

리그닌 생합성관련 유전자의 발현조절에 의한 고품질 목초 개발

우현숙 · 윤정우 · 이병현

Development of High Quality Forage Grass by Down-regulating Lignin Biosynthetic Gene

Hyun-Sook Woo, Jungwoo Yun and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

To develop a new variety of orchardgrass with improved digestibility, caffeic acid *O*-methyltransferase (*Dgcomt*), which is a methylation enzyme involved in the early stages of lignin biosynthesis, was isolated and characterized. *Dgcomt* was expressed not only in leaves but also in stems and roots. The expression levels of transcripts were high in stems and roots which are the most lignified tissues, and only moderate levels of transcripts were expressed in leaves. To develop transgenic orchardgrass plants by down-regulating the *Dgcomt* gene, an RNAi suppression vector with partial *Dgcomt* DNA fragment was constructed and transferred into the genome of orchardgrass via *Agrobacterium*-mediated gene transfer method. PCR and Southern blot analyses with genomic DNAs from putative transgenic plants revealed that the T-DNA region containing RNAi construct was successfully integrated into the genome of orchardgrass. Northern blot analysis revealed that the majority of the down-regulated transgenic lines showed significant reduction in *Dgcomt* gene expression. These RNAi transgenic orchardgrass will be useful for molecular breeding of new variety with improved digestibility by down-regulating lignin biosynthetic enzyme.

(Key words : COMT, Lignin, Transgenic orchardgrass, Forage digestibility)

I. 서 론

식물의 세포벽은 구조성 탄수화물 (cellulose, hemicellulose), 단백질, lignin 및 각종 페놀성 화합물로 구성된 복합체이다. 이들 세포벽 구성 성분 중 단백질은 반추동물의 반추위 내에서 직접 소화 분해되어 이용될 수 있으나, 그 외의 조섬유 성분은 직접 분해되지 못하고, 반추위 내의 미생물에 의해 분해되어져 부분적으로 소화가 가능하다. 그러나 lignin 성분은 소화가 전혀 불가능할 뿐만 아니라, 단백질, cellulose,

hemicellulose와 같은 소화가 가능한 세포벽 성분들을 감싸므로 소화작용을 방해한다. 따라서 lignin 함량이 많은 목초는 소화율을 감소시키고, 가용에너지 섭취를 저하시키며, 반추위 포만감만 증대시켜 건물섭취량을 감소시킴으로서 결과적으로 가축의 생산성을 감소시키는 결과를 초래한다. 그러므로 목초의 lignin 함량을 감소시킬 수 있다면 에너지 섭취율 증가에 따른 조사료의 영양가치 증가 뿐 아니라 가축의 생산성 증대효과를 기대할 수 있을 것이다.

경상대학교 농업생명과학대학, 응용생명과학부 (Division of Applied Life Science, College of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea).

Corresponding author: Byung-Hyun Lee, College of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Tel : +82-55-751-5418, Fax : +82-55-751-5410, E-mail : hyun@snu.ac.kr

반추위 내에서 목초의 건물소화율은 식물체의 노화 및 개화가 진행됨에 따라 10% 이상 감소한다(Stone, 1994). 이러한 건물소화율의 감소는 여름철 목초의 사료영양가치를 현저히 저하시키는 주된 요인이 되고 있다. 지금까지 목초 및 사료작물의 건물소화율을 증가시켜 영양가치를 향상시키기 위한 연구가 낙농 및 육우 산업에 있어서 가장 중요한 육종목표 중의 하나로 추진되어 왔다(Smith 등, 1997). 그러나 목초의 건물소화율에 관여하는 유전자들의 유전력이 낮을 뿐만 아니라, 많은 수의 유전자가 관여하고 있음으로 인해 교잡에 의한 전통적인 육종방법으로는 개량하는데 장기간이 소요되어져 왔다(Barns, 1990).

목초의 소화율을 감소시키는 가장 주된 요인 중의 하나는 목초의 생육과정에 있어서 숙기가 진행되는 동안 세포벽 lignin 함량 증가에 따른 목질화 때문으로 알려져 있으며(Buxton와 Russell, 1988), 이로 인해 목초의 건물소화율이 10% 이상 감소하는 것으로 알려져 있다(Stone, 1994). 식물 세포벽의 목질화 반응은 lignin과 lignin 전구체인 monolignols의 생합성 과정의 복잡한 대사경로를 통하여 조절 합성되며(Dixon 등, 1996), 아직도 그 경로가 완전히 밝혀지지 않은 상태이다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면 식물에 있어서 lignin은 coniferyl alcohol에서 유래한 guaicyl lignin (G-unit), sinapyl alcohol에서 유래한 syringyl lignin (S-unit), 및 *p*-coumaryl alcohol로부터 유래된 *p*-hydroxyphenyl lignin (H-unit)으로 구성되어 있으며 COMT 유전자는 S-unit의 생합성 과정에 필요한 아주 중요한 효소유전자이다.

최근의 연구에 의하면 *in vitro* 소화율 분석 연구 결과에 따르면 건물소화율 1%의 증가는 실제로 동물의 생체중이 평균 3.2% 증체될 수 있는 것으로 알려져 있다(Casler와 Vogel, 1999). 따라서 조사료에 있어서 직접적인 소화율 저해 인자인 동시에 사료영양가치를 저하시키는 주된 요인인 lignin의 함량이 낮은 고품질 목초

및 사료작물 신품종 개발은 가장 시급하고도 필수적인 육종목표라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 목초의 lignin 생합성 대사경로에 관련된 핵심유전자의 하나인 caffeic acid *O*-methyltransferase의 발현을 조절하여 소화율이 높은 신품종 목초를 개발하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 RNA 분리

온실에서 6개월간 재배하여 개화기에 도달한 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)의 잎과 줄기조직으로부터 total RNA를 분리하였다. 식물 조직을 액체질소를 이용하여 파쇄한 다음 TRI reagent (MRC, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였으며, mRNA 분리는 total RNA로부터 oligotex mRNA kit (Quiagen, Germany)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 정제하였다.

2. PCR 반응

RT (reverse transcriptase)-PCR 반응은 분리한 mRNA를 oligo(dT) primer와 reverse transcriptase (RT)를 이용하여 cDNA로 전환시킨 다음, PCR 반응을 수행하였다. *Taq* DNA polymerase 반응 buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.5 mM MgCl₂; 0.01% gelatin; 0.1% Triton X-100)에 10 mM의 dNTP mix, 100 pmol의 sense 및 antisense primers, 그리고 2 units의 *Taq* DNA polymerase (Clontech, USA)를 첨가하여 수행하였다. PCR 증폭은 아래와 같이 3단계로 실시하였다. 첫 번째 반응은 94°C에서 30초 및 72°C에서 3분간으로 5 cycle을 실시하였으며, 두 번째 반응은 94°C에서 30초, 70°C에서 30초 그리고 72°C에서 3분간으로 5 cycle을 실시하였다. 마지막 반응은 94°C에서 30초, 68°C에서 30초 그리고 72°C에서 3분간으로 27 cycle을 수행하였다. Genomic DNA로부터 PCR 증폭은 이 등

(2004)의 방법에 준하여 실시하였다.

3. Southern 및 Northern blot 분석

Genomic DNA를 각각의 제한효소로 절단한 다음, 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, nylon membrane에 transfer 한 다음 hybridization 반응은 이 등 (2000)의 방법에 준하여 실시하였다. Northern blot 분석은 이 등 (2000)의 방법과 같이 total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 다음 membrane으로 transfer 하여 Southern blot 분석과 동일한 방법으로 hybridization 하였다.

4. 오차드그래스의 배발생 캘러스 유도

캘러스 유도배지 [MS배지 (Murashige와 Skoog, 1962), 3 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 0.1 mg/L BA (6-benzyladenine), 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 살균된 종자를 치상하여 24 ± 2 °C의 생장실에서 약광조건(150 μmol m⁻²s⁻¹)으로 4주간 배양한 후 종자로부터 형성된 배발생 캘러스를 선발하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질 전환에 이용하였다.

5. COMT RNAi 발현벡터 구축

RNAi (RNA interference) 기법을 이용한 COMT 유전자 suppression용 발현벡터를 구축하기 위하여, 분리한 *Dgcomt* cDNA의 coding region 중 일부분을 (Fig. 2) Ri-Fw-*Xho*I primer (5'-ATCTCGAGCTGGCGATGACGCTCAAG-3')와 Ri-Rv-KpnI primer (5'-ATGGTACCGTTGGGTGTGAGCCACTT-3')를 사용하여 PCR 증폭한 다음 pKANNIBAL 벡터 (Wesley 등, 2001)의 35S promoter 하류에 sense 방향으로 도입하였다. Antisense *Dgcomt* cDNA는 Ri-Fw-XbaI primer (5'-AATCTAGACTGGCGAT-

GACGCTC AAG-3')와 Ri-Rv-*Hind*III primer (5'-ATAAGCTTGTGGGTGTGAGCCACT T-3')를 이용하여 증폭한 후 pKANNIBAL 벡터의 intron 하류에 도입하여 pKANicomt를 구축하였다. 구축된 pKAN icomt 벡터를 *Not*I으로 절단하여 35S-sense comt-intron-antisense comt-ocs terminator 단편을 분리한 다음 pCAMBIA 1300 벡터에 도입하여 pCAMicomt 벡터를 구축하였다(Fig. 4).

6. 오차드그래스의 형질전환 및 선발

오차드그래스의 형질전환은 Hood 등 (1986)의 방법에 따라 실시하였다. 구축한 pCAMicomt 발현벡터를 도입한 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 배양한 후, 배발생 캘러스에 감염시켰다. 감염된 캘러스를 hygromycin이 첨가된 재분화배지 (이 등, 2003)로 옮겨 식물체의 재분화를 유도한 다음 재분화된 shoot을 포함한 캘러스는 N6 배지 (Chu 등, 1975)를 기초로 한 선발배지(250 mg/L cefotaxime, 25 mg/L hygromycin, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 3 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 옮겨 6주간 배양하였다. 재분화된 식물체는 50 mg/L hygromycin이 첨가된 1/2 MS 배지로 옮겨 4주간 배양한 다음 정상적으로 뿌리가 발육되고 살아남은 개체만을 선발하여 화분으로 이식하여 온실에서 재배하였다.

III. 결과 및 고찰

1. COMT 유전자의 분리

오차드그래스의 COMT 유전자를 분리하기 위하여, 이미 알려진 옥수수를 비롯한 화분과 식물 유래의 COMT cDNA의 염기서열을 비교하여 상동성이 높은 영역의 PCR primer를 합성하였다. 오차드그래스의 genomic DNA를 주

형으로 하여 PCR로 증폭한 결과 0.3 kb의 증폭산물을 얻을 수 있었다(Fig. 1). 또한 오차드그래스의 mRNA를 이용한 RT-PCR 증폭에서도 genomic PCR과 동일한 크기의 증폭산물을 나타내었다(결과 생략).

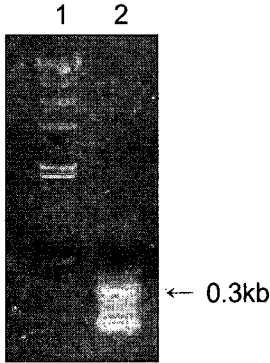


Fig. 1. PCR amplification of partial coding region of *Dgcomt* gene. Lane 1, size marker(λ DNAI HindIII); Lane 2, PCR product.

증폭된 0.3 kb DNA 단편을 pGEM-T easy 벡터에 도입한 후 DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과, 오차드그래스로부터 증폭된 PCR 산물은 다른 식물 유래의 COMT 유전자와 높은 상동성을 나타내었으며, 특히 화본과 목초인 tall fescue (AF153823)와 perennial ryegrass (AF033538)의 COMT 유전자와는 93.7%와 90.9%의 높은 상동성을 각각 나타내었다. 따라서 본 실험에서 분리한 DNA 단편이 오차드그래스의 COMT 유전자의 일부임을 확인하였으며(Fig. 2), 이를 *Dgcomt*로 명명하였다. 증폭된 DNA 단편을 COMT 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 발현벡터 구축에 이용하였으며, COMT 유전자의 발현 조사를 위한 probe로 사용하였다.

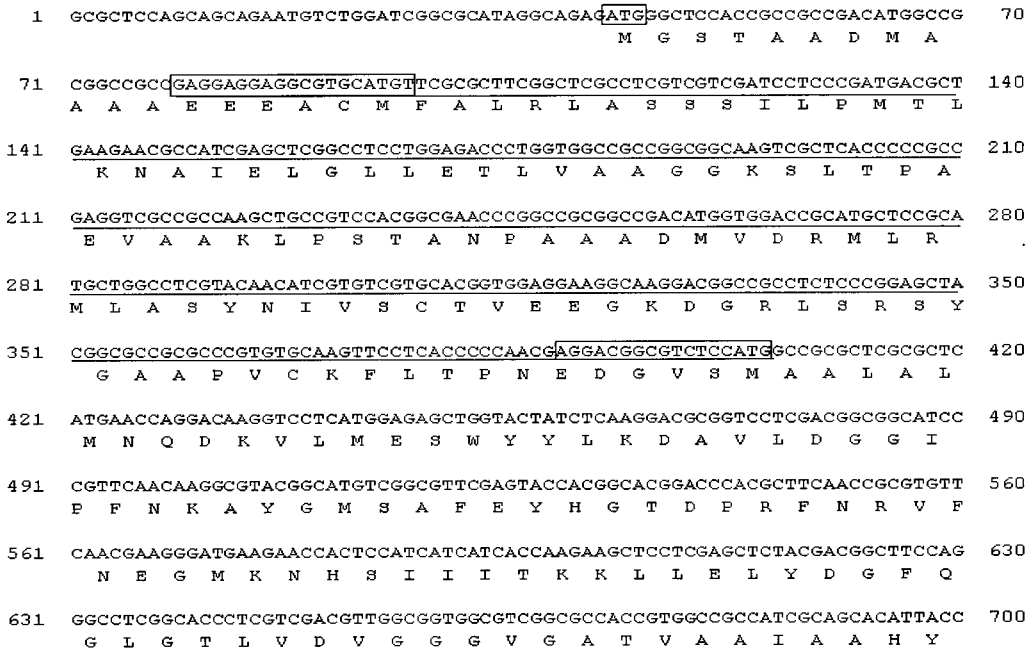


Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA for the COMT of orchardgrass plant. Boxes indicate the translation initiation codon and primers used for PCR amplification. DNA fragment used for RNAi vector construction is underlined.

2. COMT 유전자의 발현 분석

Dgcomt 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여, Northern blot 분석을 실시하였다. 오차드그래스의 잎, 줄기 및 뿌리 조직으로부터 분리한 total RNA를 formaldehyde agarose gel 전기영동하고 nylon membrane에 transfer한 다음 0.3 kb *Dgcomt* DNA 단편을 probe로 하여 hybridization을 실시하였다(Fig. 3).

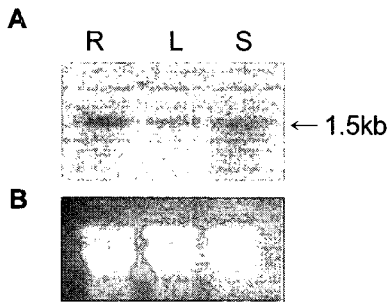


Fig. 3. Expression of transcripts of the *Dgcomt* gene in different tissues of orchardgrass. A. Northern blot. B. EtBr-stained gel after agarose gel electrophoresis. R, root; L, leaf; S, stem.

그 결과, 오차드그래스의 줄기와 뿌리조직에서 *Dgcomt* 유전자의 발현양이 높게 나타났으며, 잎에서의 발현은 이들 조직보다 다소 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Dgcomt* 유전자가 식물체의 영양생장이 진행됨에 따라 잎 조직에 비해 비교적 목질화가 빨리 일어나는 조직인 줄기와 뿌리에서 lignin의 생합성에 많이 관여하고 있다는 증거이며, *Dgcomt* 유전자가 식물에 있어서 lignin 생합성 과정에 있어서 중요한 기능을 담당할 것으로 판단되는 결과이다. 옥수수에서 있어서 리그닌 생합성 과정에 관

여하는 유전자 중의 하나인 MC1 (*McCesa1*) 경우에는 단지 뿌리에만 높은 발현을 보였으며, 알팔파, 담배 그리고 *Stylosanthes humilis*에서의 COMT 유전자는 줄기에서 높은 발현을 나타내었다(Collazo 등, 1992; Gowri 등, 1991; Hayakawa 등, 1996; McIntyre 등, 1995). 이러한 결과들은 식물들이 가지고 있는 COMT 유전자 homologue들이 서로 다른 조직에서 특이적으로 기능함을 추측케 하는 결과이다.

3. *Dgcomt* 유전자 발현 억제 형질전환 오차드그래스

RNAi 기법을 이용하여 오차드그래스의 *Dgcomt* 유전자의 발현을 억제시키고자, *Dgcomt* 유전자 단편의 양 말단에 특정 제한효소 부위 (*Xho*I, *Bam*HI, *Kpn*I, *Xba*I)를 PCR로 도입 한 다음 intron을 포함하는 RNAi 벡터인 pKANNIBAL에 sense와 antisense 방향으로 각각 도입하였다. pKANNIBAL 벡터에 삽입된 RNAi *Dgcomt* cassette를 *Not*I으로 절단하여 hygromycin 선발표지를 가지는 pCAMBIA1300 벡터에 subcloning하여 *Dgcomt* RNAi 발현벡터, pCAMicomt를 구축하였다(Fig. 4).

구축된 pCAMicomt 발현벡터를 *Agrobacterium* EHA105에 도입한 후, 오차드그래스의 종자유래 캘러스에 감염시켜 공동배양 한 후, 형질전환 식물체를 선발배지에서 재분화시켰다. RNAi 발현벡터의 재분화된 오차드그래스 식물체 내에 RNAi 발현벡터의 도입을 확인하기 위하여 형질전환체로부터 genomic DNA를 분리한 후, 35S promoter의 3'-쪽의 sense primer와 sense 방향의 *Dgcomt* cDNA 단편의 antisense primer를



Fig. 4. Construction of RNAi *Dgcomt* expression vector, pCAMicomt.

이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과, wild-type에서는 증폭산물이 검출되지 않았으나, 형질전환체의 경우 임의로 선발한 5개체 모두에서 예상크기와 동일한 0.3 kb의 DNA 단편이 증폭되었다(Fig. 5). *Dgcomt* probe를 이용한 Southern blot 분석에서도 *Dgcomt* 유전자 특이적인 hybridization band를 나타내었다(결과 생략). 이러한 결과는 RNAi 발현벡터의 T-DNA 영역이 오차드그래스의 genome에 성공적으로 도입되었음을 나타낸다.

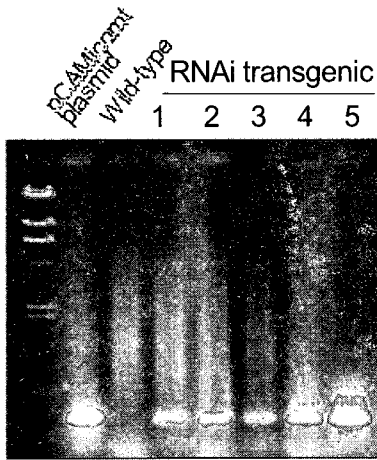


Fig. 5. Identification of RNAi *Dgcomt* transgene in transgenic plants. Genomic DNA was isolated from wild-type and transgenic plants, and subjected to PCR analysis. Lanes 1-5, RNAi transgenic plants.

RNAi 형질전환체에 있어서 *Dgcomt* 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 형질전환 식물체 5개체의 줄기조직으로부터 total RNA를 분리한 후 *Dgcomt* probe를 이용하여 Northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 형질전환 식물체는 wild-type과 비슷한 발현량을 보이는 개체로부터 발현이 현저히 감소된 개체까지 다양한 수준의 *Dgcomt* 유전자 발현정도를 나타내었다(Fig. 6).

본 실험에서 개발한 형질전환 식물체 내에서

lignin 생합성 경로에 중요한 유전자 중 하나인 *Dgcomt* 유전자의 발현감소는 속기가 진행됨에 따라 축적량이 증가하는 lignin 함량을 현저히 감소시킬 수 있을 것으로 추측된다. 현재 이들 RNAi 형질전환 식물의 lignin 함량변화를 조사 중에 있으며, 본 실험에서 확립한 기술은 소화율이 월등히 향상된 고사료가치 신품종 목초개발에 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

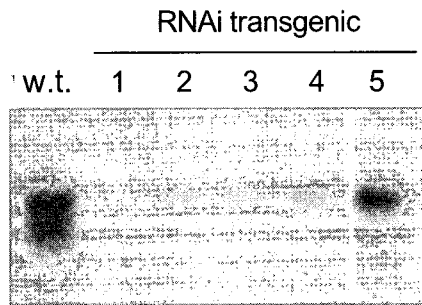


Fig. 6. Expression level of *Dgcomt* mRNA in RNAi *Dgcomt* transgenic orchardgrass plants.

IV. 요약

조사료로서 소화율을 향상시킨 신품종 형질전환 오차드그래스를 개발할 목적으로 lignin 합성경로에 있어서 중요한 효소 유전자 중의 하나인 COMT 유전자를 cloning하여 그 특성을 해명하였다. 오차드그래스의 COMT 유전자는 식물체의 전 조직에서 발현되고 있었으며, 특히 줄기와 뿌리조직에서 높은 발현량을 나타냄으로서 목질화에 크게 관여하는 lignin 생합성 유전자일 것으로 판단되었다. *Dgcomt* 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환 오차드그래스를 개발하기 위하여 *Dgcomt* 유전자를 RNAi 발현벡터에 도입한 후, *Agrobacterium* 형질전환시스템을 이용하여 오차드그래스에 도입하였다. PCR, Southern 및 Northern 분석 결과 RNAi 발현벡터가 genome에 도입되었으며, *Dgcomt* 유전자

의 발현이 상당한 수준으로 저하되었음을 확인하였다. *Dgcomt* 유전자의 발현억제는 식물체의 목질화와 더불어 증가되는 lignin의 축적량을 감소시킬 것으로 기대되며 향후 소화율이 증가된 고품질 신품종 목초의 개발에 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

V. 사 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-003-F00027).

VI. 인 용 문 헌

- 이상훈, 우현숙, 이병현. 2004. 이탈리아 라이그래스의 형질전환에 미치는 몇 가지 요인의 영향. 한국동물자원과학회지 46(2):235-242.
- Barnes, R.F. 1990. Importance and problems of tall fescue. In: Kasperbauer, M.J. (ed.) Biotechnology in tall fescue improvement. CRC Press, Boca Raton, 1990. pp. 2-12.
- Buxton, D.R. and Russill, J.R. Russell. 1988. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. Crop Sci. 28:553-558.
- Casler, M.D. and Vogel, K.P. 1999. Accomplishments and impact from breeding for increased forage nutritional value. Crop Sci. 39:19-20.
- Chu, C.C., C. S. Wang, C.C. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinic. 18:659-668.
- Collazo, P.A., Montoliu, L.P. Puigdomenech and J. Rigau. 1992. Structure and expression of the lignin *O*-methyltransferase gene from *Zea mays* L. Plant Mol. Biol. 20:857-867.
- Dixon, R.A., C.J. Lamb, S. Masoud, V. Sewalt and N.L. Paiva. 1996. Metabolic engineering-prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses-a review. Gene 179:61-71.
- Gowri, G., R.C. Bugos, W.H. Campbell, C.A. Maxwell and R.A. Dixon. 1991. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) X: Molecular cloning and expression of S-adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. Plant Physiol. 97:7-14.
- Hayakawa, T., K. Nanto, S. Kawai, Y. Katayama and N. Morohosh. 1996. Molecular cloning and tissue-specific expression of two genes that encode caffeic acid *O*-methyltransferase from *Populus kitakamiensis*. Plant Sci. 113:157-165.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol. 168:1291-1301.
- Lee, B.-H., S.H. Won, H.S. Lee, M. Miyao, W.I. Chung, I.J. Kim and J. Jo. 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice, Gene 245:283-290.
- Lee, S.H., D.G. Lee, J.S. Kim and B.-H. Lee. 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. Kor. J. Plant Biotechnol. 30:341-346.
- McIntyre, C.L., A.L. Rae, M.D. Curtis and J.M. Manners. 1995. Sequence and expression of a caffeic acid *O*-methyltransferase cDNA homologue in the tropical forage legume *Stylosanthes humilis*. Australian J. Plant Physiol. 22:471-478.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

15. Smith, K.F., K.F.M. Reed and J.Z. Foot. 1997. An assessment of the relative importance of specific traits for the genetic improvement of nutritive value in dairy pasture. *Grass Forage Sci.* 52:167-175.
16. Stone, B.A. 1994. Prospects for improving the nutritive value of temperate, perennial pasture grasses. *New Zealand J. Agric. Res.* 37:349-363.
17. Wesley, S.V., C.A. Helliwell, N.A. Smith, M.B. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, A.P. Gleave and P.M. Waterhouse. 2001. Construct design for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27(6):581-590.