

극지식물 유전자원 기능의 신속검증 시스템 구축

Establishment of Rapid Functional Verification System for
Polar Plant Genetic Resources



2019. 5. 30

한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지식물 유전자원 기능의 신속검증 시스템 구축”과제의 최종보고서로 제출합니다.



2019. 5. 30

연구책임자 : 이형석

참여연구원 : 박미라, 박현, 변미영, 이정은,
정지혜, 조성미, 조호진

위탁연구기관명 : 덕성여자대학교

위탁연구책임자 : 이호림



보고서 초록

과제관리번호	PE18290	해당단계 연구기간	2017. 04. 01. ~ 2019. 03. 31	단계 구분	1 / 1	
연구사업명	중 사업명	창의연구사업				
	세부사업명	Seed형 선행과제				
연구과제명	중 과제명					
	세부(단위)과제명	극지식물 유전자원 기능의 신속검증 시스템 구축				
연구책임자	이 형 석	해당단계 참여연구원수	총 : 11 명 내부 : 3 명 외부 : 8 명	해당단계 연구비	정부: 270,000 천원 기업: 천원 계: 270,000 천원	
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 극지 유전체 사업단		참여기업명			
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 : 덕성여자대학교		연구책임자 : 이 호 립			
요약					보고서 면수	44
<p>◦ 최근 극지식물 유전자원을 활용하여 내냉성 벼가 개발되는 등 극지식물 유전자원이 생명공학 작물 개발을 위한 신규 유전자원으로서 주목받고 있음</p> <p>◦ 본 연구과제에서 극지식물 유전자의 활용연구 활성화를 위해 극지식물 유전자원 기능의 맞춤형 신속검증 시스템을 구축하고자 함</p> <p>◦ 본 연구과제에서 극지식물 자체에서 원형질체 세포를 분리하여 단기발현시스템을 기능분석에 사용하여 이중 유래 발현에 의해 발생할 수 있는 오류를 최소화하는 신속 기능검증 방법을 확립하였음. 그 결과 현화식물 5종, 선대류 2종 등 총 7종의 극지식물에 대해 원형질체 추출방법을 확립하였고, 12종의 유전자의 단백질을 발현시켜 유전자 발현 유무 및 세포내 위치를 성공적으로 확인했음</p> <p>◦ 형질전환기법이 확립된 모델중에 극지식물의 유전자를 과발현시켜 극지유전자의 기능을 분석하는 방법을 구축하였음. 남극개미자리(<i>Colobanthus quitensis</i>)의 주요 스트레스 경로 유전자를 모델식물인 애기장대에, 남극 낮깃털이끼(<i>Sanionia uncinata</i>)에서 선별된 스트레스 내성 유전자를 모델 선대류인 <i>Physcomitrella patens</i>에 각각 형질전환하고 표현형을 분석했음</p> <p>◦ 극지 환경에 적응하여 살아가는 선대류의 배양체를 확보하고 특성을 파악, 유용 유전자원으로 활용하고자, 극지선대류의 무균배양체를 확보하고 이들의 성장 및 발달특성을 배지조건별, 항생제별, 온도별 성장양상을 조사했음</p> <p>◦ 극지 선대류인 KMR5045(<i>Bryum sp.</i>)를 대상으로 원형질체 세포 분리방법과 외래 DNA 도입법을 구축하여, 성공적으로 극지 선대류 형질전환 기법을 구축했음</p>						
색인어 (각 5개 이상)	한 글	극지식물, 기능연구, 모델식물, 원형질체, 형질전환				
	영 어	polar plant, functional verification, model plant, protoplast, transformation				

요 약 문

I. 제 목

극지식물 유전자원 기능의 신속검증 시스템 구축

II. 서론: 연구개발의 목적 및 내용

유전공학 기술로 DNA를 재조합하여 새로운 성질을 갖도록 개량하는 생명공학 작물 연구는 작물의 생산성과 병충해 저항성 증진을 통한 농업 경제성 확보, 환경재해 저항성 증진을 통한 재배지역 확대 등, 다목적으로 진행되어 왔다. 최근 극지식물 유전자원을 활용하여 내냉성 벼가 개발되는 등 극지식물 유전자원이 생명공학 작물 개발을 위한 신규 유전자원으로서 주목받고 있다. 본 연구과제에서는 극지식물 유전자 활용연구의 활성화를 위해 극지식물 유전자원 기능의 맞춤형 신속검증 시스템을 구축하고자 하였다.

III. 연구개발결과

1. 원형질체 발현시스템 확립 : 유전자 형질전환방법 중 원형질체를 이용한 단기발현시스템은 재조합단백질을 식물세포에서 대량신속하게 발현시킴으로써 단기간에 단백질의 특성을 규명하기에 매우 용이하다. 기존의 식물생리유전학에서는 모델식물의 원형질체를 주로 사용하였으나 본 연구에서는 극지식물 자체에서 세포를 분리하여 기능을 검증하는 방법을 사용함으로써 이중 유래 발현에 의해 발생할 수 있는 오류를 최소화한 신속 정확한 기능검증 방법을 확립하였다. 현화식물 5종, 선태류 2종, 총 7종에 대해 원형질체 추출기법을 성공적으로 확립했으며, 12종의 유전자의 타겟 단백질을 발현시켜 세포내 발현유무 및 위치를 확인했다.

2. 모델식물 기반 유전자 기능분석 : 형질전환기법이 확립된 모델종인 애기장대(현화식물) 및 *Physcomitrella patens* (선태류)에 극지식물의 유전자를 과발현시켜 극지유전자의 기능을 분석하는 방법을 구축하였다. 남극개미자리(*Colobanthus quitensis*)의 전사체 분석을 통해 식물스트레스에 주요 역할을 하는 MAPK 경로 유전자 2종 및 4종의 온도반응 유전자를 선별해

원형질체 시스템에서 발현 검사를 진행한 후 애기장대에 형질전환 후 표현형을 분석했다. 그 중 *CqNPK1*, *CqMKK6*, *CqTSPO*의 과발현 형질전환체들이 삼투저항성을 가지고 있음을 확인했다. 남극 바톤반도에서 우점하는 남극 낮깃털이끼(*Sanionia uncinata*)에서 선별한 LEA14와 DHN 유전자를 PEG-mediated DNA transfection 방법으로 선대류 모델종 *Physcomitrella patens*에 형질전환한 결과, genomic PCR 및 RT-PCR 등을 통해 타겟유전자가 과발현되었음을 확인하였다.

3. 극지선대류의 형질전환 : 본 연구에서는 남극 환경에 적응하여 살아가는 선대류의 배양체를 확보하고 특성을 파악, 유용 유전자원으로 활용하고자 하였다. 극지선대류의 무균배양체를 확보하여 이들의 성장 및 발달특성을 배지조건별, 항생제별, 온도별 성장양상을 기록하였다. 이들 중 비교적 생장이 빠른 극지 선대류인 KMR5045(*Bryum sp.*)를 대상으로 원형질체 세포 분리방법과 외래 DNA 도입법을 구축하여, 성공적으로 극지 선대류 형질전환 기법을 구축했다.

V. 연구개발결과의 활용계획

극지식물 유전자원 연구는 극지생물의 적응과 진화 과정을 규명하기 위한 중요한 연구결과를 제공한다. 신속검증시스템은 실효성 있는 극지식물 유전자원 확보 과정에 필수적인 단계로서, 연구 개발의 결과들은 극지식물 유래 유전자원을 활용한 생명공학 작물 개발의 초석으로 활용될 것이다.

극지연구소

S U M M A R Y

I. Title

Establishment of rapid functional verification system for polar plant genetic resources

II. Introduction: Purpose and contents of R & D

Research on biotechnology crops, which are defined as improved crops by recombinant DNA with genetic engineering technology, has progressed for the purpose to contribute to securing agricultural economy by improved crop productivity and resistance to pests, and to expanding cultivation areas by increasing resistance to climate change. Recently, polar plant genetic resources have been attracting attention as a new genetic resource for the development of biotechnology crops, such as the development of cold tolerant rice with polar plant genes. In this research project, we tried to establish a customized rapid verification system of polar plant genetic resources in order to facilitate the functional research on polar plant genes.

III. R & D results

1. Establishment of protoplast system: Among the transgenic methods, protoplast-based transient expression systems are very easy to identify the characteristics of genes in a short period of time by expressing recombinant proteins in plant cells in large quantities. In the present study, we used a quick and accurate method to verify gene function by isolated protoplast cells from polar plants, minimizing errors caused by heterologous expression. The protoplast extraction method was established for five flowering species and two moss species. We expressed twelve genes with various gene function in protoplast system and their cellular localization was confirmed.

2. Model plant-based gene function analysis: A method to analyze the function of polar genes

selected by overexpressing polar plant genes in *Arabidopsis thaliana* (flowering plants) and *Physcomitrella patens* (moss), well established model species. Through transcriptome analysis of *Colobanthus quitensis*, two genes of MAPK pathway and four temperature responsive genes preliminary tested in protoplast system were transformed in Arabidopsis plants and the phenotype was analyzed. Among them, transformants of CqNPK1, CqMKK6 and CqTSPO were confirmed to have osmotic resistance. We also performed the functional analysis by transforming selected genes from Antarctic bryophyte species, *Sanionia uncinata*. *SuLEA14* and *SuDHN* genes were transformed into the model species *Physcomitrella patens* by PEG-mediated DNA transfection, and confirmed by genomic-PCR and RT-PCR.

3. Establishment of gene transformation systems for polar mosses: In this study, we aimed to acquire and characterize the polar moss species and established them as a genetic transformation system for functional study of polar plant genes. Axenic cultures of polar mosses were obtained and their growth and developmental characteristics depending on culture conditions were examined. Among them, KMR5045 (*Bryum sp.*), which is a relatively fast growing one, was selected to test protoplast cell separation method and foreign DNA transformation and it was successful. These results will be used as a basis for establishing the transgenic system for polar mosses.

V. Plan to utilize R & D results

Research on polar plant genetic resources provides important findings to explain the adaptation and evolution mechanism of polar organisms. The rapid functional verification system will be of great help in securing an effective polar plant genetic resource, and the results of this development will be used as a cornerstone for the development of biotech crops using polar plant-derived genetic resources.

C O N T E N T S

Chapter 1	Introduction	12
Section 1.	Background and Purpose of Research Planning	12
1.	Technical aspects	12
2.	Economic and industrial aspects	13
3.	Social and cultural aspects	13
Section 2.	Current R & D status	14
1.	Current international status	14
2.	Current domestic status	14
3.	Existing Performance of R & D	16
Section 3.	R & D objectives	17
1.	Vulnerabilities in current technology	17
2.	R & D objectives	17
Chapter 2	Contents and results of R & D	19
Section 1.	Establishment of protoplast system	19
1.	C.quitensis	19
2.	D.antarctica	22
3.	Arctic plant cells	25
4.	Antarctic moss	26
5.	Research papers and patent applications	26
Section 2.	Model Plant Based Gene Functional Analysis	27
1.	Construction of transgenic plants and functional analysis using Arabidopsis	27
2.	Construction and phenotyping of transgenic moss plants using Physocomitrella	31
Section 3.	Transformation of Antarctic bryophytes	32

1. Establishment of aseptic culture	32
2. Establishment of transgenic technique of Antarctic bryophytes	36
Chapter 3 Achievement of research and development goal	39
Section 1. Achievement of research goal.....	39
1. Objectives and Contents.....	39
2. R & D achievement.....	40
Chapter 4 Utilization Plan with R &D results.....	41



목 차

제 1 장 서론	12
제 1 절 연구기획 배경 및 목적	12
1. 기술적 측면	12
2. 경제·산업적 측면	13
3. 사회·문화적 측면	13
제 2 절 연구개발 현황	14
1. 국외 수준	14
2. 국내수준	14
3. 기존 연구개발 실적	16
제 3 절 연구개발 목표	17
1. 현기술상태의 취약성	17
2. 연구 목표	17
제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절 원형질체 시스템	19
1. 남극개미자리의 원형질체 추출 방법 확립 및 유전자 발현	19
2. 남극곰새풀의 원형질체 추출 방법 확립 및 유전자 발현	22
3. 북극식물 엽육세포의 원형질체 추출 방법 확립	25
4. 남극 선대류 원형질체 추출 및 유전자 발현	26
5. 논문 및 특허 출원	26
제 2 절 모델식물 기반 유전자 기능 분석	27
1. 모델현화식물 애기장대를 이용한 형질전환체 제작 및 유전자 기능 분석	27

2. 모델선택태류를 이용한 형질전환체 제작 및 표현형 분석	31
제 3 절 극지선택태류의 형질전환	32
1. 선택태류 무균배양체 확립	32
2. 극지 선택태류의 형질전환 기법 확립	36
제 3 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	39
제 1 절 연구목표 달성도	39
1. 연구 목표 및 연구내용	39
2. 연구개발 성과	40
제 4 장 연구개발결과의 활용계획	41



제 1 장 서 론

제 1 절 연구기획 배경 및 목적

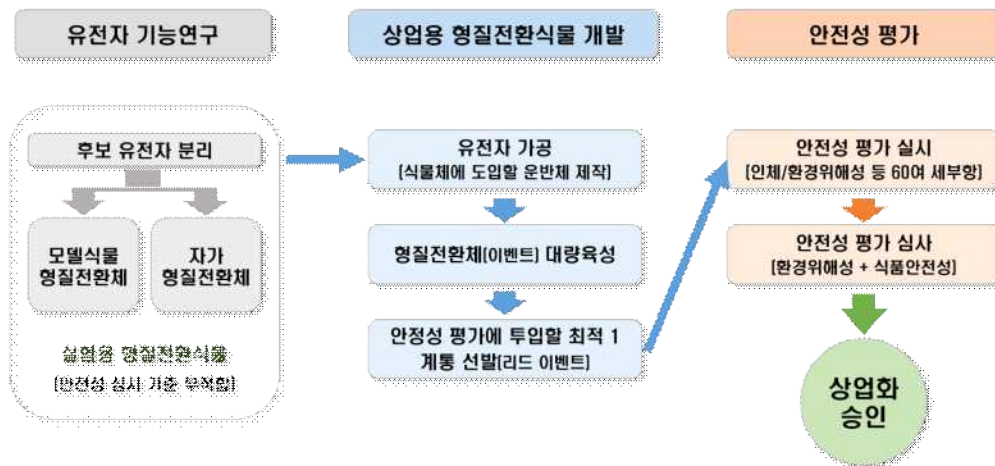
1. 기술적 측면

가. 극지식물 유전자원의 실용화 가능성 확인

유전공학 기술로 DNA를 재조합하여 새로운 성질을 갖도록 개량한 작물로 정의되는 생명공학 작물 연구는 작물의 생산성과 병충해 저항성 증진을 통한 농업 경제성 확보, 환경재해 저항성 증진을 통한 재배지역 확대 등 다목적으로 진행되어 왔다. 국내에서는 2012년부터 농진청에서 진행된 차세대바이오그린사업의 일환인 GM작물실용화사업단을 필두로 생명공학작물 개발 연구사업이 본격화되었으나, 활용 가능한 신규 유전자원의 부족은 연구사업 운영의 지속적인 한계점으로 작용해 왔다. 그러나 최근 극지식물 유전자원을 활용하여 내냉성 벼가 개발되는 등 극지식물 유전자원이 생명공학 작물 개발을 위한 신규 유전자원으로서 주목받고 있다.

나. 극지식물 유전자 기능연구의 기술적 한계 극복 필요

유용유전자를 활용한 생명공학 작물의 상업화 과정은 유전자 기능연구, 상업용 형질전환식물 개발, 안전성 평가 등 크게 3단계로 구성된다(그림 1).



[그림 1. 상업용 생명공학 작물 개발 과정]

국내 생명공학 작물의 상업화 과정에서 가장 큰 난점은 첫째, 작물 형질전환체의 대량육성 과정이 장기간 소요된다는 것과, 둘째, 안전성 평가 심사과정의 과도한 정부 규제이다. 이러한 두 가지 난점에 더불어, 극지식물 유전자원의 경우 자가 형질전환체 제작 기술이 확립되지 않아서 초기 유전자 기능연구 단계에서 기술 장벽 또한 존재한다. 극지식물 유용유전자원이 실용화로 이어지려면 일차적 기술 장벽인 자가 형질전환체 제작기술 확립이 시급하며, 유전자 기능연구 완료 이후 과정은 노하우가 확립된 농촌진흥청과의 협력을 통하여 진행하는 전략적 접근이 필요하다.

2. 경제·산업적 측면

가. 글로벌 생명공학 작물 시장의 지속 성장

환경재해 내성을 증진시킨 생명공학 작물은 열악한 자연환경에서 기존 작물보다 높은 생산성을 유지할 수 있어, 환경재해 극복 대책의 일환으로 활발한 연구가 진행 중이다. 글로벌 생명공학 작물 시장은 최초의 상용화가 진행된 1996년 이래 급속 성장하여 2020년에는 그 규모가 200억 달러에 도달할 것으로 추정되고 있다.

나. 생명공학 작물 기술의 해외 종속 우려

우리나라는 2015년 기준 연간 1,024만 톤, 23억 6천 달러 규모의 생명공학 작물을 수입했으며, 세계에서 5번째로 많은 생명공학 식품을 허가한 국가이다. 현재 생명공학 작물 시장은 몬산토, 신젠타 등 글로벌 기업이 독점하고 있어 거대 자본의 식량 무기화와 국내 시장 종속화에 대한 우려가 지속적으로 제기되고 있다.

3. 사회·문화적 측면

가. 이상기후와 환경재해로 인한 농업 피해는 국가적 난제

환경재해란 갑작스런 기상변화로 인한 사회경제적 피해를 일컫는 것으로, 한파, 가뭄, 홍수, 고온 등이 주요 원인이다. 환경재해는 21세기에도 빈번한 현상으로, 2009년 미국에서만 농작물 피해 규모 50억 달러, 그 중 저온으로 인한 피해는 15%인 7.5억 달러 규모로 발생했다. 관계부처합동 이상기후보고서에 따르면, 2015년 한 해

환경재해로 인한 국내 농업 분야 피해액이 냉해 60억, 가뭄 252억에 달하는 등 환경재해 극복은 아직 해결되지 않은 국가적 난제이다(그림 2). 2016년에도 충북과 제주의 농민들로부터 냉해 대책을 촉구하는 대정부 항의가 수 차례 진행되는 등 반복되는 국가적 재난에 대한 정부 차원의 대책 마련 시급하다.



[그림 2. 이상기후로 인한 우리나라 농업 분야 피해 내용 요약. (출처) 관계부처합동 이상기후보고서 2015]

제 2 절 연구개발 현황

1. 국외 수준

생명공학 작물 재배가 시작된 1996년 이래 재배면적은 100배 성장하여 현재는 미국과 캐나다를 비롯 28개국에서 생명공학 작물이 재배되고 있다. 목표시장은 주로 해외 시장 진출을 위한 종자 개발이 중점적이며, 콩, 옥수수, 면화, 유채 등 18개 작물에 적용되어 108개의 품종이 상업 재배 중이다. 개발 주체는 산학연 주도의 종자 개발이 다수를 이루며, 다국적 종자기업들 (몬산토, 바이엘크롭, 듀폰, BASF, 신젠타, 다우아그로 등)에 의한 상업화가 가장 활발하다. 대표적인 예로, 몬산토에서 개발한 GM 옥수수인 드라우트가드(DroughtGard™)는 2015년 미국에서 8,100 평방킬로미터에 재배되었고, 민관합자사인 WEMA(Water Efficient Maize for Africa)에 기증되어 2017년까지 아프리카의 선택된 국가들에게 보급될 예정이다. 극지식물의 경우 칠레 Manuel Gidekel 박사 연구팀에서 남극곰새풀 유래 자외선 차단물질 분리, 남극곰새풀 근권에서 분리한 미생물 활용 생물비료 개발 등의 내용으로 PCT와 미국, 유럽에 특허 등록 완료한 바 있다. 하지만 극지식물 유래 유전자원을 활용하여 작물의 환경재해 내성을 개량하고자 하는 시도에 대한 해외 사례는 전무하다.

2. 국내수준

국내 생명공학 작물 개발은 농촌진흥청 주도의 차세대바이오그린 21사업 산하 GM작물개발사업단을 주축으로 한국생명공학연구원, 대학 소속 연구팀들에 의해 진행되어 왔다. 주요 연구 대상은 벼, 콩, 과채류, 고추, 잔디, 화훼류, 당근, 감자, 배추 등으로 병해충저항성, 신기능물질생산, 환경스트레스 저항성, 고생산성 등의 특성을 증진시키는 것이 주목적이었다. 이처럼 활발하게 연구개발이 진행되었음에도 불구하고, 국내 생산 유전자 변형 작물은 2015년까지 422건이 연구개발용으로 승인이 되었을 뿐 식품, 산업용으로는 승인받은 경우는 전무하다.

표 1. 국내외 생명공학 작물 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
<ul style="list-style-type: none"> 농촌진흥청 GM작물개발사업단 	<ul style="list-style-type: none"> 미래대응 유용 GM 작물 육성 기반 기술 구축 형질전환 작물 개발 및 실용화 	<ul style="list-style-type: none"> 글로벌 종자회사로의 기술이전 2건을 통한 기술료 수입 발생 산학연 컨소시엄의 공동연구를 위한 기술이전
<ul style="list-style-type: none"> 다국적 종자 기업 (몬산토, 바이엘크롭, 듀폰, BASF, 신젠타, 다우아그로) 	<ul style="list-style-type: none"> 제조제 저항성, 해충저항성, 병원균 저항성, 환경스트레스 내성 증진 작물 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 인네이트(Innate™) 감자, 아틱(Arctic®) 사과, 첫 번째 수정 계능 작물인 카놀라(Canola™)의 상업화 추진 몬산토의 GM 옥수수인 드라우트가드(DroughtGard™)는 미국 내 재배 및 아프리카 보급 예정
<ul style="list-style-type: none"> 고려대학교 	<ul style="list-style-type: none"> 선대류 모델종인 <i>P. patens</i>의 환경스트레스 반응 연구 	<ul style="list-style-type: none"> New Phytologist 등 유명 저널에 4편의 논문 발표
<ul style="list-style-type: none"> The Moss Genome Consortium 	<ul style="list-style-type: none"> 독일, 일본, 미국 등의 <i>P. patens</i> 연구자들의 연합체로, 지놈 연기사열 해독 및 유전자 기능연구 수행 	<ul style="list-style-type: none"> 연구논문 출판과 Moss Genome 웹사이트 운영을 통해 지속적으로 선대류 연구의 기반 정보 공유
<ul style="list-style-type: none"> BAS (British Antarctic Survey) 	<ul style="list-style-type: none"> 환경변화에 따른 생물 반응 연구를 진행하며, 남극 선대류의 분포도 조사 수행 	<ul style="list-style-type: none"> BAS 내의 다른 연구 프로그램과 연계한 데이터 공유, 연구논문과 전문서적 발간
<ul style="list-style-type: none"> 극지연구소 	<ul style="list-style-type: none"> 남극 식물 유전자원 확보 내냉성 관련 극지식물 유전자원 기능 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 극지생물 유전자원 DB Antagen 구축 활용 남극곰새풀 유래 내냉성 유전자인 <i>DaCBF7</i> 유전자를 과다발현하는 벼 형질전환체에 관한 논문 출판 및 국내 특허 등록. 극지유전자원을 활용한 GM 작물의 최초 사례

3. 기존 연구개발 실적

가. 극지식물 유전자원 지속 확보

극지연구소에서는 “극지생물 기능유전체 연구(2011~2013)”와 “남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴(2014~2016)” 사업을 통해 남극에 있는 2종의 현화식물, 2종의 선대류를 포함한 다양한 극지생물의 유전체 정보를 획득했고, 남극에서 식하는 현화식물인 남극좁새풀과 남극개미자리에 다양한 환경스트레스를 처리한 후 발현유전체를 분석 후 스트레스 내성 관련 유전자들의 기능 연구 수행해 왔다(Lee et al. 2013; Lee et al. 2014).

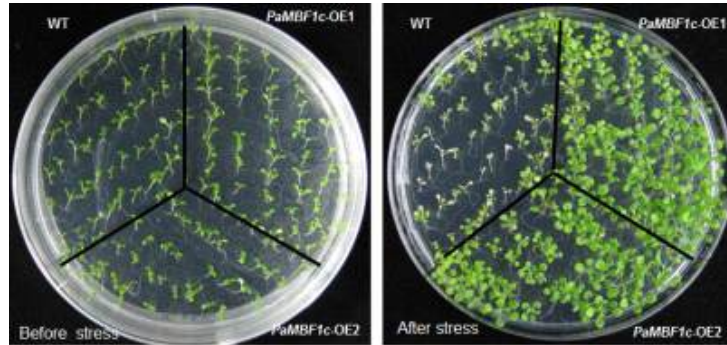
나. 남극식물 유래 환경스트레스 저항성 증진 유전자 발견

남극좁새풀 유래 내냉성 유전자인 DaCBF7 유전자를 과다발현하는 벼 형질전환체를 제작한 결과, 일반벼에 비해 냉해 조건에서의 생존률이 5배 이상 증가하여 극지식물 유전자원이 생명공학 작물 개발의 소재로 활용될 수 있음을 확인했다(그림 3)(Byun et al. 2015).



[그림 3. 2015년 6월 1일자 OBS 뉴스. 세계 최초 남극 식물에서 항냉해 유전자 발견]

남극에서 우점하는 산솔이끼의 환경스트레스 반응 관련 유전자인 PaMBF1c를 과다발현하는 애기장대 형질전환체가 야생형에 비해 염스트레스 저항성 증가됨을 확인했다(그림 4)(Alavilli et al. 2017).



[그림 4. 염스트레스 처리 전(좌), 후(우) 야생형과 *PaMBF1c* 과다발현 애기장대 표현형]

제 3 절 연구개발 목표



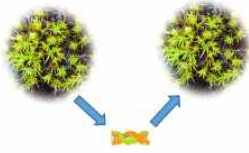






1. 현기술상태의 취약성

형질전환 기술을 이용한 식물의 환경스트레스 내성 증진 관련 기술의 특허현황 분석 결과, 양적비교에서는 한국이 보유특허 205건으로 미국(264건) 대비 77.6%, 중국(256건) 대비 80.1% 수준이었다. 질적비교에서는 한국의 보유특허 중 우수 등급은 11%, 미국은 23.5% 수준이어서 양적수준에 비해 격차가 벌어지지만, 중국(11%)과는 거의 동일한 기술수준을 보유한 것으로 나타났다. 극지에 서식하는 식물의 유전자를 이용하여 식물의 환경스트레스 내성을 증진시킨 형질전환체 개발 기술은 현재 소수의 특허 출원만이 진행되고 있어 기술 개발의 초기단계인 것으로 보이며, 향후 집중 투자 여부에 따라 극지연구소가 해당 분야 선두그룹이 되는 것도 가능할 것으로 판단된다.

2. 연구 목표

본 연구의 목표는 앞서 기술한 기술적 한계를 극복하고 극지식물 유전자의 활용연구 활성화를 위해 극지식물 유전자원 기능의 맞춤형 신속검증 시스템을 구축하는 것이다. 이를 위해 3가지 세부목표를 설정하였다(그림 5). 첫 번째, 가장 신속하게 세포내 단백질의 위치와 유전자의 기능을 1차적으로 검증 가능한 세포기반 원형질체 시스템을 구축한다. 두 번째, 모델식물 기반 기능연구를 시스템을 구축한다. 대부분의 극지식물의 직접적인 형질전환이 불가능한 현 수준에서 현실적으로 가장 신뢰 가능한 연구결과를 생산 가능한 모델식물 시스템을 시도하고 실증한다. 세 번째, 남극 선대류를 대상으로

형질전환 시스템을 구축하여, 차후 극지의 선대류 대상 유전체 기능연구에 활용할 수 있도록 한다.

	세포기반 시스템	모델종 형질전환	자가 형질전환
의미	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 식물에서 추출한 세포에 유전자를 삽입하여 기능 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 다양한 소스의 유전자를 모델식물에 삽입하여 기능 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 식물체 유래 유전자를 원래 식물체에 삽입하여 기능 연구 
실험 소요기간	 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 3개월 이내 	 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 애기장대 1년 ✓ 모델이끼 1년 ✓ 벼 3년 	 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1년 이상 ✓ 많은 경우 불가능
데이터 신뢰도	 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 비생체 실험(in vitro) ✓ 신뢰도 가장 낮음 	 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 생체 실험(in vivo) ✓ 신뢰도 중간 	 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 생체 실험(real in vivo) ✓ 신뢰도 최고

[그림 5. 극지식물 유전자원 기능의 신속검증을 위한 세 가지 시스템 비교]



제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

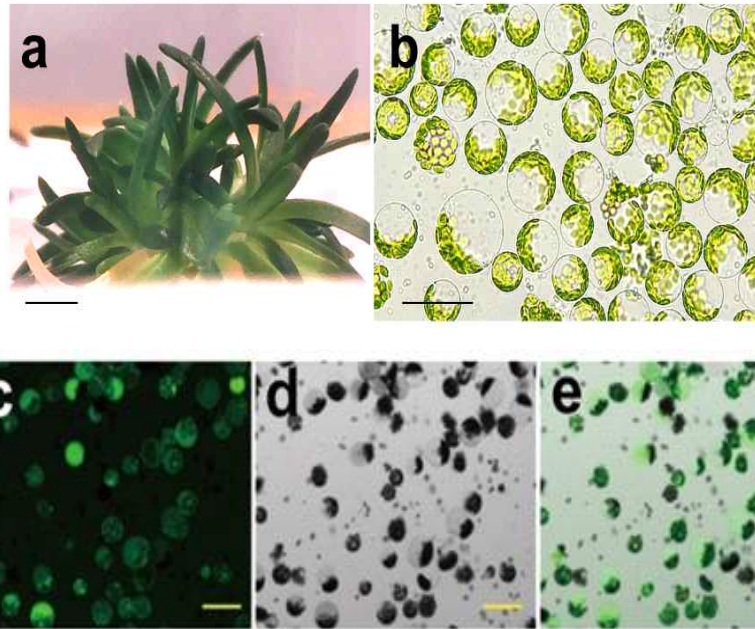
제 1 절 원형질체 시스템

1. 남극개미자리의 원형질체 추출 방법 확립 및 유전자 발현

유전자 형질전환방법 중 원형질체를 이용한 transient expression 시스템은 재조합단백질을 식물세포에서 대량으로 신속하게 발현해서 단기간에 단백질의 특성을 규명하기에 매우 편리하다. 기존의 식물생리유전학에서는 모델식물의 원형질체를 주로 사용하였으나 본 연구에서는 극지식물 자체에서 세포를 분리하여 기능을 검증하는 방법을 사용하고 genome background의 차이에 의해 발생할 수 있는 오류를 줄여 신속 정확한 기능검증을 추구하였다.

가. 남극개미자리 엽육세포의 원형질체 추출 방법 확립

분화가 끝난 남극개미자리(*Colobanthus quitensis*) 식물의 잎을 이용하여 원형질체 세포(protoplast) 추출의 최적화 조건을 결정했다(그림 6). 이 과정에서 세포 분리의 중요 요인에 해당하는 셀룰로오스 분해 효소의 종류, mannitol, pH 등의 여러 조건을 다양하게 적용하여 최적화조건을 결정하고 안정적인 수득률을 확보할 수 있었다. 원형질체 유도 효소로는 기존에 잘 알려져 있던 cellulase RS, macerozyme R10 이외에 새롭게 Viscozyme을 추가로 이용하여 최종 $5.8 \pm 0.8 \times 10^5$ protoplasts/ gFW (gram of fresh weight) 수준의 수득률을 확보했다(표 1). 삼투압 안정제인 mannitol의 여러 농도를 적용해서 비교했고, 그 중 0.5 M 조건 및 acidic pH 4.0 조건에서 가장 높은 $8.7 \pm 0.5 \times 10^5$ protoplasts/ gFW 수준의 수득률을 확보할 수 있었다(표 1).



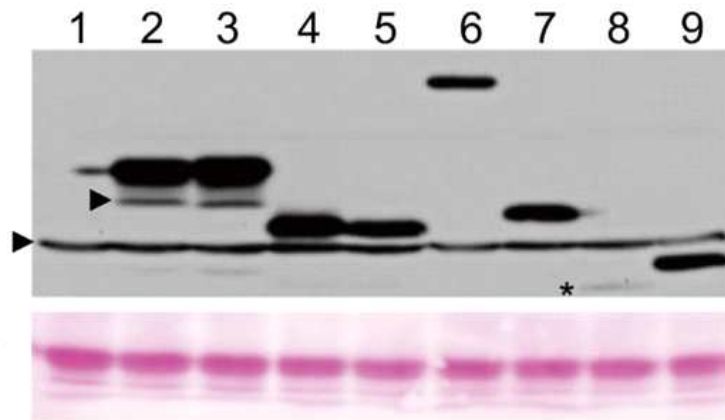
[그림 6. 남극개미자리 원형질 세포 분리. a. fully differentiated plant, b. isolated mesophyll protoplasts .c. fluorescein diacetate staining, d. bright field, e. merged images]

[표 1. 다양한 조건 변화에 따른 남극개미자리 원형질체 세포분리 수득률 비교]

No	Cellulase	Macerozyme	Viscozyme (%)	Mannitol (M)	pH	Protoplast yield (mean ± SD/gFW)	p
	RS (%)	R10 (%)					
1	1.5	0.3	-	0.5	5.7	3.6 ± 1.9 X10 ³	ns
2	2.0	0.6	-	0.5	5.7	7.7 ± 2.9 X10 ³	ns
3	3.0	1.2	-	0.5	5.7	1.2 ± 0.4 X10 ⁴	***
4	3.0	1.2	1.5	0.5	5.7	5.8 ± 0.8 X10 ⁵	***
5	3.0	1.2	1.5	0.4	5.7	4.6 ± 0.3 X10 ⁵	***
6	3.0	1.2	1.5	0.6	5.7	3.2 ± 0.5 X10 ⁵	***
7	3.0	1.2	1.5	0.7	5.7	2.6 ± 0.2 X10 ⁵	***
8	3.0	1.2	1.5	0.5	4.0	8.7 ± 0.5 X10 ⁵	***
9	3.0	1.2	1.5	0.5	5.0	5.2 ± 0.6 X10 ⁵	***
10	3.0	1.2	1.5	0.5	6.0	4.2 ± 0.3 X10 ⁵	***
11	3.0	1.2	1.5	0.5	7.0	1.7 ± 0.2 X10 ⁵	***

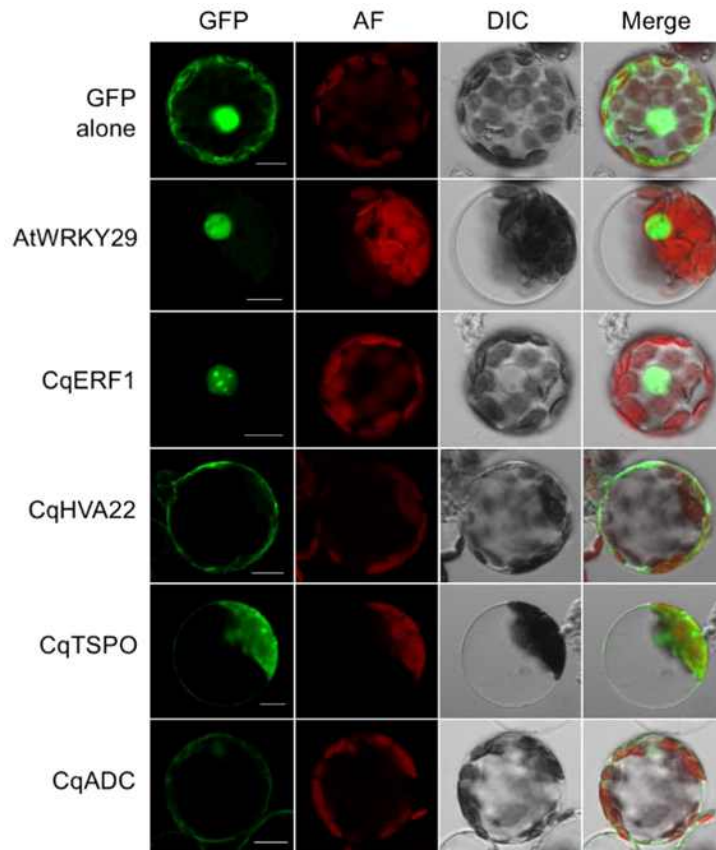
나. 남극개미자리 원형질체 내 외래 유전자 발현

남극개미자리 원형질체 세포 내 외래 유전자를 도입하기 위해 PEG-CaCl₂-mediated DNA transfection을 수행했다. DNA transfection을 위한 고순도의 plasmid DNA를 얻기 위해 CsCl-gradient ultracentrifuge 분리법을 적용했고, DNA transfection 후, 상온상태에서 원형질체 세포를 6시간 동안 배양했다. 도입된 유전자들은 HA epitope으로 표지되었기 때문에 anti-HA 항체를 사용하여 western blot 분석을 수행하여 발현단백질의 양을 확인할 수 있었다(그림 7). 이로써 남극개미자리 원형질체에서 타겟단백질이 성공적으로 발현되고 있음을 확인하였고, 향후 다양한 생화학적 분석이 가능할 것으로 판단된다.



[그림 7. 남극개미자리 원형질체의 유전자 도입 및 단백질 발현. 1: Control; 2: Cq_MKK6-HA; 3: Cq_MKK6a-HA; 4: Cq_NPK1-KD; 5: Cq_NPK1-KM; 6: Cq_ADC; 7: Cq_ERF1; 8: Cq_HVA22; 9: Cq_TSPO]

세포 기반 분석법 중 가장 대표적인 연구방법은 발현 단백질의 세포내 위치를 결정하는 것이다. 남극개미자리에서 선별된 유전자들의 ORF를 GFP 형광단백질과 결합시키고, 35S-CaMV 프로모터로 발현이 유도되도록 고안된 발현벡터에 클로닝한 후 이를 DNA transfection했다(그림 8). 그 결과, 음성 대조군인 GFP alone은 세포막, 세포질 그리고 핵에서의 발현 위치를 보였고, 양성 대조군으로 사용한 애기장대 전사인자 AtWRKY29은 핵에서 뚜렷한 발현을 확인할 수 있었다(Asai et al., 2002). 그 외, 남극개미자리 유전자인 CqERF1은 핵에서, CqHVA22, CqTSPO 그리고 CqADC의 경우에는 세포막 혹은 세포질에서 발현되었다(그림 8).

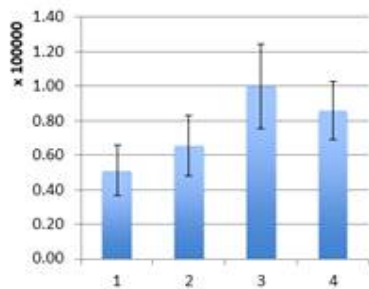
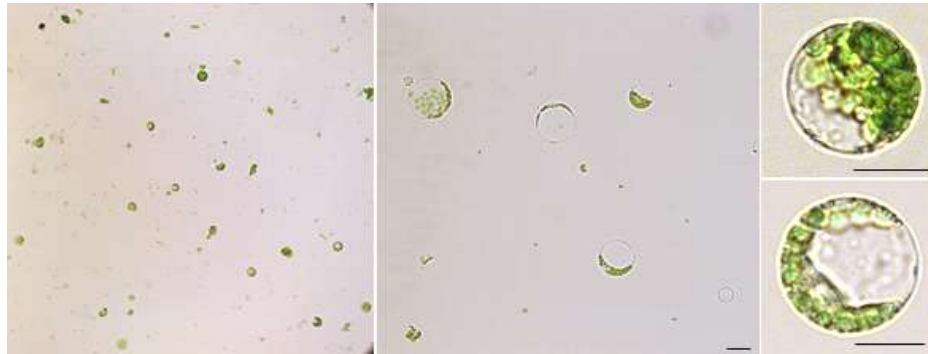


[그림 8. 남극개미자리 세포에서의 타겟유전자의 세포내 위치 확인]

2. 남극곰새풀의 원형질체 추출 방법 확립 및 유전자 발현

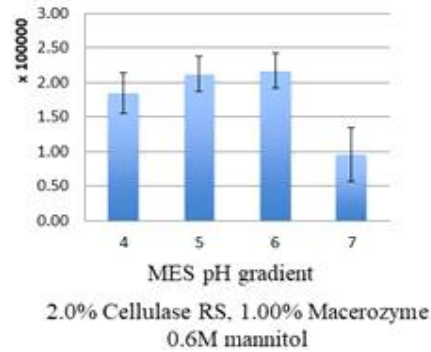
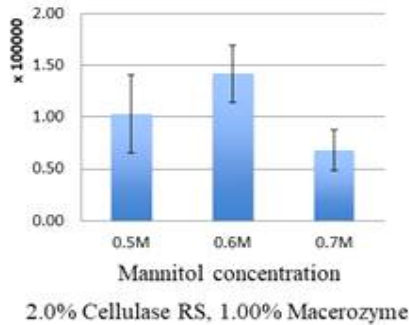
가. 남극곰새풀 엽육세포의 원형질체 추출 방법 확립

남극곰새풀 (*Deschampsia antarctica*)은 단자엽식물이므로 모델 단자엽인 벼의 원형질체 분리 방법을 참고해서 실험을 수행했다(Zhang et al., 2011). 세포 분리의 중요 요인인 셀룰로오스 분해 효소의 종류, mannitol, pH 등의 여러 조건을 다양하게 적용하여 최적화조건을 결정하고 수득률을 비교했다. 최종적인 결과로, 2.0% Cellulase RS, 1.0% Macerozyme R10, 0.6M Mannitol, 10mM MES pH 6.0의 조건에서 6시간 동안 식물 조직 절편을 처리했을 때, 약 2×10^5 protoplasts/ gFW 수준의 높은 수득률을 확보할 수 있었다 (그림 9).



Efficiency of different enzyme mixture for *D. antarctica*

- 1: 1.0% Cellulase RS, 0.50% Macerozyme
 - 2: 1.5% Cellulase RS, 0.75% Macerozyme
 - 3: 2.0% Cellulase RS, 1.00% Macerozyme
 - 4: 2.5% Cellulase RS, 1.25% Macerozyme
- with 0.5M Mannitol, MES pH 5.7

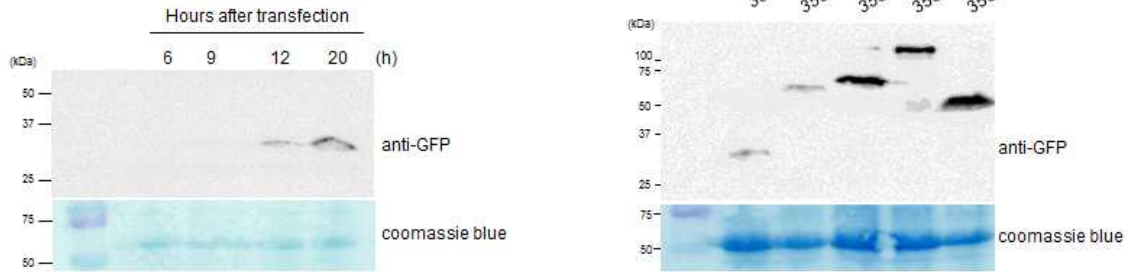


[그림 9. 남극곰새풀 엽육세포에서 분리한 원형질체 세포 및 다양한 조건에 따른 원형질체 세포 분리 수득률 최적화]

나. 남극곰새풀 원형질체에서 외래 유전자 발현

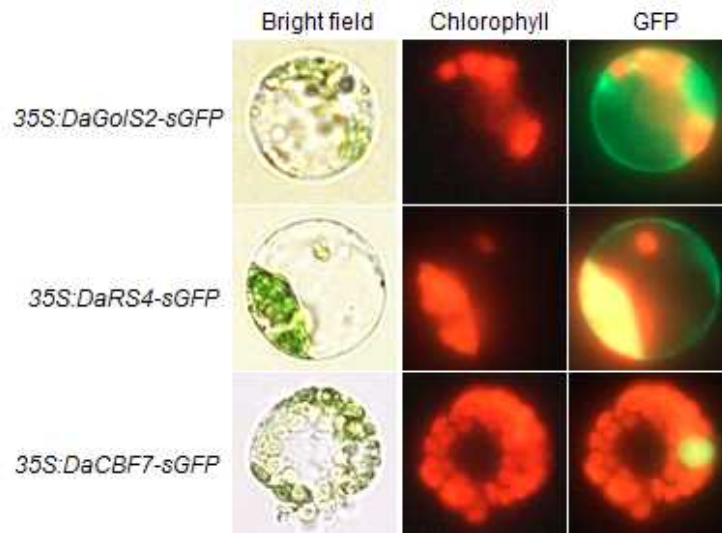
분리한 남극곰새풀 원형질체에 sGFP 형광단백질을 PEG-mediated DNA transfection의 방법으로 발현시킨 후, 시간별 발현량을 western blot으로 비교한 결과, 12시간 이후 다량의 sGFP 단백질이 생산되는 것이 확인되었다. 이후 남극곰새풀 유래 단백질 5종에 sGFP 형광단백질을 붙인 construct를 원형질체 세포에 발현시키고 western blot으로 발현을 확인한 결과 이들 모두 높은 수준으로 발현되는 것을 성공적으로 확인했다 (그림 10).

Protoplast transfection - 35S:sGFP



[그림 10. 남극좁새풀 원형질체에 단백질을 발현시켜 western blot으로 확인한 결과. 좌; sGFP의 시간대별 발현 확인, 우; 남극좁새풀 유래 유전자의 원형질체 세포 내 발현 확인]

목표 단백질의 세포내 위치를 확인하기 위해 형광단백질을 접한시킨 몇 가지 남극좁새풀 유래 단백질의 발현을 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 전사인자로 작용하는 DaCBF7은 남극좁새풀 세포의 핵에서 발견되었고, 당 합성에 관여하는 효소인 DaGolS2와 DaRS4는 세포질에서 볼 수 있었다 (그림 11).



[그림 11. 남극좁새풀 원형질체에 발현한 형광표지 결합 단백질들의 세포내 위치]

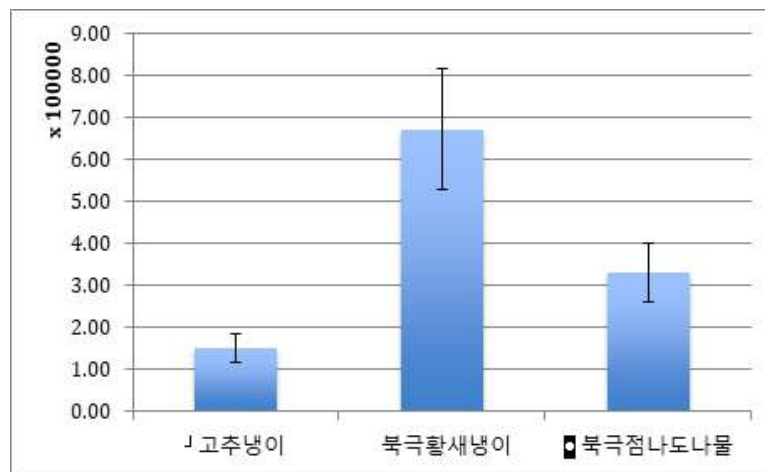
3. 북극식물 엽육세포의 원형질체 추출법 확립

앞선 두 종의 남극식물과 마찬가지로, 북극식물인 그린란드고추냉이, 북극황새냉이, 북극점나도나물을 대상으로 원형질체 세포 분리를 시도하였다. 그린란드고추냉이의 경우 잎이 크고 두껍지만 엽육조직이 부드러워 기존의 1.5% Cellulase R10, 0.3% Macerozyme R10, 0.4 M Mannitol 조건에서 쉽게 세포벽이 녹고 추출 시간도 단축되었지만, 분리된 원형질체 세포가 상대적으로 크기 때문에 상기 농도의 enzyme과 삼투압이 적합하지 않아 세포가 깨지는 경우가 많이 관찰되었다.

북극황새냉이와 북극점나도나물의 경우, 위와 동일한 세포벽분해효소 조건에서 세포벽이 잘 녹지 않아 분리된 원형질체 세포가 완벽한 등근 형태를 보이지 않았다. 이 문제를 해결하기 위해 또 다른 종류의 효소인 Viscozyme(Sigma, Catalog No. V2010)을 사용하여 추출 조건을 최적화하였다.

- 극지식물을 위한 universal method: 1.0% Cellulase R10, 0.2% Macerozyme R10, 1.0% Viscozyme, 0.5M Mannitol, 20 mM MES pH 5.7, 10 mM CaCl₂, 5 mM β - mercaptoethanol, 0.1% BSA

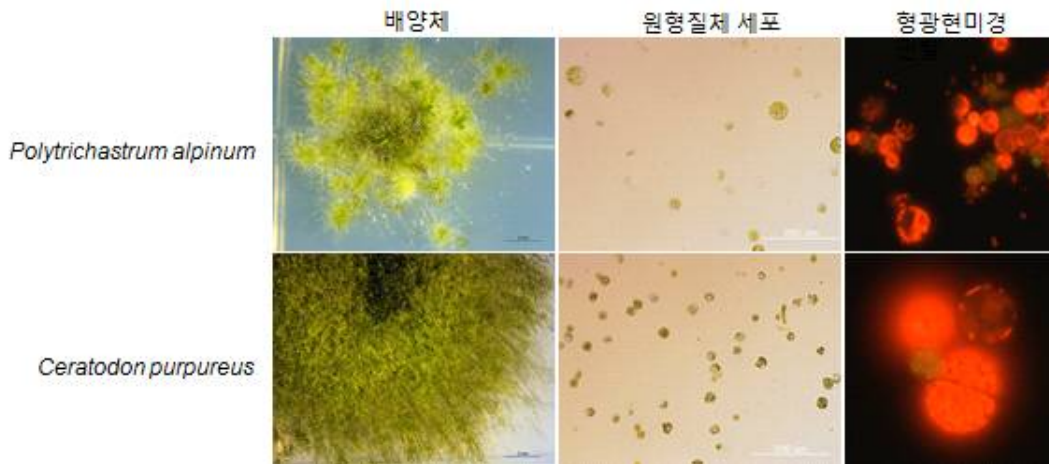
위 조건을 이용하면 세 종의 북극식물에서 2~4시간 이내에 $1.5 \sim 6.7 \times 10^5$ protoplasts/ gFW 수준의 수득률을 확보할 수 있었다(그림 12).



[그림 12. 그린란드 고추냉이, 북극황새냉이, 북극점나도나물 3종의 북극식물에 Universal method를 적용한 경우 원형질체 세포 분리 수득률 비교]

4. 남극 선대류 원형질체 추출 및 유전자 발현

남극에는 약 100여종의 선대류가 적응하여 분포하고 있기 때문에 식생을 구성하는 가장 주요한 생물이다. 하지만 선대류의 경우 전세계적으로 모델종인 *Physcomitrella patens* 외에는 대부분의 세포기반 분석이 확립되어 있지 않아서 연구에 많은 어려움이 존재한다. 이를 해결하기 위해 남극 유래 선대류 2종의 배양체를 대상으로 원형질체를 추출하는 조건을 구축하였다. PEG-mediated DNA transfection의 방법으로 pAct:Citrine construct를 발현 시킨 후, 형광단백질의 발현을 형광현미경으로 관찰한 결과 성공적으로 남극 선대류 원형질체에서 형광단백질이 발현되는 것을 확인하였다(그림 13).



[그림 13. 남극 선대류 원형질체에 단백질을 발현시켜 형광현미경으로 발현을 확인]

5. 논문 및 특허 출현

극지식물의 원형질체 분리에 관한 논문 작성 및 투고 : Optimized protoplast isolation and establishment of transient gene expression system for the Antarctic flowering plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., (Plant Cell, Tissue and Organ Culture 저널에 논문 투고 후 리뷰 중)

남극개미자리 원형질체 분리에 관한 국내특허 출원 완료: 남극개미자리 원형질체 분리용 효소액 및 이를 이용하여 남극개미자리로부터 원형질체를 분리하는 방법 (2018.05.03. 출원 제10-2018-0051427호)

제 2 절 모델식물 기반 유전자 기능 분석

1. 모델현화식물 애기장대를 이용한 형질전환체 제작 및 유전자 기능 분석

가. 유전체 분석을 통한 스트레스 내성 관련 유전자 선발

식물에서 다양한 스트레스 신호전달의 중추 역할을 담당하는 MAPK 신호인자를 남극개미자리에서 분리하고 기능을 검증하고자 하였다 (Kovtun et al., 2000; Xie et al., 2012). 첫 번째로, CqNPK1 유전자는 MAP Kinase Kinase Kinase(MKKK)를 암호화하는 애기장대의 ANP1과 ANP2, 담배의 NPK1 단백질의 상동유전자로서 남극개미자리 전사체 데이터베이스에서 찾을 수 있었다(Contig_19538). NPK1과 같은 MKKK 단백질은 autoinhibitory 활성이 있어서 WT 단백질은 특정 신호가 없는 조건에서는 활성을 갖지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 활성이 있는 형질전환체를 만들기 위해 autoinhibitory activity를 제거한 CqNPK1의 kinase domain (CqNPK1-KD)만을 클로닝하여 이용하였고, 음성 대조군으로 kinase 활성이 제거된 inactive kinase domain을 가진 NPK1-KM을 제작하였다 (표 2).

CqMKK6 유전자는 MAP Kinase Kinase(MKK)이다. 애기장대에서 스트레스 반응과 밀접하게 연관된 것으로 알려진 AtMKK4의 상동유전자를 탐색하는 과정에서 분리되었으나(Contig_46660), 염기서열은 AtMKK6와 가장 유사하여 82% sequence identity를 보였기 때문에 CqMKK6로 명명하였다. 형질전환체에서 기능 분석을 위해 WT 형태의 CqMKK6와 active form인 CqMKK6a 두 가지 모두를 클로닝하였다(표 2).

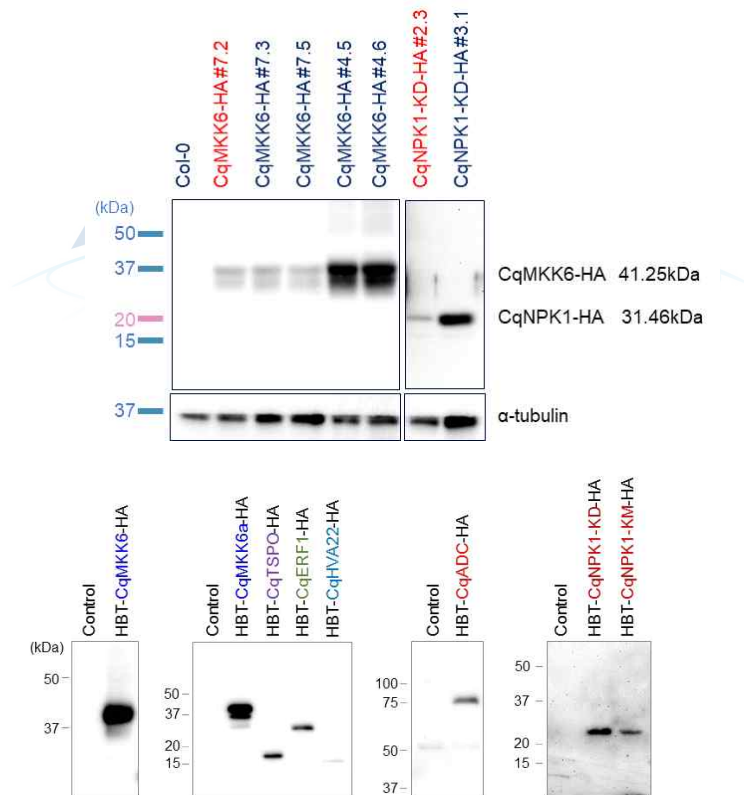
[표 2. 남극개미자리 MAPK pathway 상동유전자 리스트]

Name	Arabidopsis (AGI)	Contig No. in <i>C. quitensis</i>	Description
<i>CqNPK</i>	ANP1 and ANP2, Nicotiana protein kinase 1 (NPK1)	Contig_19538	
<i>CqMKK6</i>	At5g56580	Contig_46660	
<i>CqTSPO</i>	Tryptophan-rich sensory protein (At2g47770)	Contig_23283	benzodiazepine receptor-related family protein
<i>CqHVA22</i>	AtHVA22E (At5g50720)	Contig_30198	HVA22 d isoform 3
<i>CqERF1</i>	AtERF-1 encodes a member of the ERF subfamily B-3 of ERF/AP2 TF (At4g17500)	Contig_14494	af245119_1ap2-related transcription factor
<i>CqADC</i>	Arginine decarboxylase (AtADC) (At4g34710)	Contig_1381	

MAPK 관련 유전자들 외에도, 남극개미자리의 온도별 전사체 분석 결과에서 선별된 4종의 유전자 CqTSPO, CqHVA22, CqERF1, CqADC의 코딩서열부위를 클로닝하였다 (표 2).

나. 애기장대 과발현 형질전환체 제작 및 선별

애기장대 형질전환 이전에, 선별된 6종의 유전자들을 먼저 원형질체 세포에서 발현시켜서 발현 여부를 확인하였다. 이를 위해 목표유전자들을 애기장대 transient expression system으로 사용되는 pHBT vector에 클로닝했고(Yoo et al., 2007), 단백질 발현을 확인한 결과, 이들이 모두 정상적으로 발현되는 것을 알 수 있었다(그림 14).



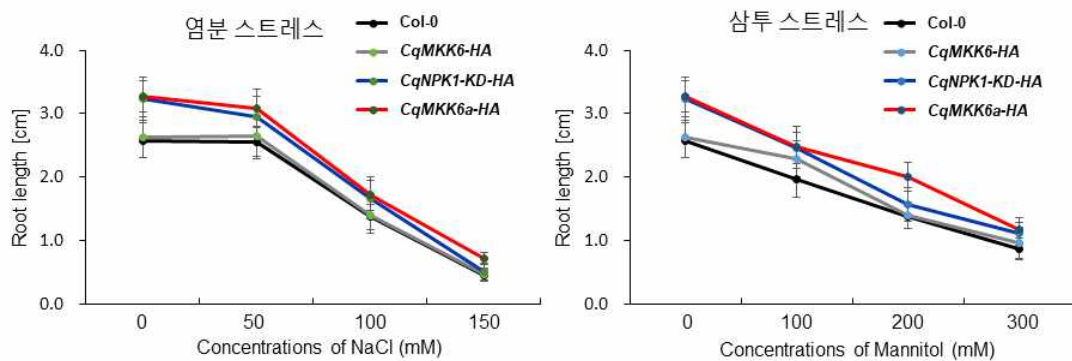
[그림 14. 남극개미자리 유전자 단백질의 애기장대 원형질체 발현]

원형질체 세포에서 단백질 발현과 세포내 단백질 위치가 확인된 6종 유전자들을 애기장대에 형질전환을 위해 pCB302 binary vector로 클로닝하였다. 이때, NPK1과 MKK6는 각각 기능분석을 위한 variant들을 추가했고, tag으로 HA와 GFP를 사용했기

때문에 유전자는 6종이지만 실제 진행된 형질전환체는 모두 16종이었다. 이들에 대한 애기장대 형질전환을 진행하여 모든 건에 대해 T0 seed pools들은 확보 완료되었다. 이들 중 CqNPK1, CqMKK6, CqTSP0, CqHVA22, CqADC, 그리고 CqERF1에 대해 T3 라인 선별이 완료되었다. 형질전환체 선발 과정에서, 높은 단백질 발현을 보이며 T-DNA가 single copy로 삽입되어 제초제 Basta에 대한 T2 분리비가 3:1인 line들을 위주로 선발하였다.

다. 애기장대 과발현 형질전환체의 표현형 분석

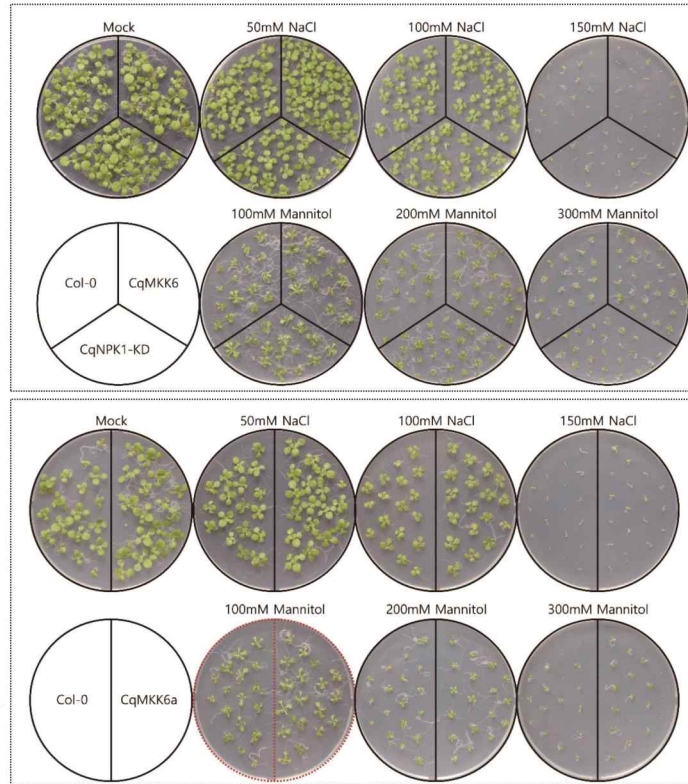
제작된 애기장대 과발현 형질전환체를 대상으로 비생물 스트레스에 대한 표현형 분석을 진행했다. CqNPK1과 CqMKK6a 형질전환체를 대상으로 염분에 대한 스트레스 반응 표현형을 비교한 결과, 두 과발현체의 뿌리가 야생형에 비해 길어졌고, 50 mM NaCl의 조건을 포함해서 전반적으로 염스트레스에 대해 저항성이 높아졌다(그림 15, 16). 또한 염스트레스 뿐 아니라 삼투스트레스에 대해서도 저항성이 증가했다. 특히 CqMKK6a의 경우, 전반적인 저항성을 보이는 반면, CqNPK1의 경우는 100 mM mannitol 스트레스 조건에서 가장 명확한 저항성을 보이고 이상의 농도에서는 그 효과가 감소했다. 따라서 결론적으로, CqNPK1과 CqMKK6 유전자의 역할은 다양한 스트레스에 대한 저항성을 뿌리 발달 과정에서 보였다.



[그림 15. CqNPK1 및 CqMKK6 과발현 형질전환체의 스트레스 내성 조사]

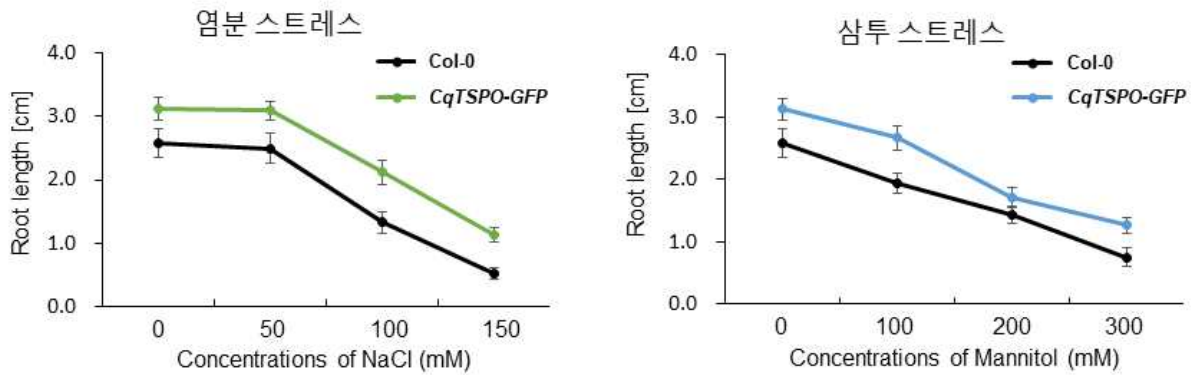
또한 2주 동안 염분 및 삼투 스트레스를 처리하며 유식물들의 성장을 분석한 결과, CqNPK1과 CqMKK6a 형질전환체들은 이들 조건에서 저항성 있는 표현형을 보이지 않았다. 다만, 항상 활성화된 형태의 CqMKK6a 형질전환체에서 100 mM mannitol

스트레스 조건에서 슈트 성장이 야생형보다 저항성을 보이며 성장이 촉진되는 것을 관찰하였다. (그림 16)



[그림 16. 삼투스트레스에 대한 CqNPK1-KD, CqMKK6, CqMKK6a 과발현 형질전환체 표현형 조사]

남극개미자리 전사체 분석 결과 저온 스트레스 저항성 유전자로 선발된 CqTSPO 과다발현 형질전환체는 염분과 삼투 스트레스 조건에서 뿌리 발달 저해가 억제되는 저항성 표현형을 보였다(그림 17). 다만, CqTSPO 형질전환체의 경우에는 아직 homozygous line이 선발된 상태가 아닌 T2 세대로 표현형 분석을 수행했기 때문에 추가적인 검증이 필요하다. 그러나, 저항성 표현형의 비율이 basta 저항성 비율과 유사한 것으로 보아, 스트레스 저항성 표현형이 CqTSPO 유전자에 의한 것이라 예측할 수 있다. 따라서 CqTSPO 유전자의 기능이 저온 이외에 다양한 비생물 스트레스에 대해 저항성을 부여한다고 판단된다. 또한 CqHVA22, CqADC, CqERF1 형질전환체에 대해서 염분 및 삼투 스트레스에 대한 뿌리 및 슈트 성장 표현형을 추가적으로 분석할 예정이다. 아울러 모든 형질전환체에 대한 저온 스트레스 저항성 표현형 분석도 진행될 것이다.

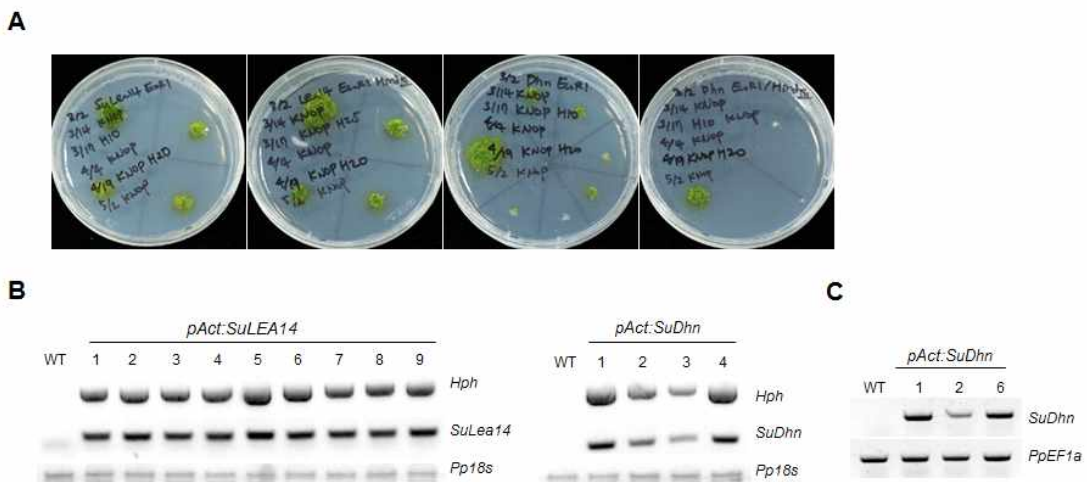


[그림 17. 삼투스트레스에 의한 TSPO 형질전환체 표현형]

2. 모델선대류를 이용한 형질전환체 제작 및 표현형 분석

가. 모델선대류를 이용한 형질전환체 제작

바톤반도에서 우점하는 *Sanionia uncinata*에서 선별한 스트레스 저항성 유전자의 기능을 분석하고자, 형질전환 기법이 확립된 선대류의 모델종인 *Physcomitrella patens*를 이용하였다. 대상 유전자 선별을 위해, 건조, 고염, ABA 스트레스 조건에서 발현이 증가하는 *SuLEA14*, *SuDhn* 유전자를 선정하였다(그림 18).



[그림 18. ABA, 건조, 고염에 대한 SuLea14, SuDhn 유전자 발현 변화 분석]

*P. patens*에서 추출한 원형질체 세포에 *pAct:SuLea14*, *pAct:SuDhn* construct를

PEG-mediated DNA transfection의 방법으로 도입하여 발현시킨 후 항생제 선별을 통해 형질전환체를 확보하였다(그림 19). Genomic DNA PCR로 유전자 삽입을 확인하고, RT-PCR로 *SuDhn*의 형질전환체에서 유전자 발현을 확인하였다. 추후 연구를 통해서, 스트레스에 반응하는 *SuLea14*, *SuDhn*이 과다발현된 형질전환 이끼가 스트레스의 저항성에 변화를 보이는지 확인할 것이다.



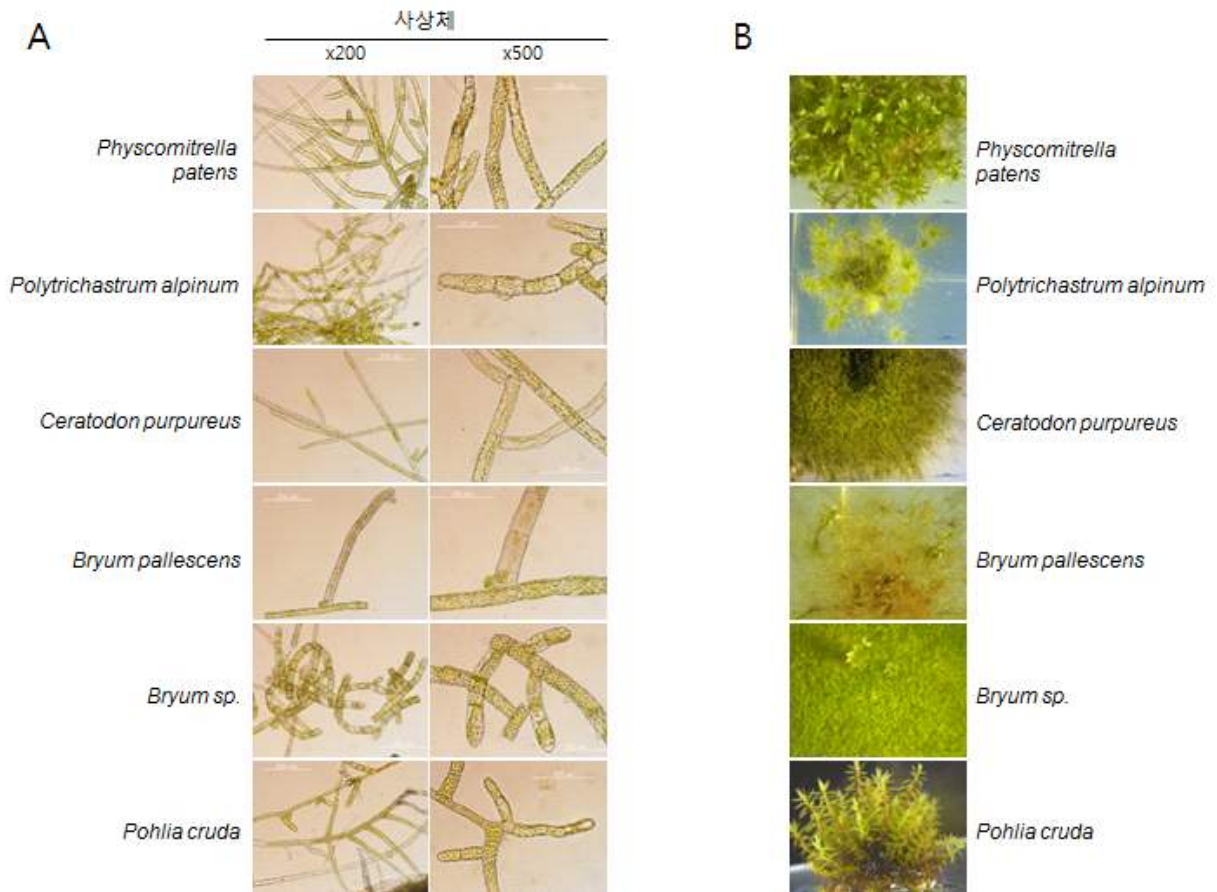
[그림19. *SuLea14*, *SuDhn* 과다발현 형질전환체 제작 A, 항생제 선별을 통해 획득한 형질전환체, B, Genomic DNA PCR C, RT-PCR]

제 3 절 극지선대류의 형질전환

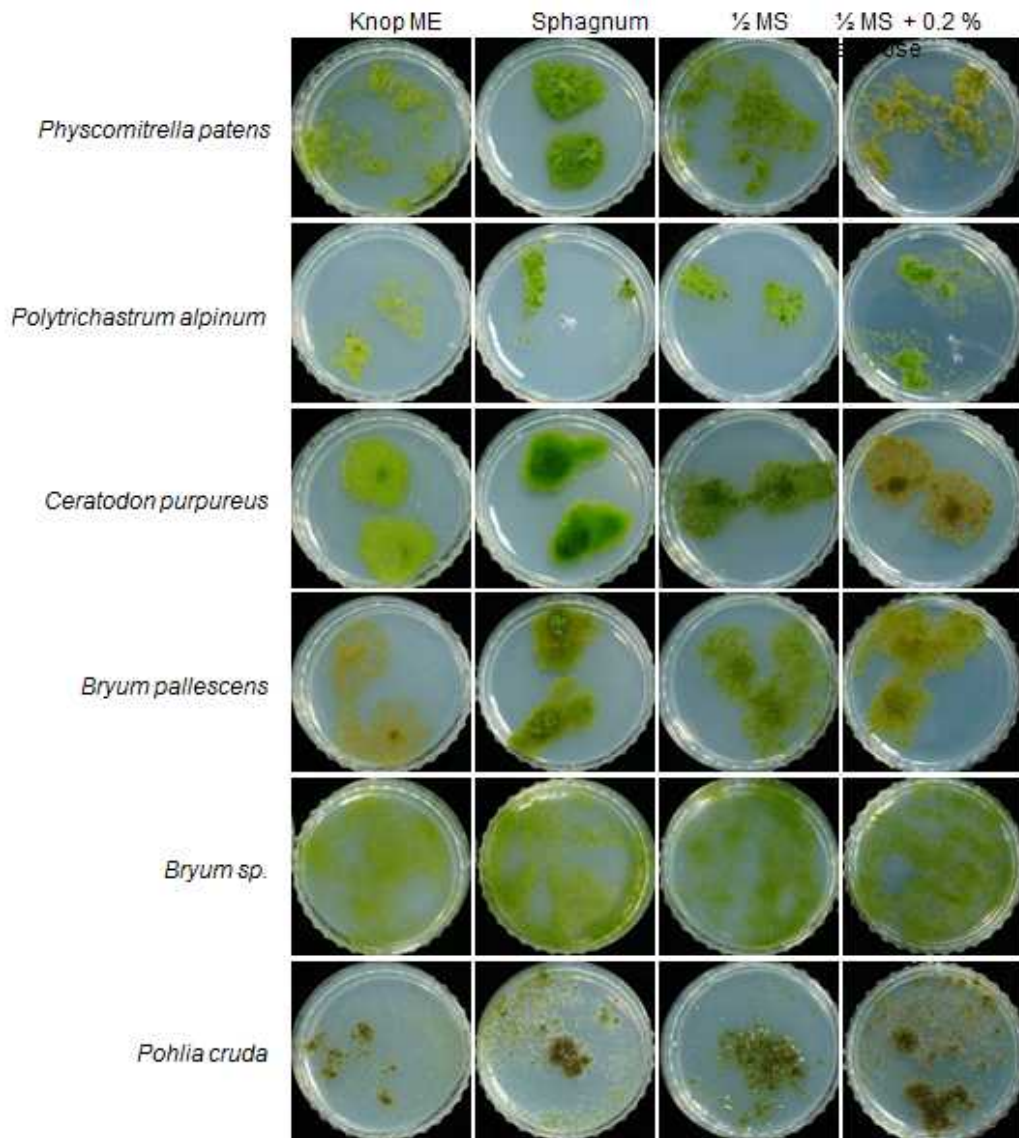
1. 선대류 무균배양체 확립

가. 극지 선대류 무균배양체 확립과 특성 파악

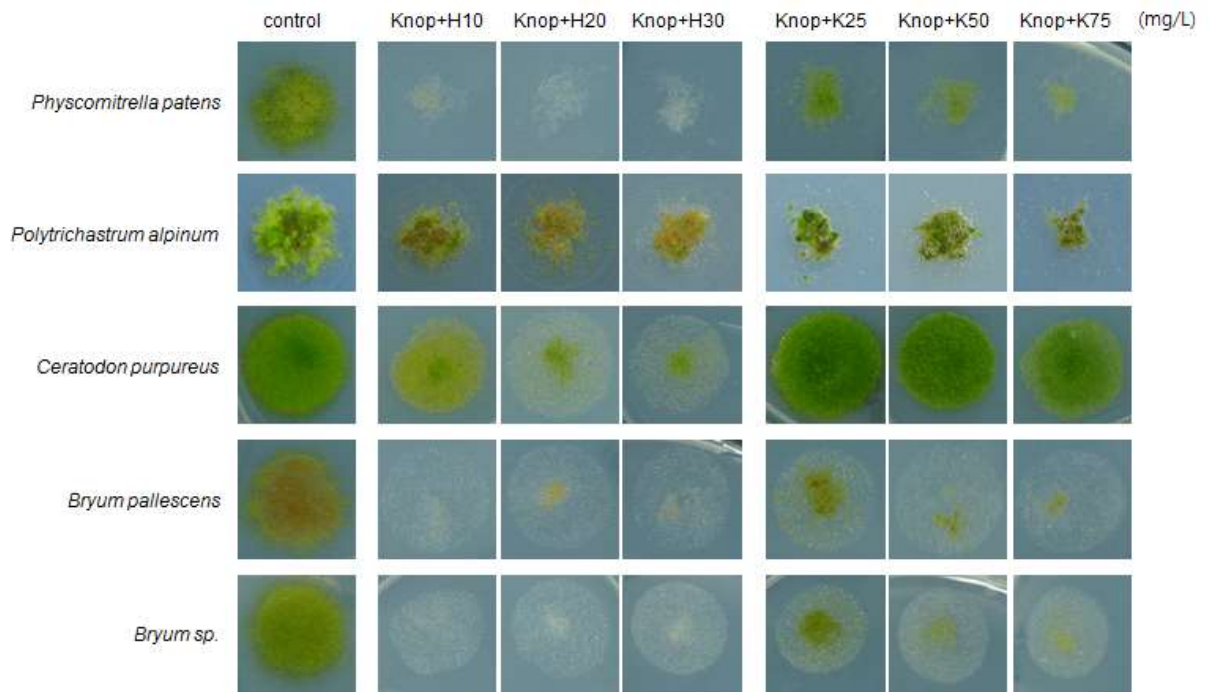
극지 환경에 적응하여 살아가는 선대류를 유용 유전자원으로 활용하고자, 이들의 배양체를 확보하고 특성을 파악하였다. 극지에서 채집한 선대류를 멸균해서 무균배양체를 확보하고 사상체를 유도했다(그림 20). 이들 배양체의 성장에 적합한 배지조건을 확립하기 위하여 선대류와 식물에서 주로 사용하는 4종류의 배지에서 키우며 성장을 비교하였다(그림 21). 그리고 이들 배양체가 가지고 있는 항생제 저항성을 확인하기 위해 선대류 및 식물에서 사용하는 2종류의 항생제를 농도를 달리하여 첨가한 배지에서 키우며 저항성 여부를 관찰하였다(그림 22). 또한 저온 조건에서의 성장을 온대종인 *P. patens*와 비교하여 극지 유래 선대류의 저온 조건 성장을 관찰하였다(그림 23). 본 결과를 토대로 유전자원으로서 극지 선대류를 활용하기 위한 형질전환 기법 확립의 기초 데이터를 확보하였다.



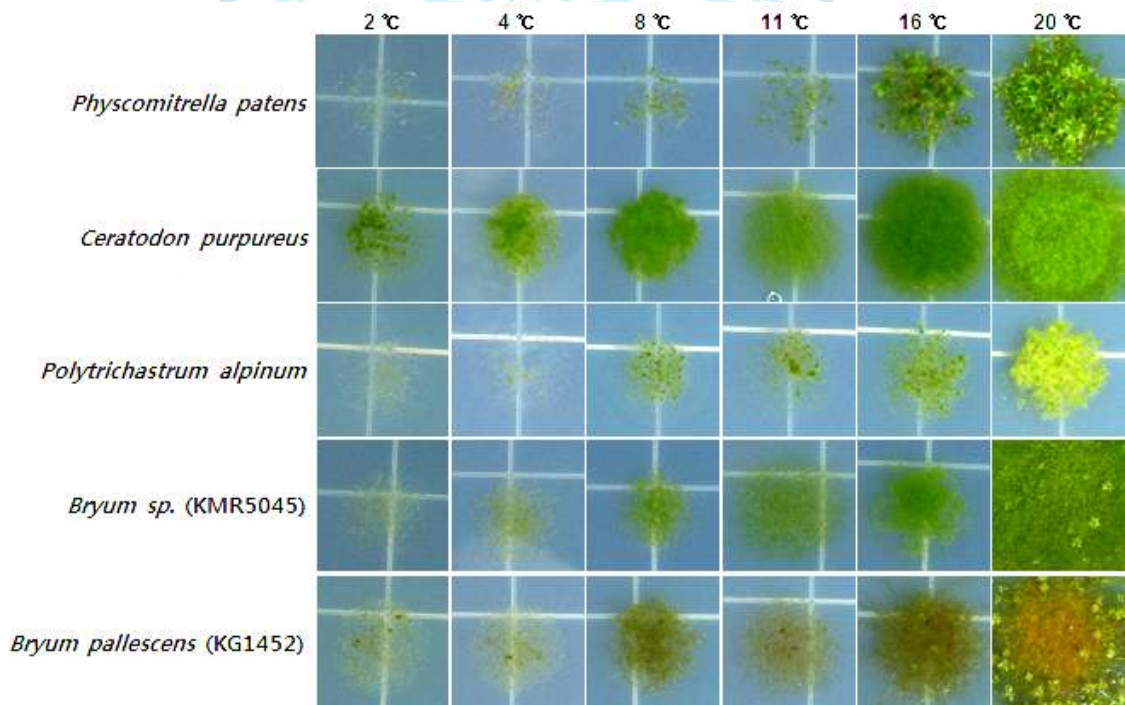
[그림 20. 극지 선대류의 사상체 유도 및 성장관찰 A, 액체배지에서 유도한 사상체 B, 고체배지에서 5주된 사상체 성장 모습]



[그림 21. 극지 선대류 사상체를 여러 가지 조성의 배지에서 키운 후의 성장 변화]



[그림 22. 극지 선태류의 사상체를 항생제 배지에 2주 동안 키운 후 성장변화]

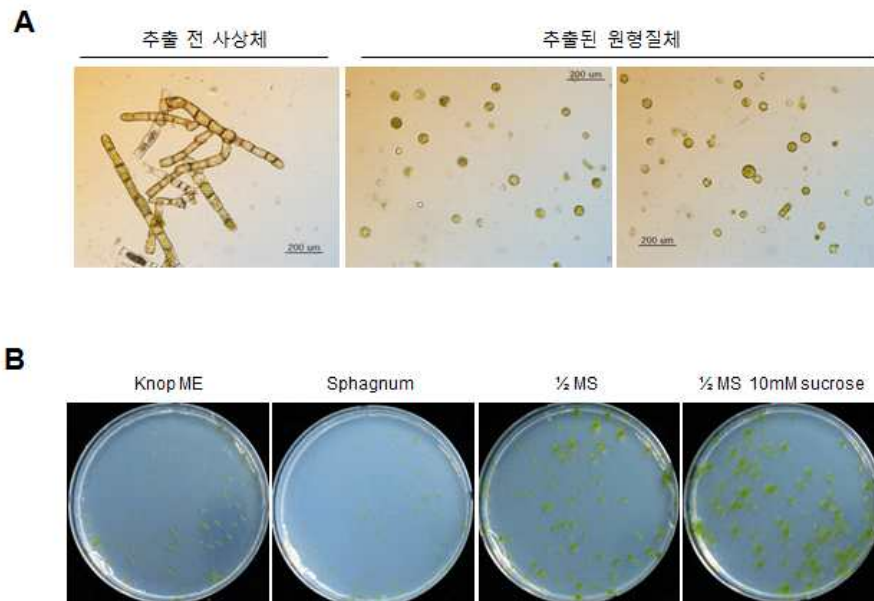


[그림 23. 극지 선태류의 사상체를 저온 조건에서 11주간 키운 후 성장 차이]

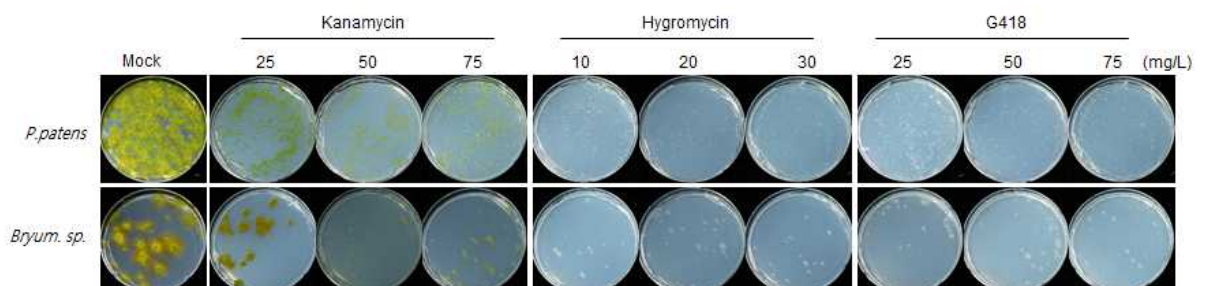
2. 극지 선대류의 형질전환 기법 확립

가. 극지 선대류의 형질전환 기법 확립

극지 선대류 배양체 중 성장속도가 빠르면서 원형질체 추출 및 재분화 효율이 좋은 KMR5045 (*Bryum* sp.)를 대상으로 형질전환 기법을 확립하고자 하였다. 이를 위해 배지 조건별 원형질체의 재분화 및 성장 차이를 비교하였다(그림 24). 그리고 형질전환 과정에서 항생제 선별에 적절한 항생제의 종류와 농도를 확인하였다. 그 결과 Kanamycin과 Hygromycin의 경우, 모델종인 *P. patens*보다 더 낮은 농도의 항생제 조건이 적절함을 확인하였다(그림 25).



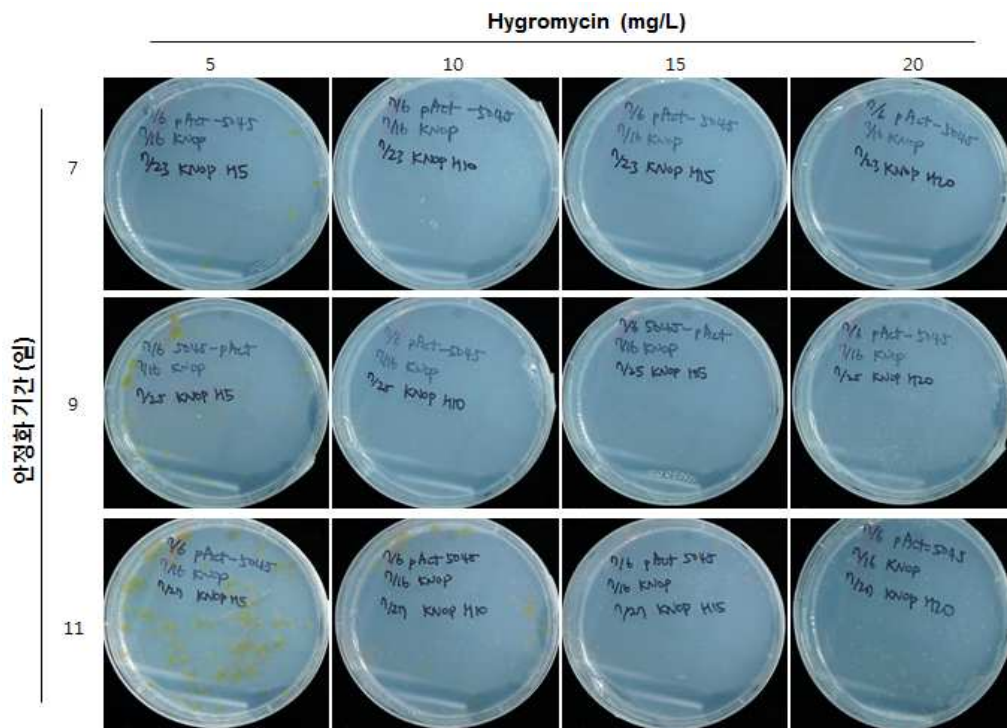
[그림 24. KMR5045 사상체에서 분리한 원형질체의 재분화 A, 사상체에서 분리한 원형질체 세포, B, 배지 조건별 원형질체의 재분화 및 성장 차이 관찰]



[그림 25. KMR5045 사상체에서 분리한 원형질체의 항생제 3종의 농도별 재분화 여부 확인]

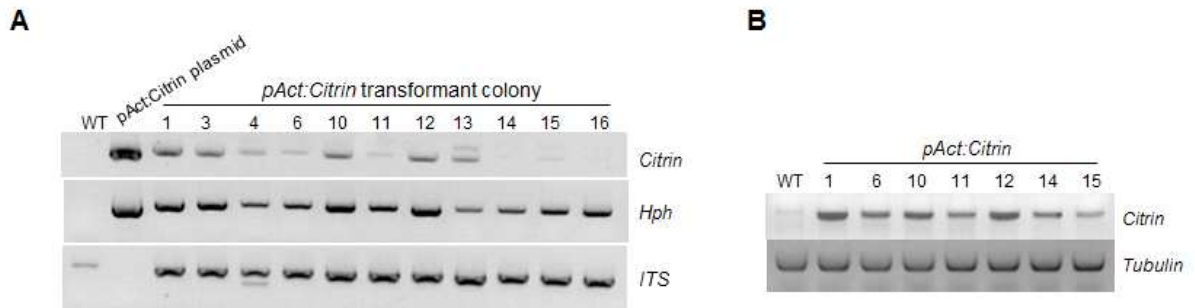
나. 극지 선택류 형질전환체 제작 및 확인

모델 이끼인 *P. patens*의 PEG-mediated DNA transfection 방법을 토대로 KMR5045에 적합하도록 형질전환법을 개선하였고, 형광단백질을 발현시키는 pAct:Citrine construct를 형질전환 기법 확립에 사용했다. KMR5045의 경우 *P. patens*보다 재분화 후 형질전환체 성장을 위한 안정화 기간이 길게 필요하였고, 그 기간에 따라 1차 선별 과정에서 형질전환체의 농도별 선별 결과가 달라짐을 확인하였다(그림 26).



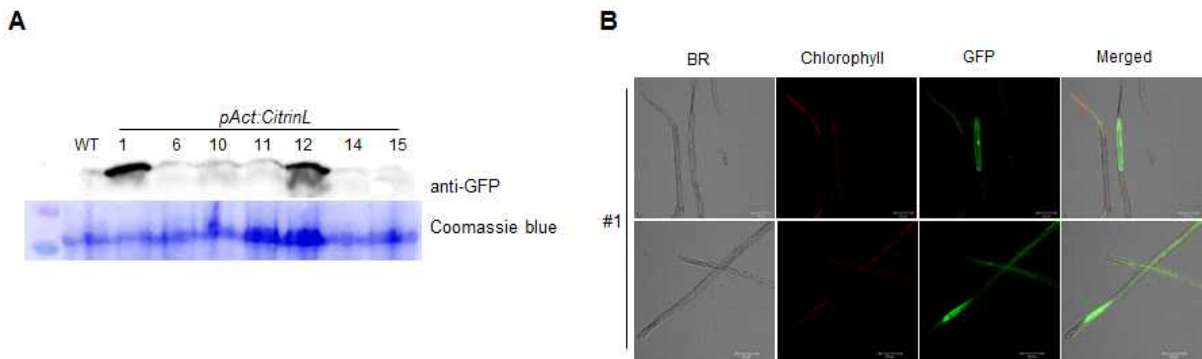
[그림 26. KMR5045 형질전환 후 안정화 기간에 따른 형질전환체 선별 차이 비교]

2차 항생제 선별 과정 후 확보된 형질전환체의 형질전환 여부를 확인하기 위해 genomic DNA를 추출하여 벡터의 삽입 여부를 PCR로 확인하였다(그림 27A). 그리고 형질전환체에서의 외래 유전자인 Citrin의 발현 여부를 확인하기 위하여 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과, 7개의 형질전환체 라인에서 Citrin 유전자가 정상적으로 발현되고 있음을 확인하였다(그림 27B).



[그림 27. 형질전환체의 확인 A, gDNA PCR, B, RT-PCR]

또한 단백질의 발현을 확인하기 위하여 Citrin을 탐지할 수 있는 anti-GFP 항체를 사용하여 western blot을 수행한 결과, 7개 라인 모두에서 Citrin 단백질의 발현을 확인하였고 그 중에서 1번과 12번 2개 라인에서 더욱 강한 단백질 발현을 확인하였다. 발현시킨 형광단백질인 Citrin이 정상적으로 기능하는지를 형광현미경으로 관찰한 결과 세포내에서 형광단백질의 발현을 성공적으로 확인할 수 있었다(그림 28).



[그림 28. 형질전환체의 단백질 발현 확인 A, Western blot, B, 공초점 현미경 관찰]

제 3 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구목표 달성도

1. 연구 목표 및 연구내용

가. 연구개발의 최종목표

본연구의 최종목표는 ‘극지식물 유전자원의 맞춤형 신속검증 시스템 구축’이다.

나. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구목표	연구내용
1년차 (2017)	◦ 극지식물세포의 원형질체기반 유전자 기능 검증 시스템 구축	◦ 극지식물 원형질체 추출법 확립 ◦ 원형질체 유전자 도입법 확립
	◦ 모델식물 기반 유전자 기능 검증	◦ 애기장대 과발현체 제작 6종 ◦ 모델선대류 과발현체 제작 2종 ◦ 환경스트레스 관련 기능 검증 2종
	◦ 극지선대류 형질전환 시스템을 위한 무균배양체 확립	◦ 극지선대류 무균배양체 확립
2년차 (2018)	◦ 극지식물 세포기반 유전자 기능 분석 실증	◦ 세포기반 극지식물 유전자 기능 분석 실증 3종
	◦ 모델식물 기반 유전자 기능 검증	◦ 극지식물 유전자 애기장대 과발현체 후속 세대(T3) 선별 4종 ◦ 모델선대류 과발현체 제작 2종 ◦ 환경스트레스 관련 기능 검증 3종
	◦ 극지선대류 무균배양체 기반 형질전환 시스템 구축	◦ 무균배양체 원형질체 추출법 구축 ◦ 극지선대류 형질전환체 제작 1종

2. 연구개발 성과

본연구개발의 주요 내용은 극지식물의 유전자의 신속 기능검증을 위하여 (1) 극지식물 세포기반 유전자 기능 검증 시스템을 구축하고, (2) 모델식물 및 극지식물의 형질전환체를 이용하여 유전자의 기능을 이해하는 것이다.

구분	세부연구목표	연구내용	달성도 (%)
1년차 (2017)	◦ 극지식물 세포기반 유전자 기능 검증 시스템 구축	◦ 극지식물 원형질체 추출법 확립 ◦ 원형질체 유전자 도입법 확립	100
	◦ 모델식물 기반 유전자 기능 검증	◦ 애기장대 과발현체 제작 6종 ◦ 모델선대류 과발현체 제작 2종 ◦ 환경스트레스 관련 기능 검증 2종	100
	◦ 극지선대류 형질전환 시스템 구축	◦ 극지선대류 무균배양체 확립	100
2년차 (2018)	◦ 극지식물 세포기반 유전자 기능 검증 시스템 구축	◦ 세포기반 극지식물 유전자 기능 분석 실증 3종	100
	◦ 모델식물 기반 유전자 기능 검증	◦ 극지식물 유전자 애기장대 과발현체 후속 세대(T3) 선별 4종 ◦ 모델선대류 과발현체 제작 2종 ◦ 환경스트레스 관련 기능 검증 3종	100
	◦ 극지선대류 형질전환 시스템 구축	◦ 무균배양체 원형질체 추출법 구축 ◦ 극지선대류 형질전환체 제작 1종	100

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 기대효과

1. 연구결과의 기대효과

- 극지식물 유전자원 연구는 극지생물의 적응과 진화규명을 위한 중요한 연구결과를 제공하며 신규유전자원을 활용한 생명공학 작물 개발의 기반 제공
- 신속한 유전자 기능 검증 시스템을 활용하여 실효성 있는 극지식물 유전자 확보
- 극지식물의 원형질체 세포기반 분석기법을 극지식물 자가시스템에서의 기능을 검증함으로써 신속 정확한 연구 결과 제공
- 신속한 유전자 기능 검증 시스템 구축을 기반으로 극한 환경 유래 극지식물 유전자원의 스트레스 저항성 기능을 규명하여 유용작물 개발 프로세스 진입
- 전세계적으로 시도된 바 없는 극지선대류 대상 형질전환 기술을 구축하여 극지연구 분야 식물분자생물학의 중심 연구기관으로 도약
- 극지식물 유전자원의 실용화는 유전학, 농학, 환경과학, 종묘산업 등 관련 학계 및 산업계의 융복합 사업으로 확장
- 극지식물의 복합적 스트레스 저항성 경로를 이해함으로써, 이상기후 대응 유용작물의 생산성 향상에 기여
- 극지식물 유래 유전자원을 활용한 생명공학 작물 개발의 초석을 마련함으로써 환경재해로 인한 농작물 피해 경감과 국가 수준 환경재해 극복 방안 마련에 기여
- 극지식물 유래 유전자원의 새로운 기능 검증법 제시와 활용성 검증으로, 축적된 극지식물 유전자원의 활용법을 다각화하고 국내외 학계로의 연구 저변 확대
- 본 과제를 통해 확보된 기술력과 극지연구소의 유전자원을 바탕으로, 농촌진흥청의 작물 개발 관련 기술력, 국립환경과학원의 환경위해성 평가 경험, 국내 종묘업체 등 다양한 분야의 전문가 집단으로 구성된 산·학·연 공동연구 체계 수립

제 2 절 활용방안

1. R&D 사업 기획을 위한 신규 아이템 제안

가. 신규 과제명

극지선태류 활용 미세먼지 친환경 저감법 개발

나. 과제 제안배경

1) 미세먼지에 대한 정부 차원 대책 필요

(머니투데이, 2019. 3. 26)

정부, 내년 '슈퍼예산' 예고... "미세먼지 저감 투자 획기적 확대"

기사입력 2019.03.26 08:00 최종수정 2019.03.26 08:00

- 홍 부총리 주재 국무회의서 "2020년 예산안 편성지침" 확정
- 미세먼지 저감 예산 올해 1조9000억... 내년 대폭 증액할 듯
- 일자리 혁신성장 사회안전망 구축... 적극적 재정 운용 방침 밝혀



홍남기 부총리 겸 기획재정부 장관.

(CBS노컷뉴스, 2019. 4. 1)

'미세먼지 해결 범국가기구 설립추진단 출범'

CBS노컷뉴스 박용민 기자 입력 2019.04.01 12:45



2) 이끼의 검증된 공기정화 능력

Moss-covered CityTree has the same air-purifying effect as 275 regular trees

20 of them have been deployed so far around the world

By Barbara Eldredge | @barbaraelredge | Jun 28, 2017, 9:33am EDT

<https://www.curbed.com/2017/6/28/15885436/air-pollution-solutions-citytree-urban-greenery>



이끼의 검증된 공기정화 능력

이끼는 공기 중의 미세먼지를 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다. 특히, 이끼는 공기 중의 질소산화물, 오존, 이산화탄소 등을 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다. 또한, 이끼는 공기 중의 유해 물질을 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다.

이끼는 공기 중의 미세먼지를 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다. 특히, 이끼는 공기 중의 질소산화물, 오존, 이산화탄소 등을 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다. 또한, 이끼는 공기 중의 유해 물질을 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다.

이끼는 공기 중의 미세먼지를 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다. 특히, 이끼는 공기 중의 질소산화물, 오존, 이산화탄소 등을 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다. 또한, 이끼는 공기 중의 유해 물질을 흡수하고 분해하는 능력이 뛰어나다.

대부분의 이끼는 크기가 수 밀리미터에서 수 센티미터에 불과하지만, 이끼의 생물학적 표면적은 엄청납니다. 1㎡에 12만 개의 개체가 밀집되어 있고, 하나의 식물체는 123 개의 잎을 만들어, 잎의 표면적은 23㎡가 넘습니다. 상대적으로 1㎡의 아이비는 잎 면적이 7㎡에 불과합니다.

[Natur, 2017년 5월, 독일]

다. 과제 제안 목적

- 1) 실내 미세먼지 제거를 통한 가정 내 공기정화 장치 개발
- 2) 학교와 공공기관 등 공공건물 내 공기정화 장치 개발
- 3) 건물의 벽면이나 옥상 공간을 활용한 도심 녹지 증대와 공기정화

라. 해결해야 할 숙제들

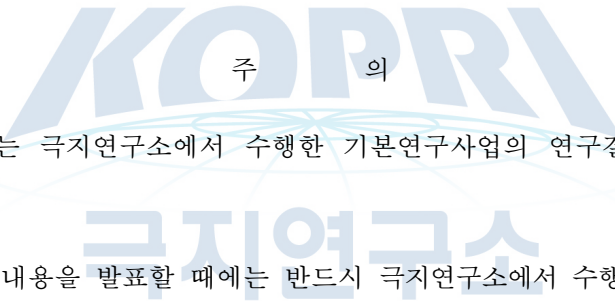


극지연구소

제 5 장 참고문헌

- Alavilli, H., Lee, H., Park, M., & Lee, B. H. (2017). Antarctic moss multiprotein bridging factor 1c overexpression in *Arabidopsis* resulted in enhanced tolerance to salt stress. *Frontiers in plant science*, 8, 1206.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., ... & Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977.
- Byun, M. Y., Lee, J., Cui, L. H., Kang, Y., Oh, T. K., Park, H., ... & Kim, W. T. (2015). Constitutive expression of *DaCBF7*, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved cold tolerance in transgenic rice plants. *Plant Science*, 236, 61–74.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2940–2945.
- Lee, J., Noh, E. K., Choi, H. S., Shin, S. C., Park, H., & Lee, H. (2013). Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress. *Planta*, 237(3), 823–836.
- Lee, J., Lee, H., Noh, E. K., Park, M., Park, H., Kim, J. H., ... & Yim, J. H. (2014). Expression analysis of transcripts responsive to osmotic stress in *Deschampsia antarctica* Desv. *Genes & Genomics*, 36(3), 283–291.
- Xie, G., Kato, H., & Imai, R. (2012). Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signalling pathway for chilling stress tolerance in rice. *Biochemical Journal*, 443(1), 95–102.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2(7), 1565.
- Zhang, Y., Su, J., Duan, S., Ao, Y., Dai, J., Liu, J., ... & Wang, J. (2011). A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant methods*, 7(1), 30.

창의연구사업 구분	Seed형 선행과제		
과제명	극지식물 유전자원 기능의 신속 검증 시스템 구축(계정번호:PE18290)	연구기간	2017.4.1.~2019.3.31.
연구책임자	이형석 책임연구원	연구비(직접비)	270백만원
과제개요, 연구성과 및 최종 결과보고서 평가의견 반영 사항			
<p>(1) 과제목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 극지식물 유전자 기능연구의 신속성·정확성 향상을 통한 연구효율성 제고 <p>(2) 최종성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 단기간(1개월) 내 극지식물 유전자의 기초 기능연구 가능한 세포기반 형질전환 기술 개발 ◦ 극지 선대류 대상 세계 최초 형질전환 기술 구축 성공 <p>(3) 성과의 향후 연구소 활용방안 또는 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 극지식물 관련 유전자의 기능 규명을 위한 기술적 기반 제공 ◦ 극지 유전자원 실용화를 위한 R&D 추진을 위한 아이템 발굴 (극지선대류 활용 미세먼지 친환경 저감법 개발) <p>(4) 최종 결과보고서에 평가의견 반영 사항</p>			
평가의견		반영사항	비고
<ul style="list-style-type: none"> ◦ 연구의 최종 목표인 유전자원 실용화를 위한 국가 R&D 추진을 위한 미세먼지 제거 부분은 실질적으로 활용하기에는 미흡한 주제이므로 식량, 바이오 에너지, 바이오 매스 개발 사업등에 대한 내용으로 보완 필요 		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 실내 공기정화에서 시작, 적용 범위를 점차 확대하여 건물 또는 지역까지 적용할 수 있는 과제 아이템의 아이디어 기술 	<p>연구보고서 p.42 참조</p>



1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.