慶北大農學誌(Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.) 17(1999. 12) 39~43.

*Agrobacterium*을 이용한 내열성 유전자의 벼로의 형질전환 및 발현

이병현 · 이효신 · 원성혜 · 조진기

경북대학교 농과대학 동물공학과

Introduction of Thermotolerant Gene into Rice Plant by *Agrobacterium* Mediated Transformation

Byung-Hyun LEE · Hyo-Shin LEE · Sung-Hye WON · Jin-Ki JO

Dept. of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University

Abstract

To investigate the function of chloroplast-localized small HSP in rice, the cDNA, Oshsp21, was introduced into rice plants via Agrobacterium-mediated gene transfer system. Calli induced from rice immature embryos were co-cultivated with a *A. tumafaciens* EHA101 that contained a plasmid, pIHSP21. The efficiency of plant regeneration from the calli co-cultivated with the *Agrobacterium* was about 30%. PCR and Southern blot analyses using genomic DNA revealed that gene for the chloroplast small HSP was introduced into the genome of rice. Expression of transgene was investigated by northern blot analysis. Results indicate that the transgene, Oshsp21, was constitutively expressed at normal growth temperature.

Key words : gene expression, heat shock protein, *oryza sativa*, transformation,

서 론

식물의 저분자량 heat shock protein (small HSP) 중의 하나인 엽록체에 존재하는 small HSP는 아직 그 기능에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않으나 (Waters, 1995), 고온 스트레스 하에서 세포내 단백질의 변성방지 및 단백질간의 응집 등을 방지하는 분자 chaperone으로서 기능하는 것이 밝혀져 있다 (Lee et al., 1995; Lindquist and Craig, 1988; Parsell and Lindquist, 1993; Waters et al., 1996). 또한 식물의 고온 또는 다양한 환경 스트레스에 대한 내성획득에 관여하고 있음이 보고되고 있다 (Chou et al., 1989; Lee et al., 1995; Park et al., 1996; Banzet et al., 1998). 이러한 결과들은 엽록체 small HSP가 식물의 고온내성 획득에 있어서 중요한 기능을

담당하고 있음을 나타낸다.

벼 (*Oryza sativa L.*)는 우리나라에 있어서 가장 중요한 식용작물 중의 하나이며, 생리적으로 높은 온도에 대한 적응능력이 높은 작물이다. *Agrobacterium*을 이용한 쌍자엽 식물로의 형질전환은 잘 확립되어져 있으나, 단자엽 식물로의 형질전환법은 아직 쌍자엽 식물에서의 형질전환 효율에는 미치지 못하고 있다 (Bytebier et al., 1987). 특히 식용작물 중 가장 중요한 벼에 있어서의 형질전환법은 아직 초보단계에 머물러 있다.

본 연구는 고온에 강한 특성을 갖는 벼의 고온내성에 있어서 가장 중요하게 기능할 것으로 추측되는 엽록체 small HSP의 기능을 밝히고자, 이 유전자를 도입한 형질전환 벼를 작성하고 유전자의 도입 및 발현양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 발현 vector의 구축 및 *Agrobacterium*에로의 도입

벼로의 유전자 도입을 위한 vector로는 kanamycin과 hygromycin 내성 유전자를 가지는 pIG121Hm (Hiei et al., 1994)를 사용하였다. pIG121Hm vector의 CaMV35S promoter의 하류에 벼 (Oryza sativa L., cv. Nagdongbyeo)로부터 분리한 full-length의 엽록체 small heat shock protein (small HSP) cDNA (Oshsp21; Lee et al., 1999)를 도입하여 발현 vector, pIHSP21를 구축한 후, Agrobacterium tumafaciens, EHA101에 도입하였다 (Hood et al., 1986). 발현 vector로 형질전환 된 Agrobacterium은 kanamycin과 hygromycin이 각각 50 μg/ml이 함유된 agar배지에서 선발하였다.

2. 벼의 형질전환 및 형질전환체의 선발

벼 종자의 종피를 제거한 후, 2.5% NaOCl, 0.01% Tween20 용액으로 30분간 소독하여 callus 유도배지 (Toki, 1997)에서 30℃, 광조건에서 3주간 배양하여 배반유래의 callus만을 형질전환에 사용하였다. Kanamycin 과 hygromycin이 50 μg/ml씩 첨가된 AB배지 (Toki, 1997)에서 3일간 배양한 *Agrobacterium* 배양액으로 callus를 감염시킨 후, 28℃에서 3일간 공동배양하였다. 배양 후 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 500 μg/ml의 carbenicillin 용액으로 세정하고 500 μg/ml의 carbenicillin과 50 μg/ml의 hygromycin이 첨가된 선발배지에서 2주간 배양하여 형질전환된 callus를 선발한 후, 1 mg/l NAA, 5 mg/l Kinetin이 첨가된 MS 재분화배지에서 식물체를 재분화시켰다.

3. 형질전환 벼의 PCR 및 Southern blot 분석

재분화된 벼의 genome에 외래유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 벼의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하였다 (Murray and Tompson, 1980). PCR분석을 위하여 발현 vector 내의 CaMV 35S promoter의 3'-영역의 염기배열의 일부인 5'-CCCACCCACGAGGAGCATC-3'를 sense primer (P-1)로, 벼 cDNA, Oshsp21의 5'으로부터 약 700 bp 부근의 antisense strand의 5'-CACGCCGTTCTTGAGCTCG-3'를 antisense primer (P-2)로 사용하였다 (Lee et al., 1999). Southern blot 분석은 5 μg의 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후, Lee 등 (1998)의 방법에 따라 분석하였다.

4. 유전자 발현의 northern blot 분석

벼의 잎으로부터 total RNA를 분리한 후, 5 μg의 RNA를 formaldehyde gel로 전기영동하여 분획하고, membrane에 blotting한 후, 벼의 엽록체 small HSP cDNA를 probe로 하여 hybridization하였다 (Lee et al., 1999).

결과 및 고찰

벼에 있어서 엽록체 small HSP의 기능을 밝히기 위하여, 벼로부터 분리한 cDNA, Oshsp21 (Lee et al., 1999)를 식물 발현 vector에 도입하여 발현 vector, pIHSP21을 구축하였다 (Fig. 1A). Vector내에 유전자가 도입되었는지를 확인하기위하여 plasmid DNA를 XbaI과 SacI으로 절단한 후, agarose gel 전기영동으로 확인한 결과 크기 약 1.0 kb의 insert DNA단편의 존재를 확인하였다 (Fig. 1B). 이 발현 vector를 *Agrobacterium*에 도입한 후, 벼의 형질전환에 사용하였다. 배반유래의

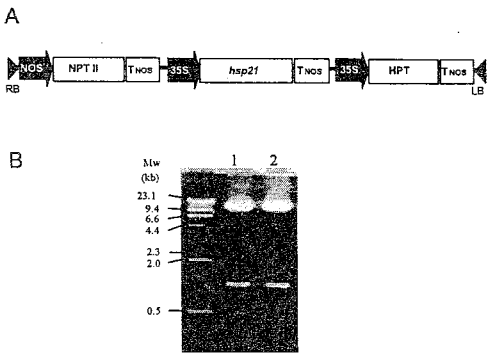

Fig. 1. Construction of expression vector.
A. Structure of a plasmid, pIHSP21. B. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA digested with XbaI and SacI.

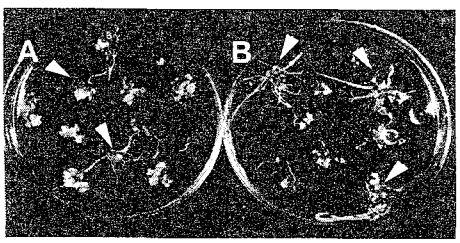

Fig. 2. Regeneration of transgenic rice plants.
Photograph was taken 4 weeks after selected calli had been transferred to regeneration medium. Arrows indicate regenerated plantlets.

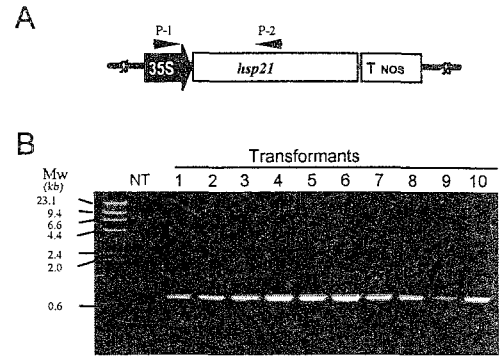

Fig. 3. PCR analyses of genomic DNAs in transgenic rice plants.
A. Oligonucleotides, P-1 and P-2, were used as PCR primers. B. PCR amplification of region of CaMV 35S-Oshsp21 junction. Genomic DNA was isolated from transgenic plant and used as a template. After PCR amplification, PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. NT, nontransformant. Arrow indicates 0.8 kb DNA fragments amplified by PCR.

callus를 재분화배지에 배양한 지 약 3주 후 부터 재분화 shoot이 관찰되기 시작하여 배양 callus의 약 30%의 재분화율을 나타내었다 (Fig. 2). 이들 재분화 식물체를 hormone free의 rooting 배지에 옮겨 완전한 식물체로 재분화시킨 다음 유전자의 도입 및 발현을 분석하였다.

재분화된 식물체의 genome에 Oshsp21가 도입되었는지를 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석으로 확인한 결과 총 16개의 재분화된 식물체에서 hybridization band를 확인할 수 있었다 (결과 미제시). 이들 형질전환 식물체에 대하여 발현 vector가 도입되었는지를 PCR로 분석하였다 (Fig. 3). Fig. 3A에 나타낸 바와 같이 oligonucleotides, P-1과 P-2를 PCR primer로 하여 증폭시킨 후, agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 그 결과 비형질전환 식물체에서는 증폭산물이 관찰되지 않았으나,

10개의 모든 형질전환 식물체의 genomic DNA로부터 크기 약 0.8 kb의 증폭산물이 관찰되었다 (Fig. 3B). 따라서 선발된 형질전환 식물체의 genome에 도입한 Oshsp21 유전자가 도입되었음을 확인하였다.

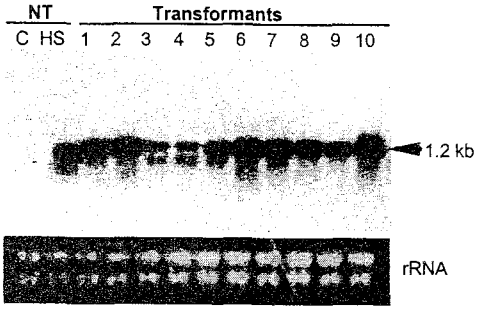

Fig. 4. Northern blot analysis.
Total RNA (5 μg) was fractionated by agarose gel electrophoresis and subjected to northern hybridization. Oshsp21 was used as probe. NT, nontransformant. C and HS denote control (25℃) and heat-stressed (42℃, 2 h) leaves of rice plants, respectively.

한편 형질전환된 벼에 있어서 Oshsp21가 항상적으로 발현하고 있는지를 조사하기 위하여 total RNA를 분리한 후, northern blot 분석을 하였다. 대조구로는 비형질전환 벼를 Oshsp21 유전자가 가장 높게 발현되는 조건인 42℃, 2시간 처리한 잎으로부터 분리한 total RNA를 사용하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이, 25℃에서 처리한 대조구인 비형질전환 벼에서는 Oshsp21의 발현이 보이지 않았으나, 42℃, 2시간 처리한 잎에서는 약 1.0 kb의 transcript가 축적되었다. 한편 25℃에서 생장시킨 형질전환 벼의 경우, 모든 식물체에서 크기 약 1.2 kb의 Oshsp21 transcript가 관찰되었다. 대조구에 비해 transcript의 크기가 증가된 것은 발현 vector내의 Oshsp21 하류의 NOS (nopaline synthase)의 termination signal에서 전사가 종결된 결과로 추측된다. 또한 각각의 형질전환 벼에 있어서의 발현양은 서로 다르게 나타났다. 이러한 발현량의 차이는 genome 내의 유전자가 삽입된 장소에 따른 차이, 삽입된 영역 주변 유전자의 구조 또는 발현된 transcript의 안정성의 차이 등에 기인한 결과로 판단된다. 형질전환체 3, 4를 제외한 모든 형질전환 벼에서 고온처리가 없었음에도 불구하고 도입한 Oshsp21가 대조구보다 높은 수준으로 항상적으로 발현되었다. 이들 형질전환 벼를 이용하여 고온 스트레스에 대한 내성의 증가 여부 및 다른 환경스트레스에 대한 Oshsp21의 반응기구를 현재 해석 중에 있다.

적 요

벼에 있어서 엽록체 small heat shock protein (small HSP)의 기능을 밝히기 위하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법을 이용하여 벼로부터 분리한 small HSP cDNA를 도입하였다. *Agrobacterium*의 감염에는 벼의 미성숙 배로부터 유도한 callus를 이용하였다. 형질전환 후의 재분화율은 약 30%였다. 형질전환을 통하여 얻어진 식물체의 genomic DNA로부터 PCR 분석과 Southern blot 분석으로 엽록체 small HSP 유전자의 도입을 확인하였다. 도입 유전자의 형질전환 벼에 있어서 유전자의 발현 양상을 northern blot 분석으로 조사하였다. 그 결과 도입된 유전자는 상온에서의 발현량이 서로 다르게 나타났으며 항상적으로 발현하고 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 경북대학교 Post-Doc. 연수지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Banzet, N., C. Richaud, Y. Deveaux, M. Kazumaier, J. Gagnon, C. Triantaphylides. 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. Plant J. 13: 519-527.
2. Bytevier, B., F. Deboeck, H. DeGrave, M. van Montagu, J. P. Hernalsteens. 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of monocotyledon Asparagus officiallis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5345-5349.
3. Chou, M., Y. Chen, C. Lin. 1989. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. Plant Physiol. 89: 617-621.
4. Hiei, Y., O. Shozo, K. Toshihiko, K. Takashi. 1994. Efficient transformation of rice (Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium and squence analysis of the boundaries of T-DNA. Plant J. 6: 271-282.
5. Hood, E., G. L. Helmer, R. T. Fraley, M. D. Chilton. 1986. The hypervirulance of Agrobacterium tumafaciens A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol. 168: 1291-1301.
6. Lee, B. -H., Y. Tanaka, T. Iwasaki, N. Yamamoto, T. Kayano, M. Miyao. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. Plant Mol. Biol. 37: 1035-1043.
7. Lee, B. -H., S. -H. Won, H. -S. Lee, M. Miyao, W. I. Jung, I. J. Kim, J. Jo (1999) Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. Gene: in press.
8. Lindquist, S., E. A. Craig. 1988. The heat shock proteins. Annu. Rev. Genet. 22: 631-677.
9. Lee, G. J., N. Pokala, E. Vierling. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. J. Biol. Chem. 270: 10432-10438.
10. Murray, M. G., W. F. Tompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
11. Park, S., R. Shivaji, J. V. Krans, D. S. Luthe. 1996. Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of Agrostis palustris Huds. Plant Physiol. 111: 515-524.
12. Parsell, D. A., S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. Annu. Rev. Genet. 27: 437-496.
13. Toki, S. 1997. Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation of rice. Plant Mol. Biol. Rep. 15: 16-21.
14. Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. Genetics 141: 785-795.
15. Waters, E. R., G. J. Lee, E. Vierling. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J. Exp. Bot. 47: 325-338.