

고 함량 트립토판 생산 GM 벼 개발 및 전사체 분석

정유진 · Franz Marielle Nogoy · 조용구 · 강권규

Development of high tryptophan GM rice and its transcriptome analysis

Yu Jin Jung · Franz Marielle Nogoy · Yong-Gu Cho · Kwon Kyoo Kang

Received: 23 September 2015 / Revised: 23 September 2015 / Accepted: 23 September 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Anthranilate synthase (AS) is a key enzyme in the biosynthesis of tryptophan (Trp), which is the precursor of bioactive metabolites like indole-3-acetic acid and other indole alkaloids. Alpha anthranilate synthase 2 (*OsASA2*) plays a critical role in the feedback inhibition of tryptophan biosynthesis. In this study, two vectors with single (F124V) and double (S126F/L530D) point mutations of the *OsASA2* gene for feedback-insensitive α subunit of rice anthranilate synthase were constructed and transformed into wildtype Dongjinbyeo by *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic single and double mutant lines were selected as a single copy using TaqMan PCR utilized nos gene probe. To select intergenic lines, the flanking sequence of RB or LB was digested with a BfaI enzyme. Four intergenic lines were selected using a flanking sequence tagged (FST) analysis. Expression in rice (*Oryza sativa* L.) of the transgenes resulted in the accumulation of tryptophan (Trp), indole-3-acetonitrile (IAN), and indole-3-acetic acid (IAA) in leaves and tryptophan content as a free amino acid in seeds also increased up to 30 times relative to the wildtype. Two homozygous event lines, S-TG1 and D-TG1, were selected

for characterization of agronomic traits and metabolite profiling of seeds. Differentially expressed genes (DEGs), related to ion transfer and nutrient supply, were upregulated and DEGs related to co-enzymes that work as functional genes were down regulated. These results suggest that two homozygous event lines may prove effective for the breeding of crops with an increased level of free tryptophan content.

Keywords Anthranilate synthase, *OsASA2* gene, Transgenic event rice, Tryptophan

서론

식물 대사공학(Metabolic Engineering)은 post-genomics 시대에 중요한 화두가 되어 재조합 DNA 기술을 통해서 다양한 생합성 경로를 조절하여 식물체내 유용한 생합성 물질을 획득하여 이용하고 있다. 리신, 메티오닌, 트레오닌 및 트립토판 등 필수 아미노산은 인간 및 가축의 필수 영양소이며, 대부분의 작물내에 이들 아미노산 함량이 매우 낮게 존재하고 있다. 고등식물에서 tryptophan 생합성경로는 필수아미노산인 tryptophan 이외에 IAA 및 식물 방어물질을 포함한 다양한 2차대사산물을 생산한다(Radwanski and Last 1995). Anthranilate Synthase (AS)는 방향족 아미노산 shikimate로부터 tryptophan을 생합성하는 과정에서 최초 반응인 chorismate를 AS로 변환시키는 촉매효소이다(Bohlmann et al. 1995; Romero and Roberts 1996). 식물에서 tryptophan의 축적은 chorismate에서 anthranilate로 전환하는 촉매효소인 anthranilate synthase (AS)의 α subunit이 feedback inhibition이 일어나지 않도록 point mutation된 유전자를 도입함에 따라 일어난

[†]These authors equally contributed to this work.

Y. J. Jung[†] · K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Hankyong National University,
Ansung, Gyeonggi-do 456-749, Korea)
국립한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University,
Ansung 456-749, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

Y. G. Cho · F. M. Nogoy[†]
충북대학교 농업생명환경대학 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju 361-763, Korea)

다(Ishihara et al. 2007; Wakasa and Ishihara 2009). 지금까지 벼에서 tryptophan 개량에 관한 연구는 돌연변이유종 program으로 선발한 5-methyltryptophan 저항성 돌연변이체(Wakasa and Widholm 1987; Lee and Kameya 1991; Kim et al. 2005), AS alpha-subunit에 관련된 유전자를 과발현시켜 얻어진 형질전환체(Tozawa et al. 2001; Wakasa et al. 2006) 등이 알려져 있으며, 이들 식물체는 tryptophan 함량이 대조구에 비해 월등히 증가되었다. 또한 Trp 은 IAA 및 serotonin과 같은 이차대사산물의 변화를 촉진시킨다(Radwanski and Last 1995).

국내에서 쌀의 경쟁력을 높이기 위해서는 고품질 쌀과 밀접한 관련이 있는 트립토판 생합성에 관여하는 AS효소의 feedback inhibition 기능 분석 및 feedback inhibition에 둔감한 돌연변이 개발을 통하여 고품질 트립토판 생산 벼의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 tryptophan 생합성상에서 feedback inhibition에 민감하게 반응하는 AS alpha-subunit 관련 *OASA2* 유전자 영역에 F124V 및 S126F/L530D으로 변형된 유전자를 이용하여 형질전환체를 육성하고, 형질전환 후대에서 tryptophan 함량이 높은 계통을 이벤트화하여 GM벼를 개발을 하고자 수행하였다.

재료 및 방법

Anthranilate synthase 관련 ASA alpha subunit 변이 유전자 분리

5-Methyltryptophan (5MT) 저항성 벼 계통의 선발과 육성은 벼 품종으로부터 EMS 처리에 의해 유도된 6개의 5MT 저항성 벼 계통의 종자를 tryptophan analog인 5-Methyltryptophan 50 mg/L를 포함한 1/2 MS 배지와 5MT를 포함하지 않은 배지에 각각 파종하여 14일간 생육시킨 후 강한 저항성을 보이는 벼 계통을 선발하여 연구의 재료로 사용하였다. 선발된 개체로부터 유전자를 분리하고 염기서열 분석을 수행한 결과 *OsASA2* (anthranilate synthase) 유전자의 124번째 아미노산인 TTC (phenylalanine)가 GTC (Valine)으로 변이된 개체(F124V)와 126번째 아미노산인 TTC (Serine)가 TTC (phenylalanine)로 변이되고, 530번째 아미노산인 CTT (Leucine)가 GAC (aspartic acid)로 변이된 개체(S126F/L530D)를 확인할 수 있었다 (data not shown). 두 가지 유형의 점돌연변이가 발생한 *OsASA2* 유전자를 각각 single mutation (F124V)과 double mutation (S126F/L530D)이라고 명명하고 분리한 후 식물발현벡터에 도입하였다.

Ti-플라스미드 벡터구축

식물 형질전환용 운반체는 pPGD1 벡터를 모벡터로 사용하여 *OsASA2* (anthranilate synthase) 유전자를 CaMV 35S 및 PDG1 프로모터에 연결하여 제작하였다. 형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 Bar 유전자를 이용하였다. 식물 발현용 vector의 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다. 28°C에서 동일한 방법으로 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* competent cell LBA4404를 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1 µl와 섞어서 electroporation cuvette에 주입한 다음 1,440 V로 전기충격을 가하여 형질전환 시킨 후 SOC 배지 1 mL을 혼합한 후, 멸균된 시험관에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 50 mg/L을 포함한 AB agar 배지에서 선발하여 확인된 배양액은 50% glycerol을 동량 첨가하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 저장하였다.

형질전환 벼 육성, 도입확인 및 발현 분석

형질전환 벼 육성을 위하여 동진 벼 종자를 2 mg/L 2,4-D가 포함된 N6 액체배지에 침종하여 30°C 암상태에서 24 시간 동안 발아시켜, 배 부분이 부풀어 오르기 시작한 종자를 15 mL의 *Agrobacterium* 현탁액이 담겨 있는 튜브에 담가 약 20 분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 *Agrobacterium*을 제거하였다. *Agrobacterium*을 접종한 종자를 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mg/L silver nitrate (AgNO₃), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 놓고 치상하여 25°C 암조건에서 3 일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해 필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25°C 암조건에서 4 일간 공동 배양하였다(Lee et al. 2011; Jung et al. 2014). 형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 계층 상에서 *OsASA2* 유전자의 도입을 확인하기 위해 재분화된 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도입유전자 Bar 및 *OsASA2* 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 이때 사용한 Bar 유전자 프라이머는 forward 5'-CGTCAACCACTACATCGAGA-3', reverse 5'-AAGTCCAGCTCGCAGAAA-3'로 제작하였고, PGD1 promoter forward 프라이머는 5'-TAGCTCTTAAC TTGCATGTC-3', *OsASA2* 유전자 프라이머는 forward: 5'-ATGGAGTCCATCGCCGCCGCA-3', reverse: 5'-AGAG-GTTTGAGAGGCGAAC-3'로 제작하여 95°C에서 6분간

pre- denaturation 시킨 후, 94°C에서 30 초간 denaturation, 58°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension 과정을 30 cycles 하였으며, 마지막으로 72°C에서 5 분간 extension을 실시하여 분석하였다. 또한 형질전환 각 세대에서 Single copy로 도입된 개체를 효율적으로 선발하기 위해 TaqMan PCR에 의해 유전자를 증폭하였다. TaqMan probe real-time PCR을 위하여 2 × Brilliant II QPCR Master Mix (Roche, Switzerland) 10 µl, dH₂O 5.5 µl, sense primer 10 pmol 0.5 µl, antisense primer 10 pmol 0.5 µl, probe 10 pmol 0.5µl, 추출한 DNA template 3 µl로 total 20 µl를 PCR tube에 넣은 후, 혼합액을 thermal cycler (7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems)에서 증폭하였으며 음성대조군으로 멸균수와 형질전환시에 사용한 동진에서 추출한 DNA를 이용하였고, 양성 대조군으로 이미 검증된 형질전환체 T₂ homo 계통과 T₂ hetero 계통의 DNA를 이용하였다. TaqMan probe PCR 반응 조건은 95°C에서 10 분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 20 초 denaturation, 56°C에서 1 분 annealing을 40 회 반복 실시하였고, annealing 반응 중에 Quencher로부터 분리된 fluorescein FAM이 활성화 될 때마다 fluorescence를 탐지하고 처음 탐지된 cycle 수(ct)는 amplification plots로 표현하였다. TaqMan probe real-time PCR 검사로 복제된 증폭산물은 nos terminator의 특이적인 labeling한 probe primer를 이용하여 분석되었다. *OsAS42* 유전자가 도입된 형질전환체의 발현량 분석은 total RNA의 분리와 cDNA합성을 통하여 RT-PCR 및 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 이때 사용한 actin primer set는 forward 5'-ATGGTTGGGATGGGTCAAAA-3', reverse 5'-TCTT-TAATGTCACGGACGATT-3'와 같이 제작하였다. Total RNA는 RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) protocol에 따라 수행하였으며, first strand cDNA는 total RNA 5 µg으로부터 합성하였다. 합성된 cDNA 2 µl를 주형으로 하여 10×PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) 5 µl와 50 mM MgCl₂ 1.5 µl, 10 mM dNTP mix 1 µl, Taq DNA polymerase (5 units/µl) 0.4 µl, forward primer (10 µM), reverse primer (10 µM)를 각각 1 µl씩 첨가하고 멸균수 38.1 µl로 최종 부피 50 µl로 하여 PCR 분석을 행하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 1 분간 denaturation, 55°C에서 1 분간 annealing, 72°C에서 2 분간 extension 과정을 35 cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10 분간 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동 한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. qRT-PCR 분석은 합성한 cDNA

를 사용하여 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO co., Japan)를 사용하여 권장하는 방법에 의해 수행하였다. Threshold cycle (Ct) 값에 의한 발현량 분석은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 으로 계산하였으며, $\Delta\Delta Ct$ 은 처리식물체의($Ct_{target\ gene} - Ct_{actin\ gene}$) - 대조식물체의($Ct_{target\ gene} - Ct_{actin\ gene}$)에 의해 계산하여 수치화 하였다(Livak & Schmittgen 2001).

FST 분석

형질전환 벼에서 도입유전자의 삽입위치 확인은 Thole et al. (2009)이 보고한 adapter PCR 방법을 개량하여 사용하였다. 형질전환체 RB 인접서열 분석에 사용한 primer는 NCBI BLAST에서 Genome Survey Sequences Database의 기존의 보고된 LB 인접서열의 유사성을 분석하여 수행한 결과 찾은 염기서열을 바탕으로 제작하였다. 50 ng의 total DNA를 5 U의 *Bfa* I 제한효소로 완전절단 시킨 뒤 5 U의 T4 DNA ligase (England Biolabs)과 1 pmol의 adaptor DNA를 첨가하여 25°C에서 16 h 반응시켜 두 단계의 PCR을 수행하였다. 일차 PCR은 전체 25 µl pre-mixture 반응물에서 7 µl를 DNA template으로 10 pmol의 AP1과 LB1 또는 RB1 primer를 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 이용하여 반응시켰다. 일차 PCR 반응조건은 95°C에서 5 분간 전 처리한 후, 94°C에서 30 초, 67°C에서 1 분, 72°C에서 1 분간을 기본주기로 하여 총 20 회 반복 반응하고 72°C에서 10 분간 최종 증폭시켰다. 이차 PCR은 일차 PCR 생성물 1 µl을 주형으로 하여 AP2와 LB 2 또는 RB 2 primer를 사용하여 94°C에서 5 분간 전 처리 한 후 94°C에서 30 초, 60°C에서 30 초, 72°C에서 1분 30 초간을 반응주기로 전체 40 회 반복 반응시킨 후 72°C에서 10 분간 최종 증폭하여 진행하였다. 증폭된 PCR 반응산물은 1% agarose gel에 전기영동 하여 ethidium bromide로 10 분간 염색하여 band를 확인하였다. 증폭된 DNA 밴드는 HiYield™Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)를 이용하여 정제하였으며 LB 2 또는 RB 2 primer를 이용하여 염기서열을 분석하였고, 분석된 염기서열 정보는 RAP-DB program과 NCBI의 Blast 프로그램(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 분석되었다.

아미노산 분석

아미노산 분석을 위하여 시료 10 g을 동결 건조한 뒤 마쇄하고 500 mg을 취하여 sample tube에 넣고, 산화방

지를 위하여 5 ml의 6N HCl을 가해서 N₂로 5 분간 purge 시켰다. Tube cap으로 봉한 후 110°C heating block에서 24 시간 방치하고 가수분해 시켜서 얻은 분해액을 원심분리하여 상등액을 50°C heating block에서 농축하여 HCl을 제거하였다. 20mM HCl (pH 2.2) 용액을 사용하여 5 ml로 정용한 다음, 0.45 µm membrane filter로 여과하고 여액을 취하여 AccQ-Tag 시약을 사용하여 유도체화시킨 후, HPLC 용 분석 시료로 사용하였다.

Microarray 분석을 통한 high-throughput screening

형질전환체에 의한 transcript의 발현양상을 규명하기 위해 대조구인 동진벼와 형질전환계통 TG1과 TG2를 50 ppm 5MT가 함유된 MS 배지에서 3 주간 배양하였다. 각각의 계통에서 5MT 처리구와 무처리구로부터 RNA를 추출한 후, microarray 분석을 2 반복으로 수행하여 발현 차이를 분석하였다. 목적 cRNA probes와 hybridization은 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology, USA)을 사용하였으며, Microarray 분석을 위한 chip은 상용화 되고 있는 Agilent Rice 4 X 44K Oligo microarray를 사용하였고, hybridization 후, image quantification은 GenePix Pro 4.0을 사용하였고, LOWESS 프로그램을 이용 각 spot의 nomalization을 수행하였다. 분석 프로그램은 Agilent GeneSpringGX 7.3을 사용하였으며, Hybridization은 각각 2 반복으로 수행하였다.

결과 및 고찰

OsASA2 유전자 도입 형질전환체 육성

벼의 tryptophan (Trp) 합성계 중에서 feedback inhibition에 작용하는 key enzyme인 anthranilate synthase (AS) α subunit 관련 유전자중에 하나인 *OsASA2*를 5MT 저항성 돌연변이 계통으로부터 분리하고 동진 벼에 도입하여 형질전환 벼를 작성하였다. *OsASA2* 유전자는 2,166 bp의 full length로 이루어져 있으며, 3 번 염색체 long arm에 위치하고 10 개의 엑손 영역과 9개의 인트론 영역으로 1,821 bp의 ORF와 21 bp 크기의 5'UTR, 324 bp의 3'UTR으로 이루어졌다(NM_001056176). 5MT 저항성 계통으로부터 분리된 *OsASA2* 유전자는 한 개체의 124 bp에 위치한 곳에서 TTC (phenylalanine)가 GTC (Valine)으로 변이되었고, 또 다른 개체의 126 bp와 530 bp가 위치한 곳에서 각각 점돌연변이가 발생하여 TCC

(Serine)가 phenylalanine (F)으로 CTT (Leucine)가 aspartic acid (D)로 나타났다 (Fig. 1A). Feedback inhibition이 둔감한 고품량 트립토판 생산 형질전환 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서 F124V single mutation 유전자와 S126F/L530D double mutations 유전자를 각각 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 Bar 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터인 pPGD1을 이용하여 벼에 도입하였다(Fig. 1A). 벼의 형질전환은 캘러스 115 개 중에서 총 35 개의 형질전환 식물체를 얻어 높은 효율을 보였다(Fig. 1B). 형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 계능 상에서 *OsASA2* 유전자의 도입 여부를 확인하기 위해, 재분화된 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도입유전자 Bar 및 *OsASA2* 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 도입한 F124V single mutation 유전자와 S126F/L530D double mutations 유전자로부터 얻어진 각각 10 개의 재분화 식물체에서 Bar 및 *OsASA2* 유전자가 검출되었다(Fig. 1C). 이는 *OsASA2* 유전자가 벼 계능에 잘 도입되어 있음을 의미하여 이들 형질전환체는 T₀ 세대부터 계통번호를 부여하였다. 또한 Single copy로 도입된 형질전환체를 선발하기 위하여 TaqMan PCR을 수행한 결과 각각 10 개의 형질전환 T₀ 개체 중에서 8개체씩 도입유전자가 single copy로 삽입되어 있었다(Fig. 2A). Single copy로 도입된

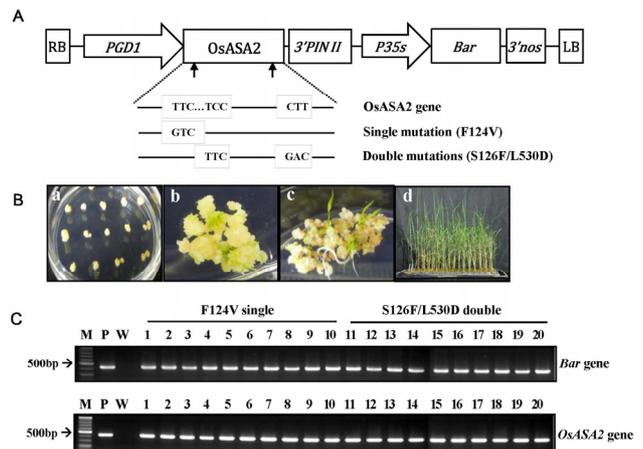


Fig. 1 (A) Ti-plasmid vector constructs for overexpression of single (F124V) and double (S126F/L530D) point mutations of *OsASA2* gene in rice. A PGD1 promoter and CaMV 35s promoter gene, a 3'PINII: protease inhibitor II terminator gene, a herbicide-resistant gene Bar (phosphinotricine acetyltransferase gene), and a nopaline synthase terminator (3'nos). (B) Transformation of these genes through the step by step processes of *Agrobacterium*-mediated transformation. (C) PCR amplification of transferred genes (*Bar*, *OsASA2*) in transgenic rice lines. The amplified products were separated on 1.5% agarose gel. Lane M: DNA ladder, Lane P: PCR products generated from the DNA template of pZP-Bar plasmid that contains *OsASA2*. Lane W: wild type plant, Lane 1~20; independent transgenic lines

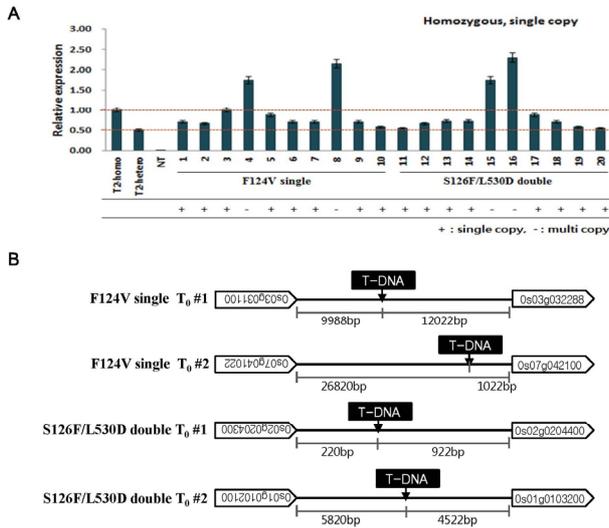


Fig. 2 (A) TaqMan PCR analysis for the selection of a single copy of transgenic rice. (B) Analysis of intergenic regions flanking to the left or right border of the T-DNA in T₀ single copy plant

T₀ 형질전환체로부터 Intergenic 개체를 선발하여 안정적으로 도입된 GM 개체들을 육성하기 위하여 FST 분석을 수행하였다(Fig. 2B). *OsASA2* 유전자 영역 내 F124V와 S126F/L530D으로 점돌연변이된 유전자가 도입된 형질전환체의 LB와 RB 인접서열을 이용하여 FST 분석을 수행한 결과 각각의 도입 유전자가 Intergenic으로 확인된 식물체를 4개체 선발하였다. 이들 식물체는 염색체 Os03g031100에서 9,988 bp (single #1), Os07g041022에서 26,820 bp (single #2), Os03g0204300에서 220 bp (double #1), Os01g0102100에서 5,820 bp (double #2) 떨어진 곳에 안정적으로 삽입된 것을 확인하였다(Fig. 2 B).

이벤트 계통육성 및 유전자 발현분석

OsASA2 유전자가 도입된 T₀세대 및 T₁, T₂ 세대 분석을 통해 유전자가 벼 계놈에 잘 도입되어 안정적으로 발현되는 개체들을 선발하여 single copy를 가지고 호모계통이면서 intergenic인 형질전환체를 오창 생명공학연구소 GMO포장(T₁세대)과 충북대학교 GMO 포장(T₂세대 및 T₃세대)에 계통별로 파종하여 수확하였다. 형질전환 이벤트 T₄ 세대 식물체를 대상으로 벼 계놈 상에서 *OsASA2* 유전자의 도입을 확인하고 유전자 발현 양상을 살펴 보았다(Fig. 3). 먼저 유전자 도입 확인은 T₃ 식물체로부터 종자를 얻어 계통당 20 개씩 종자를 파종하고, 발아시킨 후, 14일경에 4 ppm의 Basta 처리를 통해 저항성을 보인 식물체를 이용하여 도입유전자 Bar 및 *OsASA2* 유전자 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 그 결과 *OsASA2*의 F124V single (S-TG) 및 S126F/L530D double mutations (D-TG) 유전자가 도입된 형질전환 후대에서 Bar 및 *OsASA2* 유전자가 검출되어 *OsASA2* 유전자가 벼 계놈에 도입되어 후대에 잘 전이되고 있음을 확인하였다(Fig. 3A). *OsASA2* 유전자가 도입된 형질전환체의 발현량 분석을 위해 RT-PCR 및 qRT-PCR법을 수행한 결과 형질전환체들 대부분에서 도입 유전자인 *OsASA2*의 F124V single 및 S126F/L530D double mutations 유전자가 세포 내에서 안정적으로 발현하고 있음을 확인하였다(Fig. 3B). qRT-PCR법에 의한 *OsASA2* 유전자 발현을 정량한 결과를 대조구와 비교했을 때, WT과 Mock에 비하여 S-TG와 D-TG의 형질전환체에서 높게 발현하는 것을

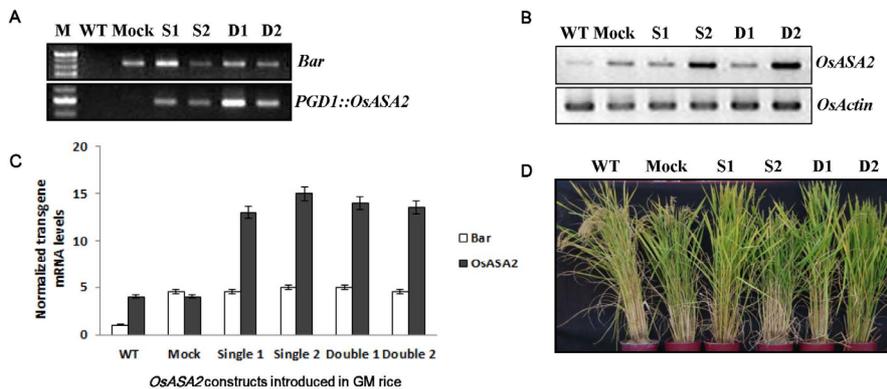


Fig. 3 Analysis of transgenic rice with overexpressed event lines of single (F124V) and double (S126F/L530D) point mutations of *OsASA2* gene. (A) PCR amplification of genes (*Bar*, *PGD1::OsASA2*) in transgenic rice lines. Lane M: DNA ladder, Lane WT: wild type plant, Lane Mock: vector control, Lane S-TG: single point mutation, Lane D-TG: double point mutation. (B) Analysis of *OsASA2* expression in the transgenic lines obtained by RT-PCR. Rice actin gene was used as a loading control. (C) Quantitative RT-PCR analysis of RNA extracted from transgenic lines and wild type control. CT values were calculated based on actin expression level as a control. Bars show the standard error of the mean for three replicate measurements. (D) Phenotype of the wild type, mock control and *OsASA2* event transgenic rice (S-TG: single point mutation, D-TG: double point mutation)

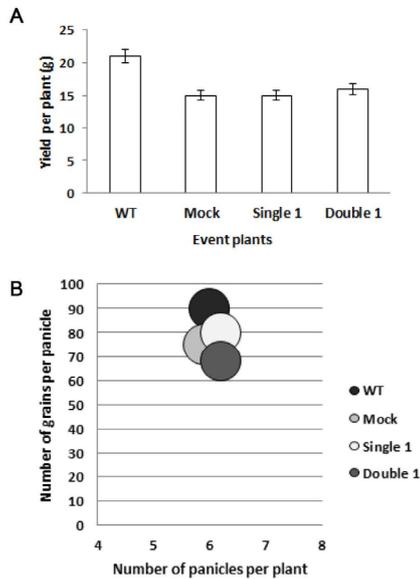


Fig. 4 Comparison of agronomic characteristics of wild type (Dongjin), Mock control, Single 1 and Double 1 event plants. (A) Yield measured by weighing all panicles per plant. Bars show the standard error of the mean for three replicate measurements. (B) Dispersion plot showing the number of grains per panicle (X-axis) and number of panicles per plant (Y-axis). For S-TG and D-TG, data from all the T3 events were merged

확인 할 수 있었다(Fig. 3C). 형질전환체의 농업 형질분석은 출수 일수, 간장, 수장, 분얼수, 임실율, 임실/식물체, 종자건물중/30식물체, 화분임성, 1000립중 등을 조사하였다. 출수 일수는 100일 정도, 간장은 78-81 cm, 수장은 18-20 cm 등 야생종인 동진벼와 유전자가 제외

되고 벡터만 도입된 Mock 등과 거의 유사한 결과를 얻었다(Fig. 3D, Fig. 4). 이런 의미는 형질전환체가 T₄ 세대에서 도입유전자를 제외하고 대조구와 거의 유사한 형질을 보인 이벤트계통으로서 고품량 트립토판 함유 GM 벼가 육성된 것으로 생각된다.

대사경로상의 유전자 발현분석

*OsASA2*의 도입에 의한 유리 Trp 함량이 증가한 벼 호모 계통인 T₃세대를 육성했다. 이 종자의 유리 Trp 함량은 비 재조합에 비해 10~30배 이상 증가했고, 벼 종자 단백질의 프로모터에 의한 발현을 제어한 계통에서는 종자의 건물중의 차이는 약 0.4%에 달했다. 고품량 Trp 종자는 정상적으로 발아와 생장을 하고 임성을 가지고 있었다. 이들 식물체 중 아미노산 함량이 가장 높은 계통을 이용하여 80% 아세톤에서 추출해, 추출물을 역상계의 고체 카트리지를 사용하여 정제한 뒤 LC/MS 분석을 수행하였다. Single 돌연변이 유전자 도입 형질전환체(S-TG)와 double 돌연변이 유전자도입 형질전환체(D-TG)의 Trp, IAN 및 IAA 함량을 뿌리, 줄기, 잎으로 나누어 측정된 결과 형질전환체의 모든 부위에서 Trp의 함량이 높게 나타났으며, 특히 leaf 3에서는 대조구에 비해 월등히 높게 나타났다(Fig. 5). IAN 및 IAA함량은 거의 유사한 pattern을 보였다. *OASA2* 도입 형질전환 벼는 대조구에 비해 IAA함량이 식물체의 축적 부위에 따라 유의로 증가하고 있었다. 흥미롭게도

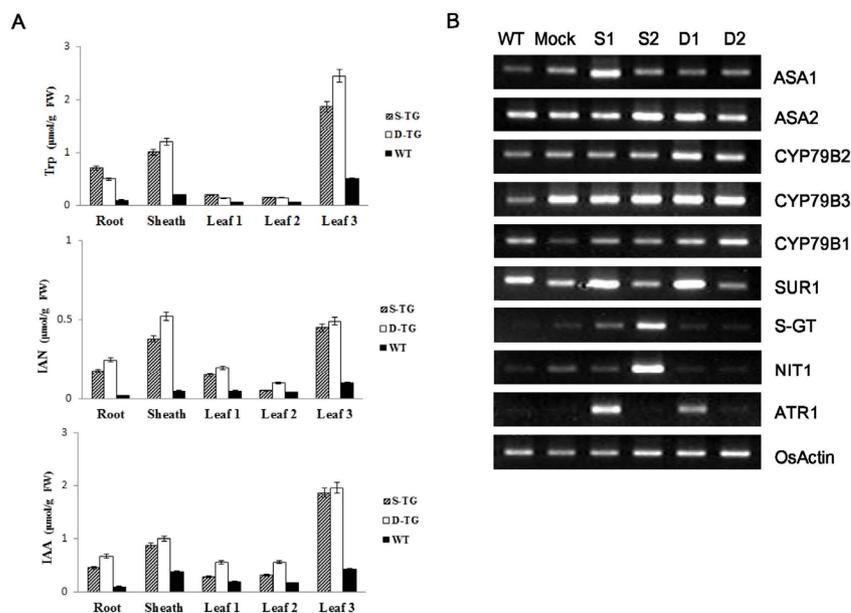


Fig. 5 (A) Comparison of the total IAA, IAN and soluble Trp contents in wild type (Dongjin), Single 1 and Double 1 event plants. (B) Expression levels of selected genes associated with Trp metabolism. The rice actin gene was used as a loading control for qRT-PCR values

IAA의 식물 체내에 생합성 분포는 Trp 축적과 같은 경향을 나타내고 있었다. 또한 IAN도 이들 두 성분과 같은 추세로 증가하고 있으며, 축적하고 있는 IAA가 Trp에서 IAN을 거쳐 생합성되고 있는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 이와 같이 식물체내에 tryptophan 함량이 증가하면 tryptamine, serotonin, melatonin 및 gramine 등의 이차 대사산물의 변화가 일어난다고 하였다(Ueno et al. 2003; Hattori et al. 1996; Murch et al. 2000). 본 연구에서 *OAS42* 유전자가 도입된 형질전환체는 Trp과 IAA 함량이 대조구에 비해 높게 나타난 것으로 보아 Trp의 축적량은 생화학적인 효소 기능을 반영하고 있음이 명백하며, 효소의 피드백 저해의 강약의 차이를 이용해 세포 내에 Trp 축적 농도를 어느 정도 제어한다는 것을 알 수 있었다. 또한 벼의 Trp 생합성 경로 상류에 위치한 chorismate 경로에 관련된 효소들의 기본 유전자 중에서 특히 대사 제어에 중요하다고 추정된 DAHP합성 효소 4 종류, chorismate kinase 3 종류, EPSP합성 효소 1 종류에 대해

서 단백질 합성을 하고 효소 등 기본 기능 해석을 실시하였다. Chorismate kinase는 방향족 아미노산 및 관련 화합물의 생합성에 중요하며, 탄닌 등의 이차 대사물의 전구체 역할도 한다(Bartel 1997; Bender and Fink 1998). 본 효소 발현 해석에서 S-GT, NIT1, ATR1 유전자에서 형질전환체들에서 발현차이를 보였다(Fig. 5B). 이런 결과는 식물체내에 tryptophan 함량이 높아져 IAA 함량 및 2차대사산물인 S-GT, NIT1, ATR1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현차이로 인해 기인된 것으로 사료된다.

이벤트 계통의 아미노산 분석

형질전환 계통들 중 single copy로 도입되어 발현량이 높은 S-TG와 D-TG 이벤트 계통을 선발하여 유리 아미노산을 분석한 결과 유리아미노산의 총량은 대조구에 비해 S-TG는 3.8 배, D-TG는 4.1 배로 높게 나타났다.

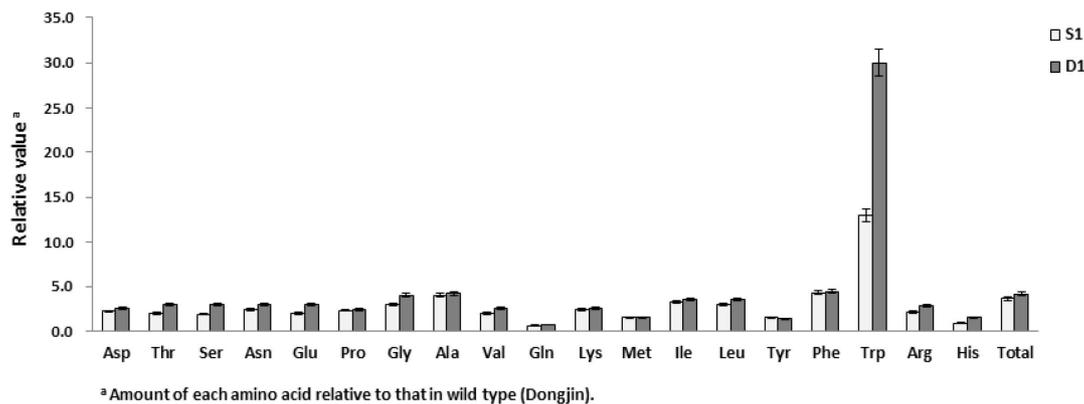


Fig. 6 The relative value of free amino acids in seeds of TG plants compare to the wildtype. The contents of free amino acids other than tryptophan in mature seeds of TG plants are higher compared to the wildtype. Means followed by the error bars are not significantly different at a 5% confidence level (Student's *t* test)

Table 1 qRT-PCR primer sequences of some genes associated with Trp metabolism

Gene name	qRT-PCR Primers (5' - 3')	
	Forward	Reverse
ASA1	GAGCTGATTGACCAGATGGA	CATGTCTCCACGGAAAGAAA
ASA2	CGAGGACAACATGGAGACG	CCATGATTGTGACCTTGTGC
CYP79B1	CCTCAAACCTCTTCGGATCTCA	TTGAGAAGCATCACCAAGGTT
CYP79B2	CGAAACATCGTCGTTTAGCA	CGGAGGGAGAGTCAGTTTCTT
CYP79B3	CATTTCAAGCCCTTGTAGCC	TTTTAAGCATCGCCGGAAT
SUR1	GTCTCGAGATCCGCAAGTTC	ACGTTTCCACATGGGTTGTT
S-GT	CACTGCGAGTAAGGGACCTG	AGCTCGTCAACGTGTTGAT
NIT1	AGCTTAAGGGCAAGCACAGA	AAGATCCTGCCAGCAGTAA
ATR1	GGACACCATGTTGCAAAGAA	AGTACGCCATCCACCTTAC
OsActin	ATGGTTGGGATGGGTCAAAA	TCTTTAATGTCACGGACGATT

특히 tryptophan은 대조구에 비하여 13 배에서 30 배 이상 높게 나타났으며, alanine, glycine, phenylalanine, threonine 및 serine 함량에서 대조구에 비해 4.2, 4.0, 4.4, 3.0 및 3.0 배가 높게 나타났다(Fig. 6). 따라서 *OsASA2* 유전자를 과발현시키면, tryptophan 생합성회로상에서 feedback inhibition이 둔감하게 되어 아미노산함량이 전체적으로 높아지고, 특정 아미노산이 높은 결과를 초래함을 확인하였다.

Microarray분석을 통한 전사체 해석

벼 형질전환체 중에서 얻어진 이벤트 계통 TG1 (S1) 및 TG2 (D1)의 T₄ 종자를 발아시킨 후, 24일 유묘를 microarray 분석을 위한 시료로 사용하였다. Microarray 결과를 바탕으로 data mining을 수행하여 transcript 발현

양상의 차이를 살펴본 결과 Table 2 및 Table 3과 같다. TG1의 경우에는 2,542 개와 4,704 개의 유전자가 up- 또는 down-regulation 되었으며, TG2의 경우에는 2,634 개와 4,653 개의 유전자가 up- 또는 down-regulation 되었다(Table 2, 3). 이벤트 계통에서 up-regulation된 유전자들을 살펴보면, receptor kinase, histidyl tRNA synthetase, cyclic nucleotide-regulated ion channel, alpha 1-2 subunit of 20S proteasome, nicotianamine synthase, LEA-like protein, UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase 등의 유전자들이 2 배에서 4 배 정도 높게 발현되었다. 이들 유전자는 대부분 세포 내 이온 수송, 영양분 공급 등에 영향을 주는 유전자로 알려져 있다(Ishihara et al. 2007). 또한 Down regulation된 유전자들은 receptor protein kinase, AUX1-like permease, ferredoxin-nitrite reductase, beta-glucosidase, chitinase, protein phosphatase, Cyt-P450 monooxygenase,

Table 2 Expression profiling of commonly up-regulated genes resulted in a two-fold increase in response to 5MT treatment between wildtype and transgenic plants, TG1 and TG2

Probe ID	Genbank	UniGene	Log ₂ fold change	Description
A. WT vs TG-1				
A_71_P120836	AK111258	Os.57297	4.10	Unknown expressed protein
A_71_P114515	AK065486	Os.48269	4.03	clone MGC:5406 IMAGE:3447276, mRNA, complete cds. PRI
A_71_P100872	AK102745	Os.32822	4.94	putative receptor kinase (At3g47570) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P124491	AK058243	Os.15841	2.25	AT5g22580/MQJ16_12 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P126087	AK063993	Os.8771	4.67	Unknown expressed protein
A_71_P108807	AK072250	Os.53356	2.19	clone 117402 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P113340	AK099789	Os.3394	2.50	mRNA histidyl tRNA synthetase. PLN
A_71_P107379	AK067626	Os.58245	2.42	mRNA for putative cyclic nucleotide-regulated ion channel, cngc2. PLN
A_71_P117819	AK102448	Os.6411	2.38	OsPAA2 mRNA for alpha 1-2 subunit of 20S proteasome, complete cds. PLN
B. WT vs TG-2				
A_71_P113250	AK107819	Os.55295	2.62	mRNA for hypothetical protein, complete cds, expressed under carbonate stress. PLN
A_71_P116816	AK066954	Os.87669	2.38	bacterial-induced peroxidase mRNA, complete cds. PLN
A_71_P117713	AK103557	Os.409	11.97	OsNramp1=Nramp1 homolog/Bcg product homolog . PLN
A_71_P121562	AK103890	Os.21960	2.23	mRNA for ubiquitin/ribosomal protein S27a fusion protein. PLN
A_71_P122323	AK072749	Os.11296	7.89	AP2 domain containing protein (AP2DCP) mRNA, partial cds. PLN
A_71_P109957	AK112069	Os.1478	7.92	osnas1 mRNA for nicotianamine synthase 1, complete cds. PLN
A_71_P109956	AK112011	Os.9311	20.93	osnas2 mRNA for nicotianamine synthase 2, complete cds. PLN
A_71_P115338	AK107134	Os.54934	2.13	putative I-box binding factor (At5g04760) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P115137	AK102039	Os.16538	2.23	hydrophobic LEA-like protein mRNA, complete cds. PLN
A_71_P128524	AK100280	Os.53824	3.11	At5g65740 mRNA for unknown protein, complete cds, clone: RAFL21-12-I06. PLN
A_71_P126180	AK103636	Os.9805	4.52	Unknown expressed protein
A_71_P123920	AK072077	Os.46062	2.56	At3g08040/T8G24.8 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P111136	AK110892	Os.89035	2.88	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase (SA-GTase) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P118320	AK101924	Os.12660	3.74	putative receptor protein kinase (At2g37710) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P101394	AK068661	Os.12629	11.42	Unknown expressed protein

Table 3 Expression profiling of commonly down-regulated genes resulted in a two-fold increase in response to 5MT treatment between wildtype and transgenic plants, TG1 and TG2

Probe ID	Genbank	UniGene	Log2 fold change	Description
A. WT vs TG-1				
A_71_P113273	AK105282	Os.54478	0.48	unknown protein (At1g12880) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P122056	AK071589	Os.9660	0.23	Ccc1p (CCC1) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P117449	AK101959	Os.21891	0.40	mRNA for open reading frame. PLN
A_71_P122307	AK072517	Os.16493	0.42	Unknown expressed protein
A_71_P125957	AK110310	Os.9468	0.50	putative receptor protein kinase (At2g37710) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P114919	AK111659	Os.9339	0.46	Medicago truncatula mRNA for putative AUX1-like permease (lax2 gene). PLN
A_71_P116773	AK110332	Os.56712	0.44	At1g45200 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P111906	AK066850	Os.35154	0.27	beta-glucosidase mRNA, complete cds. PLN
A_71_P102212	AK061893	Os.142	0.45	mRNA for ferredoxin-nitrite reductase, complete cds. PLN
A_71_P103612	AK107646	Os.31233	0.18	Unknown expressed protein
A_71_P124224	AK059264	Os.50889	0.44	Unknown expressed protein
A_71_P112517	AK102369	Os.54178	0.29	mRNA for chitinase, complete cds. PLN
A_71_P100416	AK099465	Os.12757	0.37	putative protein phosphatase (At5g10480; F12B17_170) mRNA, complete cds. PLN
B. WT vs TG-2				
A_71_P101433	AK102809	Os.12501	0.48	Nt-gh3 deduced protein mRNA, complete cds. PLN
A_71_P107010	AK060722	Os.5479	0.25	Cyt-P450 monooxygenase (PM-II) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P109152	AK070517	Os.20163	0.50	clone 39127 mRNA, complete sequence. PLN
A_71_P102416	AK109763	Os.27505	0.45	mRNA for pectin esterase clone. PLN
A_71_P116870	AK101267	Os.54009	0.25	putative selenium-binding protein (At5g48910) mRNA, complete cds. PLN
A_71_P122322	AK065344	Os.88551	0.18	AP2 domain containing protein (AP2DCP) mRNA, partial cds. PLN
A_71_P126544	AK072461	Os.53402	0.31	OsDTC1 mRNA for putative diterpene cyclase, complete cds. PLN
A_71_P118050	AK067895	Os.14948	0.17	At2g41900/T6D20.20 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P128331	AK111230		0.49	Unknown expressed protein
A_71_P112242	AK070216	Os.52974	0.34	At2g02040/F14H20.11 mRNA, complete cds. PLN
A_71_P118328	AK105640	Os.16563	0.48	clone U10950 unknown protein (At2g44260) mRNA, complete cds. PLN

pectin esterase, selenium-binding protein, diterpene cyclase 등으로 세포 내 기능유전자의 역할을 담당하는 조효소 등이 0.3에서 0.5 정도로 낮은 발현량을 보였다. 이런 결과로 미루어 볼 때, 도입유전자가 intergenic으로 삽입되어 T₄ 세대를 오면서 안정화되었다고 생각된다. 많은 연구자들이 형질전환 후대를 이용하여 arsinh (Huber et al. 2002), cube root (Keay et al. 2003), rice (Jung et al. 2011) 등에서 유전자 발현양상 결과와 유사한 pattern을 얻었다.

적 요

Anthranilate synthase (AS)는 트립토판(Trp)과 indole-3-acetic acid, indole alkaloids의 생합성 경로에서 중요한

효소로 작용한다. 트립토판 생합성 상에서 feedback inhibition에 민감하게 반응하는 AS alpha-subunit 관련 *OASA2* 유전자 영역의 single (F124V) 및 double (S126F/L530D) 점돌연변이로 변형된 유전자의 재조합운반체를 작성하고 이들 유전자들을 *Agrobacterium* 방법으로 동진벼에 도입하여 형질전환체를 육성하였다. Single 및 double 돌연변이 *OsASA2* 유전자가 도입된 형질전환 벼 계통들은 nos gene probe를 이용한 TaqMan PCR 방법으로 single copy를 선발하였고, intergenic 계통을 선발하기 위해서 *Bfa* I 제한효소를 이용하여 RB와 LB 인접서열로부터 IPCR을 통한 FST 분석을 수행하여 4 개의 intergenic 계통을 선발하였다. 도입된 유전자의 발현으로 형질전환 벼는 Trp, IAN 및 IAA가 잎에 가장 많이 축적되었고, 종자의 트립토판 함량도 증가되었다. 후대에서 tryptophan 함량이 높은 S-TG와 D-TG의

두 호모 이벤트 계통을 육성하여 트립토판 함량을 분석한 결과 대조구에 비하여 13~30배 이상 높게 나타났으며, 유리아미노산의 함량도 증가하였다. 이벤트 계통을 이용하여 microarray 분석을 수행한 결과 세포 내 이온 수송, 영양분 공급 등에 영향을 주는 유전자군들이 up-regulation 되었고, 세포 내 기능유전자의 역할을 담당하는 조효소 등이 down-regulation 된 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 선발된 두개의 상동성 이벤트 계통들이 고함량의 유리 트립토판 생산 벼의 육종에 효과적으로 이용될 수 있음을 보여준 결과로 생각된다.

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 벼 미색관련 유전자의 표적 돌연변이체 육성 및 이용, 세부과제번호: PJ01119202)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Bartel B (1997) Auxin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:51-66
- Bender J, Fink GR (1998) A myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95:5655-5660
- Bohlmann J, DeLuca V, Eilert U, Martin W (1995) Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes. Plant J 7:491-501
- Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtanikane R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ (1995) Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. Biochemistry and Molecular Biology International 35:627-634
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. Bioinformatics 18 (Suppl 1): S96-S104
- Ishihara A, Matsuda F, Miyagawa H, Wakasa K (2007) Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. Metabolomics 3:319-334
- Jung YJ, Lee MC, Kang KK (2011) A transcription factor “*OsNAC075*” is essential for salt resistance in rice (*Oryza sativa* L.). J Plant Biotechnol 38:94-104
- Jung YJ, Nou IS, Kang KK (2014) Overexpression of *Oshsp16.9* gene encoding small heat shock protein enhances tolerance to abiotic stresses in rice. Plant Breed. Biotech. 2(4):370-379
- Keay S, Seillier-Moiseiwitsch F, Zhang CO, Chai TC, Zhang J (2003) Changes in human bladder epithelial cell gene expression associated with interstitial cystitis or antiproliferative factor treatment. Physiological Genomics 14:107-115
- Kim DS, Lee IS, Jang CS, Kang SY, Seo YW (2005) Characterization of the altered anthranilate synthase in 5-methyltryptophan-resistant rice mutants. Plant Cell Rep 24:357-365
- Lee HJ, Abdula SE, Jee MG, Jang DW, Cho YG (2011) High-efficiency and Rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method using germinating rice seeds. J Plant Biotechnol 38:251-257
- Lee HY, Kameya T (1991) Selection and characterization of a rice mutant resistant to 5-methyltryptophan. Theor Appl Genet 82:405-408
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 25:402-408
- Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (2000) Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St John’s wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. Plant Cell Reporter 19:698-704
- Radwanski ER, Last RL (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. Plant Cell 7:921-934
- Romero RM, Roberts MF (1996) Anthranilate synthase from *Ailanthus altissima* cell suspension cultures. Phytochemistry 41:395-402
- Thole V, Alves SC, Worland B, Bevan MW, Vain P (2009) A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (FSTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants. Nature Protocols 4:650-661
- Tozawa Y, Hasegawa H, Terakawa T, Wakasa K (2001) Characterization of rice anthranilate synthase a-subunit genes OASA1 and OASA2. Tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of OASA1. Plant Physiology 126:1493-1506
- Ueno M, Shibata H, Kihara J, Honda Y, Arase S (2003) Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. The Plant Journal 36: 215-228
- Wakasa K, Hasegawa H, Nemoto H, Matsuda F, Miyazawa H, Tozawa Y, Morino K, Komatsu A, Yamada T, Terakawa T, Miyagawa (2006) High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. J Exp Bot 57:3069-3078
- Wakasa K, Ishihara A (2009) Metabolic engineering of the tryptophan and phenylalanine biosynthetic pathways in rice. Plant Biotechnol 26:523-533
- Wakasa K, Widholm JM (1987) A 5-methyltryptophan resistant rice mutant, MTR1, selected in tissue-culture. Theor Appl Genet 74:49-54