

TgMTP1 과발현 애기장대에서 Nickel 흡수 연구

김동균

Studies on nickel uptake in transgenic *Arabidopsis thaliana* introduced with TgMTP1 gene encoding metal tolerance protein

Donggiun Kim

Received: 30 November 2015 / Revised: 9 December 2015 / Accepted: 9 December 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To enhance phytoremediation, which removes heavy metal from soil, transgenic plants were applied to contaminated soil. We constructed a transformation vector expressing both *TgMTP₁* (*T. goesingense* metal tolerance protein):HA and *TgMTP*:GFP genes. Transgenic plants were generated using an *Agrobacterium*-mediated transformation system that expressed the two vectors. Screening and analysis confirmed the incorporation of foreign genes into the *Arabidopsis thaliana* genome. Callus was induced in the 116 T3 line. These transgenic plants and calli were used for further analyses on the accumulation of Ni. The 116 T3-line plants and calli from selected lines were resistant to heavy metals and accumulated Ni in their leaves. The expression level of *TgMTP* RNA was equal in all leaves, but protein stability increased in the leaves with Ni treatment. According to these results, we suggest that *TgMTP₁*-overexpressing plants may be useful for phytoremediation of soil.

Keywords Transgenic plant, Phytoremediation, *Arabidopsis thaliana*, Heavy metals, Ni tolerance

서론

오염된 환경을 복원하는 기술의 개발은 미래의 인류 복지 증진에 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다. 토양 환경 오염은 농업생산성과 식품으로 변화되어 생명체의 건강

에 영향을 주기 때문에 토양정화는 중요한 과제이다. 오염된 토양환경복원에 여러 방법이 이용되고 있는데 그 중에서 생물학적 방법으로 미생물을 이용하여 오염 물질을 분해하는 방법, 그리고 식물을 사용하여 오염원을 제거하는 방법을 이용해왔다(Baker 1981; Etim 2012). 특정식물을 이용하여 오염물질들을 토양에서 제거하는 방법은 오염된 환경을 복구하기 위해 널리 사용하고 있다. 지금까지 식물정화공정에 사용하고 있는 식물은 해바라기, 포플러, 냉이, 물옥잠화, 고사리 등이 있다. 그러나 식물의 동일종 간에서도 서식지에 따라서 상당한 특이성 차이가 있고, 오염원과 활용 목적에 따라 적용이 다르기 때문에 식물 정화 공정에 필요한 식물은 지극히 부족하고 발굴하여 적용하기에는 상당한 비용과 시간이 필요하다. 최근 들어 이러한 단점들을 보완하기 위해 유전공학 기술을 이용하여 특정 유전자를 식물체에 도입하여 식물 정화공정에 부합하는 식물체를 만들려는 연구가 활발하다(Kupper 1999; Kramer 2005).

토양 내 오염원으로는 난분해성 유기화합물, 폐유, 중금속 등으로 식물정화공정에 사용하기 위한 많은 방법 및 적용 등이 알려져 있다(Kramer 2005). 중금속의 경우, 정화공정에 사용하려면 식물이 토양 내에 존재하는 중금속에 대한 저항성을 갖고 있으며, 그것을 식물체내에 가급적 많이 흡수 및 축적하여 활용하거나 비축용량이 클수록 유리 하다고 하였다(Etim 2012). 예를 들어 Zn, Ni, Co 등의 중금속은 미량원소로 토양 내 적정농도 이상이 되면 식물에 독성으로 작용하여 식물의 생육 및 발육을 할 수 없게 한다. 그러나 몇몇 식물체에서는 특별한 중금속이 고 농도 하에서도 식물 생장 및 발육에 전혀 영향을 주지 않으며, 식물 세포 내에 중금속을 축적 할 수 있는 능력을 갖고 있다. 이런 식물들 중에 중금속 제거 정화공정에 맞춤형식은 초본이면서 생육 조건이 평이하고 생체

Donggiun Kim (✉)
신라대학교 생명과학과
(Department of Biological Science, Silla University, Busan, 46958, Korea)
e-mail: botanist@silla.ac.kr

부피가 크면 클수록 많은 양을 제거 할 수 있는 이점을 갖는다(Salt 1998). 중금속 과축적종으로 알파인 페니크래스(*Thlaspi*) 종류가 잘 알려져 있다(Kramer 2005). 이들 중에서 *T. goesingense*은 여러 중금속을 제거하기 위해서 MTP (metal tolerance proteins) 유전자들의 분리 및 발현특성 등 중금속 흡수와 축적의 유용성에 대한 연구가 보고되었다(Persans 2001; Kim *et al.* 2004). 또한 식물체내 중금속 축적에 대해 *TgMTP₁* 유전자를 과발현 시킨 결과, 형질전환체의 세포내 액포에 흡수하여 중금속을 축적하고 있다고 하였다(Gustin 2009). 본 연구는 Gustin과 Kim(2009)에 의해 육성된 형질전환 후대 homo 계통을 이용하여 도입유전자가 안정적으로 발현하는 양상과 생육상 비교 및 세포내 중금속 흡수와 축적을 검토하여 중금속을 제거 할 수 있는 정확용 식물로의 사용 가능성에 대해 실험하였다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에 사용한 애기장대 종자(CS6000)은 애기장대 종자은행(<http://www.arabidopsis.org>)에서 분양 받아 수행하였다. 형질전환을 위해 사용한 종자는 70% EtOH로 표면 소독한 후, 1% 차염소산 나트륨 용액에 20분간 소독하였다. 그 후, 차염소산 나트륨을 제거하기 위해 멸균수로 5회 세척하고 MS (Murashige and Skoog) 기본배지에 파종하였다. 발아 2주 후, 식물체에서 callus를 유도하였으며, 또한 발아 6주 후 식물체를 형질전환을 위한 재료로 사용하였다.

형질전환 벡터 제작과 형질전환

식물 형질전환용 Ti-plasmid 벡터는 pCAMBIA 302-3을 이용하여 *TgMTP₁* 유전자를 CaMV35S 상시 발현 프로모터에 지배되도록 하였으며, 3 말단영역에 mGFP와 mHA를 연결하여 함께 발현 할 수 있도록 구축하였다(Gustin *et al.* 2009). 애기장대에서 형질전환에 사용한 *Agrobacterium* 균주는 105EHA를 사용하여 floral dipping방법(Weigel and Glazebrook 2002)으로 형질전환 하였다.

형질전환체 선발 및 RT-PCR 분석

형질전환에 의해 얻어진 T0 종자를 이용하여 Glyphosate ammonium (Pestanal; Sigma-Aldrich)을 처리하여 저항성 유무에 따라 형질전환체를 선발 한 후 T1 종자를 육성하였다. 도입유전자의 copy 수는 T1 종자를 파종하여 BSTA 처리에 의해 저항성을 보인 개체수의 비율을 계산하여 선발

하였다. 이렇게 선발된 식물체에서 T2 종자 및 T3 종자를 육성하였다. 도입유전자의 발현분석은 RT-PCR 분석에 의해 수행하였다. RT 분석에 사용한 primer set (Fw; 5' GAGA-GAAAGCTTATGGAGTCTTAAGGT 3', Rv 5'ATGAATTCT-TAGCGCTCGATTTGTAT3;)을 이용하여 PCR 분석을 수행하였다(Kim *et al.* 2004).

중금속 처리

중금속의 농도 별 식물생육 양상을 알아보기 위해 Cd, Co, Zn, Ni 등을 각각 25, 50, 150, 50 μ M 등의 농도가 함유된 MS 배지에서 생육시켰다(Kil and Kim, 2015). 발아 후 2주된 식물체로부터 callus 유도한 후, 중금속이 들어간 callus 유도배지에 계대배양하여 성장양상을 살펴보았다. 중금속 처리에 따른 생육양상을 살펴보기 위해, 미량원소가 함유된 수용액에 중금속을 처리하여 발아 후 6주된 어린 식물체의 2주간 생육상태를 조사하였다. 이들 실험은 3번 반복하여 실시하였으며 1번 실험에 10개체 이상 식물체를 사용하였다

GFP 분석

형질전환체의 선발 및 발현량 분석을 위해 구축한 Ti-plasmid는 *TgMTP₁* 유전자 3말단에 GFP 유전자를 fusion 시켜 발현을 유도하였다. GFP 이미지 촬영에 사용된 현미경은 TE2000 inverted microscope (NiKon Co)를 사용하여 500 nm 와 540 nm 형광 파장에서 촬영하였다.

결과 및 고찰

TgMTP₁ 유전자도입 형질전환 애기장대 후대에서 유전자 발현

식물발현용 Ti-plasmid 벡터(pCAMBIA 302-3)에 *TgMTP* 유전자를 재조합하여 형질전환체를 육성하고 GFP 발현 양상을 살펴본 결과, 형질전환체 앞에서 GFP 발현이 세포내에 아주 잘 발현하고 있었다(Fig. 1A). 또한 *TgMTP₁* 유전자가 homo 상태로 삽입되어 과발현하고 있는 T3 종자를 이용하여 Ni, Zn, H₂O, 토양에서 처리된 것에, 유전자의 발현분석을 실시한 결과는 Figure 2와 같다. 먼저 도입 유전자가 Ni, Zn, H₂O, 토양에서 처리된 것에 따라 mRNA로 전사되는지 여부는 RT-PCR 분석에 의해 실시한 결과, 모든 처리구에서 같은 양으로 발현되고 있었다(Fig. 2A). 또한 발현된 mRNA가 단백질로 번역되어 안전한 단백질로 되었는지를 western blot 분석을 실시한 결과 Ni 과 H₂O에서는 강한 signal을 보였다. 그러나 Zn 과 토양에 자란 처리구에서는 *TgMTP₁* 유전자의 발현량이 현저히 떨어졌

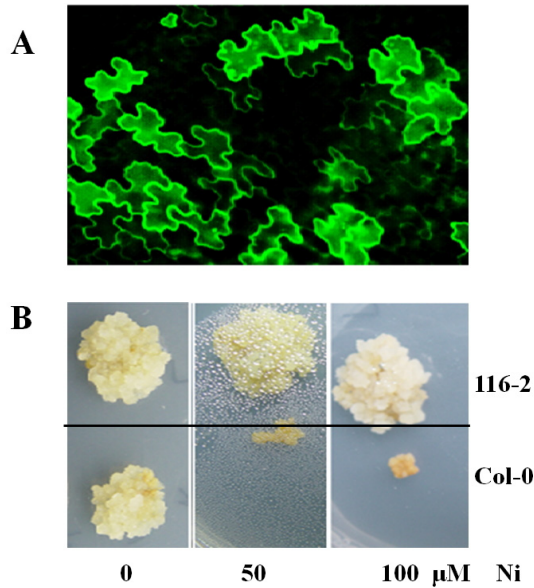


Fig. 1 A. Localization in TgMTP1:GFP-overexpressing transgenic plant leaves. B. Assay of 116-2 and Col-0 on plates treated with Ni after callus induction

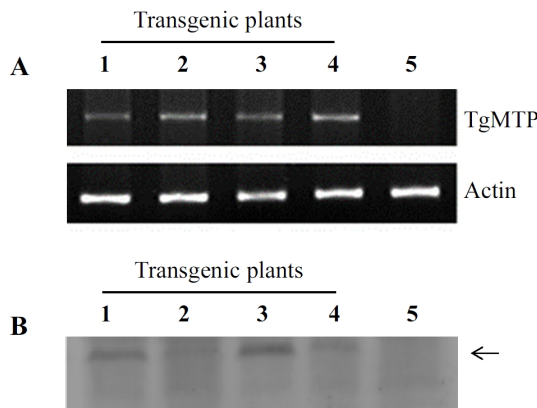
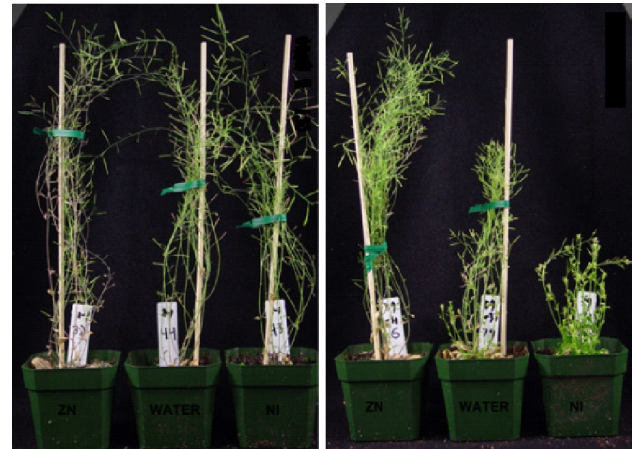


Fig. 2 Studies of protein stability using RT-PCR and Western blotting in 116-2 leaves treated with different chemicals and Col-0 leaves. Different treatment: 1.Ni 2.Zn 3.H₂O 4.Soil 5.Col-0

다(Fig. 2B). 이런 결과로부터 형질전환체에서 도입유전자가 안정적으로 발현은 하는데, posttranscription 조절과정에서 Zn 및 토양에 자란 처리가 영향을 미쳐 단백질화에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 이런 결과는 지금까지 보고된 많은 형질전환 식물체에서 보고되었다(Gustin *et al.* 2009).

형질전환 호모 계통에서 중금속에 대한 생육 반응

형질전환체의 T2 세대 종자로부터 발현양 및 도입유전자가 확인된 개체를 각각 파종한 후 도입한 유전자가 호모상태인 개체로부터 T3 종자를 육성하였다. 이들 T3 종자(이하 호모계통)를 이용하여 중금속의 생육상을 조사



Wild type plants (Col-0) Transgenic lines (TgMTP1::HA)

Fig. 3 Phenotypes of wild-type Arabidopsis (Col-0) and TgMTP1-overexpressing transgenic plants. Plant growth in soil culture treated with 5 ml 5 mM NiSO₄ (Ni) or 5 ml 10 mM ZnSO₄ (Zn) once a day for 2 weeks

한 결과 Figure 3과 같다. 표현형을 연구하기 위해서 대조 식물인 Col-0과 Ni 및 water에 발현되고 단백질활성이 뛰어난 식물체의 T3 line을 사용하여 여러 실험을 진행하였다. Col-0 애기장대 식물에 아연과 니켈을 처리하였을 때 식물체의 키 크기는 변화가 크게 없었지만 생육상태는 니켈을 처리했을 때 상당히 나빠졌다(Fig. 1). 하지만 57, 116 lines 식물체는 4종류의 중금속에 저항성을 나타내었으며 Zn와 Ni를 처리 했을 때는 식물체 키의 크기가 각기 다른 금속에 다른 결과가 나타났다. 57~31 line은 본 연구의 116 line과 비교를 위해서 사용되었다(Kil and Kim, 2015). 물만 처리했을 때는 성장상태가 문제가 되지는 않았고 신장 크기가 작았는데 반해 아연을 처리한 과발현 식물에는 성장이 촉진됨을 보인다(Fig. 1, 2). Tg MTP₁ 과발현 식물은 중금속을 처리하지 않을 때 10~15 cm 정도로써, 25~30 cm정도의 Col-0에 비해 작았다. Col-0의 생육상태를 성장크기로 살펴보면 저항상태가 약해져 황색현상과 마름증 현상을 보인다. 반면에 과발현 식물은 성장상태는 작지만 생육상태가 왕성하며 bolt의 수가 2배나 많았다(Fig. 2). Zn을 처리 했을 때는 Col-0와 차이가 없었지만 Ni를 처리 했을 때는 조금 더 작아졌다. bolt의 수는 Zn을 처리한 것 보다 Ni를 처리한 형질전환 식물체에서 급격하게 증가하였다(Fig. 2). 이 결과들은 중금속의 스트레스로 잘 자라지 못하는 Col-0 애기장대 식물에 비해서 형질전환체가 저항성을 보임을 입증하고 있다.

형질전환 호모계통에서 Ni 축적

형질전환 후대 호모계통을 이용하여 Zn, Ni 및 water 존재 하에서 생육시켜 얻어진 생체로부터 세포내 축적된 Ni

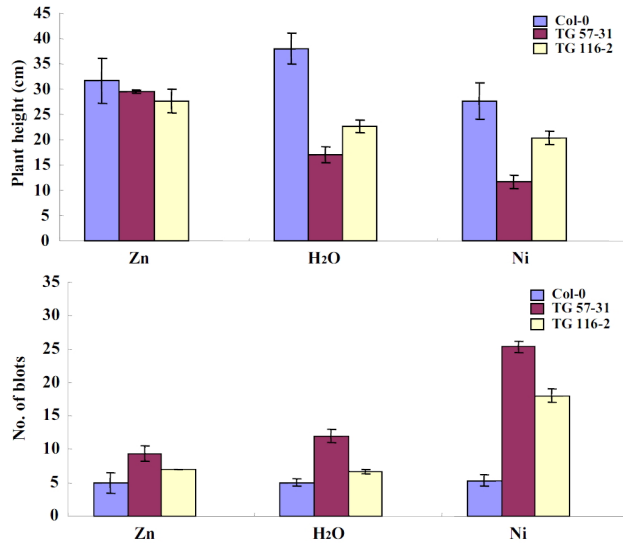


Fig. 4 Plant growth (cm) and number (#) of bolts in plants grown in soil culture treated with 5 ml 5 mM NiSO₄ (Ni) or 5 ml 10 mM ZnSO₄ (Zn) once a day for 2 weeks. TG and Col-0 represent TgMTP-overexpressing transgenic and Colombia (wild type) plants, respectively

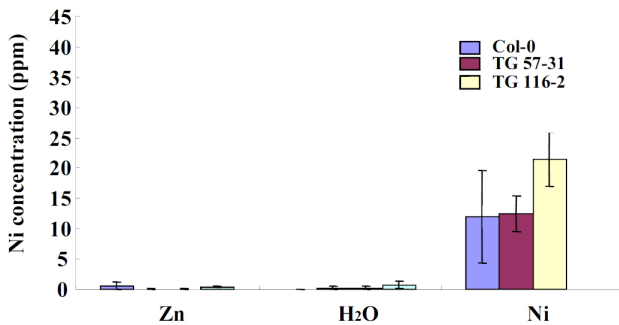


Fig. 5 Concentration (ppm) of Zn and Ni in flowers, leaves, and fruit in plants grown in soil culture after treatment with 5 ml 5 mM NiSO₄ or 5 ml 10 mM ZnSO₄ once a day for 2 weeks. TG and Col-0 represent TgMTP-overexpressing transgenic and Colombia (wild type) plants, respectively

함량을 측정된 결과 Figure 5와 같다. 식물체의 Ni의 축적은 Ni 함유 토양에서 자란 식물체에서만 검출되었다. 가장 많이 검출된 것은 형질전환체 호모계통 TG 116-2인데 22.3 ppm의 Ni가 검출되어 대조구 및 다른 형질전환 호모계통 TG 57-31에 비해 약 2배정도 많았다(Fig. 5). 이런 결과는 애기장대나 *Thlaspi goesingense* 둘 다 MTP1 유전자는 액포에 위치하여 중금속을 축적하는 결과라고 생각한다 (Kupper et al. 1999, 2000, 2004). 이러한 결과로부터 *TgMTP_i* 유전자가 꽃잎, 열매, 잎 등에서 되었음을 알 수 있다. 이들 중에서 다른 어느 기관보다 잎에서 많은 양이 관찰되었다(Fig. 1A). 잎에 많은 양이 발현되는 양상은 식물정화공정에서 활용할 수 있는 모델 식물에 부합하는 결과인데, 그것은 표면적이 넓은 잎이 많은 양의 중금속을 저장

할 수 있는 축적 능력을 보인다는 기존보고 같은 결과를 나타내었다(Salt 1998). 더구나 Gustin (2009)과 Kobae (2004)가 이 유전자는 액포에 위치하고 있다고 보고했고, 우리가 형질 과발현 시킨 이 변환체도 MTP1 유전자를 액포에 발현시킬 가능성이 크기 때문에 식물정화공정에 아주 유용하게 활용 가능성이 있다(Gustin et al. 2009; Kobae et al. 2004). 선별한 116-2 line의 식물체에서 잎을 사용하여서 성공적으로 callus를 유도하였고, MS media에 Cd, Co, Zn, Ni을 여러 농도를 첨가한 중금속 저항성 실험에서 116-2 호모계통 유래 callus는 4종류의 중금속에 저항성을 나타내었으며, 그 중에서 Ni은 다른 금속에 비해 저항성이 높았다. 이런 callus 실험결과는 식물의 초기 성장 단계에서 중금속의 저항성은 식물 성장을 연구하는데 도움을 줄 수 있다. 하지만, 식물정화공정을 위해서는 식물체에 축적되는 중금속의 농도가 높을수록 토양정화식물의 효율성을 높인다. 이상의 결과로부터 MTP1 유전자가 안정적으로 도입되어 발현된 형질전환 애기장대 식물체는 중금속에 의해서 발생하는 스트레스에 내성이 있음이 확인되었고 또한 중금속이 축적됨을 확인하였다. 여러 MTP family 유전자들이 안정적으로 도입되어 발현된 형질전환체를 만드는 전략으로 사용된다면 부족한 식물정화공정의 효율적 적용식물로 활용 될 수 있을 것이다. 결론적으로 본 연구는 토양환경을 정화하여 환경을 보존하기 위한 유용한 유전자원으로 고려하면 미래의 중요한 관련 기술로써 활용 가능성이 있다. 이런 결과에 생태학적 연구결과를 보강하고, 자연상태로 유출되었을 경우를 잘 고려해서 실제환경에 적용하는 실험을 철저히 할 수 있다면 자연 속에 무분별한 중금속 유출 문제에 대한 해결 방법 및 식물정화공정으로 활용가치가 있다고 사료된다.

적 요

본 연구는 토양에 오염된 중금속을 제거하기 위한 식물정화공정에 사용할 식물체를 개발하기 위해 *TgMTP_i* 유전자를 CaMV35S 상시 발현 할 수 있도록 Ti-plasmid 벡터를 구축하여 형질전환식물을 육성하였다. 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에서 *TgMTP* 유전자를 과발현하는 호모 TG-116 (T3 generation) 계통을 육성하여 그 특성을 조사하였다. 호모계통으로 육성한 TG-116 계통은 callus 및 식물체에서 중금속에 대한 저항성을 보였다. 특히 RT-PCR 및 Western 분석에서 유전자의 발현은 잎에서 높게 나타났으며, Ni 흡수 및 축적이 많이 일어났다. 따라서 MTP1 유전자가 발현되어 액포에 중금속을 축적하는 실험결과를 활용한다면 식물정화공정에 사용할 수 있는 다양한 유전자원으로 기대할 수 있다.

사 사

본 논문은 신라대학교 교내 연구비의 지원에 의한 결과로 수행되었다. 이 연구가 수행 될 수 있도록 기술적 지원을 해준 퍼듀 대학의 Dr. Salt 와 경상대 윤대진 교수에게 감사사를 드린다.

References

- Baker AJ (1981) Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3:643- 654
- Etim EE (2012) Phytoremediation and Its Mechanisms: *International Journal of Environment and Bioenergy* 2(3):120-136
- Gustin JL, Loureiro ME, Kim D, Na G, Tikhonova M, Salt DE (2009) MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *Plant J.* 57:1116-1127
- Kil EJ, Kim D (2015) Research of phytoremediation possibility using *TgMTP1* overexpressing plants. *Sungkyunkwan University Journal of Biotechnology and Bioengineering* 21:1-5.
- Kim D, Gustin JL, Lahner B, Persns MW, Baek D, Yun DJ, Salt DE(2004) The plant CDF family member *TgMTP1* from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* 39:237-251
- Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, Maeshima TM (2004) Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol.* 45:1749-1758
- Kramer, U (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:133-141
- Kupper H, Zhao FJ, McGrath SP (1999) Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 119:305-311
- Kupper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta,* 212:75-84
- Kupper H, Mijovilovich, A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH (2004) Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol.* 134:748-757
- Persans MW, Nieman K, Salt DE(2001) Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 98:9995-10000
- Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev.Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643-668
- Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis* A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.