

## 담배 형질전환 식물체를 이용한 $\gamma$ -Benzenehexachloride의 분해

이정경, 박순기<sup>1</sup>, 정일경\*

대구가톨릭대학교 자연대학 생명자원학부, <sup>1</sup>경북대학교 농과대학 농학과

### The $\gamma$ -Benzenehexachloride Degradation Using Transgenic Tobacco Plant

Jeong-Kyung Lee, Soon-Ki Park<sup>1</sup>, Il-Kyung Chung\*

Faculty of Life Resources, Catholic University of Daegu, Kyungsan 712-702, Korea

<sup>1</sup>Division of Plant Bioscience, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

**ABSTRACT** LinA gene involving in the  $\gamma$ -benzenehexachloride degradation have been cloned from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. This linA gene which catalyzes the first dechlorination step of  $\gamma$ -benzenehexachloride is known to play a key role in the  $\gamma$ -benzenehexachloride degradation pathway in UT26. In this study, the linA gene was designed to clean-up the  $\gamma$ -benzenehexachloride and its derivatives contaminated in soil, water and air using transgenic tobacco plants. The linA transgene was introduced into the chromosome of tobacco using leaf-disk transformation approach as revealed by Southern blot analysis. In addition, mRNA and protein produced by linA gene was expressed at a high level in the leaf tissue as demonstrated by both northern blot analysis and Western bolt analysis with polyclonal antibody against *S. paucimobilis* UT26. *In vitro* analysis using GC-MS showed that transgenic tobacco plant produced the linA protein which effectively degraded  $\gamma$ -benzenehexachloride into  $\gamma$ -pentachlorocyclohexene and 1,2,4-trichlobenzene compounds which are less toxic.

**Key words:** *Sphingomonas paucimobilis* UT26, transgenic tabacco,  $\gamma$ -BHC, LinA, *Agrobacterium*

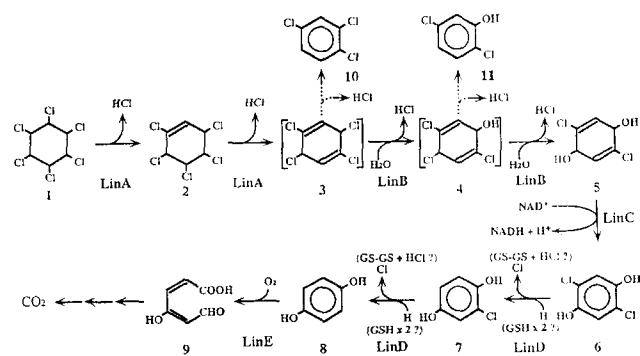
## 서 론

토양은 식물 생산의 기반으로서 가장 중요한 역할을 하고 있으며, 인간이 정착생활을 하고 농경을 시작한 이래로 인간 생활과 토양은 아주 깊은 관계를 가져 왔다. 토양 오염이 지금까지는 농경지 및 산림에만 국한되어 거론되어 왔으나, 최근에는 대기, 수질, 폐기물 등의 환경오염이 최종적으로는 토양환경오염으로 연결됨이 밝혀졌다. 지금까지 농작물의 생산성 향상을 위해 많은 종류의 농약이 사용되어 왔다. 농약은 그 사용한 양의 다소에 관계없이 그 자체의 독성으로 인해 동·식물 및 인간에게 많은 부정적 영향을 미칠 뿐 아니라, 잔류성으로 인해 토양오염의 원인이 되고 있다. 토양오염에서

가장 문제시되어 온 유기염소계 농약은 benzenehexachloride (BHC)나 aldrin과 같이 환상구조를 가지는 것과, dichlorodiphenyl-trichloro-ethane (DDT)와 같이 diphenyl 구조를 가지는 화합물로 나누어지며 (Figure 1), 이와 같은 유기염소계 살충제는 토양-식물-가축-인간이라는 사슬을 통해 농축된다. 특히 모유로부터 고농도의 유기 염소계 살충제가 육아에게 옮겨져 농축되는 것이 확인되고 있다. 태평양과 대서양상에서 채취된 시료에서 대기, 지표 및 수중으로부터 유기염소계 농약인 DDT 혹은 BHC가 고농도로 검출되었고, 또한 발트해에서 생식하는 해조, 수중 생물에서도 고농도의 오염 물질이 검출되고 있으며, 우리나라의 토양과 강에서도 유기염소계 농약의 잔류성이 심각한 문제로 대두되고 있다 (Bachmann et al. 1988; Bhunya and Jena 1992).

BHC의 화학명은 1,2,3,4,5,6-hexachloro-cyclohexane (HCH)이며, 1825년 최초 합성된 이래, 4개의 BHC 이성체가 분리되었고 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -BHC) (Aldrich and Chakrabarty 1988), 강한 살

\*Corresponding author Tel 053-850-3178 Fax 053-850-3178  
E-mail chungik@cuth.cataegu.ac.kr



**Figure 1.** Proposed degradation of BHC in *Spingomonas paucimobilis* UT26. 1,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH,  $\gamma$ -BHC); 2,  $\gamma$ -pentachlorocyclohexene ( $\gamma$ -PCCH); 3, 1,3,4,6-tetrachlorocyclohexane ( $\gamma$ -PCCH); 4, 2,4,5-trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol (2,4,5-DNOL); 5, 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol (2,5-DDOL); 6, 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ); 7, 2-chlorohydroquinone (2-CHQ); 8, hydroquinone (HQ); 9,  $\gamma$ -hydroxymuconic semialdehyde ( $\gamma$ -HMSA); 10, 1,2,4-trichlobenzene (1,2,4-TCB); 11, 2,5-dichlorophenol (2,5-DCP)

충력과 DDT보다도 저렴한 생산비용 및 광범위한 해충에 대한 방제효과로 인해 2차 세계대전 이후 세계 여러 나라에서 다량으로 생산되어 농업적 목적과 보건적 측면에서 살충제로 사용되었다. 그러나 인체에 축적되고 유해성 (강한 변이원성과 암원성) 및 환경에서의 잔류성이 지적되어 FAO와 WHO에서는  $\gamma$ -BHC의 허용 섭취량을 0.88 mg/70 kg man/day 이하로 규정하고 있다 (Bedard et al. 1987). 선진국에서는 이미 사용과 합성이 금지되었으며 1979년 이후부터 우리나라에서도 전면적으로 사용이 금지되었다 (Bachmann et al. 1988; Bhunya and Jena. 1992; Nagata and Miyauchi. 1996). 그러나 이러한 독성과 잔류성에도 불구하고 중국, 인도, 러시아 등의 개발도상국에서는 경제적 이유로 현재까지 사용되고 있다. 최근 저위도의 열대지역에서 사용된 BHC의 거의 대부분은 상승기류를 타고 대기 중에 확산되어 고위도 지역에 내려지고 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 현재에도 BHC에 의한 환경오염은 전 지구에 확산되는 추세이며 조속히 해결해야 할 과제로 대두되고 있다.

1974년  $\gamma$ -BHC가 살포된 실험포장에서  $\gamma$ -BHC를 탄소원으로 이용하여 호기적으로 자화시키며 생존하는 미생물이 선발되었다 (Ahmed and Focht 1993; Imai et al. 1989a, 1989b, 1991). 이 미생물은 *Spingomonas paucimobilis* UT26으로 명명되었고 (Bachmann 1988; Bhunya and Jena 1992; Imai 1989a; Nagata et al 1993; Nagata and Miyauchi 1996), 약 25년 간에 걸쳐서  $\gamma$ -BHC를 분해하는 경로에 관계되는 효소 및 유전자가 분리 정제하게 되었다 (Eisher et al. 1978; Franklin et al. 1981; Frey and Krisch 1985). Figure 1은 *S. paucimobilis* UT26 내에서  $\gamma$ -BHC의 분해경로를 보여주고 있다.  $\gamma$ -BHC는 linA 단백질의 작용으로 HCl을 방출함과 동시에 5개의 Cl기를 가진  $\gamma$ -pentachlorocyclohexene ( $\gamma$ -PCCH)와 1, 2, 4-

trichlobenzene (1, 2, 4-TCB)와 같은 비교적 독성이 약한 화합물로 분해시킨다. 이 화합물은 linB 단백질의 작용으로 HCl을 방출함과 동시에 2, 5-dichloro-2, 5-cyclohexadiene-1, 4-diol (2, 5-DDOL)로 분해시킨다 (Harayama et al. 1989; Imai et al. 1989b). 2, 5-DDOL 화합물은 linC 단백질의 작용으로 5-dichlorohydro-quinone (2, 5-DCHQ) 화합물로 변하고, 이 화합물은 linD 단백질의 작용으로 Cl기가 quinone에서 완전히 제거된 무독성화합물로 변한 뒤 최종적으로 linE 단백질의 작용으로 CO<sub>2</sub> 기체를 발생시킨다 (Imai et al. 1991, 1992).

본 연구는 유기염소계 농약과 같은 환경오염원을 자연 상태에서 분해시키기 위하여, 1)  $\gamma$ -BHC를 분해하는 첫 번째 단계의 효소인 linA 유전자를 독립영양식물인 담배 식물체에 도입, 2) 식물체 내에서 linA 유전자의 발현, 3) 형질전환된 식물체의  $\gamma$ -BHC를 흡수, 분해하는 능력의 조사를 통하여 유기염소계 농약이 오염된 토양, 수질 및 대기를 정화하는 데 이용하고자 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물체 형질전환용 벡터 제작과 담배의 형질전환

PCR 방법으로 증폭한 linA 유전자를 pUC118에 cloning 후, CaMV35S promoter를 연결한 벡터 pJK108 (Lee and Chung. 1999)으로부터 발현력을 강화하기 위해 CaMV35S promoter의 enhance부분과  $\Omega$  sequence를 포함하고 있는 promoter를 연결한 벡터 pIK108를 제작하였다. pIK108을 *E. coli* XL (Cohen et al. 1985)과 freeze-thaw 방법 (Paul and Hooykaas. 1988)을 사용하여 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)에 도입된 후, 담배의 형질전환 실험에 사용하였다.

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 종자를 MS배지에서 발아시킨 후 1개월 생육한 건전한 잎을 형질전환을 위한 재료로 사용하였다. 생장실에서 무균으로 배양한 담배 조직을 적당한 크기 (약 1 cm<sup>2</sup>)로 잘라서 재분화 hormone이 첨가된 액체 MS배지 (50 mL MS liquid media, BA 2.0 mg/L, IAA 0.2 mg/L, acetosylcon 20 mM)에 담그어 배양한 *Agrobacterium*과 28°C 암상태에서 2일간 co-culture시킨 후, 항생제 (kanamycin 300 mg/L, carbenicilin 500 mg/L)가 첨가된 재분화 배지 (BA 2.0 mg/L, IAA 0.2 mg/L)에 옮겼다. MS 선발배지는 10일마다 새로운 배지로 계대배양하였으며 kanamycin 내성을 가진 callus로부터 발생한 shoot를 발근 배지에 치상하여 순화시킨 후, 포장에서 재배하여 분석재료로 사용하였다.

### 형질전환 담배의 DNA, RNA 분석

형질전환 개체로부터 Brunel 등 (1992)의 방법에 의해 genomic DNA를 분리하였다. 어린 잎 1 g을 채취하여 1.5 mL

E-tube에 넣고 액체질소로 동결한 다음 마쇄한 후 extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) 600  $\mu$ L를 첨가한 후 플라스틱봉으로 분쇄하였다. E-tube에 20% SDS 40  $\mu$ L를 넣은 후 65°C에서 10분간 반응시킨 후 5 M potassium acetate 200  $\mu$ L를 넣고, -20°C에서 20분간 방치한 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취했다. RNA와 단백질을 제거하기 위해 RNase H 30 unit를 원심분리한 상층액에 넣고 37°C에 1시간 반응시켜 식물세포의 RNA를 분해시킨 다음 phenol 3회, chloroform/isoamylalcohol (24:1)에 1회 각각 정제하여 맑은 층을 취한 후 isopropylalcohol을 첨가하여 DNA 침전을 유도하고 -20°C에 30분 이상 total DNA를 침전시켰다. 12,000 rpm에 10분간 원심분리하여 pellet화된 DNA를 얻어 70% ethylalcohol에 1회 염분을 제거하고 상온에서 진공건조기로 건조시킨 후 이를 멸균수에 녹여 Southern 분석을 위한 재료로 사용되었다.

linA 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 PCR 방법으로 linA 유전자를 증폭하여 1%의 agarose gel 상에서 분리한 DNA 단편을 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP를 표식하여 Southern 분석을 위한 DNA probe로 사용하였다. 제한 효소 *Pst*I와 *Eco*RI로 절단된 형질전환 식물체의 DNA를 1%의 agarose gel에서 전기영동하여 분리한 후, nylon membrane (Amarsham Co.)에 옮겼다.

형질전환된 담배로부터 RNA를 분리하기 위해, 잎조직 1 g을 액체질소로 급속 냉동시킨 후 마쇄하였다. 마쇄물을 RNA extraction buffer (4 M guanidinium isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarkosyl, 0.1 M mercaptoethanol)로 현탁한 후, 2 M sodium acetate (pH 4.0), water-saturated phenol과 chloroform/isoamylalcohol (24:1) 혼합액을 넣고 혼합한 후 12,000 rpm에 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후, 동일량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C, 1시간 동안 RNA를 침전시켰다. 10분간 원심분리 (12,000 rpm) 후, 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척, 건조 후 DEPC가 처리된 멸균수에 녹여 northern 분석용 시료로 사용하였다. 추출한 total RNA를 formaldehyde gel 상에서 전기영동하고, 이 gel을 DEPC 처리한 멸균수로 세척하여 formaldehyde를 제거한 후 nylon membrane (Amarsham Co.)으로 옮겼다. 이상의 DNA, RNA가 부착된 membrane들을 linA DNA 단편으로 제조된 DNA probe로 55°C에서 24시간 동안 hybridization시켰다. 반응을 마친 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

#### 형질전환 담배의 Western 분석

형질전환된 담배의 잎조직 1 g을 채취하여 액체질소로 급속 냉동시켜 마쇄 후 protein extraction buffer (phosphate buffer, pH 7.6)로 현탁하여 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이를 단백질 정량한 후, Western blot에 사용하였다. 20  $\mu$ g의 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동을 수행하였다.

#### 기내에서 $\gamma$ -BHC의 탈염소화 반응 및 linA 단백질의 활성 측정

형질전환된 담배잎 조직의 세포추출물을 100  $\mu$ L의 분석용액 (5 ppm  $\gamma$ -BHC의 W medium)과 현탁시킨 후, 현탁액을 30°C에서 10~30분 배양하였다. 이 현탁액에 100  $\mu$ L ethylacetate를 첨가하여 3분 동안 vortex로 충분히 혼합하였다. 이후 원심분리 (10,000  $\times$ g, 3 min)하고, ethylacetate를 첨가하였다. 1  $\mu$ L의 세포추출물을 gas chromatography로  $\gamma$ -BHC의 탈염소화 정도를 측정하였다.

단백질의 활성은 GC분석기와 GC-mass spectrometry을 이용하여 분석되었다. GC 기기 (Hitachi 263-30, Japan)에는 electron capture  $^{63}$ Ni detector에 glass column (2.6 mm, 2 m)과 silicon OV17 (at 2% on 80/100-mesh Chromosorb W)가 충전된 column을 사용하였다. Column의 주입온도는 각각 175°C와 250°C이며, 가스는 50 mL/min으로 흐르게 하였다. GC-MS spectrometry 분석은 JMS DX303 (JEOL Ltd.)와 OV-1 capillary column (0.25 mm, 25 m)을 이용하였다. Column의 온도는 16°C/min 증가로 120°C에서 250°C로 높였다. Electron impact mass spectrometry는 70-eV ionization potential, 300- $\mu$ A trap current와 200°C ion source 온도로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

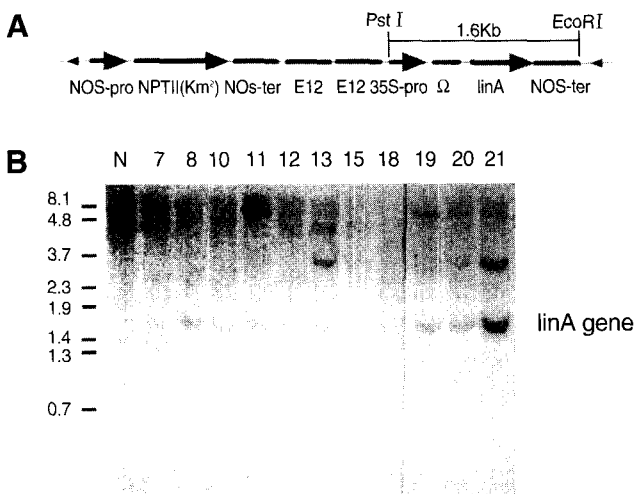
### linA 유전자를 이용한 식물형질전환용 vector의 제작

linA 유전자는 465 bp가 code하는 155개의 아미노산로 구성된 유전자로서, 17 kDa의  $\gamma$ -BHC 탈염소효소를 생성케 한다 (Harayama et al. 1989; Imai et al. 1991). 미생물의 유전자를 식물체내에 효율적으로 발현시키기 위하여, linA 유전자의 단백질 개시 codon인 ATG로부터 상류영역에 8개의 염기를 포함한 plasmid를 제작하였다. Oligonucleotide를 이용한 PCR 반응에 의해 얻어진 linA 유전자를 pUC118 plasmid에 클로닝하였다. PCR 반응 중 중합효소인 Taq polymerase의 잘못된 중합 효과에 의해 발생하는 염기서열의 변화를 제거하기 위하여 automatic sequencer를 이용하여, plasmid DNA의 linA sequence를 최종 확인하였다. 이렇게 DNA sequence가 확인된 plasmid DNA를 양쪽 linker *Bam*HI와 *Sac*I로 절단, 연결시킨 후, 식물체 형질전환용 expression promoter로 제작되었다. pCaMV35S promoter의 발현력을 높이기 위하여 CaMV35S promoter의 일부와 두 종류의 enhancer 영역과  $\Omega$  sequence을 포함한 식물 형질전환용 벡터 (pIK108)를 제작하였다 (Lee and Chung 1999). 이들 벡터는 freeze-thaw method에 의해 *Agrobacterium*에 도입되었다. 식물체 담배에 형질전환 실험을 수행하기 이전에, pIK108이 삽입된 *Agrobacterium*의 세포추출물과  $\gamma$ -BHC용액을 혼합하여 배양한 후  $\gamma$ -BHC의 분해율을 조사한 결과, 약 10배의 linA 단백질이 생산됨이 확인되었다.

(Lee and Chung 1999).

linA 유전자가 도입된 형질전환 담배의 선발

pIK108 박테가 도입된 *Agrobacterium*을 leaf disk transformation 방법에 의해 담배 Xanthi 품종에 형질도입하였다. 약 300개의 leaf disk에 *Agrobacterium*을 감염시켜 200개의 leaf disk에서 kanamycin 내성 (300 mg/L) callus를 얻었다. callus에서 재분화된 shoot에서 190개의 형질전환체를 선발하였다. 이들 식물체의 염색체 DNA를 추출하여 linA 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 담배 염색체내에 삽입된 유전자를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환체가 아닌 담배의 total DNA에서는 DNA 증폭이 일어나지 않은 반면, 형질전환 개체들에서는 0.7 kbp의 증폭된 DNA 밴드가 관찰되었다 (결과 미제시). 이는 *Agrobacterium* total DNA에서 증폭된 DNA 밴드와 동일한 크기임이 확인하였다. PCR 분석에서 1차 확인된 형질전환 식물체들의 total genomic DNA를 분리하여 linA 유전자를 probe로 사용하여 Southern 분석을 시도하였다. 조사된 형질전환체 11개 중 8개체 (Sample No. 8, 10, 11, 12, 13, 19, 20, 21)로부터 1.6 kb 위치에서 linA 유전자와 결합하는 밴드가 관찰함으로써, 식물체의 염색체 내에 linA 유전자가 안정된 구조로 도입되었다는 사실을 확인하였다 (Figure 2).



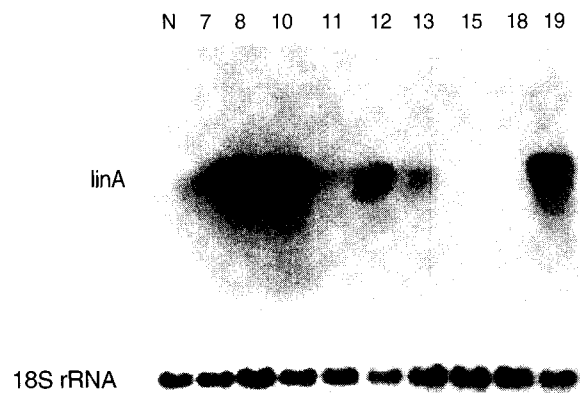
**Figure 2.** Construction map of pIK108 and detection of a transgene in tobacco transgenic plants. A, Map of pIK108 containing an intact linA gene. The 1.6 kbp fragment which was generated from *Pst*I and *Eco*RI digestion of plasmid DNA was used as the hybridizing probe. B, DNA blot analysis. Total leaf DNA from individual plants (Sample No. 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 21) digested with *Pst*I and *Eco*RI were hybridized to radiolabelled linA fragment. Lane N: untransformed plant.

형질전환 식물체에서 linA 유전자의 발현

식물체의 염색체 내에 안정된 구조로 도입된 linA 유전자가 식물체내에서 정상적으로 전사되는지의 여부를 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 total RNA를 추출하여 linA 유전자를 probe로 사용하여 northern 분석을 수행하였다. 비형질전환체인 정상개체에서는 linA 유전자 유래의 전사산물이 검출되지 않은 반면, Southern 분석에서 linA 유전자의 도입이 확인된 식물체 (Sample No. 8, 10, 11, 12, 13, 19)에서는 전사체의 발현이 확인되었다 (Figure 3). 그러나 이들 형질전환 개체의 앞에서 동일한 양의 RNA (5 µg)를 분석하였을 때 식물체 내에서 linA 유전자를 전사하는 능력은 각 식물체마다 약 10배 정도의 차이를 보였다. 또한 Southern 분석에 의해 linA 유전자가 염색체내에 도입됨이 확인되었으나 전사산물을 전혀 생산하지 않는 경우가 관찰되었다 (Sample No. 11). 이러한 사실은 도입된 유전자가 염색체상의 삽입된 위치에 따라 전사능력은 현저히 차이가 보이는 “position effect”에 기인하는 것으로 여겨진다. 그러므로 figure 3의 형질전환 개체 8, 10, 12, 19에서는 전사활성 영역에 linA 유전자가 안정하게 도입되었고, 11은 centromere나 telomere 부근에 linA 유전자가 도입되어 linA 유전자에 대한 mRNA의 전사능력이 없어진 것으로 추측된다.

형질전환 담배에서 linA 단백질의 발현

linA 유전자의 전사능력을 확인한 형질전환 식물체에서 미생물 유래의 유전자가 식물체내에서 linA 단백질을 정확하게 발현하는지에 대한 여부를 조사하였다. 형질전환 식물체의 잎 조직을 마쇄하여 단백질을 추출 (20 µg)한 후, *S. paucimobilis* UT26 유래의 anti-linA polyclonal 항체와 반응시켜 Western 분석을 수행하였다. 정상개체에서는 linA 단백질의 항체와 결합

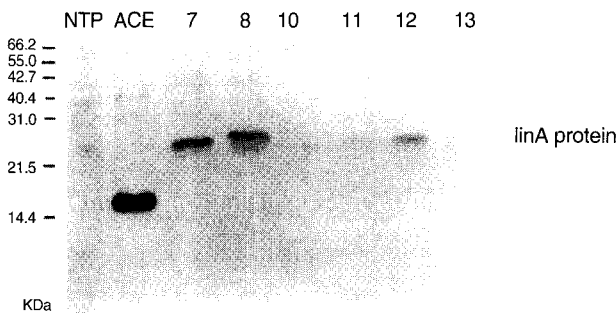


**Figure 3.** Northern analysis of transgenic plants. 5 µg of leaf RNA from individual plants (Sample No. 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19) was loaded. The amount of RNA loaded each lane is represented by the amount of 18S ribosomal RNA. Lane N: untransformed plant.

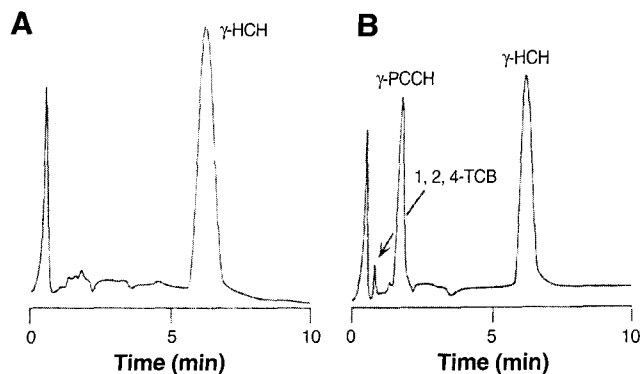
하는 밴드가 확인되지 않았으나 (Figure 4의 lane NTP), positive control로 사용된 *Agrobacterium*의 세포추출물과의 반응에서는 17 kDa의 단백질이 확인되었고, 형질전환 식물체에서는 단백질의 크기가 증가된 약 28 kDa의 밴드로 나타났다 (Figure 4). 발현되는 단백질의 크기가 변하는 현상은 미생물 유래의 linA 유전자 내에 식물의 golgi에서 인식될 수 있는 glycosylation site인 "N-X-S/T" site가 존재하는 것으로 보아 식물체 내에서 당의 수식을 받아 단백질의 크기가 변한 것으로 추측한다.

한편 figure 3에서 나타난 형질전환 식물체 내에서의 linA 유전자에 대한 전사량과 figure 4에서 나타난 단백질의 발현량이 서로 일치하지 않는 것으로 나타났다 (Figure 3와 4의 7, 8번 식물체). 이러한 현상은 post-translational regulation 현상으로써 linA 단백질이 식물체 내에서 만들어지고 난 후 미지의 단백질 혹은 활성물질에 의해 수식을 받았을 가능성이 제기되었다.

Western 분석에서 변형된 크기의 linA 단백질이 탈염소화효



**Figure 4.** Detection of linA protein in transgenic tobacco plants using anti-linA polyclonal antibody. 30  $\mu$ g of total leaf protein from individual plants (Sample No. 7, 8, 10, 11, 12, 13) was loaded. Lane NTP: untransformed plant. Lane ACE: cellular protein of *Agrobacterium* containing linA gene. Protein size markers are indicated at left side.



**Figure 5.** Assay of the linA activity in the crude extracts from transgenic plants. A: untransformed plant as a negative control, B: transgenic tobacco plant containing linA gene.

소의 기능을 지니고 있는지에 대한 여부를 판단하기 위하여 이들 식물체들의 세포추출물을 이용하여 GC분석을 수행하였다. 형질전환 식물체에서 linA 단백질에 의해  $\gamma$ -BHC가  $\gamma$ -PCCH와 1,2,4-TCB로 분해되는 현상을 확인할 수 있었다 (Figure 5). 그러나 완성된 식물체로 순화되어 온실에서 약 1개월간 재배시간이 경과된 식물체에서 추출한 세포추출물에서는 이들 단백질이 점점 분해되는 현상이 관찰되었다 (결과 미제시). 이 현상은 형질전환체 내에서 다량으로 발현된 탈염소화효소인 linA가 식물체 내에 이미 내재하는 특정 단백질 분해효소에 의해 분해되기 쉬운 형태로 변형됨으로써 유발되었을 가능성이 있다. 혹은 3개월 이상 온실에서 성장한 식물체에서 광합성의 영향으로 만들어진 다당류들에 의해 linA 단백질의 작용이 저해되었을 가능성도 생각할 수 있다. 앞으로 이러한 문제점을 해결하기 위한 세포생물학적인 추가 연구의 진행이 이러한 의문점을 해결할 수 있으리라 생각한다.

## 적 요

본 연구는 난분해성 농약의 자연분해를 유도하기 위하여  $\gamma$ -BHC를 탄소원으로 이용하여 호기적으로 자화하는 미생물 (*Sphingomonas paucimobilis*)에서 분리된 탈염소화효소 중  $\gamma$ -BHC 분해의 첫단계에 관여하는 linA 유전자를 담배에 도입하여 BHC에 활성을 나타내는 형질전환 식물체를 만들었다. LinA 유전자를 함유한 pJK108 배터를 제작하여, *Agrobacterium*를 이용한 leaf disk transformation 방법으로 담배에 형질전환시켰으며, northern 분석 및 Southern 분석을 통해 형질전환 개체에서 linA 유전자의 도입과 linA 유전자 유래의 mRNA가 전사됨을 확인하였다. Western 분석에서 linA 단백질의 발현을 확인하였고, gas chromatography를 이용하여 담배 형질전환 개체에서 BHC가  $\gamma$ -PCCH와 1, 2, 4-TCB로 분해되는 것을 확인하였다.

사사 - 본 연구는 대구가톨릭대학교의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Ahmed MD, Focht D (1993) Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can J Microbiol* 19: 48-52
- Aldrich TL, Chakrabarty AM (1988) Transcriptional regulation, nucleotide sequence, and localization of the promoter of the catBC operon in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 170: 1297-1304

- Bachmann A, Walet P, Wijnen P, de Bruin W, Huntjens JLM, Roelofsen W, Zehnder AJB (1988) Biodegradation of alpha-and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl Environ Microbiol* 54: 143-149
- Bedard DL, Haberl ML, May RJ, Brennan MJ (1987) Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl Environ Microbiol* 53: 1103-1112
- Bhunya SP, Jena GB (1992) Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane ( $\gamma$ -BHC) : an *in vivo* study in chicks. *Mutat Res* 272: 175-181
- Brunel D (1992) An alternative rapid method of plant DNA extraction for PCR analyses. *Nucleic Acids Res* 20: 56-569
- Cohen SN, Miller CA, Tucker WT, Meacock PA, Gstafrsson P (1985) In plasmid in Bacteria. Plenum press, New York. pp. 383
- Eisher PR, Appleton JM (1978) Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. *J Bacteriol* 135: 798-804
- Franklin FCH, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromaticring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7458-7462
- Frey J, Krisch HM (1985) Omega mutagenesis in gram-negative bacteria: a selectable interposon which is strongly polar in wide range of bacterial species. *Gene* 36: 143-150
- Harayama S, Rekik M, Ngai I-L, Ornston LN (1989) Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via meta cleavage in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 171: 6251-6258
- Lee JK, Chung IK (1999) Study of  $\gamma$ -BHC degradation using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Appl Sci Res* 7: 57-65
- Imai R, Nagata Y, Fukuda M, Takagi M, Yano K (1991) Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol* 173: 6811-6819
- Imai R, Nagata Y, Fukuda M, Yano K, Takagi M (1992) Isolation and characterization of a dehydrochlorinase gene for the degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. In: Galli E, Silver S, Witholt B. (eds), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington. D.C., pp 292-300
- Imai R, Nagata Y, Senoo K, Wada H, Fukuda M, Takagi M, Yano K (1989a) Dehydrochlorination of  $\gamma$ -BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric Biol Chim* 53: 2015-2017
- Imai R, Nagata Y, Senoo K, Wada H, Fukuda M, Takagi M, Yano K (1989b) Dehydrochlorination of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -BHC) by  $\gamma$ -BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric Biol Chem* 53: 2015-2017
- Nagata Y, Nariya T, Ohtomo R, Fukuda M, Yano K, Takagi M (1993) Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* 175: 6403-6410
- Nagata Y, Miyauchi K (1996) Isolation and characterization of  $\gamma$ -5induce mutants of *Spingomonas paucimobilis* defective in 2,5-dichlorohydroquinone degradation. *Biosci Biotech Biochem* 60: 689-691
- Paul J, Hooykaas J (1988) *Agrobacterium* Molecular genetics. *Plant Molecular Biology Manual A4:1-13* Kluwer Academic Publishers, London

(접수일자 2003년 2월 15일, 수리일자 2003년 2월 24일)