

***GalUR* 유전자를 이용한 비타민 C 증대 상추 (*Lactuca sativa* L.) 형질전환체 개발**

임미영, 조이남, 채원기, 박영수, 민병환¹, 한지학*
(주)농우바이오 생명공학연구소, ¹경북대학교 생명자원과학대학 식물자원학과

Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) with increased vitamin C levels using *GalUR* gene

Mi Young Lim, Yi Nam Cho, Won Ki Chae, Young Soo Park, Byung Whan Min¹, and Chee Hark Harn*

Biotechnology Institute, Nongwoo Bio Co., Ltd., Jeongdan, Ganam, Yeosu, Gyeonggi, Korea

¹Dept. of Plant Resources, Kyungpook National University, Gajang-Dong, Sangju, Kyungsangbuk-Do, Korea

ABSTRACT L-Ascorbic acid (vitamin C) in vegetables is an essential component of human nutrition. The objective is to transform lettuce (*Lactuca sativa* L.) with *GalUR* gene that is involved in the vitamin C biosynthesis. The cotyledons of Hwoahong (Nongwoo Bio Co.) were used to induce the callus and shoot under the selection media with MS + 30 g/L Sucrose + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA + 100 mg/L kanamycin + 200 mg/L lialicillin, pH 5.2. The shoot was developed from the cut side of the explants after 3 weeks on the selection media. We successfully transformed the lettuce with *GalUR* gene and analyzed the levels of vitamin C. We found that some of the lettuce transgenic lines contained higher levels of vitamin C compared with the normal one (non-transformed). Especially, some of T₁ lettuces inserted by *GalUR* showed about 3~4 times higher content of vitamin C compared to the non-transformed lettuce. This data support the previously work performed with *GLOase* transgenic T₁ lettuces from which several times higher content of vitamin C were identified. The T₂ lettuces with high content of vitamin C have been selected for further analysis.

서 론

L-Ascorbic acid (비타민 C)는 미량으로 생체내의 물질대사를 지배 또는 조절작용을 하는 필수 영양소 중의 하나이다. 대부분의 동물은 체내에서 비타민 C가 생합성 되지만, 사람은 체내에 생합성 경로가 없기 때문에 비타민 C가 생성되지 않는다. 따라서 최적의 건강상태를 유지하기 위하여 음식을 통해서 꼭 섭취를 해야만 한다 (Moser and Hornig

1982). 채소와 과일에 많이 존재하는 비타민 C의 역할 중에서 항산화 기능을 통한 항암 관련연구는 매우 주목 받고 있는 분야이다. 따라서 동물과 식물에서 L-Ascorbic acid (비타민 C)의 생합성 경로 규명은 오랫동안 연구되어 왔다 (Isherwood and Mapson 1962; Ostergaard et al. 1977; Smimoff 1996; Conkin et al. 1997; Wheeler et al. 1998).

GalUR 유전자는 galacturonic acid reductase라는 효소를 encoding 하는 유전자로서 D-galacturonic acid를 L-galactonic acid로 바꿔서 비타민 C의 전구체인 L-galactono-1, 4-lactone를 생성하게 한다 (Agius et al. 2003; Valpuesta and Botella 2004) (Fig. 1, 저자에 의한 재구성). Agius 등 (2003)은 딸기

*Corresponding author Tel 031-883-7055 Fax 031-884-7065
E-mail: chham@nongwoobio.co.kr

내에서 *GalUR*을 통해 비타민 C 합성이 일어나며, *GalUR* over-expression한 애기장대 내에서 비타민 C 함량이 2~3배 높아졌다고 보고한바 있다. 동물에서 유래된 *GLOase* 유전자를 이용한 형질전환 실험이 다양하게 진행 되었으나 (Jain and Nessler 2000; Kim et al. 2004), *GalUR* 유전자의 경우 식물에서 유래된 유전자를 식물의 형질전환에 이용하는 장점이 있다.

상추는 샐러드, 겉절이, 쌈 등의 생채 재료로 육류소비의 증가로 인한 식생활 변화로 소비량이 증가되고 있으며, 신선하고 상쾌한 맛을 지닐 뿐 아니라, 씹는 느낌이 좋아 생식에 적합하다. 상추는 비타민과 무기질이 풍부한 채소이긴 하나, 다른 채소에 비하여 상대적으로 비타민 C 함량이 낮다. 항암작용과 노화방지 등에 탁월한 효능을 지닌 필수 영양소 비타민 C의 관심이 높은 시점에서, 우리 식단에서 쉽게 접할 수 있는 상추에 비타민 C 증진 유전자를 도입하여 비타민 C 함량이 월등히 높은 신품종을 개발한다면 큰 효과가 기대된다.

최근 분자생물학의 발달로 다양한 유전자를 클로닝 할 수 있게 됨에 따라 획득된 유전자를 식물내로 도입하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 상추는 형질전환이 비교적 쉬운 작물로서, 자엽 절편을 재료로 하여 *Agrobacterium*과의 공동 배양법으로 비타민 E 합성 유전자인 *γ-tocopherol methyltransferase* (Kim et al. 2000; Cho et al. 2005), 철 저장단백질 관련 *ferritin* 유전자 (Kim et al. 2001), 백혈구 생산을 촉진하는 *hGM-CSF* 유전자 (Kim et al. 2003)의 도입 등 고기능성 상추 개발 연

구가 이미 보고 된바 있다.

따라서 본 실험은 소비량은 많지만, 비교적 비타민 C 함량이 낮은 상추에 비타민 C 생합성 유전자인 *GalUR* 유전자를 도입하여 비타민 C 함량이 높은 상추를 선발하고자 실시 하였다.

재료 및 방법

실험재료

(주)농우바이오 시판종인 화홍적측면 상추 종자를 70% EtOH에 1분, 25% 락스에 15분간 침지하여 표면 살균하였다. 4회 멸균수로 수세한 다음 1/2MS 배지 (Murashige and Skoog 1962) 에 sucrose 1%가 첨가된 고체배지에 파종 후, 광조건 (25±1℃, 16h day/8h dark)에서 발아시켰다. 발아 후 3일 정도 된 자엽 절편체 (엽병을 약간 포함)를 Kim과 Kwon (1999)이 상추 재분화에 효과적이라고 보고한 전처리 배지 (MS, sucrose 3%, 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, agar 0.8%, pH 5.7)에서 2일간 전 배양한 후, *Agrobacterium*과의 공동배양에 하였다.

형질전환용 균주

본 실험에 사용한 균주는 딸기 유래 유전자 *D-galacturonic acid reductase (GalUR)*와 선발마커인 *npt II* 유전자가 재조

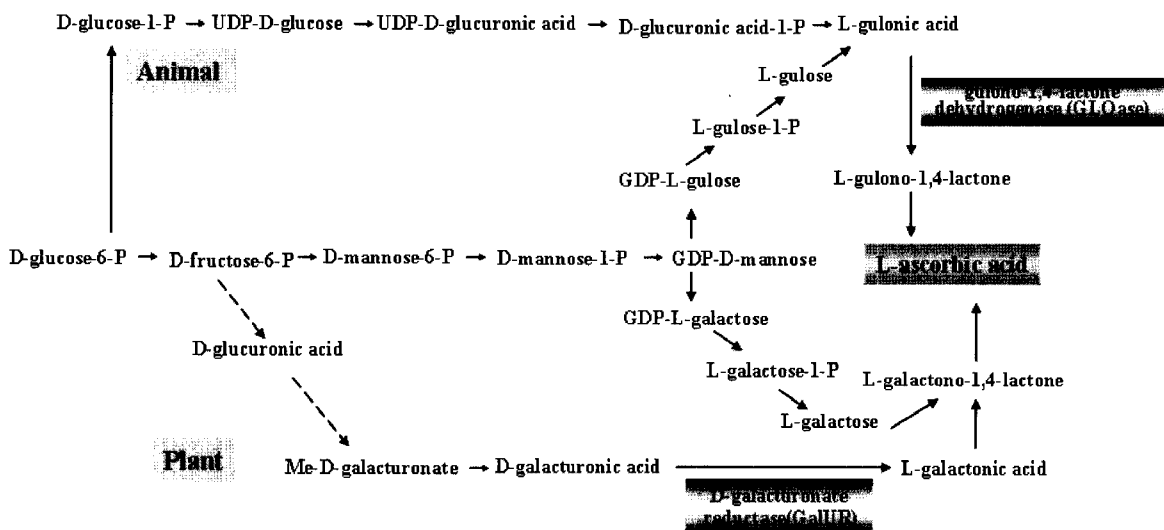


Figure 1. Proposed biosynthetic pathways of L-Ascorbic acid in animals and plants.

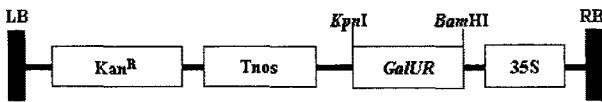


Figure 2. A diagram of the insertion region in pGALUR2300 vector

합되어진 vector (pGALUR2300, (주)농우바이오)를 포함한 *A. tumefaciens* EHA105였다 (Fig. 2). 균주를 YEP (peptone 10 mg/L, yeast-extract 10 mg/L, NaCl 5 mg/L, Kanamycin 50 µg/ml, rifampicin 30 µg/ml, pH 5.6) 액체배지에 O.D₆₀₀ = 0.8 정도까지 배양하여 한 번 원심분리한 후 동일 양의 전처리 액체배지로 *Agrobacterium* pellet을 희석한 다음 절편체와 공동배양에 사용하였다.

상추 형질전환

공동배양을 위해 미리 준비한 *Agrobacterium* 현탁액에 2일간 전 배양한 자엽 절편체를 넣고 20분간 교반하였다. 그리고 멸균 여과지로 절편체에 붙은 현탁액을 제거한 후 공동배양배지 (MS, sucrose 3%, 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, acetosyringon 50 µM, pH 5.2)에 치상하고, 암 상태에서 2일간 배양하였다. 선발배지는 전처리 배지에 *Agrobacterium*의 제거를 위하여 200 mg/L의 Lilacillin (penicillin-sulfate sodium, Takeda Medicine Co., Japan)이 첨가되었다. 또한 본 실험에 사용된 균주의 선발마커는 Kanamycin 저항성을 가졌기 때문에 형질전환체 선발을 위하여 100 mg/L Kanamycin이 첨가되었다. 선발배지에서 살아남은 신태들을 더 확실하게 선발을 하고자 MS배지에 100 mg/L Kanamycin과 200 mg/L Lilacillin만 첨가된 배지에서 신태의 신장과 발근을 유도하였다.

PCR 및 Southern 분석

Kanamycin이 첨가된 선발배지에서 살아남은 식물체에 GalUR 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환 하여 얻어진 발근된 상추 개체를 자연광이 들어오는 순화실에서 (20°C) 순화하였다. 본엽이 3~4장 나온 식물체의 어린 잎조직을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1

분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 하는 과정을 35번 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 신장반응 시키는 것으로 하였다. PCR 반응에 사용된 forward와 backward primer는 5'-ATGACGCACAATCCCCTAT-3'와 5'-GTGGGATCCTCATAATTCCTTCGTC-3'를 각각 이용하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 하였으며, EtBr로 염색하여 UV lamp하에서 밴드를 확인하였다. 또한, 증폭된 밴드가 GalUR 유전자인지, 몇 copy로 삽입되었는지 확인하기 위하여 Southern 분석을 실시하였다 (Southern 1975). 상추 앞에서 분리한 genomic DNA (20 µg)를 HindIII로 절단하여 0.8% agarose gel 전기영동 한 후, agarose gel 상의 DNA 밴드를 ZetaR-Probe nylon membrane으로 전이시켰고, GalUR 유전자를 probe로서 ³²P-dCTP로 표지하여 60°C에서 24시간 hybridization시켰다. 반응을 마친 membrane을 세척하고, -70°C에서 X-ray 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

비타민 C 함량 분석

형질전환체 (T₀) 8 line들을 각각 자가수분하여 T₁ 종자를 채종하였다. 비타민 C 함량 분석을 위하여 T₁ 형질전환체 종자를 105구 tray에 파종하였다. 8 line 각각의 T₁ 식물체내에 GalUR 유전자 삽입 유무를 확인하기 위해 본엽이 3장 정도 나왔을 때 PCR 분석을 수행하였다. 유전자가 확인된 T₁ 개체들 중에서 각각의 T₁ 12개체를 선발하여 큰 포트에 이식하였다. 이때 대조구로서 형질전환하지 않은 화홍적측면 상추도 같이 파종하여 다수 준비하였다. 하우스에서 약 2달간 재배한 형질전환 상추 8 line당 T₁ 12개체에서 생육이 불균일한 것을 제외하고 각각 10점을 모아서 bulk로 시료를 준비하였다. 이같이 준비된 시료에서 비타민 C 함량을 측정하고자 오래된 잎을 제외한 비슷한 크기의 어린잎을 약 200 g씩 채취하였다. 대조구도 같은 방법으로 3개의 시료를 준비하였다. 비타민 C는 쉽게 파괴되는 영양소이므로, 채취된 시료들을 바로 얼음을 채운 상자에 넣어서 분석전문 기관인 한국식품연구소로 보내 HPLC 분석 방법으로 비타민 C 함량을 측정하였다. 5% metaphosphoric acid 용액에서 시료를 추출하였고, column은 C18 (4.6 mm × 250 mm), detector는 UV 254 nm를 사용하였다. Standard curve 값은 Ascorbic acid 표준시약을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

상추 형질전환체 육성

화홍적측면 상추 형질전환을 위해 비타민 C를 생합성하는 *GalUR* 유전자를 사용하였다. 100 mg/L Kanamycin과 200 mg/L Lilacillin이 첨가된 재분화 (MS, sucrose 3%, BA 0.5 mg/l, NAA 0.1 mg/L) 선발배지에 치상하여 형질전환체를 선발하였다 (Kim and Kwon 1999). 재분화 선발배지에서 3주 정도 되었을 때 callus에서 싹초가 형성되기 시작하였고, 4주 정도 경과 후 식물체로서 모습을 갖춘 싹초들이 관찰되었다 (Fig. 3A). 형성된 싹초들을 callus와 함께 또는 싹초만 자엽 절편체와 분리하여, 다시 재분화 선발배지 또는 생장조절제가 첨가되지 않은 선발배지에 계대배양을 하였다 (Fig. 3B). 계대배양 후 녹색을 띠며 잘 자라는 싹초가 있는 반면, 성장을 멈추고 백화되는 싹초도 많이 발생되었다 (자료 미제시). 더 확실한 선발을 위하여 발근 배지에 100 mg/L Kanamycin을 첨가하여 뿌리를 유도 하였는데, 뿌리가 형성되지 못하고 백화 되고 성장을 멈추는 개체들도 있었지만, 대부분 유도된 녹색의 싹초들은 발근이 잘되었다. 발근된 식물체들을 지피포트에 옮겨 안정적으로 순화를 하고 본엽이 전개되면서 보다 큰 포트로 이식하여 순화실에서 순화하였다 (Fig. 3C). 차후에 유전자의 도입이 확인된 상추 형질전환 개체들을 2회에 걸쳐 큰 포트로 이식하고 하우스에서 자가수분하여 T₁ 종자를 채종하였다 (Fig. 3D).



Figure 3. Developmental stages of transformed *GalUR*-Lettuce. A: Callus and shoot induction from cotyledon explants on selection medium; B: Elongation of shoot on MS medium with Kanamycin 100 mg/L and Lilacillin 200 mg/L; C: Acclimation; D: Flowering of transgenic lettuce (T₀).

PCR 및 Southern 분석

재분화된 형질전환체에서 Kanamycin 내성을 갖는 식물체가 정상적으로 자라는 것을 확인함으로써 형질전환 여부를 대략 판단할 수 있었고, 더 정확한 유전자 분석을 하기 위하여 PCR 분석을 실시하였다. 순화된 식물체 본엽에서 genomic DNA를 추출하였다. PCR 검정을 한 결과 형질전환을 하지 않은 상추에서는 *GalUR* 유전자 단편이 증폭되지 않았으나, 상추 형질전환체에서는 모두 약 1.2 kb 크기의 *GalUR* 유전자의 단편이 증폭된 것으로 확인되었다 (Fig. 4). *GalUR* 유전자가 도입된 상추 형질전환체 T₀ 총 18개체를 확보하였으며 그 형질전환 효율은 약 0.36%였다.

PCR 반응에서 *GalUR* 유전자가 확인된 식물체로부터 *GalUR* 유전자의 도입여부를 보다 더 정확하게 확인하고자 형질전환 개체들 중 8점을 선정하여 Southern 분석을 실시하였다. *Hind*III로 처리한 결과 대조구에서는 band를 확인할 수 없었으며, 형질전환체의 경우 12 kb~5 kb 사이에서 강한 band가 one copy에서 복수 copy까지 다양하게 확인 되었다. 따라서 외래 유전자 *GalUR*이 상추 nuclear genome 내로 안정적으로 삽입되었음을 확인하였다 (Fig. 5).

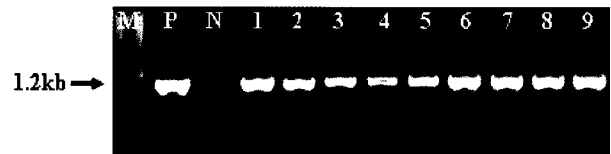


Figure 4. PCR analysis. M: Marker; P: Positive control; N: Non-transformed plant as a negative control; 1-9: Transgenic lettuces (T₀).

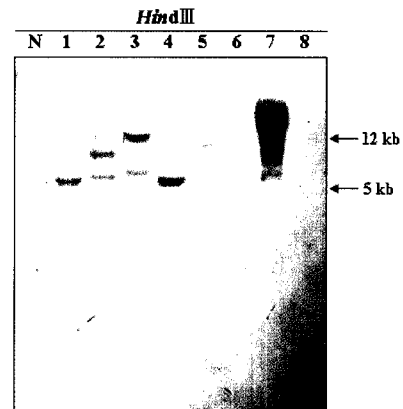


Figure 5. Southern blot analysis. Total genomic DNA was digested with *Hind*III. The genomic DNA was hybridized with *GalUR* probe labeled with ³²P. N: non-transformed lettuce; 1-8: Transformed lettuces.

상추 형질전환체 비타민 C 함량 분석

형질전환 상추에서 *GalUR* 유전자가 확인된 개체들을 가수분해 하여 얻어진 T₁ 종자를 파종하였다. 대조구 화홍적측면 상추와 *GalUR* 형질전환체 T₁의 형질을 관찰해본 결과 원예적으로 대조구와 별다른 차이가 없었다 (Fig. 6).

비타민 C 함량 (L-Ascorbic acid)을 측정 하고자 한국식품연구소에 대조구와 형질전환체 시료를 의뢰하여 HPLC 분석 방법으로 조사하였다. 대조구의 경우 0.25~0.37 mg/100 g 정도를 나타냈고, 형질전환체의 경우 최저 0.6 mg/100 g에서 최고 1.33 mg/100 g 정도 나타났다. 그 결과 형질전환체 모두 대조구 보다 높은 비타민 C 함량을 보였으며, 특히 대조구에 비해서 비타민 C 함량이 3~4배 높은 T₁ line을 선발할 수 있었다 (Fig. 7). 위에서 유래된 비타민 C 생합성에 관여하는 *GLOase* 유전자 형질전환 담배와 상추에서도 비타민 C가 대조구에 비해 7배 증가하였다는 보고가 있다 (Jain and

Nessler 2000). 또한 Kim 등 (2004)의 보고에서도 역시 *GLOase* 유전자가 도입된 상추 형질전환체에서 대조구에 비해 비타민 C 함량이 높은 몇몇 개체가 확인되었다. 본 실험 결과에서 주목 할점은 Agius 등 (2003)의 실험에서 언급 하였듯이 딸기에서 유래된 *GalUR* 유전자를 형질전환 할 경우 비타민 C 생합성이 대조구에 비해 형질전환체의 경우 더 높게 합성됨을 알 수 있었고, 특히 주로 생식으로 섭취하는 상추의 경우 식물에서 유래된 유전자라는 사실 때문에 소비자들의 거부감이 한층 줄어들 것으로 기대된다.

본 실험 결과 *GalUR* 유전자가 형질전환된 상추에서 비타민 C 생합성에 관여하여 비타민 C 함량을 높인다는 사실을 알 수 있었다. 상추내로 도입된 비타민 C 생합성 유전자가 후대에도 유전되어 제 기능을 하는지 확인하기 위해 비타민 C 함량이 높게 나온 6 line을 선정하여 T₂ 종자를 수확하였다. 향후 자연 온도 조건이 맞아 재배하기 쉽고, T₁과 비슷한 조건하에 비타민 C 함량을 측정하고자 다음해 봄에 T₂를 파종할 계획이다.

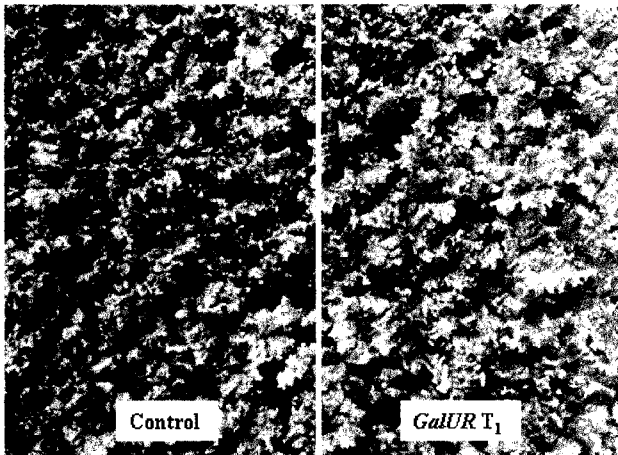


Figure 6. Comparison of control and T₁ lettuces.

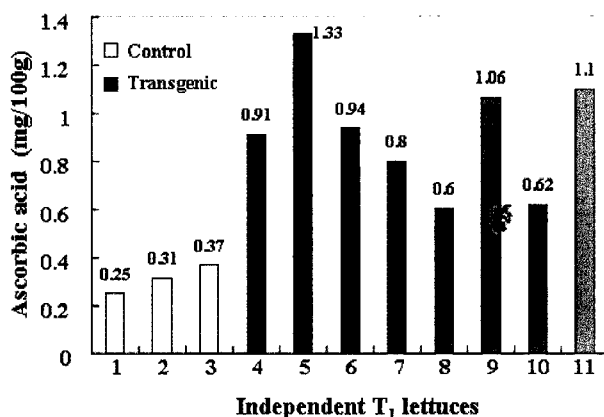


Figure 7. L-Ascorbic Acid (Vitamin C) content in leaves of *GalUR* transformed lettuces and non-transformed lettuces (Hwoahong).

적 요

사람은 채소를 통해 필수영양소인 L-Ascorbic acid (vitamin C)를 공급받는다. 본 실험의 목적은 비타민 C 생합성 유전자인 *GalUR* 유전자를 상추 (*Lactuca sativa* L.)에 형질전환 하고자 실시하였다. (주)농우바이오의 화홍적측면 상추의 자엽 절편체를 선발배지 (MS + 30 g/L Sucrose + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA + 100 mg/L Kanamycin + 200 mg/L Lilacillin, pH 5.2.)에 치상하여 3주 경과 후 자엽 절편체의 절단면에서 callus와 싹초가 형성되었다. 그 결과 *GalUR* 유전자로 상추 형질전환을 성공하였고 비타민 C 함량을 분석하였다. 대조구에 비하여 상추 형질전환체 line에서 높은 함량의 비타민 C 특히, *GalUR* 유전자가 삽입된 T₁ 중 일부는 비형질전환체에 비해 3~4배 높은 비타민 C 함량을 나타내었다. 이 결과는 *GLOase* 유전자 형질전환 상추 T₁ 세대에서 고품량의 비타민 C를 함유한 결과와 일치한다. 이런 결과를 기초로 하여 비타민 C 고품량 T₂ line을 선발하였다.

사 사

본 연구는 과기부 프론티어 작물유전체기능연구 사업단 (과제번호: CG3133) 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Agius F., González-Lamothe R., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V. (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *nature biotechnology*. 21: 177-181
- Cho EA, Lee CA, Kim YS, Baek SH, Reyes BG, Yun SJ (2005) Expression of γ -tocopherol methyltransferase transgene improves tocopherol composition in lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Molecules and cells* 19(1): 16-22
- Conkin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnoff N (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vct1*. *Plant Physiol*. 115: 1277-1285
- Isherwood FA, Mapson LW (1962) Ascorbic acid metabolism in plants. Part II. Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 13: 329-350
- Jain AK, Nessler CL (2000) Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Molecular Breeding* 6: 73-78
- Kim BK, Park SY, Jeon BY, Hwang DY, Min BW (2004) Metabolic Engineering increased vitamin C levels in lettuce by overexpression of a L-Gulono- γ -lactone oxidase. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 45(1): 16-20
- Kim MJ, Baek SH, Yoo NH, Yun SJ (2000) Transformation of *Arabidopsis* gamma-Tocopherol Methyltransferase into Lettuce (*Lactuca savita* L.) *Korea J Plant Tissue Culture* 27: 435-439
- Kim SH, Nou IS, Choi CS, Kang KK (2001) Transformation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using Iron Storage Protein Ferritin Gene. *Korea J Plant Tissue Culture* 28(3): 147-151
- Kim YS, Kwon TH (1999) Establishment of efficient regeneration system through in vitro culture of Lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Res* 2: 16-21
- Kim YS, Kim MY, Kwon TH, Yang MS (2003) Production of hGM-CSF from Cell Suspension Culture of Transformed Lettuce Using *Agrobacterium*-mediated Transformation System. *Korea J Plant Tissue Culture* 30(1): 97-102
- Moser U., Hornig D. (1982) High intakes of vitamin C: A contributor to oxalate formation in man. *TIPS-December* 480-485
- Murashige, T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Ostergaard J, Persiau G, Davey MW, Bauw G, Van Montagu M (1997) Isolation of a cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *J Biol Chem* 272: 30009-30016
- Smirnoff N (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot* 78: 661-669
- Southern, E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-512
- Valpuesta V, Botella MA (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *TREND in Plant Science* 9(12): 573-577
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369

(접수일자 2008년 2월 21일, 수리일자 2008년 4월 3일)