

NDP Kinase 2 유전자를 도입한 산화스트레스 내성 형질전환 감자의 선발

탕리¹, 권석윤², 윤대진³, 곽상수², 이행순^{1*}

¹한국생명공학연구원 식물세포공학연구실, ²환경생명공학연구실, ³경상대학교 대학원 응용생명과학부

Selection of Transgenic Potato Plants Expressing NDP Kinase 2 Gene with Enhanced Tolerance to Oxidative Stress

Li Tang¹, Suk-Yoon Kwon², Dae-Jin Yun³, Sang-Soo Kwak², Haeng-Soon Lee^{1*}

¹Laboratory of Plant Cell Biotechnology, ²Laboratory of Environmental Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Eoeun-dong 52, Yusong, Daejeon 305-806, Korea

³Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT *Arabidopsis* NDPK2 (AtNDPK2) is a key signaling component that regulate cellular redox state and known to enhance multiple stress tolerance when over-expressed in *Arabidopsis* plant (Moon et al. 2003). In order to develop transgenic potato plants with enhanced tolerance to multiple stresses, we placed an AtNDPK2 cDNA under the control of a stress-inducible *SWPA2* promoter or enhanced CaMV 35S promoter. Transgenic potato plants (cv. Superior and Atlantic) were generated using an *Agrobacterium*-mediated transformation system and selected on MS medium containing 100 mg/L kanamycin. Genomic Southern blot analysis confirmed the incorporation of AtNDPK2 cDNA into the potato genome. When potato leaf discs were treated with methyl viologen (MV) at 10 μ M, transgenic plants showed higher tolerance to MV than non-transgenic or vector-transformed plants. The NDPK2 transgenic potato plants will be further used for analysis of stress-tolerance to multiple environmental stresses.

Key words: Multiple stress, NDP kinase, oxidative stress, *Solanum tuberosum*, transformation

서 론

식물을 포함한 대다수의 호기성 생물은 환경스트레스를 받으면 생체 내 산소는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다 (Allen 1995). ROS의 과다 발생은 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등 생체 내에 생리적 장애를 주고 심할 경우 세포사멸을 초래한다 (Inze and Van Montagu 1995).

그러나 이러한 ROS는 식물체 내에 잘 구축된 항산화기구인 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione 등의 저분자 항산화물질에 의해 효율적으로 제거된다 (Allen 1995).

급격한 인구증가와 산업화에 따른 환경문제는 매우 심각한 실정으로, 재배 작물 가운데는 각종 환경스트레스로 인하여 생산성이 문제가 되는 경우가 대두되고 있다. 최근 유전체 연구의 발전으로 특정 유전자만을 도입하는 분자 육종에 의한 유전자변형 품종 (GMO) 개발이 이루어지고 있다. 특히 환경스트레스에 대한 내성을 향상시키기 위하여 항산화기구를 강화시킨 형질전환 식물체 개발에 관한

*Corresponding author Tel 042-860-4439 Fax 042-860-4608
E-mail hslee@kribb.re.kr

많은 연구가 진행되고 있고 금후 환경재해에 강한 실용적인 농작물의 분자육종이 기대되고 있다 (McKersie et al. 1996; Roxas et al. 1997; Yun et al. 2000; Kwon et al. 2002, 2003).

스트레스 신호전달 과정에서 상위에 위치한 유전자를 이용할 경우, 복합스트레스에 내성이 있는 형질전환 식물체 개발을 기대할 수 있다. 더욱이 이 유전자가 스트레스를 받을 때만 발현될 수 있다면 보다 효율적인 스트레스 내성 형질전환체가 될 수 있을 것이다. Nucleoside diphosphate kinases (NDPKs; EC 2.7.4.6)는 생합성 과정에서 모든 dNTP의 세포 내 수준을 유지하는 유전자로 최근 신호전달 과정에서 중요한 역할을 수행한다고 알려졌다. 식물에서는 이 NDPK가 phytochrome A 반응, UV-B 신호전달, 열 스트레스, 상처 및 생장에 관련이 있다고 보고되었으며 (Choi et al. 1999; Pan et al. 2000; Martha et al. 2001), 애기장대 NDPK2가 MAP kinase에 의한 신호전달과 관련되어 있으며 이 NDPK2을 과발현시킨 형질전환 애기장대가 ROS을 유발시키는 복합스트레스에 대한 내성이 있음이 밝혀졌다 (Moon et al. 2003; Yang et al. 2003). 이러한 유전자는 스트레스를 받았을 때에만 발현을 유도하는 프로모터를 이용할 경우, 필요 없는 물질대사를 배제할 수 있는 장점이 있다. 따라서 환경스트레스 내성 형질전환체 개발에는 산화스트레스 조건에서 발현이 강하게 유도되는 *SWPA2* 프로모터 (Kim et al. 2003)의 사용이 매우 중요하다 하겠다. 본 연구에서는 산화스트레스에 의해 발현이 강하게 유도되는 *SWPA2* 프로모터를 이용하여 복합스트레스 내성 유전자인 NDPK2 (Moon et al. 2003)를 발현하는 형질전환 벡터를 제작하여 복합 환경 스트레스에 내성을 가진 감자를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

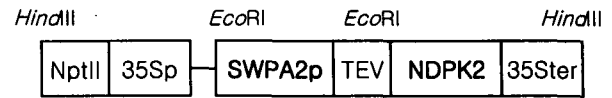
식물재료

감자 (*Solanum tuberosum* L.) 형질전환에는 국내에서 식용인 수미 (Superior)와 가공용인 대서 (Atlantic) 품종을 기내에서 증식시켜 사용하였다. 식물체 증식은 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 sucrose를 3% 첨가하여 16 시간 일장, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 의 cool-white 형광, 25°C의 배양실에서 배양하였으며 2주 동안 배양한 잎과 줄기조직을 형질전환 재료로 사용하였다.

형질전환 벡터 제작

고구마 배양세포에서 분리한 *SWPA2* 프로모터 (Kim et al. 2003)를 복합스트레스 내성 유전자인 NDPK2 (Moon et al.

A



B

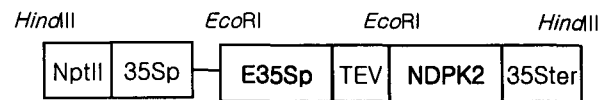


Figure 1. Plant transformation vectors, pSN-K (A) and pEN-K (B). SWPA2p: sweetpotato peroxidase promoter, NDPK2: nucleoside diphosphate kinase 2 gene E35Sp: enhanced CaMV 35S promoter, TEV: tobacco etch virus 5'-UTR, 35Ster: CaMV 35S terminator.

2003)에 연결시킨 후, neomycin phosphotransferase (*nptII*) 유전자를 선발표지로 한 식물형질전환 벡터인 pCAMBIA2300에 도입한 pSN-K 벡터와 enhanced CaMV 35S 프로모터에 NDPK2를 연결시킨 pEN-K 벡터를 제작하였다 (Figure 1). 이것들을 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하여 형질전환에 이용하였다. 대조구로는 pCAMBIA2300 벡터만이 도입된 것을 사용하였다.

형질전환 및 식물체 재분화

형질전환은 기내에서 배양중인 식물체에서 신초의 위부위로부터 2-3번째 잎과 줄기조직을 절취하여 Youm 등 (2002)의 방법에 따라 *Agrobacteria*와 공동배양하였다. 공동배양 후 잎과 줄기 절편체를 MS 기본 액체배지로 세척후 선발배지 (MS + 2 mg/L zeatin + 0.01 mg/L NAA 0.1 mg/L GA₃ + 400 mg/L claforan + 100 mg/L kanamycin)에서 배양하였다. 3주 간격으로 새로운 배지로 계대배양한 후 선발배지에서 유도된 shoot은 뿌리 유도를 위해 뿌리유도배지 (MS 기본배지 + 400 mg/L claforan + 100 mg/L kanamycin)로 옮기고 뿌리가 발생하면 4~5일간 순화시켜 화분으로 옮겨 배양기에서 재배하였다.

형질전환체 선발 및 Southern blot 분석

Kanamycin 함유배지에 일차적으로 선발된 재분화 식물체를 PCR로 확인하였다. PCR에 사용된 primer는 NDPK2 유전자와 *SWPA2* 유전자의 특이 염기서열 부분을 사용하였다. PCR로 형질전환이 확인된 감자 식물체를 벡터별로 무작위로 선발하여 Southern분석을 실시하였다. 배양기에서 생육중인 감자 식물체의 잎으로부터의 genomic DNA 분리는 Asemota (1995)의 방법에 따라 수행하였다. 분리한 DNA (30 μg)를 *EcoRI*으로 각각 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후, Zeta Probe membrane (Bio-Rad 제

품)으로 전이시켰다. NDPK2 유전자 특이부분 (544 bp)를 polymerase chain reaction (PCR)로 합성한 후 동위원소 [α - 32 P] dCTP로 labelling시켜 probe로 이용하였으며 혼성화 반응은 60°C에서 24시간 동안 실시하였다. 반응을 마친 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

Methyl viologen (MV) 처리

MV 처리를 위하여 기내에서 증식시킨 식물체를 순화하여 pot로 옮겼다. 생육 8주 된 식물체의 잎 (위로부터 3~4 번째)을 절취하여 10 μ M의 MV 용액이 5 mL씩 들어있는 직경 5 cm의 Petri dish에 3 개씩의 잎을 띄웠다. MV 처리 실험은 0.4 M sorbitol이 첨가된 MV 용액에 leaf disc를 띄워 25°C의 암 조건에서 12 시간 동안 배양한 후, 광 조건에서 72 시간 배양하여 잎의 손상정도를 육안으로 조사하였다. 실험에 이용한 형질전환 식물체는 두 종류 벡터별로 10 개체 이상을 이용하였으며, 실험은 3 회 반복 실시하였다.

결과 및 고찰

형질전환 식물체 개발

*Agrobacterium*와 공동배양한 잎, 혹은 줄기 절편체를 MS 기본배지에 2 mg/L zeatin, 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃, 400 mg/L claforan, 100 mg/L kanamycin이 포함된 선발배지에 배양하였다. Kanamycin 저항성을 지닌 shoot은 선발배

지에 약 3~4 주 정도 배양되었을 때 캘러스와 함께 유도되었다. 형질전환 벡터에 의한 shoot 유도율의 차이는 관찰되지 않았지만 사용한 식물조직에 의한 차이는 뚜렷하였다. 즉, 줄기 절편체에서 80% 정도, 잎 절편체에서는 약 5%의 shoot 유도율을 나타내었다. 잎이 1~2 장 정도 나왔을 때 뿌리유도배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다. 뿌리는 대부분의 shoot로부터 잘 유도되었으며, 뿌리가 발달된 소식물체를 kanamycin이 함유된 MS 기본배지로 옮겨 줄기와 뿌리가 발달된 식물체로 성장하였으며, 기내에서 계속 배양한 결과 소괴경이 형성되었다 (Figure 2). 형질전환에 이용한 벡터에 의한 외형적인 차이는 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 형질전환시키지 않은 식물체와 비교하여 외형적인 차이를 나타내지 않았다.

형질전환 감자 식물체 분석

Kanamycin 배지에서 선발된 소식물체를 대상으로 NDPK2 및 *SWPA2* 유전자 특이 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. NDPK2 primer의 경우 약 544 bp의 밴드가, *SWPA2* primer를 사용하였을 경우에는 약 593 bp의 DNA 단편이 합성되었다 (결과 미제시). PCR로 형질전환이 확인된 식물체를 벡터 및 품종별로 1~2 개체씩 무작위로 선발하여 Southern 분석을 실시하여 형질전환 여부를 결정하였다. 이때 NDPK2 특이 probe를 사용하였으며 그 결과, pSN-K 식물체는 1~4 copy가, pEN-K 식물체의 경우 두 품종 모두 2 copy가 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 3). 그러나 형질전환 시키지 않은 대조구 식물체에서는 어떤 밴드도 나타나지 않았다. 이로써 다양한 copy의 외래 유전자가 안

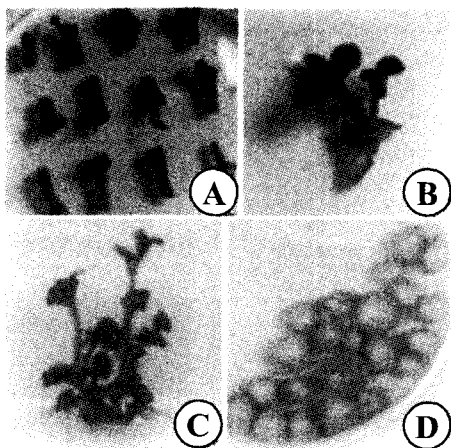


Figure 2. Shoot induction and plant regeneration from stem explants of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Atlantic) transformed with *Agrobacterium* harboring pSN-K vector. A and B, Shoot induction from stem explants on MS medium containing 2 mg/L zeatin, 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃, 400 mg/L claforan, and 100 mg/L kanamycin. C, Regenerated plants on MS medium with 100 mg/L kanamycin. D, Microtubers formation from transgenic potato plants.

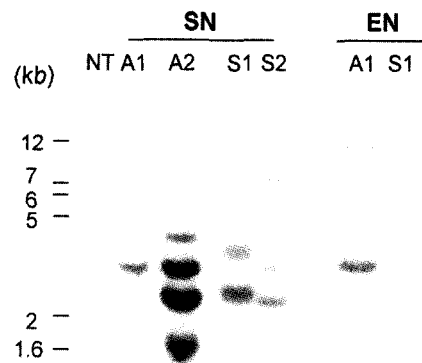


Figure 3. Southern analysis of genomic DNA prepared from transgenic and non-transgenic potato (cv. Atlantic, Superior) leaves. Equal amounts (30 μ g) of genomic DNA were digested with the *Eco*RI, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the 544 bp fragment of NDPK2 for transgenic plants as a probe. SN and EN indicate pSN-K and pEN-K transformed plants, respectively. NT, non-transgenic plants; A1 and A2, transgenic lines of cv. Atlantic; S1 and S2, transgenic lines of cv. Superior. The positions of molecular weight markers are shown on the left.

정적 도입된 형질전환 감자 식물체를 개발하였으며, 이들 식물체 중 pSN-K가 도입된 식물체는 SN식물체, pEN-K가 도입된 식물체를 EN식물체로 명명하였다.

Methyl viologen (MV) 내성 분석

제조제 파라콧 (methyl viologen, MV)은 PSI에서 광환원되어 전자를 산소로 전달하여 세포독성이 있는 산소 라디칼 ($O_2\cdot$)를 생성시켜 결과적으로 재산화되는 산화환원 (redox) 활성 물질로서 (Slooten et al. 1995), 환경스트레스에 대한 내성을 증가시킨 형질전환 식물체의 산화스트레스 내성을 검정하는 스트레스원으로 많이 사용되고 있다 (McKersie et al. 1996; Roxas et al. 1997; Yun et al. 2000).

기내에서 배양중인 감자 식물체를 pot로 옮겨 4~5일 동안 순화시킨 후 온실에서 생육시켰다. Pot에서 약 8주 생장한 형질전환 감자식물체 3-4번째 잎을 취하여 10 μ M MV 용액이 든 Petri dish에 띄워 72 시간 배양하여 잎의 손상 정도를 관찰하였다 (Figure 4). MV를 처리하여 광 조건에서 배양한 지 24 시간이 경과 후부터 잎의 손상이 관찰되기 시작하였다. 비형질전환 식물체 (NT)와 pCAMBIA2300 벡터만을 도입한 식물체 (C)의 잎은 형질전환 식물체 잎에 비해 심한 손상을 받았다. 반면 형질전환 식물체의 경우 50% 이상의 개체가 MV에 대해 내성을 나타내는 것으로 관찰되었다. MV에 대한 잎의 손상 정도는 형질전환 개체마다 각기 다른 반응을 나타내었을 뿐 도입된 벡터 종류에 의한 차이

는 뚜렷하지 않았다. 일반적으로 대서가 수미에 비해 여러 가지 환경스트레스에 민감한 것으로 보고된 바 있지만 (Tang et al. 2003) 본 연구에서는 품종간의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. MV에 대한 내성 결과로부터 MV에 대해 백화현상이 거의 일어나지 않은 식물체를 2 line씩 벡터별로 선발하였다. 선발된 line들은 복합재해 내성 감자 개발을 위하여 포장에서 식물체 수준에서 MV, 고온 등의 여러 가지 환경스트레스에 대한 내성특성 분석에 재료로 이용할 계획이다. 형질전환 식물체가 MV에 대해 내성을 갖은 것은 산화스트레스에 의해 *SWPA2* 프로모터가 *NDPK2*의 발현을 강하게 유도한 결과라 판단된다. 따라서 MV에 대해 강한 내성을 나타낸 형질전환체를 대상으로 도입유전자의 northern blot 및 Western blot 분석을 수행하여 발현 패턴과의 관련 여부를 추후 확인할 필요가 있겠다.

이상의 결과로부터 복합스트레스 내성 *NDPK2* 유전자가 안정적으로 도입된 형질전환 감자 식물체는 methyl viologen에 의해 발생하는 산화스트레스에 내성이 있음이 확인되었다. 따라서 앞서 개발된 SOD와 APX를 동시에 엽록체에 발현시킨형질전환 감자 (SSA식물체, Tang et al. 2004)와 함께 여러 가지 환경스트레스에 대한 내성분석이 이루어질 것이며 이로부터 최근 심각하게 나빠지는 환경에 대비하여 고염, 건조, 저온 스트레스 등의 복합스트레스에 저항성을 지닌 감자 품종이 개발될 수 있을 것이다.

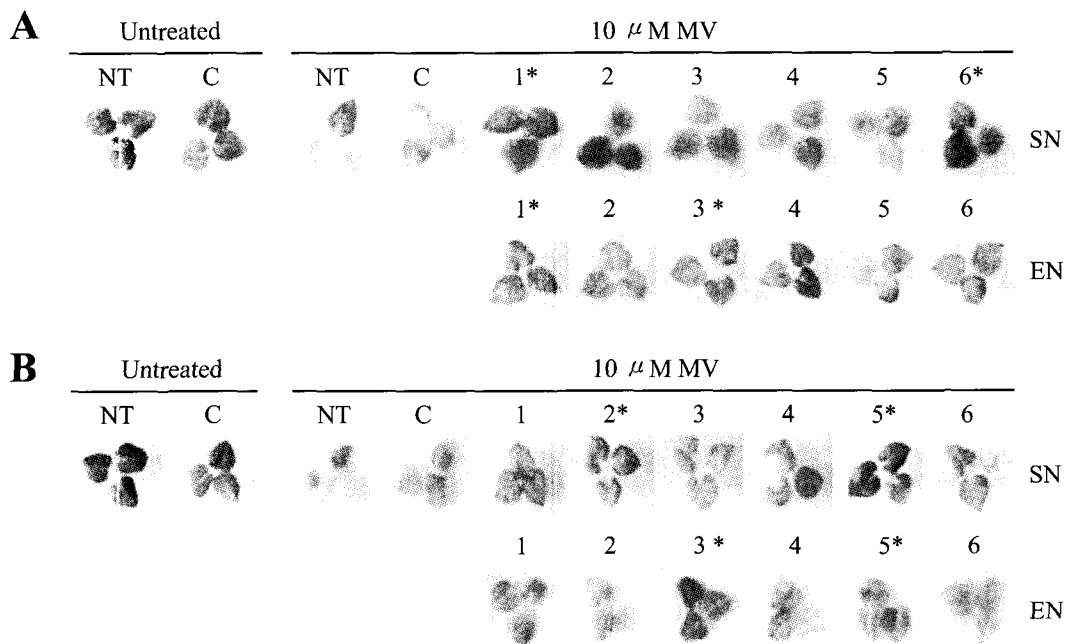


Figure 4. Screening of transgenic potato plants (A: Atlantic, B: Superior) with enhanced tolerance to MV-induced oxidative stress. Leaves of control plants and transgenic plants were treated with 10 μ M MV for 72 hours. Asterisks (*) indicate the selected transgenic plant lines with tolerance against MV. NT, non-transgenic plants. C, pCAMBIA2300 vector-transformed plants. SN and EN indicate pSN-K and pEN-K transformed plants, respectively. Numbers indicate transgenic plant lines.

적 요

복합스트레스 내성 유전자 NDP kinase 2 유전자를 도입시킨 형질전환 감자를 개발하기 위하여 이 유전자를 산화스트레스에 의해 발현이 강하게 유도되는 *SWPA2* 프로모터 또는 enhanced CaMV 35S 프로모터에 연결한 벡터를 제작한 후 각각 *Agrobacterium* 매개로 형질전환 하였다. 기관발생 경로에 의해 kanamycin 저항성 식물체를 재분화시킨 후 Southern 분석으로 외래 유전자가 안정적으로 감자 게놈내로 삽입되었음을 확인하였다. 형질전환 감자 식물체의 잎 조직을 대상으로 10 μ M methyl viologen에 대한 내성 검정을 조사하여 산화스트레스 내성 형질전환 감자 식물체를 2 개체씩 선발하였다. 선발된 식물체는 건조, 고온 등의 여러 가지 환경스트레스 내성 분석을 실시할 예정이며 이로부터 복합재해에 내성을 지닌 감자 품종을 개발할 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 연구비 지원의 연구결과이다. 식물 재료를 제공해 준 한국생명공학연구원 김현순 박사에게 감사한다.

인용문헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049-1054
- Asemota HN (1995) A fast, simple, and efficient miniscale method of the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea* spp.). *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21
- Choi G, Yi II, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 401: 610-613
- Inze D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* 6: 166-172
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur YK, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51: 831-838
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YM, Kwak SS (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* 160: 347-353
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25: 873-882
- Martha L, Galvis E, Marttila S, Hakansson G, Forsberg J, Knorpp C (2001) Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein. *Plant Physiol* 126: 69-77
- McKersie BD, Bowlwy SR, Harjanto E, LePrince O (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpression superoxide dismutase. *Plant Physiol* 111: 1177-1181
- Moon HJ, Lee BY, Choi G, Shin DJ, Prasad T, Lee OS, Kwak SS, Kim DH, Nam JS, Bahk JD, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Yun DJ (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci* 100: 358-363
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Pan L, Kawai M, Yano A, Uchimiya H (2000) Nucleoside diphosphate kinase required for coleoptile elongation in rice. *Plant Physiol* 122: 447-452
- Roxas VP, Smith RK, Jr Allen ER, Allen RD (1997) Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* 15: 988-991
- Slooten L, Capiou K, Van Camp W, Van Montagu M, Sybesma C, Inze D (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol* 107: 737-750
- Tang Li, Kwon SY, Kwak SS, Sung CK, Lee HS (2003) Susceptibility of two cultivars to various environmental stresses. *Korean J Plant Biotechnol* 30: 405-410
- Tang Li, Kwon SY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2004) Selection of transgenic potato plants expressing both CuZnSOD and APX in chloroplasts with enhanced tolerance to oxidative stress. *Korean J Plant Biotechnol* 31: 109-113
- Yang KA, Moon HJ, Kim GT, Lim CJ, Hong JC, Lim CO, Yun DJ (2003) NDPK kinase 2 regulates expression of antioxidant genes in *Arabidopsis*. *Proc Japan Acad* 79B: 86-91
- Youm JW, Jeon JH, Jung JY, Lee BC, Kang WJ, Kim MS, Kim CJ, Joung H, Kim HS (2002) Production of VP6 gene into potato plants by *Agrobacterium*-mediated transformation and analysis of VP6 expression in transgenic potatoes. *Korean J Plant Biotechnol* 29: 93-98
- Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Jo JK, Kim JS, Cho KY, Kwak SS (2000) Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet-potato peroxidases. *J Plant Physiol* 156: 504-509

(접수일자 2004년 9월 8일, 수리일자 2004년 9월 14일)