

14장. 식물 형질전환기술의 이용

1절. 유전자 클로닝

어떤 생물의 DNA 단편을 다른 생물에 주입시켜 외래 DNA의 유전형질이 발현되는 현상을 형질전환(transformation)이라고 한다. 이러한 형질전환기술이 식물세포에 적용된 것은 1984년 이었지만 그 후 급속히 발전하여 식물 육종의 새로운 한 분야가 되었다. 전통적인 방법에 의해 작물의 품종개량을 해오던 육종기술 분야는 1980년대에 들어서면서 커다란 변혁기를 맞이하게 된다. 토양 미생물 중 자연 상태에서 식물세포로 감염능력이 있는 *Agrobacterium*의 존재를 발견하였고, 생물체 내에 있는 유전자를 제한효소를 사용하여 재조합 할 수 있는 기술이 개발되었기 때문이다. 이러한 미생물체의 새로운 능력의 발견과 유전자 재조합 기술의 개발은 형질전환 식물체를 생산하는 과정에 접목되면서 농업적 측면에서 매우 중요한 새로운 식물 품종을 탄생시키게 되었다. 식물세포에 새로운 유전자를 전이 시킴으로써 새로운 식물체, 즉 형질전환체를 만들어 낼 수 있게 된 것이다. 더욱이 최근 들어 식물분야에서 유전체학(genomics)이 발달하면서 생명공학의 원재료라고 할 수 있는 유전자의 대규모 발굴이 가능하게 되었고, 이러한 유전자의 확보와 기능 연구결과는 작물, 화훼, 나무 등 전 식물분야에 걸쳐 직접 응용되어 새로운 유용 형질을 부여한 품종들이 개발되고 있다. 식물형질전환 기술은 작물의 육종과 관련하여 기존의 전통적인 육종 방법을 넘어서는 새로운 방법으로 분자육종의 도입을 가능하게 하였고 아울러 미래의 농업분야의 핵심기술로 자리 잡게 되었다.

1) 유전자 클로닝

mRNA로부터 역전사 시킨 cDNA 등 유전정보를 지니고 있는 DNA 단편이나 식물체의 전체 DNA를 제한효소로 절단시킨 Genomic DNA를 플라스미드, 박테리오파지 등 유전자 운반체인 vector에 부착시켜 박테리아나 기주세포에 도입한 다음 박테리아나 세포의 증식과 더불어 도입한 특정 유전자를 대량 증식시키는 것을 유전자 클로닝이라고 한다. 유전자 클로닝은 cDNA 클로닝과 Genomic DNA 클로닝으로 구분한다.

① 유전자 클로닝 및 유전자 은행 제작

cDNA 클로닝은 특정 형질이 발현되는 조직에서 mRNA를 추출하고, mRNA를 주형으로 하여 역전사효소(reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 합성한다. cDNA를 제한효소로 절단하고 동일 제한효소로써 플라스미드나 박테리오파지 등의 유전자 운반체를 절단하여 절단된 cDNA 단편과 용액 내에 두면 cDNA와 운반체 DNA간에 재조합 DNA가 형성된다. 이들 재조합 DNA를 보유한 운반체를 박테리아에 삽입시킨 다음 증식된 플라스미드를 분리하면 cDNA가 대량 증식되어 cDNA 유전자 은행(cDNA library)이 작성된다. 어떤 생물체의 DNA를 제한효소로써 절단하여 DNA 단편을 유전자 운반체에 부착시킨 후 재조합 DNA를 박테리아에 삽입시켜 증식시킨 일련의 재조합 DNA를 게놈 DNA 유전자 은행(Genomic DNA library)이라고 한다. 게놈 DNA 유전자 은행은 유용 유전자를 가지고 있는 것도 있고, 유전 정보가 없는 것도 있어서 유용 유전정보를 지니고 있는 것을 탐색하기 어렵지만, cDNA 유전자 은행은 대부분 유용한 정보가 있으므로 유전자 조작 시 효율적으로 이용할 수 있다. 유전자 운반체로는 대장균 또는 *Agrobacterium*에서 분리한 플라스미드, λ-박테리

오과지, 꽃양배추모자이크바이러스 등이 있으며 목적에 따라 다양하게 이용한다.

② 유전자 확인

재조합 DNA를 삽입하여 증식시킨 수많은 박테리아 클론 중에서 목적 유전자를 보유하고 있는 것을 식별하는 방법으로 항생제 저항성 유무로써 식별하는 방법과 동위원소로 표시된 DNA단편을 잡종화(hybridization)시켜 필름 감광 여부로써 식별하는 방법 등이 있다. 항생제 저항성 유전자를 가진 운반체와 재조합된 DNA를 보유한 클론(clone)은 항생제가 함유되어 있는 배지에서 저항성을 보이므로 쉽게 식별된다. 유전자 삽입을 시도한 다음 배양한 박테리아군에서 DNA를 추출하여 목적 유전자와 상보적인 염기서열을 가진 DNA단편을 동위원소로 표시시켜 잡종화시키면 목적 유전자, 즉 외래의 재조합 DNA를 가진 부위는 X-선 필름에 감광되므로 식별할 수 있다.

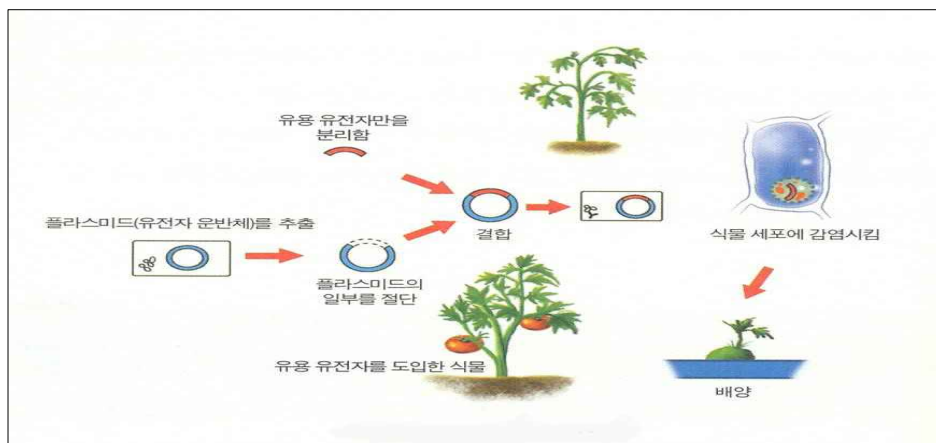
2절. 형질전환방법

식물에 있어서 외래유전자를 도입하여 발현이 보고된 것은 1984년의 일이다. 그 이후 불과 몇 년 되지 않지만 이제 유전자 도입은 유전공학에서 뿐만 아니라 식물의 연구와 작물육종에서 가장 중요한 기술의 하나가 되었다. 형질전환기술은 세포배양기술의 이용이 전제되고 있는데, 형질전환법을 이용하여 작물을 개량하기 위해서는 첫째, 유용 유전자의 선정 및 분리, 둘째, 분리된 유전자의 재조합, 셋째, 재조합된 유전자의 식물세포내로의 전이, 넷째, 형질전환세포의 선발 및 임성 식물체의 재생의 단계를 거쳐야 하는데 여러 가지 유전공학 기법이 종합적으로 적용된다. 여러 생물체로부터 유전자은행 제작에 의하여 대량 확보된 유전자를 식물체에 도입시켜 외래 유전자의 형질을 발현시키는 방법은 여러 가지가 있다.

① Agrobacterium 이용

식물형질전환은 원하는 형질을 지닌 목적 유전자를 대상으로 하는 식물의 유전체에 안정적으로 도입하는 것이 관건이다. 유전자를 안정적으로 도입하기 위하여 여러 가지 방법이 사용되었고 많은 식물의 종들이 성공적으로 형질전환 되었다. Agrobacterium을 매개로 하여 유전자를 도입하는 방법은 가장 널리 이용되는 형질전환 방법이며, 특히 쌍자엽 식물을 형질전환 시키고자 할 때 보편적으로 사용하고 있다. 기술 개발 초기에는 Agrobacterium 이용법을 사용하여 단자엽 식물에서 형질전환 식물체를 얻어내는 데는 다소 어려움이 있었으나, 최근 들어서는 다양한 형질전환 방법 및 조건이 지속적으로 개발되어 이제는 단자엽 식물도 Agrobacterium 이용법에 의한 형질전환이 일반화 되었다. Agrobacterium 이용법은 토양 내에 존재하는 미생물인 Agrobacterium을 유전자 도입에 이용하는 방법이다. 외래 유전자가 식물내로 도입되는 현상은 자연 상태의 Agrobacterium tumefaciens에서 볼 수 있다. Agrobacterium은 포도, 호두, 사과, 장미 등의 작물 뿌리와 줄기의 경계부에 근두암종병(crown gall disease)을 일으키는 원인균으로서 그람음성균이며, 막대 모양으로 근권(rhizosphere)에서 발견되는 운동성이 있는 토양세균이다. Agrobacterium은 식물 뿌리에서 분비되는 영양분에 의존하여 살아가는 박테리아 미생물이다. 이 미생물은 토양 속의 양분이 부족해지면 식물에 침투하여 기생하는 특성을 가지고 있는데, 이 때 자신이 가진 플라스미드 DNA의 일부(T-DNA라고 불리는 부분)를 절단하고, 이 유전자를 식물의 유전체 내에 도입하여 성장조절제와 아미노산을 만들도록 한다. 식물체의 줄기 혹은 뿌리에 크라운 골

(crown gall)이라는 비정상적인 혹이 생기는 이유는 Agrobacterium의 유전자가 식물체에 옮겨져 식물 성장조절에의 작용에 의해 세포분열이 촉진되기 때문이다. 이처럼 자신의 유전자 중 일부를 식물에 옮기는 현상을 알아낸 과학자들은 유용한 유전자를 Agrobacterium을 이용하여 식물에 도입하려 했다. 우선 플라스미드 중에 크라운 골을 만드는 유전(T-DNA 영역)를 제거한 후, 그 부분에 목적으로 하는 유용 유전자를 연결시킨다. 그리고 유용 유전자를 가진 플라스미드를 Agrobacterium에 집어넣고, 이 Agrobacterium을 식물세포에 접촉, 감염시켜 목적하는 유용유전자를 식물세포의 염색체에 끼워 넣어 유용 유전자를 가진 형질전환체를 만들게 된다. 이렇게 외래 유전자인 유용 유전자가 도입된 형질전환체는 항생제를 이용하고 조직배양 방법을 통해 선발과정과 재분화 과정을 거친 다음 완전한 형질전환 식물체가 된다. Agrobacterium 이용법에 의한 몇 가지 형질전환 방법은 대부분 유사한데, 최근에는 Agrobacterium에 의한 유전자 도입 효율을 높이기 위해 감염성이 높은 Agrobacterium 균주를 사용하고, 플라스미드의 구조를 변경하거나 복제수를 높이는 방법 등이 시도되고 있다. 그리고 또한 Agrobacterium과 식물조직을 공동 배양하는 여러 조건을 연구 검토하여 보다 진보된 방법들이 속속 개발되고 있다. 현재까지 개발되어 알려진 여러 가지 유전자도입 방법 중 가장 안정적이고 확실한 방법으로 인식되어 있으며, 또한 대부분의 경우에서 가장 바람직한 방법으로 권장되고 있다. 처음에는 Agrobacterium을 이용한 형질전환은 주로 쌍자엽 식물에 적용되었지만, 벼를 비롯한 단자엽 식물의 형질전환에도 광범위하게 이용되고 있다. Agrobacterium을 이용한 형질전환은 다른 방법과 비교해 보면 비교적 정상적인 형질전환개체가 많이 발생한다.

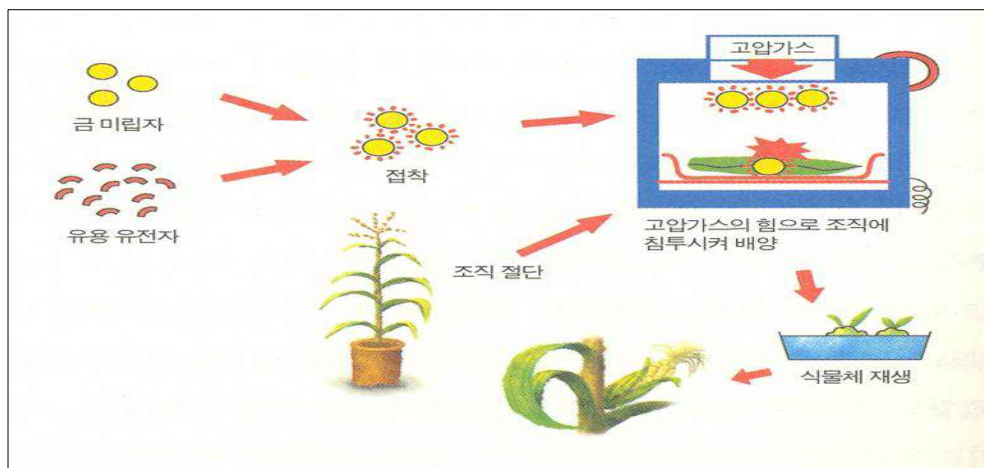


<그림 1. Agrobacterium을 이용한 형질전환>

② 유전자총(입자충격법)

입자충격법은 유전자를 직접 도입하기 위해서 가장 효과적으로 쓰일 수 있는 형질전환 방법이다. 1987년에 처음으로 개발된 이 시스템은 주로 화본과 작물에 외래 유전자를 도입하여 형질전환체를 생산하기 위하여 이용되었으며, 본격적인 상업화의 측면에서 최고의 형질전환 작물인 해충저항성 옥수수가 이 기술을 통하여 생산되었다. 이 방법은 유전자총(Bombardment, Biolistics)을 이용하여 텡스텐이나 금분말과 같이 입중이 무거운 물질에 유전자클로닝기법으로 대량 증식시킨 DNA 단편을 묻혀서 강한 충격으로 배양세포·배어린 식물체 등에 강제로 주입시켜 형질전환을 유도하는 방법이다. Biolistics particle delivery system(그림3)은 헬륨 가스에 의하여 rupture disk에 압력이 높아지게 되어서 rupture

disk가 파열되어 헬륨가스가 금 또는 텅스텐 입자와 DNA를 코팅한 macrocarrier를 쳐서 맞추게 되면 금 또는 텅스텐 입자는 macrocarrier로부터 분리되어 stopping screen을 때리게 되고 또한 아래쪽의 목표 조직을 향하여 고속으로 질주하게 된다. 이 방법은 유전자를 특별한 벡터에 클로닝 할 필요가 없어 빠른 시간 내에 결과 확인가능하고, 핵으로 뿐만 아니라 엽록체로도 유전자 삽입 가능하여 많은 연구자들이 사용하고 있다. 또 동시에 2종류 이상의 유전자를 도입시킬 수도 있다. 하지만 Agrobacterium의 이용에 비해 삽입된 유전자의 안정성이 떨어져서 비정상적인 개체가 많이 발생한다. 최근에는 세포의 핵 내에서의 형질전환이 아니고, 색소체내에 유전자를 도입하기 위해 사용한다.



<그림 2. 유전자총을 이용한 형질전환>

③ 바이러스 이용

꽃양배추모자이크바이러스(CaMV) 담배모자이크바이러스(TMV) 등의 식물바이러스가 유전자운반체로 이용하기도 하고, 담배모자이크바이러스의 경우에는 외피단백질을 이용하기도 한다. 바이러스를 이용한 유전자 운반체는 바이러스의 특성상 일단 식물세포 내에서 발현이 되면 인접세포들로 급격히 퍼져 나갈 수 있는 관계로, 성숙한 식물체라도 한 번의 감염에 의해 대부분의 세포로 새로운 유전자의 도입 및 발현이 이루어질 수 있다. 이 방법은 외래 유전자의 식물 내로의 삽입은 동반되지 않는 관계로 종자를 통한 다음 세대로의 유전은 기대할 수 없다. 식물 바이러스를 개조한 유전자 운반체의 개발은 RNA를 genome으로 가지고 있는 바이러스의 경우에는 일단 RNA를 역전사효소 (reverse transcriptase)등을 이용하여 이중나선의 DNA로 변형 시킨 후 사용되며, 이중나선의 DNA를 가지고 있는 바이러스의 경우는 직접 유전자 재조합 과정을 시행하여 변조됨으로써 사용될 수 있다. 단일 DNA 가닥을 가지고 있는 바이러스는 DNA 중합효소를 이용하여 이중가닥 DNA 구조로 만든 후 유전자 재조합 과정이 수행 된다. 식물 바이러스는 유전자 재조합 과정을 거쳐 목표하는 유전자가 삽입된 후 DNA의 형태로 또는 in vitro transcription system을 이용하여 감염력이 있는 전사체로 만들어진 후 사용되든지, 또는 Agrobacterium의 식물체 형질전환체를 이용하여 일단 식물체에 도입된 후 바이러스의 성질을 다시 찾아 식물체의 목표 유전자의 효율적인 발현을 유도할 수 있다. DNA 형태의 또는 DNA화된 식물 바이러스가 외래 유전자를 가지고 Agrobacterium을 이용한 식물 형질전환 시스템의 binary vector에 삽입되어 식물체내로 도입되는 과정을 Agroinfection 과정이라 통칭한다. Agroinfection 과정은 식물 바

이러스 유전자 운반체가 가지고 있는 특성인 단기간 내의 식물체 전체의 형질전환 가능성을 최대한 살릴 수 있는 기법으로, 도입된 유전자가 종자의 형성과정을 통해 다음 세대로 유전되는 장점도 가지고 있다.

④ 전기충격법(Electrophoration)

식물을 형질전환 시키기 위하여 세포에 전기 충격을 주어 DNA를 식물 세포나 원형질체에 주입하는 방법을 전기충격법 또는 원형질체 융합법이라고 한다. 이 방법은 Agrobacterium 이용법에 의해 유전자 도입이 잘 되지 않지만 원형질체 배양에 의해 재분화가 가능한 식물에 사용한다. 식물세포의 세포벽을 제거하고, 원형질체만을 분리하여 도입 목적의 DNA와 함께 수용성 완충액에 넣고 순간적으로 강하고 짧은 전류를 흐르게 그 충격으로 DNA가 원형질체내로 들어가게 하는 방법이다. 동시에 2종류 이상의 유전자를 도입시킬 수 있다. 전기충격법은 주로 벼, 밀, 옥수수 등의 화분과 작물의 형질전환에 많이 이용되고 있다. 이 방법은 조직배양에 따른 문제를 감소시킬 수 있으나 전기충격을 위해 사용되는 목적 조직을 고농도의 삼투압 용액에 전기 충격 전후 배양을 해야 한다. 전기충격법에 의한 형질전환 기법은 최적 조건에서도 세포로 도입되는 DNA의 양이 매우 적어서 소수의 복제 도입 유전자를 가진 형질전환체를 생산한다는 장점이 있다.



<그림 3. 전기충격을 이용한 형질전환>

⑤ 직접주입법

현미경에 부착되어 있는 미세 주입기에 목적하는 DNA용액을 넣고 세포 내로 주입하는 미세주입법(microinjection), 비교적 굵은 관을 이용하여 다량의 유전자를 식물의 조직에 주입하는 다량주입법(macroinjection) 등이 있다. 미세주입 기법은 동물체의 핵과 세포질과의 상호 연관성을 연구하기 위한 노력으로 핵의 치환을 시도함으로써 처음 생물현상 연구에 이용되기 시작했다. 미세주입 기법은 현미경에 부착된 미세조작기 (micromanipulation)를 이용하여 매우 가늘게 뽑은 유리 모세관을 통해 소량의 물질을 세포의 특정 부위에 주입하는 과정으로써 동물체의 형질전환에는 널리 이용되는 기법이다. 식물체의 경우에는 세포벽이라는 두꺼운 장벽이 매우 가는 유리 모세관의 침투를 막는 관계로 세포벽이 제거된 원형질체를 사용하여야 하는 어려움이 있다.

⑥ PEG 이용

Polyethylene glycol(PEG)은 매우 강한 흡수력을 가지고 있으며, 고농도의 PEG용액에 세포가 위치되면 세포막의 변성을 가져와 순간적으로 PEG 수용액에 첨가되어 있는 DNA가 세포 내로의 전달이 이루어져 원형질체 내로 삽입될 수 있다. 식물세포의 경우는 역시 원형질체가 대상이 되어야 하며 이 방법의 어려운 점은 유전자의 식물세포 원형질체 내로의 도입이 아니라 원형질체로부터 식물체 재분화에 있다. Protoplast transformation 방법은 원하는 식물의 특정 조직으로부터 Protoplast를 분리하여 PEG를 매개로 DNA를 삽입하는 방법으로, Transient expression을 활용한 assay 방법이다. 이 assay의 장점은 형광단백질을 이용함으로써 target proteins의 localization 쉽게 알 수 있으며, 다양한 protein inhibitor 처리를 통한 그 효과 분석에 적합하다. 또한 조작이 쉽고 간편하며, 비용이 적고 in vivo assay라는 장점을 가지고 있다.

⑦ Liposome

지질(lipid) 용액을 DNA나 RNA의 수용액에 떨어뜨리면 지질간의 소수성 작용(hydrophobic interaction)에 의하여 DNA나 RNA 수용액을 소량 함유한 lipid vesicle(liposome)이 형성된다. DNA나 RNA를 함유한 liposome은 화학적 성질이 원형질막과 유사하기 때문에 원형질체와 융합을 이룰 수 있으며 또는 미세주입법에 의하여 식물세포의 특정 내부기관(예, 액포)으로 주입될 수 있다.

⑧ Imbibition 방법

건조한 종자, 특히 배(embryo) 부위를 DNA 수용액에 담그면 DNA가 건조한 세포내로 빨려 들어가며 그 결과로 염색체 내로 외래 유전자의 도입이 가능성을 두고 실험이 이루어졌고 일부의 성공 사례가 보고되었으나, 다른 연구진들에 의하여 반복 되지 않음이 확인되어 다른 많은 수의 잘못 보고된 형질전환체들과 같이 실험과정의 실수로 판단되고 있다. 식물체의 건조한 조직을 대상으로 외래 유전자를 도입하고자 하는 시도는 식물 세포벽을 DNA가 통과할 수 없음을 간과한 착상이라고 판단된다.

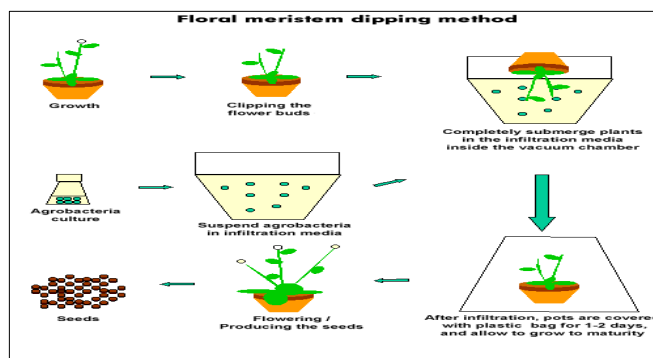
⑨ Pollen-tube pathway 방법

식물체는 수분과정에서 화분(pollen)의 핵이 통과하는 화분관(pollen tube)이 형성되어 정자가 난자와 접합이 가능하게 된다. 이와 같은 현상에 근거하여 화분관이 형성되고 있는 암술의 윗 부위를 절단하고 접합자에 도입하고자하는 목표 유전자 용액을 적용함으로써 화분관을 통한 유전자의 전달이 시도되어 성공 사례가 보고되었으나 반복성 여부가 확실시 되지 않다. 화분관은 비워 있는 공간이 아니라 callose로 급속히 채워지는 관개로 DNA 용액이 통과할 여유가 별로 없을 것으로 판단된다.

⑩ In-planta transformation

일반적으로 식물의 형질전환은 조직배양 기술을 바탕으로 발달해 왔으나 조직배양을 이용한 경우 재분화(regeneration) 기간이 길어 시간과 노력이 많이 요구되는 단점이 있고, 재분화 과정에서의 체세포 변이 또는 자연적인 기형 형성이 나타나는 등의 심각한 문제점이 제기된다. In-planta transformation 기술은 조직배양을 거치지 않고 식물이 성장하는 상태 그대로 성장점 부위에 위치하는 세포들을 형질전환 시킨 후, 형질전환된 세포로부터 재분화하는 줄기에서 형질전환된 종자를 획득하여, 유전적으로 안정된 형질전환 식물체를 획득할

수 있는 기술이다. 이 기술은 1990년에 최초로 개발되어 국제적인 관심을 끌었으며 이것을 근간으로 하는 파생기술로서, 진공을 이용한 형질전환법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(Floral meristem dipping method), 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method) 등의 비조직배양 기술이 개발되다. 이러한 방법은 단시간 내에 다수의 형질전환체를 확보할 수 있고, 사용하는 유전자 운반체(vector)의 종류에 따라 다양한 유전자 분리법을 활용할 수도 있다.



<그림 4. 침지법(dipping)을 이용한 형질전환 >

3절. 형질전환식물체의 식별

① 항생제 저항성 검정

유전자 운반체 플라스미드에 항생제 저항성 유전자 npt II 를 표지로 사용하고 있으므로 재조합 DNA를 갖는 형질전환체는 항생제 저항성을 가지게 된다. kanamycin이 함유되어 있는 배지에서 배양하면 형질전환개체, 즉 npt II 유전자 보유 개체는 저항성을 보이고 형질전환 되지 않은 개체는 죽게 된다.

② β-glucuronidase(GUS) 활성 검정

대장균에서 유래한 uidA 유전자를 가진 플라스미드운반체를 형질전환에 이용하면 형질전환 된 식물체는 β-glucuronidase(GUS) 효소의 활성을 나타낸다. GUS효소는 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide(X-Glu)와 반응하면 청색을 나타낸다. 형질전환을 시도한 캘러스(callus)나 식물체를 X-Glu 용액으로 반응시키면 형질전환 된 부위나 개체는 청색을 나타내어 쉽게 형질전환체를 식별할 수 있다. 또한, 형광물질 4-methyl umbelliferyl glucuronide(MUG)로 형질전환을 시도한 캘러스나 식물체를 반응시키면 형질전환 된 부위나 개체는 형광성을 나타낸다. GUS효소의 활성으로 형질전환식물체를 식별하는 방법이 가장 많이 이용된다.

③ Southern blot 검정

형질전환을 시도하여 획득한 식물체의 게놈 DNA를 제한효소로써 절단하고 agarose gel 상에서 전기영동을 시킨 다음 나일론 천에 Southern blot 방법으로 옮긴다. 거기에 방사능으로 표지된 uidA 유전자로 잡종화시켜서 X-선 필름에 감광시키면 형질전환된 식물체는 감광되고 형질전환 되지 않은 식물체는 감광되지 않는다.

④ 기타 방법

식물체의 neomycin phosphotransferase, chloramphenicol acetyltransferase 등의 효소 활성검정이나 단백질발현검정 등의 방법이 있다.