

CAB (Chlorophyll a/b Binding Protein) 유전자의 형질전환 식물체에서 발현

박성원* · 김선원¹ · 이영기 · 강신웅 · 이청호 · 이종철 · 최순용¹
한국인삼연초연구원, ¹한남대학교 미생물학과

Expression of CAB (Chlorophyll a/b Binding Protein) Gene in Transformed Plants

PARK, Seong Weon* · KIM, Sun Won¹ · LEE, Yung Gi · KANG, Shin Woong,
LEE, Cheong Ho · LEE, Jong Chul · CHOI, Soon-Yong¹

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

¹Department of microbiology, HanNam University, Taejon, 306-791, Korea

ABSTRACT Transgenic tobacco plants were produced by the transformation of ginseng CAB gene using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The presence of CAB gene in the second generation of transgenic tobacco plant was confirmed by genomic PCR. The photosynthetic ability of transgenic plants was higher than normal tobacco plants and the maximum photosynthetic point of transgenic and normal tobacco plants was $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The photosynthesis of C7, C11, C14 cell lines was higher than normal plants at all the light intensities investigated. The photosynthesis of C2, C11, C14 cell lines in 90% dark condition was higher than normal plants. The chlorophyll contents of transgenic tobacco plants were almost same as normal plants. The % of dry weight, nicotine content, total sugar and nitrogen contents of harvested transgenic tobacco plant leaves were almost same as normal plants.

Key words: CAB gene, photosynthesis, transgenic tobacco plant

서 론

고등식물이 이용하는 대부분의 빛 에너지는 엽록소 a/b에 의하여 흡수되는데 이 엽록소는 엽록체 내의 틸라코이드 막에 단백질과 비공유결합되어 엽록소-단백질 복합체 형태로 존재한다 (Flachmann 1997). 이 엽록소-단백질 복합체는 광계 I (photosystem I, PS I)과 광계 II(photosystem II, PS II)를 구성하고 있다. 각 광계의 반응 중심은 광수확 엽록소 a/b 복합체 (light-harvesting complex, LHC)로 둘러싸여 있

으며, 이 복합체는 핵 내의 CAB (chlorophyll a/b binding protein) 유전자에 의해 발현된다 (Babiychuk et al. 1995; Jansson 1994; Millar and Kay 1991). 이때 LHC 복합체의 기능은 빛 에너지를 잡기 위한 안테나의 시스템으로서 광합성을 위한 빛을 모으는 중요한 역할을 한다 (Funk et al. 1995; Flachmann and Kühlbrandt 1995).

빛에 충분히 노출된 잎은 광합성 작용을 활발히 하여 많은 당을 생산하지만 빛이 가려진 잎은 광합성이 불가능한 잎도 있어서 조기 낙엽으로 도태될 수 있다. 특히 양지성 작물인 담배는 생육 초기에는 넓은 범위의 광도조건 하에서 양호한 생육을 보이는데 중기 이후에는 중·상위엽이 넓고 길게 생육하므로 중·하위엽의 빛을 차단하는 상태가 되어 상·하의 잎 사이에 광에 대한 경합이 일어나게 된다. 실제로 잎에 도

*Corresponding author. Tel 042-866-5441 Fax 042-862-2522
E-mail swpark@gtr.kgtri.re.kr

달한 광선은 일광의 10% 정도만 잎을 투과하게 되고 엽맥을 침투해온 광선의 대부분은 편광 혹은 산란광으로 잎을 통과하게 되므로 중·하위엽에 도달하는 광은 일광의 1% 이하이다. 잎 3매가 겹쳐 있을 때 두 번째 잎은 6%에 해당되는 빛 에너지를 세 번째 잎은 0.35%의 빛 에너지만을 이용할 수 있게 되므로, 담배의 경우 중·상위엽에 의해 해가림이 되는 하위엽은 그 수확시기가 지나면 조기 낙엽 및 품질의 저하가 되는 것이 사실이다.

특히 고려인삼은 반 음지성 작물로서 해가림 구조 아래 자연광의 5~10% 정도의 저광도에서 안정적으로 광합성을 하여 생육하고 있으며 30% 이상의 고광도에서는 엽소현상(bleaching)으로 잎이 말라죽는 피해를 입게 된다. 이는 인삼 엽록체에서 저광도의 광 에너지를 효율적으로 화학에너지로 변화되고 있음을 나타내고 있으며, 고광도에서는 너무 많은 광에너지의 흡수로 광합성 과정에서의 광반응계 전자전달기작의 과부하로 생성되는 singlet oxygen에 의해 엽록소 및 엽육세포가 파괴되어 나타나는 것이다 (John et al. 1995).

CAB 유전자의 형질전환은 대부분 *Arabidopsis*를 이용하여 광합성 생리에 관한 학술적 연구의 일환으로 진행되고 있으나 캐나다에서 실험적으로 담배 (*N. tabacum* cv. Petit Havana SR1)를 형질전환시켜 광합성능 제고 효과가 입증된 바 있다 (Millar and Kay 1996). 그러나 포장조건에서 원료엽으로서의 제반 특성을 유지하면서 물질생산이 증가한 담배로 실용화를 위해서는 형질전환 담배의 광합성 효율 변화, 광합성량, 엽록소 함량 등 생리학적 연구와 온실 및 포장조건에서의 생육특성 검정이 수행되어야 할 것이다.

따라서 본 실험은 저 광도에서 광흡수 효율이 높아 빛 에너지를 효율적으로 화학에너지로 변환시킬 담배의 하위엽의 광합성 효율을 좀 더 높이고자 고려 인삼으로부터 에너지의 변환에 핵심적인 역할을 하고 있는 유전자 중 CAB 유전자를 담배에 도입하여 형질전환 식물체를 선발하여 그 생리적 특성을 조사함으로써 담배의 하위엽 품질 향상에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

인삼 CAB 유전자의 연초 형질전환

인삼 cDNA clone중 연초 CAB 유전자와 그 염기서열상 유사성이 높은 pKGCAB (GenBank Accession No. AF 034 631) clone을 PCR을 이용하여 transit peptide와 poly A를 포함하는 0.99 kb 단편을 식물 발현 벡터인 pBI121에 cloning하였다 (Figure 1). 재조합된 식물발현 벡터 pCAB plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 도입하였으며, 형질전환된 균주를 담배잎 절편에 동시배양법에 의하여 형질전환을 시도하였으며 kanamycin이 포함된 shoot 유

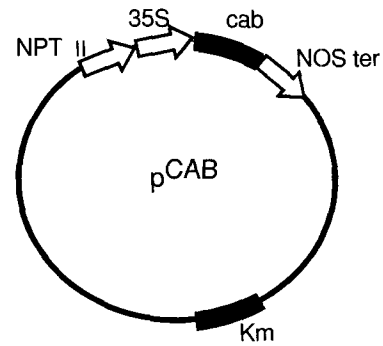


Figure 1. The structure of plant expression vector, pCAB plasmid. 35S: CaMV 35S promoter, cab: ginseng chlorophyll a/b binding protein, and NPT II: neomycin phosphotransferase II.

기 배지에서 재분화 식물체를 획득하였다.

형질전환 식물체의 도입된 유전자 확인

형질전환 연초 R2세대 식물체는 genomic PCR에 의해 CAB 유전자의 존재여부를 확인하였다. 식물체의 형질전환 여부는 재분화 식물체에서 정제한 genomic DNA를 template로 하고 인삼 CAB 유전자 염기서열에 따라 합성된 5'-primer (5'-tctagaaatggctgtctccacaat)와 3'-primer (5'-ggatccaattcacaacaattctt)를 이용하여 PCR한 후 890 bp 크기의 DNA 단편이 합성되는지 여부로 확인하였다.

광합성량 측정 및 chlorophyll 함량 조사

식물체의 광합성량은 Li-6400 Portable Photosynthesis system (Li-Cor Inc., Lincoln, NE)를 이용하여 CO₂ 교환율 (CO₂-exchange rates, CER)을 측정하였다. 식물체의 chlorophyll 함량은 식물체의 생엽을 95% ethanol에 4°C, 1주일 동안 충분히 추출하여 Porra 등 (Porra et al. 1989)의 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

CAB 유전자의 연초 형질전환 및 선발

저광도에서도 광합성 효율이 높은 인삼의 광합성능을 제고시키는 CAB 유전자를 식물발현벡터인 pBI121에 재조합한 pCAB plasmid (Figure 1)를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하여 연초 (*Nicotiana tabacum* cv. NC82)의 형질전환 실험에 계속하여 사용하였으며 형질전환된 연초의 엽육조직을 shoot 유기배지에 치상하여 다수의 shoot가 유기되었고 (Figure 2) 형질전환된 연초 식물체를 다수 획득하였다 (Kim et al. 1999). 인삼 CAB 유전자로 형질전환된 연초 2세대 식

물체의 도입된 cab 유전자 존재여부를 primer를 사용한 genomic PCR 방법으로 조사하였으며 그 결과는 figure 3과 같다. 형질전환 2세대 식물체 C2, C3, C7, C9, C11, C14, C16 (Figure 3, lane 1 - 7)의 각계통에서 도입된 유전자를 primer에 의해 합성된 DNA band를 확인하였고 정상 연초 NC82에서는 band가 확인되지 않았다(Figure 3, lane 8 and 9).

CAB 유전자 형질전환 식물체의 생리특성 조사

CAB 유전자로 형질전환된 2세대 식물체가 자연광 조건과 90% 차광된 조건의 온실에서 각각 자란 연초 식물체를 광량을 다르게 주면서 광합성능 정도를 조사한 평균 결과 형질전환 식물체의 광합성능 정도는 정상 NC82와 유사하거나 약간 높은 경향이였으며, 광포화점은 형질전환 식물체나 정상 NC82 모두 $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 유사하였다. 형질전환 2세대

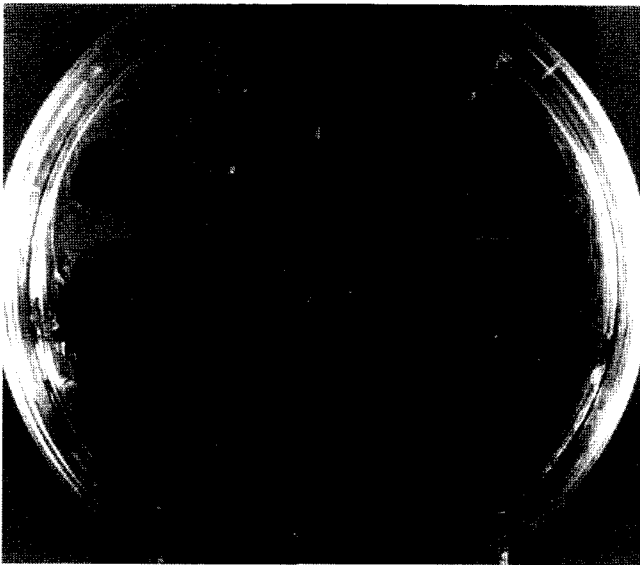


Figure 2. Transformed tobacco leaf tissues in shoot induction medium.

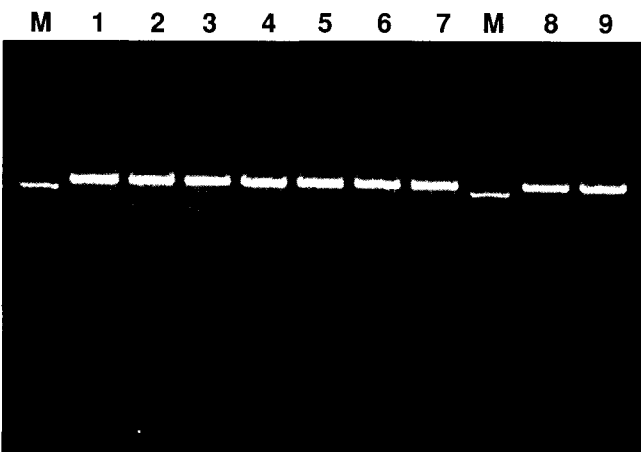


Figure 3. Genomic PCR of transgenic tobacco plants with CAB gene. M: 100 bp ladder, 1: C2, 2: C3, 3: C7, 4: C9, 5: C11, 6: C14, 7: C16, 8: NC82, 9: Br21

연초 식물체 7계통 중 C7, C11, C14 계통의 광합성능 정도가 조사된 모든 광량에서 NC82보다 높게 나타났으며 포장에서 최대에너지인 $1,500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서도 약 40%정도 광합성능이 높게 나타났다 (Figure 4).

인삼 CAB 유전자로 형질전환된 연초 2세대 식물체를 온실에서 자연광 조건과 90% 차광된 조건에서 각각 생육된 식물체의 광도별 광합성 정도를 각각 조사한 결과는 figure 5와 figure 6과 같으며 자연광 조건에서 생육한 7계통의 형질전환 식물체의 광합성 정도는 정상식물체에 비하여 약 20%정도 광합성능이 높았으며 특히 C7, C11, C16 계통은 $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광도에서 정상식물체보다 각각 8%, 10%, 5% 높게 나타났으며, 조사된 $500 \sim 1,500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 전반적으로 광합성능이 높게 나타났다 (Figure 5).

차광된 조건에서 생육한 담배 식물체의 광합성능 정도를 조사한 결과 4계통의 형질전환 식물체는 정상식물체에 비하여 광합성능이 낮게 나타났으나 조사된 7계통중 C2, C11, C14 계통은 90% 차광된 온실조건에서도 광합성능이 우수하게 나타났으며 특히 C11계통의 광합성능은 $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광도에서 정상식물체보다 13% 높게 나타났다 (Figure 6).

형질전환 연초 식물체의 chlorophyll 함량을 조사한 결과 형질전환 연초식물체의 chlorophyll 함량은 정상 NC82와 차이가 없었으며, 또한 양지에서 생육한 조건과 90% 차광된 조건 모두에서 chlorophyll 함량의 차이는 없었다 (Table 1). 광

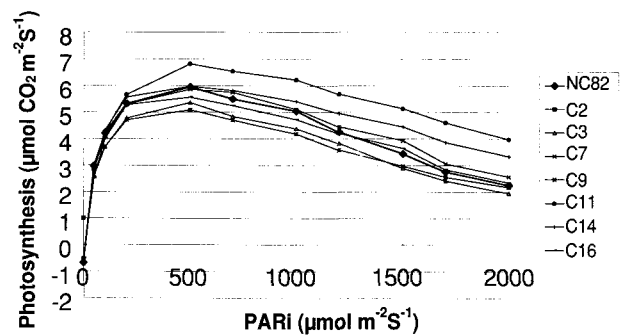


Figure 4. CO₂ accumulation of the second generation of transgenic tobacco plants.

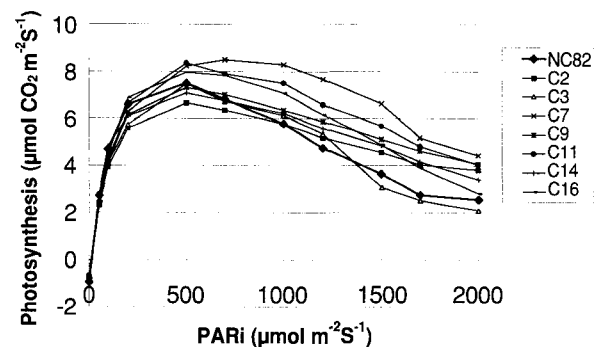


Figure 5. CO₂ accumulation of the second generation of transgenic tobacco plants in the light conditions.

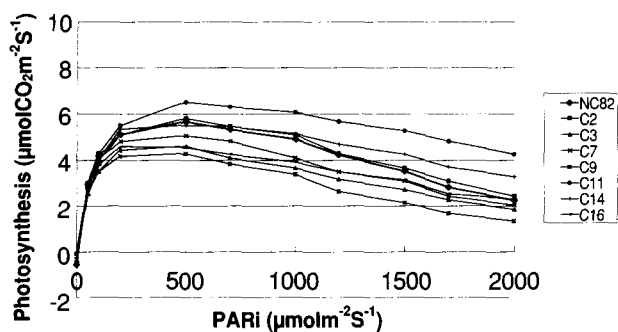


Figure 6. CO₂ accumulation of the second generation of transgenic tobacco plants in the dark conditions.

합성능과 chlorophyll II 함량과의 유의성 있는 차이도 발견되지 않았다. 그러나 Ko 등 (1992)은 완두콩의 CAB 유전자를 연초에 도입하여 형질전환 식물체에서 CAB 발현 정도가 증가하여 단위 PSII당 light harvesting chlorophyll a/b binding protein이 많이 합성되었고 잎의 g 당 엽록소의 함량은 1.5배, light harvesting complex II 함량은 2~3배 증가하였음을 보고하였다. 본 실험에서도 형질전환 식물체와 정상식물체 그리고 자연광 조건과 차광 조건 등에서 약간의 함량차이는 있었으나 유의성 있는 차이는 나타내지 않았다.

포장에서 자연광의 차단 정도를 조사한 결과 연초의 상위 부위에 비해 중엽 부위 및 하엽 부위는 각각 58%, 87% 차광되었으며, 차광된 온실에서는 약 90% 차광되었다 (data not shown). R2세대 형질전환 유식물체의 잎, 줄기, 뿌리의 생체중을 조사한 결과 형질전환 식물체 2세대 식물체의 생체중은 NC82에 비하여 작았으나 건물물은 높았으나 R3세대에서는 역으로 생체중은 NC82와 유사하였으나 건물물은 낮게 나타났다 (Table 2). 이 결과로 광합성능의 제고가 생체중 혹은

Table 1. Chlorophyll contents of transgenic tobacco plants (mg/mL).

Cell lines	Light condition	Dark condition
NC82	1.47	1.44
C2	1.59	1.52
C3	1.57	1.54
C7	1.59	1.55
C9	1.67	1.47
C11	1.57	1.53
C14	1.61	1.52
C16	1.65	1.48

Table 2. Percentage of dry weight of young transgenic tobacco plants.

Cell lines	NC82	C2	C3	C7	C9	C11	C14	C16	C303	C309	C311	C314
Fresh weight ¹⁾	18.93	9.49	9.97	13.57	9.6	12.36	11.0	18.26	19.07	18.41	17.57	15.82
Dry weight	1.51	0.93	1.00	1.0	1.08	1.51	1.08	1.51	1.46	1.21	1.36	1.34
% of dry weight	7.98	9.74	10.05	8.1	10.41	8.65	9.77	8.24	7.62	6.57	7.72	8.43

¹⁾All the plants were investigated at 50 days after sowing.

건물물의 증가에 영향을 주지 않는 것으로 추측된다.

온실에서 성장한 형질전환 연초 식물체의 하위부터 7, 8, 9 매체를 수확하여 정상 건조하고 건물물을 각각 3반복으로 조사한 결과 형질전환 연초의 건물물은 정상담배 식물체와 비교하여 유의 차는 없었으며 (Table 3), 형질전환 연초와 정상 연초의 수확엽의 내용성분을 대표적으로 니코틴, 전당, 전질소 함량을 조사한 결과는 table 4와 같으며 수확엽의 내용성분은 nicotine, 전당, 전질소 모두에서 개체별 차이는 다소 있었으나 유의차는 보이지 않았다. 추후 포장에서 하위엽의 생육정도 및 생육특성 등을 조사하여야 할 것이며 하위엽과 상위엽의 내용성분 및 품질을 제고하는지 여부도 조사되어야 새로운 품종으로의 육성이 가능할 것이라 사료된다.

적 요

CAB 유전자로 형질전환된 담배 2세대 식물체의 도입된 CAB 유전자 존재여부를 genomic PCR 방법으로 각계통에서 확인하였다. CAB 유전자로 형질전환된 2세대 식물체를 자연광 조건과 90% 차광된 온실에서 각각 생육시킨 결과 형질전환 식물체의 광합성능 정도는 정상 식물체와 유사하거나 약간 높은 경향이였으며, 광포화점은 형질전환 담배 식물체나 정상 식물체 모두 500 µmol m⁻²s⁻¹로 차이가 없었다. 조사한

Table 3. Percentage of dry weight of harvested leaves in transgenic tobacco plants.

Cell lines	NC82	C2	C3	C7	C9	C11	C14	C16
Fresh weight	11.90	8.46	8.80	11.82	10.03	10.52	12.57	12.69
Dry weight	2.01	1.15	1.28	1.41	1.40	1.56	1.89	1.63
% of dry weight	16.89	13.59	14.54	11.92	13.95	14.82	15.03	12.84

Table 4. Ingredients of harvested leaf in transgenic tobacco plants.

Cell lines	Nicotine	Sugar	Nitrogen
NC82	1.38	18.40	1.75
C2	1.15	14.50	2.14
C3	1.28	19.84	1.58
C7	1.40	17.05	1.84
C9	1.45	24.67	1.67
C11	1.14	24.20	1.51
C14	1.36	16.78	1.96
C16	1.48	15.90	1.98

7계통 중 C7, C11, C14 계통의 광합성 정도가 조사된 모든 광량에서 정상 담배 식물체보다 높게 나타났다. 차광된 조건에서 생육한 담배 식물체의 광합성능 정도는 조사된 7계통 중 C2, C11, C14 계통이 90% 차광된 온실조건에서도 광합성능이 우수하게 나타났다.

형질전환 담배 식물체의 chlorophyll 함량은 정상 NC82와 차이가 없었으며, 양지에서 생육한 조건과 90% 차광된 조건 모두에서 차이점이 없었으며 광합성능과 chlorophyll 함량과의 유의성은 없었다. 형질전환 담배 식물체 수확엽의 건물물은 정상 식물체와 비교하여 차이점이 나타나지 않았으며, 내용성분도 nicotine, 전당, 전질소에서 차이가 없었다.

인 용 문 헌

- Babiychuk E, Chantz RS, Cherep N, Weil JH, Gleband Y, Kushnir S** (1995) Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in *Solanaceae cybrids*. *Mol Gen Genet* **249**:648-654
- Flachmann R** (1997) Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. *Plant Physiol* **113**:787-794
- Flachmann R, Kühlbrandt W** (1995) Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *The Plant Cell* **7**:149-160
- Funk C, Schröder WP, Napiwotzki A, Tjus SE, Renger G, Andersson B** (1995) The PSII-S protein of higher plants: A new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* **34**:11133-11141
- Jansson S** (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins. *Biochimica et biophysica Acta* **1184**:1-19
- John I, Drake R, Farrell A, Cooper W, Lee P, Horton P, Girerson D** (1995) Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *The Plant J* **7**(3):483-490
- Kim KS, Lee KW, Lee JC, Yea WH, Chae SY, Park EK** (1999) Cloning of CAB cDNA encoding chlorophyll a/b binding protein of photosystem II in Korean ginseng and use in plant. *J Korea Soc Tobacco Sci* **21**(2):152-159
- Ko K, Ko ZW, Turpin DH, Labates C, Mohanty N, Granell A** (1992) Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In *Research in Photosynthesis Vol. III* (N. Murata ed.) Kluwer Acad Pub pp 445-448
- Millar AJ, Kay SA** (1996) Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:15491-15496
- Millar AJ, Kay SA** (1991) Circadian Control of cab gene transcription and mRNA accumulation in Arabidopsis. *The Plant Cell* **3**:541-550
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**:384-394

(접수일자 2001년 2월 27일)