

종자 특이 프로모터와 대두 Ferritin 유전자에 의한 벼 종실의 철분강화

조용구^{1*} · 김형근¹ · 최장선² · 정유진² · 강권규²

¹충북대학교 식물자원학과, ²한경대학교 원예학과

Iron fortification of grains by introducing a recombinant gene of ferritin with seed promoters in rice

Cho, Yong-Gu^{1*} · Hyung-Keun Kim¹ · Jang-Sun Choi² · Yu-Jin Jung² · Kwon-Kyoo Kang²

¹Department of Crop Science, Chungbuk National University, 410 Seongbong-ro Heungdokgu, Cheongju, Korea

²Department of Horticulture, Hankyong National University, 67 Sukjong-dong, Ansung, Korea

ABSTRACT The recombinant DNAs, *pGBF*, *pGTF*, and *pZ4F*, using soybean ferritin gene have constructed with the promoters derived from seed proteins, glutelin, globulin, and zein. The recombinant ferritin genes were transformed into rice plant by *Agrobacterium*-mediated transformation. Iron contents and agronomic traits have been evaluated in the transgenic progenies. The embryogenic calli survived from second selection medium were regenerated at the rates of 19.2% with *pGBF*, 15.0% with *pGTF*, and 18.4% with *pZ4F* in Donganbyeon and 6.7% with *pGBF*, 11.7% with *pGTF*, and 3.4% with *pZ4F* in Hwashinbyeon. The introduction of ferritin gene in putative transgenic rice plants was confirmed by PCR and Southern blot analysis and also the expression of ferritin gene was identified by Northern blot and Western blot analysis. The iron accumulation in transgenic rice grains of the transgenic rice plant, T1-2, with zein promoter and ferritin gene contained 171.4 ppm showing 6.4 times higher than 26.7 ppm of Hwashinbyeon seed as wild type rice, but the transgenic plants with globulin and glutelin showed a bit higher iron contents with a range from 2.1 to 3.0 times compare to wild type grain. The growth responses of transgenic plants showed the large variances in plant height and number of tillers. However, there were some transgenic plants having similar phenotype to wild type plants. In the T1 generation of transgenic plants, plant height, culm length, panicle length, and number of tillers were similar to those of wild type plants, but ripened grain ratio ranged from 53.3% to 82.2% with relatively high variation. The transgenic rice plants would be useful for developing rice varieties with high iron content in rice grains.

서 론

철은 호흡이나 광합성, 질소고정, 세포분열 등과 같은 대사과정에서의 중요한 역할로 인해 사실상 모든 형태의 생물에 필수적인 요소이다. 철분(Fe^{2+})은 미량원소로서 적은 양이 필요하지만 인체에 있어서 헤모글로빈의 주성분으로서 성장 속도가 빠른 유아, 임신부 및 가임여성 등에 있어서 결핍은 매우 심각한 문제를 야기할 수 있다. 세계 보건기구에 의하면 전 세계 인구의 30%가 철분 결핍 빈혈을 가지고 있으며, 특히 취학 전 아동의 43%, 임신부의 51%, 학동기 아동의 37%에서 증상이 나타나고 있다 (WHO

1992). 벼를 주식으로 하고 있는 우리나라에서 쌀밥에서의 철분의 함량을 고려할 때에 임신부의 경우 20 mg/day 정도의 철분이 필요하나 벼에서는 단지 0.4 mg/100 g에 불과하므로 결핍현상이 초래되기 쉽다.

식물체내에서 ferritin은 철 저장단백질로서 철농도를 조절함으로써 살아있는 세포 내에서 중요한 역할을 하는데 (Theil et al. 1990), 첫 번째는 철을 ferredoxin이나 cytochrome 같은 철단백질의 합성을 위해 공급하는 것이며, 두 번째는 iron/dioxygen의 상호작용으로 인한 자유기로부터의 유해한 작용을 방지하는 역할을 하는 것이다. Ferritin 단백질의 세포 내 철 항상성에 있어서 중요한 점은 4,500개의 다량의 철 분자를 수용성, 생체 이용성, 무독성의 형태로 단백질 중앙 부위에 저장한다는 점이다 (Crichton et al. 1978; Harrison et al. 1989; Theil 1987).

*Corresponding author Tel 043-261-2514 Fax 043-273-2242

E-mail: ygcho@cbnu.ac.kr

Ferritin 유전자는 동물에 있어서 Dickey 등(1988)이 ferritin mRNA-specific trans-acting factors를 검출하였고, 그 후 ferritin 조절 단백질을 분리하고 클로닝하여 (Walden et al. 1989; Rouault et al. 1990), 보존된 조절 염기배열을 확인하였다(Leibold et al. 1988; Koeller et al. 1989). 식물에 있어서 ferritin 유전자는 콩(Ragland et al. 1990), 강낭콩(Spence et al. 1991), 완두콩(Lobreaux et al. 1991), 고추(Kim et al. 1998) 및 옥수수(Lobreaux et al. 1992)에서 분리되어 염기서열이 밝혀졌으며, 동식물 아미노산 서열과의 상동성도 분석되었다. 형질전환기술을 이용하여 ferritin 유전자를 작물로 도입한 연구는 Kim 등(1998)이 콩에서 유래한 ferritin 유전자를 고추에 형질전환하여 철분 함량을 높였으며, Kim 등(2001)은 상추에 ferritin 유전자를 형질전환 하였다. 그리고 일본의 Goto 등(1999)은 ferritin 유전자를 아그로박테리움을 이용한 형질전환 방법으로 벼에 도입하여 철분 함량이 일반 벼 보다 2.5배정도 높은 형질전환 벼를 얻었다고 보고하였다. 그러나 철분 함량이 낮은 품종을 사용하였으며, glutelin 프로모터를 사용하여 대부분의 철 단백질이 호분층에 저장되어도 정서 50% 정도가 제거됨으로 그 이용 효율이 낮았다.

형질전환법을 이용하여 외래 유전자를 식물에 도입한 후에는 도입 유전자가 안정적으로 발현되는 것이 가장 중요하다. Jones 등(1985)은 도입 유전자의 copy수와 발현수준에는 연관성이 없다고 하였으며, Finnegan 등(1994)은 도입 유전자가 두 개 이상 존재할 경우에는 도입 유전자의 발현이 정지할 경우가 많다고 하였다. 그리고 Vain 등(1998)은 형질전환된 작물 중 50% 정도가 세대를 거듭함에 따라 도입 유전자의 발현수준이 떨어지거나 정지하는 경향을 나타낸다고 하였다. 이는 형질전환 식물체의 육성에 큰 걸림돌이 되어왔다. 그러나 최근 Spiker와 Thompson(1996) 이 염색체 구조와 유전자 발현의 연관관계를 연구한 바에 의하면 염색체 상에 전사적 작용 domain과 전사적 비작용 domain이 존재하고 염색체상의 이러한 domain을 제한하는 부위가 있는데, 이를 MAR (matrix attachment region)라고 하였다. MAR는 염색체상의 도입부위에 관계없이, 혹은 도입 유전자의 수에 비례해서 유전자 발현을 안정적으로 유도한다는 사실이 동물세포 및 식물세포에서 보고되었다(Van et al. 1996; Miynarova et al. 1995). 이를 바탕으로 Jang 등(2003)은 발현 안정화에 기여하는 MAR를 형질전환용 운반체의 양쪽 board 안쪽 부위에 장착시켜서 도입 유전자의 안정적 발현을 유도할 수 있도록 운반체를 제작하였다. 또한 이 운반체는 제조제 저항성 유전자(bar)를 선발 마커로 사용했기 때문에 형질전환 식물체를 만든 다음에 선발을 용이하게 하는 특징이 있다.

종자를 이용하는 많은 작물들에 있어 유용 유전자를 종자 내에서 집중적으로 발현시키기 위한 가장 효율적인 방법은 종자내에서 특이적으로 발현하는 프로모터를 운반체에 사용하는 것이다(Wu et al. 1998). 유용 유전자의 발현을 조직 특이적으로 조절할 수 있고 또한 유용 유전자를 종자 내에서 집중적으로 발현시킬 수 있는 배유 특이 프로모터의 기능을 사용하면 많은 작물들에 있어서 유용 유전자의 기능을 종자에 집중시킬 수 있다는 이점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 벼와 옥수수의 종자 저장 단백질인

globulin, glutelin 및 zein으로부터 분리된 배유 특이 프로모터와 콩으로부터 분리된 ferritin 유전자를 결합하여 배유에서만 특이적으로 발현하는 운반체를 제작하고, 만들어진 운반체를 *Agrobacterium* 을 이용하여 형질전환 시킴으로써 고농도 철 단백질 생산 능력을 가진 벼 품종 육성을 위한 분자육종소재를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

RT-PCR에 의한 Ferritin 유전자 분리

RNA의 분리는 황금콩의 잎에서 Qiagen RNA mini Kit를 사용하여 RNA를 분리하였으며, Ferritin 유전자를 분리하기 위하여 콩 ferritin 유전자 염기서열 (Ragland et al. 1990)로부터 다음과 같은 primer (G-1: 5'-ATGGCTCTTGCTCCATCCAAAGTT-3', G-1R: 5'-TTGATCAAAGTGCCAAACACCGTG-3', G-2: 5'-GGCTATCAAGATT AAGCAG-3', G-2R: 5'-GGCTATTCAAGATTAAGCAG-3')를 합성하였다. RT-PCR (reverse transcription-PCR)은 mRNA를 역전사 반응시켜 cDNA로 만든 다음, 이 cDNA를 주형 DNA로 하여 RT-PCR 분석을 실시하였다. 즉, mRNA를 25°C에서 10분간 미리 반응을 실시한 후 42°C에서 30분간 역전사 반응시켰다. 99°C에서 5분간 다른 효소의 활성을 제거하고, 합성된 cDNA를 template로 하여 95°C에서 1분간 hot step, 95°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 4분간 extension 과정을 45 cycle로 하여 PCR 반응을 실시하였고, 1.5% 아가로스 겔 상에서 증폭된 밴드를 클로닝하여 염기배열을 확인한 후 이 DNA 단편을 벼에 형질전환을 위한 재조합 유전자의 제작에 이용하였다.

유전자 운반체 제작 및 형질전환

Globulin, glutelin(Wu et al. 1998) 및 zein(Scherthaner et al. 1988) 유전자의 프로모터와 콩에서 분리한 ferritin 유전자를 sense(S)와 anti-sense(R)로 연결하고 기본 벡터는 marker 유전자로 bar gene이 연결되어 있는 pMJ21 벡터(Jang et al. 2003)를 사용하였다. Ferritin 유전자의 형질전환을 위해 재조합된 유전자는 pGBF-S12, pGBF-R4, pGTF-S12, pZAF-S12, pZAF-R4로 이름을 붙였다.

Ferritin 유전자의 형질전환을 위해 재조합된 유전자를 포함하는 *Agrobacterium tumerfaciens* strain LBA4404를 spectinomycin 50 mg/L, tetracycline 50 mg/L가 첨가된 AB 고체배지(3 g/L K₂HPO₄, 1 g/L NaH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.15 g/L KCl, 0.01 g/L CaCl₂, 2.5 mg/L FeSO₄·7H₂O, 5 g/L NaCl 15 g/L agar, pH 7.2)에 접종하고 28°C에서 3일간 암배양하였다. 3일 후 AB 고체배지에서 증식한 *Agrobacterium*을 회수하여 acetosyringone(3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone)이 100 μM 포함된 AAM 액체배지(Hiei et al. 1994)에 희석한 후 계대배양한 캘러스를 10분 정도 침지시켰다. 접종된 캘러스는 멸균된 여과지로 여분의 수분을 제거한 후, 2N6-AS 배지에서 28°C의 암조건에서 3일간 배양하였다.

캘러스로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 250 mg/L의 cefotaxime이 포함된 멸균수에 캘러스를 세척하고, 4 mg/L의 phosphinotricin이 첨가된 1차 선발배지인 2N6-CP 배지로 계대배양 하였으며, 28°C 암상태에서 한 달간 배양하여 증식된 캘러스만을 선발 하였다. 1차 선발배지에서 살아남은 캘러스 중에서 새로 성장한 부분을 250 mg/L의 cefotaxime과 4 mg/L의 phosphinotricin이 첨가된 2차 선발배지 N6-7-CP로 옮겨서 28°C, 암상태에서 약 15일간 배양 하였다.

2차 선발배지에서 항생제 저항성을 나타내고, 왕성하게 자라는 캘러스를 선발하여 2-3등분해서 항생제가 포함된 MS-CP(Murashige and Skoog 1962) 재분화 배지로 옮겼다. 녹색체가 형성된 캘러스를 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 뿌리와 줄기의 분화를 유도하였다. 재분화를 위한 배양은 27°C, 3000 lux의 광조건 16시간, 암조건 8시간의 배양 조건에서 수행하였다. 재분화 배지에서 줄기와 뿌리가 정상적으로 분화된 개체만을 선발하여, 순화시킨 후 포트당 1주씩 이식하여, 인공환경조절실에서 재배하여 종자를 수확하였다.

DNA 추출, PCR 및 Southern analysis

벼 잎 1 g을 14 ml tube에 넣고, 액화질소를 이용하여 곱게 마쇄한 후 DNA추출 용액 (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM EDTA, Sodium bisulfate 0.38 g/100 ml) 1 ml를 첨가하여 유봉으로 잘 혼합한 후, chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 1 ml를 첨가하여 10분간 흔들어 잘 혼합한 다음 3,500 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 동일 양의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)를 첨가하여 10회 정도 흔들어 준 후, 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 1.5 ml tube에 옮긴 다음 2μl의 RNase(10 mg/l)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 2/3~1 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 응축시킨 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하여, 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 DNA를 풍건시킨 다음 70 μl의 TE에 DNA를 녹여서 PCR 분석에 사용하였다. 추출한 DNA를 10~50배로 희석한 다음 시료당 20 ng을 취하여 PCR 분석에 이용하였다. PCR에 사용한 primer는 *pGBF*, *pGTF*, *pZ4F*의 Bar 유전자 앞에 위치한 35S 프로모터 단편의 특이적인 DNA 증폭을 위하여 forward primer (5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 reverse primer (5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3')를 합성하여 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 hot step, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35 cycle 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 마지막 extension을 실시하여 증폭하였으며 1% agarose gel 상에서 35S 프로모터의 도입여부를 확인하였다.

위에서 추출한 10 μg DNA를 EcoRI 제한효소로 절단하였다. 절단된 DNA는 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, Sambrook과 Russell (2001)의 방법에 따라 nylon membrane에 고정시켰다. Probe

DNA는 Ladderlabelling kit (TaKaRa)를 이용하여 (α -³²P)dCTP로 방사선표지하였다. Hybridization은 Church와 Gilbert (1984)의 방법에 의하여 수행하였으며, hybridization을 마친 필터는 2X SSC/0.1% SDS용액으로 상온에서 2번 세척한 후, 0.1X SSC/0.1% SDS용액으로 상온에서 한번, 68°C에서 한번 세척하였다.

Northern blot 및 Western analysis

형질전환체의 ferritin 유전자의 발현량을 조사하기 위하여 개화 후, 30일 된 미숙 종자의 배유로부터 Total RNA를 추출하였다. 각 시료로부터 20 μg의 RNA를 1% agarose gel에 전기영동한 후, nylon membrane에 고정시켰다. Probe의 준비와 hybridization, filter의 세척은 기본적으로 Southern blot 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

Ferritin 단백질 정제 및 antibody의 작성은 cDNA Library로부터 full length ferritin 유전자를 expression vector에 삽입 후, *E. coli* 균주에서 생산하는 단백질을 재정제하여 Takara 社 (Japan)에 의뢰하여 monoclonal antibody를 작성하였다. Western blot analysis는 조직 및 생육시기별로 채취한 시료를 단백질 추출용액을 가하여 마쇄 후, 원심분리에 의해 단백질을 추출한 후, 10% acrylamide gel상에 SDS-PAGE를 수행하여 단백질 전용 나이론 membrane을 이용하여 blotting하였다. Ferritin 단백질의 분석은 Promega 社에서 시판되고 있는 항체와 본 실험에서 작성한 항체를 표식하여 밴드화하였다.

형질전환체들의 bialaphos 저항성 검증

Phosphinotricin이 포함된 배지에서 선발되어 재분화된 개체를 자식에 의하여 육성한 T1 세대의 식물체를 30일간 육묘하여 30 × 15 cm 간격으로 격리포장에 재배하여 등숙기에 pot에 이식한 후 시판되고 있는 비선택성 제초제인 바스타 (경농, 유효성분 20%)를 3 g/L의 농도로 살포하여 bialaphos에 대한 저항성을 조사하였다.

철분 함량의 측정

벼 알의 종피를 제거하고 현미를 유발에서 곱게 분쇄한 후 품종별로 0.5 g을 취하여 농황산 5 ml를 첨가하고, 시료와 황산을 잘 혼합 후, 24시간 실온에 방치하였다. 식물체의 분해시에는 분해를 촉진시키기 위하여 과산화수소를 조금씩 가하면서 시료가 맑고 투명하게 될 때까지 4~5시간 동안 분해하였다. 분해가 완료된 분해액을 Whatman No.2 여과지를 이용하여 100 ml mass flask에 여과시킨 다음 100 ml로 부피를 맞춘 후 무기성분 분석용액으로 이용하였다. Fe 함량의 분석시 0.45 μM membrane filter를 통과시켜 ICP로 분석하였다.

Ferritin 유전자 도입체통의 후대 육성 및 농업형질 조사

Agrobacterium tumefaciens 방법을 이용하여 ferritin 유전자를 형

질 전환 시킨 후 재분화된 T0 식물체들을 인공환경조절실에서 생육시킨 후 수확기에 종자를 수확하였으며, T1 계통은 형질전환에 사용한 동진벼 및 화신벼와 함께 포장에 4월 26일에 파종하고 5월 30일에 격리 포장에 이식하여 농촌진흥청 벼 표준재배법에 의하여 재배하였다. 모 품종인 동진벼와 화신벼를 대조 품종으로 하고 T1 형질전환 계통들의 초장, 간장, 수장, 분얼수 등을 조사하는 한편, 전체적인 초형을 비교하여 ferritin 유전자만 치환되고 다른 재배 특성은 모 품종과 동일한 새로운 품종을 선발하는 지표로 활용하였다.

결과 및 고찰

Ferritin 유전자 분리 및 형질전환용 벡터구축

콩에서 ferritin 유전자를 분리하기 위해 RT-PCR 분석을 실시하여 3개의 증폭된 밴드를 얻었고, 이들 클론을 pUC119 벡터에 클로닝한 후 염기서열을 조사한 결과 670 bp, 1,070 bp, 861 bp 였으며, 이들 각각의 유전자간 상동성은 97%로 매우 높았다(data not shown).

이중 가장 큰 클론인 rF2 1,070 bp의 염기서열을 분석한 결과 full-length의 ferritin 유전자를 얻을 수 있었다. 유전자의 발현이 시작되는 개시코돈(ATG)과 유전자 발현이 끝나는 종료코돈(TAG) 및 mRNA 뒤에 붙어서 유전자의 끝을 알리는 poly (A⁺) tail로 구성되어 있어서 분리한 ferritin 유전자는 ferritin 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열인 750 bp의 ORF(Open Reading Frame)를 포함하는 완전한 유전자임을 확인할 수 있었다.

Globulin, glutelin, zein 단백질에서 분리된 980bp 크기의 globulin 프로모터와 1.3 kb 크기의 glutelin 프로모터(Wu et al. 1998), 그리고, 933 bp 크기의 zein 프로모터 (Z4, Scherthner et al. 1988)와 콩으로부터 분리한 ferritin 유전자를 sense(S) 또는 anti-sense(R)로 결

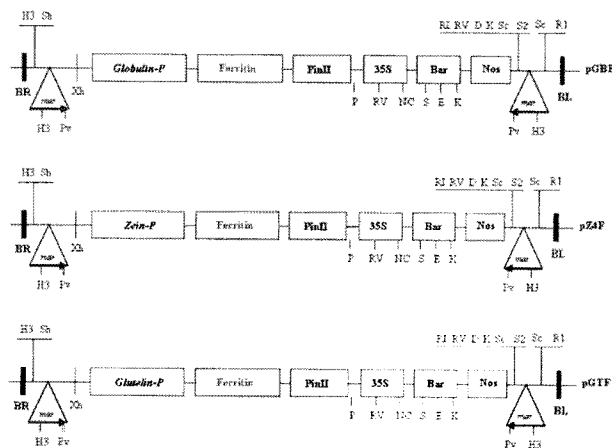


Figure 1. Vector construction of *pGBF*, *pGTF*, and *pZAF* with ferritin gene and globulin, glutelin, and zein promoter, respectively. Bar gene was included as a selection marker. *mar* sequence was used to enhance over-expression of ferritin gene

합하고 pMJ21 벡터(Jang et al. 2003)에 삽입하여 *pGBF-S12*, *pGBF-R4*, *pGTF-S12*, *pZAF-S12*, *pZAF-R4*를 제작하였다 (Fig. 1).

형질전환용 재조합 유전자를 작성할 때 벼가 아닌 콩 유래의 ferritin 유전자를 사용한 것은 형질전환 후대에 발생할 수 있는 유전자발현 저하의 문제(Finnegan et al. 1994)를 최소화하려는 것이고, 종자내에서 특이적으로 발현하는 프로모터를 운반체에 사용함으로써 ferritin 단백질을 종자 내에서 집중적으로 발현시킬 수 있는 종자 특이 프로모터의 기능을 사용하였다. 또한, MAR를 사용하여 염색체상의 도입부위에 관계없이, 혹은 도입 유전자의 수에 비례해서 유전자 발현을 안정적으로 유도(Van et al. 1996; Miynarova et al. 1996)하고자 하였다.

Agrobacterium을 이용한 Ferritin 유전자의 형질전환

동안벼와 화신벼 종자를 치상하여 유기한 캘러스를 이용하여 종자유래의 globulin, glutelin 및 zein 프로모터와 ferritin 유전자를 삽입한 *pGBF-S12*, *pGBF-R4*, *pGTF-S12*, *pZAF-S12*, *pZAF-R4* 재조합 DNA를 *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404 균주를 이용하여 형질전환시킨 후 항생제를 함유한 배지에서 선발하였다. 형질전환된 캘러스를 phosphinotricin 이 포함된 MS 배지 상에 치상하여 배양 3주 후부터 embryogenic 캘러스의 왕성한 성장을 보였고, 5주 후부터 캘러스에 녹색의 반점이 보이기 시작하였으며, 이들 캘러스를 MS기본배지에 옮겨 재분화를 유도하여 ferritin 유전자가 도입된 형질전환 재분화 식물체를 획득하였다 (Fig. 2-I).

2차 선발배지에서 phosphinotricin 항생제에 저항성인 캘러스를

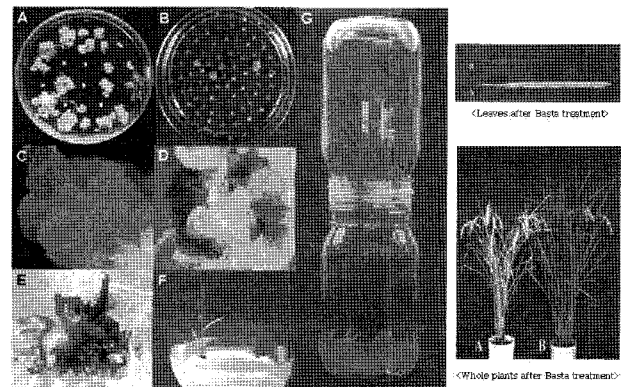


Figure 2. [I] Callus induction and regeneration of rice embryogenic calli after transformation of ferritin gene. (A) Three-week old scutellum derived calli used for co-cultivation with *Agrobacterium*, (B) Phosphinotricin resistant cell lines proliferated on N6-7-CP medium containing Phosphinotricin in 1 month after selection, (C) Transformed embryogenic callus, (D) Green spots in embryogenic callus, (E),(F) Regenerated transplanted rice plants with ferritin gene, (G) Transplanted rice plants in a large bottle for acclimatization [II] Growth inhibiting effect of bialophos in wild type and bialophos resistant rice plant. Transgenic and wild type plants were sprayed with 3g/L of Basta. (A) A transgenic plant survived after Basta spraying while (B) a wild type plant stopped growing and died

Table 1 Number of regenerated plants and regeneration ratios

Vector	Variety	No. of seeds inoculated	No. of transformant	Ratio (%)
<i>pGBF-S12</i>	Donganbyeo	60	12	20.0
	Hwashinbyeo	60	2	3.3
<i>pGBF-R4</i>	Donganbyeo	60	11	18.3
	Hwashinbyeo	60	6	10.0
<i>pGTF-S12</i>	Donganbyeo	60	9	15.0
	Hwashinbyeo	60	7	11.7
<i>pZ4F-S12</i>	Donganbyeo	60	9	15.0
	Hwashinbyeo	60	3	5.0
<i>pZ4F-R4</i>	Donganbyeo	60	13	21.7
	Hwashinbyeo	60	1	1.7

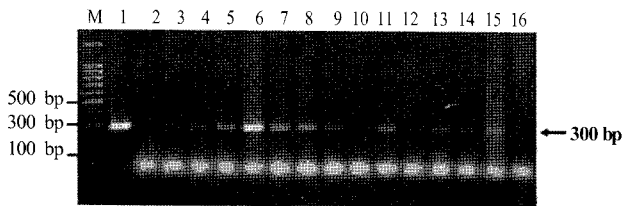


Figure 3. Amplification of ³⁵S promoters in putative transgenic rice plants by PCR

M : Molecular weight marker, 100bp DNA ladder, lane 1: Control-pMJ21 (³⁵S promoter), lane 2, 10, 12, 16: non-transgenic rice plants. lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15 : transgenic rice plants
 -lane 3, 7, 8 : *pGBF-R4* in Donganbyeo,
 -lane 4, 11: *pZ4F-S12* in Hwashinbyeo
 -lane 5, 15 : *pZ4F-S12* in Daeripbyeo
 -lane 6 : *pGTF-S12* in Hwashinbyeo
 -lane 9 : *pZ4F-R4* in Donganbyeo
 -lane 14 : *pGBF-S12* in Donganbyeo

재분화 배지에 이식하였을 때의 식물체 재분화율은 Table 1과 같다. Globulin 프로모터를 사용한 경우 ferritin 유전자를 sense로 삽입한 *pGBF-S12*에서는 동안벼에서 1차배지에 치상한 60개의 종자 중 12개의 클러스터에서 식물체가 재분화되어 20.0%의 재분화율을 보였으며 화신벼는 2개의 식물체가 재분화되어 매우 낮은 재분화율을 보였다. Ferritin 유전자를 antisense로 삽입한 *pGBF-R4*에서는 동안벼에서 1차배지에 치상한 60개의 종자 중에서 11개가 식물체로 재분화하여 18.3%의 재분화율을 나타내었고 화신벼에서는 6개의 재분화 식물체를 얻을 수 있었다.

Glutelin 프로모터의 경우 동안벼와 화신벼에서 각각 9개와 7개의 재분화 식물체를 얻어 15.0%와 11.7%의 재분화율을 보였다.

Zein 프로모터를 사용한 경우 ferritin 유전자를 sense로 삽입한 *pZ4F-S12*에서는 동안벼, 화신벼에서 각각 9, 3개의 재분화 식물체를 얻어 15.0%, 5.0%의 재분화율을 나타내었다. Ferritin 유전자를 anti-sense로 삽입한 *pZ4F-R4*에서는 동안벼에서 60개의 종자 중에서 13개가 재분화하여 21.7%의 재분화율로서 가장 높은 비율을 보였다. 전체 프로모터 별로는 모든 운반체의 경우에 동안벼에서 54개체가 재분화되어 재분화율이 가장 높았다.

형질전환 식물체와 wild type의 식물체를 pot에 이식한 후 시판

되고 있는 비선택성 제초제인 바스타를 3 g/L의 농도로 살포하고 2주 후에 관찰한 결과는 Fig. 2-II와 같다. Wild type의 화신벼의 잎은 살포 1주후부터 잎이 chlorosis가 일어나 고사하였으나, 형질전환 식물체는 외형적으로 아무런 피해를 받지 않고 정상적으로 생육이 가능하였다. 이러한 결과는 형질전환체에서 Bar 유전자가 정상적으로 발현되는 것을 보여주는 것이며 ferritin 유전자가 형질전환 벼에 도입되었음을 나타내고 있는 것이다.

PCR 분석에 의한 유전자 도입확인

Ferritin 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 73개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 일조직을 사용하여 전 DNA를 추출 후, ³⁵S 프로모터 부위의 특이 염기서열을 이용하여 primer를 합성하고 PCR 분석을 한 결과는 Fig. 3과 같다.

형질전환된 식물체에서는 PCR 증폭에 의해서 예상 크기인 300bp의 밴드가 증폭되었으나, 형질전환되지 않은 식물체의 경우에는 밴드가 보이지 않았다. PCR 분석에 의해 형질전환체로 확인된 개체수는 61개체로써 품종 및 프로모터별로 나누어 충북대학교 실험포장에 옮겨, Southern blot 분석 및 Northern blot 분석, Western blot 분석, 후대육성 및 철분함량을 측정하는데 이용하였다.

Southern blot 분석에 의한 형질전환체 분석

PCR 분석에 의해서 일차적으로 유전자 도입여부를 확인한 61개체 중에서 품종별 및 프로모터 별로 각각 3개체씩 선발하여 전 DNA를 추출 후, 제한효소 EcoRI로 절단한 후 Southern blot 분석을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다.

조사한 12개체 모두에서 ferritin 유전자의 예상 크기인 750 bp가 벼 염색체에 integration되어 있었으며, single copy (2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12) 및 two copy (1, 3, 8, 11)로 도입되어 있음을 확인할 수 있었다. 이들 결과로 볼 때 형질전환체의 확인은 PCR 분석에 의해 얻어진 data만으로는 신뢰할 수 없었는데, 이러한 결과는 PCR 반응상의 partial annealing에 의한 비특이적 염기서열의 증폭이나 polymerase

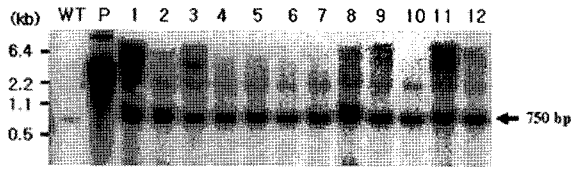


Figure 4. Southern hybridization of transgenic rice plants. Genomic DNA (5ug) was digested to completion with EcoRI. Gel blots were probed with ferritin ORF and washed at high stringency. WT; wild type plant, P; plasmid DNA, 1-3; ³⁵S-ferritin, 4-6; *pGTF*, 7-9; *pZAF*, 10-12; *pGBF*

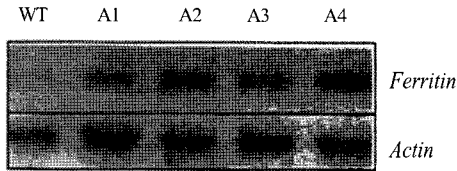


Figure 5. Northern blot analysis of organ and development stages in transgenic plant. Gel blots were probed with ferritin ORF (upper) and rice actin (lower) and washed at high stringency. WT: wild type control, A1: ³⁵S-ferritin, A2: *pGTF*, A3: *pZAF*, A4: *pGBF*. Upper photo: ferritin probe, Lower photo: rice actin probe

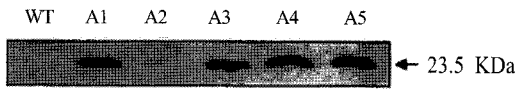


Figure 6. Immunodetection of ferritin protein in transgenic rice plants. WT: wild type plant, A1: ³⁵S-ferritin, A2-3: *pGTF*, A4: *pZAF*, A5: *pGBF*

의 부적절한 반응 등에 의하여 기인하는 것으로 생각된다.

Northern blot 분석에 의한 형질전환체의 발현조사

Southern blot 분석에 의하여 확인된 형질전환체를 대상으로 프로모터에 따라 조직특이적으로 유전자의 발현양상을 알아보기 위해 프로모터 별로 1개체씩을 선정하여 Northern blot 분석을 수행한 결과는 Fig. 5와 같다. 먼저 ³⁵S-ferritin이 도입된 형질전환체는 잎을 시료로 사용하였으며, *pGTF*, *pZAF* 및 *pGBF*이 도입된 형질전환체는 출수 30일 후, 성숙종자의 종피를 벗겨낸 종자를 시료로 사용하여 전 RNA를 추출하였다. 그 결과 형질전환 되지 않은 wild type에서는 ferritin 유전자가 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다. 또한 프로모터 간의 발현량은 ³⁵S-ferritin, *pZAF*의 형질전환체에서 거의 유사하였으며, *pGTF*, *pGBF*이 도입된 형질전환체에서는 높은 양으로 발현하고 있음을 알 수 있었다. 이들 결과로부터 ferritin 유전자가 본 연구에서 사용된 프로모터에 따라 발현시킬 수 있는 system이 확립하였음을 시사하였다.

Western blot 분석에 의한 형질전환체의 단백질 발현

변형질전환 식물체들에서 ferritin 단백질이 어느 정도 프로모터에 따라 발현하고 있는지를 조사하기 위하여 성숙한 잎(³⁵S-ferritin)

및 배유(*pGTF*, *pZAF*, *pGBF*)로부터 soluble protein을 추출하여 SDS-PAGE에 의해 분획한 후, 나이론 membrane에 옮겨 Western blot 분석을 실시한 결과는 Fig. 6과 같다. 그 결과 wild type과 형질전환 계통 중에서 한 개체만을 제외하고 ferritin antibody에 의하여 밴드가 검출되었다. 이는 도입된 ferritin 유전자가 사용된 프로모터에 의하여 mRNA로 전사되어, protein으로 번역이 이루어진 것으로 생각된다. 그러나 lane 2 (*pGTF*)의 경우 mRNA 수준에서는 전사가 되었으나, protein을 만드는 과정에서 변이가 일어난 것으로 예상할 수 있다. 이런 결과로부터 ferritin 유전자를 벼 세포내에 형질전환한 식물체들에서 종자 특이 프로모터에 의해 예상했던 ferritin 단백질이 안정적으로 발현하고 있음을 알 수 있었다.

변형질전환체 계통의 후대육성 및 농업형질

변형질전환체들의 생육상황을 비교한 결과 초장은 형질전환체에 따라서 많은 변이를 보였으며, 형질전환에 이용한 동안벼와 화신벼에 비하여 50%정도 감소한 왜성 식물체 및 이형 식물체의 출현도 보였다. 또한 분얼수에서도 상당한 영향을 보여 전혀 분얼을 보이지 않는 형질전환체도 출현하였다. 그러나 형질전환체 중에서 표현형적으로 대조품종과 거의 같은 식물체도 출현하였다. 이런 변이체들은 외래유전자의 도입에 따른 영향보다는 재분화 과정에서 식물 호르몬 등의 영향을 받은 체세포 변이 등의 유발에 의해 일어난 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 형태적으로 대조품종과 매우 유사한 형질전환체를 선발하여 후대계통 육성에 이용하였다.

T1 세대에서 형질전환체의 초장, 간장, 수장, 분얼수 및 등숙률을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

초장의 변이는 화신벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-2와 T1-11의 초장이 각각 108 cm와 112 cm로서 화신벼와 비슷하였으나, 동안벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-36과 T1-43은 초장이 103 cm로서 동안벼와 같았으나 T1-39와 T1-45는 초장이 각각 114 cm와 113 cm로서 동안벼 보다 약 10 cm 정도 컸다. 간장의 변이는 화신벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-2가 74.7 cm로서 화신벼보다 12.3 cm가 작았고 T1-11은 비슷하였으나, 동안벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 간장이 80.0~86.3 cm로서 동안벼보다 6~12 cm 정도 컸다. 수장의 변이는 화신벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-11이 19.2 cm로서 화신벼보다 1.2 cm가 컸고 T1-2는 비슷하였다. 동안벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 간장이 18.0~19.0 cm로서 동안벼에 비해 1 cm 이내의 변이를 보였다. 분얼수의 변이는 화신벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-2가 9.9개로 화신벼보다 2개가 적었고 T1-11은 비슷하였으나, 동안벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-43의 경우에만 동안벼와 같았고 나머지 3계통은 9.8~12.5개로 동안벼의 9.2개 보다 적었다. 출수기에 있어서는 모든 계통에서 이앙이 늦어져 다소 지연되었으나 8월 22~23일에 출수하여 모 품종인 화신벼, 동안벼와 같은 경향을 보였다. 등숙률의 변이는 화신벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-2

Table 2 Agronomic characters of transgenic plants which have higher iron contents at T1 generation

Line	Plant height (cm)	Culm length(cm)	Panicle length(cm)	No. of tillers(EA)	Heading Date	Ripened grain ratio(%)
Donganbyeo	103	74.2	18.0	12.0	8. 22.	83.0
Hwashinbyeo	110	87.0	19.0	15.0	8. 21.	85.0
T1-2(H)*	108	74.7	17.6	9.9	8. 23.	82.2
T1-11(H)	112	89.2	19.2	12.6	8. 22.	62.5
T1-36(D)	103	80.8	19.0	9.8	8. 23.	76.9
T1-39(D)	114	86.3	18.5	12.5	8. 23.	53.9
T1-43(D)	103	85.4	17.8	14.6	8. 22.	65.1
T1-45(D)	113	80.0	18.3	11.2	8. 23.	80.5

* H : Hwashinbyeo seeds were used for callus induction
 D : Donganbyeo seeds were used for callus induction

Table 3 Iron contents and ratios of rice grains of transgenic plants at T1 generation

Plant type	Line	Recombinant gene	Iron content (ppm)
Wild type	Donganbyeo	-	22.1±2.4
	Hwashinbyeo	-	26.7±0.8
Transformant	T1-2(H)*	pZ4F-S12	171.4±6.9
	T1-11(H)	pGBF-R4	55.5±0.6
	T1-36(D)	pGTF-S12	58.2±4.6
	T1-39(D)	pGBF-S12	62.6±4.3
	T1-43-1(D)	pGTF-S12	66.7±2.4
	T1-43-5(D)	pGTF-S12	65.5±4.0
	T1-45(D)	pZ4F-S12	60.9±0.9

* H : Hwashinbyeo seeds were used for callus induction
 D : Donganbyeo seeds were used for callus induction

는 82.2%로서 화신벼와 비슷하였으나 T1-11은 62.5%로서 화신벼보다 22.5%가 낮았다. 동안벼를 모 품종으로 사용한 경우에는 T1-45는 80.5%로서 동안벼와 비슷하였으나 T1-39는 53.9%에 불과하여 가장 낮았고 T1-36과 T1-43은 각각 76.9%와 65.1%로서 동안벼보다 6.1%와 17.9% 낮았다.

벼 형질전환체에서 종자 내 Fe⁺⁺ 이온함량의 분석

PCR 분석 및 dot blot hybridization 분석에 의해 배유특이적인 globulin, glutelin 및 zein 프로모터와 ferritin 유전자를 삽입한 pGBF, pGTF, pZ4F 재조합 유전자를 *Agrobacterium* 법에 의해 도입한 형질전환체 중에서 ferritin 유전자의 도입이 확인된 pGBF, pGTF, pZ4F 유래의 형질전환 계통의 종자를 가지고 벼 종자내에 축적된 철함량을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

벼 종자의 배유내에서 발현할 수 있는 globulin, glutelin 및 zein 단백질의 프로모터를 사용하여 ferritin 유전자 운반체를 작성하였으며 화신벼 종자에서 유래한 배발생 캘러스에 ferritin 유전자를 형질전환한 결과 형질전환 전에 종실 내에 철분함량이 26.7 ppm이었던 것을 zein 프로모터를 사용한 T1-2에서는 171.4 ppm으로 증가시켜 wild type과 비교하여 6.4 배의 철분함량 증가를 이루었고 globulin을 프로모터를 사용한 T1-11에서는 55.5 ppm으로 증가시켜 wild type과 비교하여 2.1 배의 철분함량 증가를 이루었다. 동안벼 종자에서 유래한 배발생 캘러스에 ferritin 유전자를 형질전환한 결과

형질전환 전에 종실 내에 철분함량이 22.1 ppm이었던 것을 glutelin 프로모터를 사용한 T1-36에서는 58.2 ppm, T1-43-1에서는 66.7 ppm, T1-43-5에서는 65.5 ppm으로 증가시켜 wild type과 비교하여 각각 2.6 배, 3.0 배, 3.0 배의 철분함량 증가를 이루었고, globulin을 프로모터를 사용한 T1-39에서는 62.6 ppm으로 증가시켜 2.8 배의 철분함량 증가를 이루었으며, zein 프로모터를 사용한 T1-45에서는 60.9 ppm으로 증가시켜 2.8 배의 철분함량 증가를 이루었다.

상기와 같이 형질전환 벼의 종자에서 높은 철분함량의 증가를 나타낸 것은 형질전환용 재조합 유전자를 작성할 때에 형질전환 후대에 발생할 수 있는 유전자발현 저하의 문제 (Finnegan et al. 1994)를 최소화하려는 의도로 벼가 아닌 비교적 원연관계의 콩 유래의 ferritin 유전자를 사용하였고, 또한, MAR를 사용하여 염색체 상의 도입부위에 관계없이, 혹은 도입 유전자의 수에 비례해서 유전자 발현을 안정적으로 유도 (Van et al. 1996; Miynarova et al. 1996) 하고자 하였으며, 종자내에서 특이적으로 발현하는 프로모터를 운반체에 사용함으로써 ferritin 단백질을 종자 내에서 집중적으로 발현시켜 종자내 철분함량의 증진을 꾀한 결과로 해석할 수 있다.

적 요

Ferritin 유전자를 벼의 저장기관인 배유에 특이적으로 발현시킬 수 있는 glutelin, gGlobulin 및 zein 프로모터를 활용하여 쌀알에 채대로 발현시켜, 고부가가치를 가진 가공용 벼 품종을 육성하여 천

연의 철 성분이 강화된 유아용 이유식 생산에 이용할 수 있으므로 유아들에게 천연의 철분을 안정적으로 공급할 수 있는 형질전환체를 육성하였다. 종자 저장단백질인 glutelin, globulin 및 zein의 프로모터와 ferritin 유전자를 pMJ21 vector에 *pGBF*, *pGTF* 및 *pZ4F* 등의 Ti-plasmid를 *Agrobacterium*에 도입하여 동안벼와 화산벼에 형질전환 하였다. 동안벼 종자를 사용하였을 때 *pGBF* 재조합 유전자는 19.2%, *pGTF*는 15.0%, *pZ4F*는 18.4%가 재분화되었고, 화산벼 종자를 사용하였을 때에는 *pGBF* 재조합 유전자는 6.7%, *pGTF*는 11.7%, *pZ4F*는 3.4%가 재분화되었다. 형질전환 벼의 ferritin 유전자의 도입여부는 PCR 분석과 Southern 분석으로 확인하였으며 ferritin 유전자의 유전자 발현은 Northern 및 Western 분석에 의해 확인하였다. Southern blot 분석 결과로부터 각각의 배유특이 프로모터 유래 형질전환체 중에서 single copy로 도입된 개체를 선발 할 수 있었다. 또한 이들 형질전환 계통들에서 도입유전자의 발현량은 wild type 벼에 비하여 매우 높게 나타났다. 또한 철 단백질의 철분 축적 정도를 분석한 결과 Zein 프로모터를 사용한 형질전환 계통 (T1-2)에서 171.4 ppm으로 wild type과 비교하여 6.4 배의 철분함량 증가를 보였다. 그러나 globulin 및 glutelin 프로모터 유래 형질전환체에서는 wild type과 비교하여 2.1~3.0 배의 철분함량 증가를 보였다.

벼 형질전환체들의 생육상황을 조사한 결과 초장은 변이 폭이 매우 크게 나타났으며, 대조품종과 비교하여 50%정도 감소한 왜성 및 이형 식물체도 출현되었다. 따라서 본 연구에서는 형질전환체 중에서 표현형적으로 대조품종과 거의 같은 식물체를 선발하여 후대를 육성하였다. 육성한 T1 세대에서 형질전환체의 초장, 간장, 수장, 분얼수 및 등숙률을 조사한 결과 초장, 간장, 수장, 분얼수에 있어서는 대조 품종과 큰 변이를 보이지 않았으나 등숙률에 있어서는 53.3~82.2%의 비교적 큰 변이를 나타내었다.

사 사

본 연구는 농림기술개발사업 및 농촌진흥청 아젠다 2-7-11의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Church GM and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81:1991-1995
- Crichton R. R, Ponce-Ortiz Y, Koch MHJ Parfait R, Stuhmann HB (1978) Isolation and characterization of phytoferritin from pea and lentil. Biochem J 171:349-356
- Dickey LF, Wang YH, Shull GE, Wortman IA, Theil EC (1988). The importance of the 3'-untranslated region in the translational control of ferritin mRNA. J Biol Chem 263:3071-3074
- Finnegan J. and McElroy D. (1994) Transgene inactivation: plants fight back. Bio/technology 12:883-888
- Goto, F, Yoshihara, T, Shigemoto, N, Toki, S, Takaiwa, F. (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nature Biotech 17:282-286
- Harrison PM, Artymiuk PJ, Ford GC, Lawson DM, Smith JMA, Treffry A, White JL (1989) Function and structural design of an iron-storage protein. In: Mann S, Webb J, Williams RJP (eds) Biomineralization: Chemical and Biomedical perspectives, pp 257-294. VCN, Weinheim
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant J 6:271-282
- Jang I-C, Park Y-M, Song SI, Kwon HJ, Nahm BH, Kim J-K (2003) Structure and expression of the rice class-I type histone deacetylase genes *OshDAC1, 2* and *3*. *OshDAC1* overexpression in transgenic plants leads to increased growth rate and altered architecture. Plant J 33:531-541
- Jones JDG, Dunsmuir P, Bedbrook J (1985) High level of expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. EMBO J. 4:2411-2418
- Kim YH, Lee YO, Nou IS, Kang HW, Kameya T, Sait T, Kang KK (1998) Isolation and characterization of a cDNA (Fp1) encoding the iron storage protein in red pepper. Plant Res 1(1):6-10
- Kim, Seong Ha, Il Sup Nou, Chang Sun Choi, Kwon Kyoo Kang (2001) Transformation of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) Using Iron Storage Protein. Korean J Plant Tissue Culture 28(3):147-151
- Koeller DM, Casey JL, Hentze MW, Gerhardt EM, Chan LN, Klausner RD, Harford JB (1989) A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 86:3574-3578
- Leibold EA, MunrHN (1988) Cytoplasmic protein binds in vitro highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy and light subunit mRNAs. Proc Natl Acad Sci USA 85:2171-2175
- Lobreaux S. and Briat J. (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. Biochem. J. 274:601-606
- Lobreaux S, Massenet O. and Briat J. (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. Plant Molecular Biology 19:563-575
- Mlynarova L, Jansen RC, Conner AJ, Stiekema WJ, and Nap JP (1995) The MAR-mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy number dependent expression in transgenic plants. Plant Cell 7:599-609
- Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:474-497
- Ragland M, Briat JF, Gagnon J, Laulhere JP, Massenet O, Theil EC (1990) Evidence for a conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. J. Biol Chem 265:18339-18344
- Rouault TA, Teng CK, Kaptain S, Burgess WH, Haile DJ, Samanieg F, Mc Bridge OW, Harford JB, Klausner RD (1990) Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein-the human iron-responsive element-binding protein. Proc Natl Acad Sci USA

- 87:7958-7962
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Scherthamer, J.P., Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M. (1988) Endosperm-specific activity of a zein gene promoter in transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 7:1249-1255
- Spence MJ, Henzl MT, Lammers PJ (1991) The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage ferritin. *Plant Mol Biol* 117:499-504
- Spiker, S. and Thompson, W.F. (1996) Nuclear Matrix Attachment Regions and transgene expression in plants. *Plant Physiol.* 110:15-21
- Theil EC (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu Rev Biochem* 56:289-315
- Theil EC (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 265:4771-4774.
- Vain P, Worland B, Clarke MC, Richard G, Beavis M, Kohli A, Leech M, Snape JW, Atkinson H and Christou P (1998) Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I Δ d86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theoretical and Applied Genetics* 96:266-271
- Van Cam, W, Capiou K, Van Montagu M, Inze´ D, Slooten L (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol* 112:1703-1714
- Walden WE, PatinMM, Gaffeld L (1989) Purification of a specific repressor ferritin mRNA translation from rabbit liver. *J Biol Chem* 264:13765-13769
- WHO (1992) The prevalence of anemia in women: a tabulation of available information. 2nd ed. WHO/MCI-I/MSM 92.2. Geneva: WHO, Wu, Chuan-Yin, Adachi T, Hatano T, Washida H, Suzuki A and Takaiwa F. (1998) Promoters of Rice Seed Storage Protein Genes Direct Endosperm-Specific Gene Expression in Transgenic Rice. *Plant Cell Physiol* 39:885-889

(접수일자 2008년 11월 11일, 수리일자 2009년 1월 10일)