

애기장대 gamma-Tocopherol Methyltransferase

유전자를 이용한 상추의 형질전환

김명준¹ · 백소현¹ · 유남희^{1,3} · 윤성중^{1,2*}

¹전북대학교 농업과학기술연구소, ²전북대학교 농과대학 생물자원과학부, ³(주)그린바이오테크 생명공학연구소

Transformation of *Arabidopsis* gamma-Tocopherol Methyltransferase into Lettuce (*Lactuca sativa* L.)

KIM, Myung Jun¹ · BAEK, So Hyeon¹ · YOO, Nam Hee^{1,3} · YUN, Song Joong^{1,2*}

¹Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

²Faculty of Biological Resources Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

³Institute of Biotechnology, Greenbiotech Co., Ltd. Kyoha-myeon, Paju, 413-830, Korea

ABSTRACT Explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.) were cocultured with *A. tumefaciens* LBA 4404 harboring γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) gene from *Arabidopsis thaliana*. These explants were transferred to MS medium supplemented with 50 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA. After 4 weeks, kanamycin resistant shoots were obtained from the explants on the selection medium. The putative transgenic shoots were transferred to rooting MS medium supplemented with 50 mg/L kanamycin and 250 mg/L carbenicillin. Stable incorporation of the *Arabidopsis* γ -TMT cDNA into lettuce genomic DNA was confirmed by PCR and Southern analysis. HPLC analysis showed that α - to γ -tocopherol ratio increased over four fold in a transgenic lettuce line indicating successful expression of the transgenic *Arabidopsis* γ -TMT in lettuce.

Key words: *Agrobacterium* transformation, HPLC, PCR, γ -TMT

서 론

지용성 항산화제인 tocopherol은 비타민 E로서 천연적으로 발생하는 tocopherol은 α -, β -, γ -와 δ -tocopherol의 4가지가 있으며 이들 동족체는 방향족 고리에 결합된 methyl기의 수와 위치에 차이가 있다 (Fryer 1992). Tocopherol은 지질 이중막 내에서 다가불포화 지방산이 lipoxygenase에 의해 산화되는 것을 방어하여 생체막을 안정화시키는 기능이 있다

(Erin et al. 1985). 천연 식물 중 존재하는 α -tocopherol은 (R,R,R)- α -tocopherol 형태이며 tocopherol 중 비타민 E 활성이 제일 높고 우선적으로 체내에 흡수되며 인체의 전역에 걸쳐 대사에 기여하므로 인간의 건강에 매우 중요하다 (Traber and Sies 1996). 현재 미국에서 비타민 E 1일 권장량은 10~13.4 international units (IU)이며, 이것은 (R,R,R)- α -tocopherol 7~9 mg과 같은 양이다 (National Research Council Food and Nutrition Board 1989). 식물성 음식을 다량 섭취하는 경우, 보통 음식물로부터 비타민 E의 1일 권장량을 섭취할 수 있다. 하지만 매일 1일 권장량보다 많은 100~1,000 IU의 비타민 E를 섭취해야만 심장혈관 질환과 일부 암의 예방, 면역기능 개선과 노화 억제에 효과가 있다고

*Corresponding author. Tel 063-270-2508 Fax 063-270-2640
E-mail sjyun@moak.chonbuk.ac.kr

한다 (Traber and Sies 1996). 따라서 비타민 E가 풍부한 특별한 식물물을 의도적으로 다량 섭취하지 않으면 일상적인 식물물 섭취에 의해 이들 질병의 예방이나 치료 효과가 있는 수준의 비타민 E를 얻기는 불가능하다 (Shintani and DellaPenna 1998).

토코페롤 함량은 유지작물의 종자에서 높는데 대부분 α -대 γ -tocopherol 비율이 낮아 영양적 품질이 낮다. 콩의 경우 전체 tocopherol 중 α -tocopherol과 α -tocopherol의 직접적인 생합성 전구체인 γ -tocopherol 함량 비율은 각각 7%와 70%이다. 따라서 대부분의 식용작물에서 치료 효과 수준의 비타민 E를 섭취하기 위해서는 α -tocopherol의 함량을 증가시킬 필요가 있다.

γ -Tocopherol methyltransferase (γ -TMT)는 α -tocopherol의 생합성 경로의 최종단계에서 γ -tocopherol의 방향족 고리에 메틸기를 전이하여 γ -tocopherol을 α -tocopherol로 전환시킨다. α -Tocopherol의 생합성 과정이 밝혀지고 *Arabidopsis*에서 γ -TMT 유전자가 분리됨에 따라 γ -TMT의 촉진 발현에 의한 식물의 α -tocopherol 함량 증대 연구가 진행되고 있다. Shintani와 DellaPenna는 *Arabidopsis*에 γ -TMT 유전자를 도입하여 촉진 발현시킴으로써 α -tocopherol의 함량을 80배 이상 증가시켰다 (Shintani and DellaPenna 1998).

상추 잎의 총 토코페롤 함량은 5.1 mg/100 g DW 수준이며 α -tocopherol 대 γ -tocopherol의 함량 비율은 0.8 정도로 총 함량이 낮고 조성비율도 영양면에서 불리하다. 그러나 생식할 수 있고 많은 양이 소비되고 있으므로 토코페롤 섭취에 유리하다. 따라서 α -tocopherol 함량이 증대된 상추의 개발은 농산물의 부가가치 증대 및 국민보건 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

이에 본 연구는 생식용 잎채소로서 소비가 증가하고 있는 상추에 γ -TMT 유전자를 도입하여 촉진 발현시킴으로써 α -tocopherol 함량이 증가된 상추 계통을 선발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

잎상추 품종 (*Lactuca sativa* L.)인 흥농종묘 청치마 상추 종자를 70% 에탄올에 1분간 침지한 후, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침지하고 멸균수로 4회 수세하여 표면소독을 실시하였다. 표면소독한 종자를 3% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 배지에 파종하고 25±1°C, 16시간 일장하에서 7~10일간 배양하여 얻은 자엽을 형질전환 재료로 이용하였다.

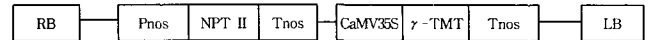


Figure 1. Partial structure of the binary vector, pBI-TMT, containing γ -TMT expression cassette. Abbreviations used are : Pnos, nopaline synthase promoter; NPT II, neomycin phosphotransferase gene II; Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; CaMV35S, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; γ -TMT, γ -tocopherol methyltransferase; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border.

형질전환 및 식물체 재분화

실험에 사용된 γ TMT 유전자는 *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio State Univ. USA)로부터 분양받아 binary vector인 pBI 121에 재조합 (pBI-TMT)하여 (Figure 1) freezing-thawing 방법을 이용하여 *A. tumefaciens* LBA 4404에 도입하였다 (An et al. 1988).

pBI-TMT 유전자 재조합체가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404를 50 mg/L kanamycin이 포함된 YEP (1% yeast extract, 1% peptone, 0.5% NaCl) 액체배지에 접종한 다음 28°C, 암상태에서 48시간 이상 250 rpm으로 진탕 배양하였다. *Agrobacterium* 배양액의 OD₆₀₀이 0.6일 때 배양액을 MS 기본 액체배지에 20배 희석하였고 희석액을 이용하여 1 cm² 크기의 자엽절편을 10분간 접종하였다. *Agrobacterium*을 접종한 자엽절편은 0.1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA를 혼용 첨가한 MS 배지에 치상하고 (Jeong et al. 2000) 21°C, 암상태에서 3일간 배양하였다.

*Agrobacterium*과 공동배양한 자엽절편을 MS 기본배지에 500 mg/L carbenicillin, 50 mg/L kanamycin, 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA가 첨가된 선발배지에 옮겨 23°C 암상태에서 7일간 배양한 후 연속조명으로 명배양하여 형질전환체를 선발하였다. 분화된 싹은 50 mg/L kanamycin과 250 mg/L carbenicillin이 첨가된 MS 기본배지에서 뿌리를 유도하였고, 얻어진 식물체를 pot에 이식하여 온실에서 순화시킨 후 특성검정을 실시하였다.

PCR에 의한 형질전환체 선발

선발된 형질전환 식물체내 *Arabidopsis* γ -TMT 유전자 삽입 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 실시하였다. Hong 등 (1993)의 방법에 따라 형질전환 상추잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 1070 bp 단편이 증폭되도록 제작한 *Arabidopsis* γ -TMT 유전자 특이적인 정방향 primer (5'-GAATTCATGAAAGCAACTCTAGC-3')와 역방향 primer (5'-TAATCGATTAGACTTAGAGTGGCTTC-3')를 사용하여 PCR을 실시하였다. 최종 25 μ l의 PCR 반응액 조성은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM primer, 200 μ M dNTP, 주형 DNA 10 ng 그리고 *Taq*

polymerase 1 unit이었다. PCR 반응은 95°C에서 1분간 pre-denaturation 반응을 거친 후 증폭반응 (94°C에서 50초, 57°C에서 50초, 72°C에서 1분간 반응)을 30회 진행하였고 최종 신장반응을 72°C에서 3분간 실시하였다. PCR 산물은 0.5 μ g/mL EtBr이 포함된 1% agarose gel에서 전기영동하여 UV 하에서 확인하였다.

Southern blot 분석

PCR 분석을 통해 *Arabidopsis* γ -TMT 유전자 삽입이 확인된 상추 형질전환 식물체를 대상으로 Rogers와 Bendich (1988)의 방법을 변형하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA 10 μ g을 pBI-TMT 제작에 사용한 제한효소인 *Sma* I과 *Sac* I으로 2중 소화시킨 다음 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 capillary transfer 방법 (Southern 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. 탐침의 표지는 Dig-High Prime Labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 실시였으며, Dig Nucleic Acid Detection kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 Southern analysis를 수행하였다.

HPLC 분석

애기장대 γ -TMT 유전자의 삽입이 확인된 상추 형질전환 식물체의 생엽 1 g을 채취하여 액체질소에서 급속냉동하여 동결건조하였다. 동결건조된 시료로부터 Tanaka 등 (1999)의 방법을 변형하여 tocopherol을 추출하였다. Tocopherol의 HPLC 분석은 Waters HPLC System 626에 μ -porasil (Waters, USA) 컬럼, 형광검출기 (Waters 474)를 부착하여 실시하였으며 n-hexane과 iso-propanol (98:2) 혼합액을 용리액 (유속 1.0 ml/min)으로 사용하였다. 추출시료 20 μ g의 tocopherol을 형광검출기 (excitation 295 nm, emission 325 nm)를 이용하여 검출하였다 (Abdollahi et al. 1993; Brigh and Dyer 1959). Tocopherol 표준 물질은 Merck사로부터 구입하여 10 ng/ μ l로 희석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

형질전환과 식물체 재분화

*Agrobacterium*과 공동배양한 상추 자엽의 절단면으로부터 배양 2주 후 callus가 형성되기 시작하고, 담황색 callus로부터 신초가 분화되었으나, 형질전환시키지 않은 자엽은 고사하였다 (Figure 2A). 배양 4주 후 대부분의 자엽 절편체로부터 callus가 유도되었으며 신초 형성률은 약 78%로 나타났으며, 재분화된 신초를 50 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 기본 배지에 옮겨 발근을 유도하였다. 배양 초기에 유도된 신초는 대

부분 발근이 되었으나 늦게 유근된 신초의 일부는 백화되었다. 발근된 식물체를 순화시킨 후 토양에 이식하고 온실에서 재배하여 채종하였다 (Figure 2B).

형질전환체로 추정되는 상추 식물체를 대상으로 애기장대 γ -TMT 유전자 특이적 primer쌍을 이용하여 PCR을 수행한 결과 애기장대 γ -TMT 유전자가 재조합된 binary vector (pBI-TMT)를 이용하여 형질전환한 식물체의 genomic DNA에서는 1,070 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되었다 (Figure 3A). 그러나 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않고 재분화된 식물체의 genomic DNA에서는 어떤 DNA 단편도 증폭되지 않았다. Figure 3A의 lane 1은 pBI-TMT에서 증폭된 단편이며, lane 3, 4, 5, 6, 7은 형질전환한 상추의 genomic DNA로부터 증폭된 단편이다. 형질전환된 식물체에서는 1,070 bp의 예상된 단편이 증폭되었으나, 형질전환하지 않은 식물체 (lane 2)에서는 단편이 증폭되지 않아 애기장대 γ -TMT 유전

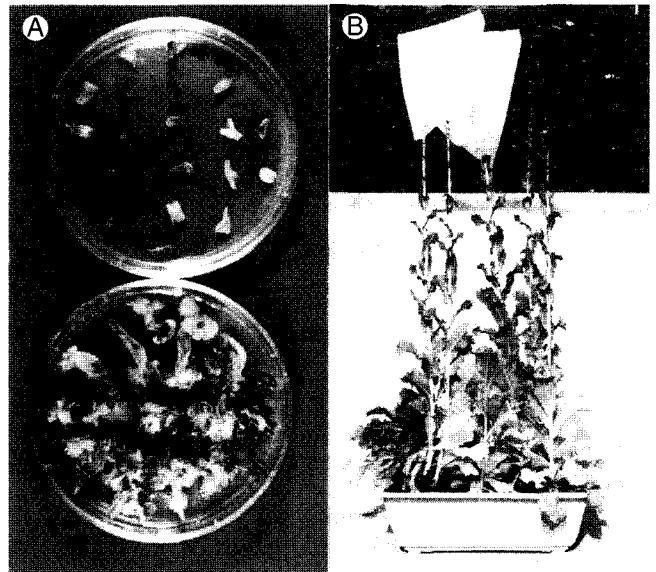


Figure 2. Nontransgenic explants (upper) and transgenic lettuce shoots transformed with *Arabidopsis* γ -TMT cDNA (lower) growing on the medium containing 50 mg/L kanamycin (A). Regenerated lettuce plants at flowering stage (B).

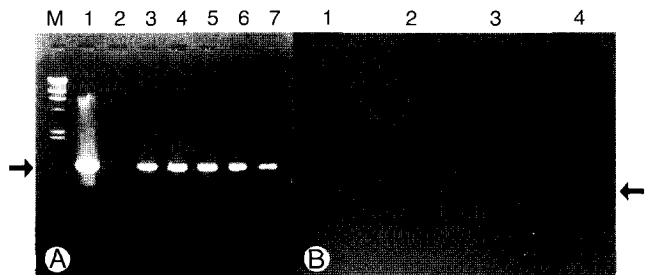


Figure 3. PCR (A) and Southern blot analysis (B) of γ -TMT transgene. A. M, Lamda DNA/*Hind* III DNA marker; lane 1, pBI-TMT plasmid vector; lane 2, nontransgenic plant; lanes 3-7, transgenic plants transformed with pBI-TMT. 1070 bp amplification products are arrowed. B. Lane 1, nontransgenic plant; lanes 2-4, transgenic plants transformed with pBI-TMT. 1.5 kb fragments hybridized with the γ -TMT probe are arrowed.

자가 상추 계층상에 삽입되었음을 암시하였다.

PCR 분석을 통해 유전자의 삽입이 확인된 식물체 중 3개의 식물체와 형질전환하지 않은 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 *Sma* I과 *Sac* I 제한효소로 2중 소화시킨 후 애기장대 γ -TMT probe를 이용하여 Southern 분석을 실시한 결과 형질전환된 3개의 식물체 모두에서 형질전환시킨 유전자와 동일한 크기인 약 1.5 kb의 단편이 검출되었으나 대조 식물체에서는 단편이 검출되지 않았다 (Figure 3B). 이것은 선발된 상추 형질전환 식물체에 외래 유전자인 애기장대 γ -TMT가 안정적으로 도입되었음을 나타내주는 결과이다.

HPLC 분석

본 연구에서 사용한 HPLC 조건에서 α 와 γ -tocopherol의 머무름 시간은 각각 4.2와 5.7분이었다. 형질전환하지 않은 상추는 α -tocopherol 대 γ -tocopherol의 함량 비율이 0.57~0.9 였으나, 형질전환 계통 중에는 α -tocopherol 대 γ -tocopherol 비율이 약 4배 증가한 계통 (Table 1)이 존재하였다 (Figure 4A, B). 이러한 α -/ γ -tocopherol 함량 비율의 증가는 형질전환된 식물체 내에서 애기장대 γ -TMT가 정상적으로 발현되어 γ -tocopherol을 α -tocopherol로 전이시킨 결과로 생각되어진다. 비형질전환 계통과 형질전환 계통간의 tocopherol 함량의 차이는 식물체의 재배 환경과 시료 채취 단계의 차이에 의해 기인된 것으로 생각된다.

Shintani와 DellaPenna (1998)는 *Arabidopsis*에 γ -TMT 유전자를 형질전환시켜 형질전환 식물체 종자의 α -tocopherol 수준이 80배 이상 증가하였고 그 결과 종자유 50 g의 비타민 E 활성은 9배 이상 증가하였다고 보고하였다. 그러나 γ -TMT 유전자의 발현에 의해 γ -tocopherol의 감소량만큼 α -tocopherol 함량이 증가하였고 종자 내의 tocopherol 전체 함량은 변화되지 않았다 (Shintani and DellaPenna 1998). 본 실험에서 얻은 형질전환 상추 1 계통은 α -tocopherol 대 γ -tocopherol 함량 비율이 대조 상추와 비교하여 약 4배 증가하였으며 Shintani와 DellaPenna의 결과와는 상이하게 전체 함량도 증가하였는데 (Table 1), 이에 대하여는 지속적인 연구 검토가 필요하다고 생각된다.

본 연구를 통하여 확보한 형질전환체에 대한 후대 검정 등의 과정을 통하여 α -tocopherol 성분이 다량 함유된 상추의 개발이 가능하다고 사료되며, γ -tocopherol의 함량이 많은 콩, 참깨, 들깨 그리고 유채 등의 유류작물에 대한 γ -TMT 유전자 형질전환을 통해 α -tocopherol의 함량이 증가된 품종 개발이 가능하리라고 생각된다.

적 요

겨울 상추 품종인 청치마 상추의 자엽조직을 γ -TMT 유전

Table 1. Tocopherol contents and compositions in leaves of nontransgenic and the selected transgenic lettuce plants transformed with *Arabidopsis* γ -TMT cDNA

Plant	α -Tocopherol (ng/mg DW)	γ -Tocopherol (ng/mg DW)	α -/ γ -tocopherol ratio
Nontransgenic plant	18.7	32.5	0.57-0.9
Transgenic plant	168.9	45.8	3.7

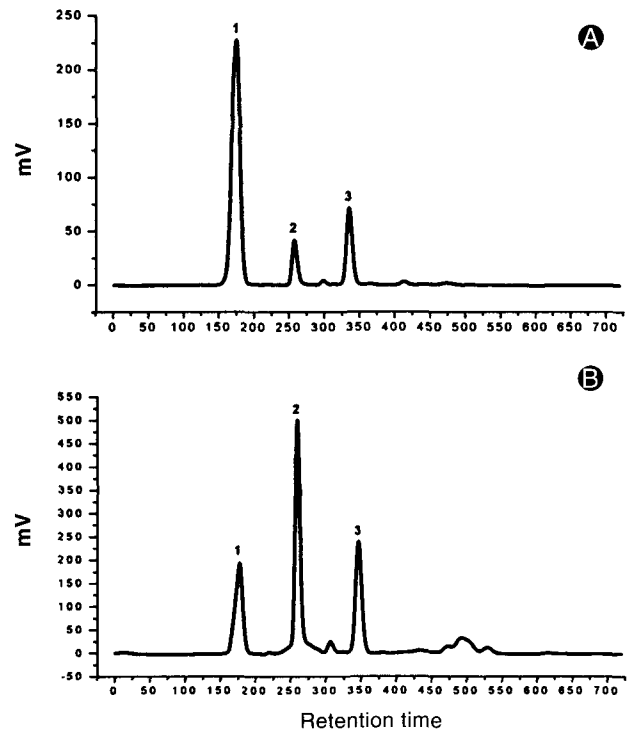


Figure 4. HPLC profiles of tocopherol isomers in nontransgenic (A) and transgenic plant (B). Peak identification: 1, eluent front (RT=2.8); 2, alpha-tocopherol (RT=4.2); 3, gamma-tocopherol (RT=5.6).

자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404와 공동배양한 후, 50 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA가 첨가된 MS 재분화 배지에 옮겨 약 4주 배양하여 재분화된 신초를 얻었다. 재분화된 신초를 50 mg/L kanamycin, 250 mg/L carbenicillin이 포함된 MS 기본 배지에 옮겨 발근된 소식물체를 얻었다. 선발된 형질전환 식물체의 genomic DNA에 대한 PCR 분석과 Southern 분석을 수행하여 애기장대 γ -TMT 유전자 특이적 DNA 단편이 상추의 genomic DNA 내에 삽입되었음을 확인하였다. 선발된 상추 형질전환체 잎의 α -tocopherol/ γ -tocopherol 함량 비율이 대조 식물체에 비하여 약 4배 증가하여 도입된 γ -TMT 유전자가 안정적으로 발현함을 나타내었다.

인용문헌

- Abdollahi A, Rosenholtz and Garwin JL** (1993) Tocopherol micro-extraction method with application to quantitative analysis of lipophilic nutrients. *J. Food Science* **58**(3):663-666
- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB** (1988) Binary vectors. *Plant Molecular Biology Manual* **A3**:1-19
- Brigh EG and Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-915
- Erin AN, Skrypin VV, Kagan VE** (1985) Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids. Nature of complexes. *Biochem. Biophys. Acta* **815**(2):209-214
- Fryer MJ** (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ.* **15**:381-392
- Hong Wang, Meiqing Qi and Adrian J. Cutler** (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* **21**(17):4153-4154
- Jeong JH, Yang DC, Jang HG and Paek KY** (2000) Transformation of lettuce using cold regulator gene (BN115). *Korean J. Plant Tissue Culture* **27**(1):7-12
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**:473-497
- National Research Council Food and Nutrition Board** (1989) NAS-NRC recommended dietary allowances. National Academy Press, Washington, DC, ed. **10**
- Rogers SO and AJ Bendich** (1998) Extraction of DNA from plant tissues. *Iniplant Molecular Biology Manual* (ed by Geliben et al). **a6**:1-10
- Shintani D and DellaPenna D** (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**:2098-2100
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:505-517
- Tanaka, Oster RU, Kruse E, Rudiger W, Grimm B** (1999) Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol.* **120**:695-704
- Traber MG and Sies H** (1996) Vitamin E in humans : demand and delivery. *Annu. Rev. Nutr.* **16**:321-347

(접수일자 2000년 9월 9일)