

한국 배추 기능유전체 연구의 현황

유재경 · 박지현 · 박영두

Current status of *Brassica rapa* functional genome research in Korea

Jae-Gyeong Yu · Ji-Hyun Park · Young-Doo Park

Received: 5 April 2010 / Accepted: 12 April 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The purpose of functional genome research is to identify biological function of useful gene and to give an agricultural value in plant biotechnology. *Brassica rapa* is an economic crop which recorded 1,000 billion won of domestic market and 100 million dollar of exports and it produces 2.5 million ton in 50,000 ha as a major ingredient of representative Korean food, *Kimchi*. Furthermore, it is very important crop economically and commercially because Korea is major seed exporter. The fact that Multinational Brassica Genome Project (MBGP) was launched and *Arabidopsis thaliana*, affiliated to same genus with *B. rapa*, has been fully sequenced activated functional genome research of *B. rapa*. Besides new technologies related to gene function analysis keep developing, many results are reporting every year by international research including Korea. This review paper introduces development of Chinese cabbage mutants which is a first step in functional genome research, variant phenotypes of mutants, flanking DNA analysis in *B. rapa* genome, gene identification, gene analysis using microarray, and representative researches.

Keywords *Brassica rapa*, functional genomics, insertional mutagenesis, microarray

서론

주요 채소작물은 주로 고전적인 방법에 의해서 육종이

이루어지고 있으나 시간과 노동, 비용이 많이 소요되기 때문에 분자육종기술을 이용하여 단기간에 새로운 특성을 가진 다양한 품종을 육성할 수 있는 기술개발이 시급히 요구된다. 유용형질을 지닌 품종 개발에 이르기 위해서는 생명공학 기술을 이용한 유용유전자의 확보가 우선이다. 생명공학 발전에 있어 중요 연구분야인 유전체 연구는 전세계적으로 활발히 이루어지고 있으며 현재까지 인간을 비롯한 다양한 생물 중에서 분석이 완료된 상태이다. 우리나라에서는 2003년부터 고등식물의 한 종류이며 유전학적으로나 육종학적으로 유용한 배추과 (*Brassica*) 작물을 대상으로 유전체 연구를 진행하고 있다.

배추과 작물에는 겨자 (*Brassica carinata*), 유채 (*B. napus*), 갓 (*B. juncea*), 꽃양배추 (*B. oleracea*), 배추 (*B. rapa*) 등이 속해 있다. 배추 유전체 연구는 전체 DNA의 염기서열을 해독하여 모든 유전자의 위치 및 구조 (배추 통합물리지도 작성)를 밝히는 구조유전체 연구와, 유전자 발굴과 유전자의 발현 양상을 조사함으로써 유전자와 유전자 산물인 단백질들의 상호작용 및 식물의 생장과 생식에 관여하는 모든 유전자들의 역할을 밝히는 기능유전체 연구로 나뉘어 진다. 이 중 기능유전체 연구는 유전자의 완전한 염기서열을 확보하고 형질전환 방법이나 돌연변이체 등을 이용하여 유전자 기능을 분석하고, cDNA 분석과 유전자 칩 제작 및 활용을 통해 배추의 생장 중의 다양한 시기와 조직별로 발현되는 유전자를 모두 모아 정보를 분석 (microarray 분석)하고 유전자의 기능 연구에 응용한다. 우장춘 박사의 ‘종의 합성’ 이론 (U’s triangle)에서 알 수 있듯이 배추는 다양한 유용 작물과 높은 연관 관계를 형성하고 있으므로 배추 유전체 연구는 이 작물들과의 비교유전체학 (comparative genomics) 연구분야에 있어서도 큰 기여를 할 수 있을 것이다. 한편 유용한 중요 형질 또는 유전자와 관련된 표지들을 개발하여 육종방법을 쉽고 빠르게 정확하도록 하는 효과도 기대할 수 있다.

J.-G. Yu · J.-H. Park · Y.-D. Park (✉)
경희대학교 생명과학대학 원예생명공학과
(Department of Horticultural Biotechnology, Kyunghee University, Yongin 446-701, Korea)
e-mail: ydpark@khu.ac.kr

연구에 사용된 한국배추 (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis*)는, 전체 유전체 크기가 식물유전체 연구 모델인 *Arabidopsis* 보다는 약 4배 정도 큰 약 530 Mb이지만 다른 배추과 식물 (약 530 ~ 700 Mb)에 비해 비교적 작은 유전체 크기이므로 연구에 용이하다. 그리고 게놈 염기서열 분석이 완료된 벼 (Goff et al. 2002)와 *Arabidopsis* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) 중 *Arabidopsis*와 매우 밀접한 관계를 가져 효율적으로 *Arabidopsis*의 유전정보를 이용할 수 있어 유리하다. 또한 기능유전체학 연구 (Holtorf et al. 2002; Ge et al. 2003)에 있어 효율적으로 이용되는 ESTs (Expressed Sequence Tags) 및 microarray 분석 등은 유전자 기능 규명에 필수 기술로서 현재도 계속 발전해 나가고 있다.

사회적인 측면을 보면 농산물 수입개방 등 국내·외의 농업사정이 급변하고 최근에 들어 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이룸에 따라 국민 총생산액 중 농업 부문의 비중이 점차 감소하고 있으며 농민들의 농업에 대한 의욕도 점차 감소하고 있는 추세이다. 배추 역시 예외는 아니나, 고품질 배추를 생산할 수 있는 유용유전자의 확보와 이에 수반되는 생명공학기술을 발전시키면 배추 생산 농가의 소득 증대에 기여함과 동시에 이농을 막고 농업에 대한 애착심과 긍지를 갖게 해 줄 것이다. 또한 FTA (Free Trade Agreement) 확대에 따른 막대한 자본과 기술을 앞세운 외국기업들이 국내 시장에 진출하여 국내 농업 및 관련 업체에 큰 변화를 가져오고 있다. 이에 대처해 고품질 배추 육성과 관련된 유용유전자를 자체적으로 분리, 개발하여 특허권을 확보하는 등의 생명공학기술을 발전시켜 외국과 경쟁해야 한다. 최근 국제적으로도 각광을 받고 있는 생명공학 산업에 대한 국민들의 관심이 고조되고 있다는 점에서 배추 구조유전체 연구와 더불어 기능유전체 연구가 동시에 진행되어 공을 거둔다면 국내의 배추 분자유종연구에 기여할 수 있을 것이다. 또한 국제적으로도 배추 연구에 주도적인 역할을 하는 농업생명공학 기술 선진국이라는 긍지를 가질 수 있다.

본 총설은 그 동안의 배추 기능유전체 연구의 진행을 검토 하는데 있어 주로 유전자의 단편을 삽입함으로써 유전자의 일부 혹은 전부를 파괴하여 유전자가 가지고 있는 고유의 기능이 사라지게 하는 삽입돌연변이체유발 (insertional mutagenesis)을 통한 gene tagging 방법을 제시하고 다양한 표현형의 돌연변이체와 이 돌연변이 배추의 게놈 내 flanking DNA 분석 및 유전자 동정, microarray를 이용한 유전자 분석, 대표적인 기능유전체 연구 사례를 제시하고자 하였다.

기능유전체 연구 재료

우장춘 박사의 U's triangle에 의해 밝혀졌듯이 *B. rapa*

L. ssp. *pekinensis* 아종은 AA형 게놈을 가지며 유전체 크기 또한 약 530 Mb로 작아 기능유전체 연구에 있어 이점을 가진다 (Choi et al. 2006). 이는 농촌진흥청 BioGreen 21 사업의 일환으로 *Brassica rapa* Genome Project (BrGP)의 재료로 이용되었으며 Multination *Brassica* Genome Project (MBGP)와 *Brassica rapa* Genome Sequencing Project (BrGSP)로 이어졌다. 또한 MBGP와 BrGSP의 유전체 연구 결과는 www.brassica-rapa.org를 통해 공개되어 있다.

배추 돌연변이체 유기

다양한 돌연변이체 유기 방법들이 존재하지만, 분석의 용이함을 위한 적은 수의 T-DNA가 삽입될 가능성이 높은 *Agrobacterium*을 이용한 간접 형질전환방법이 배추를 비롯한 식물체 돌연변이 유기에 많이 이용되고 있다. 그러나 배추는 고추, 무와 함께 형질전환이 어려운 작물 중에 하나로서 그 성공률이 약 2-3% 정도이다. 일반적으로 배추는 종자 파종 후 7일 정도 지난 어린 식물체에서 자엽을 이용한 형질전환 방법과 하배축을 이용한 형질전환 방법으로 구분되지만 재료의 종류만 다를 뿐 전체적인 방법은 비슷하다 (Lee et al. 2004; Kim et al. 2006b; Yu et al. 2010).

또한 애기장대와 벼에서 성공을 거둔 전이인자 (transposable element)를 이용한 삽입돌연변이 집단的大量 유기 방법을 배추에 적용한다면 기능유전체 연구에 필요한 재료를 확보하는데 크게 기여할 수 있을 것이다. 이와 관련하여 배추에서 *Ac/Ds* 전이인자 시스템 (Activation/Dissociation transposon system) 적용에 대한 연구가 본 연구팀 (www.pmglab.com)에 의해 진행되고 있다.

배추 돌연변이체 표현형 분석

T-DNA가 배추 게놈 내에 무작위로 삽입됨으로써 유전자의 일부 혹은 전부를 파괴하여 유전자가 가지고 있는 고유의 기능이 사라지게 되어 나타나는 형질변화를 관찰하고 이러한 돌연변이체를 분석하여 관련 유전자를 동정할 수 있다. T-DNA의 삽입이 확인된 T₀ 돌연변이체를 순화시키고 저온 처리는 최소 5°C 이하의 온도를 유지해 약 45 ~ 50일 정도로 처리한 뒤 배추의 자가불화합성을 고려하여 뇌수분 (bud pollination)을 이용해 교배하고 각각의 특성을 파악한다. T₀ 돌연변이체로부터의 돌연변이체 관찰은 주요 목표 형질 (웅성불임 등)을 목표로 그 특성에 맞추어 선발되며 그 외의 형질들은 일반적으로 농촌진흥청 종자관리소에서 발행한 작물별 특성 조사 요령 (식물체 크기, 외엽의 크기 및 모양, 앞면의 요철 등 총 30가지 특성)에 맞추어 조사된다. 이러한 방법으로 조사된 T₀ 돌연변이체들은 고유의 형질이 다음 세대에 계속 전해지는 지를 확인하기 위해 최소 T₂ 세대까지 온실 및 노지에서 진전시켜 그 표현형을 관찰하게 된다 (Fig. 1).

T-DNA의 삽입 위치가 정해져 있지 않음은 다양한 형태의 돌연변이체가 생산됨을 통해서도 확인할 수 있다. 육종학적 측면에서는 배추가 자가불화합성임에도 불구하고 자가화합 및 응성불임 현상을 보이는 개체들, 작물 생육 측면에서 철, 망간 등의 결핍으로 엽록소가 감소하여 카로티노이드계 색이 나타나는 황백화 현상으로 생장이 억제된 개체, 다른 배추에 비해 추대시기가 빠른 개체 등이 관찰되었다. 그리고 작물 형태 측면에서는 외엽이 완전히 땅에 달라붙어 성장하는 로제트 (rosette)형 개체, 잎 표면에 털이 없는 무모 개체, 결구외엽의 결각이 마치 무처럼 자라는 개체, 식물체의 본엽이 좁아지고 (세엽현상) 액아들이 많이 붙어 마치 판엽계 열무형태의 잎이 많은 개체, 화기의 크기가 크거나 작은 개체, 꽃잎이 주름진 개체 등 다양한 돌연변이체가 관찰되었다.

한편, 돌연변이 현상이 실제 T-DNA 삽입에 따른 유전자의 기능 억제 및 파괴에 의해 이루어졌음을 명확히 하기 위해서는 돌연변이체의 염색체 배수성 분석 (polyploidy analysis)을 통해 조직배양이나 형질전환과정에서 발생한 돌연변이 현상을 배제하고 유전자 수준에서의 변화인지를 분석하여야 한다 (Gottlieb 2003; Chen 2007).

Flanking DNA 분석

T-DNA 삽입으로 유전자의 기능을 파괴함으로써 그 기능을 역추적하기 위해서 우선 T-DNA 삽입 위치 즉, 기능이 파괴된 유전자가 무엇인지 알아야 한다. 표현형이 비형질전환체와 뚜렷한 차이를 보이며 Southern blot 분석 결과 적은 수의 T-DNA가 삽입되었고 염색체 수가 $2n = 20$ (Lagercrantz and Lydiat 1996)인 돌연변이체가 분석에 용이하며 그 방법으로는 plasmid rescue, inverse PCR 및 tail-PCR 등이 있다. 염기서열 확인은 T-DNA 내의 sequencing primer들을 이용하고, 획득한 염기서열은 NCBI (National



Fig. 1 Phenotype analysis of *B. rapa* mutants

Center for Biotechnology Information) database의 BLASTN, BLSATX 분석과 배추 EST (Expressed Sequence Tags) database (www.brassica-rapa.org)와 상동성 비교를 통해 동정한다 (Table 1). 또한 flanking DNA는 *B. rapa* BAC clone sequences database (www.brassica-rapa.org)와 비교하여 배추 염색체내에서 유전자좌를 표시하고 이는 기능유전체학 연구에 중요한 초석이 될 수 있다 (Lim et al. 2005, 2007; Kim et al. 2006a).

실제로 3000개 이상의 삽입돌연변이체를 보유한 본 연구팀에서는 pCambia 1301 vector와 pBluescript II KS (+) vector를 결합한 형태로, plasmid rescue와 inverse PCR이 모두 가능한 pRCV2 vector를 제작하여 (Kim et al. 2003) 배추 기능유전체 연구를 진행하고 있다. 확보된 flanking DNA는 *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* 등에서 다양한 유전자와 높은 상동성을 보였다 (Yu et al. 2010).

MSAP를 이용한 유전자 동정

식물체의 유전자 발현을 조절하기 위해서는 알맞은 methylation pattern의 유지가 필요하며, 이를 위해 초기에 methylation 되어있지 않은 DNA에 methylation을 일으키는 과정과 함께 고정된 pattern을 유지하는 형태의 상보적인 시스템이 필요하다. 식물에서 DNA methylation은 genome DNA의 CpG 또는 CpNpG 염기의 시토신 (cytosine)에 메틸기 (methyl group)가 결합하는 것으로 이 과정에 의해서 식물의 발달을 조절하고, 전체 게놈의 순수한 유전정보를 유지하는 등의 유전자 조절이 가능하게 된다 (Cedar 1988; Bestor and Coxon 1993; Chiang et al. 1996). Methyltransferase 유전자 발현을 억제함으로써 유발될 수 있는 methylation pattern의 변화를 관찰하고 변화에 의해 조절되는 것으로 추정되는 유전자를 동정하기 위해 MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) 방법이 이용된다. MSAP 기법은 기존 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 방법에 methylation sensitive enzyme를 도입함으로써 목표 식물체의 genomic DNA 상에서 나타나는 methylation pattern를 관찰하고 hypermethylated pattern의 대조군과 비교하여 변화된 band의 염기서열을 분석함으로써 methylation 정도에 따라 변화된 유전자를 찾아 내는 방법이다 (Jaligot et al. 2004; Baurens et al. 2008; Oh et al. 2009).

발현 조절 vector를 이용한 유전자 기능 구명

유용 유전자의 분리가 가능해 짐으로써 분리된 유전자의 기능을 연구하기 위해 식물형질전환용 발현벡터가 발명되었다. 이 벡터는 유전자를 삽입하여 식물체내에 전

Table 1 Comparison with T-DNA tagged flanking sequence and *Brassica rapa* uni-gene EST sequence by BLASTX algorithm

Mutant Line No.	Hit to <i>B. rapa</i> EST	Matched analysis			Putative Identity ^z
		E-Value	Bit score	% identity	
51	KHCT-23F01	100	486	96	ACO1 (ACC OXIDASE 1); 1-aminocyclopropane-1-c arboxylate oxidase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
82	Brapa_Ctg3668	14	77.8	100	ABC2 homolog 11 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
300	Brapa_Ctg508	81	299	93	NOP56 (<i>arabidopsishomolog</i> of nucleolar protein NOP56)
516	Brapa_Ctg14603	100	1289	98	hypothetical protein (<i>Vitis vinifera</i>)
560	KBAY-12B02	10	65.9	90	cinnamoyl-CoA reductase-like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
588	KBCG-153A02	19	95.6	96	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
608	KHLW-01E04	100	377	98	deoxycytidine deaminase (<i>Brassica oleracea</i>)
730	Brapa_Ctg14190	100	1007	99	putative senescence-associated protein (<i>Pisum sativum</i>)
864	KFRT-015D03	14	77.8	88	zinc-binding protein, putative / protein kinase C inhibitor, putative (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
888	Brapa_Ctg9111	42	170	98	putative CCAAT-box binding transcription factor (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
932	KFRT-032B12	76	283	99	nucleotide binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
1171	KBFS-112A09	15	81.8	88	PGP11 (P-GLYCOPROTEIN 11); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

^z Location of sequences highly similar to the T-DNA flanking sequences relative to known *Brassica rapa* uni-genes as determined using GenBank annotation, search Conserved Domains or BLASTX searches

달되어 DNA가 mRNA로 발현하게 된다. 강력한 프로모터인 Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)의 35S promoter 발견으로 식물에서의 형질전환을 가능하게 하였다(Odell et al. 1985). 과발현(over-expression)벡터를 이용한 식물형질 전환은 식물체 내부의 유전자로부터 분리된 유전자를 다시 삽입함으로써 목표 유전자의 과발현을 유도하게 되고, 최종적으로 그 유전자와 관련된 내부의 대사과정을 조절할 수 있게 된다.

유전자의 발현을 억제하는 방법에는 크게 2종류로 나뉜다. 즉 전사과정에서 DNA가 mRNA로 전사되지 않는 silencing과정을 TGS (Transcriptional Gene Silencing)와 전사 후 mRNA의 번역을 억제하는 PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing)로 구분되어진다. 1998년 *Caenorhabditis elegans*에서 RNA interference 현상이 Andrew Fire와 Craig C. Mello에 의해 처음 발견되어 유전정보의 흐름을 제어하는데 근본적인 메커니즘을 규명했다. RNAi란 dsRNA가 dicer라는 효소에 의해 siRNA로 분해되면서 RISC (RNA-induced Silencing Complex)라는 단백질 복합체에 결합하게 되고 이 복합체가 상보적인 목적 mRNA에 결합하면 mRNA가 분해되어 자극하여 단백질의 발현을 억제하는 PTGS 현상 중 하나이다 (Fire et al. 1998). RNAi 현상을 이용한 pHANNIBAL (Wesley et al. 2001)과 GATE-WAY 벡터 시스템 (Curtis and Grossniklaus 2003)이 개발되어져 유전자의 일부서열을 삽입하여 식물체내에 전달되면 유전자의 mRNA가 분해되어 그 기능을 억제하게 된다 (Mark와

Ueli 2003).

Microarray 분석

생물체의 생리 변화는 다양한 유전자의 발현 양상 변화와 함께 발생하므로 이를 동시에 분석할 수 있는 microarray 분석 방법은 유전자 발현 및 기능 분석에 있어 매우 효율적이다. DNA chip은 제한된 수의 발현 분석 비교만이 가능한 northern blot (Alwine et al. 1977)과 differential display (Liang과 Pardee 1992), 분석에 상당량의 시료가 필요한 dot blotting (Lennon과 Lehrach 1991), 많은 노동력이 요구되는 SAGE (Velculescu et al. 1995) 등의 단점을 보완하여 1995년 미국의 스탠퍼드대학 (Stanford university)에서 처음 사용되었다. 소량의 시료로 한 번에 수백, 수천 개의 유전자를 빠른 시간 내에 분석할 수 있는 microarray 기술은 RNA 수준의 분석 기술 뿐만 아니라 DNA 수준의 Southern blot, SNP (Single Nucleotide Polymorphism)와 DNA sequencing 기술 등도 대체할 수도 있다.

Microarray 연구 결과를 시각적으로 표현하기 위해 다양한 프로그램이 이용된다. 기본적으로 NCBI의 Nucleotide-nucleotide BLAST (BLASTN), Translated query vs. protein database (BLASTX) 등으로 염기서열로 표시되는 유전자를 아미노산 및 단백질로 변환하여 확인해 볼 수 있다. 또한 TAIR (www.arabidopsis.org)에서 제공되는 3가지 프로그램 (Gene Search, Functional Categorization, AraCyc Me-

tabolic Pathway)을 이용하면 목표 유전자의 기능 (발현 시기 및 장소, 역할, 관련 pathway 등)을 애기장대에 비추어 유추해 볼 수 있다. <http://www.tm4.org>에서 제공하는 MultiExperiment Viewer (MeV)는 가장 많이 이용하는 프로그램으로써 Hierarchical trees와 Clustering 분석이 가능하다. 그리고 MapMan (<http://gabi.rzpd.de>)은 식물체 주요 pathway 상에서 목표 유전자의 위치와 발현 정도를 동시에 표시해 주는 프로그램도 있다.

BrEMD의 microarray 연구는 내흔계인 *Brassica rapa* (cv. Chiffu)를 이용해 비생물학적 스트레스로 저온, 건조, 염류 및 ABA (abscisic acid) 처리가 있으며, 생물학적 스트레스로 *Pectobacterium carotovorum* (배추 무름병균), *Plasmodiophara brassicae* (배추 뿌리혹병균), Turnip Mosaic Virus (TuMV) 감염을, 발달 단계 별로는 식물체 전체 발달 단계와 화아발달 단계를, 그리고 조직 특이적인 재료를 이용하여 DNA chip이 제작되었다. 'KBGP-24K' 형태의 microarray는 60개의 oligo 배열로 혼성화되고 24,963개의 unigene 염기서열 정보를 보유하고 있다. 이 중 19,900개의 unigene의 open reading frame (ORF)는 이미 알려져 있어 정방향의 올리고 탐침 (probe)으로 존재하지만, 5,063개는 그렇지 못해 양방향 탐침으로 제작되었다. 애기장대 및 배추과 식물을 모델로 한 배추의 microarray 분석 결과는 *Brassica rapa* EST and Microarray Database (BrEMD)에 현재까지 총 117,653개의 EST 결과와 24,141개의 unigene 이 공개되어 있다 (www.brassica-rapa.org).

배추 고품질 관련 유전자 발굴

배추의 수확량과 품질은 재배 온도에 많은 영향을 받는다. 이에 충남대학교 허윤강 교수 연구팀은 배추 품종 중 Chiifu (지부)와 Kenshin (권심)이 그 기원이 지리적으로 다르기 때문에 고온과 저온에 대한 적응도 다를 것이며 그에 따른 유전자 발현양상도 다를 것으로 판단하여, 고온 및 저온관련 유전자를 탐색하기 위하여 KBGP-24K oligomeric chip을 이용하여 microarray 연구를 수행하였다. 고온 스트레스 저항성 배추품종 육성을 위한 10개의 다형성 분자 마커 개발에 참여하였으며, 이는 배추 작물에서 환경 스트레스 저항성과 유전적 연관관계 확인 및 MAS (marker assisted selection)를 이용한 품종육성에 이용될 수 있다 (Jeong et al. 2009).

또한 영양생식과 종자생산을 크게 증가시키는데 관련된 *BrMORN* (*B. rapa* Membrane Occupation and Recognition Nexus) 유전자를 과발현시킨 연구가 완료되었다 (Lee et al. 2010). 그리고 현재 *BrARPI* (*B. rapa* Auxin-repressed Protein 1), *BrDRMI* (*B. rapa* Dormancy-associated Protein 1), *BrGASAI* (*B. rapa* GAST1 protein homolog 1), *BrLSHI* (Light-dependent Short Hypocotyls 1) 유전자에 관한 연구와

배추 유전자 칩 (50K chip)을 이용한 잡종강제 및 GMS (Genetic Male Sterility) 등의 연구가 진행 중이다.

병저항성 유전자 탐색 및 이용

순천대학교 노일섭 교수 연구팀은 Biogreen 21 사업 연구로, 배추의 완전장 cDNA library 및 Microarray에 의한 DNA chip(KBGP-24 또는 KBGP-35K)을 활용하여 병 저항성 관련 유전자 (cysteine protease)를 탐색하고 염기서열 분석 후 13개의 신규유전자를 발굴하여 Genebank에 등록하였다(GenBank No. EU186317, EU186318, EU186319, EU186322, EU186324, EU186371, EU186378, EU186326, EU186327, EU186328, EU186329, EU186332, EU186333.). 분리된 완전장 병 저항성 관련 유전자는 강 발현 binary vector에 삽입하여 배추에 형질전환 시켜 저항성 계통 육성 연구에 이용되고 있는 중이다. 이와 더불어 chromobacteria 유래 병 저항성 관련 유전자 (chitinase) 및 인체에 무해한 인체 유래 항균 peptide LL-37 유전자를 이용하여 배추의 세균병 및 곰팡이병 저항성 계통 개발도 병행하고 있다.

자가불화합성 타파 및 응성불임 관련 유전자 분석

배추는 자가불화합성을 가져 자연상태에서 교잡이 발생하므로 우성형질을 지닌 고정된 품종을 유지하는데 어려움이 있다. 그래서 실제 자가불화합성을 타파하기 위해 CO₂ gas처리를 이용하는데, 이 타파의 원인을 분석하여 원리를 이해하는 연구가 경북대학교 윤호성 교수 연구팀에 의해 연구되고 있다 (Hyun et al. 2007). 그 결과 CO₂ gas를 처리하였을 때 CO₂ gas에 반응하여 자가불화합성의 타파를 유도하는 유전자 (R gene)는 배추에서는 우성형질을 밝혀내었으며 이는 열성형질인 무와 상반되는 결과로서, 같은 배추과에 속한 작물들이지만 서로 다른 인자에 의해 자가불화합성 타파가 될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

응성불임 연구에서는 애기장대 응성불임관련 상동 유전자를 배추cDNA library에서 발굴하여 과발현 vector를 구축함과 동시에 Ogura CMS (Cytoplasmic Male Sterility)계통과 정상계통의 화기 mRNA를 이용한 microarray 분석 결과를 애기장대와 비교하여 15개의 응성불임 관련 배추 homologue 유전자들을 선별하였다 [MND1 (At4g29170), SWI3D (At4g34430), MPK6 (At2g43790), EXO70A1 (At5g03540), FLP1 (At5g57800), MYB26 (At3g13890), PEAMT (At3g18000), MS1 (At5g22260), CUT1 (At1g25450), MS2 (At3g11980), PTL (At5g03680), ASK1 (At1g75950), MYB103 (At5g56110), MYB24 (At5g40350), USP (At5g52560)]. 이 중 일부를 화기조직특이 promoter와 결합하여 애기장대에

도입 중에 있다.

또한 화기 형태 조절에 관여하는 CDM37 (*Chrysanthemum morifolium* MADS-box transcription factor 37) 유전자와 CDM111 (*Chrysanthemum morifolium* MADS-box transcription factor 111) 유전자, 화기 발달을 상류에는 제어하는 LFY (LEAFY) 유전자와 그 promoter를 클로닝하여 애기장대에 도입하였고 이들이 응성불임에 관여하는 수술 등의 화기 발달에 영향을 준다는 사실을 확인하였다 (Park and Yoon 2007).

항암 관련 유전자 탐색 및 기능성 배추 생산

Phenylethyl-isothiocyanate(PEITC)는 배추에서 glucosinolate가 myrosinase에 의해 가수분해 되면서 생성되는 2차 대사산물인 isothiocyanate의 한 종류로 해충저항성, 항암 효과를 보이는 물질이다 (Fahey et al. 1997; Barrett et al. 1998). 외부 자극에 의해 식물세포가 파괴가 되면 myrosinase가 분비되고, glucosinolate가 가수분해 되어 Epithiospecifier Protein (ESP) 유전자에 의해 nitriles, thiocyanate로 분해되며, 경쟁적으로 Epithiospecifier Modifier 1 (ESM1) 유전자에 의해 phenylethy-isothiocyanate로 분해되며 이는 미토콘드리아에 존재하는 Glutathione S-transferase (GST)에 의해 촉매 되어 S-(N-phenylethio-carbamoyl)-glutathione으로 전환된다 (Lambrix et al. 2001; Halkier and Gershenzon 2006; Zhang et al. 2006). 유용 물질인 PEITC가 대량 생성되기 위해 glucosinolate 하위 pathway를 조절하게 되는데 이와 관련하여 myrosinase 유전자가 과발현 (over-expression)된 형질전환 배추와 GST 유전자가 발현 억제 (down-regulation)된 형질전환 배추의 교배를 통해 PEITC의 함량이 일반 배추보다 증가된 개체를 만드는 연구가 본 연구팀에 의해 진행되고 있다.

결론

기존보다 더 좋은 품질의 작물을 개발하기 위해서 가장 우선 되어야 하는 것은 해당 작물의 유전체 연구이다. 다양한 유전체 연구 분야 중 유전자의 기능을 밝히는 기능유전체학 연구 분야는 신품종 육성의 핵심임에 당연하다. 배추는 식용 및 사료용으로 많이 이용되는 중요한 채소로서 1조원의 국내 시장과 1억 달러의 수출액을 기록하는 경제 작물이다. 같은 과에 속하는 애기장대의 유전체 연구가 완료됨에 따라 2003년 MBGP (Multinational Brassica Genome Project)를 시작으로 배추의 전체 염기서열 분석 연구 (구조유전체 연구)가 세계적으로 활발히 이루어지고 있다. 그리고 이에 맞추어 농촌진흥청을 중심으로 여러 대학과 연구기업이 협동하여 배추 유전자의 기

능을 밝히는 배추 기능유전체 연구를 활발히 진행하고 있으며 그 기술 또한 나날이 발전하고 있다. 이는 배추 유전체 연구에 있어 우리나라가 세계적인 선두임을 자부하고 유지할 수 있는 큰 원동력이 된다. 그리고 앞선 두 유전체 연구는 해당 연구 성과로만 한정되지 않고 큰 경제적 가치를 지닌 다른 배추과 채소들의 유전체 연구의 중요한 토대로 쓰여 이들의 품질 및 생산량 향상에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

적요

식물생명공학 분야에 있어 기능유전체 연구는 식물체가 지니고 있는 유용한 유전자의 생물학적 기능을 밝히고, 농업적 유용성을 확보하여 가치를 부여하는 것을 목적으로 한다. 배추는 우리나라 대표 음식 중의 하나인 김치의 주원료이며 식품영양학적으로도 우수성이 인정되었고 약 5만 ha에서 연간 약 250만 톤이 생산되어 1조원의 국내 시장 및 1억 달러의 수출액을 기록하는 경제작물이다. 그리고 우리나라가 주요 종자수출국의 위치를 차지하고 있어 재배에 있어서나 경제적, 상업적으로 그 중요성이 매우 높은 작물이다. Multinational Brassica Genome Project (MBGP)가 시작되고 배추와 같은 속에 속하는 애기장대의 전 염기서열 분석이 완료됨으로써 배추의 기능유전체 연구가 더욱 활발해 질 수 있는 환경이 마련되었다. 또한 유전자 기능 분석 연구에 필요한 새로운 기술들이 계속 개발되고 있으며 우리나라를 선두로 하여 국제적으로도 연구가 이루어져 해마다 많은 성과들이 보고되고 있다. 본 총설에서는 기능유전체 연구의 첫 단계인 배추 돌연변이체 유기 방법을 시작으로 다양한 표현형의 돌연변이체를 소개하고 이 돌연변이 배추의 게놈 내 flanking DNA 분석 및 유전자 동정, microarray를 이용한 유전자 분석, 대표적인 기능유전체 연구 사례를 제시하고자 하였다.

사사

본 총설에서 제시한 일부 결과는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제번호: 2007030103403700801와 2008040103403900805)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc

- Natl Acad Sci 74:5350-5354
- Barrett JE, Klopfenstein CF, Leipold HW (1998) Protective effects of cruciferous and seed meals and hulls against colon cancer in mice. *Cancer Lett* 127:83-88
- Baurens FC, Causse S, Legavre T (2008) Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) protocol to assess CpG and CpNpG methylation in the banana genome. *Fruits* 63: 117-123
- Bestor TH, Coxon A (1993) The pros and cons of DNA methylation. *Curr Biol* 3:384-386
- Cedar H (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* 53: 3-4
- Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol* 58:377-406
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 10:471-480
- Choi SR, Park JY, Park BS, Kim HI, Lim YP (2006) Korea Brassica Genome Project: Current Status and Prospective. *J Plant Biotechnol* 33:153-160
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133:462-469
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P (1997) Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* 94:10367-10372
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-11
- Ge H, Walhout AJ, Vidal M (2003) Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* 19:551-560
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296:92-100
- Gottlieb LD (2003) Plant polyploidy: gene expression and genetic redundancy. *Heredity* 91:91-92
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann Rev Plant Biol* 57:303-333
- Holtorf H, Guitton MC, Reski R (2002) Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* 89:235-249
- Hyun JY, Gothandam KM, Baek NK, Wang G, Chung YY (2007) Dominance Relationship between Two Self-Incompatible *Brassica campestris* Haplotypes in Response to CO₂ Gas. *J Plant Biol* 50:161-166
- Jaligot E, Beulé T, Baurens FC, Billotte N, Rival A (2004) Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 47:224-228
- Jeong YS, Lim YP, Hur YK, Chung SM (2009) Development of DNA markers for trehalose synthesis genes in *Brassica rapa* L. *J Life Sci* 19:639-643
- Kim HS, Kim SH, Park YD (2003) Development of rescue cloning vector with phosphinothricin resistant gene for effective T-DNA tagging. *J Kor Soc Hort Sci* 44:407-411
- Kim JS, Chung TY, King GJ, Jin M, Yang TJ, Jin YM, Kim HI, Park BS (2006a) A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*. *Genetics* 174:29-39
- Kim SY, Park BS, Kwon SJ, Kim JS, Lim MH, Park YD, Kim DY, Suh SC, Jin YM, Ahn JH, Lee YH (2006b) Delayed flowering time in *Arabidopsis* and *Brassica rapa* by the overexpression of FLOWERING LOCUS C (FLC) homologs isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 26:327-336
- Lagercrantz U, Lydiat D (1996) Comparative genome mapping in *brassica*. *Genetics* 144:1903-1910
- Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J (2001) The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* 13:2793-2807
- Lee JY, Han CT, Hur YK (2010) Overexpression of BrMORN, a novel 'membrane occupation and recognition nexus' motif protein gene from Chinese cabbage, promotes vegetative growth and seed production in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 29:113-22
- Lee MK, Kim HS, Kim JS, Kim SH, Park YD (2004) Agrobacterium-mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *J Plant Biol* 47: 300-306
- Lennon GG, Lehrach H (1991) Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 7:314-317
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971
- Lim KB, De Jong H, Yang TJ, Park JY, Kwon SJ (2005) Characterization of rDNAs and tandem repeats in heterochromatin of *Brassica rapa*. *Mol Cells* 19:436-444
- Lim KB, Yang TJ, Hwang YJ, Kim JS (2007) Characterization of the centromere and peri-centromere retrotransposons in *Brassica rapa* and their distribution in related *Brassica* species. *Plant J* 49:173-183
- Mark C, Ueli G (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133:462-469
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812
- Oh YJ, Chung H, Yu JG, Park YD (2009) Newly developed MSAP analysis reveals the different polymorphism patterns in transgenic tobacco plants with the dsRNA MET1 gene. *Plant Biotechnol Rep* 3:139-145

- Park YD, Yoon HS (2007) The role of a floral identity gene LFY in plant morphological evolution. *Kor J Plant Tax* 37:323-333
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-487
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27:581-90
- Yu JG, Lee GH, Kim JS, Shim EJ, Park YD (2010) An Insertional Mutagenesis System for Analyzing the Chinese Cabbage Genome Using *Agrobacterium* T-DNA. *Mol. Cells* 29:267-275
- Zhang Z, Ober JA, Kliebenstein DJ (2006) The gene controlling the quantitative trait locus *epithiospecifer modifier 1* alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1524-1536