

Glutathione Reductase 유전자의 도입에 의한 오차드그래스의 형질전환

이효신 · 배은경 · 김기용* · 원성혜 · 정민섭 · 조진기

Transformation of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with Glutathione Reductase Gene

Hyoshin Lee, Eunkyung Bae, Ki-Yong Kim*, Sunghye Won, Minsup Chung and Jinki Jo

Abstract

To develop transgenic orchardgrass resistant to reactive oxygen species produced from environmental stresses, a vector with the cytosolic glutathione reductase cDNA (BcGR1) from Chinese cabbage was constructed under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter and was introduced into orchardgrass using *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. Transgenic plants from hygromycin-selected calli of orchardgrass did not show any morphological difference from wild-type plants. The results of PCR amplification and genomic Southern blot analysis confirmed the integration of foreign gene into the chromosome of transgenic orchardgrass. Northern blot analysis with total RNA from leaves also confirmed the constitutive expression of BcGR1 in transgenic orchardgrass.

(Key words : *Agrobacterium tumefaciens*, Glutathione reductase, Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), Oxidative stress, Transformation)

I. 서 론

인구증가와 산업발달에 따른 환경의 파괴로 인하여 식물체 내에서 superoxide anion radical ($\cdot O_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 및 hydroxyl free radical ($\cdot OH$) 등과 같은 활성 산소종들을 생성하는 환경 스트레스의 발생이 급증하고 있다. 이러한 스트레스에는 최근 그 발생빈도가 급증하고 있는 오존을 비롯하여 고온과 저온, 건조 등의 환경 스트레스와 중금속과 이산화황과 같은 가스상의 오염물질, 제초제 그리고 병원균의 감염 등이 있으며, 이들에 의해 생성된 활성 산소종들은 강한 산화력으로

세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등을 유발하여 식물을 포함한 생체에 심각한 피해를 일으킨다 (Foyer와 Mullineaux, 1994; Levine 등, 1994; Foyer 등, 1997).

식물세포는 이러한 활성 산소종들에 의한 피해로부터 자신을 보호하고 광합성을 무리없이 진행시켜 항상성 (homeostasis)을 유지하기 위하여 진화 과정을 통해 항산화 기구를 발전시켜왔다. 이러한 항산화 기구는 glutathione (GSH), ascorbic acid (AsA), α -tocopherol 등의 저분자량 항산화 물질과 glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) 및 ascorbate peroxidase (APX) 등의 항산화

경북대학교 농과대학 (College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

* 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)

본 연구는 한국과학재단 특정기초 연구비 지원 (1999-2-209-003-3) 및 2000년도 경북대학교 Post-Doc. 연수지원에 의하여 수행되었음.

효소로 구성되어 있다.

항산화 기구에서 중심적인 역할을 하는 glutathione reductase (EC 1.6.4.2)는 대부분의 호기성 생물에 존재하며, 전자공여체로 NADPH를 사용하여 산화형의 glutathione (glutathione disulfide, GSSG)을 환원형의 GSH으로 환원시키는 효소이다. GSH은 대부분의 식물에서 대표적인 저분자량 thiol compound로서 (Alscher, 1989), 'sulfur transport, protein disulfide reductant, 제초제와 같은 xenobiotic의 해독 및 유전자 발현 조절 등의 기능을 가지는 필수 대사산물이다 (Foyer 등, al. 1997). 이러한 GSH과 GR의 중요성에 따라 GR의 유전자 수준에서의 연구와 더불어 GR 형질전환 식물체를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성 특성의 규명에 관한 연구가 수행되고 있다. 그러나, 대부분의 연구가 아직은 모델식물 수준에 머물고 있는 실정이며, 목초류의 형질전환에 관한 보고는 전무한 실정이다. 이미 우리나라의 경우도 오존, 이산화황 등과 같은 대기오염물질과 고온, 저온, 가뭄 등의 기상이변에 따른 환경 스트레스의 발생이 증가 추세에 있다. 따라서 본 연구에서는 환경 스트레스 내성 목초의 개발을 위하여 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 화분과 목초인 오차드그래스에 배추로부터 분리한 cytosolic GR 유전자를 도입하여 그 발현을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

본 실험의 재료식물로는 축산기술연구소로부터 분양 받은 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.) 품종 중 Potomac을 이용하였다. 종자소독과 캘러스의 유도는 Lee 등 (1998b; Lee 등, 2000)의 방법에 따라 실시하였다.

2. 발현 vector의 구축과 *Agrobacterium*의 형질전환

배추(*Brassica campestris* var. *Pekinensis* cv. Seoul)로부터 분리한 glutathione reductase cDNA (BcGR1; Lee 등, 1998a)를 식물체 내에 도입하기 위하여 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm에 클로닝하였다. 먼저, 양 말단이 *XhoI/XbaI*인 BcGR1 cDNA를 pGEM-11Zf vector (Promega, USA)

에 도입하여 pGEM-GR1을 구축한 다음, 제한효소 *XbaI/SacI* 절단하여 BcGR1 cDNA를 포함하는 1.8 kb의 DNA 단편을 회수하였다. 회수한 DNA 단편을 제한효소 *XbaI/SacI*으로 절단하여 GUS 유전자를 제거한 pIG121-Hm의 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter의 하류에 도입하여 최종적으로 발현 vector pIG-GR1을 구축하였다. pIG-GR1을 freezing-thawing 방법 (Horsch 등, 1984)으로 *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) EHA101에 형질전환하였다.

3. 오차드그래스의 형질전환

오차드그래스의 형질전환은 Lee 등 (2000)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. pIG-GR1으로 형질전환된 *Agrobacterium*을 AB 한천배지 (Chilton 등, 1974)에 도말한 다음, 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. 균체를 회수하여 acetosyringone (100 µM)이 첨가된 AA배지 (Muller와 Grafe, 1978)에 현탁 (OD₆₀₀ = 0.4)하여 캘러스의 감염에 사용하였다. 오차드그래스의 캘러스를 *Agrobacterium* 현탁액에 20분 이상 침지한 다음, acetosyringone (100 µM)이 첨가된 N6 공동배양배지에 치상하여 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. 감염된 캘러스를 250 mg/l의 cefotaxime과 40 mg/l의 hygromycin이 첨가된 N6 선발배지로 옮겨 25°C, 암상태에서 3주간 배양한 다음, 캘러스를 동일한 조건으로 2주간 다시 계대배양하였다. Hygromycin으로 선발된 캘러스를 1 mg/l의 NAA, 5 mg/l의 kinetin, 250 mg/l의 cefotaxime 및 50 mg/l의 hygromycin이 첨가된 MS 재분화배지로 옮겨 형질전환된 식물체의 재분화를 유도하였다. 재분화된 식물체는 호르몬을 첨가하지 않은 half-strength의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도한 다음, 원예용 상토 (5호, 부농)를 담은 화분으로 옮겨 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 일주일간 순화시켰다.

4. Southern blot 분석

오차드그래스의 잎으로부터 CTAB 방법 (Murray와 Tompson, 1980)으로 genomic DNA를 분리하였다. DNA 5 µg을 제한효소 *XbaI*과 *SacI*으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법 (Southern, 1975)으로 nylon membrane에

전이시켰다. Membrane은 5×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS, 50 mM Na-Pi (pH 6.5), 0.1 mg/ml denatured herring sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액에서 3시간 (42℃) 동안 prehybridization한 다음, [α - 32 P] dCTP로 표식된 BcGR1 DNA를 첨가하여 12시간 이상 hybridization 하였다. Membrane은 2×SSC, 0.1% SDS 용액 (50℃)에서 10분간, 그리고 0.2×SSC, 0.1% SDS용액 (50℃)에서 1시간 동안 세정한 다음, -70℃에서 2~3일간 X-ray film (Kodak)에 노출시켰다.

5. PCR 분석

PCR 분석을 위한 primer로는 CaMV 35S promoter의 염기서열에 근거한 sense primer (35Ss1; 5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 BcGR1 cDNA의 염기서열에 근거한 antisense primer (GRas; 5'-CTAGCATCTCA AGTTCACC-3')를 사용하였으며, 증폭 산물은 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

6. Northern blot 분석

오차드그래스의 잎으로부터 guanidine thiocyanate 방법 (McGookin, 1984)으로 total RNA를 분리하였다. Total RNA 10 μ g을 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동한 다음, Southern blot 분석에서와 동일한 방법으로 분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

Cytosolic glutathione reductase의 full-length cDNA를 발현 vector인 pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter의 하류에 도입하여 발현 vector pIG-GR1을 구축한 다음 (Fig. 1A), *A. tumefaciens* EHA101에 형질전환하였다. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소로 분해한 다음, agarose gel 전기영동 (Fig. 1B)하여 vector의 구조를 확인하고 오차드그래스의 형질전환에 이용하였다.

형질전환을 위한 식물재료로는 오차드그래스의 조직배양 및 형질전환 효율에 관한 전보 (Lee 등, 1998b; Lee 등, 2000)의 결과에서 재분화 및 형질전환 효율이 가장 높게 나타난 Potomac의 배반조직 유래의 캘러스를 이용하였다. 식물 형질전환

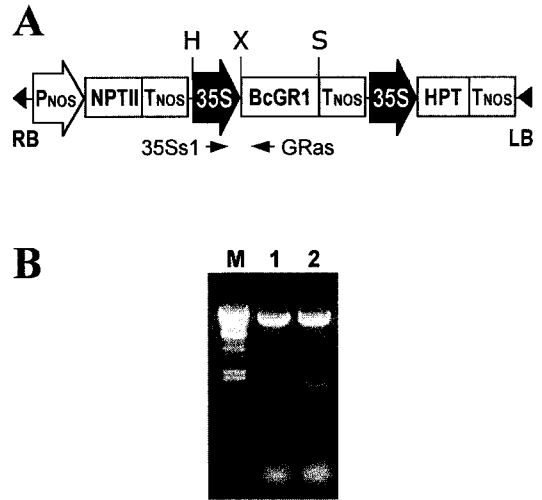


Fig. 1. (A) Schematic diagram of the expression vector, pIG-GR1, used for the transformation of orchardgrass. The BcGR1 cDNA was placed under the control of the CaMV 35S promoter. Restriction sites of *Hind*III (H), *Xba*I (X), and *Sac*I (S) were shown. Arrows represent the positions and orientations of primers (35Ss1 and GRas) used for PCR analysis. (B) Restriction enzyme analysis of the construct, pIG-GR1. Plasmid DNA was digested by *Hind*III and *Xba*I (lane 1), or *Xba*I and *Sac*I (lane 2), and analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis. M, λ DNA digested with *Hind*III, DNA size marker.

효율은 식물재료, vector, *Agrobacterium* strain, selective agent 및 배지조성 등의 요인이 영향을 미치는데, 이중 단자엽 식물의 형질전환 효율에는 식물재료가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 대표적인 단자엽 식물인 벼의 경우 배반 조직 유래의 캘러스가 형질전환 효율이 가장 높은 것으로 보고되었으며 (Hiei 등, 1994), 배반조직으로부터 합성되는 화합물이 *Agrobacterium*의 vir 유전자의 발현과 T-strand generation을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Vijayachandra 등, 1995). Potomac의 배반조직으로부터 유도한 캘러스 (Fig. 2A)를 *Agrobacterium* 현탁액에 감염시킨 다음, hygromycin

이 첨가된 N6 선발배지에서 3주간 배양하고 동일 배지로 계대하여 2주간 다시 배양하였다. 선발과정을 통하여 hygromycin에 의해 갈변되어 고사하지 않고 저항성을 나타내는 캘러스를 재분화배지로 옮겨 신초의 분화를 유도하였다 (Fig. 2B). 유도된 신초를 half-strength의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도한 다음 (Fig. 2C), 화분으로 옮겨 생장실에서 생육시켰다. 재분화된 식물체는 환경 스트레스 내성 관련 유전자의 형질전환 시에 빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이 (Lagrimini, 1991; Lagrimini 등, 1997)는 나타내지 않았다.

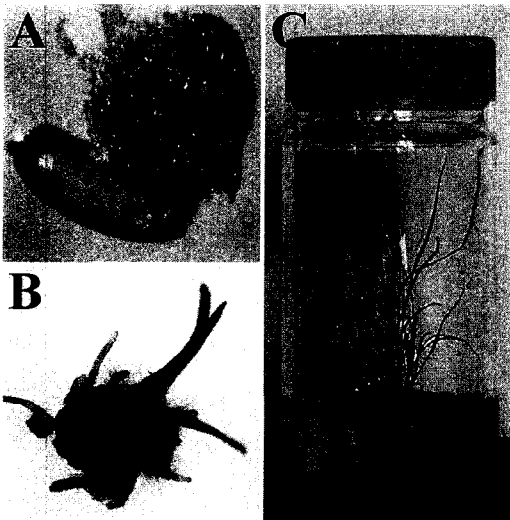


Fig. 2. Plant regeneration from scutellum-derived callus of orchardgrass transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Scutellum-derived callus of orchardgrass (B) Shoots induced in regeneration medium containing hygromycin after 3 weeks of culture. (C) Hygromycin-resistant plantlets with roots and shoots.

Hygromycin이 첨가된 배지에서 재분화된 식물체로부터 genomic DNA를 분리한 후 PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하였다. 오차드그래스의 endogenous glutathione reductase 유전자와의 구별을 위

하여 35S promoter와 BcGR1 유전자에 특이적인 sense 및 antisense primer를 합성하여 PCR 증폭을 실시하였으며, 이때 예상되는 증폭산물의 크기는 0.6 kb이다. PCR 증폭산물을 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, Fig. 3A에서 나타낸 바와 같이 형질전환하지 않은 wild-type에서는 증폭산물이 관찰되지 않았으나, 형질전환 식물체의 genomic DNA에서는 예상크기와 동일한 0.6kb의 35S promoter-BcGR1 DNA 단편이 증폭되었음을 확인하였다. 또한 PCR 증폭으로 BcGR1 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체의 염색체 내에 pIG-GR1의 integration을 확인하고자 Southern blot 분석을 실시하였다. Genomic DNA를 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 완전분해한 다음, BcGR1 유전자를 probe로 하여 hybridization한 결과 PCR 증폭에서와 마찬가지로 모든 형질전환 식물체에서 도입된 BcGR1 cDNA의 크기와 동일한 1.8 kb의 hybridization band를 확인하였다 (Fig. 3B).

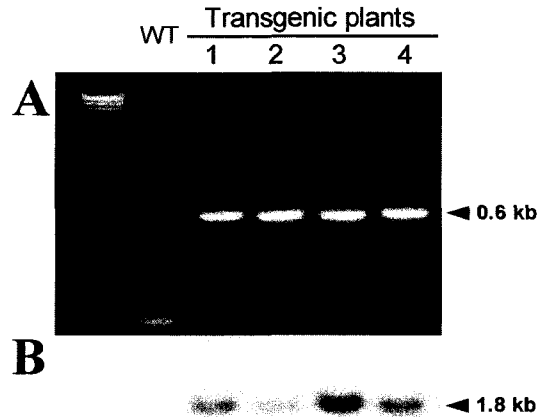


Fig. 3. Confirmation of transgenic plants by PCR and Southern blot analysis using genomic DNAs from wild-type (WT) and transgenic plants. (A) PCR amplification with 35Ss1 and GRas primers. (B) Southern blot analysis. Genomic DNA was digested with *Xba*I and *Sac*I and was hybridized with the ³²P-labeled BcGR1 cDNA. Numbers indicate independent transgenic lines.

형질전환된 오차드그래스 내에서 배추 유래의 cytosolic glutathione reductase 유전자가 지속적으로 발현되는지를 확인하기 위하여 wild-type과 형질전환 식물체의 잎으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시하였다. Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 wild-type 식물체의 경우 BcGR1 probe와 hybridization하는 전사체가 전혀 관찰되지 않았으나, 형질전환 식물체에서는 1.8 kb의 전사체의 축적이 관찰되어 도입된 유전자가 지속적으로 발현된다는 것을 나타내었다. Northern blot 분석에서 형질전환하지 않은 wild-type 식물체에서 BcGR1 probe와 hybridization하는 band가 전혀 나타나지 않는 이유는 오차드그래스의 endogeneous glutathione reductase 유전자가 지속적으로 발현되지 않거나 BcGR1 유전자와의 상동성이 낮기 때문으로 추정된다. 따라서 Southern blot 분석에서도 wild-type 식물체의 경우 hybridization band가 전혀 나타나지 않았다는 것을 고려하면 (Fig. 3B), 이러한 결과는 오차드그래스와 배추의 glutathione reductase 유전자의 상동성이 낮기 때문으로 생각된다. 또한 형질전환 식물체의 Southern 및 Northern blot 분석에서 hybridization band의 intensity가 개체별로 차이를 나타내었는데, 이는 도입된 유전자의 copy number의 차이, 삽입된 위치 및 integration되는 과정에서 chromosome rearrangement 현상 등이 관여한 것을 추정된다.

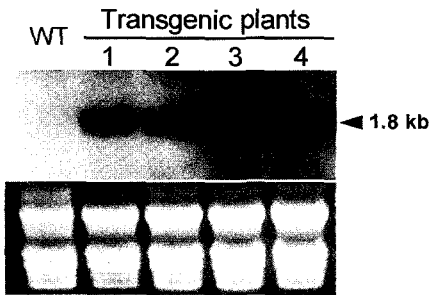


Fig. 4. Northern blot analysis of transgenic orchardgrass. Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transgenic orchardgrass. Numbers indicate independent transgenic lines. The lower part of each panel shows an ethidium bromide-stained gel.

이상의 결과를 종합하면, 오존 등과 같은 환경 스트레스에 내성을 가지는 목초의 개발을 위하여 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환에 관한 실험을 수행하여 배추 유래의 cytosolic glutathione reductase 유전자가 정상적으로 도입되어 발현되는 형질전환 오차드그래스 식물체 (T_0)를 구축하였다. GR을 과량 발현하는 형질전환 식물체는 일반적으로 paraquat, 중금속 등과 같은 여러 가지 환경 스트레스에 내성을 나타내는 것이 보고되고 있다 (Creissen 등, 1995; Elizabeth 등, 2000). 최근 우리나라의 경우도 오존, 고온, 가뭄 등의 환경 스트레스의 발생이 증가하는 추세에 있다는 것을 고려하면 본 연구에서 개발한 형질전환 오차드그래스를 이용하여 여러 가지 환경 스트레스 조건에서 cytosolic glutathione reductase 유전자의 지속적 발현이 항산화 효소계에 미치는 영향과 환경 스트레스에 대한 내성 특성을 규명할 필요가 있다고 생각된다. 따라서 현재 자가수정과 형질전환체의 선발을 통한 homozygous line을 구축 중에 있다.

IV. 적 요

환경 스트레스에 의해 야기되는 활성 산소종에 의한 피해에 내성을 가지는 목초의 개발을 위하여 오차드그래스의 배반 조직 유래의 캘러스에 배추 유래의 cytosolic glutathione reductase 유전자 (BcGR1)를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 매개로 형질전환시켰다. Hygromycin으로 선발된 캘러스로부터 재분화된 식물체는 야생형과 비교하여 형태적으로 차이를 나타내지 않았다. PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 형질전환 식물체의 염색체 내에 BcGR1 유전자가 integration 되었음을 확인하였다. 오차드그래스의 잎으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시한 결과, 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 지속적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

V. 인 용 문 헌

1. Alscher R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77:457-464.
2. Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bandich, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1974.

- Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3672-3676.
3. Creissen, G., H. Reynolds, Y. Xue and P. Mullineaux. 1995. Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. The Plant J. 8(2):167-175.
 4. Elizabeth A.H., Y.L. Zhu, T. Sears and N. Terry. 2000. Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: Effects on cadmium accumulation and tolerance. Physiol. Plant. 110:455-460.
 5. Foyer, C.H., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiol. Plant. 100:241-254.
 6. Foyer, C.H. and P.M. Mullineaux. 1994. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC press, Boca Raton, FL. pp. 343-364.
 7. Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant J. 6(2):271-282.
 8. Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rodgers and R.T. Fraley. 1984. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 223:496.
 9. Lagrimini, L.M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. Plant Physiol. 96:577- 583.
 10. Lagrimini, L.M., R.J. Joly, J.R. Dunlap and T.T. Liu. 1997. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol. Biol. 33:887-895.
 11. Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 79:583-593.
 12. Lee H.S., D.Y. Son and J.K. Jo 1998a. Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. Biochim. Biophys. Acta 1395:309-314.
 13. Lee H.S., Y.S. Kwon, B.H. Lee, S.H. Lee and J.K. Jo. 1998b. Plant regeneration from seed-derived callus in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 18(4):285-290.
 14. Lee H.S., B.H. Lee and J.K. Jo. 2000. Development of transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 20(2):103-108.
 15. McGookin R. 1984. RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. In: Walker JM (ed), Methods in Molecular Biology. Vol. 2, Humana Press, New Jersey, pp. 113-116.
 16. Muller, A.J. and R. Grafe. 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. Mol. Gen. Genet. 161:67-76.
 17. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
 18. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments. J. Mol. Biol. 98:503-517.
 19. Vijayachandra, K., K. Palanichelvam and K. Veluthambi. 1995. Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-strand generation. Plant Mol. Biol. 29:125-133.