

감미단백질 관련 브라제인, 타우마틴 및 미라클린 유전자를 이용한 형질전환 상추 육성 및 발현분석

정여진 · 강권규

Stable expression and characterization of brazzein, thaumatin and miraculin genes related to sweet protein in transgenic lettuce

Yeo Jin Jung · Kwon Kyoo Kang

Received: 17 August 2018 / Revised: 11 September 2018 / Accepted: 11 September 2018

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Sweetener is one of the additives that makes you feel sweet. Artificial sweeteners and sugar are typical examples, and sweetness proteins with sweetness characteristics have been widely studied. These studies elucidated the transformation lettuce cells with *Agrobacterium* method for stable production of natural sweet proteins, brazzein, thaumatin, and miraculin. In this paper, we report use of a plant expression system for production of sweet proteins. A synthetic gene encoding sweet proteins was placed under the control of constitutive promoters and transferred to lettuce. High and genetically stable expression of sweetener was confirmed in leaves by RT-PCR and Western blot analysis. Sweet proteins expressed in transgenic lettuce had sweetness-inducing activity. Results demonstrate recombinant sweet proteins correctly processed in transgenic lettuce plants, and that this production system could be a viable alternative to production from the native plant.

Keywords Taste modifying protein, Brazzein, Thaumatin, Miraculin, Transgenic lettuce, *Agrobacterium* method

Y. J. Jung · K. K. Kang
국립한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Life Science, Hankyong National University, Ansong, Gyeonggi-do 17579, Korea)

K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

서 언

감미료(sweetener)는 단맛을 느끼게 하는 첨가물 중 하나로 설탕이 대표적이다. 당은 다양한 음식에 필요하며, 설탕과 아세설팜칼륨, 아스파탐 및 사카린 등의 인공감미료를 다량 섭취하는 현대인들에게 고혈압, 당뇨병, 비만 및 치아질환 등을 유발할 수 있다. 또한 이러한 인공감미료의 사용은 방광암, 뇌종양, 심부전 및 정신적 질환과 같은 복합성 질환을 야기한다고 보고되었다(Kant 2005). 따라서 인공 감미료나 설탕 대신에 단맛의 특성을 발휘하거나 미각을 수식할 수 있는 안전하고 건강한 대체 감미료의 연구가 필수적이다(Kant 2005). 지금까지 단맛의 특성을 지닌 감미단백질은 miraculin (Kurihara and Beidler 1968), thaumatin (Wel and Loeve 1972), monellin (Wel 1972; Moris and Cagan 1972), pentadin (Wel et al. 1989), curculin (Yamashita et al. 1990), mabinlin (Liu et al. 1993), brazzein (Ming and Hellekant 1994), eggwhite lysozyme (Masuda et al. 2001) and neoculin (Shirasuka et al. 2004; Suzuki et al. 2004) 등 9종이 알려져 있다. 이들 감미단백질은 열대과실에서 많이 존재하며, 토착민들의 주된 단맛원료로 사용되어 왔다. 감미단백질은 설탕에 비해 낮은 농도로 단맛을 유도 할 수 있으며, lysozyme을 제외하고는 모든 감미단백질의 기원은 자연의 식물 열매로부터 유래되었다. 그 중 brazzein은 가장 작은 분자량을 가진 단백질로서 아프리카 식물 *Pentadiplandra brazzeana* Baillon의 열매에서 분리되었다(Ming and Hellekant 1994). 내열성 및 광범위한 pH (pH 2.5 ~ 8)에서 안정성을 보이며, 당과 단맛이 유사한 특징을 가지며, 독성이 없어 모든 식품에 사용이 가능하다고 하였다(Assadi-Porter et al. 2000). 또한 brazzein 단백질은 sucrose보다 분자량 기준으로 500 ~ 2000 배, 몰 기준으로 9500배 당도가 높아 감미료로써 높은 평가를

받고 있다(Ming and Hellekant 1994; Assadi-Porter et al. 2000). Thaumatin은 설탕의 약 10,000배에 달하는 높은 감미도를 가진 식물단백질로서 서아프리카에서 자생하는 *Thaumatococcus danielli* Benn. (Benth.) 열매에서 유래되었다(Wel and Loeve 1972). 쓴맛이 없는 감미를 나타내며 풍미증강효과 및 수용성이 높고 열과 산성조건(pH 11.5~12.5)에서 안정적이며 설탕에 비해 단맛을 느끼는 정도는 낮지만 지속시간은 길다는 장점이 있다고 하였다(Farbman et al. 1987). 또한 thaumatin은 미각 구강 내 특정 요소에 결합하는 것이 밝혀짐에 따라 사람을 비롯한 영장류에서만 강한 단맛을 느끼는 특성을 지니고 있어 많은 국가에서 식품첨가물로서 승인되어 있다(Farbman et al. 1987, Zemanek et al. 1995). Miracullin은 열대식물인 miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*)의 열매에서 추출한 당 단백질로 자체로는 단맛은 없지만 신맛을 단맛으로 변화시킬 수 있는 미각수식활성(Taste modifying activity) 작용을 한다고 하였다(Kurihara and Beidler 1968). 이렇게 변형된 단맛은 산의 pH와 신맛에 따라 결정되며, 설탕보다 3,000배 높은 감미도를 가지며, 100°C 이상 가열하면 맛을 변화시키는 성질을 상실한다고 하였다(Faus 2000). 이러한 감미단백질들은 천연감미료로서 매우 높은 평가를 받고 있으나, 과실에서 생산하는 단백질은 한정된 지역 및 계절에 따라 단백질 품질이 다르기 때문에 산업적 활용이 극히 제한적이라고 할 수 있다. 따라서 안정적으로 단백질 생산을 위해서는 유전자 고효율 발현 시스템을 이용한 재조합변이세포 또는 식물체를 육성하여, 안정적으로 주년 생산할 수 있는 탱크 배양 및 양액 재배 시스템 개발이 절실히 필요하다고 하였다(Faus 2000; Masuda and Kitabatake 2006). 이 일환으로 본 연구에서는 먼저 몇몇 감미단백질에 관련된 유전자를 고 발현 프로모터 하에서 생산 가능하도록 벡터를 구축하고, *Agrobacterium* 방법을 통해 상추 세포에 T-DNA를 삽입시켜 안정적 발현 및 후대 종자를 육성하였다.

재료 및 방법

식물재료

상추(*Lactuca sativa* L. cv. Green Skirt, 청치마) 종자는 70% EtOH로 30초간 소독한 뒤 tween 20이 첨가된 1% sodium hypochlorite를 사용하여 15분간 표면 살균을 하였다. 그 후, 멸균수로 3회 수세한 후 1/2 MS 고체배지에 치상하고, 16일 장의 광조건(25±1°C, 16h day/8h dark)에서 발아를 유도시켰다. 3일 뒤에 본엽 2매 전개되면 자엽의 엽병을 포함한 절편체를 식물형질전환에 이용하였다.

감미단백질 관련 유전자 합성 및 Ti-plasmid 벡터 구축

식물 발현용 Ti-plasmid 벡터 구축은 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 brazzein, thaumatin 및 miraculin 유전자 정

보를 확보하여 제한 효소 *XhoI* 및 *BamHI*을 포함하는 염기서열의 합성을 (주)바이오니아(<https://www.bioneer.co.kr/index.php/>)에 의뢰하여 진행하였다(Shahina et al. 2016). 합성된 유전자는 brazzein 239 bp, thaumatin 701 bp, miraculin 737 bp로 제한효소를 사용하여 식물 과발현 벡터인 pPZP-3'PinII-Bar Ti-plasmid 벡터에 클로닝 하였다. 이때 유전자의 발현 조절을 위한 프로모터는 2x CaMV 35S (Duel cauliflower mosaic virus 35S promoter)를 사용하였으며, 형질전환체 선발을 위하여 bar 유전자를 이용하였다. 구축된 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환하여 초저온 냉동고(-80°C)에 저장하였고 일부는 식물형질전환에 사용하였다.

형질전환 상추육성

상추의 자엽절편은 NAA 0.1 mg/L⁻¹, Kinetin 0.5 mg/L⁻¹을 포함한 MS고체배지에서 2일간 pre-culture 한 후, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (OD₆₀₀=0.5-0.7)에 10분간 감염시켰다. 감염 후, acetosyringone이 첨가된 pre-culture배지에 계대하여 25°C에서 2일간 암 배양으로 co-culture 하여 유전자 도입을 유도하였다. co-culture 후에는 감염된 잎 절편을 NAA 0.1 mg/L⁻¹, Kinetin 0.5 mg/L⁻¹, PPT 3 mg/L⁻¹, cefotaxime 300 mg/L⁻¹을 포함한 MS고체 선발배지에 계대하고 25°C에서 명 배양하여 bar 유전자에 내성이 있는 신초를 유도하며 2주마다 계대배양하였다. 한달 후, 잎절편으로부터 유도된 재분화 개체는 MS hormone free배지에 이식하여 뿌리를 유도하고 뿌리가 형성된 형질전환 상추는 포트에 이식하여 순화시켰다. 이후 이를 이용하여 형질전환체의 유전자 분석에 사용하였다.

Genomic DNA 추출 및 PCR분석

Brazzein, thaumatin, miraculin 유전자의 도입 여부 확인은 재분화된 상추 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR분석을 실시하여 확인하였다. 이때 사용한 primer set는 Table 1과 같이 bar-fw 및 nos-rv로 제작하여 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30 cycles로 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하여 분석하였다.

RT-PCR 및 qRT-PCR 분석

도입 유전자의 발현분석은 형질전환 상추로부터 total RNA를 추출하여 RT-PCR과 qRT-PCR 분석을 통하여 수행하였다. Total RNA는 FavorPrep™PlantTotal RNAMiniKit (Favorgen, Korea)를 사용하여 분리하였고, Inclone™One-stepRT-PCRkit (IncloneBiotech, Korea)를 사용하여 total RNA로부터 cDNA를

Table 1 Primers used for PCR amplification and RT-PCR amplification in this study

Primer name	Sequence (primer direction 5'-3')
Genomic DNA PCR primers	
Bar Fw	CGTCAACCACTACATCGAGA
Nos Rv	TTGCGCGCTATATTTTGTTTT
RT-PCR primer	
Brazzein RT-Fw	GAAAACCTACCCGGTGTCCAA
Brazzein RT-Rv	GGTTGCGTTTTTCGTCGTAG
Thaumatococin RT-Fw	CTGGTGACTGTGGTGGTTTG
Thaumatococin RT-Rv	GCACATCTGACGCCTCTACA
Miraculin RT-Fw	TCCACCGATCTCAACATCAA
Miraculin RT-Rv	ACGGTGGGACAGAAAACAAG
Actin-Fw	AGCAACTGGGATGACATGGA
Actin-RV	GGGTTGAGAGGTGCCTCAGT

합성 하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30 cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 상에 영동 한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. RT-PCR 결과를 입증하기 위해, 독립적으로 제조된 total RNA를 이용하여 2회 실험을 반복하였다. 또한 정량적 실시간 PCR 실험을 위해, SuperScript™III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하였다. PCR 반응을 위해, 반응 성분의 마스터 믹스를 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 대한 제조사의 프로토콜에 따라 제조하였다. Thermocycling 및 형광 검출을 Illumina's Eco Real-Time PCR System (Illumina, Inc. California, U.S.A.)을 이용하여 수행하였다. PCR을 95°C 10분에 이은 94°C 30초, 57°C 30초 및 68°C 1분의 20~25 사이클을 수행하였다. qPCR 결과를 입증하기 위해, 3회 실험을 반복하였다(Livak & Schmittgen 2001).

단백질 추출 및 Western blot 분석

형질전환 상추의 단백질 발현 분석은 Western blot 으로 수행하였다. 단백질 추출은 brazzein, thaumatin, miraculin 유전자가 도입되어 mRNA의 발현량이 높은 형질전환체와 wild type의 잎으로부터 extraction buffer 2.0M KPO4 (pH 7.8), 0.5M EDTA, Triton X-100, 1.0M dithiothreitol (DTT), 80% glycerol and dH2O 200 µl를 사용하여 총 단백질을 추출 하였다. 세포 분쇄액을 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하고 상층액을 수집하여 추가 분석에 사용 하였다. 총 단백질은 Bradford (1976)에 따라 소혈청 알부민을 표준으로 사용하는 Bio-Rad 단백질 염색을 사용하여 검출하였다. 각각의 brazzein, thaumatin, miraculin 라인으로부터 동일한 양의 총 단백질 20 µg/lane을

12% SDS polyacrylamide gels에서 분리하고(Laemmli, 1970), semi-dry transfer (5 mA /m², 15분)에 의해 PVDF membrane (Bio-Rad, Korea)으로 옮겼다. FLAG HRP anti-flag을 1차 항체 (1 : 1000, v/v)로 사용하고, anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (Roche, Korea)를 2차 항체(1 : 3000, v/v)로 사용 하여 검출하였다.

결과

감미단백질관련 유전자의 분자적 특성 및 Ti-plasmid 벡터 구축

감미단백질 유전자 brazzein, thaumatin 및 miraculin은 식물열매 유래 단백질로 brazzein은 Ming and Hellekant (1994)에 의해 발표된 단백질로 216개의 ORF 및 71개의 아미노산으로 구성되어 6.5 kDa의 분자량을 갖고 있다. Thaumatin은 Wel and Loeve (1972)에 의해 발표한 단백질로 678개의 ORF 및 225개의 아미노산으로 구성되어 22.33 kDa의 분자량을 갖고 있으며, miraculin은 Kurihara and Beidler (1968)에 의해 발표된 단백질로 714개의 ORF 및 237개의 아미노산으로 구성되어 24.36 kDa의 분자량을 보였다(Fig. 1). 각각의 유전자 말단에는 FLAG-tag를 부착하여 형질전환 된 식물에서 단백질의 발현을 검출하는데 사용하였다. Brazzein, thaumatin 및 miraculin 유전자를 상추 계놈에 도입시키기 위한 식물형질전환용 Ti-plasmid 벡터는 2 x CaMV 35S 프로모터 하에 유전자의 발현이 조절되도록 하고, 선발 마커로 bar 유전자를 사용하여 구축하였다. 이렇게 구축된 식물발현 벡터는 *A. tumefaciens* EHA105에 형질전환 시켜 상추 자엽절편에 도입하였다(Fig. 2).

감미단백질관련 유전자 도입 형질전환 상추 육성

감염된 자엽절편으로부터 얻어진 재분화 식물체는 총 9개체

① Miraculin 237 a.a 24.36 kDa
 MKELTMLSLSFFVVSALIAAANPLLSAADSAPNPVLDIDGKLRGTGTYIYVFLRDHG
 GGLTVSATTPNGTFVCPFRVQTRKEVDHDRPLAFFPENPKEDVVRVSTDLNINFSAFMP
 CRWTSSTVWRLDKYDESTGQYFVTIGGVKGNPGPETISSWFKIEEFCSGSGFYKLVFCPTV
 CGSCKVKCGDVGIIYDQKGRRRLLALSDKPFFAFEFNKTVYFDYKDDDDKGDYKDDDDK-

② Brazzein 71 a.a 6.5 kDa
 MDKCKKVYENYFVSKCQLANQCNYDCKLDKHARSGECFYDEKRNLCQICDYCEYDYKDDD
 DKGDYKDDDDK-

③ Thaumatin 225 a.a 22.33 kDa
 MATFEIVNRCSTYVWAAASKGDAALDAGGRQLNSGESWTINVEPGTNGGKIWARTDCYFD
 DSGSGICKTGDCGGLLRCKRFGRPPTTLAEFSLNQYKDYIDISNIKGFNVPMNFSPTTR
 GCRGVRCAADIVGQCPAKLKAPGGGCNDACTVFQTSEYCCCTGKCGPTEYSRFFKRLCPD
 AFSYVLDKPTTVCPSGSSNYRVTFCTADYKDDDDKGDYKDDDDK--

Fig. 1 Amino acid sequence of sweet and taste modifying proteins. Sequence was collected from the Swiss-Prot biological database of proteins

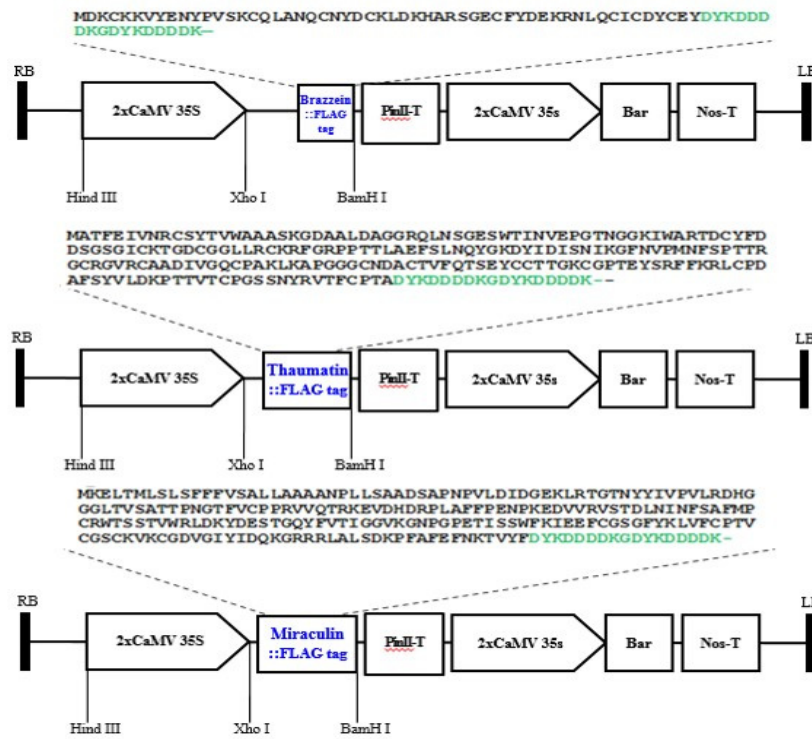


Fig. 2 Development of transgenic lettuce plants with genes. (A) Ti-plasmid vector construction for overexpression of brazzein, thaumatin, miraculin genes in lettuce. T-DNA region of pinII-gene. RB, right border; LB, left border; gene::FLAG, genes with FLAG-tag; Bar, bar gene; Nos-T, nopaline synthase terminator; 2xCaMV 35S, dual cauliflower mosaic virus 35S promoter

로 brazzein(5개체), thaumatin(3개체) 및 miraculin(1개체)를 확보하였다(Fig. 3). 육성된 T0 형질전환 상추의 성장상을 분석하기 위하여 잎과 줄기, 뿌리의 길이를 분석한 결과는 wild-type (WT)와 유사한 성장양상을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 4).

재분화된 상추로부터 감미단백질관련 유전자 도입확인 및 발현 분석

도입유전자들로부터 재분화한 총 9개의 상추 잎을 이용하여 각각 DNA를 추출한 후, 유전자 도입 여부 확인은 bar 유전자

와 nos 터미네이터 영역의 프라이머를 작성하여 PCR 분석을 수행하였다(Table 1). 그 결과 WT에 비하여 9개의 재분화 식물체에서 PCR가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 재분화 식물체들은 brazzein, thaumatin 및 miraculin 유전자가 각각 상추 게놈에 안정적으로 도입된 것을 확인하였다(Fig. 5). 확인된 9개 형질전환 상추에서 brazzein, thaumatin 및 miraculin 유전자의 발현여부 확인은 각각의 잎으로부터 total RNA를 추출하여 RT-PCR 분석과 qRT-PCR 분석으로 수행하였다. 그 결과 WT에 비하여 형질전환 상추에서 유전자가 높게 발현 되고 있음을 확인하였다. 그 중 brazzein에서는 B1, B3 개체와 thaumatin에서는 T2개체, miraculin에서는 M1개체에서

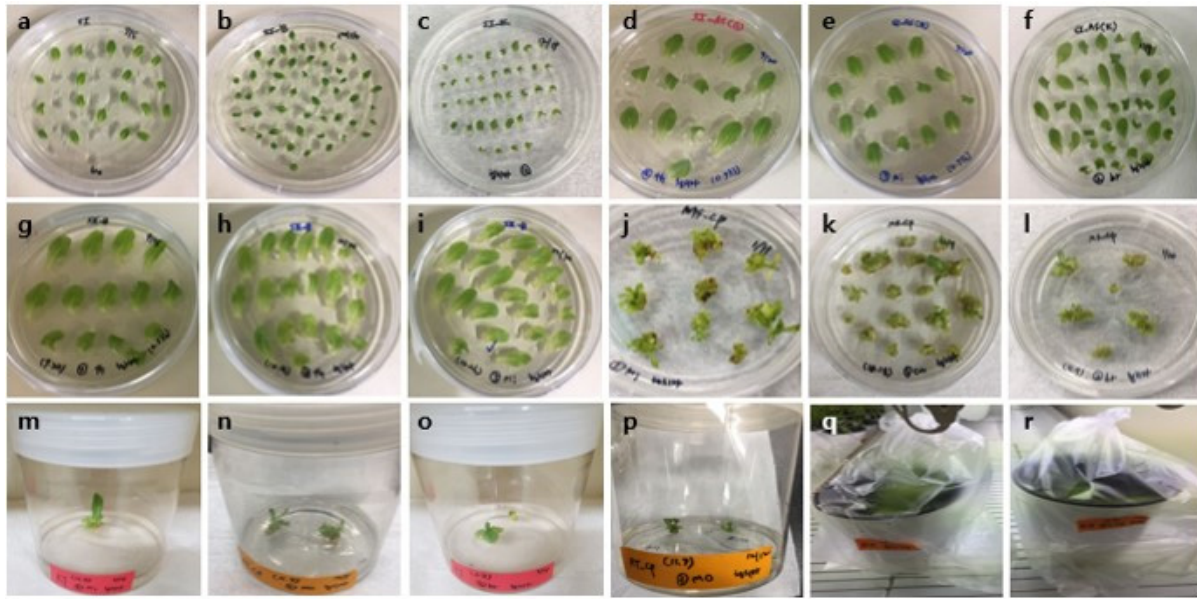


Fig. 3 Development of transgenic lettuce plants with brazzein, thaumatin, miraculin genes. *Agrobacterium* mediated transformation procedures in lettuce plants. a-c, pre-culture on MS medium with NAA and kinetin; d-f, co-culture after infection; g-i, callus formation; j-l, multi-shoot differentiation; m-p, regenerated plants in rooting medium; q-r, acclimation in soil

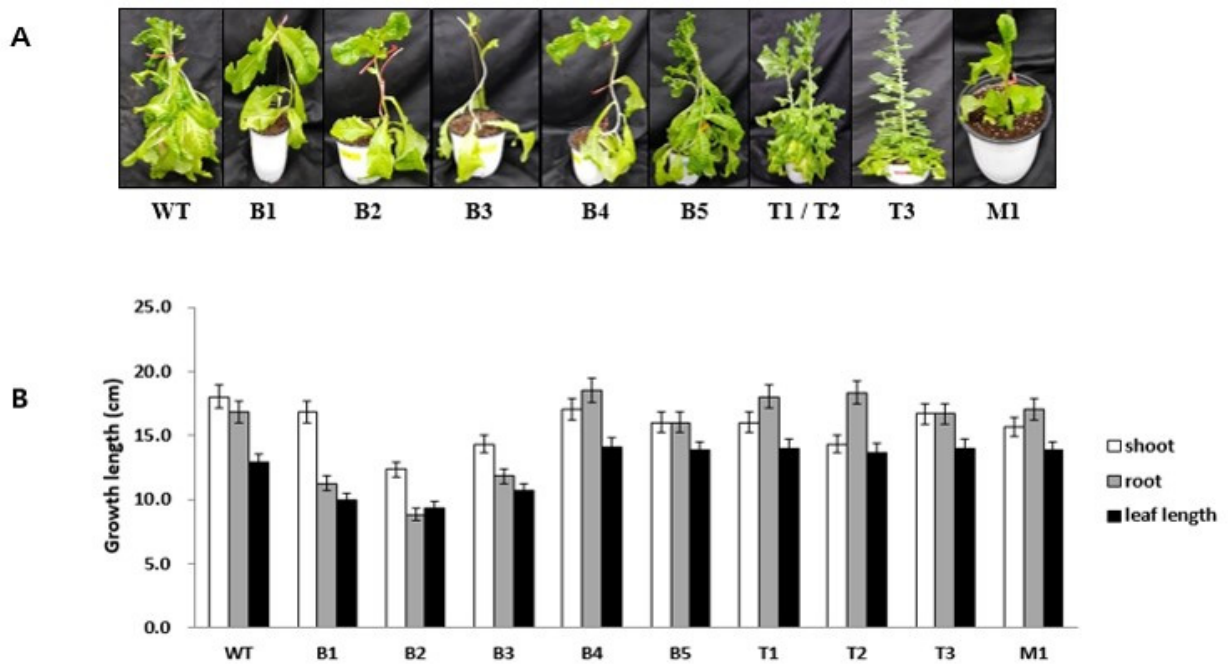


Fig. 4 (A) Phenotype of wild-type (WT) and transgenic lettuce plants. (B) Plant growth of shoot, root, and leaf length in WT and transgenic lettuce lines. Significance level $p \leq 0.05$.

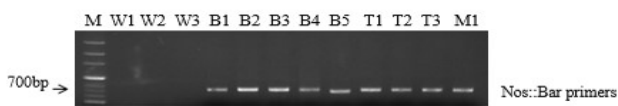


Fig. 5 PCR analysis of bar and nos terminator region. M, molecular marker; W, wild type as negative control plant; B1 to M1, transgenic plant lines. B, Brazzein; T, Thaumatin; M, Miraculin

가장 많이 발현하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 안정적으로 발현하는 형질전환 9개체로부터 단백질의 발현과 추적 가능성 검토는 western blot 분석을 통하여 수행하였다. 그 결과 형질전환 9개체 모두에서 도입한 brazzein, thaumatin 및 miraculin 유전자가 전사 및 번역과정을 걸쳐 안정적으로 단백질을 생산하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 7). Western blot 분석으로 검출된 단백질은 기 보고된 천연 brazzein 분자량인 6.5 kDa

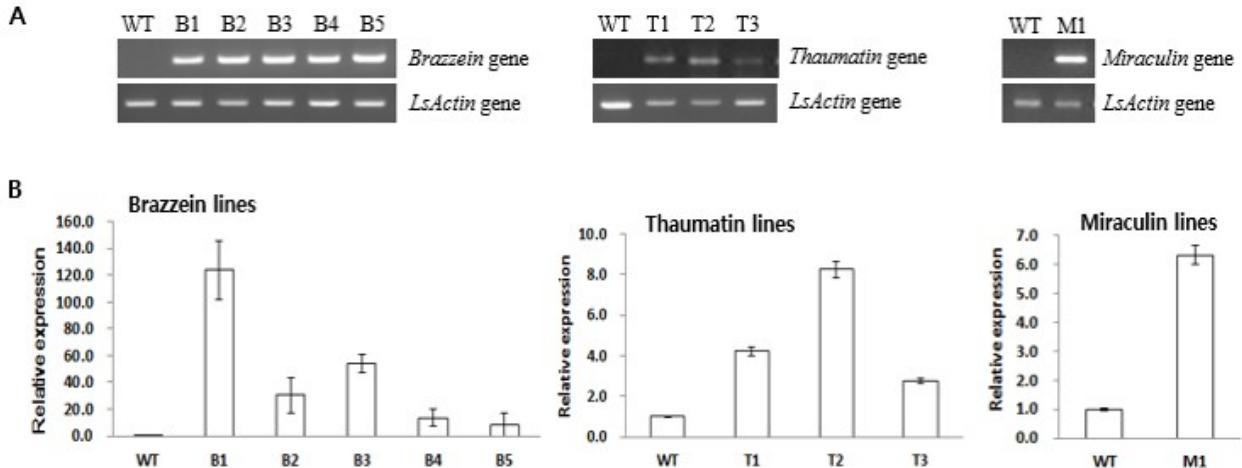


Fig. 6 (A) Expression of the brazzein, thaumatin and miraculin genes in transgenic plants by RT-PCR analysis. WT, wild type; B1 ~ M1, 9 transgenic plants. (B) Quantitative RT-PCR analysis of RNA extracted from transgenic lines and control (wild type). CT values calculated based on actin expression level as a control. WT, wild type plant; B1~B5, Brazzein lines; T1~T3, Thaumatin lines; M1, Miraculin lines. Bars render standard error of mean for three replicate measurements

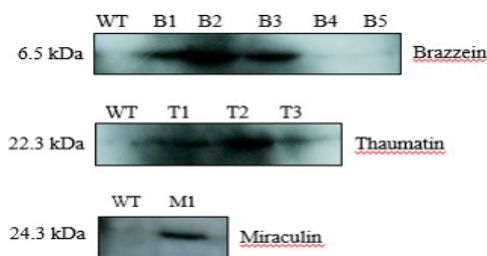


Fig. 7 Western blot analysis in T0 generation of transgenic lettuce plants with the FLAG-tag (DYKDDDDK). Protein was isolated from transgenic plants and wild type. WT, wild type; B1~M1, transgenic plants; B1 to B5, Brazzein lines; T1~T3, Thaumatin lines; M1, Miraculin lines

(Ming and Hellekant, 1994), thaumatin 분자량인 22.3 kDa (Wel and Loeve, 1972), miraculin 분자량인 24.3 kDa (Kurihara and Beidler, 1968)과 일치하였다(Fig. 7). 또한 brazzein 도입 형질 전환 개체 중에서는 B1, B2 및 B3에서 가장 높은 발현을 나타

내었고, thaumatin 도입 형질전환 개체에서는 T2에서 높은 발현을 보였다. Miraculin 유전자가 도입된 형질전환 M1에서도 단백질이 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 형질전환 상추에서 brazzein, thaumatin 및 miraculin 감미단백질이 안정적으로 발현한 것을 선발하여 후대 육성에 사용하였다.

감미단백질 유전자 도입 후대 육성

감미단백질 유전자가 안정적으로 발현하는 형질전환 상추 (B1, B2, B3, T1, T2 및 M1)에서 각각의 유전자가 single copy로 도입된 개체를 효율적으로 선발하기 위하여 이들 개체로부터 후대육성을 통하여 T1세대 종자를 획득하였으며, T1세대에서 basta처리를 통하여 저항성과 감수성을 선발하여 카이자승 검정(Chi-square analysis)을 실시하였다(Table 2). 그 결과 멘델의 법칙에 맞게 brazzein 유전자가 single copy로 도입된 개체는 B1과 B2 식물체로 2개체를 선발하였고, thaumatin

Table 2 Chi-square analysis in T1 generation after transformation with brazzein, thaumatin and miraculin in lettuce. χ^2 -test for resistant and susceptible strains, estimated with the bar-strip test

T1 Seeds generation	Total seeds	Result of basta treatment ^{a)}		χ^2 -test	P-value	
		No. of resistance	No. of susceptible			
Brazzein	B1	123	97	26	0.97	0.50 < P < 0.20
	B2	105	78	27	0.028	0.95 < P < 0.80
	B3	98	89	9	13.06	P < 0.005
Thaumatin	T1	189	161	28	10.45	P < 0.005
	T2	201	143	58	1.45	0.50 < P < 0.20
Miraculin	M1	122	87	35	0.88	0.50 < P < 0.20

^{a)}14 days after sowing in 1/2 MS medium containing 3 mg/L PPT

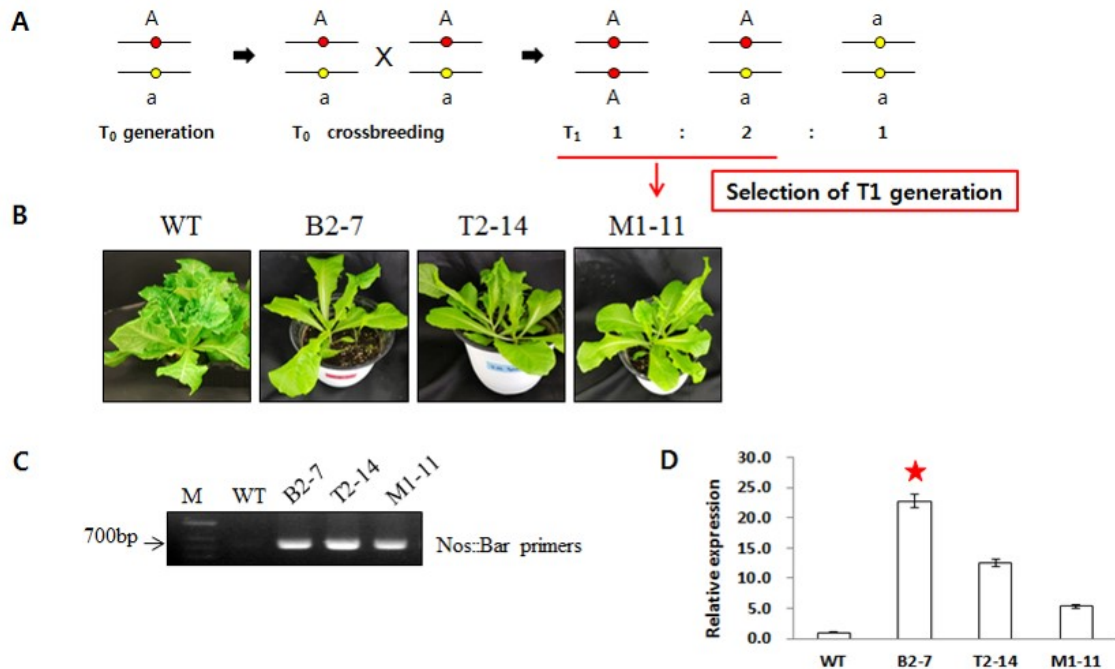


Fig. 8 (A) Schematic diagram for breeding of homo and hetero lines. (B) Phenotype of wild-type (WT) and T1 generation plans. (C) PCR analysis of T1 homo and hetero lines with bar and nos terminator primers. M, molecular marker; WT, wild type; B2-7, brazzein T1 generation; T2-14, thaumatin T1 generation; M1-11, miraculin T1 generation. (D) Quantitative RT-PCR analysis of wild-type (WT) and T1 generation plants

및 miraculin 유전자가 single copy 로 도입된 개체는 T1과 M1 식물체로 각각 1개체씩 선발하였다(Table 2). 이들 식물체로부터 후대육성을 통하여 저항성으로 분리된 homo 및 hetero 선발 개체인 B2-7, T2-14, M1-11은 각각의 감미단백질 유전자가 도입되어 안정적으로 발현하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 8). 감미단백질 유전자인 brazzein, thaumatin, miraculin이 도입된 형질전환 상추 후대로부터 안정적으로 발현량이 높은 유전자는 brazzein 유전자가 도입된 식물체로 나타났다(Fig. 8). 이상의 결과로부터 얻어진 brazzein, thaumatin 및 miraculin 단백질 생산 형질전환체는 감미단백질 생산이 가능하고 산업적으로 이용 가능한 계통으로 사료된다. 따라서 본 연구는 형질전환 상추로부터 감미단백질 생산 가능성을 확인하였고, 향후 이들 식물체를 이용하여 homo 후대계통 육성 및 감미단백질의 생산에 이용하고자 한다.

고 찰

당(suger)은 우리 몸에 필수 에너지원으로 당 섭취량이 부족하면 기억력 저하를 가져온다. 하지만, 매년 당 섭취량이 증가함에 따라 비만, 당뇨병과 같은 수많은 복합성 질병을 유발한다고 보고된다. 한때 부의 상징이었던 당은 웰빙의 영향으로 건강한 삶을 바라는 현대인들에 의해 설탕을 대체할 새롭고 건강한 당으로 변화하고 있다. 인공 감미료는 설탕

대안으로 사용될 수는 있지만 여전히 좋지 않은 영향을 미친다고 하였다(Kant, 2005; Sun et al. 2006; Price et al. 1970; Akter et al. 2016). 따라서 본 연구에서는 천연 유래 과실에서 생산하는 감미단백질을 당과 인공 감미료의 대체 방안으로 생각하고 감미단백질을 상추에 도입한 후 발현 여부를 분석하여 안정적 발현하는 계통을 육성하고자 하였다. 과실에서 생산하는 천연 감미단백질의 양은 매우 적으며 재배에도 어렵기 때문에 형질전환방법을 사용한 대체 생산 시스템을 이용하여 대량생산의 가능성을 검토하고자 하였다. 식물 발현 시스템은 형질전환 후대 종자의 유용단백질의 안정적 발현과 장기간 보관이 가능하며, 식물세포는 박테리아에서 볼 수 없는 글리코실화 반응과 같은 복잡한 단백질 번역 후 변형(Post-translational modification)이 잘 일어나지 않아 유용물질 생산에 가치가 있다고 보고된다(Lamphear et al. 2005; Sun et al. 2007; Lee et al. 2018). 본 연구에서는 감미단백질의 이용 가능성을 높이기 위해 brazzein, thaumatin 및 miraculin 유전자를 식물에 도입하여 얻어진 형질전환 상추로부터 유전자의 안정적 발현 및 후대 육성을 수행하였다. 또한 도입 유전자마다 감미단백질의 발현이 가장 높은 계통을 선발하고 후대 종자를 확보하였다. 이들 계통은 감미단백질의 높은 생산을 위한 대량 생산 시스템을 구축하는데 이용 가능 할 것으로 생각되며, 향후 본 계통을 이용하여 탱크배양용 세포주 육성 및 양약 재배용 상추 육종 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

적 요

감미료(sweetener)는 단맛을 느끼게 하는 첨가물 중 하나로 인공감미료와 설탕이 대표적이며, 단맛의 특성을 지닌 감미 단백질도 잘 알려져 있다. 본 연구는 천연 감미 단백질, brazzein, thaumatin 및 miraculin의 안정적인 생산을 위해 *Agrobacterium* 방법으로 상추 세포를 형질 전환시켰다. 감미 단백질을 코딩하는 합성 유전자들은 상시적으로 발현하는 프로모터의 제어 하에 상추에 형질전환 하였다. 형질전환한 잎을 이용하여 RT-PCR 및 Western blot 분석을 실시한 결과 감미 단백질이 안정적으로 발현하는 것을 확인하였다. 형질전환 상추에서 발현한 단백질은 단맛을 유발하는 단백질 활성을 가지고 있었다. 이러한 결과는 유전자 재조합 감미 단백질들은 형질전환한 상추에 잘 발현된 것을 보여 주며, 이들 생산 시스템은 식물로부터 감미단백질 생산을 위한 좋은 대안이 될 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호: 213007-05-1-SBD30)에 의해 이루어진 것임.

References

- Akter S, Huq MA, Jung YJ, Cho YG, Kang KK (2016) Application of sweet and taste modifying genes for development in plants: current status and prospects. *J Plant Biotechnol* 43:397-404
- Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Cheng H, Markley JL (2000) Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. *Arch Biochem Biophys* 376:252-258
- Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Markley JL (2000) Sweetness Determinant Sites of Brazzein, a Small, Heat-Stable, Sweet-Tasting Protein. *Arch Biochem Biophys* 376:259-265.
- Assadi-Porter FM, Patry S, Markley JL (2008) Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. *Protein Expr Purif* 58:263-268
- Berlec A, Jevnikar Z, Majhenic AC, Rogelj I, Strukelj B (2006) Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biot* 73:158-165
- Berlec A, Strukelj B (2009) Large increase in brazzein expression achieved by changing the plasmid/strain combination of the NICE system in *Lactococcus lactis*. *Lett Appl Microbiol* 48:750-755
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6:219-226
- Faus I (2000) Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Appl Microbiol Biot* 53:145-151
- Farbman AI, Ogden-Ogle CK, Hellekant G, Simmons SR, Albrecht RM, Van Der Wel H: Labeling of sweet taste binding sites using a colloidal gold-labeled sweet protein, thaumatin. *Scanning Microsc.* 1987, 1 (1): 351-7
- Howard JA, Hood E (2005) Bioindustrial and biopharmaceutical products produced in plants. *Adv Agron* 85:91-124
- Hwang-Bo J, Kyung Ok Jang, Hayoung Chung, Jong-Hwa Park, Tae Hoon Lee, Jiyoung Kim and In Sik Chung (2016) Anti-inflammatory Effect of *Lactuca sativa* L. Extract in Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Improvement of Lipid Levels in Mice Fed a High-fat Diet. *Korean J. Food Nutr.* 29(6) 998-1007
- Hood EE, Jilka JM (1999) Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Opin Biotech* 10:382-386
- Hood EE, Woodard SL, Horn ME (2002) Monoclonal antibody manufacturing on transgenic plants-myths and realities. *Curr Opin Biotech* 13:630-635
- Horn ME, Woodard SL, Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep* 22:711-720
- Jo HJ, Noh JS, Kong KH (2013) Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expres Purif* 90:84-9
- Jung YJ, Bae SS, Lee GJ, Seo PJ, Cho Y G, Kang KK (2017) A novel method for high-frequency genome editing in rice, using the CRISPR/Cas9 system. *J Plant Biotechnol* 44:89-96
- Jung YJ, Nogoy FM, Cho Y G, Kang KK (2015) Development of high tryptophan GM rice and its transcriptome analysis. *J Plant Biotechnol* 42:186-195
- Jung YJ, Nou IS, Kang KK (2014) Overexpression of Oshp16.9 gene encoding small heat shock protein enhances tolerance to abiotic stresses in rice. *Plant Breed Biotech* 2(4):370-379
- Kant R (2005) Sweet proteins, potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutrition* 4:5
- Kurihara Y, Beidler LM (1968) Taste-modifying protein from miracle fruit. *Science* 161:1241-1243
- Lamphear BJ, Barker DK, Brooks CA, Delaney DE, Lane JR, Beifuss K, Love R, Thompson K, Mayor J, Clough R, Harkey R, Poage M, Drees C, Horn ME, Streatfield SJ, Nikolov Z, Woodard SL, Hood EE, Jilka JM, Howard JA (2005) Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener. *Plant Biotechnology Journal* 3:103-114
- Lee JJ, Kong JN, Do HD, Jo DH, Kong KH (2010) Design and efficient soluble expression of a sweet protein, brazzein and minor-form mutant. *B Kor Chem Soc* 31:3830-3833.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee YR, Akter S, Lee IH, Jung YJ, Park SY, Cho Y-G, Kang KK, Jung YJ (2018) Stable expression of brazzein protein, a new

- type of alternative sweetener in transgenic rice. *J Plant Biotechnol.* 45:63-70
- Liu X, Hu Z, Maeda S, Aiuchi T, Nakaya K, Kurihara Y (1993) Purification, complete amino acid sequence and structure characterization of the heat stable sweet protein, mabinlin II. *Eur J Biochem* 211:281-287
- Price JM, Biava CG, Oser BL, Vogin EE, Steinfield J, Ley HL (1970) 'Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin'. *Science* 167:1131-1132
- Masuda T, Kitabatake N (2006) Developments in biotechnological production of sweet proteins. *J Biosci Bioeng* 102:375-389
- Masuda T, Ueno Y, Kitabatake N (2001) Sweetness and enzymatic activity of lysozyme. *J Agr Food Chem* 49:4937-4941
- Ming D, Hellekant G (1994) Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra byamarazzeana* B. *FEBS Lett* 355:106-108
- Moris JA, Cagan RH (1972) Purification of monellin, the sweet principal for *Dioscoreophyllum cumminsii*. *Biochim Biophys Acta* 261:114-122
- Rachid A, Belloir C, Chevalier J, Desmetz C, Miller ML, et al. (2009) Optimization of the Production of Recombinant Brazzein Secreted by the Yeast *Pichia pastoris*. *Chem senses* 34:A80-A80
- Ren YL, Zhou YW, Ye YH. 2004. Chemical components of *Lactuca* and their bioactivities. *Acta Pharmaceutica Sinica* 39:954-960
- Shirasuka Y, Nakajima K, Asakura T, Yamashita H, Yamamoto A, Hata S, Nagata S, Abo M, Sorimachi H, Abe K (2004) Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci Biotech Bioch* 68:1403-1407
- Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H (2006) Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett* 580:620-626
- Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* 5:2-15
- Sun HJ, Kataoka H, Yano M, Ezura H (2007) Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *Plant Biotechnol J* 5:768-777
- Streatfield SJ, Howard JA (2003) Plant-based vaccines. *Int J Parasitol* 33:479-493
- Thole V, Alves SC, Worland B, Bevan MW, Vain P (2009) A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (FSTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants. *Nature* 4:650-661
- Van der Wel H (1972) Isolation and characterization of the sweet principal for *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels. *FEBS Lett* 21:88-90
- Van der Wel H and Loeve K (1972) Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem* 31:221-225
- Van der Wel H, Larson G, Hladik A, Hladik CM, Hellekant G, Glaser D (1989) Isolation and characterization of pentadin, the sweet principle of *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Chem Senses* 264:6655-6659
- Yan S, Song H, Pang D, Zou Q, Li L, Yan Q, Fan N, Zhao X, Yu H, Li Z, Wang H, Gao F, Ouyang H, Lai L (2013) Expression of Plant Sweet Protein Brazzein in the Milk of Transgenic Mice. *PloS one* 8:e76769
- Yamashita H, Theeraship A, Nakaya T, Nakamura Y, Kurihara Y (1990) Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein with taste-modifying activity, curculin. *J Biol Chem* 265:15770-15775
- Yoshida K, Shinmyo A (2000) Transgenic expression systems in plants, a natural bioreactor. *J Biosci Bioeng* 90:353-362
- Zemanek EC, Wasserman BP: Issues and advances in the use of transgenic organisms for the production of thaumatin, the intensely sweet protein from *Thaumatococcus daniellii*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995, 35(5):455-66