

엽록체형질전환을 이용한 담배에서의 laccase 유전자의 발현

유병호¹, 임종민¹, 우제욱¹, 최동욱², 김선하³, 최관삼^{3*}, 유장렬⁴, 고석민^{1*}
¹유진텍(주) 부설연구소, ²전남대학교 사범대학 과학교육학부 생물교육전공,
³충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학전공, ⁴한국생명공학연구원 식물유전체연구센터

Expression of laccase in transgenic tobacco chloroplasts

Byung Ho Yoo¹, Jong Min Lim¹, Je Wook Woo¹, Dong Woog Choi², Sun Ha Kim³, Kwan Sam Choi^{3*},
Jang Ryol Liu⁴, and Suk Min Ko^{1*}

¹Eugentech Inc., KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

²Department of Biology Education, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

⁴Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),
Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Laccase (EC 1.10.3.2) is a small group of enzymes that catalyze the oxidation of a broad range of phenolic compounds including hazardous and recalcitrant pollutants in the environment. This study attempted to develop an efficient system for production of a recombinant laccase by chloroplast genetic transformation of tobacco. Chloroplast transformation vector was constructed and introduced into the tobacco chloroplast genome using particle bombardment. Chloroplast-transformed plants were subsequently regenerated. PCR and southern blot analyses confirmed stable integration of the laccase gene into the chloroplast genome. Northern blot analysis revealed that mRNA of the laccase gene was highly expressed in chloroplast-transformed plants.

서 론

의학의 발달과 산업화가 진행됨에 따라 의료용 단백질과 산업용 단백질의 수요가 증가하고 있다. 이러한 단백질의 생산에 있어서 현재까지는 주로 미생물 배양 시스템 등을 통해서 이루어지고 있는데, 생산비용 등의 경제적 측면과 안전성 등에 적지 않은 문제점들을 안고 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위한 방법 중의 하나로 식물체에서 유용단백질을 생산하고자 하는 연구가 활발하게 진행되어 왔다 (reviewed by Giddings et al. 2000, Streatfield 2007). 이러한

단백질들을 식물에서 생산할 경우, 대량생산의 용이성이 탁월하고, 바이러스나 독소 오염의 위험성이 거의 없어 안전성이 높으며, 타 시스템에 비해 압도적으로 생산단가가 낮다는 장점을 가지고 있다. 현재까지 식물체에서 외래 단백질을 생산하기 위해 도입하는 유전자는 주로 핵으로 도입되고 있는데 (핵 형질전환), 핵 형질전환의 경우, 목표 단백질의 발현량이 0.1% TSP (total soluble protein) 이하 수준으로 매우 낮으며, 목표유전자가 도입된 부위에 따라 형질전환 개체의 발현량이 일정하지 않아 (위치효과) 많은 수의 형질전환개체를 생산해야 하는 문제점을 안고 있다 (Kooter et al. 1999, Day et al. 2000).

한편, 최근에 연구가 활발히 이루어지고 있는 엽록체 형질전환을 이용한 시스템은 1) 엽육세포 1개당 10,000 copy의

*Corresponding author Tel 042-863-2051 Fax 042-863-2056
E-mail: smko@eugentech.com, kschoi@cnu.ac.kr

게놈이 존재하여 대량발현이 가능하고, 2) 도입 유전자가, 정해진 위치에 삽입되어 형질전환개체 간 변이가 거의 없으며, 3) 엽록체는 모계유전이므로 도입한 외래 유전자가 꽃가루에 의해 다른 식물체로 전파될 가능성이 거의 없다는 점 등 유용단백질의 효율적인 대량생산 시스템으로서의 유용성이 기대되고 있다 (reviewed by Daniell et al. 1998, Scott et al. 1999, De Cosa et al. 2001, Daniell 2001, Elizabeth et al. 2002). 그러나 아직 연구의 역사가 짧아서 광범위한 적용이 어려운 상태로 향후 상당한 기술축적이 필요하다. 외래단백질의 대량생산에 있어서 엽록체 형질전환 기술이 보편적으로 사용할 수 있는 기술로서 정착을 하기 위해서는 우선 외래 단백질의 안정적 대량생산에 직결되는 효율적인 엽록체 형질전환 벡터의 개발 및 안정적인 엽록체 형질전환 시스템의 개발이 필요하다.

한편, 산업용 효소로서 널리 이용되고 있는 laccase (EC 1.10.3.2)는 각종 미생물이나 균류에 분포하고 있는 oxidase로서 목재의 리그닌을 분해하므로 펄프나 섬유산업 등에서 이용가치가 높은 효소이다 (reviewed by Kirk et al. 1987, Higuchi 1990, Alfred and Richard 2002). 또한 최근에는 플라스틱 가역제, 플라스틱 수지나 비이온계 계면활성제 원재료 등의 일반 산업 화학물질에서 다이옥신이 지적이 되고 있는데, laccase가 이들 다이옥신을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있다는 연구결과 등에 의해 그 산업적 이용가치가 높음에도 불구하고 높은 생산비용은 대량생산에 있어서의 장애물이 되고 있다 (Paszczynski et al. 1992, Spadaro et al. 1992, Alfred and Richard 2002). 최근에는 laccase의 식물세포에서의 생산을 시도한 연구가 보고 되었지만 laccase 단백질의 발현양은 식물의 총 가용성 단백질의 1% 이하로 매우 낮다 (Hood et al. 1997, Hood et al. 2003). 그러므로 본 연구에서는 식물 엽록체 형질전환 기술의 장점을 최대한 이용하여, 여러 laccase 단백질 중 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus* cv. Florida) 균사체 (KCTC 26133)에서 분리한 laccase 유전자를 담배의 엽록체 genome에 도입하여 담배에서의 laccase 단백질 생산이 가능한가를 알아보는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

식물재료

연구에 이용된 식물재료는 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun으로 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 발아시켜

4-6주간 기내 배양한 직경 2-3 cm인 잎을 엽록체 형질전환 재료로 사용하였다.

유전자 cloning과 형질전환 vector의 제작

Laccase 유전자는 한국생명공학연구원 유전자원센터로부터 분양받은 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus* cv. Florida) 균사체 (KCTC 26133)에서 RT-PCR을 통해 확보하였다. 느타리버섯 균사체를 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 26°C에 2주간 암 배양 한 후, 0.15 M CuSO₄가 첨가된 동일한 배지에서 4-5일 배양하여 total RNA를 추출하였다. PCR primer는 오페론 방식의 발현을 위하여 Met (ATG) codon과 그 앞쪽에 *E. coli*의 SD (Shine-Dalgarno) sequence (RBS)가 부가된 laccase-SD5' (GAAGGAGATATACCCATGAGCATTGGGCC CCGCGAAACG)와 laccase-3' (TCATGCTTCAATGGCGCAG) primer를 제작하여 사용하였다. PCR product는 pBluescript KS 벡터의 *EcoRV* site에 클로닝하였다. pBluescript KS 벡터에 클로닝된 PCR product를 *EcoRV* 제한효소로 digestion한 후 *Xba*I로 digestion하고 blunting 처리를 한 CtV₂ 벡터에 도입하여 엽록체 형질전환 벡터 CTVL을 완성하였다 (Figure 1).

엽록체 형질전환

Particle bombardment를 이용하여 담배 엽록체 형질전환을 수행하였다. 형질전환에 사용된 particle bombardment는 BiO-Rad사의 PDS-1000 기종이며, 0.6 μm gold particle에 형질전환 플라스미드 벡터를 CaCl₂와 spermidine을 사용하여 coating한 후, 무균 상태의 chamber에서 vacuum 28 in.Hg, 압력 1,100 psi, 거리 9 cm의 조건으로 RMOP (regeneration media of plant; MS salt (1X), 30 g/L sucrose, 6 g/L phytoagar, 100 mg/L myo-inositol, 1 mg/L thiamine-HCl 1 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, pH 5.8) 배지 위에 치상된 담배 잎에 bombarding하였다.



Figure 1. Chloroplast transformation vector(CTVL).

The aminoglycoside 3' adenylyltransferase (*aadA*) gene, conferring resistance to spectinomycin, and the laccase gene downstream of it are driven by the constitutive promoter of the rRNA operon (*Prn*). The foreign transcripts are stabilized by the 3'-untranslated region of chloroplast *psbA* gene.

형질전환체의 선발

Bombarding된 담배 잎을 RMOP 배지에서 2일간 배양 후 5×5 mm크기로 절단하여 RMOP sp (RMOP, 500 mg/L spectinomycin) 선발배지에서 6-7주 배양하여 spectinomycin 저항성 shoot을 유도한 후, 다시 3×3 mm 크기로 절단하여 동일한 선발배지에서 재분화를 통하여 spectinomycin 저항성 shoot을 유도하였다. 이와 같이 선발 배지에서 재분화를 반복하여 도입된 목표 유전자의 homoplasmy를 유도하였다.

형질전환체 검정

형질전환체 검정을 위하여 PCR 분석과 Southern blot 분석, northern blot 분석을 수행하였다. PCR과 Southern blot 분석을 위해서 배양중인 식물체의 잎에서 genomic DNA를 추출 (G-spinTMIIp Gnomc DNA Extraction Kit for Plant, Intron)하였고, northern blot 분석을 위해서 total RNA를 추출(RNeasy Plant Mini kit, QIAGEN)하였다. PCR 분석은 P1 primer (chloroplast genome sequence: 5'-AATCGCTAGTAATCGCCGG-3')와 P2 primer (aadA sequence: 5'-AATCAATATCACTGTGTGGC-3')를 이용하여 유전자가 엽록체 genome으로 도입되었는지를 확인하였고, P3 primer (laccase 5' sequence)와 P4 primer (laccase 3' sequence)를 이용하여 유전자 도입여부를 확인하였다.

Southern blot 분석은 2 µg의 genomic DNA를 BgIII 제한 효소로 digestion하여 수행하였고, 분석에 사용된 probe는 담배 엽록체 genome의 trnI 유전자와 trnA 유전자 sequence를 이용, 담배엽록체 genome DNA를 주형으로하여 증폭한 PCR product를 gel elution (Gel Elution Kit, QIAGEN)한 후 방사성동위원소로 labeling (³²P-dCTP Probe Labeler Kit, Intron)하여 사용하였다. Northern blot 분석은 5 µg의 total RNA를 이용하여 수행하였고, 분석에 사용된 probe는 laccase 유전자의 5' sequence와 3' sequence로 제작된 primer를 이용하여 형질전환에 사용된 재조합 plasmid DNA를 주형으로하여 증폭한 PCR product를 gel elution (Gel Elution Kit, QIAGEN)한 후, 방사성동위원소로 labeling (³²P-dCTP Probe Labeler Kit, INTRON)하여 사용하였다.

결과 및 고찰

형질전환체 선발

엽록체 형질전환을 위해서 제작한 벡터 CTVL은 Figure 1에 나타난 바와 같고, 이 형질전환 벡터를 gold particle에 coating

한 후, particle bombardment를 이용하여 RMOP 배지에 치상된 담배 잎에 bombarding하였다. 1-2개의 절편이 치상된 plate 20개를 준비하여 형질전환을 수행하였다. Bombarding한 담배 잎을 2일간 배양 후 5×5 mm 크기로 절단하여, RMOP sp 선발배지에서 6-7주 동안 배양하였고, 6개의 개체를 확보하였다. 확보된 6개체를 계대배양 하면서, 정상적으로 자라는 3개 line을 선발하였다. 선발된 line의 개체를 3-4번의 계대배양으로 homoplasmy를 유도한 후 발근배지 (MS 배지, 500 mg/L spectinomycin, pH 5.8)를 거쳐 토양 순화를 하였다 (Figure 2).

형질전환체 검정

PCR 분석

발근배지로 옮겨진 식물체의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 2개의 primer set으로 PCR 분석을 수행하였다. 먼저, P1 primer (chloroplast genome sequence: 5'-AATCGCTA GTA ATCGCCGG-3')와 P2 primer(aadA sequence: 5'-AATCAAT ATCACTGTGTGGC-3')를 이용하여 형질전환 벡터의 도입 부분이 엽록체 genome으로 도입되었는지를 확인하였고, P3 primer (laccase 5' sequence)와 P4 primer (laccase 3' sequence)를 이용하여 laccase 유전자의 도입을 확인하였다 (Figure 3).

엽록체 genome과 aadA 유전자의 primer를 이용한 PCR 반응에서 wild-type의 담배 (Panel A; Lane 2)에서는 예상되는 1.7 kb의 밴드가 나타나지 않았으나 형질 전환 식물체 (Panel A; Lane 3-5) 모두에서는 예상되는 1.7 kb의 PCR product를 확인할 수 있었다.

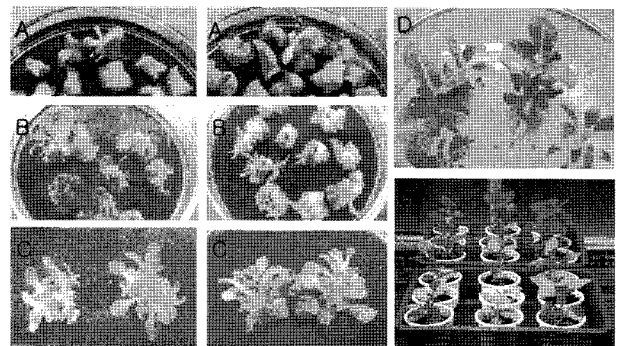


Figure 2. Generation of tobacco plants with transformed chloroplasts. A: Adventitious shoots on leaf explant in first round selection, B: Adventitious shoots on leaf explant in second round selection, C: Adventitious shoots in third round selection, D: Root induction of chloroplast transformants, E: Chloroplast transformants grown in soil.

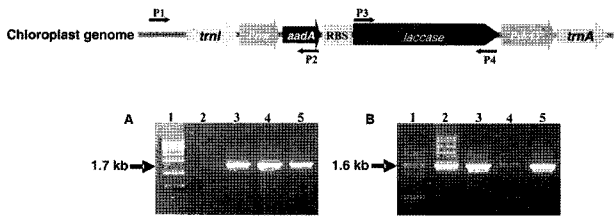


Figure 3. PCR analysis of untransformed and putative chloroplast transformants using two primer sets: (A) P1-P2 and (B) P3-P4. (A) Lane 1: 1 kb ladder; Lane 2: wild-type plant; Lane 3-5: putative transformants (CTVL 2, 4, 6), (B) Lane 1: wild-type plant; Lane 2: control plasmid; Lane 3-5: putative transformants (CTVL 2, 4, 6).

Laccase 유전자의 primer를 이용한 PCR 반응에서, 형질전환 식물체 중 하나인 CTVL4 (Panel B; Lane 4)에서는 예상되는 1.6 kb의 밴드가 확인되지 않았고, wild-type에서 확인된 복수의 희미한 비특이 밴드 (non-specific band)가 검출되었다. 반면 다른 형질전환 식물체인 CTVL2, CTVL6 (Panel B; Lane 3, 5)에서는, 대조 플라스미드 (Panel B; Lane 2)에서 확인된 laccase 유전자 크기인 1.6 kb의 밴드가 확인되었다. 따라서 형질전환 식물체 CTVL2, 4, 6 모두 목표 유전자가 엽록체 genome에 도입된 것을 확인하였지만, 형질전환 식물체 CTVL4의 경우는 laccase 유전자 도입이 정상적으로 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

Southern blot 분석

Laccase 유전자의 담배 엽록체 도입과 homoplasmy의 확인을 위해서 Southern blot을 수행하였다. Southern blot 분석에 사용한 DNA는, 발근배지로 옮겨진 식물체의 잎에서 추출한 genomic DNA를 Bg/II 제한효소로 digestion한 후 이용하였고, Southern blot 분석에 이용한 probe는 wild-type 식물체의 genomic DNA를 template로 하여, trnI와 trnA 유전자의 sequence를 바탕으로 제작한 primer로 증폭한 PCR product를 방사선 동위원소로 labeling 하여 이용하였다.

Southern blot 분석 결과 크기가 서로 다른 두 개의 밴드가 검출되었는데, 이것은 laccase 유전자의 내부에 1개의 Bg/II 제한효소 site가 존재하기 때문이며, 대조구로 사용된 wild-type 식물체에서의 결과와 비교하여 homoplasmy 정도를 확인할 수 있었다. 즉, CTVL2, CTVL4, CTVL6의 세 line 모두 wild-type에서 나타난 4.4 kb의 밴드가 나타나지 않은 결과로부터 homoplasmy 상태를 확인할 수 있었고, CTVL2와 CTVL6 line에서는 6.0 kb와 1.4 kb band가 검출되어, laccase 유전자를 포함한 형질전환 vector의 도입부분이 엽록체 genome에

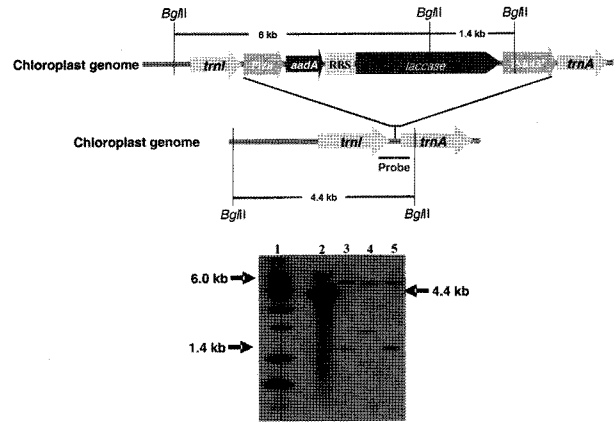


Figure 4. Southern blot analysis of chloroplast transformants. Plant DNA was digested with Bg/II and hybridized with the probe, which contained chloroplast flanking sequences used for homologous recombination. The wild-type chloroplast genome should generate a 4.4 kb fragment and the transformed plant chloroplast genome should generate a 6.0 kb and 1.4 kb fragment. Lane 1: λ HindIII marker; Lane 2: wild-type plant; Lane 3-5: putative transformants (CTVL 2, 4, 6).

도입되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 CTVL4 line은 다른 크기의 밴드가 검출되었고, PCR 분석결과와 종합해볼 때, laccase 유전자 도입이 정상적으로 이루어지지 않은 것으로 사료된다 (Figure 4).

Northern blot 분석

PCR 분석과 Southern blot 분석을 통하여 laccase 유전자를 포함한 목표 유전자의 엽록체 genome으로의 도입과 homoplasmy 정도를 확인한 후, 도입된 유전자의 발현 정도를 확인하기 위해서 northern blot을 수행하였다. PCR 분석과 Southern blot 분석에 사용된 식물체의 잎에서 total RNA를 추출하여 northern blot 분석에 이용하였고, laccase 유전자의 일부 sequence로 이루어진 primer로 laccase 유전자를 PCR 증폭하여 방사선 동위원소로 labeling 한 후 probe로 이용하였다.

Northern blot 분석 결과 CTVL2와 CTVL6 line에서 2개의 밴드가 확인되었고, PCR 분석과 Southern blot 분석에서 유전자의 도입이 불확실하게 나타난 CTVL4 line에서는 밴드가 검출되지 않았다 (Figure 5). Northern blot 분석결과에서 여러 개의 밴드가 검출된 것은, 도입한 trn I 부위의 upstream 부분에 담배 엽록체의 16S rRNA promoter가 존재하고, 이 부위에서부터 개시된 전사물 (transcripts)과 도입유전자의 rm promoter 부위에서부터 개시된 전사물이 존재하는 공전사 (co-transcription or read-through transcripts)가 일어나기 때문인 것으로 사료된다 (Alicia et al. 2003).

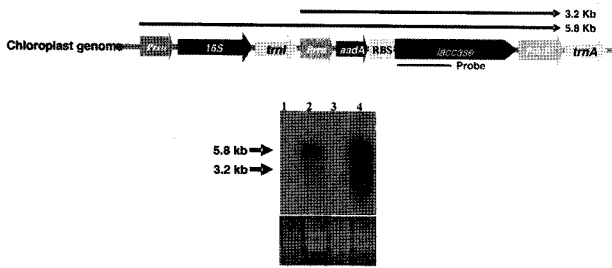


Figure 5. Northern blot analysis of chloroplast transformants. Total RNA was extracted from leaves of transgenic tobacco. Denatured RNA(5 μ g) was separated by electrophoresis on a 1.2% agarose/formaldehyde gel. Laccase cDNA was used as probe. Polycistronic transcripts synthesized from the Prn promoter incorporated with the gene cassette and read-through transcripts synthesized from Prn promoter of the rn operon, are denoted as horizontal arrows in the upper panel. Lane 1: wild-type plant; Lane 2-4: putative transformants (CTVL 2, 4, 6).

본 연구에서는 엽록체 형질전환 벡터를 제작하여 laccase 유전자를 담배 엽록체의 genome에 도입하였고, PCR 분석과 Southern blot 분석, northern blot 분석을 통하여 도입 여부와 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 두 개의 line을 확보하였는데, 이들 line에서의 laccase 단백질의 생산을 확인하기 위해서 western blot 분석을 수행하였으나, 다수의 비특이 밴드가 검출되었다 (data 미제시). Wild-type에서도 다수의 밴드가 검출되는 것으로 보아 목표 단백질 검출을 위해 제작한 laccase 항체에 문제가 있는 것으로 사료된다. 현재 새로운 항체의 제작을 진행 중에 있다.

사 사

본 연구는 해양수산기술진흥원 해양 극한생물 분자유전체 연구단 사업, 과학기술부 프론티어 작물유전체기능연구 사업, 과학재단 SRC 경희대 식물대사연구센터의 지원으로 수행되었다.

인용문헌

Alfred MM, Richard CS (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565
 Alicia FM, Angel M, Michael M, Henry D (2003) A Chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotech J* 1: 71-79
 Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnol* 16: 345-348
 Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression

of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* 311: 1001-1009
 Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW (2000) Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev* 14: 2869-2880
 De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H. (2001) Overexpression of the *Bt* Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnol* 19: 71-74
 Glynis G, Gordon A, Douglas B, Adrian C (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol* 18: 1151-1155
 Higuchi T (1990) Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24: 23-63
 Hood EE, Bailey MR, Beifuss K, Magallanes-Lundback M, Horn ME, Callaway E, Drees C, Delaney DE, Clough R, Howard JA (2003) Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol J* 1: 129-140
 Hood EE, Witcher DR, Maddock S, Meyer T, Baszczyński C, Mailey MR, Flynn P, Register J, Marshall L, Bond D, Kulisek E, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehig RJ, Hernan R, Kappel WK, Ritland D, Li CP, Howard JA (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol Breed* 3: 291-306
 Kirk TK, Farrell RL (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev Microbiol* 41: 465-505
 Kooter JM, Matzke MA, Meyer P (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci* 4: 40-347
 Paszczyński A, Pasti-Grigsby MB, Goszczyński S, Crawford RL, Crawford DL (1992) Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *phanerochaete chrysosporium* and *streptomyces chromofuscus*. *Appl Environ Microbiol* 58: 3598-3600
 Scott SE, Wilkinson MJ (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nature Biotechnol* 17: 390-392
 Spadaro JT, Gold MH, and Renganathan V (1992) Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58: 2397-2401
 Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* 5: 2-15

(접수일자 2008년 2월 28일, 수리일자 2008년 3월 14일)