT TTA GCT TGC CTT TTG TTC ACT GTA AAA TAA TAA TGT AAG 3570

3571 TAC TCT CTA TAA TGA GTC ACG AAA CTT TTG CGG GAA TAA AAG 3612

3613 GAG AAA TTC CAA TGA GTT TTC TGT CAA ATC TTC TTT TGT CTC 3654

3655 TCT CTC TCT CTC TTT TTT TTT TCT TTC TTC TGA GCT TCT TGC 3696

3697 AAA ACA AAA GGC AAA CAA TAA CGA TNG GTC CAA TGA TAG TTA 3738

3739 GCT TGA TCG ATG ATA TCT TTA GGA AGT GTT GGC AGG ACA GGA 3780

3781 CAT GAT GTA GAA GAC TAA AAT TGA AAG TAT TGC AGA CCC AAT 3822

3823 AGT TGA AGA TTA ACT TTA AGA ATG AAG ACG TCT TAT CAG GTT 3864

3865 CTT CAT GAC TTG GAG CTC AAC CCA ACT TGG AAA GTT CGA GAG 3906

3907 TAT TTG GAC CAT TGT GCT TTG TGT CTT CAA ACA TAA AAC ATC 3948

3949 GCT CCA AAT TTA ACA TGG GAG CTA AAA ATG TGT TTT TCT GGG 3990

```
3991 ATT TTA ATT TTC AAC AGA GTC AAG GAT GGT GTT GCA TAT GAT 4032

4033 GTC TTG ATG TCC ATT GTC CAC ACT AAA TAG ATA TTG GTT TCA 4074

4075 AGA AAT ATT AAT TTC ATT TTC TGA CTT TCA ATT CAT AAA CCT 4116

4117 TAA ACG AAT ATT AAT TTA AAT CTA TCC TCA AAT GAT AAA TTT 4158
```

Figure 9. Nucleotide sequence of the genomic clone of glycinin subunit A1aBx, Gy1. Deduced amino acid sequence is shown.

유전자의 일반적인 구조와 일치한다. 따라서 이들 5′ 조절 부위와 3′ 종결 부위를 활용하면 목적하는 유전자를 대두 저장단백질 glycinin 과 같이 매우 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 것으로 기대한다. 따라서 목적하는 유전자들을 이들 조절 부위 사이에 삽입할 수 있도록 유전자 운반체를 재조합하고 있다. 물론 이 재조합 유전자는 식물의 형질 전환에 직접 활용할 수 있도록 식물 형질 전환용 운반체 pGA482 에 삽입하도록 한다.

제 2 절 인공 유전자의 합성

가. 필수 아미노산을 code하는 oligonucleotide의 design

단백질의 아미노산 함량은 단백질을 code하는 유전자에 의해 결정된다. 두류및 곡류의 저장 단백질에 결핍되어 있는 필수아미노산을 code하는 유전자를 인공적으로 합성하여 대두에 도입시키거나 기존의 대두 저장단백질 유전자에 삽입시킴으로서 대두 단백질 유전자를 변형시키면 합성되는 단백질의 필수 아미노산 조성을 강화시킬 수 있다. 이러한 목적으로 methionine, tryptophan, lysine을 code하는 36-mer의 oligonucleotide를 합성하였다 (Figure 10). Methionine과 tryptophan, lysine 이외에 aspartic acid는 neutral pH에서 lysine의 positive charge를 상쇄시키기 위하여 삽입하였다. 36-mer oligonucleotide를 vector에 cloning할 경우 거꾸로 삽입될 가능성을 배제하고 방향성을 주기 위하여 HindIII 제한효소 부위를 가진 oligonucleotide를 linker로서 합성하였으며 그 길이는 18-mer로 하였고 이에 대칭되는 oligonucleotide는 26-mer A를 사용하였다. Oligonucleotide들은 36-mer A, 여기에 대칭하는 36-mer B 그리고 18-mer B를 DNA synthesizer를 사용하여 합성하였다.

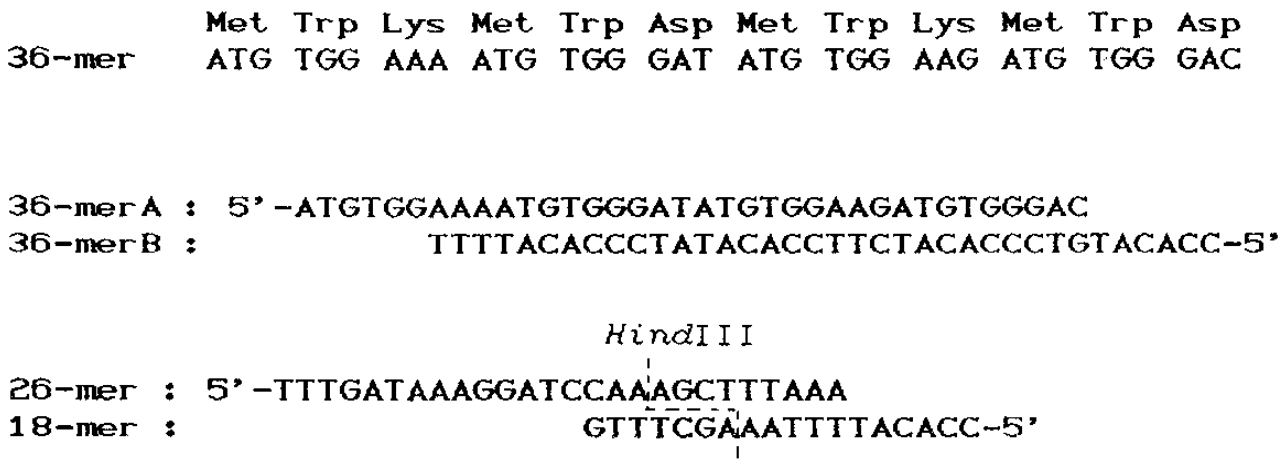


Fig. 10 DNA sequences chemically synthesized and used in the construction of repeating genes.

나. 필수 아미노산을 code하는 합성 oligonucleotide의 cloning

인공 합성한 DNA 의 cloning 방법은 Figure 11에 나타난 바와 같다. 합성된 36-merA, 36-merB, 26-merA, 18-merB를 T4 polynucleotide kinase로 phosphorylation한 후 각각의 AB DNA를 annealing하였다. 그 결과로 생긴 이중 가닥의 36-mer AB와 26-, 18-mer AB를 2:1 molar ratio로 혼합하여 5'- end에 26-,18-mer가 위치하고 36-mer AB가 일정한 reading frame을 유지하며 반복되게 하였다.

2% agarose gel electrophoresis 로 ligation 정도를 측정했을 때 36-mer AB가 1-5 unit로 반복된 DNA가 형성되었다 (Figure 12). 중합된 DNA를 E.coli DNA polymerase I의 Klenow fragment로 fill-in하고 HindIII를 사용하여 5'-end는 HindIII-cohesive end가 되게하였다. 이렇게 제작된 인공 DNA를 expression vector인 pHK414 plasmid의 HindIII와 SmaI으로 절단된 부위에 삽입한 다음 E.coli HB101에 형질전환 후 ampicillin 저항성 균주들의 DNA를 HindIII와 BamHI으로 이중 절단한 후 agarose gel 전기 영동으로 인공 DNA의 삽입 여부를 확인하였다. 그 결과 36-mer AB의 기본 단위가 1개, 2개, 3개로 삽입된 것으로 추정되는 형질전환체들이 선별되었다 (Figure 13).

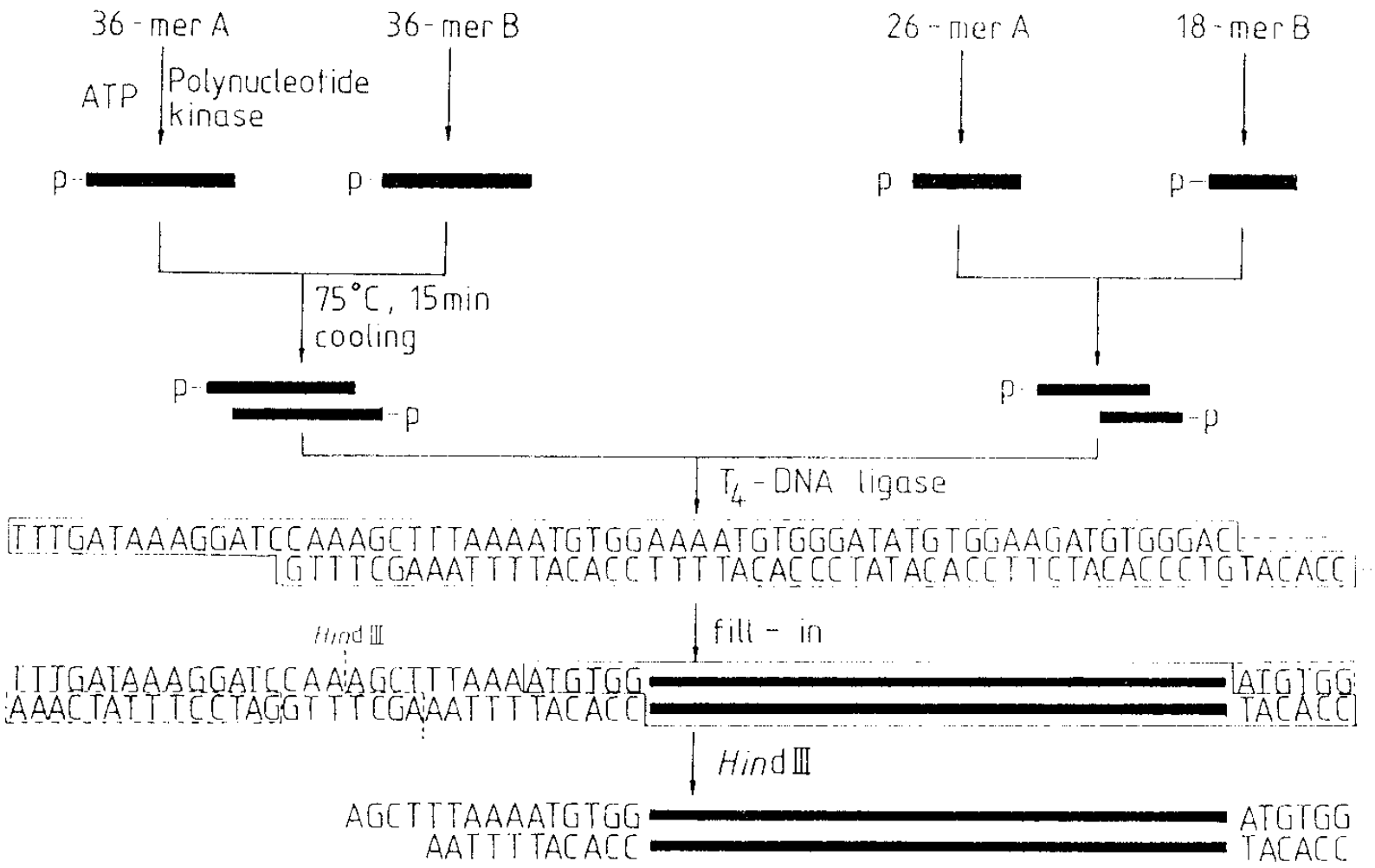


Fig 11 Schematic representation of construction of repeating genes.

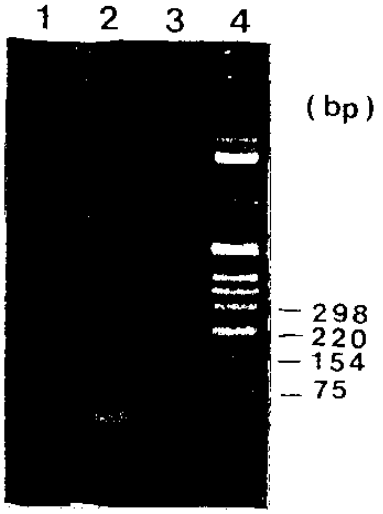


Fig. 12 . 2% agarose gel electrophoresis of annealing and ligation mixture.

Lane 1 : annealed 26mer : 18 mer

2 ; annealed 36 mer A:B

3 ; ligation mixture of 26 mer,18 mer and 36 mer A B

4 ; Size marker (pBR322/ HinfI)

Fig.13. Restriction enzyme analysis of cloned DNA. DNAs were double digested with HindIII and BamHI.

Lane 1 ; Size marker (pBR322/HinfI)
2 ; Clone No.1 (insertion of 1 basic 36mer unit)
3 ; Clone No.2 (insertion of 2 basic 36mer uint)
4 ; Clone No.3 (insertion of 3 basic 36mer unit)

다. Cloning된 인공 합성 DNA의 DNA 염기서열의 확인

반복적인 DNA 서열을 갖고 있는 인공합성 DNA들은 그 유전자들의 cloning 과정 중에 또는 숙주세포 내에서 유전자의 발현 시에 recA 숙주에서 조차 유전자의 결실, 삽입, 또는 single base change등이 일어날수 있다 (Sadler 1980; Zurauski et al 1986). 따라서 cloning된 인공합성 DNA가 목적한 바대로의 필수 아미노산의 유전정보를 code하도록 정확한 염기서열로 합성되었는지 또한 cloning과정 중에 유전자의 변이여부를 조사하기 위하여 DNA 염기서열을 dideoxy sequencing 방법으로 결정하였다 (Figure 14). DNA sequencing 결과 36 mer-AB의 기본단위가 1개 그리고 3개 삽입된 DNA들은 필수아미노산들의 유전정보를 정확하게 갖도록 합성되었으며 유전자의 결실이나 삽입등이 관찰되지 않았다. 그러나 36mer AB의 기본단위가 2개 삽입된 DNA (pMW2-1)는 36 mer 기본단위의 접합부위에서 6개 아미노산에 해당하는 18 bp의 결실이 일어났고 또한 하나의 AAG (Lys) code가 CAG (Gln)로 변이된 A - C로의 transversion이 일어났다 (Figure 15). 그러나 pMW2-1 DNA의 경우에도 translational reading frame에는 변화가 없었다. 따라서 다음 단계에서는 36 mer 기본 단위가 3개 삽입된 합성유전자에서 insert를 분리한 후 재 중합시켜서 더욱 길이가 긴 인공 유전자를 합성하여 대두 세포에 도입시키면 목적을 달성할 수 있으리라 여겨진다. 본 실험실에서 지금까지 다른 인공 유전자를 사용하여 연구한 바에 의하면 이들 인공 유전자는 미생물에서 매우 안정되게

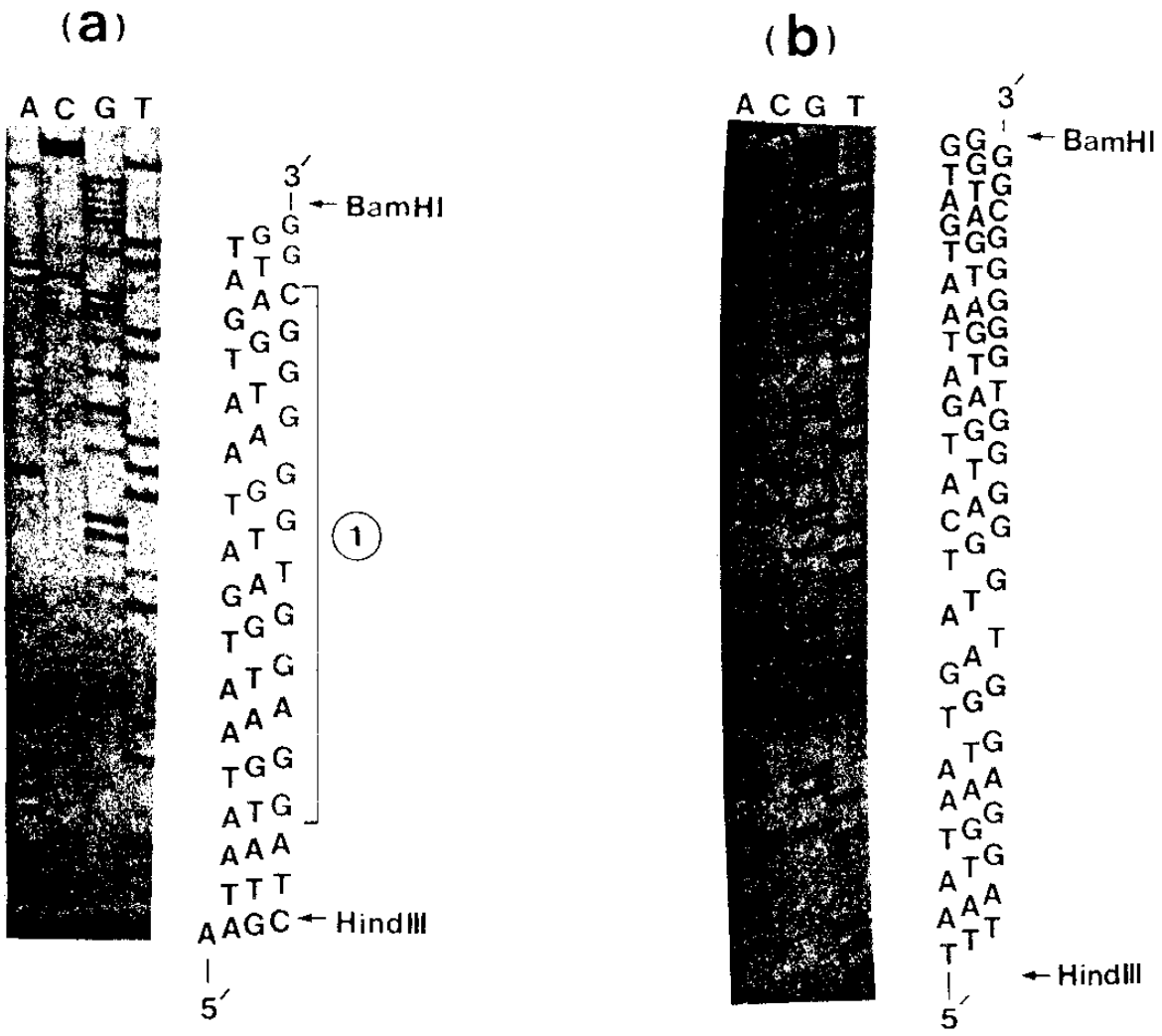


Fig.14. Autoradiogram of dideoxy sequencing of cloned DNAs in pUC18 electrophoresed on 6% sequencing gel.

(a) ; Nucleotide sequence of the clone No.1 (insertion of 1 basic 36mer unit)

(b) ; Nucleotide sequence of the clone No.2 (insertion of 2 basic 36mer unit)

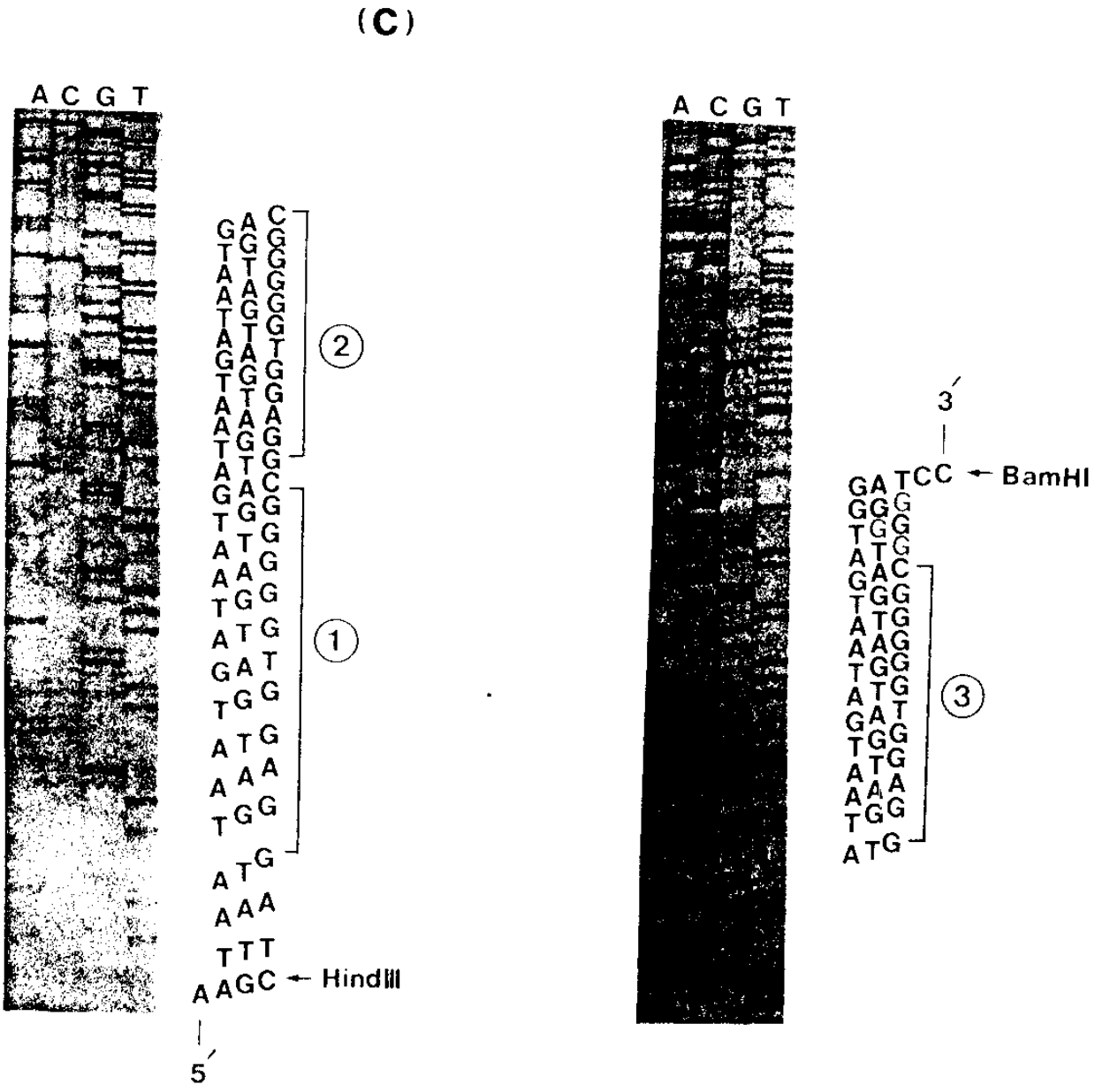


Fig. 14. Autoradiogram of dideoxy sequencing of cloned DNAs in pUC18 electrophoresed on 6% sequencing gel.

(c) ; Nucleotide sequence of the clone No.3 (insertion of 3 basic 36mer unit)

Insert DNA in (c) can be read from the left panel, yielding a total of 108 nucleotides.

Numbers indicate a basic 36mer unit.

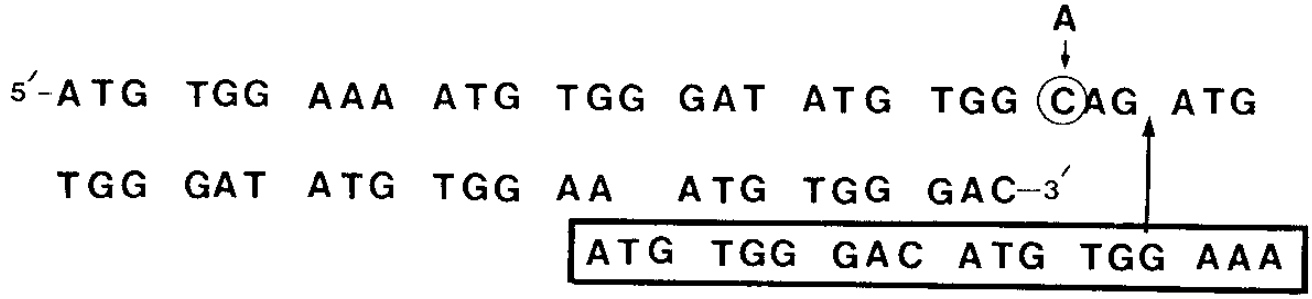


Fig.15. Nucleotide sequence of the clone No.2 in arrow-linked box indicate the partially deleted DNA sequences, and the nucleotide in a solid circle shows the transversion, A→C.

발현이 되는 것으로 나타났다.

라. Fusion protein으로서 인공단백질의 발현.

Expression vector인 pHK414 plasmid에 삽입된 인공DNA 주위의 유전자에는 5'-end 부위에는 lamda-cro gene이, 3'-end 부위에는 lacZ gene이 위치하고 있어 발현될 경우 cro-synthetic polypeptide-galactosidase로 이루어진 fusion protein이 만들어진다. 또한 이들의 발현은 lactose promoter인 lacUV5에 의하여 전사가 개시되며 lacIq 유전자의 산물인 repressor에 의해 그 발현이 억제된다. 앞서 선별한 재조합 DNA들을 lacIq 균주인 E.coli JM103에 형질전환 시킨후 beta-galactoside analogue인 isopropyl-beta-D-thiogalactoside (IPTG)를 최종농도 1mM로 첨가하여 발현을 유도하였다. SDS-PAGE로 발현산물을 분석한 결과, cro와 lacZ 유전자에 대하여 reading frame을 유지하고 있는 pHK412 plasmid는 cro-gal의 fusion protein이 발현되었으나, 본 실험에서 인공 합성 DNA의 cloning vector로서 사용된 pHK414 plasmid는 reading frame이 맞지 않으므로 발현되지 않았다. 한편 pHK414 plasmid에 cro와 lacZ유전자에 대해서 reading frame이 맞도록 인공합성 DNA가 cloning된 pMW1-1 (1 basic 36-mer unit), pMW2-1 (mutated 2 basic 36-mer unit) 그리고 pMW3-1 (3 basic 36-mer unit) 재조합 DNA들은 cro-synthetic polypeptide-gal의 fusion protein이 발현되었고, 그 대략적인 분자량은 DNA

염기서열로부터 각각 118,800, 119,400, 121,400 daltons으로 계산되었다 (Figure 16). 이상의 결과들로부터 methionine, tryptophan, lysine등의 필수 아미노산을 code하는 인공 유전자를 합성하여 합성된 유전자가 생체내에서 lacZ 유전자와 fusion protein으로 정상적으로 발현된다는 사실을 앞으로 이 유전자를 식물의 수퍼 저장 단백질 유전자의 일부로써 집합하여 그 집합 유전자를 식물체 내에서 발현 시킴으로서 식물 저장단백질의 필수 아미노산 수준을 증가시키는데 이용될 수 있으리라고 사려된다.

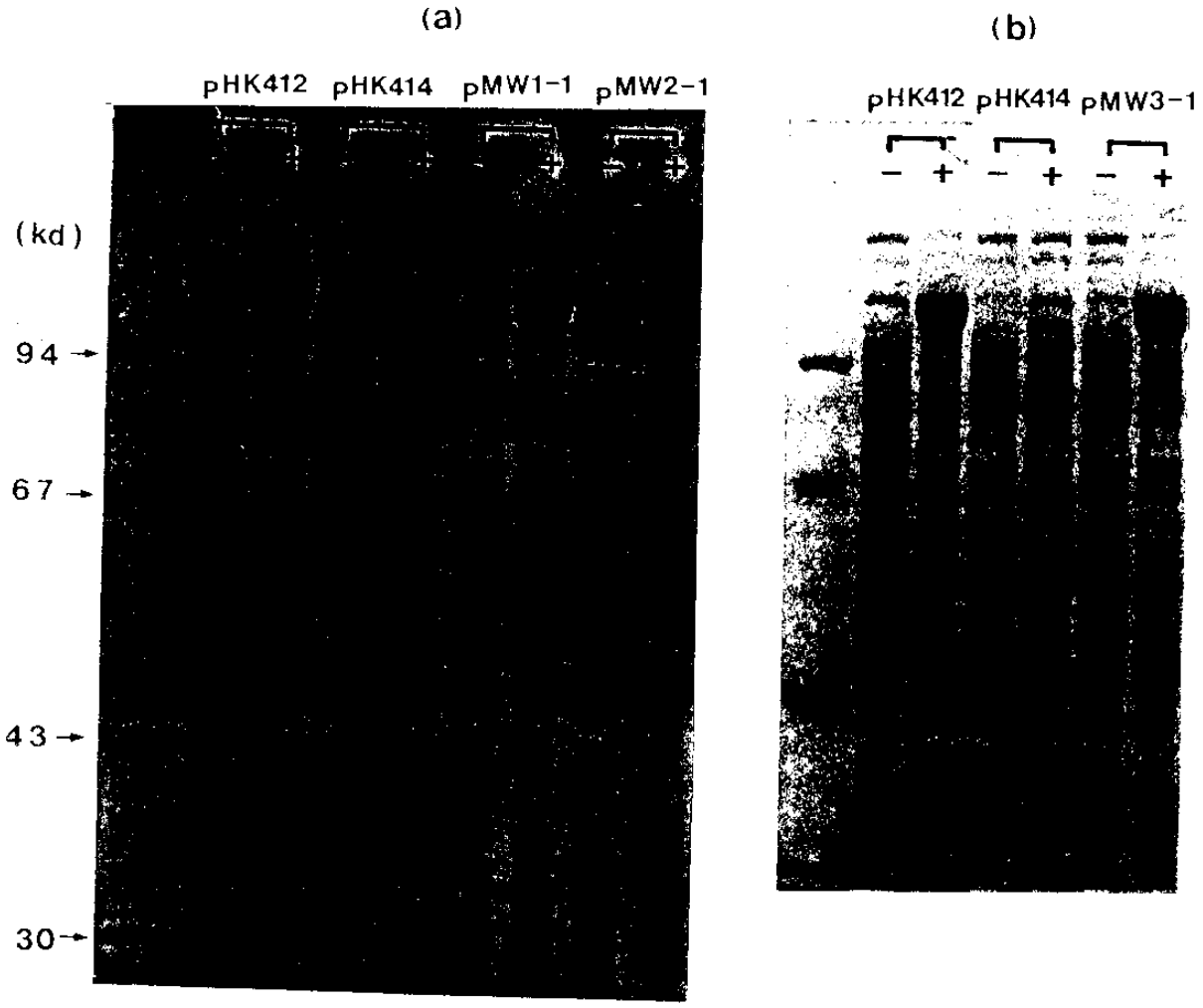


Fig.26. Visualization of Cro-Synthetic polypeptide-β-galactosidase fusion protein. Overnight cultures of E.coli JM103 were diluted 1/50 with LB containing ampicillin(50ug/ml). IPTG was added to final concentration of 1mM and incubation continued for 5hours at 37°C. Whole cells extracts of uninduced(-) and induced(+) were analized by 7.5% SDS-PAGE. In (a) panel,pMW2-1 containing mutated synthetic DNAs is also expressed in the same translational reading frame of the Cro-lacI/Z sequences as shown nucleotide sequencing.

제 3 절 대두 형질전환 및 재분화

가. Immature embryo로부터 somatic embryo의 유도

단엽, 팔달, 황금의 immature embryo를 10mg/l 2,4-D, 20 mg/l 2,4-D, 10 mg/l 2,4,5-T, 2.5 mg/l 2,4-D + 2.5 mg/l 2,4,5-T 가 각각 함유된 MS 배지에서 somatic embryo를 유도한 결과 10 mg/l 2,4,5-T, 2.5 mg/l 2,4-D + 2.5 mg/l 2,4,5-T, 10 mg/l 2,4-D 그리고 20 mg/l 2,4-D 순으로 somatic embryo가 유도되었으나 유도된 somatic embryo의 수는 대체로 적었다. 유도된 somatic embryo의 형태는 구형 또는 부정형의 형태로 보였다 (Figure 17a). 품종별 somatic embryo의 유도는 황금, 팔달 그리고 단엽 순으로 높게 나타났다. 첨가된 2,4-D 나 2,4,5-T는 somatic embryo 유도에는 좋은 효과를 보이나 somatic embryo의 발달을 저해함으로 (Buchheim et al., 1989) 이들을 흡수하기 위하여 activated charcoal이 첨가된 성숙 배지로 옮겨서 30일간 성숙 시킨 결과 몇몇의 구형의 somatic embryo는 부정형으로 변했으며 변하지 않은 것들은 더 이상 형태의 변화는 보이지 않았고 색깔이 짙어졌다 (Figure 17b,c).

황금을 8 mg/l NAA가 함유된 MS 배지에서 somatic embryo를 유도한 결과 앞의 방법보다 somatic embryo의 유도율이 높았으며 torpedo 형태의 embryo가 형성되었다 (Figure 18). 유도된 torpedo 형태의 embryo를 호르몬이 함유되지 않은 MS 배지에서 발아시킨 결과

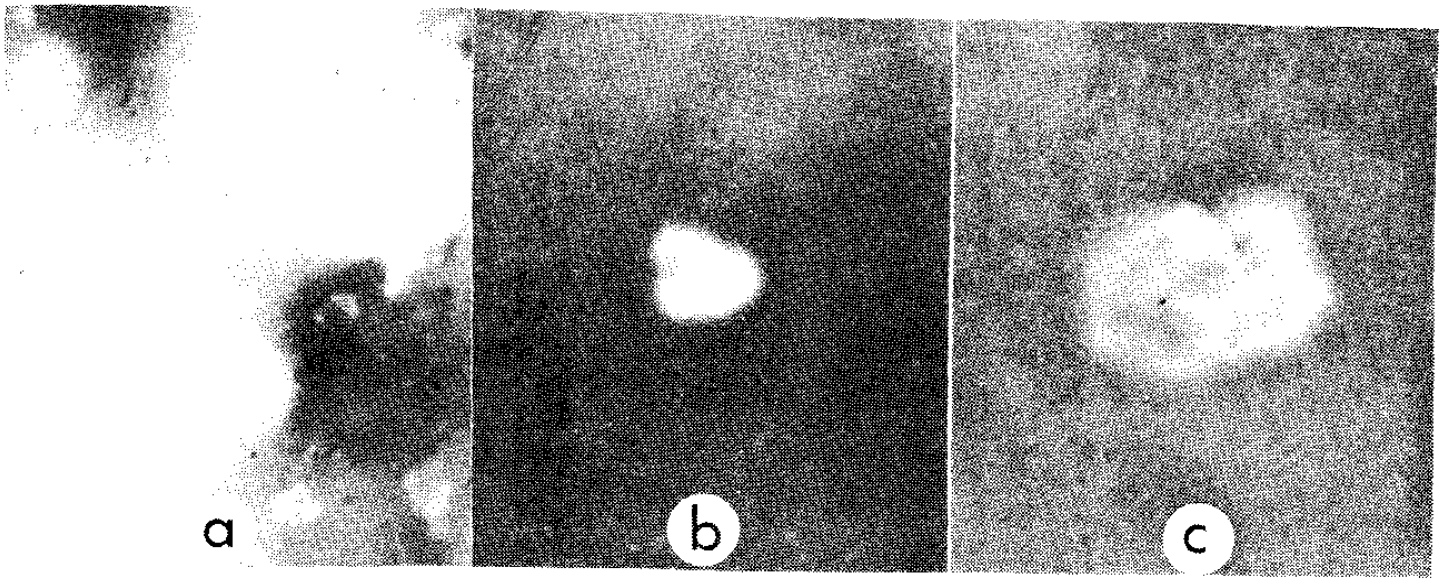


Figure 17. Somatic embryos of Hwang geum.
a : globular somatic embryo cultured on induction medium containing 10 mg/l 2,4,5-T.
b and c : Somatic embryos with abnormal morphology cultured on mature medium containing o.5% activated charcoal.

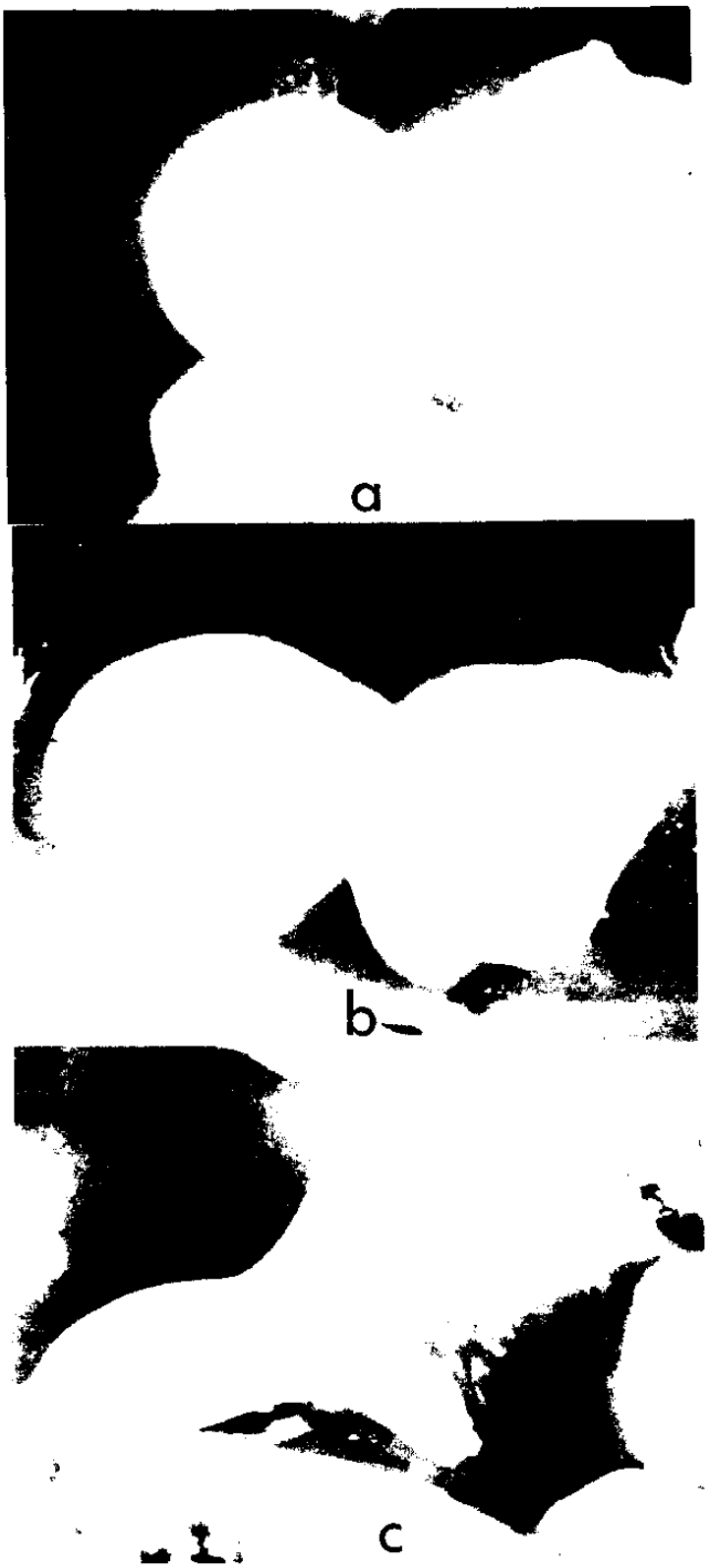


Figure 18. Somatic embryos of Hwang geum cultured on MS medium containing 8 mg/l α-NAA for 3 weeks.
a : globular-stage embryo.
b : heart-stage embryo.
c : torpedo-stage embryo.

길이의 생장은 조금있었으나 더 이상의 분화는 관찰되지 않았다.

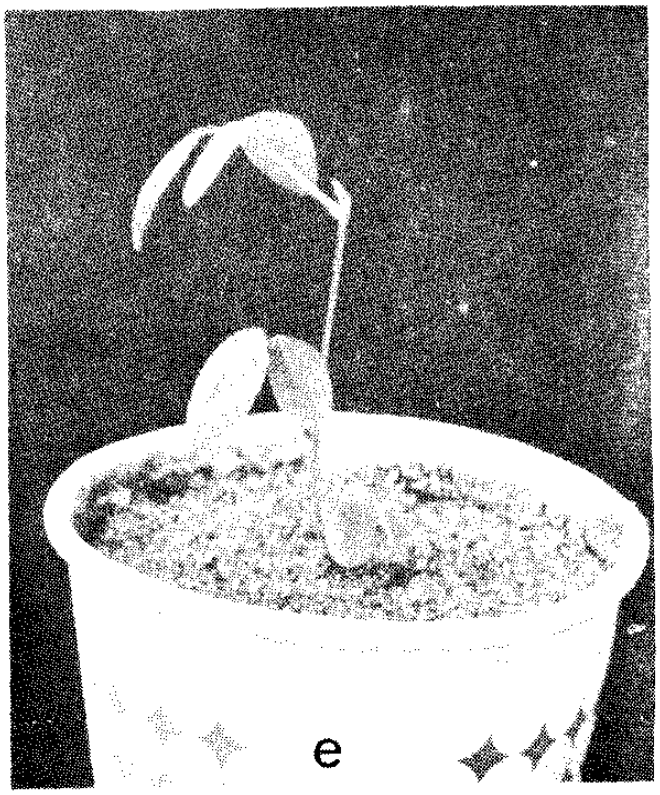
미숙배로부터 somatic embryo를 거쳐 완전한 식물체로의 재분화는 최근들어 몇몇 사례가 보고되고 있으나 (Barwale et al., 1986 ; Buchheim et al., 1989 ; Hartweck et al., 1988) 품종간의 차이가 많이 날 뿐아니라 그 효율성도 매우 낮은 편이다. 더구나 아직까지도 immature embryo를 이용한 Agrobacterium에 의한 형질전환은 재분화한 식물체의 유전적 안정성의 잇점이 있음에도 불구하고 보고된 바가 없다. 그 이유는 아마도 immature embryo로부터 다량의 somatic embryo를 유도하고 재분화시키는 조직배양기술의 미발달에 기인하리라 사료된다. 따라서 다량의 somatic embryo를 생산해 내는 조직배양 기술이 확립된 후에야 성공적인 대두의 형질전환을 가져올 수 있으므로 이들 품종으로부터 somatic embryo를 유도하고 이를 Agrobacterium의 매개에 의해 형질전환시킨다는 것은 불가능하다고 사료되어 다른 발달단계에 있는 대두조직을 이용하는 방법을 시도하였다.

나. 자엽절 배양에 의한 신초군의 유도 및 Agrobacterium의 매개에 의한 형질전환

단엽, 팔달, 황금의 종자를 BA를 포함하고 있는 B5 배지 (B5BA 배지)와 BA가 함유되 지 않은 B5 배지 (B50 배지)에서 발아시킨 결과, 팔달과 황금은 자엽절 부위가 왜소하고 잔뿌리가 많이 나타났으나

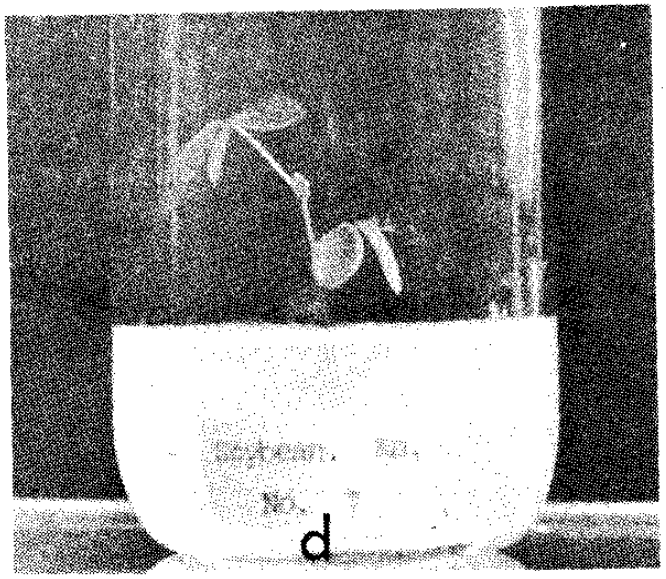
단엽은 자엽절이 비후되고 잔뿌리가 나타나지 않았다. 따라서 단엽을 신초군 유도와 Agrobacterium의 매개에 의한 형질전환에 사용하였다. 단엽을 B5B 배지에서 14 일간 배양하여 자엽절을 절취하여 신초를 유도한 결과 평균 4 - 5 개의 신초가 형성되었다. 자엽절의 배양시 칼루스는 거의 형성되지 않았으며 형성된 칼루스도 시간이 지남에 따라 검게 변하였다. 대두세포에 유전자를 도입하기 위하여 단엽 자엽절을 pJSL231을 지닌 Agrobacterium과 2 일간 같이 배양하고 100 ug/ml kanamycin과 500 ug/ml carbenicillin이 첨가된 B5B 배지에서 10 일간 계속 배양시킨 결과 신초가 3 4 개 정도 형성되었다 (Figure 19a). 그러나 Agrobacterium과 같이 배양하지 않은 대조구에서도 1 - 2 개의 신초가 나타났으나 시간이 경과함에 따라 대개 백색으로 변해갔다 (Figure 19b). Agrobacterium과 같이 배양한 자엽절에서 생성된 신초를 kanamycin을 함유한 B50 고형배지로 옮겨 3 - 4 주간 배양한 결과 기존의 신초수보다 많은 수의 신초가 분화되었다 (Figure 19c). 이것은 아마도 고농도의 BA는 신초의 형성을 촉진하나 신초의 생장 은 억제한다는 보고 (Cheng et al., 1980 ; Saka et al., 1980)가 있는데 B5BA 배지에서는 신초의 형성이 촉진되어 이미 신초의 분화가 되어 있는 상태에서 BA가 없는 B50 배지로 옮겼을 때 이미 분화된 신초가 신장을 통하여 형성되었다고 사료된다. 반면 B5B 배지에서 계속 계대배양을 수행한 결과 신초군의 생장이 상당히 억제되었으며 더 이상의 신초가 형성되지 않았다. 생성된 신초군에서 모든 신초들이 신장을 계속하지 않고 1 - 2개의 신초만이 신장을 계속하였다. Kanamycin이 첨가된 B50 배지에서

a


e

b

c


d

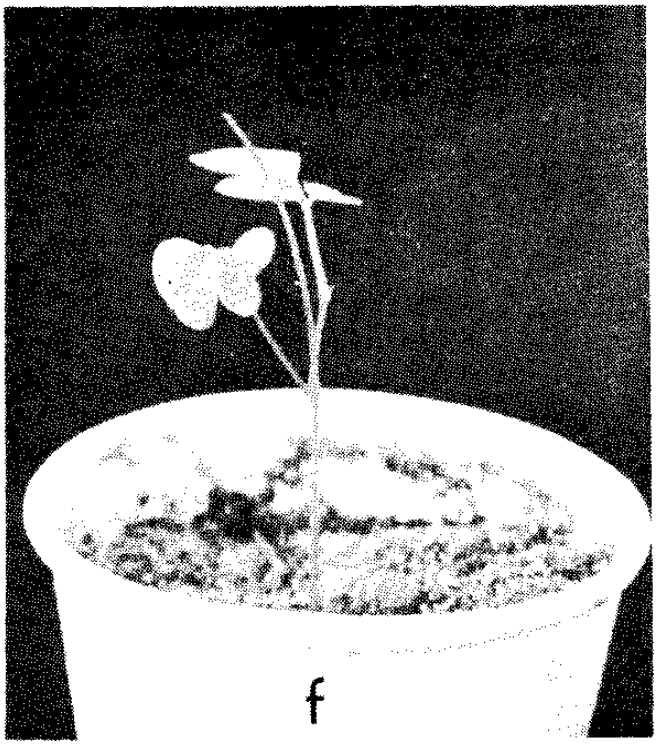

f

Figure 19. Regeneration of soybean plants from cotyledonary node segment.

a : multiple shoots formed from cotyledonary node segments cocultivated with Agrobacterium and cultured on B5B medium containing 100 ug/ml kanamycin for 10 days.
b : cotyledonary node segments not cocultivated with Agrobacterium in B5B medium containing 100 ug/ml kanamycin.
c : adventitious shoots forming at cotyledonary node segment after 20 days in B50 medium containing 100 ug/ml kanamycin.
d : plantlet in 1/2 B50 root induction medium containing 50 ug/ml kanamycin.
e and f : regenerated plants

계속적으로 신장하는 신초들은 형질전환된 세포로부터 형성된 것으로 사료되며 이들 신초들을 절단하여 50 ug/ml kanamycin이 함유되고 호르몬이 없는 1/2 B50 고형배지에서 뿌리를 유도하였다 (Figure 19d). 약 10 일 후에 뿌리가 분화되기 시작하였으며 2 주 후에는 질석으로 옮겨 순화시켰다 (Figure 19e,f).

다. 자엽으로부터 신초군의 유도 및 Agrobacterium의 매개에 의한 형질전환

발아한 유묘로부터 자엽을 분리하여 B5BA 고형배지에 배양한 결과 절단한 부위에서 1 - 2 개의 신초가 유도되었는데 유도된 신초는 약간 신장하다가 더 이상 신장하지 않았다. 이들 신초를 절단하여 BA가 없는 B50 고형배지로 옮겨서 신초의 신장을 유도하였는데 이때 먼저 생성된 신초 부근에서 다수의 신초가 나타났다. 그러나 생성된 신초 모두가 신장을 계속하는 것이 아니라 1 - 2 개의 신초만이 계속 신장하였다. 신장된 신초를 절단하여 1/2 B50 고형배지에 옮겨 뿌리를 유도한 결과 용이하게 뿌리가 유도되었다. Agrobacterium과 같이 배양하지 않은 자엽을 100 ug/ml kanamycin이 함유된 B5BA 고형배지에서 배양한 결과 신초의 분화가 거의 일어나지 않았으며 유도된 신초도 백색화되었다. 그러나 Agrobacterium과 같이 배양한 자엽에는 위와 마찬가지로 1 - 2 개의 신초가 유도되었으며 녹색을 유지하였다. 이들 신초들을 절단하여 100 ug/ml kanamycin이 함유된

B50 고형배지에서 신초의 신장을 유도한 결과 다수의 신초가 생성되었다. 생성된 신초중 1 2 개의 신초만이 신장을 계속하였고 나머지는 그대로 생장이 멈추거나 생산속도가 극히 느렸다. 지속적으로 생산하는 신초들은 형질전환된 세포에서 분화된 것으로 사료되며 이들 신초들을 50 ug/ml kanamycin이 함유된 1/2 B50 고형배지에서 뿌리를 유도한 결과 약 10 일후 뿌리가 생성되었으며 (Figure 20a) 그로부터 2 주후 질석으로 옮겨서 순화시켰다 (Figure 20b). 이들 transgenic soybean은 계속 키운 후 도입된 CaMV 35S - inhibitor I 유전자의 존재양태와 발현여부를 검정할 예정이다.

최근 대두의 형질전환은 embryogenesis를 통한 방법보다는 organogenesis를 이용한 방법 (McCabe et al., 1988 ; Hinchee et al., 1988; Christou et al., 1989)과 조직배양을 통하지 않고 발아중인 종자에 직접 Agrobactrerium을 주입하는 방법 (Chee et al., 1989)이 주로 이루어지고 있다. 이들 방법들은 효율이 대단히 낮으나 본 연구에서 수행한 자엽절과 지엽을 이용한 형질전환 방법이 그 효율성이 높기 때문에 본 연구에서 수행한 형질전환과 transgenic soybean의 형성방법은 유전 공학적 기술을 이용한 대두의 품종개량에 앞으로 이용할 가치가 크다고 사료된다.

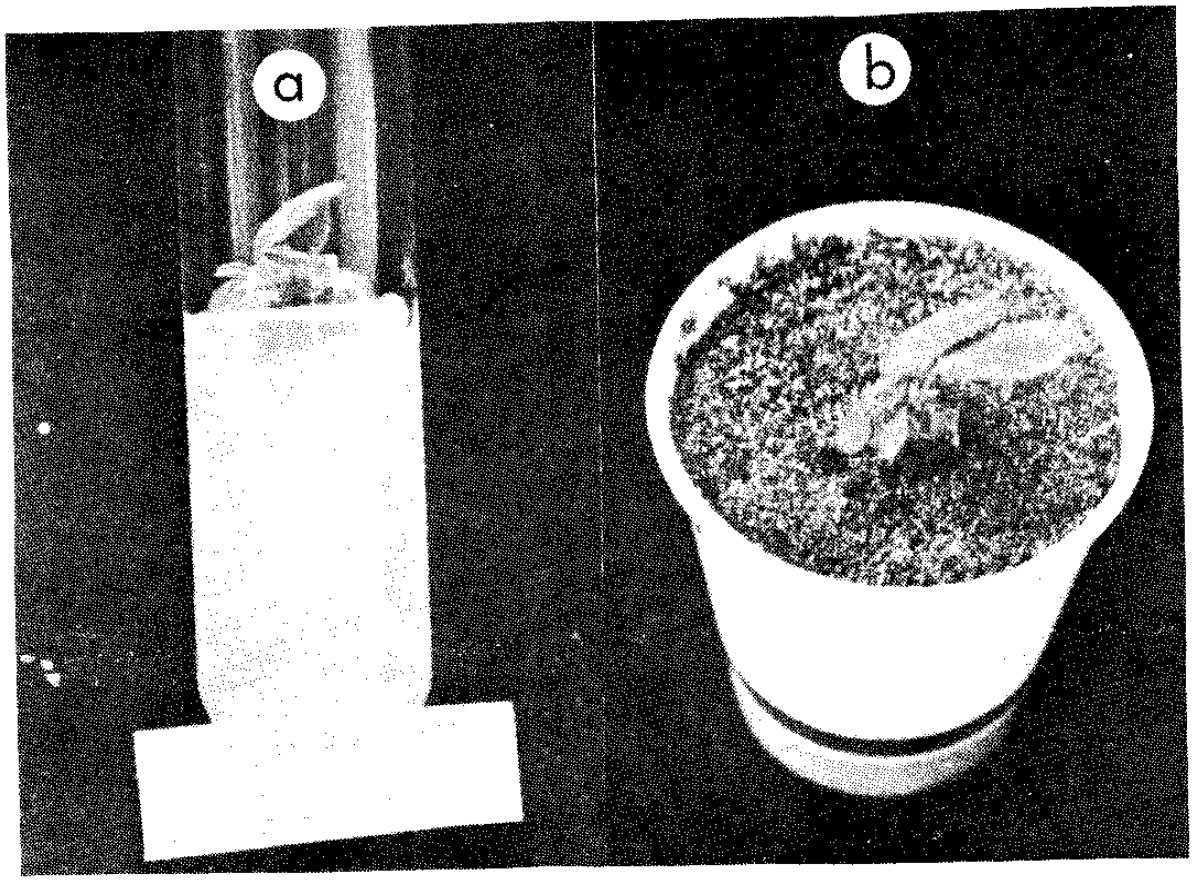


Figure 20. Regeneration of transgenic soybean plants from cotyledon explants.
a : rooted plantlet in 1/2 B50 medium containing 50 ug/ml kanamycin.
b : regenerated plants.

참 고 문 헌

1. Barwale, U.B., H.R. Kerns and J.M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes bia embryogenesis and organogenesis. Planta 167: 473-481.

2. Benton, W.D. and R.W.Davis. 1977. Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-184.

3. Bitter, G.A. and K.M.Egan. 1984. Expression of heterologous genes in Saccharomyces cerevisiae from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydregenase gene promotor. Gene. 32: 263-274.

4. Buchheim, J.A., S.M. Colbum and J.P. Ranch. 1989. Maturation of soybean somatic embryo and the transition to plantlet growth. Plant Physiol. 89: 768-775.

5. Chee, P.P., K.A. Fober and J.L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (Glycine max) by infecting germinating seeds with Agrobacterium tumefaciens. Plant Physiol. 91: 1212-1218.

6. Chen, Z.L., M.A.Schuler and R.N.Beachy. 1986. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 83: 8560-8564.

7. Chen, Z.L. et al. 1988. A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promotor. EMBO J. 7: 297-302.

8. Cheng, T., H. Saka and T. Voqui-Dinh. 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. Plant Sci. Lett. 19: 91-99.

9. Chou, P.Y. and G.D.Fasman. 1978. Empirial predictions of protein conformation. Ann.Rev.Biochem. 47: 251-276.

10. Christou, P., W.F. Swain, N.S. Yang and D.E. McCabe. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. Proc.Natl.Acad.Sci. 86: 7500-7504.

11. Dickinson, C.D., R.P.Evans and N.C.Nielsen. 1988. RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. Nucl.Acids Res. 13: 687-699.

12. Fang, R.X. et al. 1989. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the CaMV 35S promoter in transgenic plants. Plant Cell. 1: 141 150.

13. Gatehouse, J.A., I.M.Evans, R.R.D.Croy and D.Boulter. 1986. Differential expression of genes during legume seed development. Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci. 314: 367-384.

14. Goeddel, D.V. et al. 1979. Expression in E.coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proc.Natl.Acad.Sci. 76: 106-110.

15. Goldberg,R.B., G.Hoschek, S.H.Tam, G.S.Ditta and R.W. Breidenbach. 1981. Abundance, diversity and regulation of cloned superabundant embryo mRNAs in soybean. Dev.Biol. 83: 218-231.

16. Goldberg, R.B. 1986. Regulation of plant gene expression. Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci. 314: 343-353.

17. Gubler, U. and B.J.Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene. 25: 263-269.

18. Hartweck, L.M., P.A. Lazzeri, D. Cui, G.B. Collin and E.G. Williams. 1988. Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. In Vitro Cellular and Developmental Biology 24: 8221-8228.

19. Helms,C., M.Y.Graham, J.E.Dutchik and M.V.Olson. 1987. Meth. Enzymol. 153: 69-82.

20. Hinchee, M.A.W., D.V. Connor-Ward,, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley and R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer. Bio/Technology 6: 915-922.

21. Ito, H. et al. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J.Bacteriol. 153: 163-168.

22. Jaynes, J.M. et al. 1986. Plant protein improvement by genetic engineering: Use of synthetic genes. Trends Biotechnol. 4: 314-315.

23. Jofuku, K.D., J.K.Okamuro and R.B.Goldberg. 1987. Interaction of an embryo DNA binding protein with a soybean lectin gene upstream region. Nature 328: 734-737.

24. Kane, J.F. and D.L.Hartley. 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli. Trends Biotechnol. 6: 95-101.

25. Kim,C.H. and Y.D.Choi. 1989a. Identification of soybean glycinin precursor in vivo. Korean J.Botany 32: 51-65.

26. Kim,C.H. and Y.D.Choi. 1989b. Molecular cloning of cDNA encoding the precursor to the glycinin A2B1a subunit of soybean. Korean Biochem.J. 22: 233-241.

27. Larkins, B.S. 1982. Genetic engineering of seed storage proteins. Genetic engineering of plants. Plenum Press, pp. 81-92.

28. Lasseri, P.A., D.F. Hildeband and G.B. Collins. 1988. A procedure for plants regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. Plant Mol. Biol. Rep. 8: 160-167.

29. Lutcke, H.A., K.C.Chow, F.S.Mickel, K.A.Moss, H.F.Kern and G.A.Scheele. 1987. Selection of AUG differs in plants and animals. EMBO J. 6: 43-48.

30. Maniatis,T., E.F.Fritch, and L.Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor, NY.

31. Marco,Y.A., V.H.Thanh, N.E.Tumer, B.J.Scallon and N.C.Nielsen. 1984. Cloning and structural analysis of DNA encoding an A2B1a subunit of glycinin. J.Biol.Chem. 259: 13436-13441.

32. Marston, F.A.O. 1986. The purification of eukariotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. Biochem.J. 240: 1-12.

33. McCabe,D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration. Bio/Technology 6: 923-926.

34. Messing, J., D.Geraghty, G.Heidecker, N.-T.Hu, J.Kridl and I.Rubenstein. 1983. In Genetic Engineering of plants, eds. T.Kosuge et al., Plenum, New York, p211.

35. Mraki, M. et al. 1985. Expression of synthetic human lysozyme gene in E.coli. Agric.Biol.Chem. 49: 2829-2831.

36. Nielsen,N.C., C.D.Dickinson, T.J.Cho, V.H.Thanh, B.J.Scallon, R.L. Fischer, T.L.Sims, G.N.Drews and R.B.Goldberg. 1989. Characterization of the glycinin gene family in soybean. Plant Cell 1: 313-328.

37. Parrott, W.A., L.M. Hoffman, D.F. Hildebrand, E.G. Williams and G.B. Collins. 1989. Recovery of primary transformants of soybean. Plant Cell Rep. 7: 615-617.

38. Proudfoot,N.T. 1979. Eukaryotic promoters? Nature 279: 376-376.

39. Sadler, J.R. et al. 1980. Plasmid containing many tandem copies of a synthetic lactose operator. Gene. 8: 279-300.

40. Saka, H., T. Voqui-Dinh and T.Cheng. 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. Plant Sci. Lett. 19: 193-201.

41. Sanger,F., S.Nicklen and A.R.Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Sci. 74: 5463-5467.

42. Staswick,P.E., M.A.Hermodson and N.C.Nielsen. 1984. The amino acid sequence of the A2B1a subunit of glycinin. J.Biol.Chem. 259: 13424-13430.

43. Sung, W.C. et al. 1986. Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in E.coli. Proc.Natl.Acad.Sci. 83: 561-565.

44. Weiher, H., M.Konig and P.Gruss. 1983. Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. Science 219: 626-631.

45. Wright, M.S., D.V. Ward, M.A. Hinchee, M.G. Carnee and R.J. Kaufman. 1987. Regeneration of soybean (Glycine max L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. Plant cell Rep. 6: 83-89.

46. Zurawski, S.M. al. 1986. Expression in E.coli of synthetic human interleukin-1 genes encoding processed active protein, mutant proteins, and -galactosidase fusion proteins. Gene. 49: 61-68.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구 보고서이다.

2. 이 연구개발 내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.