

형질전환 토마토에서 Cytosine Methylation에 의한 유전자발현 억제

정서희, 민성란, 이수영, 박지영, S Javad Davarpanah, 정화지, 전재홍, 유장렬, 정원중*
한국생명공학연구원, 식물유전체연구센터

Gene Silencing Induced by Cytosine Methylation in Transgenic Tomato

Seo Hee Jung, Sung Ran Min, Soo Young Lee, Ji Young Park, S Javad Davarpanah, Hwa-Jee Chung, Jae Heung Jeon, Jang Ryol Liu, and Won Joong Jeong*

Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Transgene expression was analyzed in tomato plants. Four lines of neomycin phosphotransferase II gene (NPTII) and the trehalose biosynthetic fusion gene (TPSP) transformed T₀ plants showed kanamycin resistance on selection medium. However, the analysis of phenotype (kanamycin resistance) and mRNA expression in T₁ plants indicated that the expression of the NPTII and TPSP transgenes was down-regulated to an undetectable level in two independent lines 1 and 11. Southern analysis demonstrated that the lines 1 and 11 had multicopies of the transgenes, whereas the typical transgenic lines 2 and 10 had 1 or 2 copies. DNA methylation analysis using methylation sensitive enzyme detected accumulated CpG DNA methylation on TPSP coding region and CaMV35S promoter region in the line 11, but not the typical transgenic line 2. These results suggest that multicopy transgene in plants is attributed to down-regulation of the transgene expression via transcriptional gene silencing.

서 론

형질전환식물체에서 예측가능하고 안정적인 외래유전자의 발현은 분자육종에서 중요한 이슈이다. 그러나 동일한 조건 및 형질전환 벡터를 이용하여도 생산된 형질전환체들 사이에는 도입유전자의 발현 수준의 차이가 크게 나타난다 (Peach and Velten 1991, Birch 1997, Bhat and Srinivasan 2002, Butaye et al. 2004). 다양한 형질전환 연구에서 여러 독립적인 형질전환체들을 분석한 결과, 일부의 형질전환체에서만 외래유전자가 높은 수준으로 발현되었으며, *Arabidopsis* 경우 80%의 형질전환체에서 GUS 유전자의 발현이 비정상적

로 낮은 것으로 보고되었다(Hobbs et al. 1993, Brouwer et al. 2002, De Bolle et al. 2003). 또한, *Arabidopsis* T-DNA mutant 분석결과 T₃세대의 56% line에서 nptII 유전자가 발현되지 않았고 (Meza et al. 2001), *chitinase*와 β -1,3-*glucanase*가 도입된 밀의 경우 T₂ 세대에서 개체의 80%에서 유전자가 발현되지 않는 현상이 보고 되었다 (Anand et al. 2003). *Luciferase* 유전자가 도입된 담배에서는 4세대까지는 정상적으로 발현되었으나 5세대 이후에 유전자가 발현되지 않는 현상도 보고되었다 (Mitsuhara et al. 2002). 이와 같이, 선발된 초기의 형질전환체는 외래유전자의 발현이 정상적이었으나, 배양기간 또는 세대가 경과하면서 발현이 감소하거나 전혀 발현되지 않는 불안정한 외래유전자 발현현상, 즉 transgene silencing 현상이 대부분의 진핵생물에서 발견되었다 (Hannon 2002). 이러한 현상은 single copy로 도입된 경우에도 일어나지만

*Corresponding author Tel 042-860-4462 Fax 042-860-4608
E-mail: wonjoong@kribb.re.kr

(De Wilde 2001), 여러 copy의 외래유전자가 도입된 경우에 많이 일어난다 (Hobbs et al. 1993, Jorgensen et al. 1996, Wang and Waterhouse 2000). 형질전환과정에서 여러 copy의 외래 유전자가 염색체의 한 locus에 repeat 또는 inverted repeat으로 배열되어 도입되거나 (Pawlowski and Somers 1998, De Buck et al. 1999, Muskens et al. 2000), single copy라도 비정상적 전사가 일어나도록 도입되면 (position effect), 이곳으로부터 정상적인 mRNA 이외에도 비정상적인 mRNA가 전사되는데, 이러한 비정상적 mRNA는 transgene silencing의 신호역할을 하게 된다 (Hannon 2002). 즉 도입유전자로부터 전사된 비정상적인 mRNA (aberrant, dsRNA 등)에 의해 transgene silencing이 유도되며 Dicer, Ago, methylase 등 다양한 효소들이 연관된 RNA interference (RNAi) 기작을 통하여, 비정상적인 mRNA 이외에도 정상적인 mRNA도 분해되도록 하는 post transcriptional gene silencing (PTGS) 또는 핵 내의 chromatin을 변형시킴으로써 해당유전자의 mRNA가 전사되지 못하게 하는 transcriptional gene silencing (TGS) 현상이 발생하는 것으로 알려졌다 (Mette et al 1999, Muskens et al. 2000, Sijen et al. 2001, Hannon 2002, Fojtova et al. 2003, 2006, Brodersen and Voinnet 2006). 따라서 외래유전자가 정상적이고 안정적으로 발현되지 못하고 silencing 되는 현상은 식물 형질전환 연구의 큰 장애물이 되었다. 이와 같은 외래유전자의 silencing 현상을 효과적으로 조절하여 형질전환의 효율을 높이기 위해서는 silencing 과정 및 현상을 연구하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 형질전환 토마토에서 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자 발현양상을 분석하여 토마토에서 transgene silencing 현상을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

토마토 형질전환체 생산

형질전환 벡터는 pCAMBIA 2300 vector에 CaMV35S promoter와 not terminator의 조절을 받는 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자가 연결된 pHC21-TPSP 벡터 (Figure 4C)를 사용하였다. 사용된 TPSP 유전자는 명지대학교 김주근 교수에게서 분양받았다. MS 배지에서 발아된 방울 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Joyful)의 자엽절편과 pHC21-TPSP 벡터를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404을 공동배양하여 형질전환을 수행하였다. 2 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 350 mg/L carbenicillin, 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS배지에서 배

양 1개월 이후 kanamycin에 저항성을 보이며 발생한 shoot을 350 mg/L carbenicillin, 100 mg/L kanamycin, 0.5 mg/L indole butyric acid (IBA)이 첨가된 MS배지에서 뿌리를 유도하여 2차 선발하였다. 이렇게 kanamycin에 저항성을 보이며 선발된 유식물체는 화분에 옮겨 생육시켜 후대 종자를 수확하였다.

DNA 및 RNA 분석

온실조건에서 생장한 토마토 식물체의 잎을 채취하여 DNA와 RNA를 분리하여 분석하였다. Genomic DNA 분리, PCR, 전기영동, Southern 분석은 표준방법을 사용하였다 (Sambrook and Russell 2001). 형질전환 토마토로부터 분리한 60 µg의 genomic DNA를 *Hind*III 제한효소로 처리하여 copy number 조사를 위한 Southern 분석에 이용하였다. TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 전체 RNA를 분리하였고, 30 µg의 전체 RNA를 Northern 분석에 사용하였다. 전체 RNA의 전기영동 및 Northern 분석은 표준방법을 사용하였다 (Sambrook and Russell 2001). Probe 제작을 위한 DNA 단편은 형질전환벡터 pHC21-TPSP를 주형으로 하고 해당 primer를 이용하여 PCR방법으로 준비하였다. 700 bp의 NPTII DNA 단편은 NPTII-F(5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3')와 NPTII-R(5'-ATCGGGA GCGGCGATCCGTA-3') primer를 사용하고, 750 bp의 TPSP DNA 단편은 TPSP-F(5'-GAAAATATTCGCTACTCTGAC-3')와 TPSP-R(5'-GATACTGAGCGATGACTGTATG-3') primer를 사용하여 PCR방법으로 증폭하여 분리하였다. 이후 [α - 32 P] dCTP로 표지하여 probe로 사용하였으며, Imaging Plate (Fujifilm, Japan) 또는 X-ray film을 이용하여 노출하였다.

DNA의 CpG Methylation 분석

형질전환 유전자의 CaMV35S promoter 부위 및 TPSP 유전자 부위의 CCGG 염기서열에서의 CpG methylation 측정 여부를 조사하였다. 형질전환체에서 분리한 60 µg의 genomic DNA를 methylation sensitive 제한효소인 *Hpa*II 처리 및 methylation insensitive 제한효소인 *Msp*I 처리하여 표준방법으로 Southern 분석을 수행하였다. 0.4 ~ 1.1 kb의 TPSP probe를 사용하여 TPSP coding region에서의 CpG methylation 변화를 조사하였다. 이후 membrane을 1% SDS와 1 mM EDTA가 첨가된 95°C의 deprobing 용액에 30분간 처리 후, CaMV

35S promoter 단편으로 re-probing하여 도입유전자의 promoter 부위에서의 CpG methylation 변화를 조사하였다. Probe용 TPSP는, 2.24 kb의 TPSP cDNA를 *Bam*HI/*Bgl*II 제한효소로 처리하여 분리된 0.4 ~ 1.1 kb크기의 DNA 단편을 사용하였다. Probe용 CaMV35S promoter는 pHC21-TPSP를 주형으로 하고 35S For (5'- ATCACGCACAATCCCACTAT-3')/35S 3(5'-ATAGT GGGATTGTGCGTCAT-3')primer로 PCR을 수행하여 증폭된 약 800 bp의 DNA 단편을 사용하였다.

결과 및 고찰

형질전환토마토 생산

배양 후 shooting 및 rooting과정에서 kanamycin에 저항성을 나타내며 선발된 토마토 형질전환체는 PCR로 재확인 후, 화분에 옮겨져 생육되었다. 화분에서 생육하는 조건은 Kanamycin에 의한 선발압력이 사라진 조건으로서, 이렇게 성장한 T0 세대에서 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자의 발현을 분석한 경우에, 형질전환체에 따라서 유전자의 발현 양상은 northern으로 감지되지 않을 정도의 낮은 수준부터 높은 발현수준까지 다양하게 나타났다 (데이터 미제시). 형질전환 토마토에서 도입된 외래유전자 발현이 안정적이지 않고 시간이 경과함에 따라 그 발현 양이 변한 것은 PTGS 또는 TGS 현상 때문일 것이다. 이러한 사실은 선발과정을 거쳐서 형질전환체를 확보하여도 도입한 유전자의 발현 양 및 안정적 발현이 예측될 수 없음을 나타낸다. 본 연구에서는 Kanamycin에 저항성을 보이며 선발되었고, PCR로 NPTII 유전자의 도입이 확인된 토마토 형질전환식물체 1, 2, 10, 11 line의 T0 식물에서 southern 분석을 수행하여 NPTII 유전자의 copy number를 조사하였다(Figure 1A). NPTII 및 TPSP유전자를 probe로 분

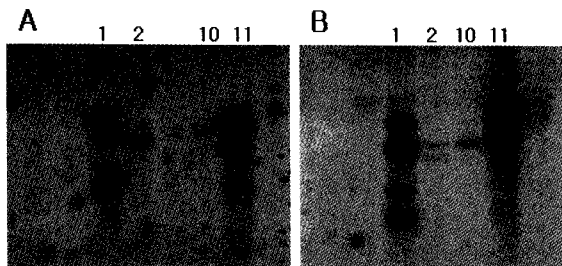


Figure 1. Southern analysis for *nptII* gene in transgenic tomato plants. (A) Southern blot in T₀ plants of transgenic tomato lines, (B) Southern blot in T₁ plants of transgenic tomato lines. PCR amplified NPTII gene was used as a probe.

석한 결과 1번, 11 번 line의 형질전환체는 여러 copy의 유전자를 가지고 있었고, 2번, 10번 line들은 1-2 copy의 외래유전자의 도입이 확인되었다 (Figure 1).

T₁ 세대에서 transgene의 발현과 Copy Number 분석

1-2 copy의 NPTII유전자를 가진 2번 line과, 4 copy 이상의 NPTII 유전자를 가진 11번 line의 후대 종자 (T₁ or T₂)를 Kanamycin이 첨가된 MS 배지에서 발아시켜 항생제 저항성을 조사하였다 (Fig 2). Kanamycin이 첨가되지 않은 배지에서는 2번 line과 11번 line이 모두 wild type과 동일하게 발아 후 성장하였다. 그러나 Kanamycin이 첨가된 배지에서는, 2번 line은 저항성을 보이며 정상적으로 발아하여 유식물체로 성장하였지만, 11번 line은 wild type과 동일하게 Kanamycin에 저항성을 보이지 못하고 유식물체로 발달하지 못하였다 (Figure 2). 그렇지만 Kanamycin에서 생육하지 못한 11번 line의 유식물체들은 PCR 분석 결과 NPTII 유전자를 가지고 있음이 확인되었다 (데이터 미제시). 이것은 11번 line에서 NPTII 유전자가 후대로 전달되었으나, 이 식물체에서는 Kanamycin에 저항성을 부여하는 neomycin phosphotransferase II 단백질이 생산되지 않았음을 나타낸다.

T₁ 세대에서 copy number 및 유전자의 발현을 조사하였다. 1, 2, 10, 11번 line에서 각각 1 개체씩을 선별하여 copy number를 분석한 결과, 1번과 11번은 역시 여러 copy의 외래 유전자가 도입되어 있었으며, 2번의 경우 2 copy, 10번의 경우 1 copy로 확인되었다 (Figure 1B). 그러나 Northern 분석

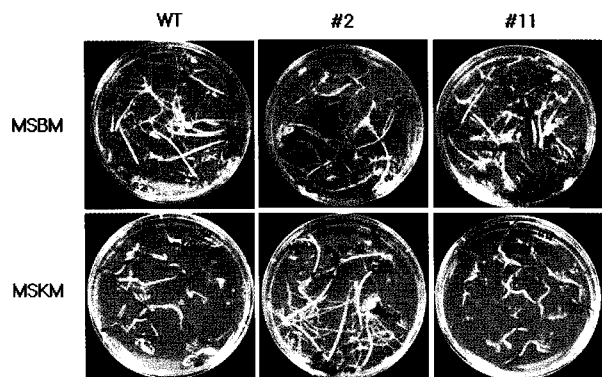


Figure 2. Antibiotic sensitivity of transgenic tomato lines. WT, untransformed wild type tomato; #2, transgenic line 2; #11, transgenic line 11; MSBM, MS basal medium; MSKM, MS medium containing 100 mg/L Kanamycin. Seeds of wild type and T₂ generation of transgenic lines 2 and 11 were germinated on MSBM and MSKM.

결과 1-2 copy의 외래유전자를 가지는 2번 및 10번 line에서는 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자가 강하게 발현된 반면, 여러 copy를 가진 1번과 11번 line의 경우는 NPTII 및 TPSP 유전자의 mRNA가 거의 또는 전혀 나타나지 않았다 (Figure 3). 한편 11번 line의 후대, 즉 T₂ 세대에서는 분리가 일어났으나 역시 여러 copy로 존재하였으며, NPTII 유전자는 역시 전혀 발현되지 않았다 (데이터 미제시). 즉, 이러한 형질전환체의 외래유전자의 발현 양상은 후대에서 동일하였다.

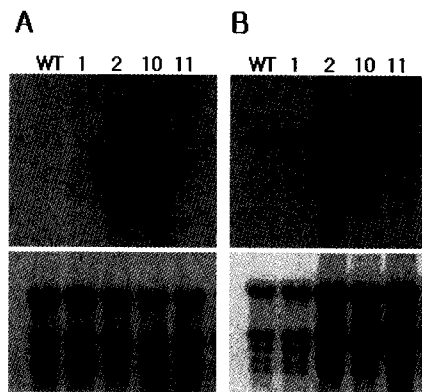


Figure 3. Northern analysis in transgenic tomato T₁ plants. (A) Northern blot for NPTII gene expression in transgenic tomato lines, (B) Northern blot for TPSP gene expression in transgenic tomato lines. Loading were monitored by EtBr staining.

Silenced Line에서 Transgene의 DNA Methylation 분석

본 연구의 토마토 형질전환체 11번 line의 경우 외래유전자가 발현되지 않는 것은 PTGS 또는 TGS에 의해서 일어날 수 있다. PTGS는 mRNA가 생성된 후에 분해되는 것으로 일반적으로는 northern 분석에서 약간의 mRNA가 감지되기도 한다. 그러나 TGS의 경우 핵 내에서 전사가 일어나지 것이므로 mRNA가 전사되지 않을 것이다. 본 연구의 형질전환체 11번 line은 Northern상에서 전혀 유전자의 발현을 볼 수 없기 때문에 TGS로 의심되었다. 고등식물에서 TGS의 경우 해당 유전자 및 promoter 부위에서 CG methylation이 일어나게 된다 (Matihieu and Bender 2004, Haque et al. 2007). 즉, DNA 염기서열 중에서 CG 서열이 나타날 경우 C에 methyl기가 첨가되어 promoter부위에 methylation이 축적됨으로써 RNA polymerase에 의한 mRNA의 전사가 억제된다. 본 연구에 사용된 TPSP 유전자 및 NPTII 유전자의 coding region, 그리고 TPSP 및 NPTII 유전자의 promoter인 CaMV35S promoter 주위에는 제한효소인 *HpaII*와 *MspI*이 절단할 수 있는 부위인 CCGG 서열이 여러 개 존재한다 (Figure 4C). 따라서 *HpaII* 또는 *MspI* 처리한 후 Southern 분석으로 TPSP 유전자 부위 및 CaMV35S promoter 주위의 methylation 유무를 확인하였다 (Figure 4). 2번 line의 경우 TPSP 유전자를 probe로 사용

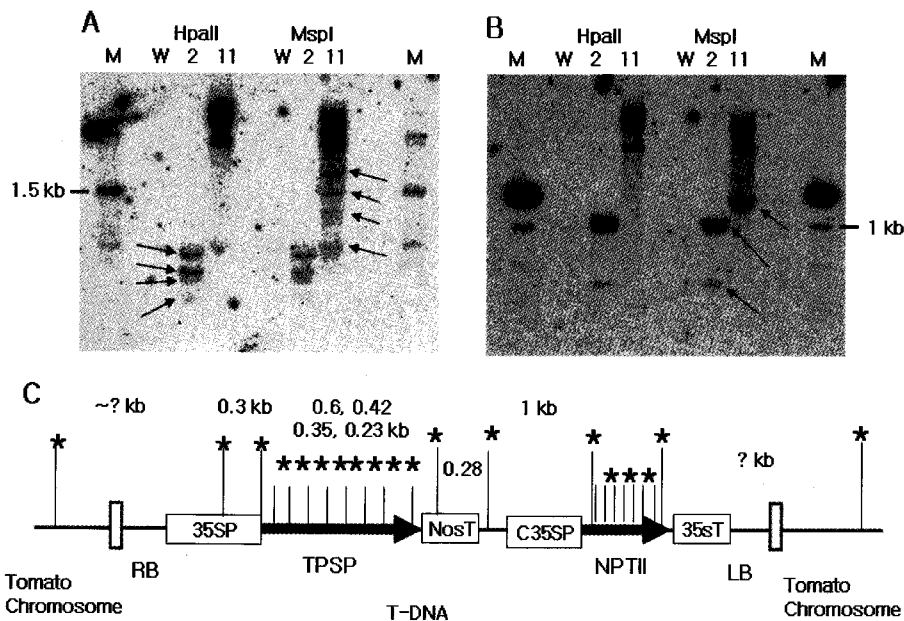


Figure 4. DNA methylation analysis of two transgenic lines 1 and 2 by Southern blot after digestion with *HpaII* (methylation-sensitive) and *MspI* (methylation-insensitive). (A) Restriction pattern of TPSP coding region, (B) Restriction pattern of CaMV35S promoter regions, (C) A schematic presentation of CCGG sites(asterisks) and T-DNA inserted in the chromosome of transgenic tomato plant. M, 1kb DNA molecular size marker; W, wild type, 2, unsilenced line 2; 10, silenced line 11.

한 경우 및 CaMV35S promoter를 probe로 사용한 경우 모두 *HpaII*를 처리한 것과 *MspI*을 처리한 것에서 동일한 밴드 양상을 보였으나, 11번 line의 경우는 밴드 양상이 변화하였다. TPSP를 probe로 사용하면, 2번 line에서는 CCGG서열부위가 절단된 경우 예상되는 230, 350, 420, 600 bp의 TPSP 단편들이 *HpaII* 또는 *MspI*으로 처리구에서 동일한 양상으로 나타났다. 그러나 11번 line에서는 *HpaII* 처리구에서는 나타나지 않았던 밴드들이 *MspI* 처리구에서 나타났다. 이러한 결과는 2번 line의 경우 TPSP 유전자 내부에서 CpG methylation이 일어나지 않았으나, 11번 line의 경우 TPSP 유전자 내부에서 CpG methylation이 축적되었음을 나타낸다. CaMV35S promoter를 probe로 사용하면, CCGG 부위가 완전히 절단될 경우, NPTII 유전자의 promoter부위에서 1 kb, TPSP promoter 부위에서 0.3 kb와 토마토 flanking sequence를 포함하는 또 하나의 밴드가 예상되었다 (Figure 4). 2번 line에서 약 0.3 kb의 밴드와 약 1 kb부위의 강한 밴드 만이 나타났으며, 역시 *HpaII* 또는 *MspI*으로 처리구에서 동일한 양상으로 나타났다. 이것은 2번 line에서는 TPSP coding region과 CaMV35S promoter 주위에 CpG methylation이 일어나지 않았음을 나타낸다. 또한 0.3 kb와 1 kb이외의 또 다른 밴드가 나타나지 않은 것은, flanking region을 포함하는 부위의 크기가 1 kb와 비슷하게 겹치는 것으로 생각되었다. NPTII 및 TPSP 유전자의 발현이 silencing된 11번 line의 경우 *HpaII* 처리구에서는 나타나지 않았던 약 1.5 kb의 밴드가 *MspI* 처리구에서 나타났다(Figure 4). 이처럼 *HpaII* 처리구와 *MspI* 처리구의 Southern 밴드 양상이 다른 것은 11번 line의 CaMV35S promoter 부위에 CpG methylation이 존재함을 나타낸다. 한편, 11번 line에서는 TPSP probe로 사용한 경우나, CaMV35S promoter probe를 사용한 경우 모두, 2번 line과는 다른 크기의 밴드들이 나타났는데, 이것은 *MspI*의 특성 때문일 것이다. 즉 *MspI*은 CC*GG의 경우 절단할 수 있으나, G C*C*GGN와 같이 바깥쪽의 C도 CpG methylation이 일어나면 절단하지 못하는 특성 때문으로 생각된다. 이상의 결과로 11번 line에서 NPTII 유전자와 TPSP 유전자가 발현되지 않는 이유는, 외래유전자가 여러 copy로 도입되었으며 유전자의 coding region 및 promoter 부위에서 CpG methylation에 의한 transgene silencing때문으로 생각된다.

토마토 식물체에서 Transgene 발현의 불안정성

본 연구에서는 형질전환 토마토에서 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자의 copy number 및 mRNA 발현변화, 그리고

DNA methylation 축적여부를 조사 하였다. 형질전환과정에서 kanamycin에 저항성을 보이며 선발된 토마토 형질전환체 중에서, 1번 line과 11번 line은 NPTII 및 TPSP 유전자가 여러 copy로 도입되었으나, 후대에서 외래유전자의 mRNA가 발현되지 않았고 kanamycin 저항성을 보이지 못했다 (Figure 1, 2, 3). 11번 line의 경우 methylation sensitive 제한효소를 이용한 methylation 분석 결과 외래유전자의 coding 부위 및 CaMV35S promoter 부위에서 CpG methylation이 축적되었음을 확인하였다 (Figure 4). 따라서 토마토 11번 line에서 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자의 silencing은 methylation에 의해 매개된 TGS 기작 때문인 것으로 추정된다.

형질전환체를 제작하는 경우, 도입된 외래유전자의 발현 수준이 예측 가능해야 하며 후대에서도 안정적으로 발현되어야 한다. 그러나 본 연구의 1번과 11번 line의 토마토 형질전환체의 경우, 여러 copy의 NPTII 및 TPSP 유전자가 도입되었으나 후대에서 유전자가 발현되지 않았다. 이러한 여러 copy의 유전자가 형질전환된 경우 발현이 억제되는 현상은 식물뿐만 아니라 동물에서 발표된 기존의 보고들과 일치한다 (Wang and Waterhouse 2000, Brodersen and Voinnet 2006, Bender 2003). 외래유전자의 silencing 빈도는 식물에 따라 많은 경우 80%의 형질전환체에서 나타나는 것으로 알려져 있다 (Meza et al. 2001, Anand et al. 2003, De Bolle et al. 2003). 그러나 이러한 결과들은 형질전환체로 선발된 이후에 조사된 결과로서, 형질전환 초기 선발단계부터 silencing이 진행된다면, 형질전환체의 선발도중에 항생제에 저항성을 잃어버리게 될 것이고, 따라서 형질전환체로 자라지 못할 것이다. 즉, 실제로는 80% 보다 훨씬 높은 빈도로 외래유전자의 silencing이 일어날 수 있음을 추정할 수 있다. 이처럼 형질전환연구에서 외래유전자의 silencing 현상은 아주 높은 빈도로 발생하고 있으며, 도입된 유전자의 안정적 발현을 예측할 수 없게 한다. 따라서 외래유전자가 도입되어 유전자의 발현이 안정적으로 되는 형질전환체를 확보하기 위해서는, 대량의 형질전환체를 생산하여 여러 세대를 거치면서 안정적인 유전자 발현을 보이는 line을 선발하거나, 외래유전자 발현의 silencing 현상을 연구하여 이를 조절할 수 있는 기술이 개발되어야 할 것이다.

적 요

토마토 형질전환체에서 NPTII 및 TPSP 유전자의 발현양상을 조사하였다. 4개 line 토마토 형질전환체가 선발배지에

서 kanamycin에 저항성을 보이며 생산되었다. 그러나, 1번 line과 11번 line의 후대에서 NPTII유전자의 발현이 억제되었으며, Kanamycin 저항성을 보이지 못했다. Southern 분석 결과, 1번 11번 line은 여러 copy의 외래 유전자를 가지고 있었으며, 2번, 10번 line은 1-2 copy의 외래유전자를 가지고 있었다. 형질전환 line 11번은 methylation sensitive 제한효소 처리 후 DNA methylation 분석 결과, TPSP coding부위 및 도입유전자의 발현을 조절하는 CaMV35S 프로모터 주위에서 CpG methylation이 축적되었음이 확인되었다. 따라서 여러 copy의 외래유전자를 가진 토마토 형질전환 line 11번에서 NPTII 유전자 및 TPSP 유전자의 발현이 억제된 것은 transcriptional gene silencing 기작에 의한 것으로 추정되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업(과제번호: 20070301034020)과 한국생명공학연구원 기관과유사업의 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Anand A, Trick HN, Gill BS, Muthukrishnan S (2003) Stable transgene expression and random silencing in wheat. *Plant Biotechnol J* 1: 241-251
- Bender J (2003) DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol* 55: 41-68
- Bhat SR, Srinivasan S (2002) Molecular and genetic analyses of transgenic plants: considerations and approaches. *Plant Sci* 164: 673-681
- Birch RG (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 297-326
- Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genet* 22: 268-280
- Brouwer C, Bruce W, Maddock S, Avramova Z, Bowen B (2002) Suppression of transgene silencing by matrix attachment regions in maize: a dual role for the maize 5' ADH1 matrix attachment region. *Plant Cell* 14: 2251-2264
- Butaye KJM, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Poes JM-TG, Delaure SL, Broekaert WF, Depicker A, Cammue BPA, De Bolle MFC (2004) Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J* 39: 440-449
- De Bolle MFC, Butaye KJM, Coucke WJW, Goderis IJWM, Wouters PFJ, van Boxel N, Broekaert WF, Cammue BPA (2003) Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 165: 169-179
- De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1999) The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* 20: 295-304
- De Wilde C, Podevin N, Windels P, Depicker A (2001) Silencing of antibody genes in plants with single-copy transgene inserts as a result of gene dosage effects. *Mol Genet Genomics* 265: 647-653
- Fojtova M, Bleys A, Bedrichova B, van Houdt H, Krizova K, Depicker A, Kovaik A (2006) The *trans*-silencing capacity of invertedly repeated transgenes depends on their epigenetic state in tobacco. *Nucleic Acids Research* 34: 2280-2293
- Fojtova M, Van Houdt H, Depicker A, Kovaik A (2003) Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiol* 133: 1240-1250
- Haque AKMN, Yamaoka N, Nishiguchi M (2007) Cytosine methylation is associated with RNA silencing in silenced plants but not with systemic and transitive RNA silencing through grafting. *Gene* 14: 17521830
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251
- Hobbs SLA, Warketin TD, DeLong CMO (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Biol* 21: 17-26
- Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 31: 957-973
- Mathieu O, Bender J (2004) RNA-directed DNA methylation. *J Cell Sci* 117: 4881-4888
- Mette MF, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM (1999) Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J* 18: 241-248
- Meza TJ, Kamfjord D, Hakelien AM, Evans I, Godager LH, Mandal A, Jakobsen KS, Aalen RB (2001) The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Res* 10: 53-67
- Mitsuhara I, Shirasawa-Seo N, Iwai T, Nakamura S, Honkura R, Ohashi Y (2002) Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics* 160: 343-352
- Muskens MW, Vissers AP, Mol JN, Kooter JM (2000) Role of

- inverted DNA repeats in transcriptional and posttranscriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* 43: 243-260
- Pawlowski WP, Somers DA (1998) Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12106-12110
- Peach C, Velten J (1991) Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* 17: 49-60
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JNM and Kooter JM (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 11: 436-440
- Wang MB, Waterhouse PM (2000) High efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Mol Biol* 43: 67-82

(접수일자 2007년 10월 15일, 수리일자 2007년 11월 16일)