

## *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 강남콩 키틴가수분해효소 유전자의 고려인삼으로의 도입

이행순 · 권석운 · 백경희 · 김석원<sup>1</sup> · 이광웅<sup>2</sup> · 유장렬<sup>\*1</sup>

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹, <sup>1</sup>유전자원센터,  
<sup>2</sup>서울대학교 자연과학대학 생물학과

### Introduction of Bean Chitinase Gene into Korean Ginseng by *Agrobacterium tumefaciens*

Haeng S. LEE, Seok Y. KWON, Kyung H. PAEK, Suk W. KIM<sup>1</sup>, Kwang-W. LEE<sup>2</sup>, and Jang R. LIU<sup>\*1</sup>

Bioresources Research Group and <sup>1</sup>Genetic Resources Center, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115 Taedok Science Town, Taejeon; and <sup>2</sup>Department of Biology, Seoul National University, Seoul, 151-742. \*Corresponding author.

We have previously established a system for plant regeneration through somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of Korean ginseng. In this study, to produce a fungus-resistant plant, we introduced a bean chitinase gene into ginseng using the transformation system. A binary vector pChi/748 was constructed by introducing the bean basic chitinase gene into *EcoRI* site of pGA748 which carries the CaMV 35S promoter governing the introduced gene and neomycin phosphotransferase II (NPT-II) gene as a positive selection marker. Cotyledonary explants were cocultured with *A. tumefaciens* strain LBA4404 harboring the binary vector pChi/748 for 48 h, and transferred to MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin, 100 mg/L kanamycin, and 500 mg/L carbenicillin. Kanamycin-resistant calli were formed on the cut surface of cotyledonary explants after one month of culture, and subsequently they gave rise to somatic embryos. Upon transfer onto medium containing 1 mg/L each of BA and GA<sub>3</sub>, most of them converted to plantlets after 5 weeks of culture. The genomic DNA of eight kanamycin-resistant regenerants was subjected to polymerase chain reaction (PCR) using two specific 21-mer oligonucleotides derived from the chitinase gene. PCR-Southern blot analysis confirmed that the chitinase gene was incorporated into six out of the eight regenerants.

**Key words:** fungus-resistant, genetic transformation, in vitro flowering, somatic embryogenesis, transformation

키틴가수분해효소(chitinase: EC 3.2.1.14)는 곰팡이 세포벽의 주된 구성 성분인 키틴( $\beta$ -1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine)을 가수분해하는 효소로서, 척추동물, 세균, 고등 식물, 곤충, 그리고 곰팡이 등에서 발견되며 군사 끝에 새롭게 합성되는 키틴을 분해함으로써 곰팡이의 생장을 억제시킬 수 있다. 고등 식물에 존재하는 키틴가수분해효소는 아미노산 배열에 따라 세 종류로 분류한다(Shinshi et al., 1990). 첫번째는 주로 열기성으로 약 33 kDa의 분자량을 가지고 있으며, N 말단에 hevein이라는 cysteine-rich domain을 가지고 있으며, 두번째는 주로 산성이며 약 28 kDa의 분자량으로 첫번째와 유사성이 있지만 hevein domain이 없다. 세번째 분류는 앞의 두 키틴가수분해효소와는 다른 것이다.

키틴가수분해효소는 평시에 식물체에서 낮은 수준으로 발현되지만 병원균의 공격이 있게 되면 그 발현이 증가한다. 유도된 키틴가수분해효소는 식물체에서 세포내의 액포에 저장되거나 세포밖의 세포간극에 저장되는데 전자의 경우는 주로 열기성이며 후자는 주로 산성 키틴가수분해효소이다(Araki et al., 1992). 키틴가수분해효소는  $\beta$ -1,3-glucanase와 함께 pathogenesis-related protein (PR 단백질)으로 바이러스 혹은 곰팡이 감염시에 식물에서 발현되지만 감자(Gaynor, 1988), yam (Araki et al., 1992) 껍질의 키틴가수분해효소는 그렇지 않다. 대부분의 키틴가수분해효소는 ethylene에 의해 유도되지만(Boller et al., 1983; Mauch et al., 1984; Broglie et al., 1989) 이외에도 살리실산(Ward et al.,

1991), auxin과 cytokinin (Shinshi et al., 1987), 부상이 키틴가수분해효소의 발현조절에 관여하고 있다.

강낭콩 키틴가수분해효소 coding sequence를 CaMV 35S promoter에 붙인 유전자를 이용하여 형질전환시킨 담배와 canola 식물체는 곰팡이가 있는 토양에서 생존할 수 있고 병증이 늦게 나타나며 (Broglie et al., 1991) 세균의 키틴가수분해효소를 담배에 도입시켜도 비슷한 결과가 나타난다 (Jach et al., 1992). 또한 담배의 basic 키틴가수분해효소 (class 1)를 *Nicotiana glauca*에 도입시켜 얻은 형질전환 식물체는 *Cercospora nicotianae*에 민감하였으나 키틴가수분해효소는 최고 120배 정도 높게 만들어진다(Neuhaus et al., 1991).

인삼(*Panax ginseng*)은 두릅나무과에 속하는 다년생 작물로 예로부터 동양에서는 가장 약용성이 높은 식물로 여겨져 왔다. 그러나 인삼은 곰팡이에 의한 피해를 많이 입는데 입고병, 근부병(뿌리썩음병), 잿빛곰팡이병, 균핵병, 건조성혹부병(마름바탕썩음병), 연화병 등에 의한 피해가 심하다. 인삼의 뿌리는 5년 이상을 흡수에 있어야 하기 때문에 곰팡이를 비롯한 여러 가지 병원균에 대한 내성이 절실하게 요구된다. 그러나 3년생이 되어야 꽃을 피울 수 있으며 자가 수분에 의해 종자를 맺게 되므로 관행 육종방법으로는 종자개량을 기대하기 어렵다. 또한 기내에서 화아를 유도함으로써 유형기를 10주 이내로 단축할 수 있으나(Chang and Hsing, 1980; Lee et al., 1990; Lee et al., 1991) 이 방식은 아직 육종에 이용될만한 수준은 아니다. 따라서 기존에 확립되어 있는 인삼의 형질전환 시스템을 이용한 항곰팡이 유전자 도입은 관행육종의 대안이 될 수 있을 것이다.

지금까지 인삼의 형질전환에 관한 연구는 인삼의 유효성분을 생산하기 위해서 *Agrobacterium rhizogenes*의 도입에 의한 모상근 배양이 주를 이루고 있다(Yoshikawa and Furuya, 1987; Ko et al., 1989; Kawaguchi et al., 1990). 한편 CaMV 35S promoter와 *E. coli*의  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 유전자 (Jefferson et al., 1987), 그리고 선발표지로서 neomycin phosphotransferase II (NPT-II) 유전자를 *A. tumefaciens*를 매개로 하여 형질전환된 인삼조직은 식물체로 재분화될 수 있으며 기내 화아형성을 유도할 수 있다. 또한 식물체에 도입된 외부 유전자인 GUS 유전자는 개체발생과정을 거치는 동안에도 안정하게 유지된다 (Lee et al., 1995). 따라서 본 연구에서는 육종방법으로 품종개량이 어려운 점을 감안하여 그 대안으로서 형질전환 시스템을 이용하여 항곰팡이성 인삼을 생산하고자 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자를 CaMV 35S promoter에 붙여 인삼에 도입하였다.

재료 및 방법

식물재료

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 종자를 20% 에탄올에 1분간, 10% 상업용 표백제(유효염소 함유량 4% 이상)에 20분간 침윤시켜 표면살균시키고 멸균 증류수로 세척한 후 접합배를 꺼내어 자엽조직을 형질전환에 사용하였다.

식물 발현용 벡터 제조

0.97 kb의 염기성 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자 (Broglie et al., 1986)를 binary 벡터인 pGA748의 *EcoRI* 자리에 삽입하여 pChi/748 (Figure 1)라 명명하였으며 이 운반체를 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환하여 인삼조직에 사용하였다. 즉, pChi/748은 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자가 CaMV 35S promoter와 7, 5' terminator 사이에 삽입되어 있고 NPT-II 유전자가 T-DNA border 사이에 있는 binary 벡터이다.

자엽조직의 형질전환 및 배양

인삼의 자엽절편에 상처를 낸 다음 *Agrobacteria*와 함께 48시간 동안 공동배양하였는데 이때 Murashige와 Skoog (MS) (1962) 기본배지에 1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin을 첨가한 (MS1D0.1K) 액체 배지를 사용하였다. 자엽조직과 *Agrobacteria*와의 배양 후 세균을 세척하고 100 mg/L kanamycin과 500 mg/L carbenicillin을 첨가한 MS1D0.1K 고체배지에서 kanamycin 저항성 캘러스를 유도하였다. 이러한

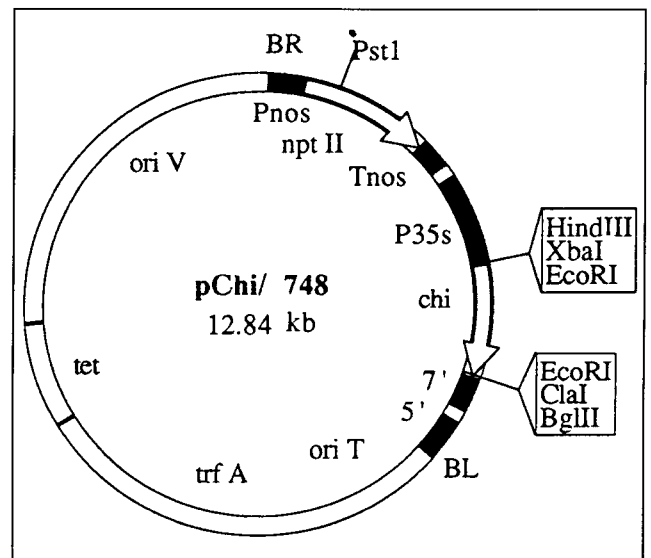


Figure 1. A binary vector pChi/748 harboring bean chitinase gene. BR, T-DNA right border; BL, T-DNA left border; Pnos, nopaline synthase promoter; NPT-II, neomycin phosphotransferase II gene; Tnos, nopaline synthase; P35S, CaMV 35S promoter; chi, bean chitinase gene; 7', transcription termination region of the gene 7 of pTiA6; 5', transcription termination region of the gene 5 of pTiA6

캘러스를 MS1D0.1K 고체배지에 유지시키면서 체세포배를 유도하였으며 유도된 체세포배를 BA와 GA<sub>3</sub>가 각각 1 mg/L씩 첨가된 배지 (MS1BIG)에서 배양하며 이를 재분화시켰다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Kanamycin 저항성 캘러스로부터 체세포배발생을 통해 분화한 식물체의 앞에서 genomic DNA를 Deblaere 등 (1987)의 방법에 의해 분리하였다. 키틴가수분해효소 유전자의 존재 확인을 위해 PCR을 수행하였다. Primer는 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자의 양쪽 말단과 상보적인 2가지의 21-mer oligonucleotide (5'-ATGAAGAAGAATAGGATGATG-3', 5'-ACAAGGTCAGAGAGTAGAG-3')이며 50 ng의 주형 DNA, 600 ng primer, 0.12 mM dNTP 그리고 1 unit의 Taq DNA polymerase를 조합하였다. Amplification은 93°C 1분간 변성, 55°C 1분간 annealing, 72°C 2분동안 extension하여 30 회 반복하였다. 합성된 DNA는 1.2% agarose 겔에 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV 조사를 통해 DNA 절편을 확인하였다.

Southern Blot Analysis

PCR 산물을 1% agarose 겔로 전기영동한 다음 Nytran membrane으로 DNA를 옮겼다. Southern blot 분석은 digoxigenin (DIG) Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim)의 방법에 의하여 시행한 후 X-ray 필름에 노출시켰다. 탐침은 *E. coli*로부터 분리한 pChi/748 plasmid DNA를 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 0.97 kb의 키틴가수분해효소 밴드만을 회수하여 DIG로 표지하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 CaMV 35S promoter-강낭콩 키틴가수분해효소 유전자와 선발표지로서 NPT-II 유전자를 가진 pChi/748 운반체가 들어 있는 *Agrobacterium*으로 인삼 접합배의 자엽 조직을 형질전환시켰다. 형질전환에 사용한 운반체는 binary vector pGA748의 *EcoRI* 위치에 염기성인 강낭콩 키틴가수분해효소(0.97 kb) 유전자를 끼워넣어 완성하였으며, 이 운반체를 *Agrobacterium* LBA4404에 도입하여 사용하였다 (Figure 1).

완성된 운반체에서 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자의 존재와 방향성을 확인하기 위해 *EcoRI*과 *BglII*으로 각각 절단시킨 결과, 전자의 경우 운반체와 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자의 두개의 밴드가, 후자의 경우에는 단일 밴드를 확인할 수 있었다(Figure 2). 또한 운반체가 A.

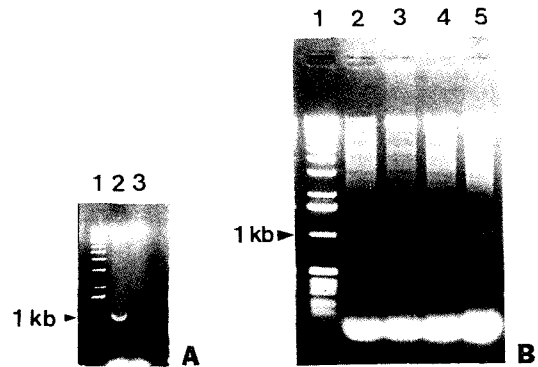


Figure 2. The restriction enzyme digestion patterns of pChi/748 vector (A) and *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring pChi/748 (B). A: Lane 1, 1 kb ladder; lane 2, pChi/748 digested with *EcoRI*; lane 3, pChi/748 digested with *BglII*; B: Lane 1, 1 kb ladder; lane 2, *A. tumefaciens* LBA4404; lanes 3~5, *A. tumefaciens* LBA4404 harboring pChi/748 digested with *EcoRI*.

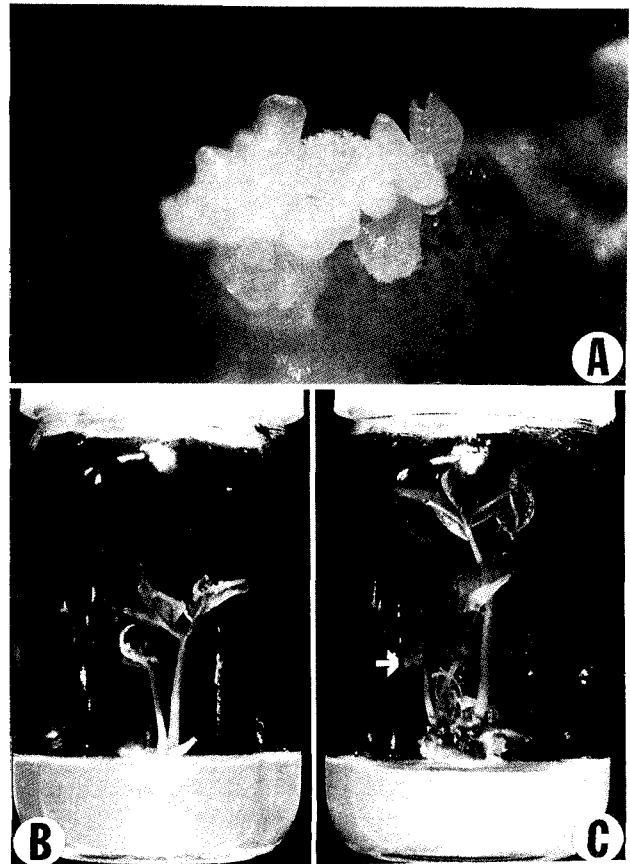


Figure 3. Somatic embryogenesis and in vitro flowering from transformed callus of ginseng. A, Somatic embryos derived from transformed cotyledonary tissue. B, Plantlet converted from somatic embryo. C, In vitro flowering plant of ginseng transformant (arrow indicates flowers).

*tumefaciens* LBA4404에 도입된 결과를 위와 마찬가지로 *EcoRI*으로 절단시켜서 확인하였다. 운반체가 들어 있지 않은 *Agrobacterium*에는 키틴가수분해효소 유전자 밴드가 존재하지 않았지만 운반체가 들어 있는 *Agrobacterium*에는 키틴가수분해효소 유전자 밴드(1 kb)가 확인되었다(Figure 2).

*Agrobacteria*와 함께 배양한 후 선발배지 (MS1D0.1K + 100 mg/L kanamycin)로 옮겨준 자엽 절편은 5주 배양 후 kanamycin 저항성 캘러스를 자엽 표면 부위에서 형성하였다. 형질전환된 캘러스를 동일 배지에서 계속 배양한 결과 배양 4주 후부터 체세포배가 유도되기 시작하였고(Figure 3A) 대부분의 체세포배는 MS1BIG 배지에서 식물체로 자랐다(Figure 3B). 동일 배지 조건에서 배양 10주가 경과한 후 일부 식물체에서 기내 화아형성이 관찰되었다(Figure 3C).

Kanamycin 저항성 캘러스로부터 체세포배발생을 통해 재분화된 식물체 중에서 여덟 개체를 선발하여 잎에서 얻은 게놈 DNA로부터 PCR을 통한 키틴가수분해효소 유전자를 확인한 결과, 여섯 개체에서 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자의 크기인 0.97 kb의 DNA 절편과 비특이 밴드로 추측되는 것들이 합성되었다(Figure 4A). 반면 형질전환 시키지 않은 대조구의 인삼 식물체 게놈 DNA에서는 어떠한 DNA도 합성되지 않은 것으로 보아 인삼 자체의 키틴가수분해효소와 강낭콩 키틴가수분해효소와는 염기서열, 특히 PCR에 이용되었던 primer의 N-말단과 C-말단 부분에서는 유사성이 없음을 알 수 있었다.

한편 PCR 산물 중 0.97 kb의 DNA 절편이 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자의 도입으로 기인된 것임을 입증하기 위한 Southern 분석을 위해 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자 탐침과 hybridization 시킨 결과, PCR 산물인 0.97 kb의

DNA 절편이 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자이고 나머지 밴드들은 PCR에 의해 합성된 비특이적인 것들임을 확인할 수 있었다(Figure 4B). 이로써 인삼의 자엽조직의 형질전환으로 얻어진 식물체는 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자를 가지고 있었고 이들 유전자는 체세포배를 통해 식물체로 분화된 후에도 계속 유지되는 것을 알 수 있었다. 그러나 인삼 염색체내로 끼어 들어간 강낭콩 키틴가수분해효소가 실제로 발현되어 그 활성을 가지고 있을 지는 western blot과 효소활성 검정 등을 통해 확인해야 할 것이다.

또한 이 유전자가 후세대에서도 안정하게 유지, 발현될 수 있는지 여부도 밝혀져야 할 것이다. 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자로 형질전환된 담배는 *Rhizoctonia solani*로 감염되어 있는 토양에서 잘 성장하였으며 곰팡이에 대한 감염 증상도 늦게 나타난다(Brogie et al., 1991). 따라서 형질전환된 인삼도 담배의 경우에서 처럼 특정 곰팡이에 대해 저항성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

### 적 요

본 연구는 이미 확립되어 있는 고려인삼의 체세포배발생을 통한 식물체 재분화와 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환 시스템을 이용하여 항곰팡이성 인삼을 개발하고자 염기서열인 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자를 인삼으로 도입하였다. CaMV 35S promoter-강낭콩 키틴가수분해효소 유전자와 선발표지로서의 neomycin phosphotransferase II (NPT II) 유전자를 가진 pChi/748 binary 벡터를 pGA748로부터 제조하여 이를 도입한 *A. tumefaciens* LBA4404와 인삼 접합배의 자엽절편을 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 MS 액체배지에서 48시간 동안 공동배양한 후 동일배지에 100 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin을 첨가한 고체배지에 옮겨 배양하였다. 배양 한달 후부터 절편의 절단면 부근으로부터 캘러스가 유도되기 시작하였으며 이어서 수많은 체세포배가 형성되었다. 이들 체세포배를 BA와 GA<sub>3</sub>가 각각 1 mg/L 첨가된 배지로 옮겨서 5주 경과 되었을 때 식물체로 전환되었다. 재분화된 개체 중 선발된 8개의 식물체로부터 PCR과 이 산물의 Southern 분석 결과 6개의 재분화 개체에서 강낭콩 키틴가수분해효소 유전자가 도입되었음을 확인하였다.

시사-원고에 대하여 세심한 수정과 논평을 해준 박상수 박사과 원고작성을 도와준 김창숙씨에게 감사한다.

### 인 용 문 헌

Araki T, Funatsu J, Kuramoto M, Konno H, Torikata T (1992) The

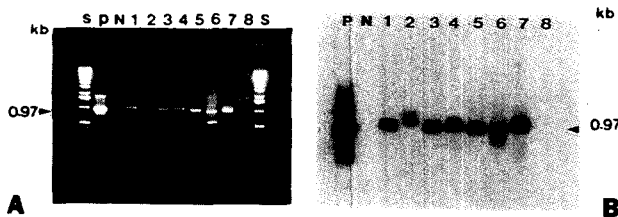


Figure 4. The detection of bean chitinase gene in the transgenic regenerants by PCR (A), and Southern blot analysis (B). S, 1 kb ladder: P, pChi/748 as positive control: N, non-transgenic genomic DNA as negative control: Lanes 1-8, transgenic regenerants genomic DNA. The 0.97 kb bean chitinase fragment probe labeled with DIG was hybridized to PCR products.

- complete amino acid sequence of yam (*Dioscorea japonica*) chitinase. *J Biol Chem* **27**: 19944-19947
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vogeli U** (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* **157**: 22-31
- Brogliè K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Brogliè R** (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254**: 1194-1197
- Brogliè K, Gaynor JJ, Brogliè RM** (1986) Ethylene-regulated gene expression: Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6820-6824
- Chang WC, Hsing YH** (1980) In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature* **284**: 341-342
- Deblaere R, Reynaerts A, Hofte H, Hernalsteens J-P, Leemans J, Van Montagu M** (1987) Vectors for cloning in the plant cells. *Methods Enzymol* **153**: 277-292
- Gaynor JJ** (1988) Primary structure of an endochitinase mRNA from *Solanum tuberosum*. *Nucl Acid Res* **16**: 5210
- Jach G, Logemann S, Wolf G, Oppenheim A, Chet I, Schell J, Logemann J** (1992) Expression of a bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection. *Biopractice* **1**: 1-10
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) Gus fusion :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907
- Kawaguchi K, Hirotani M, Yoshikawa T, Furuya T** (1990) Biotransformation of digitoxigenin by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry* **29**: 837-843
- Ko KS, Noguchi H, Ebizuka Y, Sankawa U** (1989) Oligoside production by hairy root cultures transformed by Ri plasmids. *Chem Pharm Bull* **37**: 245-248
- Lee HS, Kim SW, Lee K-W, Eriksson Tage, Liu JR** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted  $\beta$ -glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. *Plant Cell Rep* (in press)
- Lee HS, Liu JR, Yang SG, Lee YH, Lee K-W** (1990) In vitro flowering of plantlets regenerated from zygotic embryo-derived somatic embryos of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *HortScience* **25**: 1652-1654
- Lee HS, Lee K-W, Yang SG, Liu JR** (1991) In vitro flowering of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) zygotic embryos induced by growth regulators. *Plant Cell Physiol* **32**: 1111-1113
- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T** (1984) Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol* **76**: 607-611
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Neuhaus JM, Ahl-Goy P, Hinz U, Flores S, Jr, Meins F** (1991) High level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol Biol* **16**: 141-151
- Shinshi H, Mohnen D, Meins F** (1987) Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 89-93
- Shinshi H, Neuhaus J-M, Ryals J, Meins F** (1990) Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequence encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol* **14**: 357-368
- Ward E, Uknes S, Williams S, Dincher S, Wiederhold D, Alexander D, Ahl-Goy P, Mettraux J-P, Ryals J** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094
- Yoshikawa T, Furuya T** (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* **6**: 449-453

(1995년 2월 1일 접수)