

## Antisense Polygalacturonase 유전자 형질전환 토마토의 후대 발현 분석

金英美\* · 韓樟鎬 · 金龍煥 · 李成坤 · 黃永秀  
農村振興廳 農業科學技術院 生物資源部 生化學科

## Inheritance and Expression of Antisense Polygalacturonase Gene in Transgenic Tomato

KIM, Young-Mi\* · HAHN, Jang-Ho · KIM, Yong-Hwan · LEE, Seong-Kon · HWANG, Young-Soo

Biochemistry Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, 441-707, Korea

\*Corresponding author

T<sub>5</sub> progeny of one transgenic tomato line (T<sub>0</sub>9) carrying antisense polygalacturonase (PG) cDNA was generated by selfing. Five T<sub>5</sub> plants were used to analyse in detail. The PG antisense gene was stably inherited through fifth generations. In all five T<sub>5</sub> plants, expression of the antisense transcripts were detected. In consequence, it led to a reduction of the PG enzyme activity in ripe fruit to between 37% and 65% that of normal. In two plants the expression of endogenous PG gene was inhibited in ripe fruit.

Key word : antisense RNA, ripening

Polygalacturonase (PG)는 토마토 과실이 숙성함에 따라 활성화되어 세포벽의 주성분인 pectin을 분해하는데 관여하는 효소 중의 하나이다. Pectin이 분해됨으로써 세포벽의 구조적인 변화가 초래되고 결국 과실의 연화(softening)로 이어진다(Huber, 1983). 미숙 토마토에서는 PG mRNA가 검출되지 않지만 익기 시작함과 동시에 점진적으로 증가하여 완숙기에 달하면 전체 poly(A)<sup>+</sup> RNA의 1%까지 축적된다(DellaPenna et al., 1986; Sheehy et al., 1987). Antisense RNA를 이용하여 polygalacturonase 유전자의 발현을 저해함으로써 토마토 과실의 연화를 지연시켜 신선도를 연장한 토마토가 실제 상품화되기도 하였다(Charles et al., 1993; Kramer and Redenbaugh, 1994; Watson et al., 1994). PG 유전자 외에도 antisense RNA를 이용하여 숙기를 연장하는데 성공한 사례로 pectin 분해에 관여하는 pectin methylesterase (PME) 유전자(Tieman et al., 1992), 에틸렌 합성에 관여하는 ACC synthase, ACC oxidase 유전자 등이 있다(Hamilton et al., 1990)

토마토의 endogenous PG gene 발현이 70-90% 이상 저해된다고 보고된 antisense RNA는 PG 유전자의 full-length를 이용한 1.4 Kb와 5'측의 730 base이며 (Smith et al., 1988; 1990), 3'측의 1.1 kb의 antisense RNA에 의하여는 4-60% 저

해됨을 前 報文에서 보고하였다(Kim et al., 1995). 이와 비슷한 예로 chalcone synthase (CHS) 유전자의 경우에도 3'측의 antisense RNA에 의하여는 endogenous CHS 유전자의 발현이 저해되나(Van der Krol et al., 1990), 5'측의 antisense RNA에 의하여는 endogenous CHS 유전자 발현 저해가 나타나지 않았다(Van der Krol et al., 1990). 이들 결과로부터 antisense RNA의 작용이 단순히 RNA-RNA duplex 형성 뿐만 아니라 특정한 mRNA의 분해 산물에 의한 유전자 발현 저해 가능성도 배제할 수 없다. 또한 PG 유전자 5'측 730 bp의 antisense gene을 도입한 형질전환 토마토의 후대(T<sub>1</sub>) 발현을 분석한 결과, antisense PG 유전자가 single copy로 도입된 형질전환 토마토 후대에서 PG 효소 활성이 5-50%로 다양한 저해활성을 나타내며, 그 중 비형질전환 토마토의 10%로 PG 효소가 저해된 line의 自殖 世代에서 antisense gene이 동형접합체(homozygous)로 존재한 경우 99%이상 효소 활성이 저해된 식물체도 확인되었다.(Smith et al., 1990). 본 연구에서는 3'측의 1.1kb의 antisense gene이 형질전환된 토마토의 T<sub>5</sub> 세대에서 antisense gene이 안정적으로 유전됨을 확인하고 그 발현 및 PG 효소의 저해 활성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

PG 유전자의 3'측 1.1 kb의 antisense gene의 도입이 확인된 형질전환 토마토 서광(Kim et al., 1995) T<sub>0</sub> 9 line의 종자를 1 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에서 발아시켜 도입 유전자 보유 개체를 분리 선발하고 온실에서 재배하여 自殖시킨 다음, 얻어진 종자를 같은 방법으로 T<sub>5</sub> 세대까지 육성하였다. 이 중 T 9-4-B<sub>1</sub>-1-2 (이하 T<sub>5</sub> 4B<sub>1</sub>로 약함), T 9-4-B<sub>1</sub>-1-B<sub>2</sub>-1(T<sub>5</sub> 4B<sub>2</sub>), T 9-5-B<sub>1</sub>-3-2 (T<sub>5</sub> 5), T 9-6-B<sub>1</sub>-2-8-6 (T<sub>5</sub> 6), T 9-10-B<sub>1</sub>-2-B<sub>2</sub>-8 (T<sub>5</sub> 10)와 같이 육성한 5개체를 유전 및 발현 분석에 이용하였다.

### Genomic Southern Blot 분석

Genomic DNA는 잎 조직으로부터 Shure 등의 방법(1983)을 변용하여 분리하였고, 약 10 µg DNA를 EcoRV로 절단한 후 0.8% agarose gel에 전기 영동한 다음 nylon membrane에 blot하였다. 이 membrane을 50% formamide, 5×SSC, 0.1% SDS, 5×Denhart 용액으로 prehybridization한 다음, <sup>32</sup>P로 표지시킨 pPG1의 EcoRV 단편 (PG cDNA)(Kim et al., 1995)을 probe로 hybridization하였다. 1×SSC, 0.1% SDS로 42°C에서 세척한 후 X-ray film에 노출하였다.

### RNA 분리 및 Northern Blot 분석

RNA는 토마토 잎과 과실의 pericarp 조직으로부터 Smith 등의 방법(1986)을 변용하여 분리하였고, 약 10 µg의 total RNA를 formaldehyde 함유 1% agarose gel에서 전기 영동한 다음 nylon membrane에 blot하였다. Hybridization은 Southern blot 분석에 이용한 PG-specific probe를 이용, 수행하였고, membrane을 42°C에서 0.1×SSC, 0.1% SDS용액으로 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다.

### Protein 추출 및 Polygalacturonase 활성 측정

Protein은 토마토 pericarp 조직으로부터 Pressy의 방법(1986)에 따라 추출하였다. 토마토 pericarp 조직 5 g을 액체 질소에서 마쇄한 후 5 mL의 증류수로 homogenize한 다음, 0.25 M HCl로 pH 3.0으로 조절하고 2°C에서 원심분리(8,000×g, 20분)하여 soluble component를 제거하였다. pH 3.0의 냉수 75 µl로 다시 homogenize하여 원심분리한 다음, 1M NaCl 용액으로 추출하고 pH 6.5가 되도록 4°C에서 30분간 교반하여 PG 활성을 회복시킨 후 Whatmann filter No. 1으로 여과하여 Smith 등의 방법(1985)을 기본으로 한 BCA protein assay kit (Sigma)로 protein을 정량하였다. PG

활성은 1% polygalacturonic acid를 기질로 하여 1 M NaCl, 0.2 M sodium acetate 반응 완충액(pH 4.5)으로 37°C에서 15분간 반응하여 측정하였으며, α-D-galacturonic acid를 사용한 표준곡선에 의해 생성된 환원당의 양으로 계산하였다 (Tucker et al., 1980).

## 결과 및 고찰

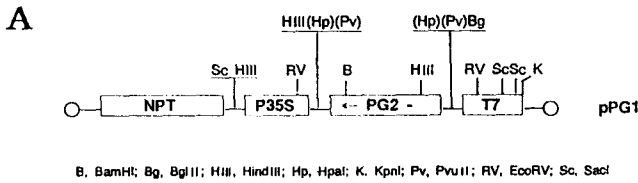
### Antisense PG 유전자의 안정적 유전

Antisense PG 유전자 형질전환 토마토 중 single copy로 유전자 삽입이 확인된 T<sub>0</sub> 9 line의 후대 자식 T<sub>5</sub> 세대의 5개체로부터 분리한 잎 DNA를 EcoRV로 절단한 후, PG2 cDNA를 probe로 하여 DNA-gel blotting 하였을 때 기대되는 band는 antisense PG 유전자 1.1 kb와 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter 일부와 T7 terminator 일부를 포함한 1.7 kb와 원래 토마토 염색체 상에 내재하고 있는 (endogenous) PG 유전자의 밴드이다. Blotting 결과, 비형질전환 토마토 잎 DNA에는 endogenous PG 유전자 밴드만 나타나는 반면, T<sub>5</sub> 4B<sub>1</sub>, T<sub>5</sub> 4B<sub>2</sub>, T<sub>5</sub> 5, T<sub>5</sub> 6, T<sub>5</sub> 10의 5개체의 DNA에는 모두 도입된 antisense PG 유전자 밴드인 1.7 kb와 endogenous PG 유전자 밴드가 약 8 kb의 위치에 나타났다(Figure 1). 이로써 T<sub>5</sub> 세대의 5개체 전부 antisense PG 유전자가 안정적으로 유전됨이 확인되었다.

### Antisense PG 유전자의 발현 및 endogenous PG 유전자 발현에 미친 영향

PG 유전자는 토마토 성숙기의 과육에만 특이적으로 발현됨이 알려져 있다(DellaPenna et al., 1986; Sheehy et al., 1987). Antisense PG 유전자의 형질전환을 위해 이용한 promoter는 constitutive promoter로 조직 비특이적인 발현 활성을 가지는 것으로 알려진 CaMV 35S promoter이다. 따라서 antisense PG 유전자가 T<sub>5</sub> 세대에서 안정적으로 발현되고 있는지를 검토하기 위하여 우선 형질전환체의 잎으로부터 RNA를 분리하여 PG cDNA를 probe로 하여 northern blot을 수행하였다. 비형질전환 토마토 잎에서는 antisense PG RNA 밴드가 나타나지 않는 반면, T<sub>5</sub> 4B<sub>1</sub>-1, T<sub>5</sub> 4B<sub>1</sub>-2, T<sub>5</sub> 4B<sub>2</sub>-1, T<sub>5</sub> 4B<sub>2</sub>-2, T<sub>5</sub> 5, T<sub>5</sub> 6, T<sub>5</sub> 10의 잎에서는 antisense PG RNA 밴드가 나타남으로써 T<sub>5</sub> 세대에서도 antisense PG 유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 알 수 있다(Figure 2).

Antisense RNA에 의한 endogenous PG 유전자의 발현 저해 양상을 조사하기 위해 성숙한 토마토 과피 조직(pericarp tissue)으로부터 RNA를 분리하여 PG cDNA를 probe로 northern blot을 수행하였다. 그 결과, T<sub>5</sub> 4B<sub>2</sub>, T<sub>5</sub> 6에서는 PG mRNA 축적이 현저히 감소됨을 확인하였고, 이는



B, BamHI; Bg, BglII; HIII, HindIII; Hp, HpaI; K, KpnI; Pv, PvuII; RV, EcoRV; Sc, SacI

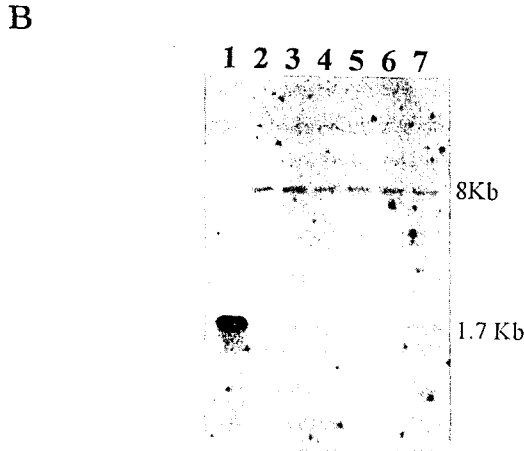


Figure 1. Genomic DNA blot(panel B) of transgenic T<sub>5</sub> plant containing antisense PG construct(panel A). 10 $\mu$ g genomic DNA was digested with EcoRV and probed with the EcoRV fragment of pPG1 (PG cDNA). Lane 1, pPG1 digested with EcoRV; lane 2, untransformed plant; lane 3, T<sub>5</sub> 4B1 plant; lane 4, T<sub>5</sub> 4B2; lane 5, T<sub>5</sub> 5; lane 6, T<sub>5</sub> 6; lane 7, T<sub>5</sub> 10. In addition to the endogenous bands lanes 3-7 each contained a single additional 1.7 kb DNA fragment.

antisense RNA에 의한 endogenous PG 유전자의 발현이 저해됨을 시사한다. 한편, T<sub>5</sub> 4B1, T<sub>5</sub> 5의 경우, 일에서는 antisense RNA의 발현이 확인되었음에도 불구하고 과피 조직에서 endogenous PG 유전자 발현 저해를 관찰할 수 없었다(Figure 3). 이는 endogenous 유전자의 RNA와의 duplex 형성에 의한 유전자 발현 저해로 설명되는 일반적인 antisense RNA의 작용기구는 해석될 수 없으므로 실제 strand-specific probe 등을 이용하여 핵 내에서 생성된 antisense PG RNA 및 PG mRNA양과 세포질내 축적된 RNA양을 자세히 분석하면 antisense PG RNA에 의한 PG 유전자의 발현 저해 관계를 더 세밀하게 파악할 수 있으리라 사료된다.

Antisense PG 형질전환 토마토(T<sub>5</sub> 세대)의 PG 활성

T<sub>5</sub> 세대 식물체의 과실이 붉게 익기 시작하여 10일 경과된 성숙 토마토와 비형질전환 토마토의 성숙 단계별 과피 조직내의 PG 효소 활성을 측정된 결과, 비형질전환 성숙 토마토의 PG 효소 활성을 100%로 하였을 때 antisense PG 형질전환 성숙 토마토의 PG 활성은 37-65%로 감소하

Table 1. PG activity in ripe fruit of T<sub>5</sub> tomato plant.

plant	PG activity <sup>a</sup> ( $\mu$ g GA <sup>b</sup> /min/ $\mu$ g protein)	Mean % normal PG activity
T <sub>5</sub> 4B1	0.67	37.5
T <sub>5</sub> 4B2	0.78	43.9
T <sub>5</sub> 5	1.14	63.7
T <sub>5</sub> 6	1.16	64.8
T <sub>5</sub> 10	0.98	54.8
Control (mature)	1.79	100
" (turning)	0.78	43.9
" (immature)	0.05	0

<sup>a</sup>PG activity is the mean from 2 fruits per plant harvested 10 days after the first colour change

<sup>b</sup>GA, galacturonic acid

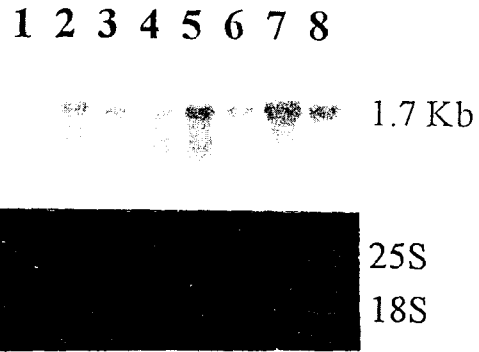


Figure 2. Expression of antisense PG gene in T<sub>5</sub> plant. Total leaf RNA(10 $\mu$ g) from 5 T<sub>5</sub> plants was hybridized to a PG cDNA probe (upper panel). Lower panel, EtBr-stained 1% agarose gel. Lane 1, untransformed plant; lane 2, T<sub>5</sub> 4B1-1 plant; lane 3, T<sub>5</sub> 4B1-2; lane 4, T<sub>5</sub> 4B2-1; lane 5, T<sub>5</sub> 4B2-2; lane 6, T<sub>5</sub> 5; lane 7, T<sub>5</sub> 6; lane 8, T<sub>5</sub> 10.

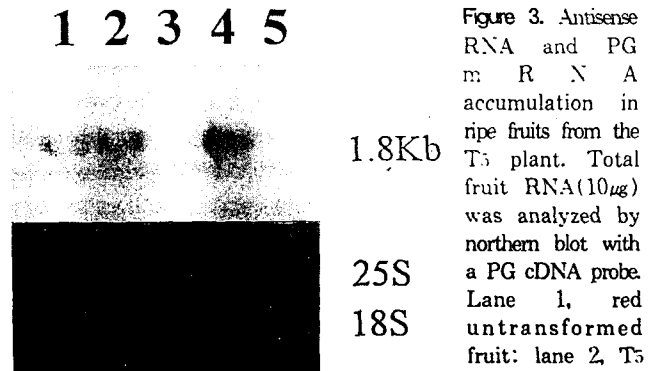


Figure 3. Antisense RNA and PG mRNA accumulation in ripe fruits from the T<sub>5</sub> plant. Total fruit RNA(10 $\mu$ g) was analyzed by northern blot with a PG cDNA probe. Lane 1, red untransformed fruit; lane 2, T<sub>5</sub> 4B1 plant; lane 3, T<sub>5</sub> 4B2; lane 4, T<sub>5</sub> 5; lane 5, T<sub>5</sub> 6. Ripe fruit was harvested 7 days after the first colour change.

였다. 이는 과실이 붉게 익기 시작하는 중간 단계(turning)의 효소 활성과 유사함을 알 수 있다(Table 1). 또한 PG 효

소 활성이 저하된 형질전환 토마토는 모두 Figure 2에서 antisense PG RNA의 발현이 확인되었으므로 antisense RNA에 의하여 결과적으로 유전자 발현이 억제되었음을 확인할 수 있으나, Figure 3에서는 antisense RNA의 발현량이 endogenous 유전자 mRNA 억제 정도에 영향을 미치지 않음을 시사하고 있다. 따라서 형질전환 토마토의 PG 활성 저하가 단순히 antisense PG RNA가 endogenous PG mRNA와 RNA-RNA duplex를 형성하여 translatable PG mRNA의 축적량 감소에 따른 결과로만은 볼 수 없으며, 세포내에 축적된 RNA양에 의한 발현 조절, 다시 말하여 co-suppression과 같은 유전자 발현 조절 가능성도 생각할 수 있다.

## 적 요

Antisense PG 유전자 형질전환 토마토로부터 自殖시켜 얻은 종자를 kanamycin 내성을 이용하여 5세대까지 분리, 육성하여 antisense PG 유전자가 안정적으로 고정된 식물체를 얻었다. 이들 식물체에는 genomic DNA gel blot 분석으로 antisense PG 유전자가 안정적으로 유전되며 northern blot 분석을 통하여 antisense RNA가 발현됨을 확인하였고, 또한 antisense RNA에 의한 endogenous PG 유전자의 발현 저해를 분석하였다. Antisense PG 유전자 형질전환 성숙 토마토 내 PG 효소 활성이 비형질전환 성숙 토마토에 비하여 37-65% 수준으로 저하되었다.

## 인 용 문 헌

- Charles IB, Thomas U (1993) Biotechnology in the food industry. *Bio/Technology* 11: 895-902
- DellaPenna D, Kates DS, Bennett AB (1986) Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase : Analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6420-6424
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287
- Huber DJ (1983) Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *J Am Soc Hort Sci* 108: 405-409
- Kim YM, Lee SK, Kim YH, Hwang YS (1995) Isolation and characterization of polygalacturonase cDNA from tomato. *RDA J Agri Sci* 37: 199-203
- Kim YM, Kim YH, Lee SK, Lim MH, Song KS, Hwang YS (1995) Expression of antisense polygalacturonase gene in transgenic tomato. *Kor J Plant Tissue Culture* 6: 351-355
- Kramer MG, Redenbaugh K (1994) Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene : the Flavr savr tomato story. *Euphytica* 79: 293-297
- Pressy R (1986) Extraction and assay of tomato polygalacturonase. *Hort Sci* 21: 490-492
- Sheehy RE, Pearson J, Brady CJ, Hiatt WR (1987) Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *Mol Gen Genet* 208: 30-36
- Shure M, Wessler S, Federoff N (1983) Molecular identification of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mollia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Smith CJS, Slater A, Grierson D (1986) Rapid appearance of a mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein MW 35,000. *Planta* 168: 94-100
- Smith CJ, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol* 14: 369-379
- Smith CJ, Watson CF, Morris PC, Bird CR, Seymour GB, Gray JE, Arnold C, Tucker GA, Schuch W, Harding S, Grierson D (1990) Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol* 14: 369-379
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruits. *Plant Cell* 4: 667-679
- Tucker GA, Robertson NG, Grierson D (1980) Changes in polygalacturonase isoenzymes during the ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur J Biochem* 112: 119-124
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JMN, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in petunia : addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299
- Van der Krol AR, Mur LA, De Lange P, Mol JMN, Stuitje AR (1990) *Plant Mol Biol* 14: 457-466
- Watson CF, Zheng LS, Dellapenna D (1994) Reduction of tomato polygalacturonase beta subunit expression effects pectin solubilization and degradation during fruit ripening. *Plant Cell* 6: 1623-1634

(1998년 1월 31일 접수)