

담배식물체에 PMT(Putrescine N-Methyltransferase) antisense RNA 유전자 도입

김선원 · 박성원* · 이정현 · 이청호 · 류명현 · 복진영 · 김도훈¹ · 최순용²
KT&G중앙연구원, ¹동아대학교 생명자원과학부, ²한남대학교 미생물학과
(2003년 5월 23일 접수)

Introduction of PMT(Putrescine N-Methyltransferase) Antisense RNA to Tobacco Plants

Sun Won Kim, Seong Weon Park*, Jeong Heon Lee, Cheong Ho Lee, Myong-hyun Ryu,
Jin Young Bock, Doh Hoon Kim¹ and Soon-Yong Choi²
KT&G Central Research Institute. ¹Faculty of natural resources and life science, Dong-A university,
Pusan 604-714. ²Department of microbiology, Hannam University, Daejeon 306-791.
(Received May 23, 2003)

ABSTRACT : Transgenic tobacco plants were selected by using the transformation of putrescine N-methyltransferase(PMT) gene, the key enzyme in diverting polyamine metabolism towards the biosynthesis of nicotine. PMT was fused in reverse orientation to the CaMV 35S promoter of the plant expression vector pBTEX(pPAB3) to produce tobacco plants of low nicotine content. To compare nicotine content, only pBTEX vector and PMT gene which was fused in forward orientation to the CaMV 35S promoter(pPAB2) were also transformed to the leaf tobacco plants(*Nicotiana tabacum* cv. NC82 and *N. tabacum* cv. Br21). The presence of sense- and antisense-PMT gene, and pBTEX vector in the transgenic plant was confirmed by genomic PCR.

Key words : transformation, tobacco plants, putrescine N-methyltransferase(PMT)

생물공학의 발달로 식물체 형질전환용 운반체 등을 이용하여 원하는 외부 유용유전자를 식물체로 도입하고 발현시킴으로써 식물체를 형질전환할 수 있게 되었으며(Herrera-Estrella *et al.*, 1983; An *et al.*, 1987), 또한 이러한 기술을 이용하여 특정 유전자의 발현을 감소시킬 수 있음이 밝혀져다(Hibi *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002).

Nicotine은 재배되는 담배나 다른 *Nicotiana* 종의 뿌리에서 발육상의 개시신호나, abiotic stress, 병원균등에 반응하여 합성되며(Hashimoto and Yamada, 1994; Kutchan, 1995, 1998; Ohnmeiss *et al.*, 1997; Baldwin *et al.*, 1997), PMT의 발현은 auxin에 의해 저해되고 jasmonic acid에 의해 자극된다고 알려졌다(Hibi *et al.*, 1994; Imanishi *et al.*, 1998).

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

PMT 외에 nicotine부터 유래한다. 따라서 putrescine의 N-methylation의 nicotinic acid moiety를 제공해주는 pyridine nucleotide cycle에서 entry-point enzyme의 역할을 하는 quinolinic acid phosphoribosyltransferase (QPT; Wagner and Wagner, 1985; Hashimoto and Yamada, 1993)나 (S)-scoulerine 9-O-methyltransferase(SMT)도 nicotine의 생합성 경로에 주요 효소로 관여하여 유전자원으로서의 활용 가능성 정도를 비교 조사하였으나 PMT가 key enzyme으로 알려졌다.

최근 특정 유전자를 antisense 방향으로 재조합하여 식물에 도입, 형질전환함으로써 특정유전자의 발현을 줄인 연구들이 발표되었다(Hibi *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002).

이미 nicotine 합성에 있어 key enzyme인 PMT의 유전자를 antisense 방향으로 재조합된 유전자를 *Nicotiana tabacum* xanthi에 도입하여 생엽수준에서 nicotine 함량을 줄인 연구결과가 국내에서 발표되었으며(Yang *et al.*, 1999), 본 실험에서는 이 유전자를 이용하여 다양한 원료엽에서 nicotine의 함량을 줄이기 위해 유전자를 확인하고, 원료엽으로 형질전환을 시도하였으며, PCR 방법을 이용하여 형질전환 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

균주는 대장균 DH5 α 와 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404가 사용되었으며 균증식을 위한 배지로는 LB배지(1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다.

식물체는 재배종 연초(*Nicotiana tabacum* cv. NC82, *N. tabacum* cv. NC567, *N. tabacum* cv. TC872 and *N. tabacum* cv. Br21)를 사용하였다.

2. Agrobacterium 균주에 재조합 유전자 도입 및 확인

PMT antisense RNA 유전자는 동아대학교 생명자원과학부 김도훈 교수님으로부터 분양받았으며 유전자의 확인 및 재배종 담배에 도입을 시도하였다. Freeze-thaw법(An *et al.* 1988)에 의하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404)에 plasmid

DNA를 도입시켰다. 즉, 50ml LB배지에 *Agrobacterium*을 가하여 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양한 후 얼음에 넣어 생각시키고, 3,000g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전된 cell을 20ml CaCl₂에 현탁시킨 후, 1.5ml microcentrifuge tube에 0.1ml씩 분주하여 -80°C에 보관하였다. 이 중 한 튜브에 1 μ g의 plasmid DNA를 첨가한 후 액체질소에 넣어 급냉시킨 다음 37°C 항온수조에서 5분간 배양 후, 1ml의 LB 배지를 첨가하고 28°C에서 4시간 배양하여 원심분리하였다. 30초 원심분리 후 상등액을 버리고 침전된 cell을 0.1ml LB 배지에 현탁하여 kanamycin(100 μ g/ml)이 함유된 LB 고체배지에 도말하여 28°C에서 배양하였다. 배양 후 48시간이 지난 뒤 형성된 colony를 LB km액체 배지에서 증식시켜 plasmid를 추출하였으며, DH5 α 로 back transformation하여 LB km배지에 도말하였고, 자라난 colony를 다시 LB km액체배지에 접종시켜 overnight 배양 후 같은 방법으로 plasmid를 추출하였다. Plasmid는 처음 cloning하였던 plasmid와 함께 *EcoRI*과 *HindIII*를 이용하여 같은 유전자인가를 확인하였다.

3. 연초 식물의 형질전환 및 재분화

연초 잎을 70% alcohol을 이용하여 30초, 1% sodium hypochloride를 이용하여 3분간 멸균 후 멸균증류수를 이용하여 세척 후 0.5×0.5(cm×cm)의 크기로 절단하여 MS 액체배지(Murashige & Skoog 1962)에 넣은 후, *Agrobacterium* 균주의 배양액 200 μ l를 넣고, 26°C 암조건에서 2일간 공동 배양한 뒤 멸균증류수로 6회 washing하여 *Agrobacterium* 균주를 잎으로부터 분리시키고 멸균종이로 물기를 제거 후, shoot 유도배지(MS medium containing 1.0mg/l BAP, 0.1mg/l NAA and 100mg/l kanamycin)로 옮겨 26°C 명조건하에서 배양하였다.

형질전환 연초를 4주 동안 shoot 유도배지에서 배양하여 나온 shoot와 callus를 멸균된 수술용 칼로 잘라내어 뿌리 유도배지(MS medium containing 300mg/l cefotaxim and 100mg/l kanamycin)로 옮겨 26°C 명조건 하에서 배양하였다. 4~8주정도 incubator에서 뿌리를 유도한 후, 뿌리가 유도된

형질전환 연초를 선별하여, 배지로부터 연초를 분리하고, 배지성분에 의한 박테리아 등의 성장을 막기 위해 뿌리에 묻어있는 배지성분을 완전히 제거시킨 후 화분에 옮겨 심었으며, 온실에서 2주 정도는 직사광선을 받지 않게 하고, 수분증발을 막기 위해 투명비닐로 덮어놓은 후, 2주 후부터 비닐을 벗겨내고, 빛을 받게 하였다.

4. 형질전환 연초의 유전자 도입 확인

형질전환 연초 식물체로부터 추출한 genomic DNA를 template로 한 genomic PCR에 의해 유전자의 도입여부를 확인하였다. Primer는 NOS terminator의 염기서열을 이용하여 제작하여 PCR에 이용하였고, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600을 이용하여 94℃에서 5분간 DNA를 denature 시킨 후, 94℃에서 30초간 denaturing, 56℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여 30 cycle 반응시킨 후, 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 재조합된 식물발현벡터 유전자 확인

클로닝된 PMT 유전자를 pBTEX vector의 CaMV35 promoter의 역방향으로 삽입하여 pPAB3를 재조합하였으며, 비교분석을 위하여 정방향으로 삽입하여 pPAB2를 재조합하였다. pBTEX, pPAB2와 pPAB3를 각각 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였으며, 다시 plasmid를 추출하여 제한효소 처리를 통해 *Agrobacterium* 균주내로의 형질전환이 정확하게 된 균주를 선별하였다. pBTEX의 CaMV promoter의 앞쪽에 *EcoRI* site가 있고, Ocs-ter 뒤쪽에 *HindIII* site가 있으며, 또한 PMT 유전자의 시작부위에 *EcoRI* site가 있다. 따라서 CaMV promoter의 역방향으로 삽입된 pPAB3의 경우 *EcoRI*으로 plasmid를 절단하였을 때에 1.7kb의 절편이 나오게 되고, 반면에 정방향으로 삽입된 pPAB2의 경우에는 0.7kb의 절편이 나오게 됨을 이용하여 삽입방향을 확인하였다. 확

인을 위해 *Agrobacterium* 균주내로 형질전환하기 전의 plasmid와 형질전환 후 추출한 plasmid를 같이 제한효소 처리하여 비교하였다.

pBTEX와 형질전환 후 추출한 pBTEX-3의 경우 *EcoRI*이나 *HindIII*로 각각 절단하였을 때에는 single cutting되어 plasmid만이 나타났고(lane 3~6), *EcoRI*과 *HindIII* 두 enzyme을 같이 처리하였을 때에는 0.8kb의 절편(lane 7 and 8)이 나타났다(Fig. 2).

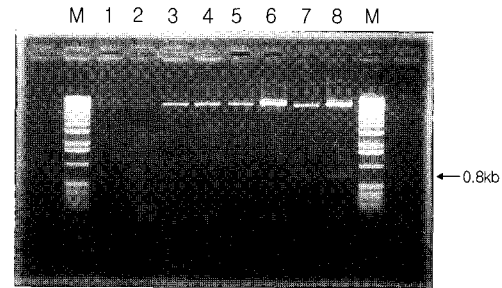


Fig. 2. Electrophoresis analysis of pBTEX and pBTEX-3 digested with restriction enzymes. M, 1kb marker; Lane 1, pBTEX; Lane 2, pBTEX-3; Lane 3, pBTEX/*EcoRI*; Lane 4, pBTEX-3/*EcoRI*; 5, pBTEX/*HindIII*; 6, pBTEX-3/*HindIII*; Lane 7, pBTEX/*EcoRI/HindIII*; Lane 8, pBTEX-3/*EcoRI/HindIII*

CaMV35 promoter의 정방향으로 삽입하여 재조합한 pPAB2와 형질전환 후 추출한 plasmid인 pPAB2-3을 *EcoRI*으로 절단하였을 때 pBTEX vector와 PMT 유전자 내에 있는 *EcoRI* site에 의해 0.7kb의 절편이 나타났고(lane 3 and 4), *HindIII*의 경우 single cutting 되었다(lane 5 and 6). *EcoRI*과 *HindIII* 두 enzyme을 처리하였을 경우에는 0.7kb와 1.4kb 두 절편(lane 7 and 8)이 나타났다(Fig. 3).

CaMV35 promoter의 역방향으로 삽입하여 재조합한 pPAB3와 형질전환 후 추출한 plasmid인 pPAB3-4와 pPAB3-5를 *EcoRI*으로 절단하였을 때 pBTEX vector와 PMT 유전자 내에 있는 *EcoRI* site에 의해 1.7kb의 절편이 나타났고(lane 4~6), *HindIII*의 경우 single cutting 되었다(lane 7~9).

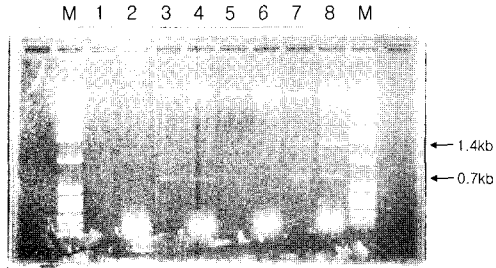


Fig. 3. Electrophoresis analysis of pPAB2 and pPAB2-3 digested with restriction enzymes. M, 1kb marker; Lane 1, pPAB2; Lane 2, pPAB2-3; Lane 3, pPAB2/*EcoRI*; Lane 4, pPAB2-3/*EcoRI*; Lane 5, pPAB2/*HindIII*; Lane 6, pPAB2-3/*HindIII*; Lane 7, pPAB2/*EcoRI/HindIII*; Lane 8, pPAB2-3/*EcoRI/HindIII*

*EcoRI*과 *HindIII* 두 enzyme을 처리하였을 경우에는 1.7kb와 0.4kb 두 절편(lane 10~12)이 나타났다(Fig. 4).

제한효소 처리 결과 pBTEX-3, pPAB2-3, pPAB3-4와 pPAB3-5 유전자가 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 제대로 형질전환되었음을 확인하였고, 각 균주를 이용하여 연초의 형질전환

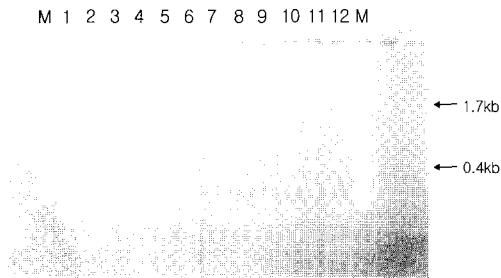


Fig. 4. Electrophoresis analysis of pPAB3, pPAB3-4 and pPAB3-5 digested with restriction enzymes. M, 1kb marker; Lane 1, pPAB3; Lane 2, pPAB3-4; Lane 3, pPAB3-5; Lane 4, pPAB3/*EcoRI*; Lane 5, pPAB3-4/*EcoRI*; Lane 6, pPAB3-5/*EcoRI*; Lane 7, pPAB3/*HindIII*; Lane 8, pPAB3-4/*HindIII*; Lane 9, pPAB3-5/*HindIII*; Lane 10, pPAB3/*EcoRI/HindIII*; Lane 11, pPAB3-4/*EcoRI/HindIII*; Lane 12, pPAB3-5/*EcoRI/HindIII*

에 이용하였다.

2. 형질전환된 연초의 선발

유전자 확인이 끝난 pBTEX-3, pPAB2-3, 그리고 pPAB3-5를 갖고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하여 다양한 잎담배 연초품종(NC82, NC567, TC872 and Br21)에 각각 형질전환을 시도하였다.

암조건으로 26°C에서 2일간 형질전환하려는 유전자를 갖고있는 *Agrobacterium* 균주와 공동 배양시킨 잎조직을 멸균 증류수로 washing 후, shoot 유도배지에 치상하여, 명조건으로 26°C에서 shoot를 직접 유기하였다(Fig. 5).

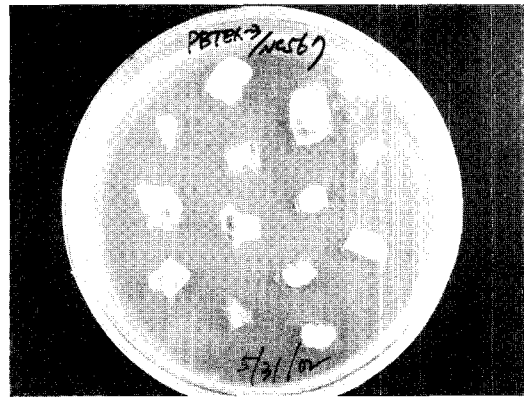


Fig. 5. Regeneration of shoots from NC567 tobacco leaf containing pBTEX-3 on shoot-induction medium.

4주~6주 동안 shoot를 유도한 후, 유도된 shoot와 callus부분을 잘라내어 뿌리 유도배지로 옮겨 심었고, 그 중 뿌리가 유도된 형질전환체(Fig. 6)를 배지의 영양분으로 인한 박테리아 등의 오염을 막기 위해 뿌리로부터 배지를 완전히 제거한 후 화분에 옮겨서 생장시키고 있다(Fig. 7).

현재 유전자가 antisense 방향으로 클로닝된 pPAB3 유전자가 형질전환되어진 6개의 NC82, sense 방향으로 클로닝된 pPAB2 유전자가 형질전환되어진 4개의 NC82, 그리고 pBTEX 벡터 유전자가 형질전환되어진 2개의 Br21이 온실에서 생장

중이며, pPAB3 유전자와 pPAB2 유전자가 각각 형질전환되어진 Br21이 배양실에서 뿌리가 유도되어지고있다.

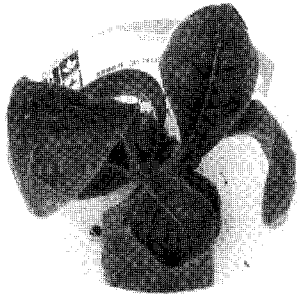


Fig. 6. Regeneration of roots from NC82 tobacco leaf containing recombinant plasmid pPAB3 on root induction medium.

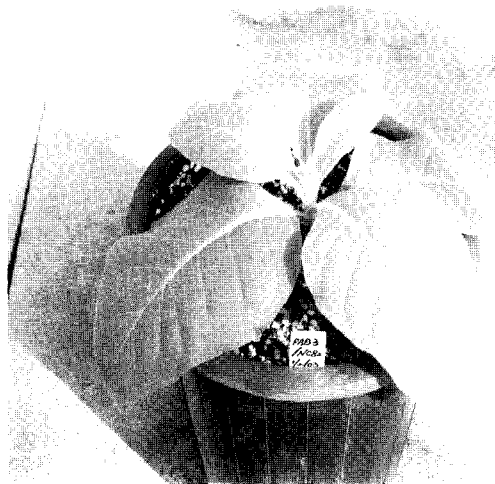


Fig. 7. Transgenic tobacco plant containing recombinant plasmid pPAB3 in green house

3. 선발된 형질전환 연초에서 유전자 확인

온실과 배양실에서 성장중인 형질전환 연초의 잎으로부터 DNA를 추출하여 NOS terminator의

sequence를 이용한 primer를 가지고 genomic PCR을 수행하였다. 그 결과 pPAB2/NC82-1,2,4, pPAB3/NC82-1,4,5,6, pBTEX/Br21-1,2, pPAB2/Br21-1, 그리고 pPAB3/Br21-1,2, 총 12개의 형질전환 식물체에 유전자가 각각 도입되었음을 확인하였다 (Fig. 8).

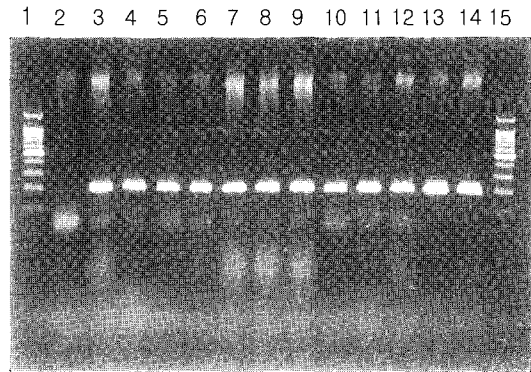


Fig. 8. Electrophoresis analysis of genomic PCR amplified fragment to confirm transformation. Lane 1, 15, 100bp ladder; Lane 2, NC82; Lane 3, pPAB2/NC82-1; Lane 4, pPAB2/NC82-2; Lane 5, pPAB2/NC82-4; Lane 6, pPAB3/NC82-1; Lane 7, pPAB3/NC82-4; Lane 8, pPAB3/NC82-5; Lane 9, pPAB3/NC82-6; Lane 10, pBTEX/Br21-1; Lane 11, pBTEX/Br21-2; Lane 12, pPAB2/Br21-1; Lane 13, pPAB3/Br21-1; Lane 14, pPAB3/Br21-2.

결 론

담배의 원료엽에서 nicotine 함성정도를 조절하기 위하여 니코틴 생합성에 관여하는 putrescine N-methyltransferase(PMT) 효소의 유전자를 식물 형질전환용 벡터인 pBTEX plasmid에 유전자 재조합하여 담배의 형질전환을 시도하였다. PMT 유전자의 조절을 위해 PMT 유전자를 CaMV 35S promoter의 역방향으로 삽입한 pPAB3 유전자를 연초에 형질전환하였으며, 비교분석을 위해 벡터인 pBTEX와 CaMV 35S promoter의 정방향으로 삽입한 pPAB2 유전자를 각각 연초에 형질전환하였다. pPAB2유전자가 형질전환된 NC82가 3개,

pPAB3 유전자가 형질전환된 NC82가 4개, pBTEX 유전자가 형질전환된 Br21이 2개, pPAB2 유전자가 형질전환된 Br21이 1개, 그리고 pPAB3 유전자가 형질전환된 Br21 3개가 NOS terminator의 염기서열내에서 제작한 primer를 이용한 genomic PCR을 통하여 형질전환되었음이 확인되었다. 이 중 유식물체의 pPAB3/NC82-1 과 NC82의 앞에서 각각 니코틴 함량을 분석하였으나 큰 차이를 나타내지 않았다(Data not shown). 그러나 이 결과는 니코틴 함량이 가장 높은 성숙기에 측정된 것이 아니므로 니코틴 함량을 확정할 수가 없고, 재종 후 2세대 식물체에서 다시 측정을 해야 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 추후 *N. tabacum* cv. NC567와 *N. tabacum* cv. TC872에 유전자를 형질전환할 계획이며, 형질전환체의 니코틴 함량을 계속 조사할 예정이다.

참 고 문 헌

- 양선경, 정상훈, 정대수, 최용락, 윤대진, 김도훈 (1999) 형질전환 담배에서 Antisense PMT 유전자의 발현. *한국육종학회지* 31(3); 239-245.
- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153; 292-305.
- Baldwin, I. T., Z.-P. Zhang, N. Diab, T. E. Ohnmeiss, E. S. McCloud, G. Y. Lynds and E. A. Schmelz (1997) Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 201; 397-404.
- Hashimoto T. and Y. Yamada (1992) Tropane alkaloid biosynthesis : regulation and application. In Pro. 7th Annu. Ponn. state Symp. Plant Physiol. Rockville : Am. Soc. Plant Physiol. Press. 122-134.
- Hashimoto, T. and Y. Yamada (1993) Nicotine and tropane alkaloids. In *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 9, P. J. Lea, ed(London: Academic Press), p. 369-379.
- Hashimoto, T. and Y. Yamada (1994) Alkaloid biogenesis : molecular aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45; 257-285.
- Herrera-Estrella L., M. Dipicker, M. Van-Montagu and J. Schell (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303; 209-213.
- Hibi N., S. Higashiguchi, T. Hashimoto and Y. Yamada (1994) Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *The Plant Cell* 6; 723-735.
- Hibi N. (1994) Biochemical and molecular analysis of putrescine N-methyltransferase in plants, Doctoral Thesis, Kyoto university.
- Kutchan, T. M. (1995) Alkaloid biosynthesis : the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 7; 1059-1070.
- Kutchan, T. M. (1998) Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In:G.A. Cordell (Ed.), *The alkaloids, chemistry and biology*, Academic Press, San Diego, p. 295-304.
- Leete, E. (1980) Alkaloids derived from ornithine, lysine, and nicotinic acid. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series 8, E.A. Bell and B.V. Charlwood, eds (Berlin: Springer-Verlag), p. 65-91.
- Ohnmeiss, T. E., E. S. McCloud, G. Y. Lynds and I. T. Baldwin (1997) Within-plant relationships among wounding, jasmonic acid, and nicotine: implications for defence in *Nicotiana sylvestris*. *New Phytol.* 137; 441-452.
- Park S., M. Yu and P. J. Facchini (2002) Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California Poppy. *Plant Physiology* 128; 696-706.
- Sato, F., T. Hashimoto, A. Hachiya, K. Tamura, K. Choi, T. Morishige, H. Fujimoto and Y. Yamada (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl.*

담배식물체에 PMT(Putrescine N-Methyltransferase) antisense RNA 유전자 도입

Acad. Sci. USA. 98; 367-372.

Smith, T. A. (1981) Amines. In the biochemistry of plants. P. K. Stumpf and E. E. Conn, eds(London: Academic Press), 7; 249-268.

Wagner, R. and K. G. Wagner (1985) The pyridine-nucleotide cycle in tobacco enzyme activities for the de novo synthesis of NAD. *Planta* 165; 532-537.