

합성유전자를 이용한 식물단백질의 향상

김태금 · *양문식

전북대학교 자연과학대학 분자생물학과

*경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작 우수연구센터

Plant Protein Improvement by Synthetic Gene

Tae Geum Kim and *Moon Sik Yang

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Chonbuk National University,
Chonju, 560-756,

*Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center(PMBBRC), Gyeongsang National
University, Chinju, 660-701, Korea

ABSTRACT

To improve the nutritional quality of plant proteins, a synthetic gene, called HEAAE (high essential amino acid encoding)-DNA, was introduced and expressed in tobacco plants. The synthetic gene, which is 292 basepair-long, codes for a protein composed of about 80% essential amino acids. To improve its expression level in plants, Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)35S and CaMV duplicate 35S promoters which are known as strong promoters were used with Nopaline Synthase promoter as a control. Transformed and regenerated tobacco plants were subject to analysis for introduction and expression of this gene. Integration of the gene into the plant genome and its expression into mRNAs and its proteins have been demonstrated using Southern, northern blot analysis and amino acid analysis. The differences of expression levels among CaMV duplicate 35S, CaMV 35S and Nopaline Synthase promoters are significant in term of mRNAs, but not in terms of proteins.

서 론

단백질을 구성하는 스무개의 아미노산중에서 우리 인간은 Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Valine 등 8개의 아미노산을 외부로부터 공급받아야 하는데 이러한 아미노산을 필수아미노산이라 한다(1). 정상적인 신체적, 정신적 발육을 위해서 우리가 섭취하는 총 열량이나

총 단백질의 양에 못지않게 이러한 필수아미노산이 골고루 분포되어 있는 음식을 섭취해야 된다.

근래에 와서 발달 되기 시작한 유전공학은 식물의 조직배양과 함께 새로운 식물을 개발하는데 획기적인 전기를 마련하였다. 그 중에서도 본 기법들을 이용하여 우리가 식품으로 사용하는 식물 단백질의 필수아미노산 함량을 높이는 문제는 많은 연구자들에 의하여 관심의 대상이 되어왔다(2-7).

본 실험에서는 식물단백질의 필수아미노산 함량을 높이기 위하여 필수아미노산을 80% 이상 함유하는 단백질을 발현시킬수 있는 합성 유전자를 제조하였으며(8), 본 합성유전자는 292 염기로 이루어져 있다. 본 합성유전자는 저자등에 의하여 감자에 도입, 발현되었으나(7), 식물에서의 발현정도가 낮아서 실질적인 감자의 영양가치 향상에 기여하지 못하였다. 본 실험에서는 합성유전자의 발현정도를 높이기 위하여 위 실험에서 사용하였던 Nopaline Synthase promoter 보다 강력한 promoter로 알려진 Cauliflower Mosaic Virus(CaMV) 35S promoter 와 CaMV duplicate 35S promoter를 사용하여 식물에서 본 합성유전자의 발현 정도를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 식물

재조합 plasmid의 transformation에 사용한 균주는 *E.coli* HB 101 이고 본 균주의 배지는 LB를 사용하였다. 식물의 transformation에 사용한 *Agrobacterium*은 *A. tumefaciens* LBA 4404이며 본 균주의 배지는 YEP (Pepton 10 g/1, Yeast Extract 10 g/1, NaCl 5 g/1)를 사용하였다. 형질전환 및 재분화에 사용한 식물은 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Havana)이다.

제한 효소 및 재조합 Plasmid의 제조

다른 표기가 없는 한 제한 효소는 KOSCO 제품을 사용하였으며 재조합 plasmid의 제조는 다른 표기가 없는 한 Sambrook *et al.*(10)방법을 사용하였다. 각각 다른 promoter를 가진 재조합 plasmids를 제조하기 위하여 fig. 1. 과 같이 행하였다.

즉 합성유전자를 CaMV 35S promoter를 가진 식물 binary vector에 cloning하기 위하여 pGA415 (7)를 제한효소 Bg 1 II 와 Hpa I 으로 자른 다음 합성유전자를 함유한 1.8kb 조각을 elution 한후 pB I 121을 제한효소 BamH1과 Sma I 으로 자른 후 그자리에 cloning 하였다. 본 재조합 plasmid를 pMYA1이라 칭하였다. 이와 비슷한 방법으로 CaMV duplicate 35S promoter와 Nopaline Synthase promoter를 가지고 합성유전자를 함유한 식물 binary vector를 제조하고 각각을 pMYA2와 pMYA3라 칭하였다.

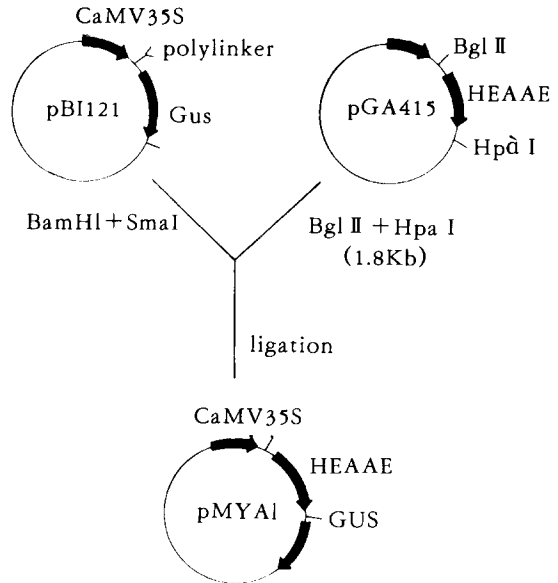


Fig. 1. Schematic diagram of construction of recombinant plasmids.

재조합 plasmid를 이용한 *Agrobacterium*의 형질전환

재조합된 pMYA1, pMYA2와 pMYA3를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하기 위하여 freeze-thaw method(11)를 사용하였다. 즉 *A. tumefaciens*를 log phase까지 키운 후 얼음위에서 10분간 방치한 후 3000 g 에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 세포를 1ml의 20mM CaCl₂ 용액에 현탁시킨 후 0.1ml 씩 미리 냉각시킨 microfuge tube에 넣는다. 각각의 tube에 약 1μg의 plasmid DNA를 넣고 액체 질소에 넣어 얼린 후 37°C 항온수조에 5분간 방치한다. 각각의 tube에 1ml의 YEP 배지를 넣고 28°C에서 2-4시간 동안 배양한 후 kanamycin(50 μg/ml)을 넣은 YEP 배지에 배양하여 선별한다. 선별된 colony는 합성 유전자를 함유한 plasmid의 존재를 확인하기 위하여 miniscreening을 행하였다.

식물 형질전환

식물의 형질전환과 재분화는 원칙적으로 leaf disc transformation 방법(12)에 준하였다. 즉 온실에서 자란 담배의 잎을 잘라 표면을 멸균한 후 멸균된 cork borer를 이용하여 잎 disc를 만든다. 잎 discs를

kanamycin($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣은 YEP 배지에서 12 시간정도 배양한 *A. tumefaciens*를 MSO(MS salts $4.3 \text{ g}/\text{l}$, B5 vitamins $1 \text{ ml}/\text{l}$, sucrose $30 \text{ g}/\text{l}$, pH5.7)로 1:10으로 희석한 용액에 세균용액이 일 끝에 잘 묻도록 적신 후 꺼내서 멸균된 filter paper 에서 과잉의 액을 닦아낸다. 일 discs를 MS 104 배지 (MSO, BA $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, NAA $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$)에 1 ~1.5ml의 일일초 cell suspension culture를 넣고 그위에 멸균된 filter paper를 놓은 nurse culture plate에 일의 밑면이 위로 가게 하여 놓고 2~3일간 24°C , 암소에서 배양한다. 일 discs를 같은 배지조성에 kanamycin($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)과 cefotaxime($250 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 선택배지에 옮긴 후 배양하였다. 2-3주 간격으로 새로운 배지에 옮긴 후 shoot가 나오면 무균적으로 자른 후 MS rooting 배지(MSO, 0.6% agar, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin, $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ cefotaxime)로 옮긴 후 뿌리를 유도하였다. 뿌리가 생긴 식물은 화분으로 옮겨서 배양하였다.

형질전환 및 재분화된 식물의 분석

화분으로 옮긴 식물의 잎을 채취하여 합성유전자의 도입 및 발현을 분석하기 위하여 각각 DNA, RNA 및 단백질을 분리한 후 Southern(13), northern(14) blot analysis 및 아미노산 분석을 행하였다. Southern blot analysis를 행하기 위하여 담배잎으로 부터 DNA를 분리한 후(15) 각각 $5 \mu\text{g}$ 의 DNA를 EcoRI 이용하여 완전히 자른 후 Southern hybridization을 행하였다. 이때 probe는 HEAAE-DNA를 random primer labelling 하여 사용하였다. Hybridization 하고 washing 한 nitrocellulose filter는 X-ray film에 노출시킨 후 autoradiography를 행하였다. Northern blot analysis를 행하기 위하여 담배잎으로부터 RNA를 분리한 후(17) oligo(dT)-cellulose column을 이용하여 poly(A)⁺ RNA를 분리하였다(18). 각각 $3 \mu\text{g}$ 의 poly(A)⁺ RNA를 formaldehyde gel을 이용하여 크기에 따라 분리하고 northern hybridization을 한 후 autoradiography를 행하였다. 이때 사용한 probe는 HEAAE-DNA를 random primer labelling 한 것을 사용하였다. 단백질로의 발현을 확인하기 위하여 담배잎에서 phosphate buffer (pH 8.0)을 사용하여 총 단백질을 추출한 후 PicoTag 방법을 이용하여 아미노산 분석을 행하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 제조

CaMV 35S promoter, CaMV duplicate 35S promoter와 Nopaline Synthase promoter를 합성유전자의 5'쪽에 붙이기 위하여 Fig. 1. 과 같이 행하여 transformants를 얻었다.

Transformants가 합성유전자를 함유하는지 확인하기 위하여 EcoRI으로 자를 때 292bp조각을 miniscreen을 통하여 확인하였다.

Agrobacterium의 형질전환

각각의 재조합 plasmid를 Agrobacterium에 형질전환 시키고 kanamycin($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유한 YEP 배지에서 선택한 후 형질전환 된 Agrobacterium이 올바른 plasmid를 함유하는지를 확인하기 위하여 Agrobacterium miniscreening을 행하였다. 분리한 plasmid를 자를 때 다같이 합성유전자에 해당되는 292bp 조각을 함유하는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

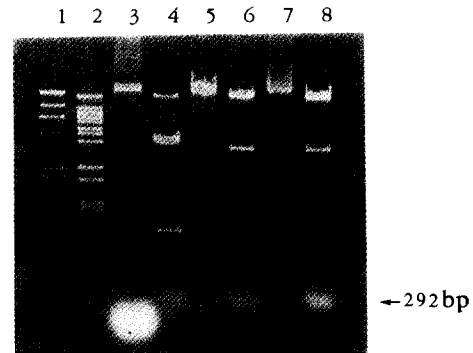


Fig. 2. Miniscreening of recombinant plasmids. Lane 1: size marker $\lambda/\text{HindIII}$, lane 2: size marker λ/BstEII , lane 3: EcoRI digestion of pB I 101, lane 4: EcoRI digestion of pMYA3, lane 5: EcoRI digestion of pMY1, lane 6: EcoRI digestion of pMYA2, lane 7: EcoRI digestion of pB I 121, lane 8: EcoRI digestion of pMYA1.

식물 형질 전환

배양 후 2-3주 후부터 calli가 보이기 시작하였다. calli로부터 shoot가 유도되었다. MS rooting 배지로

옮긴 shoot는 2-3주 후에 약 90%의 식물이 뿌리가 유도되기 시작하였다. 뿌리가 유도된 식물은 다음 분석을 위하여 화분에 옮긴 후 배양을 계속하였다.

형질전환 및 재분화된 식물의 분석

Southern blot analysis에 의하여 얻은 autoradiogram은 fig. 3 과 같다. 기대한 것과 같이 Agrobacterium을 묻히지 않고 재분화만 시킨 식물에서는 signal이 없으며 형질전환 및 재분화된 식물에서는 292bp에 해당되는 곳에 band를 형성함으로써 각각의 식물은 nuclear genome 안에 합성유전자를 함유한다는 것을 확인하였다.

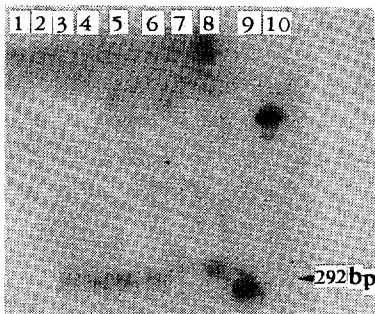


Fig. 3. Southern blot analysis of transformed and regenerated plants. Lane 1-2: negative control(regenerated plants without transformation), lane 3-4: plants transformed with the synthetic gene under control of CaMV 35S promoter, lane 5-6: plants transformed with the synthetic gene under control of CaMV duplicate 35S promoter, lane 7-8: plants transformed with the synthetic gene under control of Nopaline Synthase promoter, lane 9-10: positive control(plasmid DNAs).

Positive control로 사용된 것이 10copies에 해당 되기 때문에 각 식물에 도입된 합성 유전자의 copy 수는 2-3에 해당된다. Northern blot analysis에 의하여 얻어진 autoradiogram은 fig. 4 와 같다. 기대했던 것과 같이 1.2Kb에 해당되는 곳에 band를 형성하였다. Southern blot analysis결과와 비교할 때 식물의 nuclear genome에 들어간 합성유전자의 copy수는 별차이가 없었으나 (2-3 copies) mRNA로 발현된 수준을 densitometers로 측정할 결과 Nopaline Synthase promoter(lane 7,8) 보다

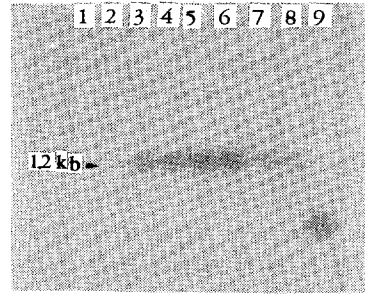


Fig. 4. Northern blot analysis of transformed and regenerated plants. Lane 1-2: negative control(regenerated plants without transformation), lane 3-4: plants transformed with the synthetic gene under control of CaMV 35S promoter, lane 5-6: plants transformed with the synthetic gene under control of CaMV duplicate 35S promoter, lane 7-8: plants transformed with the synthetic gene under control of Nopaline Synthase promoter, lane 9: positive control(plasmid DNAs).

CaMV 35S promoter의 경우에는 5-8배, CaMV duplicate 35S promoter의 경우는 10-20배 가량의 발현 수준 증가를 나타내었다.

합성유전자의 단백질로 발현을 확인하기 위하여 재분화된 담배의 잎으로부터 단백질을 분리한 후 총 아미노산 분석을 행한 결과는 Table 1과 같다. 본 단백질 분석 결과를 mRNA의 발현수준과 비교해 볼때 CaMV duplicate 35S promoter와 CaMV 35S promoter의 경우 Nopaline Synthase promoter 보다 높은 (5-20배) 발현수준을 나타내었으나 단백질의 발현에서는 합성 유전자가 높은 비율로 함유한 Lysine, Tryptophan, Methionine등의 유의적인 증가를 볼 수 없었다. 본 실험결과는 합성유전자가 mRNA level까지는 발현에 별 문제가 없으나 단백질을 발현시키는데 문제가 있음을 암시한다. 즉 단백질을 발현시키지 못하거나 발현된 단백질이 생체 내에서 안정하지 못하여 분해되어버린 경우를 생각할 수 있을 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여서는 항시성 promoter인 CaMV promoter 보다는 저장 단백질 특이적인 유전자의 사용, 생체내에서 안정성을 높이는 유전자의 고안, protein body로의 합성유전자 targeting등을 고려해 볼수 있을 것이다.

Table 1. Amino acid analysis of transformed and regenerated plants.

AA(mol %) sample	*	**	**	SER	GLY	HIS	ARG	THR	ALA
sample 1	1.34	9.42	11.00	4.91	9.32	1.64	4.66	7.45	9.30
sample 2	2.83	6.58	11.54	4.08	7.52	1.23	1.559	2.51	7.56
sample 3	2.01	7.02	11.25	3.90	8.19	1.41	3.40	4.99	8.21
sample 4	1.44	8.20	12.86	4.20	8.63	2.97	2.64	9.68	8.78
AA(mol %) sample	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	LYS
sample 1	7.63	1.91	6.84	2.15	3.97	8.25	4.00	0.72	5.48
sample 2	23.01	1.14	2.90	0.74	1.84	2.98	21.46	0.21	1.28
sample 3	19.91	1.33	4.37	1.40	2.57	5.12	11.88	0.41	2.62
sample 4	9.46	0.99	4.53	1.22	2.67	4.77	13.69	0.61	2.64

Sample 1: Negative control(regenerated plant without transformation).

Sample 2: Plants transformed with the synthetic gene under control of CaMV 35S promoter.

Sample 3: Plants transformed with the synthetic gene under control of CaMV duplicate 35S promoter.

Sample 4: Plants transformed with the synthetic gene under control of Nopline synthase promoter.

*CYA means the sum of cyteic acid and oxidized cystine.

** ASX, GLX mean the sum of Asparagine & Aspartic acid and Glutamine & Glutamic acid.

요 약

식량으로 쓰이는 식물 단백질은 공통적으로 Iso-leucine, Lysine, Methionine, Threonine, Tryptophan 등 5가지 필수아미노산이 결핍되어 있다. 본 연구에서는 이러한 필수아미노산을 다량 함유한 단백질을 발현시킬 수 있는 합성유전자를 담배에서 높은 수준으로 발현시키고자 강한 식물 promoter로 알려진 CaMV 35S, CaMV duplicate 35S promoters를 사용하였다. 형질 전환 및 재분화된 식물을 분석한 결과 본 합성유전자가 식물 nuclear genome 안으로 도입은 안정하여 잘되었고 mRNA 수준까지는 유의적인 증가를 보였으나 단백질 수준에서는 유의적 수준의 증가를 관찰할 수 없었다.

감 사

본 연구는 1990년도 학술진흥재단(유전공학분야) 및 경상대 식물분자생물학 및 유전자 조작 우수연구센터의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 대하여 감사드립니다. 아미노산 분석을 행하여주신 기초과학

지원센터의 박 혜성 선생님께 감사를 드립니다.

참고문헌

1. G. Arroyave(1975), Amino acid requirement, in protein-calorie malnutrition(Olson, R. ed)p 1-22. Academic Press
2. J.C. Pernollet and I. Mosse(1983), Seed proteins, Phytochemical Soc. of Eur. Symp. Series No., **20**, 155.
3. L.E. Hoffman, D.D. Donaldson, R. Bookland, K. Rashka and E. M. Herman(1988), Plant Mol. Biol., **11**, 717.
4. K. Pederson, P. Agros, S. V. L. Naravana and B. A. Larkins(1986), J. Biol. Chem., **201**, 6279.
5. J.C. Wallace, G. Galili, E.E. Kawata, R. E. Cuellar, M.A. Shotwell and B.A. Larkins (1988), Science, **240**, 662.
6. S.B. Altenbach, K.W. Pederson, G. Meeker, L.C. Staraci and S. M. Samuel(1989), Plant

- Mol. Biol., **13**,523.
7. M.S. Yang, N.O. Espinoza, P.G. Nagpala, J.H. Dodds, F.F. White, K.L. Schnorr and J.M. Jaynes(1989), *Plant Science*, **64**, 99.
 8. J.M. Jaynes, M.S. Yang, N. Espinoza and J.H. Dodds(1986), *Trends in Biotech.*, **4**, 314.
 9. P. Sanders, J.A. Winter, A.R. Barnason and S.G. Rogers(1987), *Nuc, Acid Res.*, **15**(4). 1543.
 10. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (N. Ford, Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. Cold Spring Harbor Press.
 11. G.An, P.R. Ebert, A. Mitra and S.B. Ha (1988), in *Plant Molecular Biology Manual*. (G. Gelvin and R.A. Schilpoort, eds.) A3/9. The Netherlands: Kluwer Academy Publishing.
 12. R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley (1985), *Science*, **227**, 1229.
 13. E. Southern(1975), *J.Mol. Biol.*, **98**, 503.
 14. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (N. Ford, Ed.) pp7. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. Cold Spring Harbor Press.
 15. S.L Dellaporta *et al.*(1984), in *Molecular Biology of Plants: A Laboratory Manual*. pp36. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y. Cold Spring Harbor Press.
 16. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (N. Ford, Ed.)pp10.6 Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. Cold Spring Harbor Press.
 17. C.H. Kim and Y.D. Choi(1989), *Korean J. Bot.*, **32**, 51.
 18. A. Avis and P. Leder(1972), *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **69**,1048.