

식물 벡터 시스템

최인성, 홍주봉
(한국과학기술연구원 부설 유전공학센터)

Higher Plant Vector Systems

Choe, In Seong and Choo Bong Hong
(Genetic Engineering Center, KIST)

Abstract

Higher plant transformation vector systems are mainly developed based on the natural biosystems which infecting higher plants. Two major groups attracting much of the research are Cauliflower mosaic virus and *Agrobacterium tumefaciens*. Cauliflower mosaic virus has a double stranded genome, and a portion of the genome can be substituted for a foreign DNA segment without losing the ability of infection. *A. tumefaciens* carries a large plasmid. Ti plasmid, whose portion can be substituted and transferred into the plant chromosome.

서론

최근 plant molecular biology 분야에서 이룩한 큰 성과들중의 하나는 *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing(Ti) plasmid를 이용해서 식물을 transformation시킬 수 있는 vector system을 개발한 일이다. Ti plasmid transformation vector는 여러가지의 기원이 다른 유전자를 식물에 비교적 용이하게 도입할 수 있는 방법을 제공함으로써 식물을 분자생물학적인 측면에서 이해하는데 많은

도움을 주고있다. Gene product의 식물체내 생합성, 그 합성기작과 대사과정의 연구 그리고 식물내에 원하는 유전자를 도입해서 식물을 인간에게 유용한 형질로 전환시키는 등의 모든 연구에 plant vector system은 필요불가결한 존재이다. 그러나 Ti plasmid vector의 사용은 *Agrobacterium* strain의 host range에 제한이 있음으로 세계적으로 가장 중요한 식량작물인 단자엽 식물에는 이용할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 이 문제점을 극복하기 위해서 새로운 종류의 *Agrobacterium* strain을 탐색하거나 또는 돌연변이를 이용한 기존 Ti plasmid vector의 변형을 많이 시도하고 있다. Host range의 장벽을 극복하기 위한 또 다른 방법은 단자엽식물에 직접 유전자를 도입할 수 있는 새로운 vector system을 개발하는 방법이다. 가장 유망한 대체 vector system으로 현재 고려되고 있는 것은 geminivirus이다. 몇몇의 연구 group에서 geminivirus를 plant host vector system으로 개발하려고 시도하고 있다. 그 이외에 plant vector system의 개발에 간과할 수 없는 점은 식물체에 기원이 다른 유전자를 도입했을때 가능한한 많은 gene product를 얻어야 한다는 점이다. 이를 위해 현재 연구된 많은 promotor들의 효율을 비교하고 가장 높은 효율을 가진 promotor를 사용한다는 점 역시 도입된 유전자를 식물에서 최대한 발현 시키는데 중요한 요소가 될 것이다.

본 론

1. Cauliflower mosaic virus

Cauliflower mosaic virus(CaMV)는 식물 바이러스중 유일하게 2중 나선구조의 DNA를 유전자로 가지고 있는 Caulimovirus group에 속하며 같은 group의 어느 바이러스보다도 많은 연구가 되어있다. CaMV는 약 8,000개의 염기쌍으로 이루어진 비교적 적은 DNA 분자를 유전자로 가지고 있으며 쉽게 식물에

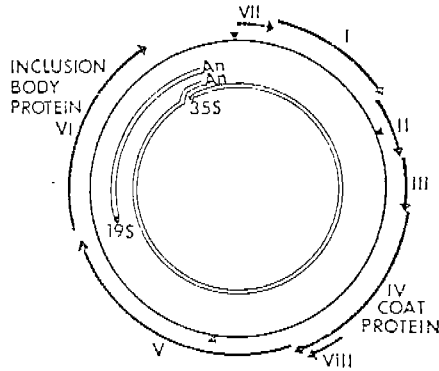


그림 1 CaMV DNA의 유전인자 지도. 전체 DNA의 크기는 약 8 kb 정도이며 8개의 open reading frame들을 가지고 있다 (로마 숫자로 표시되어 있음). 3곳에 single stranded DNA로 된 부위가 존재하며 (역삼각형)으로 각각 표시되어 있다. 주요 polyadenylate된 19S와 35S의 transcript들이 표시되어 있다.

접종시키거나 식물로부터 분리할 수 있고 또 식물의 잎에서 간단한 방법으로 그 존재를 확인할 수 있다(그림1). CaMV의 유전자가 2중 나선구조의 DNA를 가지고 있기 때문에 외부의 유전자를 식물체내로 도입할 수 있는 vector의 후보로서 주의를 끌어들였으며 Brisson등은 CaMV DNA의 ORF(open reading frame) II를 미생물의 dihydrofolate reductase gene으로 교체시킨 뒤 turnip plant에서 발현시키는데 성공했다(1). 식물 vector로서 CaMV DNA를 사용하는데는 몇가지 장애가 있는데 바이러스의 host range가 제한되어 있고 바이러스의 증식에 필요한 packaging 때문에 외부 유전자가 도입될 수 있는 공간의 여유가 매우 적으며 유전자의 도입위치가 아주 정확해야 한다는 등의 문제점이 있다. 또 상호보완적으로 작용하는 두가지의 다른 vector를 이용하는 binary vector system을 사용하는 방법도 시도되었으나 CaMV의 경우는 SV40 같은 바이러스의 경우와는 달리 complementation 대신 두 vector가 recombination에 의해 wild type의 virus로 돌아감으로써 성공하지 못했다(2). CaMV는 replication되는 과정에서 두종류의 major RNA(19S RNA와 35S RNA)와 몇종류의 minor RNA를 만드는 것이 알려져 있다. 이들 RNA의 promoter들은

원하는 유전자와 융합시킨 뒤 식물체내에 도입시켰을 때 외부 유전자의 발현을 효과적으로 수행한다고 알려져 있어 plant molecular biology 분야에서 널리 쓰이고 있다. CaMV의 35S RNA promotor와 Ti plasmid의 nopaline synthase promotor를 각각 neomycin phosphotransferase의 coding sequence와 결합시킨 뒤 petunia에 도입시켜 각각의 유전자 발현 정도를 측정 한 결과 CaMV의 35S RNA promotor가 nopaline synthase의 promotor 보다 RNA level에서 30배, 그리고 효소역가에서 110배 정도 효율적이었다는 보고가 발표되어 있다(3).

Balazs 등은 CaMV의 gene VI promotor를 neomycin phosphotransferase 유전자와 융합시킨 뒤 이를 plasmid vector에 도입하고 turnip protoplast를 polyethylene glycol을 이용해 직접적으로 transformation시킨 후 이 유전자가 세포내에서 발현됨을 확인했다(4).

Ti plasmid vector의 host range 문제를 극복하기 위한 연구의 일환으로 geminivirus를 식물 vector system으로 개발하려는 시도가 진행되고 있으며 이 group에 속하는 virus중에는 단자엽식물을 숙주로 하는 것들도 알려져 있다. Geminivirus의 유전자는 single-stranded(ss) DNA이며 약 2,700개의 nucleotide로 구성되어 있다. 이 virus는 크기가 매우 작아서 큰 유전자를 도입할 수 없다는 점이 문제이나 double-stranded DNA인 virus의 replicative form 을 이용하여 virion 으로 서가 아니고 plasmid 와 같이 세포 내에서 증식하는 vector 를 geminivirus 의 replicon 에서 개발하는 것을 목표로 한다.

2. *Agrobacterium*

현재 식물세포의 transformation에 가장 널리 쓰이는 방법은 *Agrobacterium*을

이용하는 것이다. *Agrobacterium* 속의 미생물은 많은 쌍자엽 식물에서 crown gall, cane gall 또는 hairy-root 같은 병을 일으키며, 그 원인은 이들 미생물에 존재하는 여러 가지 형태의 Ti plasmid가 원인으로 알려져 있다. *Agrobacteria*의 분류는 생리적 및 생화학적인 특성에 따라 두 종류의 major biotype group (group 1 및 group 2)과 하나의 minor intermediate biotype (group 3)으로 나눈다. Biotype 1과 3은 3-ketolactase를 생산하며 biotype 2는 erythritol을 탄소원으로하여 성장할 수 있고 biotype 3은 2% NaCl을 포함한 배지에서 생육할 수 있다.

대부분의 *Agrobacterium*속에 속하는 미생물은 식물에서 tumor를 일으키는 성질에 관계없이 하나 또는 그 이상의 커다란 plasmid를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이들 여러가지 plasmid들의 분자량은 $120-160 \times 10^6$ dalton (약200kbp)으로 계산되며 host range, induced tumor morphology, opine 생합성 그리고 opine의 이용에 관계되는 특성등을 결정한다. 일반적으로 T-DNA에 의해 transformation된 식물세포는 T-DNA에 의해서 그 생합성이 조절되며 *Agrobacterium*에 의해서 탄소 및 질소원으로 이용되는 opine을 생산한다. *Agrobacteria*가 opine을 이용할 수 있는 능력은 crown gall rhizosphere 안에서 다른 토양미생물과의 생존경쟁에 우위를 차지할 수 있는 잇점으로 작용하며 이와 같은 현상을 genetic colonization이라 부른다. Ti plasmid는 그들이 생합성하는 opine의 종류에 따라 분류된다 (Table 1 및 그림 2).

Ti plasmid는 외부 DNA 분자를 식물세포내에 도입할 수 있는 능력 때문에 식물의 형질개량에 이용하기 위한 많은 연구의 대상이 되어 왔다. 이 특성은 Ti plasmid의 일부인 T-DNA 부분이 식물의 chromosome으로 삽입되는 과정에서 기인한다. T-DNA는 25bp의 불완전한 terminal repeat가 양끝에 존재하고 이 terminal repeat 사이에 존재하는 DNA 분자는 어느 것이나 식물세포내의 nuclear DNA로 이전이 가능하다. 이 T-DNA의 이전은 Ti plasmid 내의 *vir* locus에 존재하는 몇 개의 유전자에 영향을

Table 1. Opines, specified by the different groups of Ti plasmids (6)

Ti plasmids	Octopine	Agropine mannopine	Nopaline	Agrocino-	Agrocino-
				pine A+B	pine C+D
Octopine-type 1 Ti plasmids	+(tra)	+	-	-	-
Octopine-type 2 Ti plasmids	+	-	-	-	-
Nopaline Ti plasmids	-	-	+	+(tra)	-
Agropine Ti plasmids	-	+(tra)	-	-	+
Rhizogenes Ri plasmids	-	+(tra)	-	+(?)	(?)

(tra) indicates that the opine induces conjugative transfer between the bacteria.

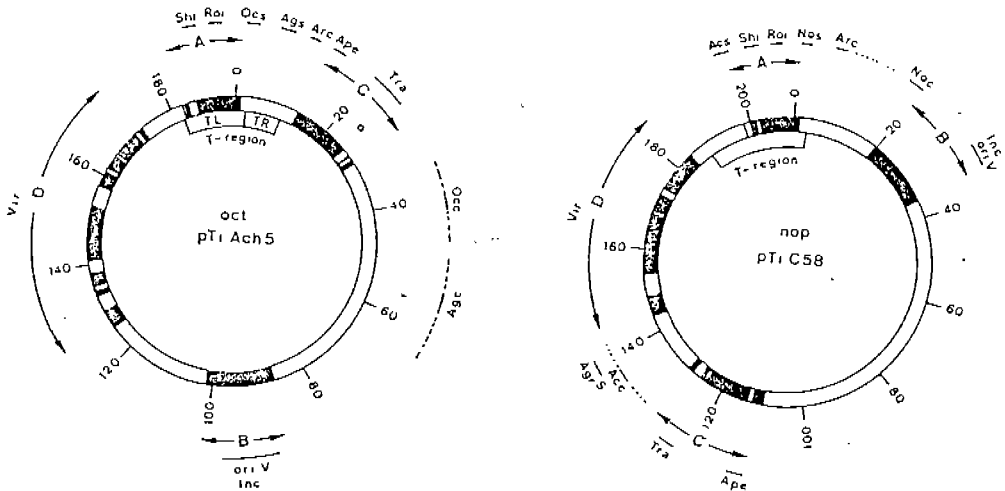


그림 2 Octopine-type I과 nopaline Ti plasmid들의 유전인자 지도들. 숫자는 거리를 kb로 표시한 것이며 검정 bar들은 두 type의 plasmid간에 유사한 부위를 표시한 것이다. (이 중 주요 4 유사부위를 A, B, C, D로 표시하였다.) Shi, shoot inhibition; Roi, root inhibition; Ocs, octopine synthesis; Ags, agropine synthesis; Acs, agrocino-pine synthesis; Nos, nopaline synthesis; Occ, octopine catabolism; Arc, arginine-ornithine catabolism; Agc, agropine catabolism; Noc, noploline catabolism; Acc, agrocino-pine catabolism.

받으며 이들의 작용은 trans form이다. 몇개의 식물 vector system 이 *Agrobacterium*의 Ti나 Ri plasmid로 부터 개발되어 있다. 이들 system은 Ti plasmid를 몇가지 기본적인 면에서, 인위적인 식물형질개량이란 목적에 맞도록 개조한 것이다. 첫째 Ti plasmid내의 growth regulator autonomy에 관계되는 유전자들은 제거되었다. 이들 유전자는 식물체내에서 발현이 되면 정상적인 식물의 regeneration을 방해하기 때문이다. 둘째 growth regulator autonomy에 관련된 유전자를 제거한 대신 형질전환된 식물을 선별하기 위해 nopaline synthase의

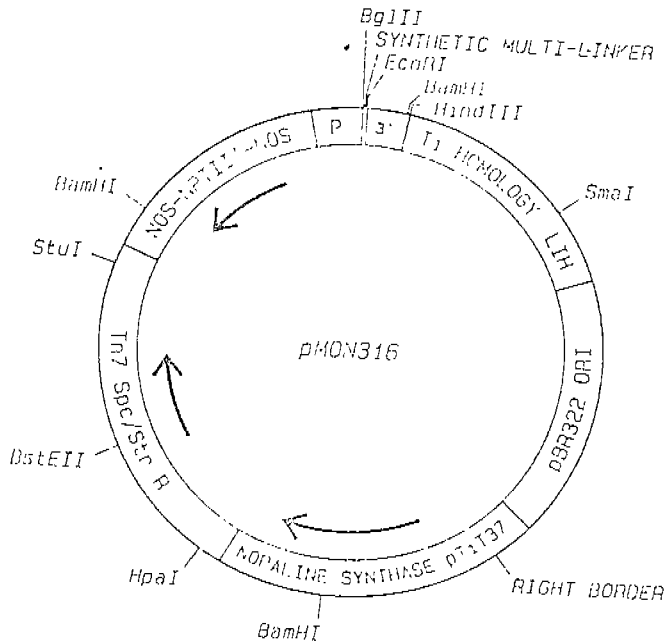


그림 3 pMON 316 expression vector. pBR 322 bacterial replication origin과 spectinomycin과 streptomycin에 저항성을 갖게끔하는 Tn 7 Spc/Str R부위를 가지고 있으며 Ti plasmid와 homologous recombination에 의한 삽입과정이 일어나게끔 Ti homology LIH 부위가 있다. Neomycine phosphotransferase 유전자 (NPT II')의 발현을 위한 nopaline synthase의 promoter 와 terminator가 붙은 NOS-NPT II'-NOS의 cassette이 있으며 CaMV 35S transcript의 promoter (P)와 nopaline synthase의 terminator (3') 부위가 synthetic polylinker를 사이에 두고 위치하고 있다. Polylinker 부위에는 Bgl II, Cla I, Kpn I, Eco RI등의 site들이 들어 있어 외부 유전인자의 삽입이 용이하게 될 수 있다. Ti plasmid T-DNA의 right border sequence가 역시 homologous recombination에 의한 pMON 316의 DNA가 고등 식물체 nuclear DNA로 이전이 가능하게끔 들어 있다.

promotor와 neomycin phosphotransferase의 유전자를 융합시킨 것과 같은 marker gene이 vector내에 도입되었다. 셋째로 외부유전자를 식물에 도입시키기 위해서 먼저 외부유전자를 Ti plasmid내로 삽입시키는 방법이 고안 되었다. 현재까지 유전자 조작이나 식물의 transformation이란 점에서 가장 편리한 vector system은 binary vector system으로 생각되고 있다. Ti plasmid는 대략 200 kbp로 원하는 외부유전자를 직접 Ti plasmid의 T-DNA에 도입하는 것은 매우 어려우므로 intermediate vector를 사용한다. 이들 vector는 식물의 transformation에 필요한 cis-acting의 유전자를 가지고 있고 기타 필요한 기능은 trans-acting으로 helper Ti plasmid나 *Agrobacterium*의 chromosome이 제공한다. Binary vector에 포함되어야 할 기능은 T-DNA borders, selectable marker, cloning sites 그리고 broad host range replicon등이다 (그림 3). 이 system의 장점은 외부 유전자를 vector에 옮긴후 이 vector를 helper Ti plasmid를 가진 *Agrobacterium*내에서 유지시킬 수 있는 점과 각각의 Ti plasmid가 다른 host range를 가진점을 이용해서 형질전환 시키길 원하는 식물에 따라 적절한 helper Ti plasmid를 선택할 수 있는 점이다(7).

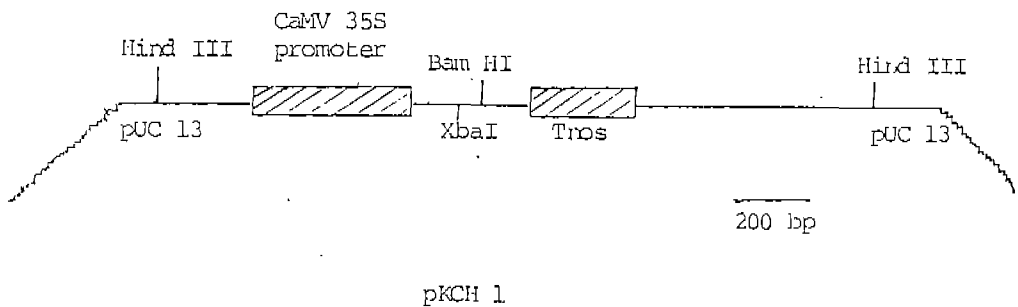


그림 4 pUC13을 기초로 하여 만들어진 pKCH 1은 외부 유전자를 삽입시킬 수 있게끔 unique한 Bam HI과 Xba I site가 존재하며 삽입된 유전자의 발현을 위하여 CaMV 35S의 promoter와 nopaline synthase terminator (Tnos)가 연결되어 있다. 일단 외부 유전자가 삽입된 후 promoter - 외부유전자 - Tnos 전체를 Hind III를 이용하여 뽑아낸 후 그림 5에서 볼 수 있는 것과 같은 selection marker가 들어 있는 vector에 삽입하여 *Agrobacterium*을 이용, 고등 식물의 nuclear DNA에 삽입시킬 수 있다.

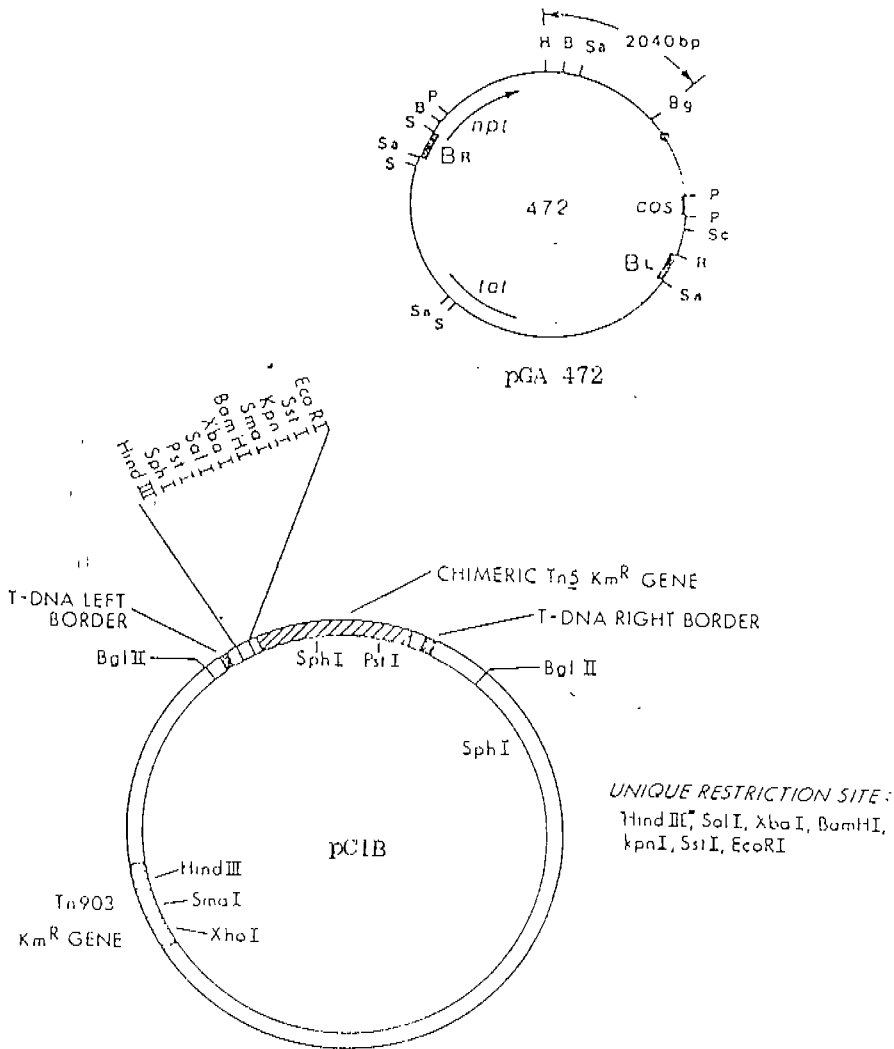


그림 5. Selection marker가 들어 있는 고등 식물 형질전환용 vector들. Plasmid의 박테리아 내에서의 항생물질에 대한 저항성을 발현시키게 하기 위하여 tetracycline resistance 유전자 (tet)가 들어 있으며, *E. coli*와 *Agrobacterium*내에서의 복제를 위한 replication origin들과 고등 식물로의 전이 후 형질전환된 개체의 선별을 위하여 neomycin phosphotransferase gene (npt)이 삽입되어 있다. Homologous recombination에 의한 고등 식물의 nuclear DNA로의 삽입을 위하여 T-DNA의 왼쪽 및 오른쪽 끝부분의 repeated sequences BL과 BR이 연결되어 있으며 외부 유전자 등의 삽입을 위한 unique한 restriction enzyme site들이 있다. Cos site는 전체 plasmid의 packaging 이용시 사용될 수 있게 λ-DNA의 cos site를 분리 연결한 것이다. B, Bam HI; H, Hind III; Bg, Bgl II; P, Pst I; R, Eco RI; S, Sst II; Sa, Sal I; Sc, Sca I (이상 pGA 472). pCIB 10은 그 형태에 있어서는 pGA 472와 다소 차이를 가지고 있으나 근본적인 구성 요소는 동일하다.

최근 그림 3에서 본 바와 같은 벡터들이 몇몇의 연구실에서 개발되어 외부 유용인자의 벡터 내로의 삽입과 그 후에 따르는 *Agrobacterium*에서 고등식물로 넘어가는 DNA의 조작이 한결 용이해 졌으며 이들을 이용한 외부 유용인자의 고등식물에서의 발현이 보고 되어있다(8). 본 실험실에서도 위에서 기술된 바와 근본적으로 동일한 생각으로 벡터를 개발하였다. pKCH 1으로 명명된 이 벡터는 pUC13을 기본으로 하여 CaMV 35S promoter와 nopaline synthase gene의 terminator (Tnos) 부분을 갖고 있다. Promoter와 Tnos 사이에는 XbaI, Bam HI 등의 unique한 restriction enzyme site들이 있어 외부 유용인자의 삽입이 용이하며 일단 promoter-외부유전자-Tnos의 조합이 이루어지면 이 조합 전체를 Hind III 효소를 이용해 잘라낼 수 있다(그림 4). 이렇게 뽑아낸 promoter-외부유전자-Tnos의 cassette을 현존하는 pGA 472나 pCIB 10 등의 selection marker와 T-DNA의 left와 right border sequence들을 가지고 있는 plasmid DNA (그림 5)에 삽입, 전체를 *Agrobacterium*으로 옮긴 후 고등식물의 형질 전환에 사용할 수 있겠다.

결 론

식물 vector system은 외래 유전자를 식물세포내로 도입하여 그 유전형질을 식물체내에서 발현시킴으로써 인간이 원하는 형질의 작물을 만들어 내는데 큰 역할을 할 것으로 기대된다. 식물 vector system으로 현재 가장 많이 쓰이는 것은 Ti plasmid vector이며 또 이에 대한 연구가 가장 많이 되어 있다. 그러나 Ti plasmid를 실제 작물 개량에 활용하는데는 우선 해결해야 할 문제점들이 있다. 첫째는 앞에서 언급된 *Agrobacterium*의 기주범위의 제한성이다. 이 제한성은 T-DNA의 염기배열이나 또는 *Agrobacterium*과 식물세포벽의 상호작용에서 기인하는 것으로

추정되며 이를 극복하기 위해 여러가지 T-DNA의 염기배열에 관한 연구나 또는 liposome을 이용한 vector의 식물 원형질체내로의 직접적인 전이등이 연구되고 있다. 두번째는 형질전환된 세포를 선별하는데 필요한 marker gene의 개발이다. Marker gene으로서는 현재 몇 가지의 항생제에 대한 내성을 가지는 유전자가 개발되어 있고 사용되고 있으며 또 편리한 marker로서 앞으로도 유망할 것이다. 세번째는 우리가 원하는 작물의 형질전환을 이룩할 유용한 유전자의 개발이다. 유용한 유전자의 cloning 및 그 작용기작의 규명 및 식물체내에서의 발현에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다. 이러한 연구의 일환으로 CaMV의 promoter 에 관한 연구가 진행되고 있다. 그리고 마지막으로 위의 과정을 거쳐 형질전환된 세포를 선별한 후 실제응용에 필요한 세포배양 및 조직배양의 기술은 감자, 담배 또는 페튜니아등에서는 확립되어 있으나 경제적으로 중요한 작물들에 있어서는 아직 그 기술이 충분치 않다. 특히 우리에게 중요한 벼등의 곡물에서는 극히 초보적인 단계에 머물러 있다.

위에서 제시된 문제점들은 식물학 및 그에 관련된 학문의 발달과 더불어 멀지 않은 장래에 해결할 수 있을 것으로 생각되므로 식물 vector를 이용한 식물의 육종은 매우 유망한 분야로 각광을 받을 것이다. 또 식물 vector system은 식물의 분자생물학적 및 생화학적인 연구에 반드시 필요한 수단이 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Brisson, N., J. Paszkowski, J. Penswick, B. Gronenborn, I. Potrykus and T. Hohn, ; Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. Nature 310 (1984) 511-514.
2. I. Choe, U. Melcher, K. Richards, G. Lebeurier and R. Essenberg. ; Recombination between mutant cauliflower mosaic virus DNAs. Plant Mol. Biol. 5 (1985) 281-289.

3. Sanders, P., J. Winter, A. Barnason, S. Rogers and R. Fraley. ; Comparison of CaMV 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. Nucl. Acids Res. 15 (1987) 1543-1558.
4. Balazs, E., S. Bouzoubaa, H. Guilley, Jonard, J. Paszkowski and K. Richards. ; Chimeric vector construction for higher-plant transformation. Gene 40 (1985) 343-348.
5. Buck, K. and R. Coutts. ; Plant biotechnology news and views. Plant Mol. Biol. 2 (1983) 351-357.
6. Depicker, A., M. Van Montagu and J. Schell, ; Plant cell transformation by Agrobacterium plasmids. Genetic Eng. of Plants ; eds by T. Kosuge et al. (1983) 143-176.
7. Bevan, M. ; Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. 12 (1984), 8711-8721.
8. Fischhoff, D., K. Bowditch, F. Perlak, P. Marrone, S. McCormick, J. Niedermeyer, D. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. Mayer, D. Rochester, S. Rogers and R. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Biotechnology 5; 807-813.

저 자 약 력

최 인 성 박사

- 1970 서울대학교 농화학과 (농학사)
- 1978 서울대학교 대학원 농화학과 (농학석사)
- 1984 미국 Oklahoma주립대학교 대학원 (Ph. D.)
- 1973 - 80 한국과학기술원 선임연구원
- 1980 - 84 미국 Oklahoma 주립대학교 연구조교
- 1984 - 86 미국 Tennessee대학교 강사
- 1986 - 현재 한국과학기술원 유전공학센터 책임연구원

홍주봉 (洪周奉) 박사

- 1952. 3. 22. 생
- 1973 서울대학교 식물학과(이학사)
- 1977 서울대학교 대학원 식물학과 (이학석사)
- 1983 미국 미시간주립대학교 대학원 식물학과 (이학박사)
- 1973 - 75 제3육군사관학교 자연과학 교관
- 1978 - 83 미국 Michigan주립대학교 연구조교
- 1983 - 84 미국 Texas Tech. Univ., 생화학과 박사후과정
- 1984 - 87 미국 California대학교, San Diego, 생물학과 박사후과정
- 1987 - 현재 한국과학기술연구원 유전공학센터 선임연구원