

적은 수의 거대 엽록체를 가진 핵 형질전환 식물체를 이용한 담배 엽록체 형질전환 빈도 제고

정원중¹, 민성란¹, 유장렬^{1*}
¹한국생명공학연구원 식물유전체연구센터

Enhancement of Chloroplast Transformation Frequency by Using Mesophyll Cells Containing a Few Enlarged Chloroplasts from Nuclear Transformed Plants in Tobacco

Won Joong Jeong¹, Sung Ran Min¹, and Jang R. Liu^{1*}

¹Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT In the chloroplast transformation process, a chloroplast containing transformed chloroplast genome copies should be selected over wild-type chloroplasts on selection medium. It is more effective for a cell to become homoplasmic if the cell contains smaller number of chloroplasts. Therefore, to reduce the number of chloroplasts in mesophyll cells in tobacco, we overexpressed *FtsZ* to generate transgenic plants, of which mesophyll cell contained a few enlarged chloroplasts contrast to a wild-type mesophyll cell containing approximately 100 chloroplasts. It was demonstrated that transgenic leaf tissues comprising cells with a few enlarged chloroplasts gave rise to approximately 40% higher frequency of chloroplast-transformed adventitious shoots.

서 론

엽록체 형질전환은 1988년 단세포 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al. 1988)에서 처음으로 보고되었다. 1990년에 Svab 등 (1990)은 엽록체 형질전환 기술을 고등식물인 담배에 처음으로 적용하였다. 이후, spectinomycin에 저항성을 나타내도록 하는 *aadA* 유전자를 선발마커로 사용하여 particle bombardment로 외래 유전자를 도입하는 방식 (Svab and Maliga 1993)이 기본 프로토콜이 되었다. 엽록체 형질전환은 핵형질전환에 비하여 여러 가지 장점을 가지고 있

는데, 유전자의 수평적 전이가 일어나지 않고 (Daniell 2002), 정확히 원하는 게놈 위치에 유전자의 삽입이 가능하고, gene silencing 및 position effect가 없으며 (De Cosa et al. 2001, Lee et al. 2003, Daniell et al. 2002), 하나의 프로모터를 이용하여 여러 개의 유전자를 동시에 operon 형식으로 발현시키는 것이 가능하다 (De Cosa et al. 2001, Jeong et al. 2004). 또한 엽록체 형질전환을 이용하면 핵에 유전자를 도입한 것보다 이론적으로는 최대 5,000배 이상의 높은 발현이 가능하다. 다양한 연구결과에서 외래유전자의 발현이 획기적으로 높아짐이 보고됨으로써 (De Cosa et al. 2001, Staub et al. 2000) 엽록체 형질전환된 고등식물은 외래유전자의 대량 발현시스템으로 사용 가능성이 증명되었다.

*Corresponding author Tel 042-860-4430 Fax 042-860-4608
E-mail: jrliu@kribb.re.kr

그러나 지금까지 대부분의 엽록체 형질전환 연구결과들은 담배에서 이루어졌다. 최근 애기장대, 감자, 토마토, 페튜니아, 콩, 목화, 포플라 (Sikdar et al. 1998, Sidorov et al. 1999, Ruf 2001, Zubko et al. 2004, Dufourmantel et al. 2004, Kumar et al. 2004, Okumura et al. 2006) 등에서 엽록체 형질전환이 보고되었으나, 형질전환 효율이 너무 낮고, 형질전환된 식물체는 대부분 불임이다. 감자 및 콩 등의 주요작물에서의 엽록체 형질전환시스템의 개발은 학문적 가치뿐만 아니라 유용물질의 대량생산 및 고부가가치 기능성 작물개발을 위하여 필요한 연구이다. 다양한 작물의 엽록체 형질전환 효율을 높이기 위해서는 최적의 식물체재분화 시스템이 확보되어야 하며, 적당한 엽록체 형질전환 벡터를 확보해야 하고 최적의 선발시스템을 확립해야 한다. 선발마커로 사용되는 *aadA* 유전자의 경우 엽록체내의 자연돌연변이를 유발하여 형질전환 되지는 않았으나 항생제에 내성을 가지는 식물체가 선발되는 경우가 빈번하고, 항생제의 농도가 낮은 경우 많은 shoot이 발생하지만 대부분의 경우 스스로 항생제에 대해 내성을 획득한 자연돌연변이체이다. 따라서 보다 효율적으로 엽록체 형질전환된 세포를 선발하기 위하여 선발마커외에 GFP (green fluorescence protein) 유전자를 리포터 유전자로 사용하는 법이 이용되었다 (Sidorov et al. 1999, Jeong et al. 2004).

한편, 엽록체 형질전환된 식물체를 얻으려면 먼저 세포수준에서 모든 엽록체가 형질전환되어야 하는데, 세포내에는 많은 수의 엽록체가 존재하므로, 엽록체 형질전환 벡터가 전이되어 형질전환된 엽록체는 선발배지에서 선택적으로 분열을 계속하고 형질전환되지 않은 엽록체들은 분열을 하지 못하게 되어, 결국 해당 세포내의 모든 엽록체가 형질전환된 상태에 이르게 된다. 따라서 만일 해당 세포내에 엽록체의 수가 적으면 그만큼 효율적으로 엽록체 형질전환을 할 수

있을 것이다. Jeong 등 (2002a, b)은 담배의 *FtsZ* 유전자를 핵형질전환법으로 과잉 발현시켰을 때 엽록체의 분열이 저해되어, wild type의 엽록세포 내에 작은 크기의 엽록체 약 100개가 존재하던 것을 거대한 엽록체 3-5개를 가진 담배식물체를 생산할 수 있었다. 그러므로 만일 엽록체 수가 획기적으로 줄어든 핵형질전환된 엽록조직을 이용하여 엽록체 형질전환을 한다면, 엽록체 형질전환시스템의 가장 큰 문제점 중의 하나인 형질전환 빈도를 제고할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 *FtsZ* 유전자를 과잉 발현시킨 담배식물체의 엽록조직을 이용함으로써 엽록체형질전환의 빈도를 제고코자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) *FtsZ* 유전자의 과잉 발현에 의해 거대엽록체를 가지는 담배 식물체(Jeong et al. 2002a, b)의 기내발아된 유식물체의 잎을 엽록체 형질전환 재료로 사용하였다.

엽록체 형질전환

효율적인 선발을 위하여 reporter 유전자로 GFP를 가지는 엽록체 형질전환 벡터 CtVG를 제작하였다 (Figure 1). 엽록체 형질전환벡터는 CtV2 (Guda et al. 2000)를 backbone으로 하고 *aadA* 유전자 뒤쪽의 *XbaI* site에 ribosome binding site 및 GFP 유전자를 연결하여, 기존에 본 연구실에서 제작한 *aadA*와 GFP의 dicistronic expression을 위한 TIG 벡터 (Jeong et al. 2004)와 동일한 구조를 가지도록 제작하였다. 엽록체 형질전환은 Jeong 등 (2004)의 방법에 준하였다.

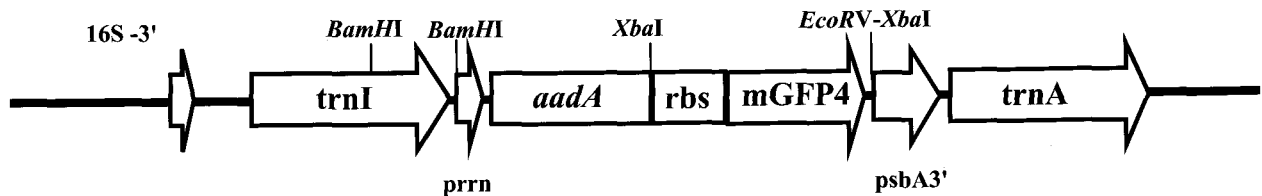


Figure 1. CtVG, Chloroplast transformation vector for GFP expression. prrn, promoter region of 16S rRNA gene; 16S-3', 3' region of 16S rRNA gene; trnI, plastidic trnI gene of tobacco; *aadA*, aminoglycoside 3' adenylyltransferase gene for spectinomycin resistance; rbs, ribosome binding site; mGFP4, modified GFP4 gene; psbA3', terminator region of psbA gene; trnA, plastidic trnA gene of tobacco.

엽록체 형질전환체 선발

형질전환을 수행하여 배양 4주 후부터 관찰하여 spectinomycin에 저항성을 보이며 발생한 shoot을 잠정적인 엽록체 형질전환체로 추정하고 2차 선발을 수행하였다. Heteroplasmy 및 chimera를 제거하기 위하여 spectinomycin에 저항성을 가지는 shoot을 1-3 mm 크기의 절편으로 나누어 2차 선발과정을 진행하였다. 이후 발생한 shoot을 생장조절제가 첨가되지 않고 500 mg/L spectinomycin이 첨가된 MS배지에서 뿌리를 유도하였다. 형질전환 유무는 UV 및 PCR 방법으로 확인하고 growth chamber에서 생육시켜 종자를 수확하였다. Bombarding 횟수 당 형질전환된 adventitious shoot의 수를 조사하여 형질전환 빈도를 분석하였다.

결과 및 고찰

엽록체 형질전환후 배양 4주 후, 잎 절편에서 adventitious shoot이 발생하였다 (Figure 2A). 처음 발생한 shoot 및 2차

선발을 통하여 얻은 식물체는 UV를 조사함으로써 형질전환 여부를 쉽게 구분할 수 있었다. 이 식물체는 spectinomycin 배지에서 정상적으로 뿌리가 발생하였으며 growth chamber에서 정상적으로 생육하고 개화하였다. 이러한 형질전환 식물체의 세포를 현미경으로 다시 관찰하여 GFP가 정확히 엽록체에서 발현되고 있음을 확인하였다 (Figure 2).

한편 자세히 살펴보면 색소체와 색소체를 서로 연결시켜 주는 stromule을 볼 수 있다 (Figure 2F, H). 이러한 stromule은 GFP 발현이 없는 상태에서는 쉽게 발견되지 않는 기관으로, stromule의 존재는 색소체들이 서로 연결되어 있으면 이를 통하여 색소체간에 단백질뿐만 아니라, 색소체내의 물질들의 이동이 가능하여 세포내 색소체들 사이에 활발한 정보교환이 일어나고 있음을 나타낸다.

엽록체 형질전환 효율은 wild type에 비하여 거대엽록체를 가지는 경우 엽록체 형질전환 효율에서 약 40%의 증가를 나타냈다. 대조구의 담배잎은 51회의 엽록체 형질전환 시도

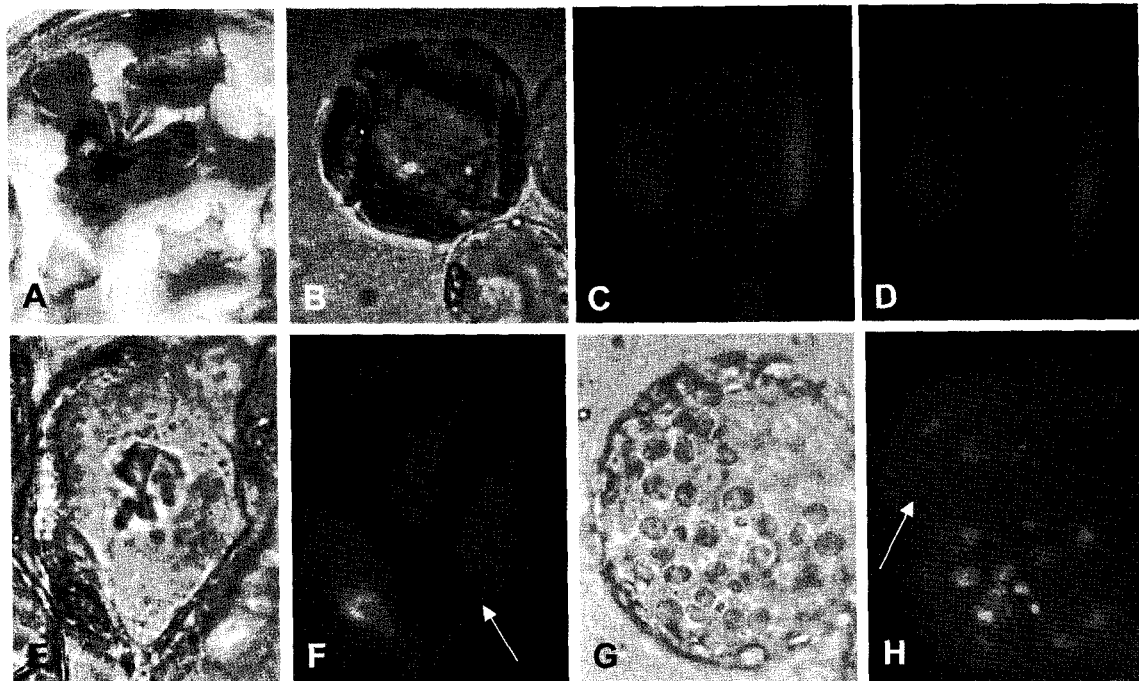


Figure 2. GFP expression in enlarged chloroplasts. A, An adventitious shoot formed on a leaf explant in first round selection; B, A bright field cell image with enlarged chloroplasts ; C, UV light without filter - the same cell as in B; D, UV light with a fluorescein isothiocyanate (FITC) filter set - the same cell as in B; E, Bright field- enlarged chloroplasts in the cell; F, FITC - enlarged chloroplasts showing the stromules (arrow)/the same cell as in E; G, Bright field- chloroplasts in the wild type cell; H, FITC - chloroplasts in the wild type cell showing stromules (arrow)/the same cell as in G. Freshly prepared cells were examined under white light, UV and FITC microscopies. Images were captured by computer using a COOLPIX-950 digital camera (Nikon, Japan) and processed using Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) software.

(bombardment)에서 11개체의 형질전환체를 확보하여 형질 전환 빈도는 21.6%로 나타났고, 거대엽록체를 가지는 경우에는 47회의 형질전환시도에서 14개체의 형질전환식물체를 확보하여 형질전환 빈도는 29.8%로 나타났다.

엽록체 형질전환이 세포수준에서 일어나려면, 엽록체 형질전환 벡터로부터 전이된 왜래유전자를 획득한 엽록체는 선발배지에서 선택적으로 분열을 계속하여 분열이 저해된 wild type의 엽록체 보다 세포내에서 우위를 차지해야 한다. 따라서 본 연구에서 거대 엽록체 3-5개를 가진 엽육세포를 대상으로 하였을 때 형질전환 빈도가 증가한 것은 거대엽록체를 사용하였기 때문이 아니라 적은 수의 엽록체를 가진 세포를 사용하였기 때문이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 GFP가 발현된 거대엽록체를 이용하여 효율적인 엽록체 형질전환 시스템을 개발하였다. 현재 엽록체 형질전환 기술은 그 사용이 제한 되어있어서, 대부분의 연구가 담배에서 이루어져 있는데, 이는 엽록체 형질전환 효율의 제고를 통해서 해결될 수 있을 것이다. 그러나 거대엽록체를 가지는 경우에, 형질전환 조건 즉, 1,300 psi의 진공 및 1,100 psi에서의 bombarding 조건에서 wild type보다 상당 부분의 세포가 파괴되어, bombarding 된 부위가 고사되는 경우가 빈번하였다. 이러한 것은 형질전환 조건을 개선하면 형질전환 효율을 훨씬 더 높일 수 있음을 의미한다. 따라서 GFP 선발시스템 및 개선된 거대엽록체 형질전환 시스템을 이용하여 엽록체 형질전환 효율의 향상을 기대할 수 있을 것이다. 또한 거대엽록체를 가지는 식물체는 wild type에 비하여 생육이 느린 단점을 가진다. 그러나 거대엽록체를 가지는 담배식물체는 핵 형질전환에 의해 생산된 것이며, 엽록체는 담배에서 모계유전을 하므로 엽록체 형질전환체를 제작한 후 이 식물체를 wild type과 교배하면 정상적인 크기와 수의 엽록체를 가지며 엽록체가 형질전환 된 식물체를 생산할 수 있다.

적 요

엽록체 형질전환된 식물체를 얻으려면 먼저 세포수준에서 모든 엽록체가 형질전환되어야 하는데, 세포내에는 많은 수의 엽록체가 존재하므로, 엽록체 형질전환 벡터가 전이되어 형질전환된 엽록체는 선발배지에서 선택적으로 분열을

계속하고 형질전환되지 않은 엽록체들은 분열을 하지 못하게 되어, 결국 해당 세포내의 모든 엽록체가 형질전환된 상태에 이르게 된다. 따라서 만일 해당 세포내에 엽록체의 수가 적으면 그만큼 효율적으로 엽록체 형질전환을 할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 담배의 *FtsZ* 유전자를 핵형질전환 방법으로 과잉 발현시킴으로써 엽록체의 분열이 저해되어 엽육세포내에 거대한 엽록체 3-5개를 가진 담배식물체의 엽육조직을 이용하여, 엽록체 형질전환을 한 결과, 엽록체 형질전환 빈도가 약 40% 증가되었다.

사 사

본 연구는 과학기술부 프론티어 작물유전체기능연구사업단과 해양수산기술진흥원의 해양극한생물 분자유전체연구단사업, 농촌진흥청 바이오그린21 사업, 과학재단 SRC 경희대 식물대사연구센터 및 한국생명공학연구원 기관고유사업 지원으로 수행되었다.

인용문헌

- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, and Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol* 20: 581 - 586
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* 7: 84-91
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19: 71-74
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo J-M, and Tissot G. (2004) Generation of fertile transplasmidic soybean. *Plant Mol Biol* 55: 479-489
- Guda G, Lee SB, Daniell H (2000) Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep* 19: 257-262
- Jeong WJ, Jeong SW, Min SR, Yoo OJ, Liu JR (2002a) Growth retardation of plants transformed by overexpression of NtFtsZ1-2 in tobacco. *J Plant Biol.* 45: 107-111
- Jeong WJ, Jeong SW, Woo JW, Choi DW, Liu JR (2004)

- Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for tracking and selecting plastid-transformed cells in tobacco. *Plant Cell Rep* 22: 747-751
- Jeong WJ, Park YI, Suh KH, Raven JA, Yoo OJ, Liu JR (2002b) A large population of small chloroplasts in tobacco leaf cells allows more effective chloroplast movement than a few enlarged chloroplasts. *Plant Physiol* 129: 112-121
- Kumar S, Dhingra A, and Daniell H. (2004) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol* 56: 203-216
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol Breeding* 11: 1-13
- Okumura S, Sawada M, Park YW, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K (2006) Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res* 15: 637- 646
- Ruf S, Hermann M, Berger I, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 870-875
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209-216
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18: 20-24
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-protein production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18: 333-338
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8526-8530
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 913-917
- Zubko MK, Zubko EI, van Zuilten K, Meyer P, and Day A (2004) Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res* 13: 523-530

(접수일자 2007년 7월 27일, 수리일자 2007년 8월 14일)