

형질전환 담배에서 *Amaranthus* 저장단백질인 *AmA1* 유전자의 발현

김태금 · 김영숙¹ · 권태호^{*1}

전북대학교 자연과학대학 생물과학부, ¹유전공학 연구소

Expression of *AmA1* Gene Encoding Storage Protein of *Amaranthus* in Transgenic Tobacco

KIM, Tae Geum · KIM, Young Sook¹ · KWON, Tae Ho^{*1}

Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University;

¹Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

ABSTRACT A 1,183bp cDNA, *AmA1*, encoding the seed storage protein of *Amaranthus hypochondriacus* was isolated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and characterized. *AmA1* gene was subcloned into plant binary vector under Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter and nopaline synthase terminator (3'NOS). The recombinant binary vector was used to transform *Nicotiana tabacum* using *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation procedure. Shoots were induced on MS medium with 0.1 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA, 100 mg/L kanamycin and 250 mg/L cefotaxime. Transgenic plants were selected on rooting medium based on MS medium containing 200 mg/L kanamycin and 250 mg/L cefotaxime without phyto regulators. The presence of *AmA1* gene in the transgenic plants was confirmed by PCR followed by DNA hybridization. The expression of *AmA1* gene in the transgenic plant was observed by RT-PCR method.

Key word : *AmA1* gene, CaMV 35S promoter, RT-PCR

서 론

*Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환 기술과 조직배양 기술이 발전하면서 많은 연구자에 의해서 외래 유전자를 식물에 도입시킴으로써 식물의 가치를 증가시키려는 노력이 행하여졌다. 이러한 분야로는 식물의 영양 가치 증진과 병충해에 대한 저항성 증진 (Shah 1997; Yuan and Knauf 1997)에 대한 연구가 있으며, 최근에는 약물의 생합성, 백신 생산 그리고 산업적으로 유용한 단백질의 생산 (Goddijn and Pen 1995; Haq et al. 1995) 등에 대한 연구가 이루어지고 있다. 식물의 영양 가치를 증가시키려는 방법으로는 특정한 아미노산의 생합성에 관여하는 유전자를 조작하는 것 (Matthews and

Hughes 1993)과 영양적 가치가 많은 외래 유전자를 식물에 도입시키는 방법 (Guerche et al. 1990) 등이 알려져 있다. 주요 작물의 저장 단백질은 인간에게 중요한 영양분을 공급하고 가축에게도 사료로써 많은 부분을 차지하고 있는데 반하여 단백질의 대부분은 최소한 한 가지 이상의 필수 아미노산이 부족하다.

*Amaranthus*의 저장 단백질인 *AmA1*은 필수 아미노산 함량이 풍부하고, 그 조성은 World Health Organization에서 인정하는 것 (table 1)과 거의 일치한다. 이 단백질은 이미 분리되어 특성이 규명되었으며, cDNA도 분리되어 특성이 규명되었다 (Raina and Datta, 1992). *AmA1*의 분자량은 35 kDa, 유전자의 길이는 1.2 kb로 한 개의 major open reading frame을 가지고 304개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드를 만든다. 이 단백질에는 lysine, leucine, threonine, phenylalanine, valine, sulfur-containing 아미노산 등과 같은 필수 아미노산들이 풍부하게 존재하고 있기 때문에 *AmA1* 유

*Corresponding author. Tel 063-270-3569

E-mail thkwon@moak.chonbuk.ac.kr

Table 1. Percentage of essential amino acids of AmA1 in comparison to the World Health Organization recommended values.

Amino acid	% of total amino acids	
	AmA1*	WHO**
Trp	3.6	1.0
Met/Cys	3.9	3.5
Thr	5.1	4.0
Ile	6.1	4.0
Lys	7.5	5.5
Val	5.2	5.0
Phe/Thr	13.7	6.0
Leu	9.2	7.0

* Data from ref. Senft JP(1980).

** Calculated by considering total residue number of each amino acid from the sequence and their respective molecular weights.

전자는 높은 영양 가치를 가진 유전자로써 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

본 연구는 *AmA1* 유전자를 주요 작물에 도입시키기에 앞서 담배를 이용하여 *AmA1* 유전자를 비교적 강하고 constitutive 하게 발현되는 CaMV 35S promoter의 조절을 받도록 vector를 제작하여 담배에 형질전환시키고 유전자의 발현을 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물 재료

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Havana)의 종자를 1% NaOCl 용액에 15분간 살균하고 멸균수로 4~5회 수세한 후에 sucrose 3%와 agar 0.8%를 함유한 MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 파종하여 25°C, 일장 16시간으로 growth chamber에서 배양하였다.

AmA1 유전자 확보와 발현 vector 구축

AmA1 cDNA의 5'부위에 specific한 primer23 (5'-ATCAG ATTAACATAATTTCAACAAT-3')과 3'부위에 specific한 primer24 (5'-TATAATTCTAACAATTATTTT-3')를 가지고 *A. hypochondriacus*의 씨앗에서 추출한 총 RNA로부터 RT-PCR를 시행하였다. RT-PCR product를 pUC18 vector의 *SmaI* 부위에 cloning하고 *AmA1* 유전자의 *XbaI*(5')-*KpnI*(3') 단편을 CaMV 35S promoter와 3'NOS를 가지고 있는 binary vector인 pMY28의 *XbaI*(5')-*KpnI*(3') 부위에 도입하여 발현 vector를 구축하였다. 이 발현 vector를 tri-parental mating (Ditta et al. 1980) 방법을 이용하여 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다.

담배의 형질전환

담배의 형질전환은 leaf disc 형질전환 방법 (Horsh et al. 1985)을 이용하였다. 종자를 기내 발아시킨 후 전개된 담배 잎을 0.5×0.5 cm 크기로 자른 다음 *Agrobacterium* 용액에 20분간 침지하여 집종 후, 1.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA를 첨가한 MS 고형배지에 치상하여 25°C, 암소에서 48시간 공조배양 하였다. 공조배양 후에 위와 같은 조성의 배지에 100 mg/L kanamycin과 250 mg/L cefotaxime을 첨가한 선발배지에 치상하여 신초를 유도하였다. 선발배지에서 잎 절편으로부터 분화된 신초는 식물 생장 조절제를 첨가하지 않고 200 mg/L kanamycin과 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 뿌리유도배지에서 뿌리를 유도하였다. 뿌리가 형성된 형질전환 담배는 화분에 옮겨 순화시킨 다음 유전자 분석에 사용하였다.

계놈 DNA 추출 및 PCR 분석

형질전환된 담배의 잎을 액체질소를 첨가하면서 마쇄한 다음 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)를 이용하여 계놈 DNA를 추출하고, spectrophotometer를 사용하여 정량하였다. Primer23과 primer24를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 주기로 30회 시행하였고 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.0% agarose gel 전기영동으로 분석하였고, 이 젤을 nitrocellulose filter로 옮긴 후 Church buffer를 이용 (Church and Gilbert 1984)하여 혼성화 반응을 시행하였다.

RNA 추출 및 RT-PCR

형질전환된 담배의 잎을 액체질소를 첨가하면서 마쇄한 후, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)를 이용하여 총 RNA를 추출하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. First-strand cDNA synthesis kit (Pharmacia)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성한 후 계놈 DNA에서와 같은 조건으로 RT-PCR을 수행하여 분석하고, 이 젤을 nitrocellulose filter로 옮긴 후 Church buffer를 이용한 방법 (Church and Gilbert 1984)으로 혼성화 반응을 시행하였다.

결과 및 고찰

AmA1 유전자 확보와 발현 vector 구축

AmA1 유전자는 *Amaranthus*가 씨앗을 형성하는 초기에 많이 발현되는 것으로 알려져 있기 때문에 *A. hypochondriacus*가 꽃이 피고 씨앗이 맺기 시작할 때부터 씨앗을 수

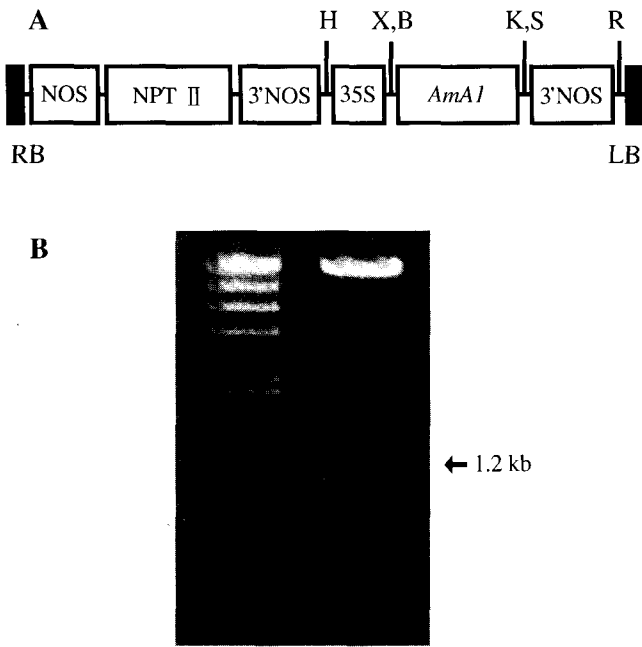


Figure 1. A, Schematic diagram of the expression vector used for the transformation of tobacco. The full-length cDNA of *AmA1* was placed under the control of the CaMV 35S promoter. Restriction enzyme sites of *Hind* III (H), *Xba* I (X), *Bam*H I (B), *Kpn* I (K), *Sac* I (S), and *Eco*R I (R) were shown. B, Restriction enzyme analysis of the recombinant vector. Plasmid DNA was digested with *Bam*H I and *Sac* I.

확하였고 총 RNA를 추출하여 RT-PCR를 수행하였다. RT-PCR 결과 1.2 kb cDNA 단편이 확인되었고, 염기서열 분석을 수행한 결과 이미 발표된 *AmA1* 유전자의 염기서열과 완전히 일치하였고 이 유전자의 deduced amino acid 조성을 살펴보면 필수아미노산 함량이 높고 균형 있게 분포되어 있었다. 이 *AmA1* 유전자를 CaMV 35S promoter와 3'NOS를 가지고 있는 식물 발현 vector에 subcloning하였고 *Xba*I과 *Kpn*I제한 효소로 잘라 1.2kb 단편을 확인하였다. 제조된 recombinant vector를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하였고 plasmid DNA를 분리하여 *E. coli*에 다시 도입한 후, *Xba*I과 *Kpn*I제한 효소로 잘라 1.2kb 단편을 확인하였다 (figure 1).

식물의 형질전환

담배에 *AmA1* 유전자를 도입시키기 위하여 제조된 재조합 vector를 포함하고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404를 가지고 기내 배양한 담배의 잎 절편과 20분간 침지한 후에 48시간 공조배양하여 잎 절편을 선발배지에 계대 배양한 결과, 배양 2주 후 부터 치상체의 절단면에서 신초가 분화되기 시작하여 비교적 빠른 분화 양상을 보였다. 분화된 신초는 뿌리 유도배지에서 뿌리가 분화되었으며, pot에 이식하여 10개체의 형질전환체를 획득하였다. 일반적으로 *Agrobacterium*을 이용하여 식물에 형질전환을 시킬 경우 형질전환에 오랜 기

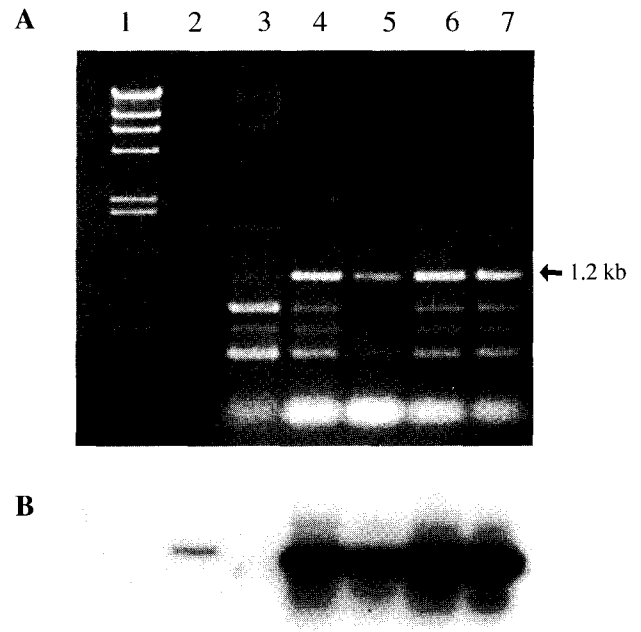


Figure 2. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of PCR products. Lane 1, λ /*Hind* III; lane 2, *AmA1* cDNA; lane 3, non-transgenic tobacco; lane 4-7, independent transgenic lines.

간이 소요되는 문제점이 있다. 형질전환이 비교적 잘 된다고 보고된 감자에서는 배양 40여일 만에 신초가 분화되었다고 보고한 바 있다 (Choiet al. 1996a, 1996b). 따라서 본 연구는 비교적 식물체 재분화가 용이한 담배를 이용하여 유전자의 발현을 빠르게 확인하여 유용한 식물의 영양가치 증진을 위한 기초 자료를 제공하고자 수행되었다.

계놈 DNA 분석

AmA1 유전자가 담배 식물체의 계놈 DNA에 들어갔는지 확인하기 위해 형질 전환된 담배 중 비교적 성장이 빠른 4개체를 골라 앞으로부터 계놈 DNA를 추출하였다. *AmA1* 유전자에 specific한 primer23과 primer24를 가지고 PCR를 수행한 결과 4개체 모두에서 1.2 kb 단편을 확인할 수 있었고 대조구인 비형질전환 담배에서는 같은 크기의 DNA 단편을 확인할 수 없었다. PCR 결과로 나온 DNA 단편이 *AmA1* 유전자가 확실한지 확인하기 위하여 *AmA1* 유전자를 probe로 사용하여 Southern blot analysis를 하였다 (figure 2). 분석 결과는 PCR 결과와 일치하였는데 이것으로 보아 *AmA1* 유전자가 담배의 계놈 DNA에 성공적으로 도입되었음이 확인되었다.

형질전환 식물체에서 AmA1 유전자의 발현

형질전환된 담배에서 *AmA1* 유전자의 발현을 확인하기 위

해 *AmA1* 유전자에 specific한 primer23과 primer24를 이용한 RT-PCR를 수행한 결과, 4개체의 형질전환된 담배 모두에서 1.2 kb 단편이 확인되었고 비형질전환 담배에서는 같은 크기의 DNA 단편을 확인할 수 없었다. RT-PCR 결과로 나온 DNA 단편이 *AmA1* 유전자가 확실한지 확인하기 위하여 *AmA1* 유전자를 probe로 사용하여 Southern blot analysis를 한 결과, RT-PCR 결과와 동일하였다 (figure 3). 이상의 결과로 볼 때에 담배에 도입된 *AmA1* 유전자가 안정적으로 발현됨을 알 수 있었다.

최근에 들어 식물에 외래 유전자를 도입하여 발현시킴으로써 식물의 산업적인 가치를 높이려는 보고가 있으며 그 중 인간이나 가축에게 필요한 필수아미노산 함량이 적은 식물의 영양 가치를 증진시키고자 하는 시도가 행하여지고 있다. 그 실례로 Brazil nut에서 methionine를 많이 함유하는 단백질의 유전자를 감자에 형질전환 시켜 methionine의 함량을 증가시켰고 (Tu et al. 1998), 인간의 모유 단백질인 β -casein의 유전자를 감자에 형질전환 시킴으로써 분유를 대체하려는 (Chong et al. 1997) 노력 등을 들 수 있다. 그러나 필수 아미노산을 많이 함유하고 있는 유전자를 도입시켜 식물의 영양 가치를 증가 시켰다는 연구는 아직 미비한 실정이다.

본 연구에서는 필수아미노산 함량을 많이 포함하고 균형 있게 분포되어 있고, WHO에서 인정하는 기준에 가까운 단백질의 *AmA1* 유전자를 식물체에 도입시키기 위하여 식물 형질전환에 널리 이용되는 담배를 이용하여 형질전환 시켜 보았다. 실험 결과 *AmA1* 유전자가 성공적으로 담배의 게놈 DNA에 도입된 것을 확인할 수 있었고 그 유전자가 mRNA 수준에서 안정하게 발현됨을 확인하였다. 따라서 이 결과를

기초로 하여 인간에게 유용한 식물인 상추, 감자, 토마토 등의 영양가치를 증진시킬 수 있을 것으로 기대한다.

적 요

*Amaranthus hypochondriacus*의 저장 단백질을 encoding 하는 *AmA1* 유전자를 RT-PCR 방법을 이용하여 분리하고 특성화하였다. *AmA1* 유전자를 담배에 형질전환 시키기 위해 CaMV 35S promoter와 3' NOS를 가지고 있는 식물 발현 vector에 subcloning 하고 이 재조합 vector를 이용하여 *Agrobacterium*-mediated 형질전환 방법을 이용하여 담배에 도입시켰다. 신허는 0.1 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA, 100 mg/L kanamycin 그리고 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 MS 선발 배지에서 선발했고, 선발된 신허는 식물 성장 조절제를 첨가하지 않고 200 mg/L kanamycin과 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 MS 배지에서 뿌리를 유도하였다. 선발된 담배의 게놈 내의 *AmA1* 유전자의 존재는 PCR 방법과 hybridization을 이용하여 확인되었고, *AmA1* 유전자의 발현은 RT-PCR 방법과 Southern blot hybridization을 사용하여 확인되었다.

사사 - 본 연구는 전북대학교 국제공동연구비의 지원과 전북대학교 유전공학 연구소의 일부 지원으로 수행되었음.

인용 문헌

Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Cho SJ, Lim YP, Joung H (1996a) Development of herbicide-resistant transgenic potato. Korean J. Plant Tissue Culture 23:161-165

Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1996b) Expression of cold-regulated gene in transgenic *Solanum tuberosum* L. Korean J. Plant Tissue Culture 23:311-315

Chong DK, Roberts W, Arakawa T, Illes K, Bagi G, Slattey CW, Langridge WH (1997) Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants. Transgenic Res 6:289-296

Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81:1991-1995

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range cloning system for gram negative bacteria construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA 77:7347-7351

Goddijn OJM, Pen J (1995) Plants as bioreactors. Trends Biotechnol 13:379-387

Guerche P, De Almeida E, Schwarzein MA, Gander E, Krebbers E, Pelletier G (1990) Expression of the 2S albumin from *Bertholletia excasa* in *Brassia napus*. Mol Gen Genet 221:306-314

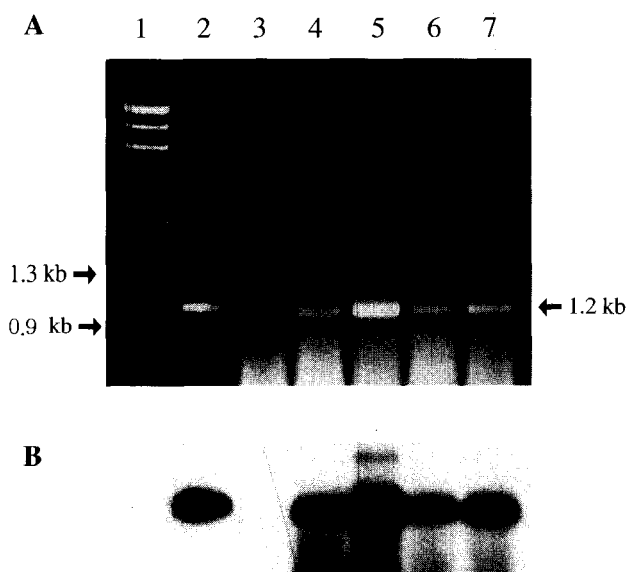


Figure 3. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of RT-PCR products. Lane 1, λ HindIII and EcoRI; lane 2, *AmA1* cDNA; lane 3, non-transgenic tobacco; lane 4-7, independent transgenic lines.

- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ** (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* **268**:714-719
- Horsch RB, Fry JE, Hofman NL, Eichholz D, Rogers SG, Fraley RT** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**:1229-1231
- Matthews BF, Hughes CA** (1993) *Amino acids*(Vienna) **4**:21-34
- Murashige T, Skoog F** (1962) A reverse medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Raina A, Datta A** (1992) Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:11774-11778
- Senft, J. P.** (1980) Proceeding of the 2nd *Amaranthus* Conference (Rodale, Emmaus, PA),43-47.
- Shah DM** (1997) Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. *Curr Opin Biotechnol* **8**:208-214
- Tu HM, Godfrey LW, Sun SS** (1998) Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Mol Biol* **37**:829-838
- Yuan L, Knauf VC** (1997) Modification of plant components. *Curr Opin Biotechnol* **8**:227-233

(접수일자 2000년 5월 18일)