

NPTⅡ 및 HPT 유전자가 삽입된 현사시의 항생제에 대한 저항성 분석

이은정¹ · 노은운 · 박재인^{1*}

임업연구원 생물공학과, ¹충북대학교 산림과학부 임학과

Comparative Analysis of Resistance to Antibiotics in *Populus alba* × *P. glandulosa* Transformed by *npt* II or *hpt* Gene

LEE, Eun Jeoung¹ · NOH, Eun Woon · PARK, Jae In^{1*}

Division of Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon, 441-350, Korea

¹School of Forest Resources, Chungbuk National University Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT This study was performed to find out the optimal conditions for the selection of transformed cells using already established transgenic plants. Several transgenic poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*) lines carrying *npt* II or *hpt* gene as a selectable marker were tested against kanamycin or hygromycin. Two culture explants, leaf discs and nodes, were compared regarding their sensitivity to the antibiotics. When leaf discs of untransformed control plants were cultured on callus inducing media in the presence of varying levels of kanamycin or hygromycin, only those cultured on the media containing lower than 50 mg/L kanamycin or 2 mg/L hygromycin formed callus. However, much higher concentration of kanamycin was needed to suppress the growth of axillary buds of untransformed plants. On the other hand, hygromycin at the concentration of 5 mg/L effectively suppressed shoot growth of untransformed plants. Root induction from untransformed plants could also be suppressed at the concentration of 50 mg/L kanamycin or 5 mg/L hygromycin. The transgenic plants showed resistance to 100 mg/L kanamycin or 50 mg/L hygromycin in the growth of callus, shoots, and roots. Hygromycin appeared to be more efficient in selecting untransformed cells than kanamycin.

Key words: HPT, NPTⅡ, poplar, selectable marker, transformation

서 론

식물 유전공학의 발전으로 박테리아를 비롯한 식물 및 동물에서 유래한 외부 유용유전자를 식물에 도입하려는 형질전환 기술이 개발되어 많은 곳에서 식물의 형질전환이 시도되고 있다. 이러한 연구들은 애기장대, 담배 등의 모델식물을 대상으로 먼저 개발된 후 다른 식물들에 어느 정도의 변형을 거친 후에 응용되는 것이 일반적인 추세이다. 그 대표적인 예가 Horsch 등 (1985)의 leaf disk 형질전환 방법이라고 할 수 있다. 이렇게 먼저 개발된 형질전환 기법을 어떤 식물에 적용

하려고 할 경우 세포나 조직으로부터의 줄기 분화에 못지 않게 선발표지에 대한 반응이 중요한 문제로 대두된다. 그 이유는 식물마다 혹은 식물조직의 각 부위마다 표지로 이용되는 물질에 대한 반응이 다르며, 최근에는 전통적인 방법이라고 할 수 있는 캘러스 유도를 거친 줄기 재분화 방법이 아닌 종자를 이용한다거나, 조직으로부터 직접 줄기를 유도한다거나 체세포배 유도과정을 이용하는 등 새로운 방법, 새로운 조직을 이용하는 경향이 늘고 있기 때문이다 (Feldmann and Marks 1987; Tzfira et al. 1997). 임목을 대상으로 한 형질전환 연구는 비교적 재분화가 용이한 포플러류 (Confalonieri et al. 1995; Fillatti et al. 1987)에서만 비교적 많은 연구가 수행되었다. 현재 세포선발에 쓰이는 표지로는 항생제 kanamycin에 대한 저항성을 부여하는 *npt* II (neomycin phospho-

*Corresponding author. Tel 043-261-2535 Fax 043-272-5921

E-mail jipark@chungbuk.ac.kr

transferase II) 유전자, hygromycin 저항성 유전자 *hpt* (hygromycin phosphotransferase), 식물에 따라 부분적인 활성이 있는 것으로 보고된 spectinomycin에 대한 저항성 유전자 (ADA), 그리고 zeocin에 대한 저항성 유전자 *sh ble*가 알려져 있다 (양 et al. 1997; Perez et al. 1989; Tian et al. 2000). 그러나 이러한 표지들에 대한 세포 및 조직의 반응에 대한 정보는 잎 절편 형질전환의 경우 외에는 없는 형편이다. 따라서 형질전환되지 않은 조직이나 세포에서 줄기가 발생할 위험은 언제나 존재하므로 각 부위별 반응을 비교하여 적정 조직, 적정농도를 구명한다는 것은 새로운 식물 시스템을 이용할 경우 필수적으로 수행되어야 할 실험이다. 본 실험에서는 먼저 확립된 형질전환체를 이용하여 조직별로 각 항생제에 대하여 어느 정도의 내성을 보이는지 비교하고 형질전환시 선발 대상인 세포수준의 반응과 형질전환체의 조직으로서의 반응의 차이를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

기내증식 방법으로 기내에서 보존된 *npt II*, *hpt*, 혹은 *pat* 유전자가 삽입된 형질전환 현사시나무 (*P. alba* × *P. glandulosa*)를 실험 재료로 사용하였다. *npt II* 유전자 형질전환체는 binary vector pBI121 (Jefferson et al. 1987)을 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 삽입시킨 것으로 50 mg/L의 kanamycin을 사용하여 선발하였다. *hpt* 유전자 삽입 형질전환체는 pBIB-HYG (Beckker 1990)를 이용한 것으로 2 mg/L의 hygromycin을 사용하여 선발한 것이었다 (Noh et al. 1996). 전 실험과정 동안 배양 환경은 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 빛은 백색 형광등으로 광도 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 16시간 명배양으로 3주간의 생장을 조사하였다.

배지조성

캘러스 유도배지 (CIM)는 MS (Murashige and Skoog 1962)를 기본배지로 BA 0.01 mg/L, NAA 0.1 mg/L, 2,4-D 1.0 mg/L를 첨가하여 사용하였고 줄기 유도배지 (SIM)는 WPM (Lloyd and McCown 1981)에 1.0 mg/L zeatin, 0.1 mg/L, BA 0.01 mg/L NAA 0.01 mg/L를 첨가하였으며, 뿌리 유도배지 (RIM)는 GD (Gresshoff and Doy 1972)에 IBA 0.2 mg/L를 첨가한 것을 사용하였다.

부위별 항생제에 대한 감수성

각 선발물질에 대한 엽절편과 절간조직의 발근능력, 액아생장, 캘러스 유도 및 생장을 조사하였다. 각 부위별 항생제에

대한 감수성 조사를 위하여 항생제는 kanamycin과 hygromycin을 사용하였으며 kanamycin은 0, 10, 50, 100, 500 mg/L로 hygromycin은 0, 2, 5, 10, 50 mg/L로 처리하였다.

결과 및 고찰

세포선발 및 생장에 대한 항생제 효과

npt II 유전자가 삽입된 형질전환체 (이하 *npt II* 형질전환체)와 대조식물체의 잎절편에 항생제 kanamycin을 0, 10, 50, 100, 500 mg/L 농도별로 처리한 MS 배지에서 3주간 캘러스를 유도한 후 kanamycin 효과를 검정한 결과는 figure 2와 같다. 형질전환체의 잎절편에서는 100 mg/L의 농도에서도 캘러스가 형성되어 성장하였으나 대조식물체에서는 10 mg/L에서 캘러스 형성을 보였을 뿐 50 mg/L부터는 캘러스가 형성되지 않았다. 반면 형질전환된 조직에서는 kanamycin을 100 mg/L까지 처리했을 때도 10개의 엽절편 모두에서 캘러스가 형성되었다. 그러나 *npt II* 형질전환체의 경우도 kanamycin 농도를 500 mg/L로 증가시켰을 경우에는 캘러스가 전혀 형성되지 않았다. Kanamycin의 농도가 100 mg/L에서도 이렇게 형질전환체의 캘러스 형성률이 높게 나타나지만 엽절편이나 줄기절편을 이용하여 형질전환할 경우 이 농도에서의 캘러스 형성률은 통상 5% 이하로 나타나고 있어서 세포단위로서의 저항성과 조직으로서의 저항성이 차이가 있는 것으로 추정된다. 그러나 이 외에도 형질전환시 조직의 상처 등으로 세포가 스트레스를 받고 있으며 도입된 유전자의 발현 등이 안정되지 못한 점을 감안한다면 초기의 선발농도는 낮을 수밖에 없을 것으로 생각된다.

캘러스의 무게 (생중량)를 이용한 생장 추정 실험 (Figure 1-A)에 의하면 형질전환 식물체가 대조식물체에 비해 영향을 덜 받고 있으나 역시 kanamycin의 농도가 증가함에 따라 생장이 위축되고 있음이 확인되었다. 이것은 세포 내 *npt II* 효소의 함량이 과량의 kanamycin을 무력화시키는 데는 충분하지 않기 때문일 수 있다. Nutter 등 (1987)은 인산화된 kanamycin도 고농도로 존재할 때는 세포에 유독하다고 밝히고 있다.

hpt 유전자를 삽입시킨 형질전환 식물체와 대조식물체의 엽절편을 항생제 hygromycin을 0, 2, 5, 10, 50 mg/L의 농도별로 첨가한 MS배지에서 3주간 캘러스를 유도하여 생장시킨 결과는 figure 3과 같다. *hpt* 유전자가 삽입된 형질전환체는 처리된 최고 농도인 50 mg/L의 hygromycin에서도 왕성한 캘러스 형성과 생장을 보인 반면 대조식물체는 가장 낮은 농도인 2 mg/L에서만 아주 미미한 캘러스 형성을 보여 *hpt* 유전자가 *npt II* 유전자보다 더 강력한 선발 표지임을 확인할 수 있었다 (Figure 1-B). 형질전환체의 경우 50 mg/L hygromycin을 처리한 경우에도 활발한 캘러스 형성과 생장이 관찰되었다.

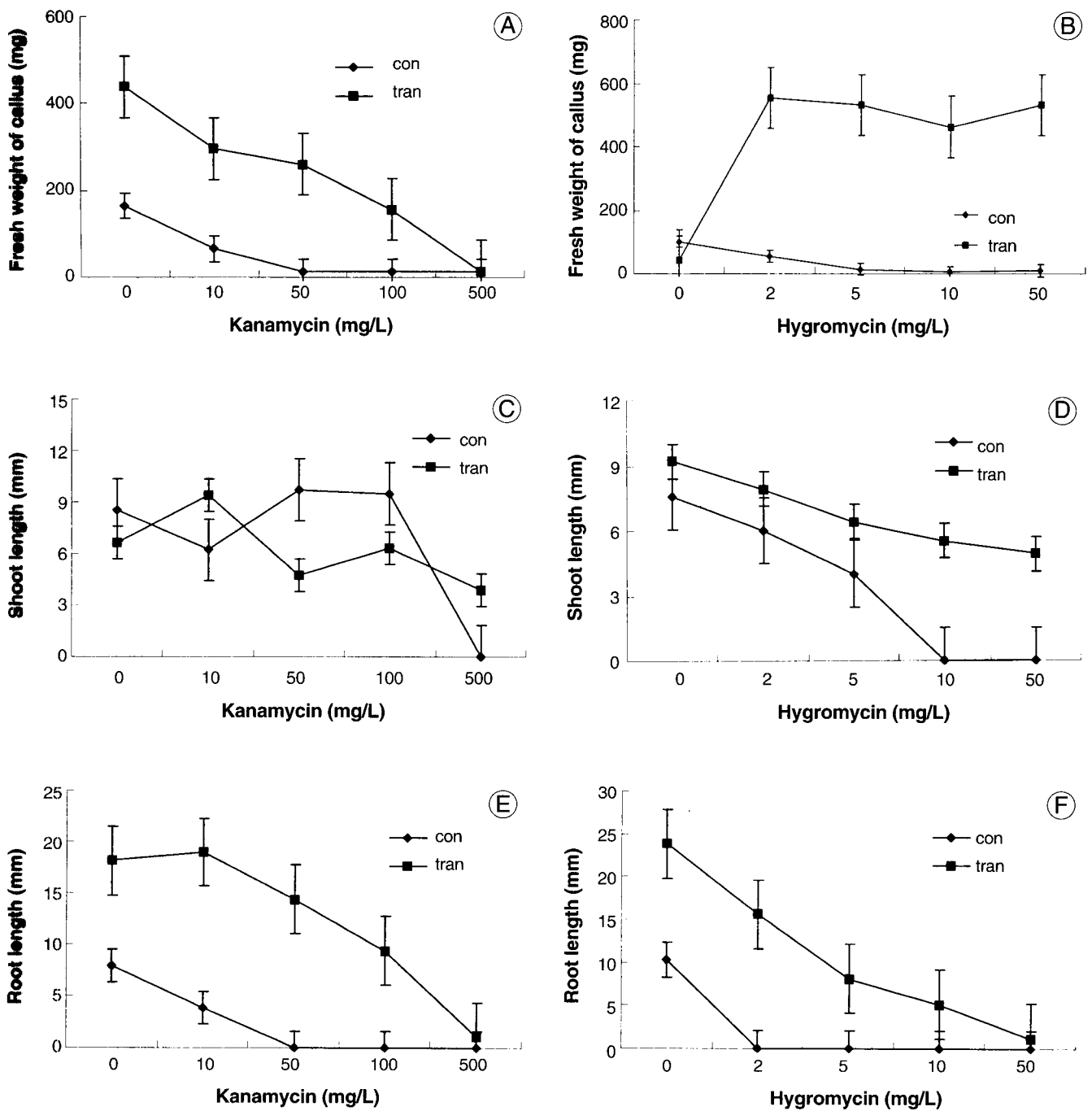


Figure 1. Effect of kanamycin or hygromycin on the growth of transgenic poplar. A: Callus growth from leaf disks of *npt II* transformed plants on varying levels of kanamycin, B: Callus growth from leaf disks of *hpt* transformed plants on varying levels of hygromycin, C: Shoot growth from stem segments of *npt II* transformed plants on varying levels of kanamycin, D: Shoot growth from stem segments of *hpt* transformed plants on varying levels of hygromycin, E: Root growth from stem segments of *npt II* transformed plants on varying levels of kanamycin, F: Root growth from stem segments of *hpt* transformed plants on varying levels of hygromycin.

따라서 형질전환체의 선발은 2 mg/L이면 가능한 것으로 나타났다. 이 농도는 10~50 mg/L라는 다른 식물에서 보고된 선발농도보다 훨씬 낮은 농도로서 현사시의 잎조직이 hygromycin에 매우 민감함을 나타낸다 (Lambe et al. 1995; Tian et al. 2000).

대조식물체와 비교할 때 *npt II* 형질전환체가 kanamycin에 대한 저항성을 나타내는 것보다 *hpt* 형질전환체의 조직이 더

hygromycin에 대한 저항성이 강하다는 것이 확인되어 kanamycin보다 hygromycin이 더 확실한 선발표지임을 확인하였다. Monika 등 (1991)도 콩의 형질전환에서 hygromycin을 이용하여 선발할 경우가 kanamycin을 선발제로 사용할 경우보다 더 효율적인 선발을 할 수 있다고 보고하고 있다. 따라서 kanamycin으로 선발이 어려운 식물의 경우는 표지를 *hpt* 유전자로 이용하여 hygromycin에서 선발하는 것이 바람직할

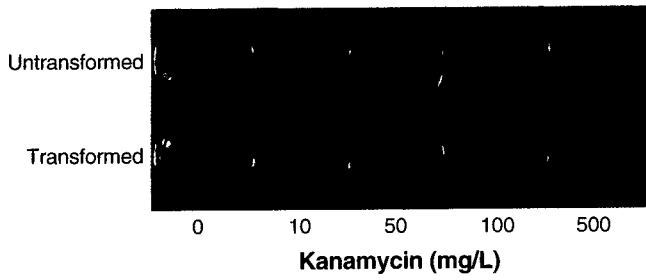


Figure 2. Effect of kanamycin on the leaf discs of *npt II* transformed *Populus alba* × *P. glandulosa* after 3 weeks on callus inducing medium.

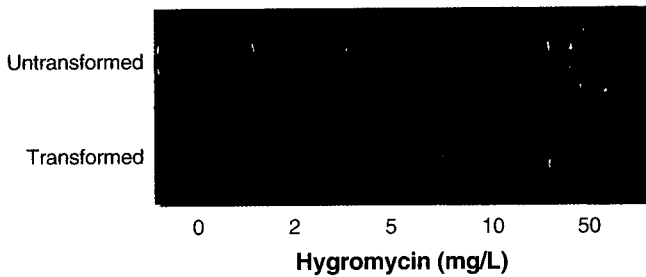


Figure 3. Effect of hygromycin on callus formation from the leaf discs of *hpt* transformed *P. alba* × *P. glandulosa* after 3 weeks on callus inducing medium.

것으로 생각된다. 이렇게 hygromycin이 훨씬 더 효율적인 이유는 이들이 세포내 소기관뿐만 아니라 핵의 단백질 translocation도 방해하기 때문으로 생각된다 (Tanaka 1975).

형질전환체의 액아 성장에 미치는 영향

Kanamycin이 액아가 포함된 줄기조직에서 개아 및 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조식물체는 kanamycin 100 mg/L 농도까지에서 개아되었으나 형질전환체는 500 mg/L에서도 개아되고 줄기도 성장하였다. 그러나 대조식물체의 액아가 100 mg/L라는 고농도의 kanamycin배지에서 정상적으로 개아는 되었다고 하지만 잎과 줄기는 황색을 띠고 있었다. 항생제 처리조직에서 이러한 대조식물체의 줄기발생은 새로운 세포분열이 동반된 것이 아니고 액아 안에 감추어진 줄기, 잎 등이 확장되면서 나타난 결과로 생각된다. 이러한 현상은 초본식물을 이용한 형질전환체의 차대 유전검정이나 종자를 이용한 형질전환실험에서 모든 종자가 발아하는 하지만 형질전환체만 녹색으로 성장하고 비형질전환체는 황색으로 발아하다가 고사하는 것과 같은 현상이라고 할 수 있다 (Feldmann and Marks 1987). 따라서 이러한 액아를 이용한 선발은 더 높은 농도의 처리나 본 실험의 3주보다 훨씬 더 긴 기간 동안 조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 본 실험 결과 액아가 포함된 절간조직을 이용할 경우 줄기생장 배지보다는 캘러스 유도 배지를 이용하여야 더 정확한 진단을 할 수 있

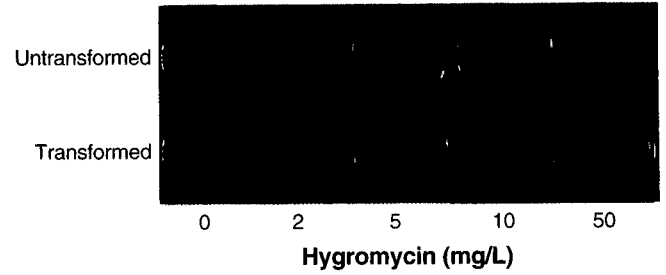


Figure 4. Effects of hygromycin on bud burst and shoot growth from the nodes of *hpt* transformed *P. alba* × *P. glandulosa* after 3 weeks on shoot inducing medium.

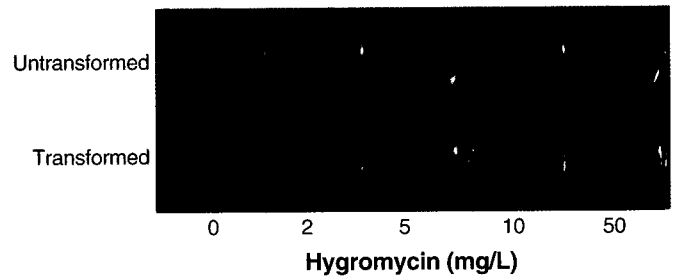


Figure 5. Effects of hygromycin on the nodes of *hpt* transformed *P. alba* × *P. glandulosa* after 3 weeks on root inducing medium.

음이 확인되었다.

줄기의 길이를 측정된 결과 3주 배양기간 동안 kanamycin 100 mg/L까지는 대조식물체의 줄기생장에 별 영향을 주지는 않았지만 figure 1-C에서 보여 주는 것과 같이 농도가 500 mg/L의 고농도에서는 *npt II* 형질전환체가 나온 것을 확인할 수 있었다. 그러나 100 mg/L까지는 별 차이가 없이 나타나고 있는데 이는 세포분열의 결과가 아닌 세포확장의 결과로 해석된다. Norell과 Aldwinckie (1993)는 *npt II* 유전자를 선발 표지로 한 형질전환된 사과조직이 kanamycin에 대하여 10~100 mg/L 농도 사이에서 일정치 않은 선발효과가 있음을 보고하고 있는데 이는 이 항생제가 조직의 종류에 따라 그 효과가 달리 나타남을 암시한다.

Kanamycin과는 달리 hygromycin의 경우 대조식물체는 5 mg/L에서도 줄기가 거의 발생되지 않았다 (Figure 4). 따라서 hygromycin이 캘러스 유도 및 성장 억제뿐만 아니라 액아발생 억제에서도 kanamycin보다 훨씬 강력하다는 것을 보여준다. 또한 엽절편과 비교할 때 줄기의 액아가 역시 항생제에 강하다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 항생제들이 배지에서 줄기조직을 거쳐서 액아에 이르는 동안 조직과 세포 내의 여러 물질과 반응하거나 부착되어 이동이 느려지거나 희석되기 때문으로 생각된다. 그러나 이러한 효과는 시간이 지날수록 없어지기 때문에 배양기간이 충분할 경우 형질전환되지 않는 세포나 조직은 도태될 것으로 생각된다. 줄기의 길이 생장도 대조식물체보다 *hpt* 형질전환체가 더 좋은 것

으로 나타났다 (Figure 1-D). 두 항생제의 액아 성장에 대한 효과를 비교한 결과 kanamycin은 그 효과가 hygromycin에 비해 반복성이 떨어지고 있는 것이 확인되었다.

뿌리 형성에 미치는 영향

Kanamycin 첨가배지에서 3주간 성장시킨 대조식물체의 줄기조직은 kanamycin 10 mg/L의 농도까지는 뿌리가 발생되지만 50 mg/L에서는 억제되는 것을 볼 수 있었으며 npt II 형질전환체는 100 mg/L의 kanamycin에서도 발근이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Data not shown). 이미 형성되어 있던 눈이 확장되어 터지는 액아생장과는 달리 뿌리형성은 새로운 세포분열이 선결조건이므로 여기에는 항생제에 대한 내성이 생장의 중요한 관문이라고 할 수 있다. 이러한 경향 때문에 뿌리형성이 캘러스 유도 및 성장과 기본적으로 같은 감수성을 보이는 것으로 생각된다.

뿌리 길이를 조사한 결과 액아에 비해 뿌리는 감수성이 높은 것으로 나타나고 있다. Figure 1-E에 나타난 바와 같이 저농도의 kanamycin으로도 형질전환체와 대조식물체의 구분이 가능하였다. 농도가 증가될수록 형질전환체의 성장도 감소되는 것은 잎절편 배양시 형질전환체의 무게 감소와 같은 이유 때문이라고 생각된다. 이는 앞에서 언급한 바와 같이 뿌리신장이 세포분열을 동반하기 때문에 이 과정에서 항생제에 대한 내성이 필요하며 이러한 항생제가 세포내 다른 대사작용에도 영향을 미치기 때문으로 생각된다.

Hygromycin 저항성의 경우 2 mg/L의 저농도로 첨가한 배지에서 대조식물체는 뿌리가 형성이 되지 않았으나 hpt 형질전환체는 10 mg/L 첨가한 배지에서도 뿌리가 발생하였다 (Figure 5). 뿌리의 길이 성장도 마찬가지로 대조식물체는 2 mg/L의 hygromycin에서도 거의 뿌리가 나오지 않았으며 hpt 형질전환체는 꾸준히 성장됨이 관찰되었다 (Figure 1-F).

뿌리의 길이 성장에 대한 kanamycin과 hygromycin의 효과를 비교한 결과 hygromycin이 kanamycin보다 훨씬 더 효

율적으로 작용하는 것을 확인하였다. Figure 6은 hygromycin과 kanamycin이 모두 꾸준함을 보이는 하지만 hygromycin은 낮은 농도에서도 선발표지로서 더 효과적으로 작용함을 나타내고 있다.

이와는 달리 액아의 생장은 단기간 혹은 100 mg/L 이하의 저농도를 사용할 경우 신뢰할 수 없음이 확인되었고 액아를 이용한 형질전환은 선발의 한계 때문에 효율이 매우 낮을 것으로 생각된다.

적 요

본 실험은 npt II 및 hpt 유전자가 삽입된 현사시나무를 이용하여 각 항생제 저항성 유전자로 형질전환된 세포의 효율적인 선발 조건을 규명하기 위하여 수행되었다. 액아가 포함된 줄기절편과 잎절편 조직의 성장, 발근 유도, 캘러스 유도로 항생제에 대한 감수성에 대한 효과를 검정하였다. 형질전환되지 않은 대조식물체의 잎절편을 이용한 경우 50 mg/L의 kanamycin이나 2 mg/L hygromycin으로 캘러스 유도 및 성장을 억제할 수 있었으나 형질전환된 식물은 100 mg/L kanamycin, 50 mg/L hygromycin에서도 왕성한 성장을 나타냈다. 절간조직의 개아의 경우 100 mg/L kanamycin, 5 mg/L hygromycin으로 줄기신장을 완전히 억제 가능하였으며, 뿌리유도는 50 mg/L kanamycin, 5 mg/L hygromycin에서 선발이 가능하였다. 형질전환체는 모두 이보다 높은 농도에서 왕성한 성장을 보였다. 형질전환이 되지 않은 세포의 성장을 억제하는 데는 hygromycin이 kanamycin보다 더 효율이 좋은 것으로 나타났다. 따라서 hpt 유전자가 npt II 유전자보다 훨씬 강력한 선발표지임이 확인되었으며 잎절편의 캘러스 유도와 성장과 절간조직의 발근유도 모두 항생제에 예민하게 작용하여 형질전환체의 식별에 효과적으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

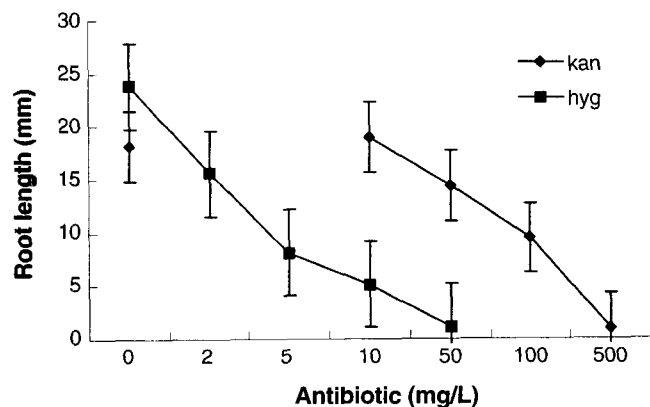


Figure 6. Effect of different antibiotics on root growth after 3 weeks on root inducing medium (kan: kanamycin hyg: hygromycin).

인용문헌

양덕춘, 이계연, 유영욱, 최경화, 임학태 (1997) 형질전환된 고추 (*Capsicum annum* L.) 식물체의 Mouse Adenosine Deaminase 유전자 발현. 식물조직배양학회지 24:37-41

Beckker D. 1990. Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. Nucl Acid Res 18:203

Confalonieri MA, Balestrazzi S, Bioffi and Cella R (1995) Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in several black poplar clones. Plant Cell Tissue Org Cult 43:215-222

Feldmann KA and Marks MD (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. Mol Gen Genet 208:1-9

- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissing B, Comai L** (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol Gen Genet* **206**:192-199
- Gresshoff PM, Doy CH** (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* **107**:161-170
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichlols D, Rogers SG, Fraley RT** (1984) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **223**:263-270
- 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
- Lambe P, Dinant M, Matagne RF** (1995) Differential long-term expression and methylation of the hygromycin phosphotransferase (*hpt*) and β -glucuronidase (*GUS*) genes in transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum*) callus. *Plant Sci* **108**:51-62
- Lloyd G, McCown B** (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain-laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip-culture. *Proc Int Plant Prop. Soc* **30**:412-427
- Monica M, Rempel LH, Jackson JA, Balisclici DS, Shaun L, Hobbs A** (1991) Optimizing the production of transformed pea (*Pisum sativum* L.) callus using disarmed *Agrobacterium tumefaciens* Strains. *Plant Cell Rep* **9**:479-483
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Noh EW, Lee JS, Lee JH, Han MS, Noh ER** (1996) Biodegradable plastic production from poplars by biotechnology. In: Environmental and social issues in poplar and willow cultivation and utilization. IPC, Budapest, Hungary. p380-385
- Nutter R, Everett N, Pierce D, Panganiban L, Okubara P, Lachmansingh R, Mascarenhas D, Wecch H, Metter I, Pomeroy L, Johnson J, Howard J** (1987) Factors affecting the level of kanamycin resistance in transformed sunflower cells, *Plant Physiol* **84**:1185-1192
- Tanaka N** (1975) Aminoglycoside antibiotics In: Antibiotics III: mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. (eds) JW Corcoran and FE Hahn. Springer-Venlag, New York
- Tian LN, Chares PJ, Seguin A, Rutledge RG** (2000) Hygromycin resistance as an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). *Plant Cell Rep* **19**:358-362
- Tzfira T, Jensen CS, Vainstein A, Altman A** (1997) Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. *Physiol Plant* **99**:554-561

(접수일자 2001년 8월 7일)