

형질전환 포플라 subclone의 도입유전자 발현에 대한 오존처리의 영향

설일환 · 신동일*†

경북대학교 농업과학기술연구소
*대구효성가톨릭대학교 자연대학 식물육종학과

Effect of ozone treatment on the expression of a foreign gene in transgenic poplar subclones

Ill-Whan Sul and Dong-Il Shin*†

Institute of Agricultural Sciences and Technology, Kyungpook National University, Daegu, 702-701
**Department of Plant Genetics & Breeding, Catholic University of Taegu-Hyosung,*
Hayang, Kyungsan, Kyungpook, 712-702

Abstract

Transgenic hybrid poplar subclones containing herbicide glyphosate resistant gene (*aroA*) were treated with ozone at the concentration of 100 nL L⁻¹ for 6 hr for 5 consecutive days. The foreign gene expression in leaves of all treated plants was reduced both at transcriptional and translational levels confirmed by Northern and Western blot analysis, respectively, as compared to non-treated control plants. These results indicated that the expression of foreign gene in transgenic plants could be affected by the environmental stresses. Thus, the performance of transgenic plants cultivated on field conditions may be lower than they are expected.

Key words : herbicide resistant gene, antioxidant stress

서 론

세포 및 분자수준에 있어서 생명공학의 발전은 초본식물에서와 마찬가지로 임목에 있어서도 육종에 필요한 시간과 공간의 부담을 줄여 효율을 크게 높이고 있다. 많은 임목에 있어서 전분화능이 증명되고 유전자 도입방법이 확립되었기 때문에 유용유전자가 도입된 형질전환체의 재분화가 많이 보고되고 있다^{1,2,3,4,5}. 농업적인 중요성이 높은 유전자를 이용한 식물의 유전공학은 바이러스, 해충, 제초제, 중금속 등에 대한 내성부여 단일유전자 형질에 주로 제한되어 왔다. 임목에 있어서도 해충, 제초제 내성유전자 및 재질에

영향을 미치는 유전자들이 유전공학을 이용한 육종의 주요 목표가 되어 왔다^{1,2,3,4,5}. 특히 세대기간이 긴 임목에 있어서 유전공학적 방법을 통한 유용 단일유전자의 도입은 선발, 교잡 등의 기존 육종방법에 비해 그 효율 및 잠재성이 무척 높다.

외래유전자가 도입된 형질전환체의 이용에 있어 실제상의 문제점 중 하나는 도입유전자의 부적절한 발현에 있다. 도입 유전자의 copy 수, 위치 효과, promoter의 종류 등 유전자의 발현에 직, 간접적으로 관계된 요인들에 의한 영향은 이미 잘 알려져 있다. 그러나 내부적 요인에 의한 영향 외에 형질전환체를 실제환경에 식재했을 때 외부환경에 의한 도입

† Corresponding author

유전자의 발현 감소도 예상할 수 있을 것이다. 특히 대기 및 토양의 오염이 극심한 지금의 상황에서 이들이 도입유전자의 발현에 어떠한 영향을 미칠 것인지에 대한 연구는 아직 알려진 바가 없으며 이에 관한 연구결과는 오염이 심각한 현재의 농업환경으로 볼때 형질전환체의 재배 또는 경작에 대한 정보와, 특히 형질전환체에 대한 field evaluation이 아직 보고된 바 없는 임목의 field 실험에 대해 유용한 정보를 제공할 것으로 판단된다. 특히 오존은 농작물에 대해 미국에서만 연간 30억 불에 이르는 피해를 끼치고 있으며 오존에 민감한 개체들은 오존의 오염이 심한 서식지에서 사라져 가는 것으로 보고되는 등 경제, 생태적인 영향이 심대한 실정이다^{6,7)}. 농업적으로 가치가 있는 형질인 제초제 내성을 부여하는 *aroA* 유전자가 도입된 식물을 대상으로 한 field 시험 등 이 유전자의 실제적 이용성에 대한 연구가 진행 중인 시점에서 *aroA* 유전자의 발현과 가장 광범위한 피해를 끼치는 식물독소인 오존의 영향을 조사하는 것은 의미있는 일 이라 판단된다.

본 연구는 제초제인 glyphosate 내성유전자인 mutant *aroA* 유전자⁸⁾가 도입된 포플라 clone을 오존에 노출 시킨 후 *aroA* 유전자의 발현을 조사함으로써 오존이 도입유전자의 발현에 미치는 영향을 조사한 것이다.

재료 및 방법

식물재료

잡종 포플라 (*Populus alba* X *P. grandidentata*)의 줄기 배양체에서 얻은 무균 잎절편을 이용하여 pMG85/587⁹⁾ (mannopine synthase promoter ; MAS-NPTII gene, MAS-*aroA* 유전자 cassette 포함), 또는 pCGN1107 (35S-NPTII, 35S-ssu/*aroA* 유전자 cassette 포함)이 든 *A. tumefaciens* strain C58 현탁 배양액과 공배양 후 줄기를 재분화시켜 Southern, Northern, 및 Western분석으로 유전자의 도입과 발현이 확인된 개체를 사용하였다⁴⁾.

Subclone P2와 P3은 pCGN1107로 형질전환된 것들이며, clone P1은 pMG85/587로 형질전환된 것이다. 이들은 온실에 옮겨져 30 cm×30 cm 화분에서 성장하였으며 체장은 약 50 cm 였고 15~20개 정도의 잎을 가지고 있었다. 온실의 온도는 낮 동안은 22°C±2 로 야간에는 18°C±2로 유지되었으며 조명은 자연광을 이용하였다.

오존처리

Subclone 당 3개의 개체를 온실내에 설치된 plexiglass chamber에 넣어 100nL L⁻¹의 오존을 하루 6시간 씩 5일간 처리하였다. 이 농도는 Karnosky (1976)¹⁰⁾에 의해 포플라의 잎이 피해를 받는 역치수준이라고 보고된 것이다. 5일간의 노출 후 줄기의 중간 높이에 위치한 잎을 채취하여 즉시 액체질소에서 얼린 후 재료로 사용하였다. 대조구 식물은 각 subclone들을 같은 조건에서 오존처리없이 둔 후 재료로 사용하였다.

Northern 분석

LiCl을 사용한 방법³⁾을 사용하여 2 g의 잎으로부터 total RNA를 분리하였다. 각각의 식물체에서 분리한 total RNA 20 µg을 formaldehyde와 1x MOPS buffer가 든 1% agarose gel로 전기영동하여 크기별로 분획한 후 10x SSPE buffer를 사용하여 진공으로 nylon membrane에 옮기고 UV cross-linking하였다. Probe로는 pARO9에서 분리한 1.3kb homologous *aroA* 유전자를 DNA labelling kit (USB)를 이용하여 [³²P] dCTP로 표지하였다. Hybridization, washing, exposure 등은 Molecular cloning lab manual¹¹⁾에 설명된 대로 실시하였다.

Western 분석

각각의 식물체 잎조직 1 g을 액체질소에서 마쇄하여 분말로 만든 후 1 ml buffer (50 mM NaPO₄ ; pH 7.0, 10 mM Na₂EDTA ; pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarkosyl, 10 mM BME) 를 이용하여 total protein을 추출하였다. Tube로 옮긴 buffer와 잎분말 혼합액을 5분간 끓인 후 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 다시 tube로 옮긴 후 14,000 rpm 으로 원심분리하여 상등액을 Millipore Ultra Free-MC (10,000NMWL) 여과기를 통과시켰다. 여과된 용액 각 30 µl를 SDS-PAGE로 전기영동 후 supported nitrocellulose membrane (BRL)으로 옮겼다. Membrane은 mutant EPSPS (5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase)에 대한 polyclonal antiserum (1 : 250 dilute)과 반응 시킨 후 streptavidin-HRP로 배양한 뒤 ECL Western blotting detection system (Amersham)으로 검출하였다.

결과 및 고찰

대기오염으로 인한 농작물의 피해가 점점증하고 있으며 대기오염물질 중 특히 오존이 가장 광범위한 피해를 일으키는 것으로 알려져있다⁷⁾. 포플라류는 임목에 있어 재분화 및 형질전환 체계가 확립되어 있는 수종으로서 유전공학적 응용이 가장 용이한 대상의 하나이며 그동안 다양한 연구결과가 보고된 바있다¹²⁾. 그러나 포플라는 오존에 매우 민감한 것으로 보고되었으며^{10,13,14)}, 단시간의 노출에도 광합성 능력이 감소하는 등의 피해를 보이는 것으로 보고되었다¹⁵⁾.

본 실험에서 처리한 농도 및 기간으로는 육안상의 뚜렷한 피해를 입히지 않았으나 이 수준의 노출만으로도 세포에서 항산화 방어체계에 관여하는 효소들의 농도나 광합성능 등에는 큰 변화가 발생하는 것으로 보고 된 바 있다^{14,15)}.

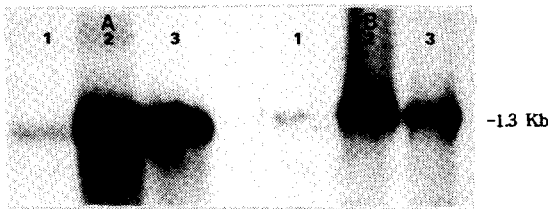


Fig. 1. Northern blot analysis of total RNA isolated from leaves of transgenic poplar subclones containing the *aroA* gene. (A) Control transgenic plants that were not treated with ozone. Lane 1, RNA isolated from subclone P1 ; lanes 2 and 3, RNA isolated from subclones P2 and P3, respectively. (B) Transgenic that were treated with ozone. Lane 1, RNA isolated from subclone P1 ; lanes 2 and 3, RNA isolated from subclones P2 and P3, respectively.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 P2와 P3에서는 오존처리 전에 *aroA* 유전자가 전사 수준에서 발현이 뚜렷이 보이며 MAS에 의해 조절되는 *aroA* 유전자로 형질전환된 P1에서는 발현이 낮음을 알 수있다. 이는 P2나 P3에 있는 35S promoter보다 MAS promoter가 상대적으로 약하기 때문인 것으로 보인다.

오존 처리 후에 전사수준에서의 발현변화를 band의 강도로 비교하면 발현정도가 세개의 subclone 모두에서 공통

적으로 감소했음을 알 수 있다. 이는 식물이 오존 등의 산화 스트레스에 처해질때 식물의 항산화 방어체계에 관여하는 superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase 유전자들과 phenyl propanoid pathway중 식물독소생성 경로에 관여하는 유전자의 발현을 유도하는 반면 총광합성량의 감소, 조기노화에 의해 전체 대사가 억제되는 것에 기인 한다고 판단된다¹⁶⁾.



Fig. 2. Western blot analysis of EPSP synthase from leaves of transgenic poplar subclones containing the *aroA* gene. (A) Control transgenic plants that were not treated with ozone. Lane 1, Protein extracted from subclone P1 ; lanes 2 and 3, protein extracted from subclones P2 and P3, respectively. (B) Transgenic that were treated with ozone. Lane 1, Protein extracted from subclone P1 ; lanes 2 and 3, protein extracted from subclones P2 and P3, respectively.

Fig. 2에서도 오존처리 전보다 처리 후에 EPSPS의 양이 감소했음을 쉽게 알 수있으며 또한 오존 처리 전에도 subclone 들간에 차이를 볼 수있다. P1에서 EPSPS의 양이 적게 나타난 것은 MAS promoter에는 만들어진 mutant *aroA* 유전자에 의해 만들어진 EPSPS를 chloroplast로 전이시키는 transit peptide를 code하는 rubisco small subunit sequence (ssu)가 없어서 EPSPS가 그 활동부위인 chloroplast로 전이되지 못했기 때문인 것으로 판단된다. 3개의 subclone 모두에서 오존처리 후 EPSPS가 감소한 이유는 오존에 의해 세포내에 생성된 superoxide 자유기가 강한 독성으로 인해 chloroplast의 기능과 구조에 치명적 해를 입혔고 또한 단백질의 변성 및 분해를 초래했기 때문인 것으로 생각된다¹⁷⁾.

이상에서의 결과에 나타났듯이 오존이 식물체 전체의 대사에 영향을 미침과 동시에 도입된 외부유전자의 발현에도 부정적 영향을 끼침을 알 수있다. 외부환경의 이러한 부정

적 영향을 줄이기 위해서는 형질전환체에 환경관련 내성유전자를 같이 도입시키는 것도 하나의 방법이 될 것이다. 예를 들어 오존같은 산화 스트레스원에 대해서는 상기한 항산화방어 체계에 관련된 유전자가 overexpression 할수있도록 하는 것이다.

본 연구의 결과는 실제적 경작에 있어 형질전환체의 도입유전자가 외부환경요인에 의해 발현이 감소할 수 있음을 보여주었으며 따라서 field에서의 경작시 여러가지 부정적 환경요인에 의해 형질전환체가 기대치보다 낮은 효과를 보일 수 있다는 사실을 암시하고있다.

추후 보다 많은 실험대상 식물체와 대기오염원 외에도 토양오염원 등 다양한 환경요인을 이용하여 외래유전자의 발현과 환경 stress와의 관계를 더 자세히 밝히는 연구가 필요할 것이다.

요 약

*Agrobacterium*에 의해 재조합내성유전자인 *aroA* 유전자가 도입된 잠종포플라의 subclone을 100 nL L⁻¹ ozone으로 하루 6시간씩 5일간 처리하여 외래도입유전자의 발현을 조사하였다.

도입된 유전자는 Northern, Western분석 결과 전사, 번역차원에서의 발현이 처리하지 않은 대조식물체에 비해 현저히 억제되었다. 이 결과는 형질전환체에서 도입유전자의 발현이 외부환경요인에 의해 저하될 수 있으며 이로인해 실제 재배시에 형질전환체의 성적이 예상했던 것 보다 낮을 수 있음을 암시한다고 할 수 있다.

인 용 문 헌

1. Block, M. D.: Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiol.*, **93**, 1110-1116(1991).
2. Bugos, R. C., Chiang, V. L. C. and Campbell, W. C.: cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1203-1215(1991).
3. Parsons, T. J., Bradshaw, J. H. D. and Gordon, M. P.: Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in poplar trees. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,

- 86, 7895-7899(1989).
4. Riemenschneider, D. E. and Haissig, B. E.: Producing herbicide-tolerant *Populus* using genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* C58: A summary of recent research, In Ahuja, ed, *Woody Plant Biotechnology*, Plenum Publisher, New York, pp.247-246(1991).
5. Shin, D. I., Podila, G. K., Huang, Y. and Karnosky, D. F.: Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Can. J. For. Res.*, **24**, 2059-2067 (1994).
6. Berrang, P., Karnosky, D. F. and Bennett, J. P. Natural selection for ozone tolerance in *Populus tremuloides*: an evaluation of nationwide trends. *Can. J. For. Res.*, **21**, 1091-1097(1991).
7. Krupta, W. C. and Manning, W. J.: Atmospheric ozone: Formation and effect on vegetation. *Environmental pollution*, **50**, 101-137(1988).
8. Comai, L. D., Facciotti, D., Hiatt, W. R., Thompson, G., Rose Re. and Stalker, D. M.: Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*, **317**, 741-744 (1985).
9. Fillatti, J. J., Kiser, J., Sellmer J., McCown, B. H., Haissig, B. E. and Comai, L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.*, **206**, 192-199 (1987).
10. Karnosky, D. F.: Threshold levels for foliar injury to *Populus tremuloides* by sulphur dioxide and ozone. *Can. J. For. Res.*, **6**, 166-169 (1976).
11. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).
12. Ostry, M. E. and Ward, K. T.: Bibliography of *Populus* cell and tissue culture. USDA For. Serv. General technical Report NC-146 (1991).
13. Gagnon, Z. E., Karnosky, D. F., Dickson, R. E. and Isebrands, J. G.: Effect of ozone on chlorophyll content in *Populus tremuloides*. *Amer. J. Bot.*, **79**, 107(1992).
14. Sheng, Y.: Effects of ozone on gene expression in sensitive and tolerant aspen clones. MS thesis, Michigan Tech. Univ. Houghton, MI. (1994).
15. Gupta, A. S., Alsher, R. F. and McCune, D.: Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant physiol.*, **96**, 650-655 (1991).
16. Eckey-Kaltenbach, H., Ernst, D., Heller, W. and Sandermann, J. H.: Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinium crispum*) plants. *Plant Physiol.*, **104**, 67-74(1994).
17. Elstner, E. F.: Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 73-96(1982).