

인체 모유 단백질 및 영양 성분 강화 고부가가치 기능성 쌀 생산 벼 품종 개발 전략

^{1*}임성렬, ¹이진형, ²이효연, ³서석철,
¹강원도 춘천시 한림대학교 자연과학대학 생명과학부, ²전남 순천시 순천대학교
농업생명과학대 자원식물과, ³경기도 수원시 농진청 농업생명공학 연구원

Development Strategy for functional rice improved with human lactoferrin and enhancement of nutrient compounds

^{1*}Seong-Lyul Rhim, ¹Jin-Hyoung Lee, ²Hyo-Yeon Lee, ³Suk-Cheol Suh,
¹Department of Genetic Engineering, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea
²Department of Agronomy, Sunchon National University, Suncheon, 540-742, Korea
³National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, 441-707, Korea
*Corresponding Author

Abstract

A strategy for development of a functional rice improved with human lactoferrin and enhancement of nutrient compounds was planned. For the purposes we have cloned and characterized a human lactoferrin cDNA from human mammary gland cDNA library. A endosperm storage vacuole targeting sequence and the cDNA fragment was linked to endosperm specific glutelin promoter. The fusion gene fragment was inserted into a binary vector containing MAR gene. In addition a new β -galactosidase gene from *Bifidobacterium* of human was used as a reporter gene in the vector system. Rice plants showing a high concentration of amino acids in the endosperm cells were developed by using a biochemical mutation and bred for the transformation with the binary vector system. Finally we have established a transformation method for the rice endosperm cells.

서 론

락토페린(lactoferrin)은 포유류 젖에서 높은 농도로 발견되는 철 이온이 결합되는 당 단백질이며, 담즙과 눈물과 같은 외분비선액에도 존재한다(Masson et al., 1968). 인체 모유 락토페린 분자는 약 700개의 아미노산 잔기를 포함하고(대략적 Mr 80,000) 있으며, 두 개의 구형 lobe로 되어 구성되어 있다(Legrand et al., 1984). Lactoferrin은 인간 모유에서 중요한 보호 기능을 가지고 있는데, 철과의 결합 특성에 기초하여, Lactoferrin은 세균의 철 이용을 방해하여 세균의 발육을 저지하는 작용을 한다(Arnold et al., 1981). 그리고, 고리형의 18개의 아미노산 잔기로 구성되어진 특이적 항균성 영역도 지니고 있다(Bellamy et al., 1992). 이 peptide 영역은 *E. coli*의 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다(Saito et al., 1991). 이러한 작용이외에 락토페린은 myelopoiesis의 조절에 중요한 역할을 하며(Broxmeyer et al., 1991), 염증 반응 조절(Oseas et al., 1981), lymphocytes에 필수 성장인자이고(Hashizume et al.,), DNA 결합(Bennet and Davis, 1982)과 RNase cleavage(Furmanski et al., 1989)에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 항균 및 면역 조절 기능을 지니고 있어서, 영양 및 의약품 개발 측면에서 많은 관심이 집중되어 오고 있다. 이러한 락토페린을 최근에 식물체에서 발현 시켜 의학적 측면에서 사용하고자하는 연구들이 수행되어지고 있으며(Chong et al., 2000; Salmon et al., 1998; Mitra and Zhang, 1994), 특히, 감자 식물체에서 발현된 락토페린은 몇가지 병원성 미생물에 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Chong et al., 2000). 그러나, 아직

가장 중요한 농작물인 벼에서 락토페린 유전자의 발현에 관한 연구는 없는 상태이다. 또한 쌀에는 인체에 필요한 아미노산 함유량이 적어 영양적 측면에서 강화해야 할 점들이 많다. 그러므로, 본 연구에서는 락토페린 및 영양 성분이 강화된 벼 품종을 개발하기 위해서, 우선 쌀에 부족한 트립토판을 많이 생산하는 벼 품종을 들연변이 처리에 의해 변이주를 선발 육종하여 얻어진 품종에 락토페린 유전자와 트립토판 합성 유전자를 도입하여 새로운 기능성을 지닌 벼 품종을 개발하고자 한다.

결과 및 토의

인체 모유 락토페린 cDNA 클로닝 및 염기 서열 분석

human mammary gland cDNA library를 *E. coli*에 infection시켜 얻어진 plaque로부터, 다량의 lambda DNA를 분리한 다음, sephadex-50 mini column으로 정제하였다. 제된 DNA를 template로 해서 lactoferrin cDNA 염기서열의 5'-end region sequence와 3'-end region sequence의 20 base를 primer로 이용하여, PCR 방법으로 lactoferrin cDNA를 분리하였다. 분리한 cDNA를 mini column으로 정제한 다음, pBlueScript의 *Kpn*I과 *Hind*III site에 연결하였다. T7-/T3-primer와 BigDye로 labelling된 nucleotide를 이용하여 각각 증폭한 다음, ABI사의 DNA-Sequencer를 이용하여 염기서열을 규명하였다. 염기서열로부터 유추된 cDNA는 711개의 아미노산을 코딩하는 것으로 밝혀졌다.

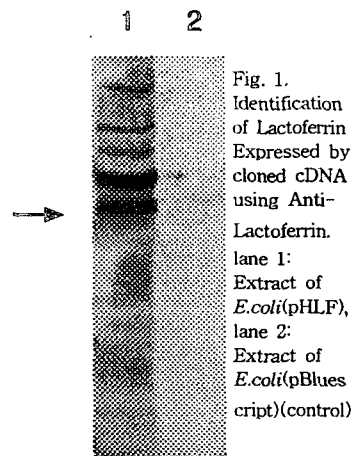


Fig. 1. Identification of Lactoferrin Expressed by cloned cDNA using Anti-Lactoferrin. lane 1: Extract of *E. coli*(pHLF), lane 2: Extract of *E. coli*(pBlue script)(control)

Lactoferrin cDNA의 발현 검증

클로닝된 cDNA가 lactoferrin을 생산하는지 확인하기 위해서 클로닝된 cDNA를 *E. coli*에 도입하여 형질 전환 시켰다. 형질전환된 *E. coli*의 total protein을 추출하여 전기 영동을 실시한 후 poly clonal anti-lactoferrin을 이용하여 western blot analysis를 실시하였다(Fig. 1). 실험 결과 클로닝된 cDNA는 인체 모유 락토페린을 생산하는 것으로 판명되었다.

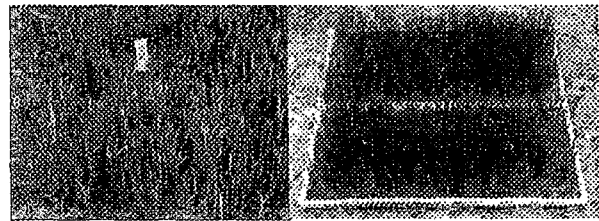


Fig. 2. Chlorophyll mutants induced by EMS treatment at 2 hours after flowering in Rice cultivars A and B
A. Dongjin B. up: Sea An, down: Ill Pum

아미노산 아날로그 저항성 식물체의 선발

수분, 수정기에 들연변이 처리에 의해 Chlorophyll 변이가 가장 많이 발생한 처리구의 M3 세대의 종자를 이용하여 라이신계, 프로린계, 트립토판계 아날로그에서 저항성 식물체를 선발하였다. 들연변이 처리에 의해 Chlorophyll 변이의 발생빈도는 개화 2시간 후에 가장 많았다. 개화 2시간 후의 EMS 처리구로부터 수확된 M3 벼 종자를 아미노산아날로그인 AEC, PFP, 5MT가 포함된 수경액에 각각 파종한 결과 저항성으로 판단되는 유묘가 AEC 4개, PFP 10개, 5MT 8개 선발되었다 (Fig. 2, 3).

벼 배유 세포의 형질전환

벼 배유 세포의 형질 전환체를 얻기 위해서 GUS 유전자가 존재하는 Binary Vector를

*Agrobacterium*를 이용하여 벼 배유 세포의 배상체 캘러스에 접종하였다. 접종된 캘러스를 배지 위에서 배양하여 형질 전환체를 선발하여 형질 전환 효율을 측정하였다. 형질 전환체 선발 배지 위에서 선발된 식물체들은 약 50%의 형질 전환율을 나타내었다. 이로서, 벼 배유 세포 형질 전환을 위해서 Binary Vector System을 이용한 *Agrobacterium* 접종에 의한 형질 전환 방법을 확립하였다. 그리고, 이 방법에 의해 선발된 벼 배유세포의 캘러스를 확인할 수 있었다 (Fig. 4 and 5).

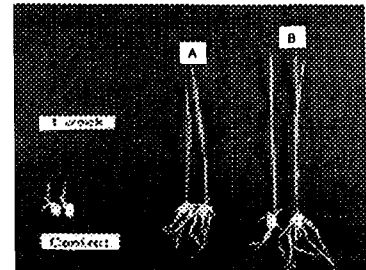


Fig. 3. Aminoethylsystiene(AEC) resistant seedlings selected from mutagenized M3 seeds. Seedlings of AEC resistant (A, B) and of the original variety 'DonJin, in nutrient solution with AEC for 1 week.

인체무해 형질 전환체 선발 마커 개발

생물 분야 인터넷 정보 사이트를 검색하여 현재 사용되고 있는 식물체 형질 전환 선발 marker들을 수집한 결과 33개의 선발 marker 유전자를 수집하였고, 이들 대부분은 인체에 해로운 가능성이 있는 항생제와 제초제를 기초로 한 선발 마커였다. 이러한 선발 마커는 GMO 규제 대상이 될 가능성이 있으므로, 인체 무해하며, 실용화가 가능한 벼 형질 전환체 선발 marker 유전자를 선정하도록 하였다. 여러 분석 결과 우리

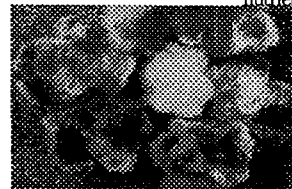


Fig. 4. Callus of rice endosperm cells transformed via *Agrobacterium* with plasmid pSBM-LS9 containing GUS gene



Fig. 5. Shooting from callus of rice endosperm cells transformed via *Agrobacterium* with plasmid pSBM-LS9

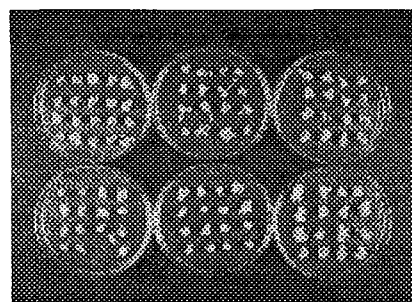


Fig. 6. Test of β -galactosidase for the selection marker in rice transgenic plants. A: Dong-Jin, B: Il-Pum, C: Hwa-Young

나라 성인에서 분리되었고, 인체에 유익한 유산균인 *Bifidobacterium*에 존재하는 β -galactosidase gene을 사용하기로 하였다. 이는 인체에 유익한 유산균의 유전자임으로 농작물에 응용시 인체에 유익하게 작용할 뿐만 아니라, x-gal 배지 위에서 쉽게 선발 할 수 있는 장점이 있기 때문이다. 선정된 선발 마커 유전자를 벼 형질 전환체 선발에 사용 가능 여부를 확인하기 위해서, 벼 식물체 배양 배지 위에 x-gal(20ug/ml)을 혼합해준 후, 세 가지의 공시재료 벼의 캘러스를 치상한 후, 배양하여 직접 발현 여부를 확인하였다(Fig. 6). 공시 재료 벼 callus들은 x-gal이 함유된 배양 배지에서 x-gal을 분해하지 못하는 것으로 판명되어, 본 실험에서는 벼 형질전환체 선발 마커로 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

식물체 형질 전환 벡터 제조

인체 모유 lactoferrin cDNA를 벼에 도입하기 위하여, *Agrobacterium*을 이용한 형질 전환 벡터를 제작하였다. 즉, rice endosperm cell glutelin promoter에 storage vacuole targeting sequence를 연결한 다음, lactoferrin cDNA의 mature region을 reading frame에 맞게 ligation 시켰다. 제작된 fusion gene fragment를 MAR(matrix attachment region)이 포함된 binary vector에 삽입하였다. 이와 아울러 lactoferrin이 인체에 섭취된 후 장내 세포에 좀더 효율적으로 흡수되게 하기 위해서 TAT(trans activator) sequence를 제작된 fusion gene fragment에 연결하였다. 그리고, 새로 선정된 유산균 β -galactosidase gene를 repoter gene으로 사용할 수 있게 제작하였다.