

Agrobacterium tumefaciens Spheroplast의 연초엽육 Protoplast내 도입에 관한 세포학적 연구*

영남대학교 의과대학 생화학교실

김정희 · 구용범 · 이기영

서 론

*Agrobacterium tumefaciens*는 쌍자엽 식물에 있어서 식물암(crown gall)을 야기시키는 토양균이다¹⁾이 식물암은 *A. tumefaciens*가 가지고 있는 T₁ (tumor inducing) plasmid의 T-DNA (transferred DNA)가 식물의 chromosome에 integration 되어져 발생하게 된다^{2,4)} 이러한 성질을 이용하여 T₁ plasmid는 외래성 유전자를 식물세포에 도입시킬 수 있는 vector로 사용되고 있다.^{5,6)} *A. tumefaciens*는 식물의 상처조직을 통하여 감염되어지므로 인위적으로 만든 상처조직에 배양한 *A. tumefaciens*를 접종하여 crown gall을 유도할 수 있다^{7,8)}

한편 근래에는 bacterial spheroplast 혹은 유전물질을 임의로 인공 liposome속에 넣어 외래성 gene vector 등을 사용하여 숙주 protoplast의 형질전환(transformation)이 가능하며 이러한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 식물의 protoplast는 cell organelle, 외래성 유전물질(DNA, RNA) 및 미생물 등을 쉽게 받아들일 수 있는 특성이 있고 이러한 특성과 식물세포의 totipotency 성을 함께 이용하면 단일 clone의 식물체를 만들 수 있다. protoplast는 세균 등의 미생물과 같이 단일세포로 취급할 수 있으며, 유전적 조작의 결과를 세포 수준에서 혹은 단일 clone의 배양조치 수준에서 정성적 및 정량적으로 확인할 수 있는 등, 여러 가지 유리한 점이 많다. *A. tumefaciens*

에 의한 protoplast의 형질전환 방법은 protoplast와 *A. tumefaciens*를 같이 배양한 후에 *A. tumefaciens*를 제거시키는 co-cultivation방법⁹⁾과 polyethylene glycol (PEG) 혹은 polyvinyl alcohol (PVA) 등의 fusogen을 이용한 *A. tumefaciens* spheroplast에 의한 형질전환 방법¹⁰⁾이 있다. 몇몇 연구자들은 polyethylene glycol (PEG)을 이용하여 호모¹¹⁾, 세균¹²⁾ 그리고 cyanobacteria¹³⁾와 같은 미생물을 식물 protoplast 내부로 도입시키는 것을 시도한 바 있다. 또 Schaffner¹⁴⁾(1980)와 Sandri-Goldin 등¹⁵⁾(1981)은 polyethylene glycol (PEG)을 이용하여 cloned gene을 갖고 있는 bacterial spheroplast를 동물세포로 도입 시켰을 때 형질전환이 일어남을 관찰한 바 있으나 세포학적인 증거도 없이 polyethylene glycol (PEG)을 protoplast의 fusogen으로 사용하였던 까닭에 동물세포와 bacterial spheroplast 사이에 fusion이 일어난다고 하였다.

최근 Hasezawa 등¹⁶⁾(1983)은 *Vinca rosea*의 suspension culture protoplast와 *A. tumefaciens* spheroplast를 polyethylene glycol (PEG) 혹은 polyvinyl alcohol (PVA)로 처리하였을 때 spheroplast가 fusion이 아니라 endocytosis에 의해 protoplast 내부로 도입 되어 진다는 증거를 보고한 바 있다.

본 실험에서는 *A. tumefaciens* ATCC 15955의 spheroplast와 연초엽육(mesophyll tissue) protoplast를 polyethylene glycol (PEG, M. W. 4000)으로 처리하여 *A. tumefaciens* spheroplast의 도

*본 연구는 1985년도 영남대학교 의과대학 기초학연구소 연구비 보조로 이루어졌음

입이 endocytosis에 의한 것임을 전자현미경으로 관찰하였으며 그 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Protoplast는 태양직사광선이 없는 상태에서 키운 연초 (*Nicotiana tabacum*)의 엽육 (mesophyll tissue)으로부터 분리하였으며, spheroplast 제조에 사용된 *Agrobacterium tumefaciens*는 American Type Culture Collection (USA, ATCC)15955를 구입 사용하였다. protoplast분리에 사용된 효소인 Cellulase Onozuka RS 및 Macerozyme R-10은 Yakult Pharmaceutical Co. Ltd. (Japan)에서 구입하였고, lysozyme과 polyethylene glycol (PEG, M. W. 4000)은 Sigma의 제품을 사용하였다. 전자현미경용 시료제작에 사용된 특수시약들은 모두 전자현미경용을 사용하였고 그 외의 모든 시약은 시판 특급시약을 사용하였다 전자현미경용 초절박편 (thin section)은 Sorvall Ultramicrotome을 사용하여 만들었으며 Hitachi (H-600) transmission electron microscope로 관찰하였다.

2. 방법

(1) 연초엽육 protoplast의 분리

Protoplast는 연초엽육 (mesophyll tissue)으로부터 one-step (direct procedure)¹⁷⁾으로 분리하였다. 신선한 연초잎을 잘라서 70% ethanol에 10초 동안 담근후 멸균 재증류수에 3분간 두었다가 20% sodium hypochlorite에서 15분간 멸균시키고 멸균 재증류수로 3회 세척하였다. 핀셋을 사용하여 lower epidermis를 벗기고 MS (Murasnig and Skoog, 1962)¹⁸⁾ salts용액에 1% Cellulase Onozuka RS, 0.5% Macerozyme R-10, 0.7M mannitol, pH 5.6이 되도록 만든 효소용액에 잎의 벗겨진 면이 효소용액의 표면에 닿도록 띄워서 30°C에서 3시간 incubation하였다. 효소용액 1g당 잎의 양이 1g이 초과되지 않도록 하였다 광학현미경으로 protoplast의 생성을 확인한 뒤 60 mesh stainless체로 여과하여 얻은 여과액을 75×g에서 5분간 원심분리 하였다. protoplast pellet을 소량 (0.5~1 ml)의 washing medium (0.7M mannitol in MS salts)에 재분산

시켜 20% sucrose cushion에 얹은 다음 50×g에서 10분간 원심분리 시켰을 때 sucrose층 위에 녹색의 떠를 이루어 모인 protoplast를 pasteur pipette로 조심스럽게 들어내어 washing medium으로 2~3회 세척한 후 실험에 사용하였다 또한 본 실험에서는 protoplast의 분리과정을 관찰하기 위해 two-step (sequential procedure)¹⁹⁾ 방법을 사용하여 protoplast를 분리하였다.

(2) *Agrobacterium tumefaciens* spheroplast의 제조

*Agrobacterium*의 spheroplast는 Hasezawa 등¹⁰⁾ (1981)의 방법을 수정하여 제조하였다. *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 15955)를 TY배지 (0.6% trypton, 0.3% yeast extract)에서 30°C로 진탕 배양하여 logarithmic phase에서 항생제 carbencillin을 500mg/ℓ 되게 첨가하여 90분간 더 진탕배양 후 집균하였다. Lysozyme용액 (0.04%, lysozyme, 10M EDTA, 10mM Tris, pH 6.0 in 0.4M sorbitol)에 분산시켜 30°C에서 2시간 incubation하여 spheroplast를 만들고 전자 현미경 시료를 제작하여 transmission electron microscope로 관찰하였다.

(3) *Agrobacterium tumefaciens* spheroplast의 protoplast내 도입

Hasezawa 등 (1981)¹⁰⁾의 방법에 따라서, 균 spheroplast를 식물세포 protoplast에 도입시켰다. 10ml들이 시험관에 약 10⁸개의 protoplast와 약 10⁸개의 spheroplast를 넣어 0.5ml 부피가 되게 섞은 다음 동량의 40% polyethylene glycol (PEG, M. W. 4000)을 방울방울 떨어뜨려 최종농도가 20% 되게 섞어서 30°C에서 10분간 incubation한 후 일부를 전자현미경용 시료제작 방법에 따라 처리하였다. Polyethylene glycol (PEG)처리후 10ml의 glycine-NaOH buffer (high pH-high Ca²⁺ buffer, 50mM glycine, 50mM CaCl₂ in 0.4M mannitol, pH 10.5)로 1회 세척후 동일 buffer 10ml에 재분산시켜 30°C에서 20분간 둔 다음 전자현미경으로 관찰하였다.

(4) Electron Microscopy

Spheroplast와 incubation한 protoplast를 Fukunaga 등²⁰⁾ (1983)이 개발한 one-step 과정에 의해 고정하였다. 고정액은 2.5ml의 0.2M cacodylate, pH 7.2, 0.3g sucrose, 2.5ml의 8% glutaraldehyde, 5ml의 4% O₃O₂ 용액을 차례대로 섞어

서 만들고 시료를 이 고정용액으로 노랑색이 없어질때까지 반복하여 세척한 다음 동일 고정용액에 분산시켜 얼음 위에서 4시간 동안 두어 고정하였다.

고정된 protoplast는 2% agar에 매몰시켜 1 mm³의 크기로 자른 다음 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% ethanol에서 각각 10분씩 탈수시키고 무수acetone에서 20분간 두어 용제치환시켰다. Epon resin에 탈수된 시료를 매몰시켜 초절 박편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 transmission electron microscope로 관찰하였다

성 적

(1) 연초엽육 protoplast의 분리

One-step방법으로 protoplast를 분리하였을 경우 엽육조직 1g에 대하여 2×10⁶개 이상의 protoplast를 회수할 수 있었다 two-step방법으로 protoplast를 분리하기 위해 0.5% macerozyme을 처리했을 때 cell wall이 벗겨지지 아니한 엽육세포가 떨어져 나왔으며 (Fig. 1), 이 엽육세포를 1% cellulase로 처리했을 때 protoplast가 생성되었다. 분리된 protoplast는 chloroplast가 세포의 전체 표면에 고르게 분포하고 있어서 진강한 것으로 보였다 (Fig. 2).

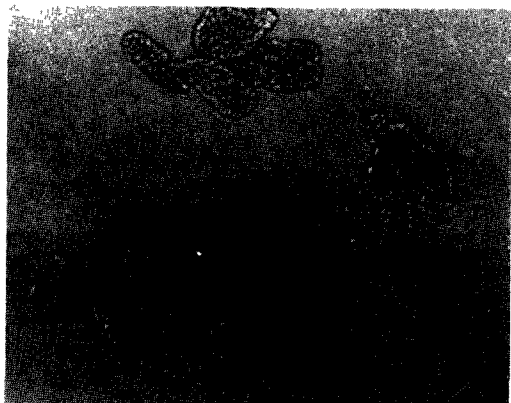


Fig. 1. Intact mesophyll cells isolated by treatment with 0.5% Macerozyme Onozuka R-10 in 0.7 M mannitol containing MS salts, pH 5.8, for 2 hrs at 30°C. The middle lamella layers were digested by the enzyme and the cells were liberated from the leaf tissue (400 X).

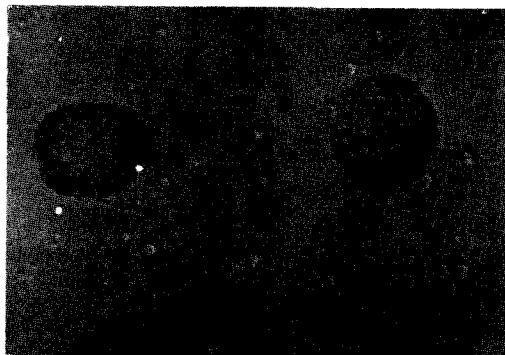


Fig. 2. Protoplasts isolated by direct (one-step) procedure: leaf tissue was treated with 1% Cellulase Onozuka RS, 0.5% Macerozyme R-10 in 0.7 M mannitol containing MS salts, pH 5.6, for 3 hrs at 30°C (400X).

(2) *Agrobacterium tumefaciens* spheroplast의 제조

항생제 carbenicillin을 배양배지에 넣지 않으면 spheroplast가 거의 만들어지지 않았다. 이러한 현상은 *Agrobacterium tumefaciens* A277에서도 관찰된 바 있다.¹⁰⁾ carbenicillin 및 lysozyme 처리후 대부분의 bacteria가 outer membrane이 부분적으로 제거된 spheroplast로 변하였다 (Fig. 3).

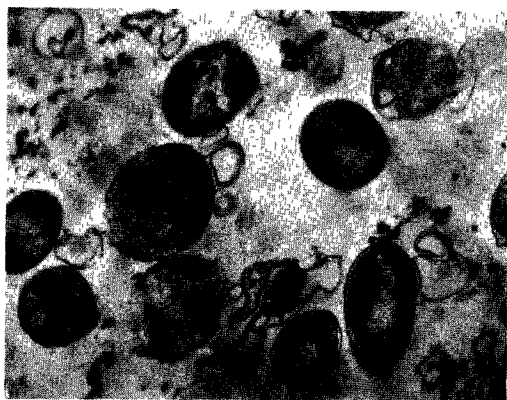


Fig. 3. Observation of bacterial spheroplasts. Note that the outer membrane fragments were released forming membrane vesicles (20,000 X).

(3) spheroplast의 protoplast내 도입

Polyethylene glycol (PEG)에 의해 유도된 spheroplast와 protoplast사이의 상호작용을 관찰한

것으로 (Fig. 4~7) 초기단계에서는 protoplast membrane에 spheroplast가 단단히 부착하였고 (Fig. 4), 시간이 경과함에 따라서 protoplast의 membrane이 반입됨과 동시에 spheroplast가 protoplast의 세포질 내부로 도입되는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5~6). Polyethylene glycol (PEG) 처리후 high pH-high Ca^{2+} (glycine-NaOH buffer) 로 처리하여 20분간 incubation시킨 다음 전자현미경으로 관찰하여 도입된 spheroplast의 변화를 조사하였다. Protoplast의 세포질 내부로 도입된 spheroplast는 점차로 세포구조가 파괴되어지는 것으로 관찰되었다 (Fig. 7).

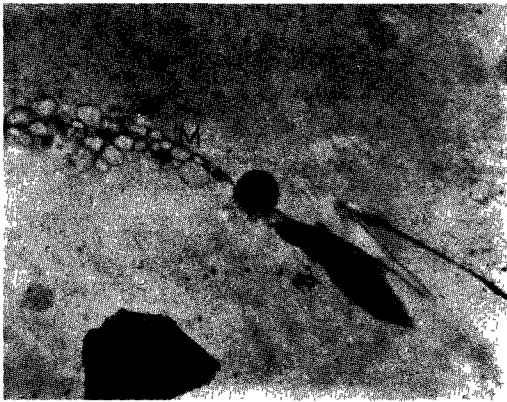


Fig. 4 Initial stage of spheroplast uptake. A spheroplast is seen adhering to the protoplast membrane (10,000 X).
M: protoplast membrane, S: spheroplast

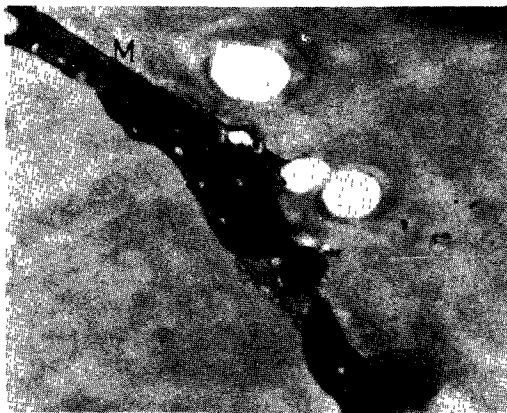


Fig 5 Intermediate stage of spheroplast uptake (10,000 X) M: protoplast membrane, S: spheroplast

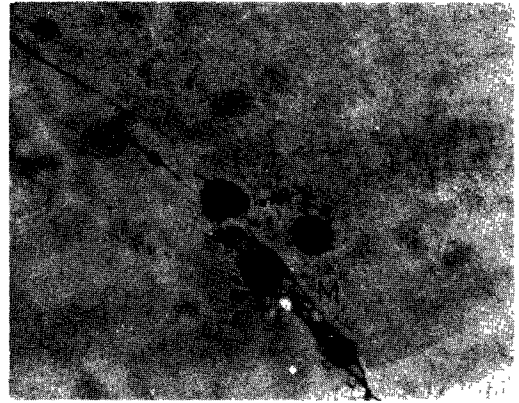


Fig. 6 A spheroplast taken up into protoplast (10,000 X). M: protoplast membrane, S: spheroplast

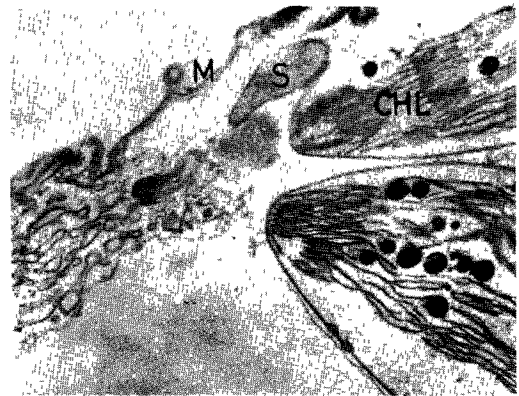


Fig 7 Later stages of spheroplast uptake after high pH-high Ca^{2+} treatment. The lower picture shows the protoplast membrane vesicle entrapping the spheroplast. Note that the engulfed spheroplasts lose their cell integrity (20,000 X).
M: protoplast membrane, S: spheroplast

이상의 관찰로 bacterial spheroplast는 식물의 protoplast로 endocytosis에 의해 도입됨을 알 수 있었다

우수하다고 하였다 본 연구에서는 동일한 고정 방법을 spheroplast와 protoplast의 상호작용 연구에 성공적으로 사용하였다. 앞으로 우리의 연구 과정은 spheroplast와 protoplast의 fusion level에서의 상호작용을 다루는 것이다

고찰

One-step방법에 의한 protoplast의 분리는 two-step방법보다 더 간편하며 protoplast의 viability에도 별다른 악영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있으며 보편적으로 사용되는 방법이다 분리된 protoplast의 viability의 정도는 chloroplast의 분포상태에 따라 달라지게 된다 chloroplast가 protoplast의 한쪽 방향으로 모이게 되면 viability가 떨어지는 것으로 알려져 있다 본 실험에 사용된 protoplast는 chloroplast가 고르게 분포하고 cyclosis현상이 관찰된 건강한 protoplast였다.

Protoplast의 분리에 사용되는 두 효소의 작용을 알아보기 위해 two-step방법으로도 protoplast를 분리하여 관찰하였다 0.5%의 macerozyme을 처리하였을 때는 엽육조직의 middle lamella (pectin성분)가 소화되면서 cell wall이 온전한 엽육세포가 분리되었다 (Fig. 1). 분리된 엽육세포를 1% cellulase로 처리함으로써 protoplast가 만들어지는 것을 관찰하였으며, One-step 방법으로 분리한 것과 별다른 차이가 없었다

엽육조직 1g에 대하여 효소용액을 10ml 이상이 되도록 한 것은 효소용액에 의해 소화되면서 용출된 잎의 성분이 효소를 불활성화 시킬 수 있는 기회를 없애기 위함이었다

Gram음성의 토양균인 *Agrobacterium tumefaciens*의 peptidoglycan층을 lysozyme이 소화함에 따라서 outer membrane이 부분적으로 제거되어 vesicle을 형성하는 것을 관찰할 수 있었으며, 몇몇 세포는 outer membrane의 대부분이 제거되어 protoplast처럼 보이는 것도 있었다 (Fig. 3).

지금까지 몇몇 연구자들은 spheroplast^{10,16)} 및 liposome²⁰⁾이 fusion이 아니라 endocytosis에 의해 protoplast 내부로 도입된다고 하였다. 본 실험에서는 도입된 spheroplast가 membrane구조 등의 cell integrity를 점차로 잃어버리는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7).

본 실험의 전자현미경용 시료제작에 사용된 고정방법은 Fukunaga 등²⁰⁾(1983)이 liposome과 protoplast사이의 상호작용을 연구하기 위해 개발한 방법으로 다른 방법보다 liposome의 고정에 더

요약

Polyethylene glycol (PEG) 처리에 의한 *Agrobacterium tumefaciens* spheroplast와 연초 엽육 protoplast의 상호작용을 연구하기 위하여, 효소적 방법으로 분리한 연초엽육 protoplast와 carbenicillin 및 lysozyme의 처리에 의해 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 15955 spheroplast를 섞어서 polyethylene glycol (PEG) 및 high pH-high Ca²⁺ buffer를 처리한 후 시료를 취하여 전자현미경으로 관찰한 결과, spheroplast는 초기단계에서 protoplast membrane에 부착하고, 시간이 경과함에 따라 endocytosis에 의해 protoplast의 세포질 내부로 도입된 다음, 점차로 그 형태 (cell integrity)가 파괴되어 지는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 관찰 결과로부터 spheroplast는 polyethylene glycol (PEG)에 의해 protoplast내부로 endocytosis되어짐을 알 수 있었다.

사사

전자현미경적 관찰에 도움을 주신 영남대학교 생물학과 장무웅 교수님과 영남대학교 전자현미경실의 남효관 기사님께 감사드립니다.

참고 문헌

- Hille, J., Van Kan, J., and Schilperoot, R. A.: The tumor-inducing plasmid of *Agrobacterium* in Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. Edited by A. Puhler, Springer-Verlag: 1983, p. 223-239.
- Yadav, N. S., Postle, K., Saiki, R. K., Thomashow, M. F., and Chilton, M. D.: T-DNA of a crown gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. Nature, 287: 458-461, 1980.
- Bevan, M. W. and Chilton, M. D.: T-DNA

- of the *Agrobacterium* T₁ and R₁ plasmids. Ann. Rev. Genet., 16 : 357-384, 1982.
4. Buchholz, W. G. and Thomashow, M. F.: Host range encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiAg63 can be expanded by modification of its T-DNA oncogene complement. J. Bacteriol., 160 : 327-332, 1984.
 5. Murai, N., Sutton, D. W., Murray, M. G., Shigtom, J. L., Merlo, D. J., Reichert, N. A., Sengupta-Gopalan, C., Stock, C. A., Barker, R. F., Kemp, J. D., and Hall, T. C.: Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. Science, 222 : 476-482, 1981.
 6. Bevan, M. W. and Hlavell, R. B.: A Chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature, 304 : 184-187, 1983.
 7. Klee, H. J., Gordon, M. P., and Nester, E. W.: Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* T₁ plasmid mutations affecting oncogenecity. J. Bacteriol., 150 : 327-331, 1982
 8. Koekman, B. P., Hooykaas, P. J. J., and Schilperoort, R. A.: A functional map of the replicator region of the octopine T₁ plasmid. Plasmid, 7 : 119-132, 1982
 9. Ooms, G., Barker, A., Molendijk, L., Wullems, G. J., Gordon, M. P., Nester, E. W., and Schilperoort, R. A.: T-DNA organization in homogenous and heterogenous octopine type crown gall tissue of *Nicotiana tabacum*. Cell, 30 : 589-597, 1982.
 10. Hasezawa, S., Nagata, T., and Syono, K.: Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Mol. Gen. Genet., 182 : 206-210, 1981.
 11. Davey, M. R. and Power, J. B.: Polyethylene glycol-induced uptake of micro-organisms into higher plant protoplast: an ultrastructural study. Plant Sci. Lett., 5 : 269-274, 1975
 12. Vasil, I. K., Vasil, V., and Hubbel, D. H.: Engineered plant cell and fungal association with bacteria that fix nitrogen. in Genetic engineering for nitrogen fixation. Edited by A. Hollander, Plenum Press, New York: 1977, pp. 197-211.
 13. Meeks, J. C., Malmberg, R. L., and Wolk, C. P.: Uptake of auxotrophic cells of a heterocyst-forming *Cyanobacterium* by tobacco protoplast, and the fate of their association. Planta, 139 : 55-60, 1978.
 14. Schaffner, W.: Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 2163-2167, 1980.
 15. Sandri-Goldin, R. M., Goldin, A. L., Levine, M., and Glorioso, J. C.: High-frequency transfer of cloned *herpes simplex* virus type I sequences to mammalian cells by protoplast fusion. Mol. Cell Biol., 1 : 743-752, 1981.
 16. Hasezawa, S., Matsui, C., Nagata, T., and Syono, K.: Cytological study of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* spheroplasts into *Vinca rosea* protoplasts. Can. J. Bot., 61 : 1052-1057, 1983
 17. Power, J. B. and Cocking, E. C.: Isolation of leaf protoplasts: macro-molecule uptake and growth substance response. J. Exp. Bot., 21 : 64-70, 1970.
 18. Murashige, T. and Skoog, F.: A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15 : 473-479, 1962.
 19. Otsuki, Y. and Takebe, I.: Isolation of intact mesophyll cells and their protoplast from higher plant. Plant Cell Physiol., 10 : 917-921, 1969.
 20. Fukunaga, Y., Nagata, T., Takebe, I., Kakehi T. and Matsui, C.: An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts. Exp. Cell Res., 144 : 181-189, 1983.

— Abstract —

Cytological Study of the Introduction of *Agrobacterium tumefaciens* Spheroplasts into *Nicotiana tabacum* Protoplasts

Jung Hye Kim, Yong Bum Koo, and Ki Yung Lee

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Agrobacterium tumefaciens induces cancerous growths called crown galls at wound sites on dicotyledonous plants. A large plasmid called T₁ plasmid is responsible for virulence. Upon tumor induction, part of the plasmid, termed T-DNA, becomes integrated into plant genome and its genetic sequences are expressed. These properties allow T₁ plasmids to be used as gene vectors in plants. Several *in vitro* methods for the transfer of T₁ plasmid into plant cell have been developed. One of them is the treatment of bacterial spheroplasts and plant protoplasts mixture with polyethylene glycol that is generally used as fusogen in cell-to-cell fusion. Several workers investigated the interaction of bacterial spheroplasts with plant protoplasts in the presence of polyethylene glycol and suggested that the interaction is not fusion but endocytosis.

In this report we observed the interaction of *Agrobacterium tumefaciens* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts by electron microscope.

Agrobacterium tumefaciens spheroplasts and *Nicotiana tabacum* protoplasts were prepared and mixed in the presence of polyethylene glycol and high pH-high Ca²⁺ buffer. Then the interaction of the spheroplasts with the protoplasts was examined by transmission electron microscope.

After the treatment of polyethylene glycol the spheroplasts adhered to the surface of the protoplasts and then they were engulfed by the protoplasts. After the high pH-high Ca²⁺ buffer treatment the engulfed spheroplasts lost their cell integrity. No fusion process was observed.

Thus all these observations suggest that the introduction process of *Agrobacterium tumefaciens* spheroplasts into *Nicotiana tabacum* protoplasts with the aid of polyethylene glycol is endocytosis.