

Plastid 형질전환에 의한 유용 농작물 개발

이승범

농업생명공학 연구원 유전자 제어공학과

작물 개발에는 여러 가지 방법이 있을 수 있다. 과거에는 교배에 의한 재래 육종 방법을 이용해서 작물을 개발하였다. 20세기 후반부터 유전자 재조합 기술의 발달로 유용 유전자만을 운반체에 재조합하여 식물체로 형질전환하는 새로운 기술이 작물 육종에 이용되기 시작했다. 그러나 최근에는 고등 식물체가 가지는 독특한 색소체 (Plastid) 내에 유전자를 도입하는 기술이 보고되면서 종래의 핵 (nucleus)내 형질전환에 보완적인 여러 가지 장점들을 제시하고 있다. 엽록체는 색소체 중의 하나로 그 유전자는 모계유전을 한다. 엽록체로 형질전환된 유전자는 후대에 분리가 일어나지 않으며 그리고 꽃가루에 의한 다른 식물체로의 타가수분이 일어나지 않는 등 GM 작물의 생태계 환경에 대한 위해성을 줄일 수 있다고 본다. 엽록체는 잎 조직에 주로 존재하며 세포 분열이 왕성한 시기에는 엽록체 DNA 분자는 수천에서 수만에 이르기기도 한다. 이렇게 많은 DNA 분자 복제수는 외부에서 삽입된 유전자의 복제수도 많게 하여 유전자 발현 양을 높이는 효과를 나타낸다고 본다. 그래서 엽록체 형질전환으로 작물을 개발할 경우 Molecular farming처럼 유용 단백질 (의약품 호르몬, 백신, 항암 단백질)을 작물을 통해 대량 생산해낼 수 있다고 보며 핵 형질전환에서 도입 유전자의 소량 발현 문제를 해결할 수 있다고 본다. 도입 유전자의 발현 양이 부족해서 효과를 보지 못한 작물에도 이 Plastid 형질전환 기술을 이용하여 좋은 작물을 육종해낼 수 있다고 본다.

본다. 이 Plastid는 유전물질인 DNA를 가지고 있으며 미토콘드리아와 같이 세포질 유전에 관여하며 모계유전을 한다. Plastid DNA 구조는 prokaryote세포 DNA와 비슷하며 AT-rich한 조성으로 되어 있다. Plastid DNA는 폐쇄 환상형으로 그 크기는 120~160 Kb 정도의 크기며 120여 종의 유전자들이 이 Plastid DNA 상에 있다. 엽록체의 경우 잎 조직의 발달이 왕성할 때 한 세포당 100개 정도 존재하고 이 엽록체 한 개당 DNA 분자가 50~100개 존재한다. 그래서 세포당 엽록체 DNA 분자 수는 5,000~10,000개 정도 된다고 본다. plastid 유전자 발현 양상도 prokaryote세포의 발현 양상과 비슷하여 polycistron으로 전사하며 promoter 부위의 -10과 -35 부위가 비슷하여 엽록체 promoter는 대장균에서도 잘 작동한다. 단백질 생합성시 이용하는 ribosome subunit는 핵이 이용하는 80S가 아닌 70S로 대장균의 것과 같다.

엽록체 형질전환 기작

엽록체 형질전환은 상동성 재조합 (Homologous recombination)에 의해서 외래 유전자가 엽록체 DNA 분자 내로 삽입된다고 알려졌다. 이 homologous recombination은 yeast와 같은 미생물에서는 오래 전에 유전자 전환의 한 방법으로 널리 사용되었다. 엽록체 DNA 단편 일부를 분리해서 이 DNA 단편을 flanking 염기서열로 homologous recombination을 유도하여 엽록체 DNA내로 외래 유전자를 삽입시

색소체 (Plastid)의 특징

색소체는 엽록체, 백색체 등을 통틀어 말하는 것으로 식물 조직 또는 기관에서의 역할에 따라 이름을 다르게 한다. 대표적으로 엽록체는 잎조직에 있는 세포에 주로 많이 있으며 광합성에 주로 관여하며, 백색체는 Non-Green Plastid라 하여 전분을 저장하는 amyloplast라는 미소기관으로 감자에 많이 존재하며, 꽃잎이나 과피에 존재하는 Plastid를 chromoplast라 한다. 지방을 저장하는 종자에는 elaioplast라 하며 유채와 같은 종실에 많이 존재한다. 그리고 암 상태에서 배양한 캘러스 세포에는 Etioplast라는 Plastid가 존재한다. 이모든 Plastid는 종자발아와 같은 초기 분열시 proplastid라는 미발달 Plastid에서 출발하여 기관 분화에 맞추어 발달된다고

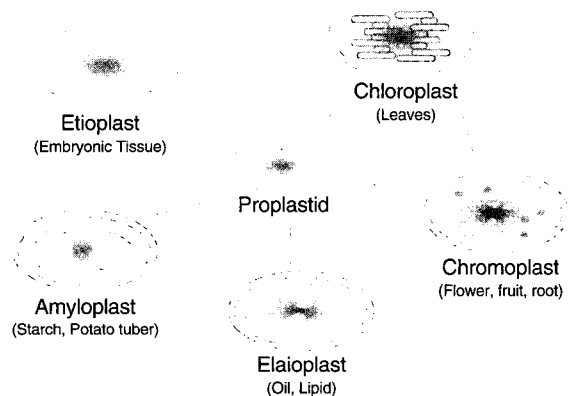


Figure 1. 색소체(Plastid)의 분화 및 종류.

키는 기작이다. 이때 삽입되는 유전자 위치는 고정되어 정해진 위치에 유전자가 삽입된다. 그러므로 유전자의 삽입이 random 하게 일어난다고 보는 핵 형질전환에서의 position effect와 같은 영향은 없다고 본다. 그래서 엽록체 형질전환에서 얻어진 전환식물체는 선발 항생제에 대한 내성을 보이는 mutant가 아닌 이상 모두 같은 형질전환체라고 볼 수 있다. 엽록체 형질전환은 homologous recombination에 의해서 일어나므로 실험자가 삽입하고 싶은 엽록체 유전자 위치에 유전자를 삽입할 수 있다. 그러나 주변 유전자에 손상을 일으키지 않도록 엽록체 운반체 제작을 해야 할 것으로 본다.

엽록체 형질전환 운반체 구성

엽록체 형질전환 운반체의 구성은 먼저 엽록체 DNA로부터 border 염기서열로 사용할 DNA 단편을 분리해 내야 한다. 이 단편은 엽록체 형질전환시 homologous recombination을 일으켜 엽록체 DNA 내로 삽입시키는 역할을 한다. 이 border 염기서열의 분리는 형질전환체를 만들고 싶은 작물로부터 분리하는 것이 최적합하다고 본다. Homologous

***Homologous recombination**

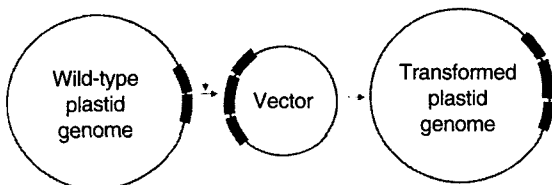


Figure 2. 엽록체 DNA의 상동성 재조합(Homologous recombination) 기작 모식도.

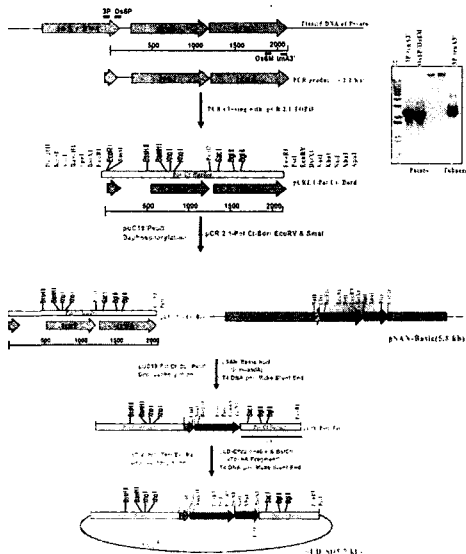


Figure 3. PCR을 이용한 엽록체 DNA border 분리 및 운반체 제작 과정.

Plasmid	Gene Location	Protein Location	Expression concentration (~% tsp)
wrg4747	Nucleus (CTP)	Chloroplast	ND-0.025
wrg4776	Nucleus (ER)	ER	0.004, 0.008
wrg4838	Chloroplast	Chloroplast	0.2
pMON38755	Chloroplast	Chloroplast	1.0
pMON38794	Chloroplast	Chloroplast	7.0

Nat/Biot (Vol. 18Mar/2000) Jeffrey M. Staub. et al

recombination은 homology가 높을수록 재조합 효율이 높다고 보기 때문이다. 엽록체 DNA는 식물체마다 서로 많은 부분이 높은 homology를 가지기 때문에 서로 교차적으로 운반체로 사용할 수 있다고 보지만 자기 자신만큼의 homology가 아니기 때문에 그 효율이 떨어진다고 본다. 그 단편 크기는 아직 정해지지 않았지만 지금까지 사용한 운반체에서 보면 2.0 kb에서 4.6 kb 범위 내에서 사용하고 있다. 양쪽 border 염기서열의 길이를 비슷하게 하는 위치에, 그러면서 coding 부위는 피해서 선발 마커 유전자 카세트를 삽입하면 기본 엽록체 운반체로 사용 가능하다. border 염기서열 분리는 기보 고된 전체 엽록체 유전자 지도에서 목적하는 엽록체 단편을 제한효소로 처리하여 cloning과 subcloning을 해도 좋지만 primer를 디자인하여 PCR을 이용하는 것이 용이하다. 기본 엽록체 운반체에 목적하는 유용유전자를 마커 유전자와 terminator 사이의 cloning site에 삽입하면 마커 유전자 카세트에 부착된 엽록체 특이 promoter에 의해 삽입 유용 유전자도 mRNA가 만들어지고 유전자발현이 이루어진다. 이 때 사용한 promoter와 terminator 역시 엽록체 특이 promoter를 사용하므로 핵으로 삽입되더라도 promoter로서의 작용을 하지 못한다. 엽록체 DNA는 발현 양상이 prokaryote와 유사하기 때문에 한 promoter에 의해 여러 개의 전사체를 만드는 polycistron이다. Monocistron 발현 양상을 가지는 핵 형질전환에서처럼 도입할 유전자마다 promoter와 terminator를 따로 부착할 필요는 없다. 선발마커 유전자는 spectinomycin 저항성 유전자인 aadA (adenosyl-3'-adenyltransferase)가 많이 사용되었고 Kanamycin도 사용된 적이 있지만 NPTII (Neomycin phosphotransferase II) 유전자 경우 선발 효율이 낮은 이유로 지금은 사용하지 않는다. 비 항생제 선발 마커 유전자로 제조제 저항성인 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) 유전자의 사용 예와 BADH (betain aldehyde dehydrogenase) 유전자를 사용한 예가 있다. 대장균 내에서의 유전자 재조합과 운반체 복제를 위해 사용한 골격 벡터는 pUC18 또는 pBlueScript 벡터를 사용했다. 그러나 highcopy 운반체인 대장균 벡터는 어떤 것을 사용해도 문제 없다고 생각한다.

엽록체내 유전자발현

엽록체 유전자의 발현은 알려진 대로 prokaryote의 발현양상을 따른다. 엽록체 특이 promoter로 많이 사용되는 Prm 역시 -10 과 -35 위치의 염기서열이 대장균 promoter들과 매우 유사하며 이 promoter 역시 대장균내에서 promoter로서의 역할을 잘한다. 엽록체 promoter는 두 가지형의 RNA polymerase를 특이적으로 이용하는데 Plastid encoded RNA polymerase (PEP)과 Nucleus encoded RNA polymerase (NEP)이다. PEP을 이용하는 Prm은 강력한 operon promoter로 알려져 있고 이 promoter에 의해서 하류의 ribosomal RNA 들을 전사해 낸다. 전사된 mRNA로부터 단백질을 생합성할 때 역시 prokaryote의 것과 같은 70S Ribosome을 이용하여 단백질을 합성한다. mRNA 전사체에는 rbs (ribosome binding site)인 GGAGG 라는 consensus 염기서열을 필요로 하며 이 부분이 결손되었을 때는 단백질 생산량이 아주 적게 생산된다. 최근의 한 보고에서는 엽록체 유전자중 UTR (untranslation region) 부분을 삽입 유전자의 5' 또는 3'에 부착했을 때 단백질 생산량이 rbs만 있는 것 보다 더 많은 단백질을 생산했다는 보고도 있다. 단백질 생산량의 차이는 여러 가지 원인이 있을수 있는데 염기 조성과 codon usage도 발현에 영향을 미치는 것으로 나타난다. 엽록체 DNA는 AT-

rich 하며 codon usage도 Eucaryote 보다 prokaryote의 codon으로 발현이 더 잘 된다고 보고했었다. 그래서 *Bacillus thuringiensis*의 Bt 유전자는 하등 미생물 유전자로 담배 엽록체에서 7%이상의 TSP (total soluble protein)을 생산했다고 보고했다. 그러나 고등동물인 사람의 somatotropin 유전자의 경우 엽록체내 단백질 발현이 최적 조건의 재조합 운반체에서 7% TSP로 보고한 결과도 있고 동물의 antibody의 haevy chain과 light chain의 경우 아주 미약하게 발현된 경우도 있었다. 그래서 지금까지의 연구결과로 어떤 종류의 유전자가 엽록체 발현에 더 적합한지에 대한 결론을 내리기는 어렵다.

엽록체 형질전환의 문제점

보고된 지금까지의 엽록체 형질전환 기술은 여러 가지 장점이 있고 전망도 있어 보인다. 그러나 몇 가지 문제점을 생각해 볼 수 있다. 핵 형질전환에 비해 전환율이 낮고 아직까지 담배 작물 외에는 엽록체 형질전환 결과 보고가 1편 정도에 머무르고 있어, 다른 농업적 가치가 있는 작물에서의 엽록체 형질전환은 많은 연구가 필요하다고 생각한다. 특히 식물 조직배양에 있어서 재분화 시스템이 확립된 작물에 엽록체 형질전환 시도가 가능하며 현재 사용하고 있는 spectinomycin

Table 1. 사람의 somatotropin 단백질의 엽록체 형질전환 및 핵 발현 양 비교.

Transgene expression strategies and recombinant protein yield					
Transgenic product	Plant host	Promoter	Expression strategy, tissue	Production level (% of total soluble protein)	Reference
Serum Proteins					
Haemoglobin (α and β)	Tobacco	34S (m)	Seed, root	0.05%	Dieryck <i>et al.</i> 1997
Human Serum Albumin	Potato	35S (m)	Constitutive, leaf	0.02%	Sijmons <i>et al.</i> 1990
Protein C	Tobacco	35S	Constitutive, leaf	0.002%	Cramer <i>et al.</i> 1996
Cytokines/lymphokines					
α -Interferon	Rice	Pl'	Constitutive, leaf	Not reported	Zhu <i>et al.</i> 1994
γ -Interferon	Tobacco	NA	Geneware viral-infected leaf	1%	Grill <i>et al.</i> 1997
CM-CSF	Tobacco	Rice glutelin	Seed specific	Not reported	Gantz <i>et al.</i> 1996
Epidermal growth factor	Tobacco	35S (m)	Constitutive, leaf	0.001%	Higo <i>et al.</i> 1993
Lysosomal enzymes					
α -Galactosidase	Tobacco	NA	Geneware/leaf	12.1mg/kg tissue	Grill <i>et al.</i> 1997
Glococerebrosidase	Tobacco	MeGA	Postharvest induced leaf tissues	1%~10%	Cramer <i>et al.</i> 1996
Viral or Bacterial antigens					
<i>E. coil</i> enterotoxin B	Potato	35S (m)	Microtuber	0.03%	Haq <i>et al.</i> 1995
Cholera toxin	Tobacco	35S (m)	Constitutive, leaf	Not reported	Hein <i>et al.</i> 1996
Hepatitis B surf. antigen	Tobacco	35S (m)	Constitutive, leaf	0.07%	Mason <i>et al.</i> 1992
Other proteins					
Hirudin	Canola	Oleosin	Seed specific	0.3% (seed protein)	Parmenter <i>et al.</i> 1995
Antibodies	Tobacco	35S	Constitutive	0.01%~1%	Rev. in Owen and Pen <i>et al.</i> 1996
α -trichosantin	Tobacco	NA	Geneware/leaf	4%~5%	Gumagai <i>et al.</i> 1993
Glutamate decarboxylase	Tobacco	35S (m)	Constitutive, leaf	0.4%	Ma <i>et al.</i> 1997
	Potato	35S (m)	Tuber	0.4%	Ma <i>et al.</i> 1997

Table 2. 핵과 Plastid 형질전환으로 발현된 단백질 생산량 비교.

Protein	TSP concentration	Plasmid	Promoter	5'-UTR	Amino-terminal fusion	Coding region	3'-UTR	Reference
NPTII	1.0%	pTNH32	Prm	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> ; 5 AA	<i>neo</i>	<i>psbA</i>	[12]
NPTII	2.5%	pHK31	Prm	<i>atpB</i>	-	<i>neo</i>	<i>rbcL</i>	[48]
NPTII	7.0%	pHK30	Prm(1)	<i>rbcL</i>	<i>atpB</i> : 14 AA	<i>neo</i>	<i>rbcL</i>	[25 ⁺⁺]
NPTII	4.7%	pHK35	Prm	<i>rbcL</i>	-	<i>neo</i>	<i>rbcL</i>	[48]
NPTII	10.8%	pHK34	Prm(2)	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> : 14 AA	<i>neo</i>	<i>rbcL</i>	[25 ⁺⁺]
NPTII	23.0%	pHK40	Prm	<i>17g10</i>	-	<i>neo</i>	<i>rbcL</i>	[28 ⁺⁺]
NPTII	16.5%	pHK38	Prm	<i>17g10</i>	<i>17g10</i> : 14 AA	<i>neo</i>	<i>rbcL</i>	[28 ⁺⁺]
EPSPS	0.3%	pMON38798	Prm	<i>17g10</i>	-	<i>CP4</i>	<i>rps 16</i>	[26 ⁺⁺]
EPSPS	>10.0%	pMON45259	Prm	<i>17g10</i>	GFP; 14 AA	<i>CP4</i>	<i>rps 16</i>	[26 ⁺⁺]
GFP	5.0%	pMON30125	Prm(3)	<i>rbcL</i>	-	<i>gfp</i>	<i>rps 16</i>	[19]
GFP	5.0%	MR220	Prm(3)	<i>rbcL</i>	-	<i>gfp</i>	<i>rps 16</i>	[20]
AAD-GFP	8.0%	pMSK56	Prm(1)	<i>atpB</i>	<i>atpB</i> : 14 AA	<i>AadA-gfp</i>	<i>psbA</i>	[21]
AAD-GFP	18.0%	pMSK57	Prm(2)	<i>rbcL</i>	<i>atpB</i> : 14 AA	<i>AadA-gfp</i>	<i>psbA</i>	[21]
Ubiquitin-somatotropin	7.0%	pMON38794	Prm	<i>17g10</i>	<i>rbcL</i>	-	<i>rps 16</i>	[27 ⁺⁺]
PAT	>7.0%	pKO3	Prm(1)	<i>atpB</i>	<i>atpB</i> : 14 AA	<i>s-bar</i>	<i>rbcL</i>	[14 ⁺⁺]
PAT	>7.0%	pKO18	Prm(1)	<i>atpB</i>	<i>atpB</i> : 14 AA	<i>b-bar2</i>	<i>rbcL</i>	[14 ⁺⁺]
Cry1Ac	5.0%	pZS224	Prm(3)	<i>rbcL</i>	-	<i>cry1A(c)</i>	<i>rps 16</i>	[38]
Cry2Aa2	3.0%	pZS-KM-cry2A	Bt	-	-	<i>cry2Aa2</i>	?	[8]
Cry2Aa2	45.3%	pLD-BD-Cry2Aa2	2x-Prm	Bt	-	<i>orf1-orf2-cry2Aa2</i>	<i>psbA</i>	[9 ⁺⁺]
20kDa; 29kDa;								
CTB	4.1%	pLD-LH-CTB	2x-Prm	Synthetic GGAGG	-	<i>ctxB</i>	<i>psbA</i>	[11]

*Identical Prm derivatives (PL cassettes) in different constructs are identified by arbitrary number. Prm derivatives that are not numbered are unique in some detail of the PL cassette. Same origin of 5'-UTR does not mean identical 5'-UTR sequences. For example, plasmids pTNH32 and pHK35 are listed to encode a *neo* gene with a *rbcL* 5'-UTR. However, the actual *neo* mRNAs 5'-UTR encoded in plasmid pTNH32 includes 18 nucleotides of *rbcL* 5'-UTR fused with 34 nucleotides of the *rm* transcript, whereas the pHK35-encoded *neo* 5'-UTR includes 58 nucleotides of the 182-nt native *rbcL* 5'-UTR. AA, amino acids.

cin 저항성 유전자를 주로 많이 사용하므로 작물 세포 자체가 spectinomycin 내성이 있으면, 또 다른 선발 마커를 개발해서 엽록체 형질전환에 이용해야 한다. 먼저 유전자총(Biostic)에 의한 형질전환 조건을 확립해야 한다. 유전자총을 이용한 형질전환의 경우 사용한 엽록체 형질전환 운반체 단편이 핵 내로 삽입될 경우도 있을 수 있으며 삽입된 운반체의 DNA 단편이 핵유전자의 발현에 영향을 줄 수 있어 엽록체 형질전환 개체이면서 동시에 핵 유전자 변이체가 출현할 가능성이 있다. 그러므로 후대 검정을 해야 하며 모계와 동일한 표현형을 선발해야 하는 경우도 있다. 엽록체 운반체 제작에 있어 한 작물에 사용한 엽록체 운반체를 다른 작물에도 그대로 운반체로 사용 가능한지 여부는 앞으로의 연구결과들에서 밝혀지겠지만, homologous recombination에 의한 형질전환이므로 우선 작물 각각의 엽록체 운반체를 만들어 사용하는 것이 최적조건이므로 작물마다 운반체를 제작해야 하는 번거로움이 있다. 또 도입시킬 유전자의 최종 산물이 단백질 그 자체이면 별 문제가 없으나 대사과정에 관여하여 대사산물을 생산하고자 할 경우 엽록체 내에서 그 전구체 또는 기질이 있는지 먼저 조사해 보고 엽록체 형질전환을 수행해야 한다. 엽록체 내에서 만들어진 단백질이 엽록체 막을 통과해 세포질

내로 나오는 기작은 아직 발견되지 못했다. 엽록체로 형질전환하여 발현된 단백질의 기질이 세포질에 있는 경우 그 효소 단백질에 의한 대사 산물은 얻기 힘들며 혹시 엽록체에서 만들어진 대사산물의 기능이 세포질에 있어야 적합한 작용을 할 경우 발현은 되었다 하더라도 엽록체 형질전환 작물의 기능을 발휘하기 어렵다고 본다.

엽록체 형질전환의 전망

앞으로 엽록체 형질전환 기술에서의 문제점들이 하나하나 해결되면 지금까지 핵 형질전환 기술에서 문제점으로 여겨졌던 유전자 발현을 저하문제, position effect로 인한 좋은 형질전환체의 재선발 과정, out-crossing에 대한 생태계 위험 등을 해결할 수 있을 것으로 생각한다. 한편 의약품 고부가가치의 단백질 생합성을 식물을 통해 대량 생산할 수 있는 기술로 개발되면 고수익을 올릴 수 있는 작물을 농가에서 재배할 수 있고, 의약품 치료용 단백질들을 안전한 식물체를 이용하여 생산 보급할 수 있다고 생각한다.

참고문헌

- Maliga P** (2002) Engineering the plastid genome of higher plants
Current Opinion in Plant Biology 5:164-172
- Bock R** (2001) Transgenic plastids in basic research and plant
biotechnology. J Mol Biol 312:425-438
- Svab Z, Maliga P** (1993). High-frequency plastid transformation in
tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. Proc Natl Acad
SciUSA. 90:913-917.
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB** (1998) Containment
of herbicide resistance through genetic engineering of the
chloroplast genome. Nat Biotechnol 1998, 16:345-348.
- Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ**
(1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt)
Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants
against susceptible and Bt-resistant insects. Proc Natl Acad Sci
USA 96:1840-1845
- 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
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB** (2001) Marker free transgenic
plants: engineering the chloroplast genome without the use of
antibiotic selection. Curr Genet 39:109-116