

형질전환 토마토에서 Antisense Polygalacturonase 유전자의 발현

金英美* · 金龍煥¹ · 李成坤 · 林明鎬 · 宋京淑 · 黃永秀

農村振興廳 農業科學技術院 生物資源部 生化學科, ¹江原道農村振興院

Expression of Antisense Polygalacturonase Gene in Transgenic Tomato

Young-Mi KIM*, Yong-Hwan KIM¹, Seong-Kon LEE, Myoung-Ho LIM, Kyong-Sook SONG, and Young-Soo HWANG

Biochemistry Division, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon 441-707; and

¹Kang-Weon Provincial Rural Development Administration, Chunchon, 200-150. *Corresponding author.

A truncated Polygalacturonase (PG) cDNA was fused in reverse orientation to the CaMV 35S promoter of the binary vector pGA643, and introduced into tomato cells by *Agrobacterium* - mediated transformation. Transformed cells were selected using kanamycin as select agent then regenerated into plants. After selfed, one transgenic line (T9), was germinated and grown on MS medium containing 1 mg/mL of kanamycin. Genomic Southern analysis of a T9 progeny with labelled PG2 cDNA probe showed a single antisense PG fragment as well as the endogenous PG2 gene, suggesting that PG antisense gene was integrated into tomato genome. Northern blot analysis demonstrated that the antisense RNA was produced from the transgene at much higher level than the endogenous PG2 gene. Polygalacturonase activity analysis of the fruit from transgenic plants demonstrated that the antisense transgene expression caused 4 to 60% reduction of endogenous PG activity.

Key word: antisense RNA, ripening

Polygalacturonase (PG)는 토마토 과실이 익기 시작할 때 다량으로 축적되어 세포벽의 주성분인 pectin을 분해하는데 관여하는 효소 중의 하나이다. Pectin 분해에 따른 세포벽의 구조적인 변화는 결국 과실의 연화(softening)로 이어진다 (Huber, 1983). 完熟 토마토 열매에 풍부하게 존재하는 polygalacturonase 효소의 PG 유전자는 단일 유전자에 의하여 코딩되어 있고 (Bird et al., 1988; Giovannoi et al., 1989), 이 유전자의 발현은 과일의 숙성(ripening)과 깊은 관계가 있다. PG mRNA는 未熟 토마토에서는 검출되지 않고, 익기 시작하면 증가하기 시작하여 완전히 익은 열매에서는 전체 poly(A)⁺RNA의 1% 이상까지 축적된다 (DellaPenna et al., 1986; Sheehy et al., 1987).

Antisense RNA를 이용하여 polygalacturonase 유전자 발현을 저해함으로써 토마토 과피 연화를 억제하는 연구가 많이 이뤄져 왔고 (Smith et al., 1988; Watson et al., 1994), 실제 과피 연화가 연장된 토마토가 상품화되기도 하였다 (Charles et al., 1993; Kramer and Redenbaugh, 1994). Pectin

을 분해하는 효소유전자 중 antisense RNA에 의한 발현 저해가 보고된 유전자는 polygalacturonase 유전자 외에도 pectin methylesterase (PME) 유전자 등이 있다 (Tieman et al., 1992). 이들 antisense 유전자는 토마토내로 도입되어 토마토 열매체에 내재하는 (endogenous) PG 또는 PME 유전자의 mRNA와 결합함으로써 duplex RNA를 형성하여 translation을 방해, 유전자의 발현이 억제되어 효소활성이 정상의 5~50%로 저해된다는 것이다 (Smith et al., 1988; 1990). Smith 등에 의해 endogenous PG gene의 발현을 저해한다고 보고된 antisense PG 유전자는 full-length가 아닌 5' 측으로부터 730 bp에 해당하는 것이고, 이후 antisense 뿐만이 아니라 truncate된 730 bp의 PG 유전자 단편의 sense construct를 이용하여도 endogenous PG 유전자의 mRNA 축적을 방해하여 발현을 저해한다는 결과가 제시되었다 (Smith et al., 1990). 그리고 chalcone synthase (CHS) 유전자의 경우에도 CHS 유전자의 3' 측의 sense 및 antisense에 의해서는 endogenous CHS 유전자 발현이 저해되지만 (Van der Krol et al., 1990),

5' 측의 antisense gene에 의해서는 endogenous CHS 발현 저해에 큰 영향을 미치지 않았다(Van der Krol et al., 1990). 이들 결과로부터 antisense RNA의 작용기구가 단순히 RNA-RNA duplex 형성만이 아니라 특이 mRNA 분해 산물의 유전자 발현 저해 가능성도 지적될 수 있다.

본 연구는 PG 유전자 전체 또는 5' 측 antisense RNA의 유전자 발현 저해는 확인되었으나 아직 보고된 바 없는 3' 측 antisense RNA의 PG 유전자 발현 저해 효과를 확인함과 동시에 antisense RNA 기법을 작물에 도입하여 새로운 형질의 작물 또는 육종 소재 창출 기술을 확립하고자 한국산 서광 토마토로부터 분리한 PG 유전자(Kim et al., 1995)의 3' 측의 antisense PG 유전자를 토마토내 형질전환하여 유전자 도입을 확인하고 PG 유전자의 발현 저해를 분석하였다.

재료 및 방법

토마토 형질전환

Antisense PG RNA의 토마토내 발현을 위하여 사용된 PG 유전자는 *Bam*HI 위치부터 종결 코돈까지의 959 bp와 종결 코돈 이후의 3' 비번역 영역 171 bp를 포함한 Polygalacturonase cDNA (Kim et al., 1995)의 *Bam*HI - *Eco*RI 3' 측 약 1.1 kb의 절단 단편으로 pUC118의 같은 제한효소 위치에 삽입하였다. *Pvu*II로 절단하여 PG cDNA와 pUC의 multicloning site를 포함한 1.4 kb 크기의 DNA를 binary vector인 pGA643의 CaMV 35S promoter 하류에 위치한 *Hpa*I 절단 부위내에 삽입한 후, 제한효소 절단 양상으로 PG 유전자가 antisense 방향으로 삽입된 것을 확인, 선별하여 pPG1을 제작하였다. pPG1을 Holster 등(1978)의 방법에 따라 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입한 다음, pPG1의 형질전환 *A. tumefaciens* LBA4404를 토마토의 재배종인 서광의 자엽 조직과 25°C에서 48 시간 공동배양함으로써 형질전환하였다(Robert et al., 1988). 형질전환된 토마토 자엽 조직으로부터 직접 shoot를 유도하기 위하여 4 mg/L kinetin, 0.5 mg/L IAA, 50 mg/L kanamycin이 첨가된 MS배지에서 한달간 배양하였고, 형질전환 재분화개체의 선발을 위하여 kanamycin 50 mg/L를 첨가한 MS 배지에서 유식물체로 재분화시켰다. 형질전환 식물체(T₀)는 온실에서 재배하여 自殖시켜 T₁세대를 육성하였으며 종자를 1 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에서 발아시켜 도입유전자 보유 개체 (T₁9)를 분리 선발하였다.

Genomic Southern Blot 분석

Genomic DNA는 잎 조직으로부터 Shure 등의 방법(1983)을 변용하여 분리하였고, 약 25 µg DNA를 *Eco*RV로 절단

한 후 0.8% agarose gel에 전기 영동한 다음, vacuum transfer unit (Hoefer, TE80)로 nylon membrane에 blot 하였다. 이 membrane을 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 5x Denhart 용액으로 prehybridize한 다음, ³²P로 표지시킨 pPG1의 *Eco*RV 단편 (PG cDNA)(Boehringer Mannheim Random Primed DNA labelling Kit)을 probe로 hybridize 하였다. 1x SSC, 0.1% SDS로 42°C에서 세척한 후 X-ray film에 노출하였다.

RNA 분리 및 Northern Blot 분석

RNA는 토마토 pericarp 조직으로부터 Smith 등의 방법(1986)을 변용하여 분리하였고, 약 10 µg의 total RNA를 formaldehyde 함유 1% agarose gel에서 전기 영동한 다음 nylon membrane에 blot 하였다. Hybridization은 Southern blot 분석에 이용한 PG-specific probe를 이용, 수행하였고, membrane 세척은 42°C에서 0.1x SSC, 0.1% SDS용액으로 행한 후 X-ray film에 노출시켰다.

Protein 추출 및 Polygalacturonase 활성 측정

Protein은 토마토 pericarp 조직으로부터 Pressy의 방법(1986)에 따라 추출하였다. 토마토 pericarp 조직 5 g을 액체질소에서 마쇄한 후 5 mL의 냉수로 homogenize한 다음, 0.25M HCl로 pH 3.0으로 조절하고 2°C에서 원심분리 (8,000 g, 20분)하여 soluble component를 제거하였다. pH 3.0의 냉수 7.5 mL로 다시 homogenize하여 원심분리한 다음, 1M NaCl 용액으로 추출하고 pH 6.5가 되도록 4°C에서 30분간 교반하여 PG 활성을 회복시킨 후 Whatmann filter No. 1로 여과하여 Smith 등(1985)의 방법을 기본으로 한 BCA protein assay kit (Sigma)로 단백질질을 정량하였다. PG 활성은 1% polygalacturonic acid를 기질로 하여 1 M NaCl, 0.2 M sodium acetate 반응 완충액으로 37°C에서 15분간 반응하여 측정하였으며, α-D-galacturonic acid를 사용한 표준곡선에 의해 생성된 환원당의 양으로 계산하였다(Tucker et al., 1980).

결과 및 고찰

Antisense PG 유전자의 토마토내 형질전환

antisense PG RNA를 토마토내로 도입하기 위하여 제작한 binary vector pPG1의 모식도는 Figure 1과 같다. pPG1이 도입된 *A. tumefaciens* LBA4404를 토마토 국내 재배종인 서광의 자엽 절편에 감염시키고, 재분화를 유도하였다. 이때 형질전환된 개체를 선발하는데 50 mg/L의 kanamycin을 사용

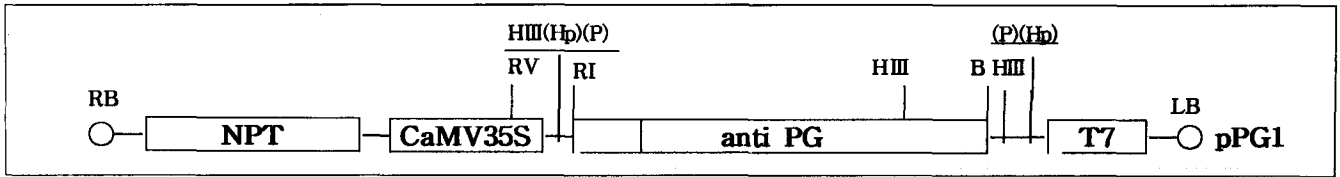


Figure 1. Construction of pPG1. A 1.1kb *Bam*HI -*Eco*RI fragment of the 3' end of the PG cDNA was isolated and cloned into the same sites of a pUC118 multiple cloning site (mcs). The 1.4kb *Pvu*II fragment from a clone containing the truncated PG cDNA fragment was introduced into the *Hpa*I site of the pGA643, under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. The antisense construct (pPG1) was confirmed by *Hind*III restriction analysis. B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; HIII, *Hind*III; Hp, *Hpa*I; P, *Pvu*II; R, *Eco*RI; RV, *Eco*RV.

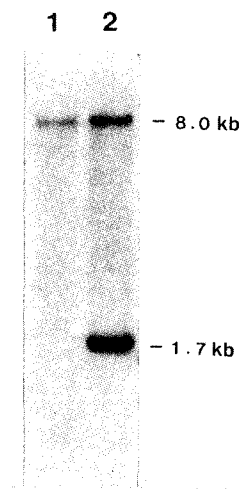


Figure 2. Genomic Southern analysis of normal and transgenic T9 selfed progeny. 25 µg genomic DNA digested with *Eco*RV was probed with the PG cDNA clone (pPG1 -*Eco*RV fragment). Lane 1, untransformed plant; lane 2, pPG1 transformed T19 plant. The 1.7 kb fragment for the T9 selfed progeny (lane 2) was not found in untransformed tomato (lane 1).



Figure 3. Northern analysis of total RNA from untransformed and pPG1 transformed fruit (T9). 10 µg of total RNA was hybridized to a 1.6 kb PG cDNA probe. Lane 1, ripe untransformed fruit; lane 2, ripe T9 fruit. Ripe fruit was harvested 7 days after the first colour change.

하였고, 재분화 식물체 (T₉)로부터 얻어진 종자를 kanamycin 1 mg/mL 함유하는 MS 배지에 발아시킨 후 형질전환 토마토 T₁₉를 얻었다. 이 형질전환 계통 T₁₉을 genomic Southern analysis로 antisense PG 유전자의 삽입을 확인하였다(Figure 2). 토마토 잎 DNA를 *Eco*RV로 절단한 후, pPG1의 *Eco*RV-DNA를 probe로 하여 DNA-gel blotting을 하였을 때 기대되는 밴드는 pPG1에 의해 도입된 antisense PG 유전자 1.4 kb와 35S promoter 일부 0.3 kb가 포함된 1.7 kb와 원래 염색체상에 내재하고 있는 (endogenous) PG 유전자의 밴드이다. Blotting 결과, 비형질전환 토마토 잎 DNA에는 endogenous PG 유전자 밴드만 나타나는 반면, 형질전환 토마토 T₁₉ DNA에는 도입된 antisense PG 유전자 밴드인 1.7 kb와 endogenous PG 유전자 밴드가 약 8 kb 위치에 나타났다. 이로써 T₁₉은 antisense PG 유전자가 염색체내로 삽입되었음이 확인되었다. 동시에 DNA dot blotting을 이용하여 염색체내 도입 유전자 갯수를 조사하였다. 토마토 polygalacturonase는 단일 유전자에 의해 code되고 있는 것으로 알려져 있는데(Bird et al., 1988; Rose et al., 1988), T₁₉ DNA의 dot blot 결과는 비형질전환 DNA보다 2배가량 강하게 나타나 한개의 antisense PG 유전자가 삽입되었음을 확인하였다(성적 제시되지 않음). 이와 함께 kanamycin 함유 배지에서의 종자발아 시험 결과인 3대 1의

분리비로부터도 한개의 유전자가 삽입되었음을 추정할 수 있다.

Antisense PG 유전자의 발현 및 PG 유전자 발현에 미친 영향

Antisense PG 유전자를 형질전환한 당대의 재분화 토마토 T₉에서 antisense PG 유전자의 발현 정도를 확인하기 위하여 과피 조직(pericarp tissue)에서 분리한 RNA로 Northern blot 분석을 수행하였다. PG2 cDNA를 probe로 하였을 때 비형질전환 토마토의 endogenous PG 유전자보다 antisense PG 유전자의 전사체 밴드가 수십배의 강도로 강하게 나타났다(Figure 3). Endogenous PG RNA와 antisense PG RNA의 예상크기가 동일하므로 T₉ RNA 밴드에는 endogenous PG RNA도 포함되어 있겠으나 비형질전환 RNA 밴드의 강도를 감안하더라도 T₉의 antisense PG RNA가 충분량 있음을 시사하고 있다.

T₁₉ 계통의 식물체 10개체의 토마토가 붉게 익은 10일 후의 과피 조직내의 PG 효소 활성을 측정된 결과, 비형질전환 토마토 PG 활성의 39%~96%로 관찰되어 antisense PG RNA에 의해 최고 60%까지 PG 발현이 저해됨을 확인하였다(Table 1). Figure 3에서 antisense PG RNA 발현으로 전사 가능한 PG mRNA의 축적량이 감소되어 결과적으로 PG

Table 1. Polygalacturonase (PG) activity in ripe fruit of T9 (pPG1 transformant) progeny.

Plant	PG activity ^a	
	($\mu\text{g GA}^b/\text{min}/\mu\text{g protein}$)	Mean % normal PG activity
T19-1	0.66	76.7
T19-2	0.63	73.3
T19-3	0.72	83.3
T19-4	0.34	39.5
T19-5	0.70	81.4
T19-6	0.55	64.0
T19-7	0.66	76.7
T19-8	0.55	64.0
T19-9	0.83	96.5
T19-10	0.57	66.3
control	0.86	100

^aPG activity is the mean from 2 fruits per plant harvested 10 days after the first colour change.

^bGA, galacturonic acid.

단백질의 감소로 이어져 PG 효소 활성이 저해되었음을 예상할 수는 있으나, PG 단백질의 축적량과 PG 효소 활성을 비교 분석하고 strand-specific PG probe를 이용하여 antisense PG RNA와 PG mRNA 축적량을 자세히 분석하면, antisense PG RNA에 의한 PG 활성 저해 관계를 더 세밀하게 파악할 수 있으리라 사료된다. 한편, PG 전체 유전자에 대한 antisense RNA에 의해서는 PG 효소 활성 저해율이 70%~90%였고(Sheehy et al., 1988), PG 구조 유전자의 5' 측 760 base에 대한 antisense RNA 또는 sense RNA만으로도 전체 PG 유전자의 antisense RNA와 동일한 PG 효소 활성 저해율을 보이는 반면(Smith et al., 1988), 본 연구에서 사용한 PG 구조 유전자의 3' 측 1.1 kb에 대한 antisense RNA에 의한 PG 효소 활성 저해율은 5~60%로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 페투니아 antisense CHS cDNA의 도입에 의한 화색(花色) 형성 저해 양상과 비슷하다. Van der Krol 등 (1990)에 의하면 3' 측 절반에 대한 antisense CHS RNA는 전체 CHS 유전자에 대한 antisense RNA와 동일한 화색의消失을 보여 주었고, 5' 측 절반에 대한 antisense CHS RNA는 화색에 영향을 미치지 않았다. 이들 결과로부터 antisense RNA의 발현 정도에 따라 endogenous 유전자 mRNA 억제 정도가 달라질 수도 있겠으나 antisense RNA의 작용 기작이 단순히 RNA-RNA duplex 형성에 의한 것만은 아님을 추정할 수 있고, 또한 특정 RNA 분해 산물에 의한 유전자 발현 저해 가능성도 생각할 수 있다.

적 요

국내 재배종 토마토 서광 품종으로부터 분리한 polygalacturonase 유전자(PG2)의 3' 측 1.1 kb cDNA 단편을

식물 형질전환용 운반체에 antisense 방향으로 삽입한 후 자엽을 이용하여 토마토내 도입하여 형질전환 토마토를 획득하였다. 형질전환 토마토(T₀)를 自殖시켜 그 종자를 1 mg/mL 농도의 kanamycin 함유 MS 배지에서 발아시켜 분리 집단 중에서 T19 식물체를 얻었다. T19의 genomic Southern blot 분석 결과, antisense PG 유전자 1개가 염색체 내로 삽입되었음을 확인하였고 RNA gel blot 분석으로 endogenous PG mRNA보다 antisense PG RNA가 강하게 발현됨을 확인하였다. T19 계통 10개체의 성숙 토마토 과피 조직내의 PG 효소 활성도 4~60%까지 저해되었다.

인 용 문 헌

- Bird CR, Smith CJS, Ray JA, Moureau P, Beven MW, Bird AS, Hughers S, Morris PC, Grierson P, Schuch W (1988) The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 11: 651-662
- Charles IB, Thomas U (1993) Biotechnology in the food industry. *BIO/TECHNOLOGY* 11: 895-902
- DellaPenna D, Kates DS, Bennett AB (1986) Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6420-6424
- Giovannoi JJ, DellaPenna D, Bennett AB, Fischer RL (1989) Expression of chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell* 1: 53-63
- Holster M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montague M, Shell J (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163: 181-187
- Huber DJ (1983) Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *J Am Soc Hort Sci* 108: 405-409
- Kim YM, Lee SK, Kim YH, Hwang YS (1995) Isolation and characterization of polygalacturonase cDNA from tomato. *RDA J Agri Sci* 37: 199-203
- Kramer MG, Redenbaugh K (1994) Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: the Flavr savrtm tomato story. *Euphytica* 79: 293-297
- Pressy R (1986) Extraction and assay of tomato polygalacturonase. *Hort Sci* 21: 490-492
- Robert BH, Joyce F, Nancy H, Jeanne N, Stephen GR, Robert TF (1988) Leaf disc transformation. In BG Stanton and AS Robert, eds, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands PMAN A5/1-9
- Rose RE, Houck CM, Monson EK, De Jesus CE, Sheehy RE, Hiatt WR (1988) The nucleotide sequence of the 5' flanking region of a tomato polygalacturonase gene. *Nucleic Acids Res* 16: 7191

- Sheehy RE, Pearson J, Brady CJ, Hiatt WR (1987) Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *Mol Gen Genet* 208: 30-36
- Shure M, Wessler S, Federoff N (1983) Molecular identification of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mollia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Smith CJS, Slater A, Grierson D (1986) Rapid appearance of a mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein MW 35,000. *Planta* 168: 94-100
- Smith CJ, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol* 14: 369-379
- Smith CJ, Watson CF, Morris PC, Bird CR, Seymour GB, Gray JE, Arnold C, Tucker GA, Schuch W, Harding S, Grierson D (1990) Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol* 14: 369-379
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruits. *Plant Cell* 4: 667-679
- Tucker GA, Robertson NG, Grierson D (1980) Changes in polygalacturonase isoenzymes during the ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur J Biochem* 112: 119-124
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JMN, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299
- Van der Krol AR, Mur LA, De Lange P, Mol JMN, Stuitje AR (1990) *Plant Mol Biol* 14: 457-466
- Watson CF, Zheng LS, Dellapenna D (1994) Reduction of tomato polygalacturonase beta subunit expression effects pectin solubilization and degradation during fruit ripening. *Plant Cell* 6: 1623-1634

(1995년 12월 27일 접수)