

무선발표지 형질전환 식물체 제조기술

우희종 · 신공식 · 이기종 · 권순중 · 조용구 · 서석철

Principal methods to produce marker-free GM plants

Hee-Jong Woo · Kong-Sik Shin · Ki-Jong Lee · Soon-Jong Kweon · Yong-Gu Cho · Seok-Cheol Suh

Received: 31 March 2010 / Accepted: 13 April 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Selectable marker gene systems are vital for the development of transgenic plants, but the presence of selectable marker genes encoding antibiotic or herbicide resistance in genetically modified plants poses a number of problems. A lot of research results and various techniques have been developed to produce marker-free GM plants. The aim of this review is to describe the principal methods used for eliminating selectable marker genes to generate marker-free GM plants, concentrating on the three significant methods (co-transformation, site-specific recombinase-mediated excision, non-selected transformation) in several marker-free techniques.

서론

1996년 처음 상업화된 유전자변형 (Genetically Modified, GM) 작물의 재배면적은 매년 급속한 성장을 기록하여 2009년에는 25개국 1억 3천 4백만 헥타르에 이르고 있다 (James 2009). 이와 같은 GM작물의 성장세는 개발도상국과 선진국의 재배농민 모두에게 GM작물이 경제적으로 도움이 되며 식물형질전환기술의 급속한 발전으로 주요 작물에서 높은 효율로 형질전환 (transformation)이 가능해졌기 때문이다.

H.-J. Woo · K.-S. Shin · K.-J. Lee · S.-J. Kweon · S.-C. Suh (✉)
농촌진흥청 국립농업과학원 생물안전성과
(National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea)
e-mail: suhsc@korea.kr

Y.-G. Cho
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju 361-763, Korea)

GM작물 개발을 위한 식물형질전환기술의 급속한 발전은 새로운 배지나 형질전환법의 개발이 빠르게 이루어졌기 때문이기도 하지만, 항생제 내성 유전자와 같은 선발표지 시스템을 식물형질전환에 적용했기 때문이다 (Miki and McHung 2004). 일반적으로 식물체 내에 목적유전자를 형질전환하기 위해서는 운반체 (vector)라는 DNA 구성물을 사용하여 목적유전자와 함께 항생제 내성 유전자와 같은 선발표지 유전자를 토양미생물인 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)의 식물체 내 T-DNA 전이기작을 이용하여 세포(핵)내로 도입한다. 하지만 아그로박테리움에 의해 외래유전자가 도입된 세포의 출현빈도는 보통 10^{-6} ~ 10^{-3} 정도로 매우 낮으며, 유전자가 도입되지 못한 다수의 식물세포와 혼재하게 된다. 이때 재분화 유도 배지에 항생제를 첨가하면 목적유전자와 연결된 특정 항생제 내성 유전자가 정상적으로 도입된 식물체만이 생존하고 재분화가 유도되어 목적유전자가 도입된 식물체를 쉽게 얻을 수 있다. 현재까지 식물형질전환을 위해 통상적으로 가장 많이 사용하고 있는 선발표지 유전자는 kanamycin과 같은 aminoglycoside계 항생제를 인산화하여 불활성화시키는 neomycin phosphotransferase를 생산하는 *nptII* 유전자이다. 선발표지로 *nptII*를 이용했을 때 선발효과가 높지 않은 벼나 배추 등의 식물체에서는 hygromycin에 대해 내성을 보이는 *hpt* (hygromycin phosphotransferase) 유전자가 많이 사용되고 있다 (Herrera-Estrella et al. 1983; Bevan et al. 1983; Goodwin et al. 2004). 한편 항생제 내성 유전자뿐 아니라 제초제 내성 유전자도 효과적인 선발표지로 사용될 수 있다. Phosphinothricin (PPT) 내성 유전자인 *bar*나, glyphosate 내성 유전자인 *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)를 사용하면 다른 항생제 내성 유전자를 사용하지 않아도 선발이 가능하고, 특정 제초제에 내성을 지닌 식물체를 육성할 수 있어 매우 유용하다.

많은 GM 작물의 상업화로 재배면적과 생산량이 증가

하면서 GM작물 개발과정에서 선발표지로 사용된 항생제 내성 유전자의 위해성 논란과 같은 여러 가지 안전성 문제가 제기되고 있다. 항생제 내성 선발표지 유전자의 위해성 문제는 GM작물체나 생산물의 항생제 내성 유전자가 임상적으로 중요한 치료제인 항생제의 효과를 감소시킬 수 있다는 인체위해성과, 장내 또는 토양의 미생물로 항생제 내성 유전자의 수평적 유전자 전이 (horizontal gene transfer)가 일어나 항생제 내성이 확산될 가능성이 있다는 환경위해성으로 구분할 수 있다. 한편, 제초제 내성 유전자는 자연교배를 통해 GM 작물에서 야생 또는 잡초 근연종으로 전이가 되면서 교배된 근연종이 새로운 서식지로 퍼져 잡초화 될 수 있는 가능성이 문제로 제기되고 있다. 또한 제초제 내성 유전자의 인체에 대한 독성 및 알러지 가능성이 계속 논란의 대상이 되고 있으며, 비표적 생물에 대한 위해성도 지적되고 있다 (Dale et al. 2002).

GM작물에 사용된 선발표지 유전자의 안전성 문제는 과학적 견해에 의한 진위여부와 관계없이 GM작물의 성공적인 상업화 요소인 소비자 인식에 영향을 줄 수 있다. 현재 사용되고 있는 항생제 또는 제초제 저항성 유전자를 제거 또는 다른 유전자로 대체할 경우 GM작물의 구입 및 승인에 찬성하겠다는 대중인식 변화보고는 선발표지 유전자의 안전성 논란이 소비자에게 GM작물에 대한 부정적 인식으로 작용하며, 선발표지 유전자의 제거가 소비자 인식에 긍정적 요인으로 작용할 수 있음을 보여주는 것이다 (Gamble and Gunson 2002; Lusk and Sullivan 2003; Schaart 2004). 이러한 이유로 대체 선발표지 유전자의 개발 및 무선발표지 형질전환체 개발을 위한 연구가 꾸준히 추진되어 왔다.

항생제 저항성 표지를 사용하지 않은 방법으로는 mannose 6-phosphate를 fructose 6-phosphate로 전환하는 phosphomannose isomerase (*pmi*)를 이용한 기술이 신젠타에 의해 개발되어 알러지와 독성평가를 포함한 안전성평가 및 포장시험을 거쳐 실용화되었고 (Joersbo et al. 1998; Privalle et al. 2000; Reed et al. 2001), 아그로박테리움의 isopentenyl transferase (*ipt*)와 효모의 D-amino acid oxidase (*dao*)를 이용하여 식물체 형질전환에 성공한 결과가 보고되었다 (Zuo et al. 2002; Erikson et al. 2004).

무선발표지 GM작물의 제조방법은 선발표지를 사용하여 형질전환을 한 이후 선발표지 유전자를 제거하거나 무선발표지를 이용하는 방법이 개발되었다. 무선발표지 GM작물은 앞에서 기술한 소비자인식의 개선 이외에 개발 단계 및 활용 면에 있어 여러 장점을 가진다. 구체적인 예로 상업화를 위한 규제과정의 간소화를 들 수 있다. GM작물이 상업화되기 위해서는 목적유전자의 안전성 뿐만 아니라 선발표지 유전자와 같이 형질전환에 사용된 모든 유전자의 엄격한 환경 및 인체에 대한 안전성평가

연구를 수행해야 한다. 따라서 무선발표지 GM작물은 선발표지와 관련된 안전성평가 심사자료 작성을 위한 노력과 비용을 줄일 수 있다. 무선발표지 GM작물의 다른 장점으로는 유전자 집적 (gene stack)의 용이성이다. 최근에 개발되는 식물 병이나 스트레스 저항성과 같은 형질을 지니는 형질전환식물은 복수의 목적유전자 도입이 요구되지만 다른 종류의 선발표지를 이용하여 공동형질전환 (co-transformation) 방법으로 형질전환하는 경우 선발표지에 따른 식물체의 효율차이로 선발표지의 사용의 한계가 존재하며 선발표지 유전자에 사용하는 상시발현 프로모터의 증가는 목적유전자의 침묵기작 (silencing mechanism)을 유도할 가능성이 있다. 무선발표지 GM작물은 사용된 선발표지를 작물체내에서 제거할 수 있어 같은 선발표지를 이용하여 다른 목적유전자를 다시 형질전환할 수 있어 복수의 유전자가 도입된 형질전환체 생산이 용이하다.

최근까지 무선발표지 형질전환 식물체 제조 방법에 관한 많은 연구논문이 발표되었다. 본 리뷰에서는 무선발표지 형질전환 식물체 관련 논문 중 주요 제조방법과 기술적인 현황 및 최근의 연구결과를 고찰해보고자 한다.

본 론

공동형질전환 이용한 무선발표지 식물체 제조

공동형질전환 (co-transformation)을 이용한 무선발표지 형질전환체 제조의 기본원리는 선발표지 유전자와 발현시키고자 하는 목표유전자를 분리된 T-DNA로 구성된 이원운반체로 만들어 아그로박테리움법이나 유전자총 (Biolistics) 법을 이용하여 식물체에 도입하고, 선발표지 유전자가 연관 (linkage)되지 않게 도입되어 유전자 분리가 발생된 목표유전자 도입 식물체를 후대에 PCR 등의 기법을 사용하여 선발하여 육성하는 것이다 (Komari et al. 1996).

형질전환 식물체 제조를 위한 공동형질전환 방법은 공동형질전환 효율이 높고, 제한된 선발표지 유전자를 사용하여 동시에 많은 유전자를 식물체에 도입할 수 있는 특징이 있다. 구체적인 예로 유전자총법을 이용하여 9개의 다른 T-DNA를 벼에 공동형질전환 한 Wu 등 (2002)의 실험에서 형질전환된 모든 세포주들은 3개 이상의 유전자가 도입되었고 17% (11/66)의 형질전환체는 9개 유전자가 모두 도입되었다. 후대분석결과 복수 (multiple)의 유전자는 대부분 벼 게놈상의 같은 유전자 좌 (locus)에 연관되게 도입되어 있었다. 유전자총법으로 발생하는 높은 연관 빈도는 복수의 목표유전자를 형질전환하기 위한 좋은 방법이 될 수 있지만, 후대에 유전자 분리가 발생되지 않기 때문에 선발표지 유전자의 제거 목적으로는 적합하

지 않다.

유전자총법에 비교하여 아그로박테리움법을 이용한 공동형질전환은 도입유전자가 높은 빈도로 식물 계놈상의 다른 유전자 좌로 도입된다. 아그로박테리움법에 의해 비연관되게 도입된 선발표지 유전자는 목표유전자와 분리할 수 있어 무선발표지 형질전환체 제조에 이용할 수 있다. 아그로박테리움을 이용한 공동형질전환 방법은 i) 다른 아그로박테리움 종을 이용하여 두 개의 다른 T-DNA를 이용하는 방법, ii)한 아그로박테리움에 다른 복제원점 (replicon)을 가지는 T-DNA를 이용하는 방법, iii)한 종류의 아그로박테리움내에 같은 복제원점을 이용하여 두 가지 다른 T-DNA를 위치시키는 방법의 세 가지 형태로 세분화 할 수 있다 (그림 1).

아그로박테리움법을 이용한 공동형질전환 방법은 비교적 일찍 선발표지 유전자와 함께 비선발 유전자가 비교적 높은 효율로 식물체내로 도입할 수 있다는 결과가 보고되었고 (An 1985), 공동형질전환체 후대의 약 50% (유채: 40%, 담배 58%)에서 도입유전자간의 분리가 관찰되었다 (Daley et al. 1991). 단일 아그로박테리움을 사용하는 방법과 다른 종류의 아그로박테리움 혼합물을 이용한 공동형질전환은 효율면에서 거의 동일하지만 식물체와 아그로박테리움 종간의 관계에 따라 연관빈도와 효율차이가 발생된다 (Depicker et al. 1985).

무선발표지 형질전환식물체 생산을 위한 공동형질전환에서 계놈상의 비연관된 유전자 좌로의 T-DNA 도입은 선발표지 제거를 위해 필수적이다. 공동형질전환으로 도입되는 T-DNA의 연관도는 사용되는 아그로박테리움 종에 의해서도 영향을 받을 수 있다. 즉 nopaline 유래의 아그로박테리움은 형질전환 효율은 높지만 연관된 자리로 T-DNA를 도입하는 반면 상대적으로 octopine 유래의 아그로박테리움은 효율은 낮지만 비연관된 자리로 T-DNA가 도입된다 (Jones et al. 1987; Jorgensen et al. 1987). 또한 T-DNA의 카피수, 식물조직, 식물조직당 박테리아의 수 등도 도입유전자의 유전자 위치와 관련된 주요인이다 (De Neve et al. 1997). 따라서 공동형질전환을 이용하여 효율적으로 무선발표지 형질전환체를 만들기 위해서는 도입유전자의 T-DNA의 카피수를 낮추고 octopine 유래의 아그로박테리움을 사용하는 것과 같은 방법을 사용하여 형질전환 효율은 낮지만 비연관 유전자 좌로 T-DNA의 도입을 유도하여야 한다 (Ebinuma et al. 2001).

아그로박테리움을 이용한 공동형질전환 방법은 형질전환체의 교배에 의한 유전자 분리에 의해 선발표지가 제거된 형질전환체를 만들 수 있다는 것이 증명되었다. 그러나 이러한 방법은 식물종에 따른 형질전환효율 등의 차이로 모든 식물체에 적용할 수는 없으며, 선발표지를 사용하는 일반적인 형질전환 방법과 비교하여 4배 이상의 많은 형질전환체 생산이 필요하다 (Daley et al. 1998).

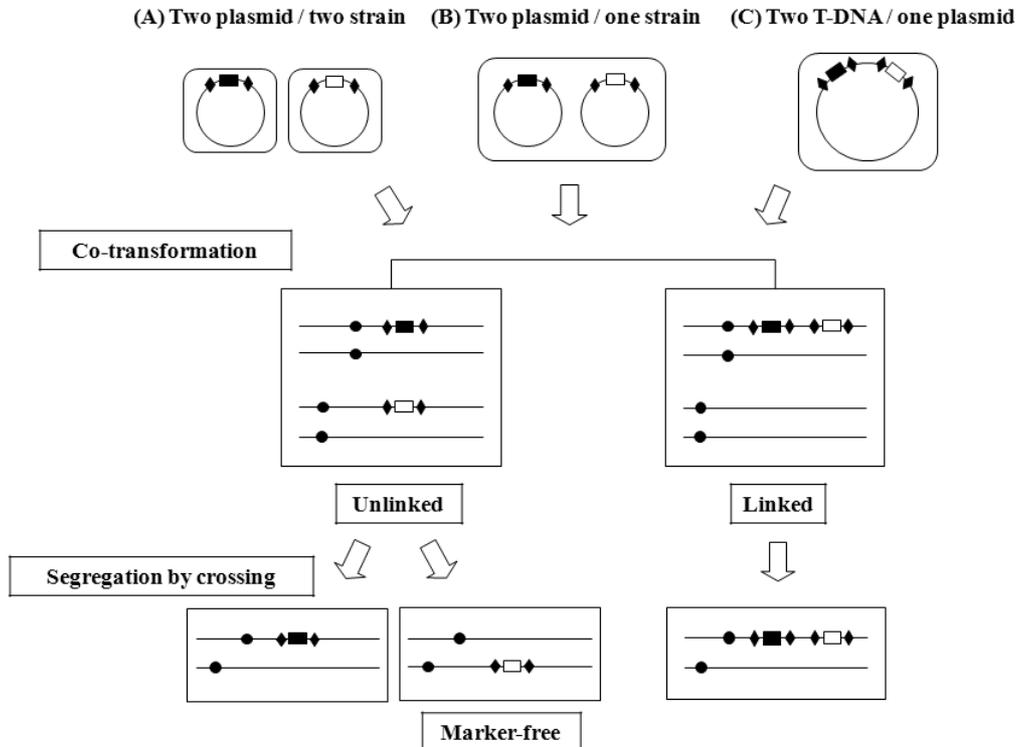


Fig. 1 Generation of marker-free transgenic plants by the co-transformation method. ■ selectable marker gene, □ gene of interest, ◆ border sequence of T-DNA. Modified from Ebinuma et al. 2001

부위-특이적 재조합효소를 이용한 선발표지 제거

부위-특이적 재조합 (site-specific recombination)은 원핵생물과 하등 진핵생물의 삽입, 카피 숫자 유지 등과 관련된 기작에서 관찰되는 일반적 현상이다. 부위 특이적 재조합효소는 특이적 DNA 염기서열을 인식하여 두 개의 인식부위가 존재할 때 DNA의 재조합을 촉매하며, 일부 재조합효소는 다른 효소의 도움이 없어도 인식부위의 방향성 (정방향 또는 역방향)에 따라 DNA를 절단시키거나 역위 (invert)시키는 기능을 가지고 있어 넓은 활용성을 가진다.

부위-특이적 재조합시스템들 가운데 여러 종류가 선발표지 제거목적으로 식물에 적용되었다 (Ow 2002). 식물에서 기능을 보이는 대표적 재조합 시스템은 박테리오파지 P1에서 발견된 Cre/loxP 재조합 시스템 (Russell et al. 1992), *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 FLP/FRT 재조합 시스템 (Lloyd and Davis 1994) 및 *Zygosaccharomyces rouxii*의 R/R 재조합 시스템 (Sugita et al. 2000)이 있다.

부위-특이적 재조합 시스템의 인식부위는 짧은 역반복서열에 둘러싸인 뉴클레오티드에 의해 방향성이 결정되며, 인식부위의 방향성에 따라 재조합효소에 의한 DNA 재배열이 일어나게 된다. 한 DNA 분자내에 인식부위가 정방향으로 위치할 경우 분자내 (intramolecular) 재조합으로 인한 절단이 일어나 한 개의 인식부위가 포함된 모분자 DNA와 다른 인식부위를 가진 원형 DNA체가 만들어지며, 두 DNA 분자에 한 개씩의 인식부위가 존재하는 경우에는 분자간 (intermolecular) 재조합으로 인한 삽입현상이 발생된다. 또한, 두 DNA 분자가 각각 두 개씩의 인식부위를 가지고 있다면 이중 재조합의 결과로 DNA 단편이 교환된다 (그림 2).

Cre/loxP: Cre/loxP 시스템은 38.5 kDa Cre 재조합효소와 34 bp의 인식부위로 구성된다. 인식부위는 두 개의 13 bp 역반복서열과 8 bp 중심서열 구조로 야생형은 loxP로 표기한다 (그림 3). 무선발표지 형질전환식물체 제조를 위해 연구된 부위-특이적 재조합시스템 중 Cre/loxP 시스템의 이용이 가장 활발하다. 선발표지 제거를 위해 Cre/loxP 시스템이 처음 적용된 식물체는 담배이다.

재조합시스템을 사용하여 선발표지를 제거하기 위한 기본 실험방법은 목표유전자 카세트와 lox-P35S-hpt-lox와 같은 유전자 구조가 포함된 T-DNA를 식물체에 항생제 선발표지를 이용하여 도입하고, Cre 유전자를 다른 선발표지 (nptII) 유전자와 함께 재형질전환 (re-transformation) 하거나 교배하는 방법이 이용된다 (그림 3). Cre 유전자가 도입되어 lox 인식부위의 재조합으로 선발표지 유전자 (hpt)가 제거된 개체들은 후대의 유전자분리를 이용하여 Cre 유전자와 다른 선발표지 유전자 (nptII)를 함께 제거할 수 있다 (Dale and Ow 1991).

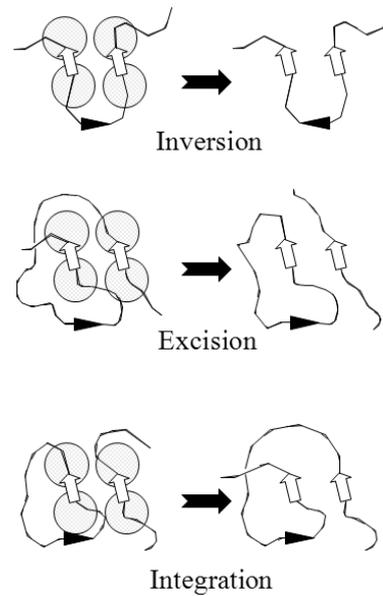


Fig. 2 Diagram depicting recombinase-mediated rearrangements catalyzed by site-specific recombination system. Depending on the orientation of the recombination sites, excision, inversion, or integration of DNA fragment occurs

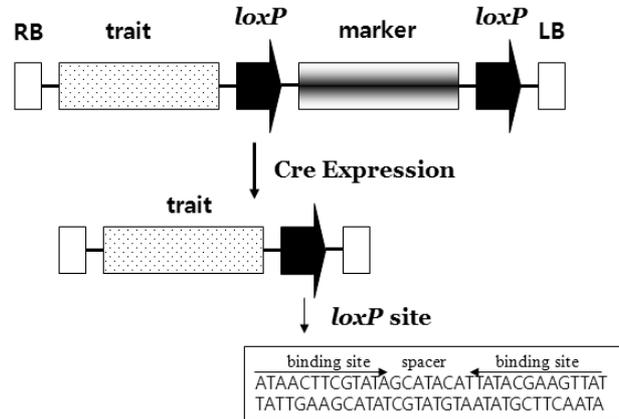


Fig. 3 Basic strategy using Cre-mediated site-specific recombination to marker gene removal and nucleotide sequences of loxP site

Cre 재조합효소의 일시적 발현과 음성표지 (negative marker) 시스템을 사용하면 lox 부위의 재조합을 유도하기 위한 Cre 유전자의 재형질전환이나 교배 없이도 선발표지를 제거할 수 있다. 목표유전자와 lox-nptII-codA-lox와 같은 구조를 가진 T-DNA가 형질전환된 담배개체들은 비독성 5-fluorocytosine (5-fc)가 첨가된 배지에서 cytosine deaminase (codA)가 5-fc를 독성 5-fluorouracil로 전환시키기 때문에 생존할 수 없다. 그러나 형질전환체 엽절편을 Cre 재조합효소 발현 아그로박테리움과 공동배양하여 무항생제 첨가배지에서 유도된 신초의 0.25%는 선발표지와 함께 codA 유전자가 제거되어 5-fc에 대한 내성을 보였다 (Gleave et al. 1999).

부위 특이적 재조합효소 시스템을 사용하여 무선발표지 식물체를 만드는 기본방법은 목표유전자와 함께 사용된 선발표지를 제거하기 위하여 교배나 재형질전환의 과정이 필요하다. 또한 Cre 재조합 효소의 일시적 발현과 음성 선발표지를 같이 사용하는 방법은 선발표지 제거 효율이 낮고 식물 종에 따른 음성 선발표지의 저항성차이로 폭넓은 식물체에 적용하기 어렵다. 이러한 문제를 극복하기 위한 대체 방안으로 자가-절단 방법이 개발되었다. 자가-절단 방법은 재조합효소 유전자를 선발표지와 함께 T-DNA내의 두 재조합효소 인식부위 사이에 위치시켜 식물체내로 도입하는 방법이다.

자가-절단 방법의 개발초기에는 식물체에서 재조합효소를 발현시킬 목적으로 꽃양배추모자이크 바이러스 유래의 CaMV 35S 프로모터 (Califlower mosaic virus 35S promoter)가 많이 사용되었다. 그러나 재조합효소가 항상 발현 프로모터에 의해 같은 양으로 계속 발현되면 식물체에서 완전히 선발표지 유전자가 제거되지 않아 선발표지 유전자가 남아있는 세포와 혼재되는 키메라 (chimeric) 현상이 발생할 수 있다 (Coppoolse et al. 2003). 따라서 이를 해결하고자 화합물 유도성 프로모터나 조직특이적 프로모터를 사용하여 형질전환 단계나 식물의 특정분화 세포 단계에서 재조합효소의 발현이 일어나 선발표지가 제거되도록 하는 연구가 수행되었다.

Cre 재조합효소 유전자가 사용된 대표적인 자가-절단 방법은 CLX (Cre/*lox* DNA excision) 운반체 시스템으로 Cre 재조합효소의 발현이 화합물 처리로 유도되도록 설계되었다 (Zuo et al. 2001). 운반체 T-DNA의 두 *loxP* 인식부위 사이에 선발표지인 *nptII* 유전자와 *Cre* 유전자 및 *Cre* 유전자 전사를 유도하기 위한 XVE 전사인자 (transcription factor) 유전자를 위치시켰다 (그림 4A). Cre 재조합효소의 발현은 O^{LexA} 프로모터에 의해 배지성분으로 포함시킨 동물호르몬 β -estradiol로 유도된다. 따라서 CLX 운반체

시스템에서는 kanamycin을 이용하여 선발된 형질전환체에서 생산된 종자를 β -estradiol이 첨가된 배지에서 발아시키면 발아과정에서 Cre가 활성화되어 두 *loxP* 인식부위가 절단의 결과로 선발표지유전자가 제거된 무선발표지 형질전환체를 얻을 수 있다. 선발표지 제거를 위해 애기장대 (Zuo et al. 2001), 벼 (Sreekala et al. 2005) 및 토마토 (Zhang et al. 2006)에 CLX 운반체 시스템이 적용되었다. 그러나 이 방법은 β -estradiol이 첨가된 배지에서 자란 식물체가 키메라가 될 가능성이 높고, 작물에 따라 선발표지 제거 효율의 차이가 크게 다르며, 영양번식식물에서는 사용하기 어렵다.

FLP/FRT : FLP 효소는 48 kDa 단백질로 두 *FRT* 인식부위에 4개의 FLP 단량체 (monomer)가 결합하여 *FRT*의 방향성에 따라 DNA의 절단과 역위를 촉매한다. *FRT* 인식부위는 13 bp의 염기서열이 정방향과 역방향으로 3회 반복되는 형태로 이루어져 있으며, 반복서열 사이의 8 bp 중간 구조에 의해 방향성이 결정된다. 최초 식물에서의 FLP/*FRT* 재조합 시스템의 기능보고는 벼와 옥수수 세포가 이용되었고 담배, 애기장대 등의 세포에서도 활성이 보고되었다 (Lyznik et al. 1993; Kilby et al. 1995; Sonti et al. 1995).

재조합 효소는 특이적 인식부위에 결합하여 기능을 수행하지만 *lox-FRT* 결합서열을 인식부위로 사용하면 FLP 또는 Cre 재조합효소에 의한 DNA 절단 효율이 극적으로 높아질 수 있다 (Luo et al. 2007). 또한 최근에 개발된 스트레스 유도성 FLP 발현 시스템은 (그림 4B) 형질전환 과정에 발생하는 스트레스나 화합물 (hydrogen peroxide) 처리에 의해 선택적으로 선발표지를 제거할 수 있어 선발표지 제거 과정이 간편하고 영양번식식물에도 사용할 수 있다 (Woo et al. 2009).

R/RS : R/RS 시스템은 *Zygosaccharomyces rouxii*의 pSR1 플라스미드에서 분리된 부위-특이적 재조합효소 시스템

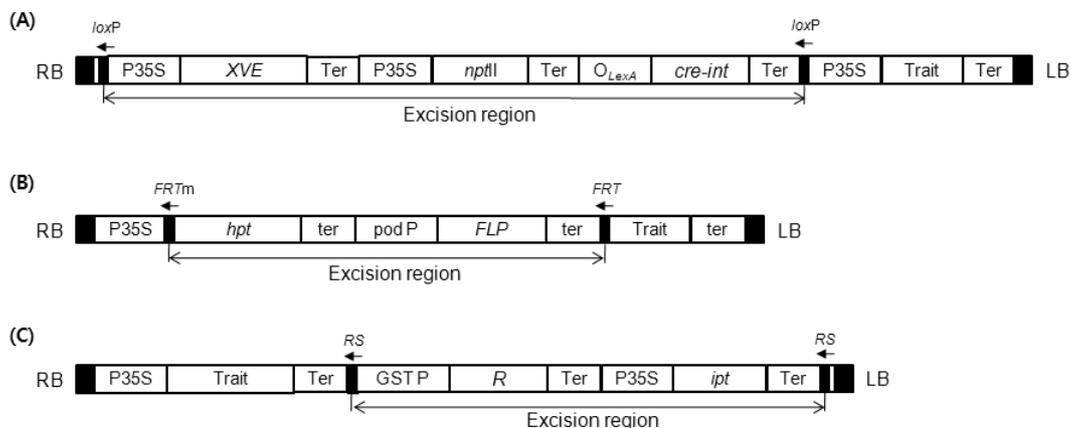


Fig. 4 Schematic diagram of the T-DNA regions of auto-excision vectors using the site-specific recombination system. (A) CLX vector system, (B) Stress-inducible marker-free vector system, (C) MAT vector system

으로 56 kDa R 재조합 효소와 두 개의 RS 인식부위로 구성되어 있다. R/RS 시스템은 담배와 애기장대에서 식물체 내 활성이 확인되었고 (Onouchi et al. 1991, 1995) 잘 알려진 선발표지 제거 시스템인 MAT (multi-auto transformation) 운반체 시스템에 적용되었다.

MAT 운반체 시스템은 두 개의 재조합효소 인식부위 RS 사이에 재조합효소 R 유전자와 식물의 비정상적인 표현형을 만드는 아그로박테리움의 종양인자 (oncogene) *ipt* (isopentenyl transferase) 유전자를 위치시켜 *ipt* 유전자를 선발표지로 이용한다 (그림 4C). 재조합효소 R 유전자의 발현은 화합물 safener에 의해 발현이 유도되는 GST (glutathione S-transferase) 프로모터에 의해 조절된다. MAT 운반체 시스템으로 식물체를 형질전환하면 사이토키닌 (cytokinin) 전구체를 만드는 *ipt* 유전자의 과발현으로 과다신초형질 (extra shooty phenotype)이 나타난다. 표현형이 비정상적인 형질전환 식물조직을 safener가 첨가된 배지에 옮겨주어 GST 프로모터의 활성을 유도하면 재조합효소 유전자 R이 활성화되어 두 개의 RS 인식부위가 절단되면서 *ipt* 유전자와 R 재조합효소 유전자가 모두 제거된 정상 표현형의 신초가 생산된다 (Sugita et al. 2000). MAT 시스템은 담배, 벼 (Sugita et al. 1999, 2000; Endo et al. 2002) 뿐 아니라 카사바, 감귤류, 포플러 등 다양한 식물에 적용되었다 (Khan et al. 2006; Ebinuma and Komamine 2001; Matsunaga et al. 2002; Zelasco et al. 2007; Ballester et al. 2007). 그러나 이 시스템 역시 선발표지 유전자의 절단이 일어난 조직에서 정상적인 신초의 생산 효율이 낮고, 재분화 시스템이 확립되지 않은 식물체에는 적용하기 어렵다.

비선발 형질전환에 의한 무선발표지 식물체 제조

비선발 형질전환 (non-selected transformation) 방법은 선발표지 유전자를 사용하지 않고 목표유전자를 식물체에 형질전환하고 목표유전자가 도입된 세포를 연쇄증합반응 (PCR)과 같은 직접 분석방법을 이용하여 식별하는 것이다. 비선발 형질전환 방법에 의해 현재까지 보고된 형질전환 식물 종은 감자와 담배로 한정된다 (De Vetten et al. 2003; Jia et al. 2007).

아그로박테리움 용액 침지 방법을 이용하여 제조된 무선발표지 감자의 형질전환 효율은 4.5%로 나타났다. 그러나 분석된 99개체 형질전환체 (T_0) 중 60개체에서 목표유전자와 함께 원하지 않은 운반체의 백본 (backbone) DNA가 발견되었고 단일 카피 (copy) 유전자 도입 형질전환체는 10개체에 불과했다 (De Vetten et al. 2003). 비선발 형질전환 방법을 담배에 적용한 경우 형질전환 효율은 1.2~2.8%로 매우 낮았으며 PCR로 선발된 T_0 개체의 단일 카피 형질전환체 비율은 약 33%였다 (Li et al. 2009). 이러한 결과는 단일 카피 무선발표지 형질전환체 10개체

를 얻기 위해서 운반체 DNA의 삽입위치나 백본 포함여부를 계산하지 않더라도 1,100~2,500 개체의 형질전환체 분석이 필요함을 의미한다.

현재까지의 기술수준에서 비선발 형질전환 방법에 의한 무선발표지 GM작물 개발은 쉽지 않아 보인다. 그러나 비선발 형질전환 방법은 무선발표지 형질전환체를 만드는 가장 이상적인 방법이며 최근의 기술향상 속도로 판단할 때 비선발 형질전환방법에 의한 상업화 GM작물의 개발도 멀지 않아 보인다.

결론 및 전망

현재의 경작자 위주의 선호형질인 해충 및 제초제 저항성 상업화 GM작물은 가까운 미래에 소비자 위주의 특성을 지닌 GM작물로 전환될 것이다. 소비자 위주의 GM작물은 단순히 소비자가 원하는 목적형질 뿐 아니라 무선발표지 작물제조와 같은 기술이 적용된 형태가 될 것이라 생각한다. 공동형질전환 방법과 Cre/lox 시스템을 이용한 교배 방법으로 선발표지를 제거한 MON89034와 LY038 GM 옥수수는 2005년과 2007년 미국 FDA의 승인을 얻어 이미 상업화된 바 있다. GM 작물 재배면적의 확대속도와 최근의 활발한 연구결과로 판단하면 앞에서 제시한 여러 방법을 이용한 무선발표지 GM작물의 상업화 속도는 더 빨라질 것으로 전망된다. 또한 형질전환 효율이 낮은 식물체내로의 접근도 분자생물학 연구와 형질전환 기술의 향상으로 가까운 시점에 가능할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 연구과제 (과제번호: 200901FHT020815367)로 수행되었습니다.

인용문헌

- An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79:568-570
- Ballester A, Cervera M, Peña L (2007) Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. *Plant Cell Rep* 26:39-45
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184-187
- Coppoolse ER, Vroomen MJ, Roelofs D, Smit J, Van Gennip F, Hersmus, BJM, Nijkamp HJJ, Van Kaaren MIJ (2003) Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations

- in plants. *Plant Mol Biol* 51:263-279
- Dale E, Ow D (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88:10558-10562
- Dale PJ, Clarke B, Fontes MG (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat Biotechnol* 20: 567-574
- Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, Turner JC (1998) Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep* 17:489-496
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1997) T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J* 11:15-29
- Depicker A, Herman L, Jacobs A, Schell J, Van Montagu M (1985) Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction. *Mol Gen Genet* 201:477-484
- De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, Van Der Meer I, Ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R (2003) A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol* 21:439-442
- Ebinuma H, Komamine A (2001) MAT (multiauto-transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:103-113
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K, Komamine A (2001) Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep* 20:383-392
- Endo S, Sugita K, Sakai M, Tanaka H, Ebinuma H (2002) Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system. *Plant J* 30:115-122
- Erickson O, Hertzberg M, Nasholm T (2004) A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol* 22:455-458
- Gamble J, Gunson A (2002) The New Zealand public's attitudes regarding genetically modified food: May and October 2001. HortResearch Client report No. 2003/35
- Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, Morris BAM (1999) Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of *cre* recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol* 40:223-235
- Goodwin J, Pastori G, Davey M, Jones H (2004) Transgenic plants: methods and protocols. *Methods Mol Biol* 286: 191-202
- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M and Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J* 2: 987-995
- James C (2009) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. ISAAA brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY
- Jia HG, Liao MJ, Verbelen JP, Vissenberg K (2007) Direct creation of marker-free tobacco plant from agroinfiltrated leaf discs. *Plant Cell Rep* 26:1961-1965
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen SG, Brunstedt J (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breeding* 4:111-117
- Jones JDG, Gilbert DE, Grady KL, Jorgensen RA (1987) T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol Gen Genet* 207:478-485
- Jorgensen R, Snyder C, Jones JDG (1987) T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol Gen Genet* 207:471-477
- Khan RS, Chin DP, Nakamura I, Mii M (2006) Production of marker-free transgenic *Nierembergia caerulea* using MAT vector system. *Plant Cell Rep* 25:914-919
- Kilby NJ, Davies GJ, Snaith MR, Murray JAH (1995) FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J* 8:637-652
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* 10:165-174
- Li B, Xie C, Qiu H (2009) Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Rep* 28:373-386
- Lloyd AM, Davis RW (1994) Functional expression of the yeast *FLP/FRT* site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 242:653-657
- Luo KM, Duan H, Zhao DG, Zheng XL, Deng W, Chen YQ, Stewart CN, McAvoy R, Jiang XN, Wu YH, He AG, Pei Y, Li Y (2007) 'GM-gene-deletor': fused loxP-FRT recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 5:263-374
- Lusk JL, Sullivan P (2002) Consumer acceptance of genetically modified foods. *Food Technol* 56:32-37
- Lyznik LA, Mitchell JC, Hiyarama L, Hodges TK (1993) Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res* 21:969-975
- Matsunaga E, Sugita K, Ebinuma H (2002) Asexual production of selectable marker-free transgenic woody plants, vegetatively propagated species. *Mol Breeding* 10:95-106
- Miki B, McHugh S (2004) Selective marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107:193-232
- Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y, Machida C (1995) Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 247:653-660
- Onouchi H, Yokoi K, Machida C, Matsuzaki H, Oshima Y,

- Matsuoka K, Nakamura K, Machida Y (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res* 19:6373–6378
- Ow, DW (2002) Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol Biol* 48:183–200
- Privalle LS, Wright M, Reed J, Hansen G, Dawson J, Dunder EM, Chang YF, Powell ML, Meghji M (2000) Phosphomannose isomerase-novel system for plant selection: mode of action and safety assessment. In: Fairburn C, Scoles G, McHughen A (Eds.) *Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. pp. 171–178
- Reed J, Privall L, Powell ML, Meghji M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Wenck A, Launis K, Kramer C, Chang YF, Hansen G, Wright M (2001) Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:127–132
- Russell SH, Hoopes JL, Odell JT (1992) Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol Gen Genet* 234: 49–59
- Schaart JG (2004) Towards consumer-friendly cisgenic strawberries which are less susceptible to *Botrytis cineres*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands
- Sonti RV, Tisser AF, Wong D, Viret JF, Signer ER (1995) Activity of the yeast FLP recombinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 28:1127–1132
- Sreekala C, Wu L, Gu Wang D, Tian D (2005) Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated CRE/loxP system. *Plant Cell Rep* 24:86–94
- Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma H (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J* 22:461–469
- Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H (1999) Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Rep* 18:941–947
- Woo HJ, Cho HS, Lim SH, Shin KS, Lee SM, Lee KJ, Kim DH, Cho YG (2009) Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible FLP/*FRT* site-specific recombination system. *Transgenic Res* 18:455–465
- Wu L, Nandi S, Chen L, Rodriguez RL, Huang N (2002) Expression and inheritance of nine transgenes in rice. *Transgenic Res* 11:533–541
- Zelasco S, Ressegotti V, Confalonieri M, Carbonera D, Calligari P, Bonadei M, Bisoffi S, Yamada K, Balestrazzi A (2007) Evaluation of MAT-vector system in white poplar (*Populus alba* L.) and production of *ipt* marker-free transgenic plants by ‘single-step transformation’. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 91:61–72
- Zhang Y, Li H, Ouyang B, Lu Y and Ye Z (2006) Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. *Biotechnol Lett* 28:1247–1253
- Zuo J, Niu QW, Ikeda Y, Chua NH (2002) Marker-free transformation: increasing frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Cur Opin in Biotech* 13:173–180
- Zuo J, Niu QW, Moller SG, Chua NH (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 19:157–161