

고려인삼 광계 II Chlorophyll a/b binding Protein 유전자(CAB)의 cloning 및 식물에의 활용연구

김갑식* · 이기원 · 이종철 · 여운형 · 채순용 · 박은경

한국인삼연초연구원
(1999년 12월 5일 접수)

Cloning of CAB cDNA encoding chlorophyll a/b binding protein of photosystem II in Korean ginseng and Use in Plant

Kab-Sig Kim, Ki Won Lee, Jong Cheol Lee, Woon-Hyung Yea,
Soon Yong Chae, Eun Kyung Park

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea
(Received December 5, 1999)

ABSTRACT: A CAB cDNA clone(pKGCAB) encoding the light harvesting chlorophyll a/b binding protein of the semi-shade plant, Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) was isolated by the one-way path random sequencing of ginseng cDNA library clones and transgenic tobacco plants(*Nicotiana tabacum* NC82) were produced by the transformation of this ginseng CAB gene in use of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

The CAB gene showed type 1 structure of LHCP-II, 84% similarity in nucleotide sequence and 92% in amino acid sequence to that of *Nicotiana tabacum* CAB40, respectively.

Seed germination and initial growth of the transgenic tobacco plants transformed with the cDNA fragment were accelerated under low light intensity compared with those of normal tobacco plant, that may result from the higher light sensitivity of the transgenic plants than that of the normal.

Key word : CAB gene, Korean ginseng, seed germination, Transgenic tobacco

반음지성 작물인 고려인삼은 해가림 구조아래 자연광의 5-10%정도의 저광도에서 안정적으로 광합성을 하고 있으며 30% 이상의 고광도에서는 엽소현상(bleaching)으로 잎이 말라 죽는 피해를 입게된다(Park,1980; Lee,1988). 이는 인삼 엽록체에서 저광도에서도 광흡수 효율이 높아 광에너지가

효율적으로 화학에너지로 변환되고 있음을 나타내고 있으며 고광도에서는 너무 많은 광에너지의 흡수로 광합성과정에서의 광반응계 전자전달기작의 과부하로 생성되는 singlet oxygen에 의해 엽록소 및 엽육세포가 파괴되어 나타나는 것이다(Yang 등 1989). 인삼식물이 유전적으로 낮은 광도에서

*연락처 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302번지, 한국인삼연초연구원

*Corresponding author : Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinseong -Dong, Yusong-Ku, Teajon, 305-345, Korea

효율적으로 광에너지를 화학에너지로 전환시키는 능력을 보유하고 있는데 특히 엽록체의 광합성 전자전달계 II 활성에서 양지식물인 무에서 보다 높다고 한다(Kim 등, 1990). 이러한 기작에 핵심적인 역할을 하는 유전자중의 하나가 CAB(LHCP: Light Harvesting Chlorophyll a/b binding Protein)이다(Babiychuk, 1995; Millar and Kay, 1991, 1996; Jansson, 1994; Flachmann and Kühlbrandt, 1995, 1997; Buetow 등, 1988).

양지성 작물인 담배는 생육초기에는 넓은 범위의 광도조건하에서 양호한 생육을 보이는데 어느 정도 자란 중기 이후에는 중상위엽이 넓고 길게 생육하므로써 직사광이 중하위엽으로 비추는 것을 막는 상태가 되어 상하의 잎 사이에 광에 대한 경합이 일어나게 된다. 이러한 결과로 중하위엽들은 광합성이 직사광보다 산란광에 의존하게 되므로써 광부족에 의해 엽육이 얇고 빈약하며, 건조시에 화학성분의 불균형 및 물리성 악화로 잎담배의 품질저하로 이어지고 있는 바, 미국종 중하위엽 잎담배 품질과 비교할 때 큰 차이를 보이고 있다. 또한 도시 근교농업의 발달로 시설재배가 확대되고 있는데 겨울철 시설내의 광부족에 의해 작물이 도장되고 연약해져 병발생이 많아지는 경향이 있는 바, 저광도에서도 고효율의 광합성을 유도할 수 있다면 식물체내 C/N 비율을 증가시켜 작물의 품질향상을 기대할 수 있을 것이다. Ko 등(1992)은 완두의 CAB 유전자를 담배에 도입하여 이 유전자의 발현을 촉진시킨 결과 저광도에서도 형질 전환된 담배의 생육이 촉진되었고 종자의 발아도 촉진되었음을 보고하였는 바, 광합성 관련 유전자의 조작에 의한 광합성능의 변형 가능성을 제시하였다.

따라서 본 연구는 엽록체 틸라코이드 막의 광흡수에 핵심역할을 하는 광계 II CAB 유전자를 광흡수 효율이 높았던 고려인삼(Kim 등, 1990)에서 cloning하여 담배에 도입하므로써 담배의 광에 대한 반응변화를 추적하고 광합성능 변화를 유도하여 생육촉진 및 품질향상에 기여 가능성을 조사하고자 수행하였는 바, 인삼 CAB 유전자의 구조 비교와 이 유전자가 도입된 연초종자의 발아차이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

인삼의 cDNA library 작성 및 유전자 cloning

인삼 꽃을 재료로 하여 mRNA를 추출하였으며 (Promega, PolyATtract isolation system), cDNA를 합성하고 Uni-ZAP vector에 삽입 후 packaging하여(Stratagene) 유전자 은행을 작성하였다. Plasmid DNA의 분리정제, 제한효소처리 등, 일반적인 사항들은 Sambrook 등의(1989) Molecular cloning, Laboratory manual에 따라 수행하였으며 DNA sequence 분석은 ABI Autosequencer를 사용하였다. Random sequencing으로 얻어지는 sequence data는 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Genbank Database에서 homology 탐색 program인 Blast로 탐색하였으며 다른 식물의 CAB 유전자 염기서열과 유사성이 높은 clone을 선발하여 전체 유전자의 구조를 구명하였다.

인삼 CAB 유전자의 연초 형질전환

인삼 cDNA clone중 연초 CAB 유전자와 염기서열상 유사성이 높은 pKGCAB (GenBank Accession No. AF034631) clone을 template로 하여 5'-primer (5'-ccgatatcaaatggcttctccac)와 3'-primer (5'-ttctagagctcttttttt)를 이용한 PCR 결과 transit peptide와 poly A를 포함하는 0.99kb CAB DNA단편을 얻었으며 제한효소 EcoRV 및 Sac I으로 처리하여 같은 제한효소로 처리된 식물 형질전환 vector인 pBI 121에 삽입하였다. 인삼 CAB유전자 함유 plasmid vector를 freeze-thaw법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404균에 형질전환시킨 후 담배 NC82의 잎절편과 함께 혼합하여 28℃에서 1일간 배양하여 가나마이신 함유 선발배지에서 배양하였으며, 재분화 배지에 옮겨 얻어진 재분화된 식물체를 배양실에서 토양에 옮겨 경화시킨 다음, 온실에서 재배하여 채종하였다. 채종된 종자는 Petri dish에 여과지 2매를 깔고 치상하여 28℃의 항온기내에서 발아상태를 검정하였다. 이때 광도의 조건은 차광조건으로서 25 Lux와 차광하지 않은 조건으로 2500 Lux이었다. 식물체의 형질전환 여부는 재분화 식물체에서 정제한 genomic DNA

유전자는 coding region에 intron이 없는 type I 에 속하는 구조를 나타내며 광반응계 II(PS II: photo-system II)의 핵심 단백질(LHCP-II)로 CAB protein family중 가장 풍부하여 필라코이드막 단백질의 절반을 차지하고 있다(Flachmann, Ralf, 1997).

대부분 식물체에서 이 유전자는 핵 DNA에 존재하며 mRNA로 전사되어 세포질에서 단백질로

번역되는데, 초기 immature 형태의 단백질은 amino terminal 에 엽록체내로의 단백질 통과작용에 관여하는 transit peptide가 포함되어 있는데, 이는 엽록체 막 통과시에 절단되고 실제 엽록체 필라코이드막에 정착되어 엽록소와 결합하는 단백질은 mature 형태이다.

식물에서 Type I에 해당하는 LHCP-II는 265-269

Korean ginseng	: 1	MAASTMALSSPSFAGMAVKVAPSSSELFSGGRISMRTGK**KP**AASSGSPWYGPDRVKYL	59
Tobacco(cab-40)	: 1	-----K---LS-----IT-N-KVT-----AS**--AKTV-----	60
Tobacco(cab-21)	: 1	---A-----Q---LS--AP-IT-N-V-----VA**--V*---*-----	58
Lettuce	: 1	-----*---Q---TS-----N--V-----AA**AKK--P-----	59
Tomato(Cab-1B)	: 1	---A-----Q---LS--A--IS-N--T---AVA**--S*--P--*-----	58
Soybean	: 1	-----S-L--Q-I-L---TP--*--V--V-----AS**--T**V-----	57
rice	: 1	---A-----V***--RAAPST--A---EA--T---AAKP--*-----A---L--	58
Maize	: 1	--S-----TA--K--N*-----***--EA-VI---AAKA--*--A-----L--	58
Korean ginseng	: 60	GPFSGEAPSYLTGEFPGDYGDWTAGLSADPETFAKNRELEVIHSRWAMLGALGCVFPELL	119
Tobacco(cab-40)	: 61	-----S-----C-----	120
Tobacco(cab-21)	: 60	-----S-----C-----	118
Lettuce	: 60	-----S-----C-----	119
Tomato(Cab-1B)	: 59	-----S-----C-----	118
Soybean	: 58	-----P-----	117
rice	: 59	--L--P-----L-----	118
Maize	: 59	--L--P-----C-----	118
Panax ginseng:	: 120	ARNGVKFGAEVWFKAGSQIFSEGLDYLGNPSLVHAQSILAIWATQVILMGAVEGYRIAG	179
Tobacco(cab-40)	: 121	-----C--V-----V--	180
Tobacco(cab-21)	: 119	-----C-----V--	178
Lettuce	: 120	-----C--V-----	179
Tomato(Cab-1B)	: 119	-----C--V-----	178
Soybean	: 118	I-----I-----	177
rice	: 119	-----I-----V--V-----	178
Maize	: 119	-----I-----C--V-----	178
Panax ginseng:	: 180	GPLGEVVDPLYPGGSFDPLGLAEDPEAF AELKVKELKNGRLAMFMSMGFFVQAI VTGKGP	239
Tobacco(cab-40)	: 181	-----I-----	240
Tobacco(cab-21)	: 179	-----I-----	238
Lettuce	: 180	-----I-----	239
Tomato(Cab-1B)	: 179	-----I-----	238
Soybean	: 178	-----D-----	238
rice	: 179	-----A-----D-----I-K-----	238
Maize	: 179	-----D-----G-----K-----L-----	238
Panax ginseng:	: 240	LENLADPLADPVNNAWAYATNFVPGK	266
Tobacco(cab-40)	: 241	-----	267
Tobacco(cab-21)	: 239	-----	265
Lettuce	: 240	-----S-----	266
Tomato(Cab-1B)	: 240	-----F-----	265
Soybean	: 239	-----H-----F-----	264
rice	: 240	-----H-----	265
Maize	: 240	-----HI-----	265

Fig. 2. Comparison of amino acid sequence of the Korean ginseng LHCP-II with those from other plants(Acc. No: tobacco cab-40 X52744, cab-21 X52743; lettuce, D14002; tomato cab-1B, M14443, soybean, U01964; rice, D00641; maize, Y00379). Dashes and asterisks represent identical amino acids and gaps introduced for alignment, respectively.

개 아미노산으로 되어 있으며 그중 31-37개 아미노산이 transit peptide를, 또 231-235개의 아미노산이 mature 형태의 단백질을 이루고 있는데 인삼의 경우 transit peptide가 34개, mature LHCP-II가 232개의 아미노산으로 구성되어 있어 그 구조가 타 식물과 비슷하였다.

Nucleotide sequence을 타 식물과 비교해 보면 150번째 염기로부터 3'쪽으로의 부분은 담배, 상추, 토마토, 콩의 것과 82-84% 유사하였으며 transit peptide부위의 염기서열에서 보다 큰 차이를 보여 70-74% 유사하였다(data 미제시).

인삼 CAB 유전자의 핵산 염기서열로부터 유추할 수 있는 아미노산서열을 다른 식물체와 비교해 보면 그림 2 에서와 같이 transit peptide부위와 mature protein의 N-terminal 특정부위에서만 큰 차이를 나타내고 있으며 91-93%의 아미노산이 같았다. 저광도하에서 인삼이 높은 광포집능을 갖고 있음을 감안해 볼 때, 이러한 인삼 CAB의 아미노산서열 차이가 light harvesting 기작에서 적어도 부정적인 영향은 없을 것으로 판단되어 이 CAB 유전자를 연초에 도입하기 위해 그림 3 에서와 같이 vector를 제조하였다.

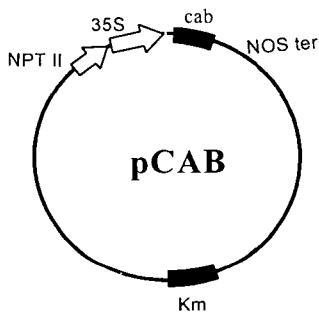


Fig. 3. Schematic diagram of the pCAB expression vector. About 1.0 kb insert of Korean ginseng CAB cDNA including untranslated region at 3'-prime is located between 35S promoter and NOS termination signal.

재조합된 pCAB로 형질전환한 *Agrobacterium tumefaciens*에서 plasmid DNA를 분리정제하여 인삼 고유 primer set를 사용한 PCR에서 900 bp의 DNA

band를 확인하였고(data 미제시) 담배잎 절편과 혼합 배양법으로 처리하여 항생제 kanamycin 배지에서 유식물체를 유기하였다.

16개의 재분화 식물체를 획득하여 각각 식물체 내에 인삼 CAB 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 특수 primer를 이용한 genomic PCR을 수행하였는 바, 정상 NC82에서는 나타나지 않는 0.9kb 크기의 도입된 유전자 DNA단편이 뚜렷이 확인할 수 있었다. 이들은 온실에서 재배하여 개화시 자가수분시켜 채종하였으며 종자에서 발아된 유식물체의 genomic PCR에서도 인삼 CAB유전자 단편을 확인할 수 있었다(그림 4).

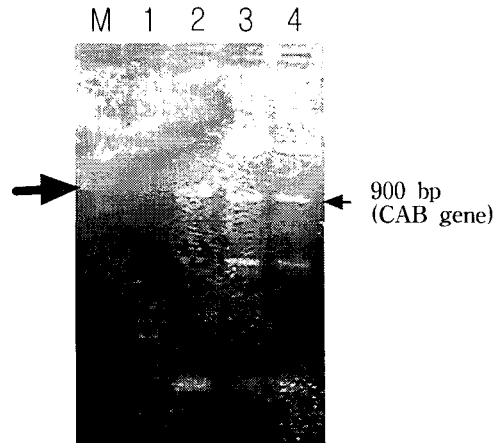


Fig. 4. Genomic PCR of transformed plants of tobacco NC82 with Korean ginseng CAB gene.

- M : DNA marker (: 1 kb)
- 1 : Normal tobacco NC82
- 2-4 : Transformed tobacco NC82 with Korean ginseng CAB gene

PCR was carried out with the specific primer set for Korean ginseng.

5'-primer (5'-tctagaaatggctgcttcacaat)

3'-primer (5'-ggatccaattcacaacaattctt)

형질전환 연초의 발아특성조사

CAB 유전자는 일주성 시계와 빛에 의해서 신호를 받아 발현이 조절되므로 빛이 없는 상태에서

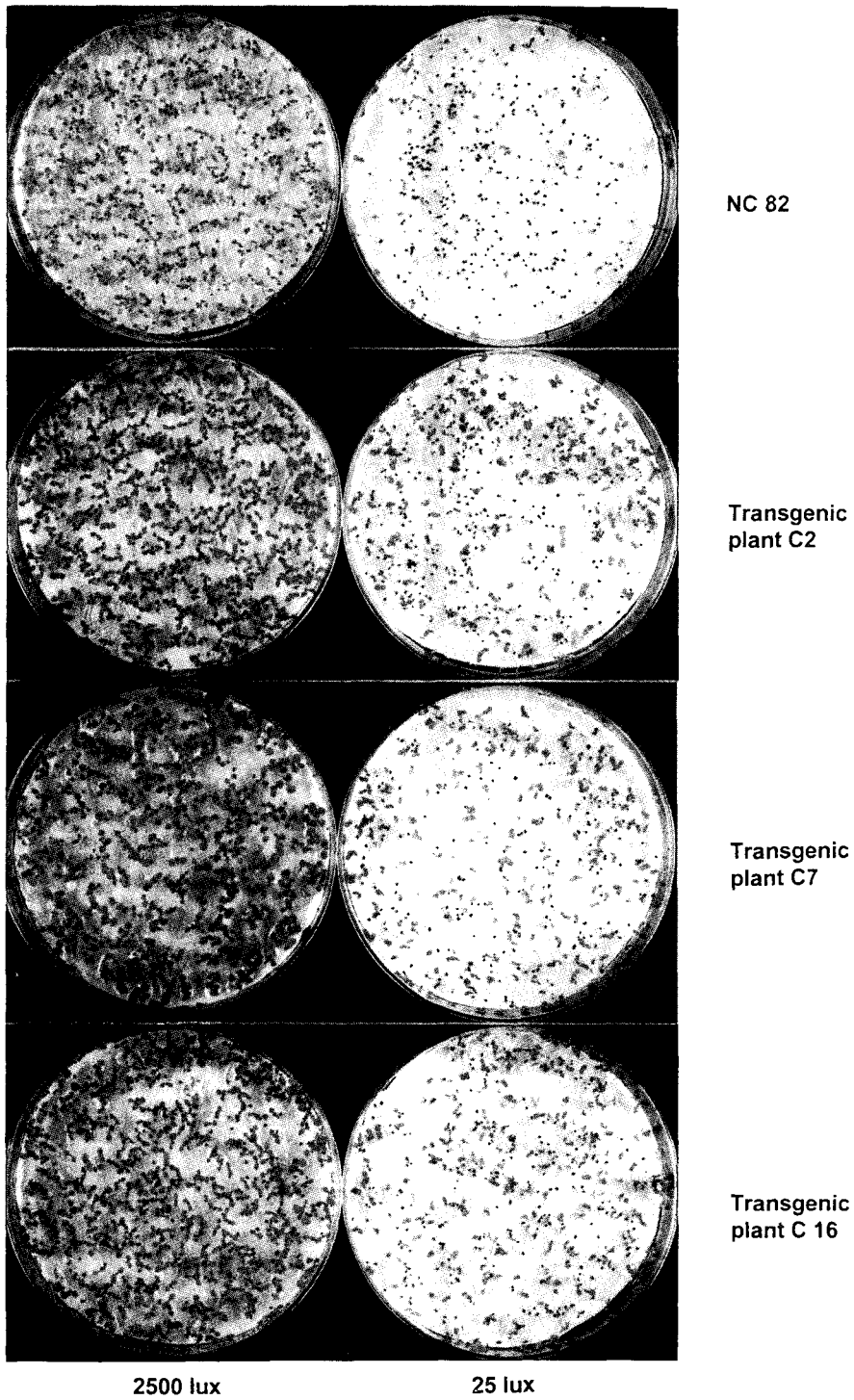


Fig. 5. Seed germination of transgenic and control plants under different light conditions

발아시키는 경우에는 그 발현이 매우 낮다. 만일 어두운 곳에서 싹이 트는 식물에 잠깐 red light를 쬐어주고 다시 암흑에 처리할 경우에도 CAB 유전자가 강력하게 발현되고 그 발현은 빛을 조사한 후 약 4시간 이내에 유도된다 (Millar and Kay 1996, 1991). 이는 식물이 종자의 저장양분을 이용해 토양밖으로 발아되어 지상의 빛을 조우하면 최우선으로 빛에너지를 화학에너지로 전환하는 기구를 만드는 과정이며 오랜 기간동안 생존에 필수적인 이 유전자의 조기발현기작으로 진화되어 왔기 때문이다(Buetow 등, 1988).

광합성에서 광에너지를 화학에너지로 전환하는 첫 번째 과정은 필라코이드막의 단백질-색소 복합체(LHC: light harvesting complex)에 의해 일어난다. 물의 광분해에 의한 산소 방출과정과 함께 광반응계 I(PS I: photosystem I)과 PS II를 포함하고 있는데 주로 광포집에 관련된 LHCP II는 PS II에 존재하고 있다(Flachmann and Kühlbrandt, 1995).

연초의 형질전환체에서 이러한 CAB 유전자의 특성이 나타나는지의 여부를 알아보기 위해서 광도조건을 달리하여 종자를 발아시킨 결과 그림 5에서와 같이 종자 발아 후 떡잎의 전개에서 괄목할만한 차이를 확인할 수 있었다. 저광도 조건인 25 Lux하에서 정상 NC82의 발아율은 97%로 높았으나 떡잎의 전개정도가 낮아 발아율이 낮은 형질전환 식물체(65-80%)보다 초기생육이 저조하였다. 보다 많은 광을 조사한 2500 Lux 하에서는 모두 80-90%이상의 발아율을 보였으나 발아 후 초기 떡잎생장은 정상식물보다 형질전환체에서 우수함을 확인할 수 있었다(그림 5).

종자식물은 우선 떡잎에 저장된 양분으로 종피를 벗어나 광에 조우되면 저장양분으로 광합성기작에 관여하는 단백질들을 합성하게 되는데, 발아 초기 광신호에 의해 유기되는 유전자들의 발현정도가 높을 경우, 광합성을 할 수 있는 구조인 광포집 단백질 복합체 형성이 촉진되는데 이는 떡잎 자체의 양분 이외에 광합성에 의한 양분공급이 추가되어 떡잎전개 및 초기생육을 촉진시키는 결과를 가져오게 된다.

담배종자는 미세종자로서 저장양분이 대형종자에 비해 적어서 발아초기에 광합성기구를 얼마나

빨리 형성하여 독립적인 양분공급체계를 확립하는가 떡잎의 전개 및 초기생육에 큰 차이를 나타낼 것으로 예상되는데, 본 실험에서 인삼 CAB 유전자가 삽입된 형질전환 연초종자가 정상 NC82종자보다 빠른 떡잎의 전개를 보이고 있는 것은 형질전환체가 낮은 광도에서도 광에 민감하게 반응하여 광포집 단백질 복합체(light harvesting complex) 생성기작을 정상 NC82보다 빨리 유도하므로서 나타난 결과라 생각되었다.

Ko 등(1992)은 완두콩의 CAB 유전자를 연초에 도입하였던 바, 형질전환체에서 CAB 발현정도가 증가하여 단위 PS II당 light harvesting chlorophyll a/b binding protein이 많이 합성되었고 잎의 g 당 엽록소 함량은 1.5배, light harvesting complex II 함량은 2-3배 증가했음을 보고하였다. 생육에도 큰 차이를 보여 잎의 크기도 컸으며 최종 식물체 키도 정상 식물체의 2배에 달하였고 특히 종자 발아도 1-2일 빨리 되어 조기에 녹색잎을 형성, 유묘생육이 촉진되었으며 특히 저광도하에서 광합성능이 정상식물보다 높았음을 보고하였다.

이와 같은 보고를 참조해 보면 인삼 CAB 유전자의 연초 형질전환체도 정상 식물에 비해 광에 민감하게 반응하는 것이 도입유전자의 발현증가에 의해 나타나는 결과로 추정되는 바, 앞으로 도입 유전자의 발현정도, 광합성능의 변화, 자연상태인 야외포장에서 연초 생육특성 및 잎담배 품질변화 등에 대한 연구가 수행될 예정이다.

결 론

반음지성 작물인 고려인삼에서 광에너지를 화학에너지로 전환하는 기작에 핵심역할을 하는 광계 II 광포집 색소결합 단백질(light harvesting chlorophyll a/b binding protein of PS II) 유전자인 CAB을 인삼 cDNA은행 clone들의 염기서열분석에 의해 cloning하고 그 구조를 구명하였으며, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용해 이 유전자를 연초에 형질전환하여 형질전환식물체를 얻었다.

Cloning된 인삼의 CAB 유전자는 type I 의 유

전자로 담배의 유전자와 핵산염기서열에서 84%, 아미노산 서열에 있어서 92%의 유사성을 보였다.

이 CAB 유전자를 연초에 형질전환하여 얻은 식물체의 종자를 저광도하에서 발아시킨 결과, 발아초기 떡잎생육이 정상의 종자에서보다 촉진되었는 바, 형질전환체의 광신호 반응이 정상식물보다 민감하였다.

참 고 문 헌

- Babiychuk, E., R. S. Chantz, N. Cherep, J.-H. Weil, Y. Gleband, and S. Kushnir (1995) Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in *Solanaceae* cybrids. *Mol. Gen. Genet* 249:648-654.
- Buetow, D .E., H. Chen, G. Erdös, and L. S. H. Yi (1988) Regulation and expression of the multigene family coding light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II; in "*Molecular Biology of Photosynthesis*" edited by Govindjee *et al.* pp 283-319.
- Flachmann, R. and W. Kühlbrandt (1995) Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *The Plant cell* 7: 149-160.
- Flachmann, R. (1997) Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. *Plant Physiol.* 113:787-794.
- Jansson, S. (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochemica et biophysica Acta*, 1184:1-19.
- Kim, K. S., J. H. Son, and K. T. Choi (1990) Characteristics of photosynthetic electron transport activity in isolated chloroplasts of Korean ginseng and radish. *Korean J. Bot.* 33: 111-118.
- Ko, K., Z. W. Ko, D. H. Turpin, C. Labates, N. Mohanty, and A. Granell (1992) Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco; in *Research in Photosynthesis* vol. III edited by N. Murata. PP. 445-448. Kluwer Academic publishers.
- Lee, C. H. (1988) Effect of light intensity and temperature on the photosynthesis and respiration of *Panax* spp. *Korean J. Ginseng Sci.* 12: 11-29.
- Millar, A. J. and S. A. Kay (1991) Circadian control of cab gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *The plant Cell* 3:541-550.
- Millar, A. J. and S. A. Kay (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling *cab* gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:15491-15496.
- Park, H. (1980) Physiological response of *Panax ginseng* to light. *Proc. 3rd International ginseng sym.* pp.151-170.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning ; A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Yang, D. C., M. W. Kim, Q. Chae and M. S. Kim (1989) Effect of active oxygen species(1O_2 , O_2 , $^{\cdot}H_2O_2$) and scavengers on the chlorophyll bleaching of leaf burning disease from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean J. Ginseng Sci.* 13: 98-104.