

감자 기내 소피경 발달에 따른 유전자 발현

홍 주 봉
(한국과학기술연구원 . 유전공학센터)

Gene Expression upon Development of *In Vitro* Potato Microtuber

Hong, Choo Bong
(Genetic Engineering Center, K.A.I.S.T.)

Abstract

Differential gene expressions of patatin, proteinase inhibitor II, PAPI, rbcS and actin in potato microtuber have been examined. Microtubers from the several different stages of development were collected and their protein and mRNA patterns were examined. SDS-PAGE of microtuber proteins revealed that developmental changes in protein should be analogous to that of potatoes grown in the field. The level of patatin mRNA was the highest at the 30th day of development. Proteinase inhibitor II mRNA level was at the highest at the 15th day and decreased thereafter. The levels of PAPI mRNA, rbcS mRNA and actin mRNA were low throughout the time course examined.

서 론

감자 (*Solanum tuberosum* L. cv Superior) 에서의 피경 발달은 외적인 환경 요인과 영양분의 공급에 의해 많은 영향을 받으며 이들 요소들은 감자 내에서의 식물 호르몬의 양을 조절함으로써 피경의 발달을 가져오는 것으로 여겨진다. 단일 주기와 저온 그리고

질소원의 공급등은 괴경 발달을 도와주며 ABA, cytokinin 등의 호르몬들에 의한 괴경 발달의 유도도 보고 되었다 (Okazawa, 1967; Park *et al.*, 1983). 1970 년 Palmer 와 Smith 는 시험관 내에서 감자 포복경의 정단 부위로 부터 소괴경을 형성 시키는 데 성공 하였으며 이러한 기내에서의 소괴경 유도 체계는 감자 괴경의 발생 및 발달 과정을 연구 하는 데 여러가지 유리한 면들을 지니고 있다.

감자 괴경의 발생 및 발달 과정의 규명을 위해 기내에서 소괴경 형성을 유도 한 후 소괴경의 발달 과정에 따라 변하는 단백질의 양상을 관찰 하였고 세포 분열 단계의 관찰을 위해 cytoplasmic actin, 광 조사에 따른 영향 관찰을 위해 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase 의 작은 구조 단위 (rbcS), 보리 와 벼 종자의 호분 층에서 발견된 amylase 와 protease 의 억제제로 여겨지고 있는 PAPI, 경작지에서 자란 감자에서 존재가 확인된 proteinase 억제제, 그리고 역시 경작지에서 자란 감자 괴경 내의 주요 저장 단백질로 여겨지고 있는 patatin 등의 단백질들의 RNA 생성 및 변화 과정을 조사 함으로써 감자 소괴경 발달 과정에 관여 되는 단백질 및 이들의 변환 과정을 밝히려 하였다.

본 론

감자의 괴경은 줄기의 일부가 방사상으로 팽창함에 따라 전분과 단백질들이 축적되어 형성된 감자의 저장기관이다 (Paiva *et al.*, 1983). 감자의 소괴경 은 괴경 발달 배지에 포복경의 일부를 배양하면 포복경의 정단 부위에서나 또는 측아 부위에서 포복경의 형성없이 소괴경의 형성을 유도할 수 있다 (정 혁, 1988). 단일 조건과 20°C 의 온도를 유지 시켜 주면 소괴경의 발달을 볼 수 있으며 약 60 일 경과 후 기내 소괴경의 성장은 완성 된다. 완전히 성장이 끝난 소괴경은 지름이 약 6 - 11 mm 정도이며

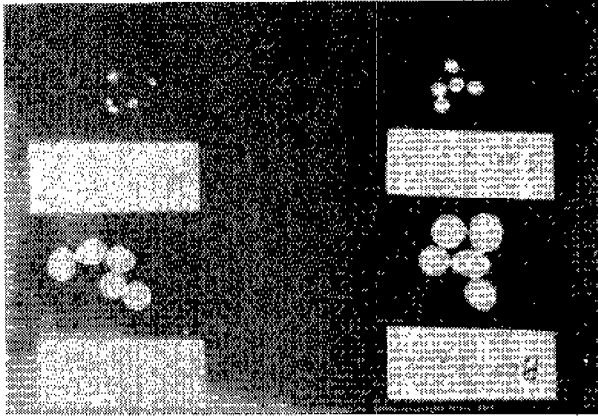


그림 1 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv Superior) 기내 소피경의 발달. 가) Petri dish 에서 성숙된 기내 소피경. 나) 발달 단계에 따라 분류된 기내 소피경.

엽록체의 발달에 따라 연한 녹색 을 띄게 된다. 완전히 성숙된 60 일 간 배양된 기내 소피경과 발달 중의 기내 소피경을 7 일, 15 일 그리고 30 일 짜에서 수확해 구분한 결과는 그림 1과 같 다.

경작지에서 자란 감자 피경의 단백질을 SDS-PAGE 로 분석하면 40 KD 의 위치 에 피경 단백질 중의 주류를 이루는 단백질의 band 를 볼 수 있으며 (그림 2의 7 번선) 이는 전체적인 단백질 band 들의 형태로 미루어 감자 피경의 주요 저장 단백질로 여겨 지고 있는 patatin 의 band (Paiva *et al.*, 1983) 로 해석 된다. 경작지에서 자란 감자의 피경에는 기타 proteinase inhibitor I 과 II 가 분리 분석 되어 있으며 (Bryant *et al.*, 1976) 보고된 바와 비교 시 gel 아래 부위에서 나타나는 약 10 KD 과 15 KD 의 band 들이 각기 이들에 해당 되는 것으로 여겨 진다. 경작지에서 자란 감자에 비해 기내에서 발달된 소피경은 patatin 이외의 기타 단백질들이 비교적 많이 존재하나 전반적인 형태를 비교 시 30 일 짜와 60 일 짜의 소피경은 경작지에서 자란 감자의 피경과 함유된 단백질군이 유사한 것으로 나타난다. 기내 소피경의 발달에 따른 patatin 의 함량 증가는 뚜렷하여 발달 30 일 짜의 소피경에서 최대치에 이르며 proteinase inhibitor 의 경우는

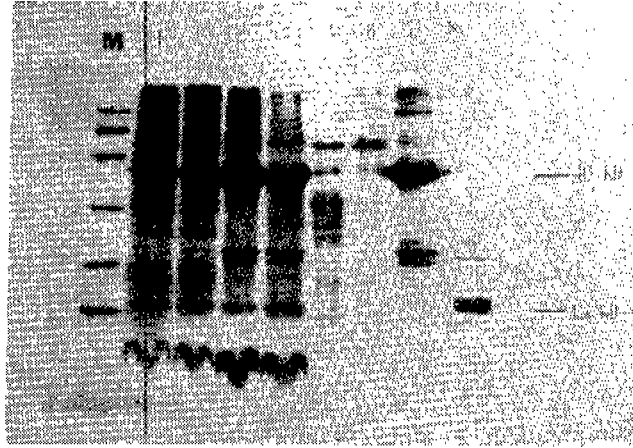


그림 2 감자 기내 소피경 발달에 따른 단백질 변화. M, size marker; 1, 발달 7 일째; 2, 발달 15 일째; 3, 발달 30 일째; 4, 발달 60 일째; 5, 감자의 잎; 6, 감자의 줄기; 7, 경작지에서 자란 감자 괴경.

기내 소피경 발달 초기에 이미 상당량이 존재 하고 있음을 볼 수 있고 소피경 발달에 따른 뚜렷한 함량 증가는 관찰 되지 않는다 (그림 2).

반면 감자의 다른 부위로 부터는 patatin 과 proteinase inhibitor I 과 II 가 공히 관찰 되지 않으며 (그림 2 의 5 번과 6번 선) 이는 patatin 과 prote- inase inhibitor I 과 II 가 기내 소피경의 발달과 밀접한 관계를 가지고 있음 을 나타내며 감자 기내 소피경의 발달을 가져 오는 요소와 patatin 과 protein- ase inhibitor I 과 II 의 형성 과정이 긴밀히 연관 되어 있음을 시사 하겠다. 따라서 감자 기내 소피경에서의 patatin 과 proteinase inhibitor I 과 II 의 생성 과정 및 역할 규명은 기내 소피경 발달 기작의 매듭을 푸는 요소가 될 것 이며 기내 소피경에서의 현상 규명은 경작지에서 자라는 감자에서의 괴경 발달 과정의 규명에도 적용될 수 있을 것이다.

식물에서의 단백질의 역할 규명은 목표 단백질의 유전자 수준에서의 조사와 유전자 조작에 의해 추구될 수 있을 것이며 따라서 patatin 과 proteinase in- hibitor II 의 유전자 수준에서의 연구의 시작으로 이들 단백질의 mRNA 에 대한 Northern 분석을 하였으며 아울러 actin, ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase 의 작은 구조

단위, 그리고 amylase 와 protease 의 억제제로 여겨지고 있는 PAPI 의 mRNA 에 대한 Northern 분석을 하여 감자의 기내 소피경 발달 에 따라 나타날 수 있는 식물체의 주요 단백질의 함량 변화를 간접적으로 조사 하고자 하였다.

1. Patatin

경작지에서 자란 감자의 피경으로 부터 크론된 patatin cDNA 의 염기서열 (Mignery *et al.*, 1984) 의 일부에 준하여 oligonucleotide 를 화학적으로 합성 한 후 32P 로 표지하여 감자 기내 소피경으로 부터 분리 되어 50 % formalde- hyde agarose gel 전기 영동으로 크기에 따라 분리된 mRNA 중 patatin mRNA 를 확인 하였다. Northern 분석 결과 약 1.6 kb 의 위치에서 그리고 감자 기내 소피경으로 부터만 Northern band 를 볼 수 있었다 (그림 3). Band 의 진한 정도는 소피경 발달 30 일 째에 최대치에 도달해 감자 기내 소피경에서의 patatin 단백질 축적 시간표와 유사함을 알 수 있었다. 반면 감자의 잎으로 부터나 또는 토마토, 고추의 잎으로 부터는 patatin mRNA 에 의한 band 형성이 예측한 바 대로 이루어 지지 않았다 (그림

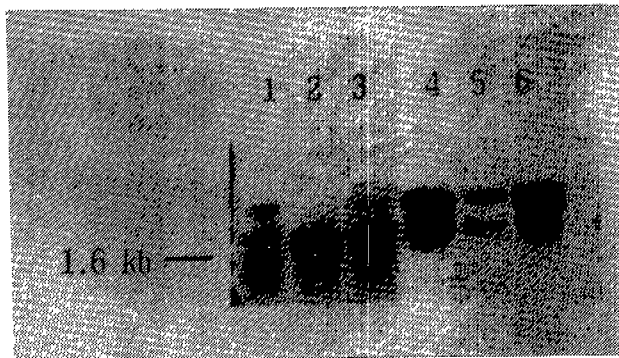


그림 3. Patatin의 Northern 분석 결과. 1. 감자 기내 소피경 발달 15일 째 ; 2. 발달 30 일 째 ; 3. 발달 60 일 째 ; 4. 감자의 양 ; 5. 토마토 (*Lycopersicon esculentum* L. cv Pungyoung)의 잎 ; 6. 고추 (*Capsicum annum* cv Dabokgun) 의 잎

3). 따라서 감자 기내 소과경에서의 patatin 단백질의 축적량은 주로 mRNA 의 생성 과정에 의해 결정됨을 말해 주고 있다.

2. Proteinase inhibitor II

경작지에서 재배된 감자의 괴경으로 부터 크론된 proteinase inhibitor II 유전자의 염기서열 (Thornburg *et al.*, 1987) 을 따라 만들어 진 oligonucleotide 를 32P 로 표지하여 proteinase inhibitor II 의 mRNA 를 Northern 분석 을 함으로써 확인 하였다. 보고된 바와 같이 약 1 kb 의 위치에서 Northern band 를 감자의 기내 소과경으로 부터는 볼 수 있었으나 감자의 잎 부위나 토 마토, 고추의 잎에서는 찾아 볼 수 없었다. Proteinase inhibitor II 의 mRNA 양의 변화 정도는 이 억제제 단백질의 양이 이미 소과경 발달 15 일 쯤에 최대치에 도달해 있음과 유사한 것으로 보아 감자 기내 소과경에서의 proteinase inhibitor II 의 생성 조절이 주로 전사 과정에서 이루어 진다고 해석된다 (그림 4).

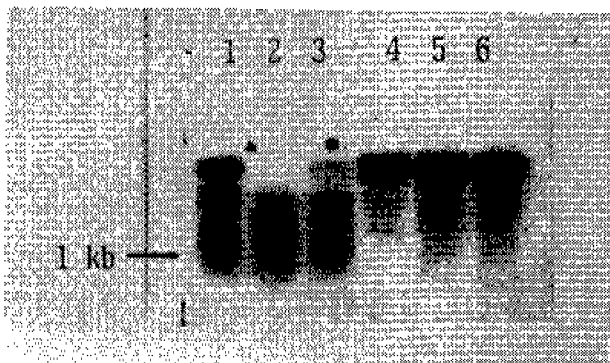


그림 4 Proteinase inhibitor II 의 Northern 분석 결과. 1, 감자 기내 소과경 발달 15 일 쯤 ; 2, 발달 30 일 쯤 ; 3, 발달 60 일 쯤 ; 4, 감자의 잎 ; 5, 토마토의 잎 ; 6, 고추의 잎.

3. Actin

동물체의 actin 은 크게 근육질 actin 과 세포질의 골격을 이루는 actin 의 두 종류가 있으나 식물체에는 세포질의 골격을 이루는 actin 류 만이 존재하는 것으로 여겨 진다. 동물의 경우 현재 까지 크론된 actin 유전자의 염기 서열 분석 결과 종간에 많은 유사성을 보여 actin이 생물의 진화 과정 중 잘 보존된 단백질의 하나임을 입증해 주고 있다 (Hightower and Meagher, 1986). 이와 같은 보존성은 고등식물에서도 예외가 아니라고 생각 되는 바 곰팡이류인 *Dic-tyostelium discoideum* 에서 크론된 actin 유전자 (세포질의 골격을 이루는 actin 류 임) (Kimmel and Firtel, 1983)를 이용하여 기내 소피경의 발달 과정 에 따른 actin mRNA 의 생성 정도를 Northern 분석을 통하여 관찰 하였다.

감자의 잎으로 부터 분리된 mRNA 로 부터는 약 1.7 kb 의 위치에 Northern band 가 확인된 반면 감자의 기내 소피경으로 부터는 발달 정도에 관계 없이 조사된 표품으로 부터 매우 약한 band 만이 똑 같은 크기에서 관찰 되었다. 한편 고추의 자엽과 토마토의 잎에서는 강한 단일 Northern band가 약 1.7 kb 의 위치에 나타 났으며 (그림 5) *D. discoideum* 의 actin mRNA 의 크기와의 동일성과 단일 Northern

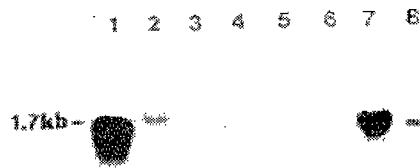


그림 5. Actin의 Northern 분석 결과. 1, 감자 기내 소피경 발달 15 일 짜 ; 2, 발달 30 일 짜 ; 3, 발달 60 일 짜 ; 4, 고추 유식물 ; 5, 감자의 잎 ; 6, 감자 잎의 poly A⁺ mRNA ; 7, 토마토의 잎.

band 인 것으로 미루어 각 식물체의 actin mRNA 가 정확히 표출된 것으로 여겨진다. Actin mRNA 의 감자 기내 소피경에의 미량 존재는 이미 소피경 발달 15 일째에는 더 이상의 뚜렷한 cytoskeleton의 증가나 세포 분열이 없는 것으로 추정된다.

4. Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase 작은 구조 단위 (rbcS)

이산화탄소 고정의 시작점인 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase 는 큰 구조단위와 작은 구조단위로 구성 되어 있으며 작은 구조단위를 기록하는 유전자는 핵내 염색체 상에 존재한다 (Gruissem, 1989). 식물체가 광선에 노출 되면 rbcS 의 mRNA 가 생성 되기 시작하며 따라서 rbcS 단백질이 만들어져 엽록 체로 이동하여 큰 구조단위와 합쳐지게 된다.

완두콩으로 부터 크론된 rbcS유전자(장 무응등, 1989)를 이용하여 감자 기내 소피경, 녹색의 감자 잎, 녹색의 고추와 토마토의 잎으로 부터 추출된 mRNA 의 Northern분석을 한 결과 녹색의 감자, 고추, 토마토의 잎으로 부터는 약 1.2 kb 에서 Northern band가 관찰 되었으나 감자의 기내 소피경들로 부터는 약한 band 가 관찰 되었다 (그림 6). 이는 비록 감자 기내 소피경의 표피에는 엽록체의 발달과 더불어 rbcS



그림 6 rbcS의 Northern분석 결과. 1, 감자 기내 소피경 발달 15 일째 ; 2, 발달 30 일째 ; 3, 발달 60 일째 ; 4, 감자의 잎 ; 5, 고추의 잎 ; 6, 토마토의 잎.

의 발현이 있었겠으나 기내 소피경 전체의 rbcS 의 표현 정도는 미미한 것으로 판단되며 이러한 결과는 rbcS 의 조직 특이성 발현에 기인 하거나 단순히 소피경 내부로의 rbcS 의 발현에 요구되는 광이 미치지 못함에 기인할 것으로 여겨진다.

5. Probable amylase/protease inhibitor (PAPI).

PAPI 는 식물체에서 amylase 와 protease 의 억제제로 작용 한다고 여겨지는 것으로 보리 (Mundy and Rogers, 1986) 와 벼 (Yu *et al.*, 1988) 의 호분층에서 그 존재가 확인 되었다. 벼에서 부터 분리되어 아미노산의 서열이 확인된 PAPI 의 유전자 염기 서열을 universal genetic code 로 풀어 가능한 genetic code 를 모두 포함한 oligonucleotide probe 를 화학적으로 합성한 후 이 'mixed oligonucleotide' 를 이용하여 감자의 기내 소피경 내에 벼와 보리의 종자에서와 유사하게 PAPI 가 형성되고 있는 가를 확인 하였다. 감자 기내 소피경에서는 조사된 한, 발달된 정도에 관계 없이 PAPI mRNA가 거의 존재 하지 않음을 볼 수 있었으며 의외로 감자의 잎, 담배의 잎, 그리고 토마토와 고추의 유식물로 부터 강한 mRNA Northern band 가 약 900 b 의 위치에서 관찰 되었다. Band 로 나타나는 mRNA 의 크기나 band 의 단일성 (약 1.8 kb 에서 나타나는 약한 band 들은 'mixed oligonucleotide' 의 'small ribosomal RNA' 와 'large ribosomal RNA' 에의 비특이성 결합에 의한 것임) 으로 미루어 900 b 에서 나타나는 band 는 PAPI 의 mRNA 에 의한 것으로 여겨지며 감자 기내 소피경에서는 PAPI 가 존재치 않거나 존재 하더라도 극히 미량일 것으로 해석되며 감자 기내 소피경에의 proteinase inhibitor II 의 다량 존재와 비교 된다. 현재 까지 보고된 바로는 PAPI 는 조직 특이성 발현이 되어 보리와 벼의 종자의 호분층에 서만 주로 생성되는 것으로 알려져 있으나 감자의 잎, 담배의 잎, 토마토와 고추의 유식물로 부터 발견되는 Northern band 는 강도로 미루어 이들 기관에도 PAPI 단백질이 존재하고 있을 가능성을

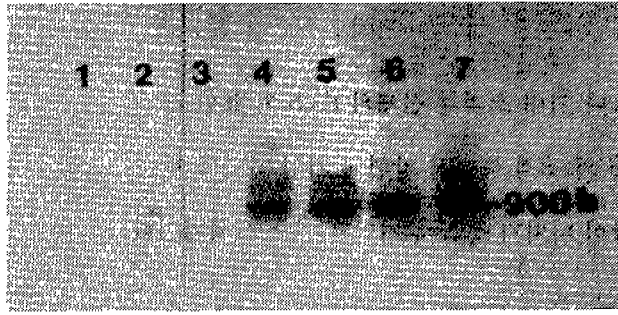


그림 7. PAPI의 Northern 분석 결과. 1. 감자 기내 소피경 발달 15 일 짜 ; 2. 발달 30 일 짜 ; 3. 발달 60 일 짜 ; 4. 감자의 잎 ; 5. 토마토의 유식물 ; 6. 고추의 유식물 ; 7. 담배의 잎.

충분히 제시하고 있다 (그림 7).

결 론

감자의 피경 발달은 단일 조건과 낮은 밤 온도에 의해 촉진되며 (Okazawa, 1967) 이러한 현상은 종자의 형태로 겨울을 넘기는 식물들의 종자 형성 과정의 한 예로 생각될 수 있을 것이다. 종자 형성 기간 중의 지상 부위로 부터 저장 물질의 종자로의 이동은 종자 발달에 필수적인 과정이며 이와같은 이동은 지상 부위의 고쇠가 완료될 때 까지 계속될 것이다. 감자의 피경도 비록 줄기의 일부가 그 시작점이라는 면에서는 다른 종자 식물과 맥락을 달리 하고 있으나 역시 종자 발달 과정에서 발견되는 많은 현상을 따르고 있음을 확인할 수 있다. 감자의 기내 소피경 형성은 감자의 피경이 감자 줄기의 일부가 발달되어 형성 된다는 사실에서 원천을 찾을 수 있으며 20°C 라는 비교적 낮은 온도와 8 시간 이라는 단일 조건에서 유도될 수 있어 경작지의 감자 피경 형성과 유사한 환경 조건을 요한다. 또한 감자 피경의 발달 과정에서 관찰 되는 지상의 탄소 동화 작용 부위로 부터 피경으로의 탄소동화물의 이동은 기내 소피경 발달 배지에 공급 되어 있는 탄수화물원으로 대치 되어 있다.

본 논문에 보고 되어 있는 결과들은 확정적인 증거로 사용 되기에는 보충할 수 있는 증거들이 긴히 요구되고 있음을 전제하나 기내에서 일어나는 감자의 기내 소피경 형성 과정을 이해 하는 데 도움이 될 몇 가지 사실들을 제시할 수 있으리라 여겨진다.

1). 기내 소피경도 경작지에서 재배된 감자 피경과 유사한 단백질 종류를 함유하고 있으며 특히 저장 단백질인 patatin 의 함량은 거의 일치함. 따라서 경작지에서 발달하고 있는 감자의 피경에서도 기내 소피경에서 관찰되는 소피경 발달에 수반되어 일어나는 단백질 형성 및 변화과정과 유사한 과정이 예측된다.

2). 저장 단백질인 patatin 의 형성은 비교적 기내 소피경이 발달된 후에 일어나며 이의 형성량 증가는 주로 patatin mRNA 생성량 증가에 따른다.

3). Serine endopeptidase 의 하나인 proteinase inhibitor II 의 형성은 기내 소피경 형성 초기 단계에서 부터 시작되며 이의 형성량 증가는 주로 mRNA 생성량 증가에 따른다.

4). Cytoskeleton 을 이루는 actin mRNA 의 존재 정도로 보아 기내 소피경을 이루는 세포는 기내 소피경 발달 초기에의 세포 분열에 의해 거의 형성 되어 있는 것으로 보인다. 또한 감자의 actin 은 아미노산 구성이나 단백질의 크기에 있어 다른 생물군과 유사할 것으로 여겨진다.

5). rbcS mRNA 의 기내 소피경에의 미량 존재는 기내 소피경 발달에 탄소동화 작용이 별다른 영향을 못 미칠을 나타낸다 하겠다.

6). PAPI mRNA 의 기내 소피경에의 미량 존재는 amylase/protease inhibitor가 기내 소피경에는 아마 존재치 않을 것임을 나타내며 감자 잎에서 발견되는 PAPI mRNA 의 다량 존재와 뚜렷한 차이를 나타내고 있으나 보리와 벼에서 제기된 PAPI 의 종자 호분층에 국한된 조직 특이성 발현과는 상반 됨으로 PAPI cDNA 크론 확보에 따른 보충 증거가 필연이라 하겠다.

이상에 제시된 점들은 비록 기내 소피경을 이용한 결과들이나 많은 경우

경작지에 서 재배되는 감자의 괴경 발달 과정에도 적용될 수 있으리라 여겨지며
기내소괴경 이 감자에서의 괴경 발달 과정을 이해 하는 데 매우 유리한 시스템임이
입증 되리 라 생각된다.

참 고 문 헌

1. 장 무웅, 구 용범, 김 한집. 1989. 완두콩 (*Pisum sativum*) 에서 Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase Small Subunit 유전자의 cDNA 클로닝과 광유도성 발현에 관한 연구. 한국 식물학회지 32: 33-40.
2. 정 혁. 1988. 체세포 유전학적 기법에 의한 식량작물의 품종 개량과 인공종자 생산의 모델 시스템 개발. 과학기술처 연구보고서 (유 장렬). pp. 55-63.
3. Bryant, J., T.R.Green, T.Gurusaddaiah and C.A.Ryan. 1976. Proteinase inhibitor II from potatoes: Isolation and characterization of its promoter components. *Biochem.* 15: 3418-3424.
4. Gruissem, W. 1989. Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161-170.
5. Hightower, R.C. and R.B.Meagher. 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics* 114: 315-332.
6. Kimmel, A.R. and R.A.Firtel. 1988. Sequence organization in *Dictyostelium discoideum*: Unique structure at the 5'-ends of protein coding genes. *Nucl. Acids Res.* 12: 7987-8000.
7. Mundy, J. and J.C.Rogers. 1986. Selective expression of a probable amylase /protease inhibitor in barley aleurone cells: Comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. *Planta* 169: 51-63.
8. Okazawa, Y. 1967. Physiological significance of endogeneous cytokinin occurrence in potato tubers during their developmental period. *Proc. Crop Sci.Soc.Jpn.* 39: 171-175.
9. Okazawa, Y. and H.W.Chapman. 1962. Regulation of tuber formation in the potato plant. *Physiol. Plant.* 15: 413-419.
10. Paiva, E., R.M.Lister and W.D.Park. 1983. The major tuber proteins of potato can be induced to accumulate in stems and petioles. *Plant Physiol.* 71: 161-168.

11. Palmer, C.E. and D.E. Smith. 1970. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultivar *in vitro*. *Plant Cell Physiol.* 11: 304-314.
12. Park, W.D., C.E. Blackwood, G.A. Mignery, M.A. Hermodson and R.M. Lister. 1983. Analysis of the heterogeneity of the Mr 40,000 tuber glycoprotein of potatoes by immunological methods and NH₂-terminal sequence analysis. *Plant Physiol.* 71: 156-160.
13. Thornburg, R.W., G. An, T.E. Cleveland, R. Johnson and C.A. Ryan. 1987. Wound inducible expression of a potato inhibitor II - chloramphenicol acetyl-transferase gene fusion in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84.....: 744-748.
14. Yu, Y.G., C.H. Chung, A. Fowler and S.W. Suh. 1988. Amino acid sequence of a probable amylase/protease inhibitor from rice seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 466-475.

저 자 약 력

홍 주 봉 (洪 周 奉) 박사

- 1952. 3. 22. 생
- 1973 서울대학교 식물학과(이학사)
- 1977 서울대학교 대학원 식물학과 (이학석사)
- 1983 미국 미시간주립대학교 대학원 식물학과 (이학박사)
- 1973 - 75 제3육군사관학교 자연과학 교관
- 1978 - 83 미국 Michigan주립대학교 연구조교
- 1983 - 84 미국 Texas Tech. Univ., 생화학과 박사후과정
- 1984 - 87 미국 California대학교, San Diego, 생물학과 박사후과정
- 1987 - 현재 한국과학기술연구원 유전공학센터 선임연구원