

## 벼 엽록체 DNA 의 이질성

남백희·문은표  
(명지대학교 생물학과 · Cornell University)

### Heterogeneity of Chloroplast DNA in Rice

Baek Hie Nahm and Eunpyo Moon  
(Dept. of Biology, Myung Ji University and Dept. of Biochemistry,  
Molecular and Cellular Biology Cornell University, U.S.A.)

#### Abstract

Plant chloroplast DNA exists as an unique circular structure in which large single copy(LSC) region and small single copy (SSC) region are separated by large inverted repeat sequences (IRS). It has been known that the unique existence of inverted repeat sequences in chloroplast DNA has no relation with the stability of the chloroplast DNA, but causes the inversion between inverted repeat sequences. The relationship between the unique structure of chloroplast DNA and its biological significance has not been understood so far. In rice, several gene clusters have been cloned and sequenced which contain ribulose-5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL). Especially, one rbcL gene is linked with rpl2 gene which is located in the IRS region in one of the gene clusters. By comparison of nucleotide sequence, the two genes are found to be linked through 151 bp repeat sequence which is homologous to the rpl23 gene in IRS region. The repeat sequence is found to be located 3' downstream of rbcL gene and near psbA gene in LSC region. The existence of these repeat sequences and the presence of gene clusters caused by the gene rearrangement thorough the repeat sequence provide a possible significance of the chloroplast DNA structure. The 151 bp repeat sequence which is found to be dispersed chloroplast DNA provide the model system to explain the heterogeneity of the chloroplast DNA in rice in terms of gene rearrangement.

## 서 론

엽록체는 식물세포에만 존재하는 세포내 소기관으로 태양에너지를 화학에너지로 전환시키는 중요한 역할을 하고있다. 이러한 엽록체의 독특한 기능은 세포 내 핵의 유전정보 뿐만 아니라 엽록체 자체가 가지고 있는 고유의 환상 DNA에 포함되어있는 유전정보에 의한 것이다. 광합성의 중요성을 비추어 볼때 엽록체 DNA의 구조에 관한 연구는 중요하게 인식되어 왔다. 그 결과 최근 *Nicotiana* 엽록체 DNA의 염기순서가 완전히 밝혀졌으며 100 여개 이상의 coding sequence 가 확인되었다 (Shinozaki *et al.*, 1986). 엽록체 DNA 는 그 구조에 있어 large single copy region 과 small single copy region 이 한쌍의 inverted repeat sequence 에 의해 분리되어 있는 독특한 환상구조로 이루어져 있고 이러한 구조로 인하여 엽록체 DNA 자체 내의 recombination 이 방지되어 안정된 고유한 구조가 유지되고 있다고 알려져 왔다 (Palmer, 1983). 그러나 그 후 엽록체 DNA 내의 inverted repeat sequence 가 항상 불안정한 엽록체 DNA 구조를 유발하지는 않는다는 결과를 얻어냄 으로서 inverted repeat sequence 의 엽록체 DNA 내의 역할에 대하여 새로운 여지를 가지게 되었다 (Palmer *et al.*, 1987). 또한 엽록체 DNA 내의 inverted repeat sequence 에는 100 bp 내외의 short repeated sequence 가 여러가지로 존재하며 이들에 의한 엽록체 DNA 자체 내에서 유전자 재조합 현상이 관찰된 바 있으나 (Stern and Palmer, 1984; Day and Ellis, 1984; Howe, 1985) short repeated sequence 가 동정되거나 이들에 대한 정확한 염기배열순서는 보고된 바 없었다. 그러나 최근 벼의 엽록체 DNA 에 위치하는 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) 의 이질적인 유전인자가 엽록체와 미토콘드리아 내에 존재함을 보고한 바 있다 (Moon *et al.*, 1987). 또한 이 rbcL 의 3'-noncoding region 에 위치하는 151 bp 의 염기순서가 inverted repeat

sequence 내에 위치하는 ribosomal protein subunit L23 의 염기순서와 유사하며 이 151 bp 염기순서에 의해 rbcL 유전인자와 이곳으로부터 20 kb 떨어져 위치한 ribosomal protein subunit L2 (rpl2) 유전인자가 연결된 유전인자군이 확인되었다. (Moon *et al.*, 1988). 이결과는 엽록체 DNA 내에서 short repeated sequence 에 의한 recombination 을 명확하게 추적할 수 있는 좋은 모델을 제공하고 있는 것이다. 따라서 본 연구에서는 rbcL 유전인자를 중심으로한 엽록체 DNA 의 heterogeneity 와 특히 151 bp short repeated sequence 를 중심으로 한 gene rearrangement 를 살펴봄으로써 엽록체 DNA 의 특이한 구조적 의미를 고찰하고자한다.

## 본 론

### 1. 벼 엽록체 유전인자 rbcL 의 복잡성

벼의 genomic DNA 로부터 spinach rbcL gene probe 를 이용하여 Southern Blot 분석에 의해 관찰된 7개의 Hind III 조각을 cloning 하여 각각 그의 organelle source 를 규명하고 그 source organelle 에 따라 엽록체에 존재하는 것은 Ct-1 (5.3 kb), Ct-3 (9.5 kb), 미토콘드리아에 존재하는 것은 Mt-0 (6.9 kb), Mt-1 (5.8 kb), Mt-2 (3.0 kb), Mt-3 (2.5 kb), Mt-4 (1.5 kb) 라고 표시하였다. 이들 중 각각 5.3 kb , 9.5 kb, 6.9 kb 의 Hind III fragment 인 Ct-1, Ct-3, Mt-0 각각의 restriction map 과 염기 배열 순서를 결정하였다 (Fig. 1) (Moon *et al.*, 1987). 이들은 모두 trnM, trnV gene 을 포함하는 전형적인 엽록체 DNA 와 같은 유전인자 구조를 보여주었다. 그러나 Mt-0 는 rbcL gene 의 downstream 에 rpl2 gene sequence 와 염기배열순서가 동일한 유전인자로 연결되어 전형적인 엽록체 DNA 의 구조와는 다른 양상을 보여 주었다. 이들 중 Ct-1 과 Ct-3 의 rbcL coding region sequence 를 비교하면 처음 278 개의 아미노산을 결정하는 834 개의 염기서열 중에서 단지 3 개의 염기가 다르고 아미노산 서열은 완전히

RESTRICTION MAPS AND GENE LOCALIZATION FOR pCt-1, pCt-3  
AND pMt-0

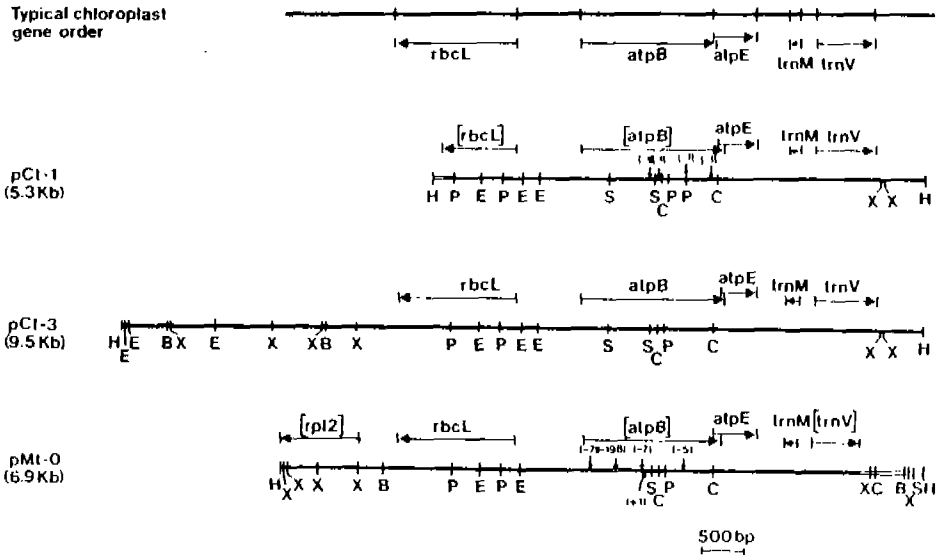


Fig. 1. Restriction maps and gene localization for Ct-1, Ct-3 and Mt-0. Numbers above arrows indicate number of bases inserted or deleted. Brackets indicate non-functional genes. The open box at the left end of Ct-1 represents the 16 bp sequence which is not found in Ct-3 or Mt-0. The open box at the right end of Mt-0 represents the 930 bp sequence which is not present in Ct-1 or Ct-3.

Abbreviations : B, Bgl II ; C, Cla I ; H, Hind III ; P, Pst I ; S, Sst I ; X, Xba I

동일하였다. 그러나 Ct-3 는 그 이후의 서열에 있어 199 개의 아미노산이 연결되어 477 개의 아미노산을 결정하는 완전한 유전인자인 반면 Ct-1 은 그 이후 단지 34개의 미지의 아미노산서열을 나타냈다. 그러나 Mt-0 는 475개의 아미노산을 결정하는 거의 완전한 염기서열을 가지고 있다. 따라서 Ct-3 와 Mt-0 는 염기서열에 있어 단지 37 개의 염기만이 다르고 이로 인해 22개의 아미노산이 치환되었다. Ct-3 와 Mt-0 의 rbcL sequence homology 는 97.4 % 로 벼와 옥수수 rbcL sequence homology 인 93.3 % 보다 더 높은 염기 서열 유사율을 보여주었다.

2. 151 bp sequence 와 direct repeat 에 의하여 재조합된 유전인자군

벼 엽록체 DNA 의 *rbcL* gene 3'-noncoding region 의 염기서열과 Mt-0 *rpl2* upstream region 의 염기 서열 분석 결과 이 위치의 151 bp sequence 는 97.3 % 의 염기 서열 유사율을 보여 주었으며 또한 벼 엽록체 DNA 의 Inverted repeat region 의 *rpl2* upstream sequence 와 유사하였다. 다만 Inverted repeat sequence region 내의 *rpl2* upstream sequence 에서는 중간에 135개의 염기순서가 삽입되어 60개의 염기서열과 91개의 염기서열이 분리되어 배열되어 있다(Fig.2) (Moon *et al.*, 1988a). 따라서 이를 151 bp sequence 로 표시한 바 이 구조는 right inverted repeat sequence (IRA) 내의 homologous sequence 는 direct repeat 구조를 이루게 되는 한편 left inverted repeat sequence (IRB) 와는 inverted repeat 을 이루게 됨으로써 homologous recombination 에 의한 gene rearrangement 를 구조적으로 가능하게 할

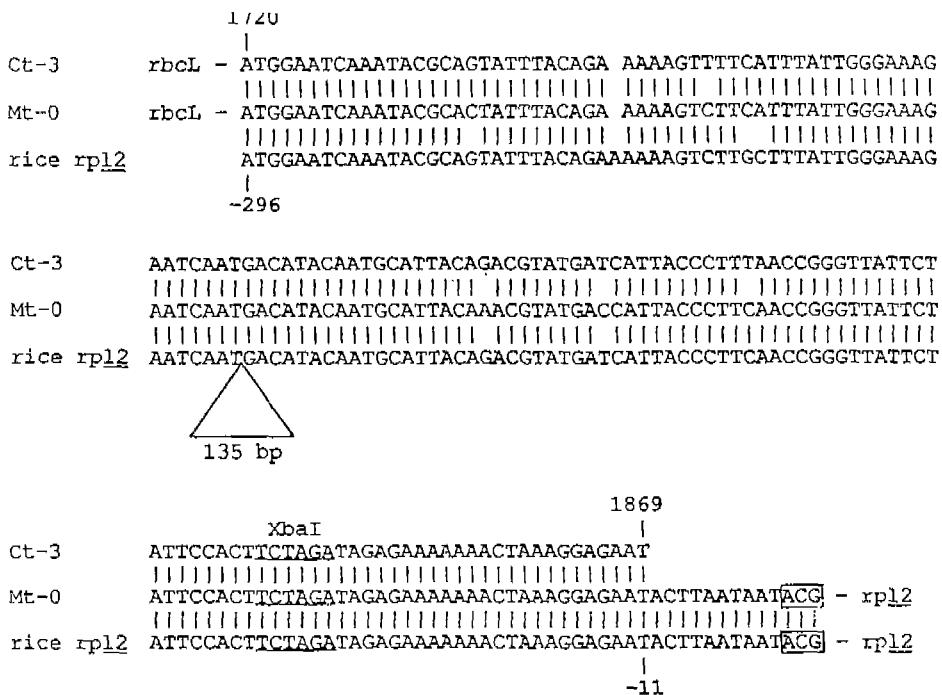


Fig. 2. DNA sequence comparison of regions downstreams from *rbcL* in two rice clones, Ct-3 and Mt-0, and upstream of rice chloroplast *rpl2*. The triangle represents the 135 bp sequence present only in rice *rpl2*. The initiation codon of the *rpl2* is boxed.

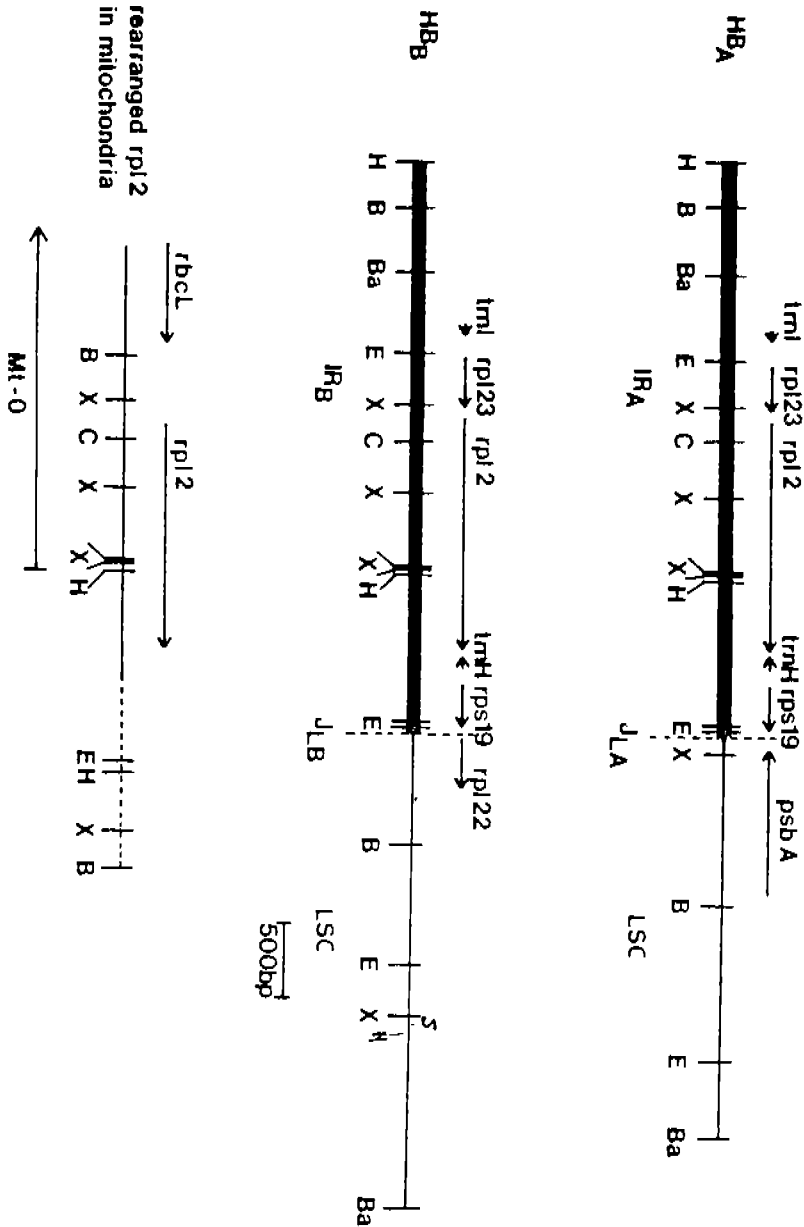


Fig. 3. Restriction map of the two gene clusters , HBA and HBB. In HBA , Hind III- Bam HI fragment contains the junction , JLA , *psbA* and inverted repeat sequence , IRA . Another inverted repeat sequence , IRB is linked to *rpl22* at the other junction, JLB, in HBB fragment . For comparison , the restriction map of Mt-0 containing *rpl2* and *rbcL* gene is showed .

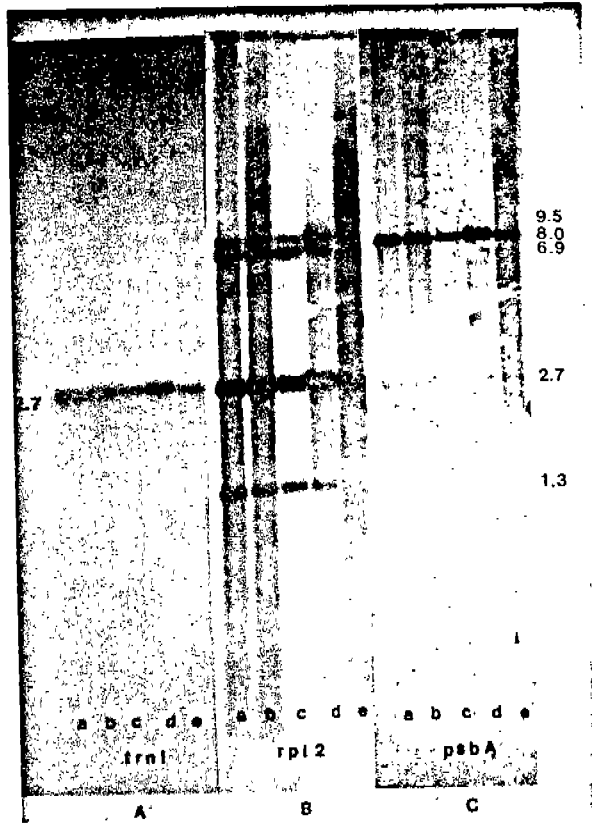


Fig. 4. Southern blot analysis of rice total genomic DNA digested with Hind III restriction enzyme.

Blot A: hybridized with 0.6 kb BamHI-EcoRI fragment of rice trnI

Blot B: hybridized with 2.4 kb EcoRI-EcoRI fragment of rice psbA Blot C: with 1.0 kb EcoRI-Bgl II fragment of psbA gene.

Rice DNA was isolated from *Oryza sativa* var. Labelle at the following developmental stages; a) 3-day etiolate, b) 3-day etiolate followed by 24 hr exposure to light, c) root with the same stage in b), d) young leaves grown for additional 3 days under the light with 3-day etiolate, e) mature leave grown for 3 month under normal day light.

수 있게 된다. 이 151 bp sequence 는 이 염기 서열을 probe 한 벼의 Genomic Southern Blot 분석 결과 hybridization 되는 9.5kb, 8.0kb, 6.9kb, 2개의 2.7kb 등 5개의 Hind III fragment 에 분포되어 있는 것으로 추정된다. 이들 중에서 Fig.3 에서와 같이 각각 한쌍의 Inverted repeat sequence 내에 포함되어 있는 rpl23 gene

에 위치한 2개 2.7 kb fragment와, Ct-3 에서 보는 바와 같이 rbcL 3'-noncoding region 위치한 9.5 kb fragment, 또한 Mt-0 에 위치한 6.9 kb fragment 등으로 4개의 위치는 Southern blot analysis, restriction map, sequence 등으로 확인 되었다. 반면 마지막 하나의 위치는 trnI, rpl2, psbA 를 probe 로한 Southern Blot 분석 결과 psbA upstream region 으로 추정되고 있다 (Fig.4 와 Moon *et al.*, 1988 의 Fig.2). 즉 151 bp sequence 의 위치가 분명하지 않은 8.0 kb Hind III fragment 는 0.6 kb trn I (Bam HI- EcoRI ) 와 ,0.6 kb rpl2 coding sequence probe (XbaI- XbaI) 로는 hybridization 되지 않으나 2.4 kb rpl2 probe (EcoRI- EcoRI) 와 1.0 kb psbA coding sequence (EcoRI-BglII) probe 로 hybridization 되었다. 그러나 알려진 psbA coding sequence 내 에서는 유사 염기서열을 발견할 수 없었다 (Wu *et al.*, 1987). 따라서 151 sequence 는 right inverted repeat sequence 와 large single copy region 의 junction 으로부터 7kb 이내의 psbA upstream region 에 위치하고 있다고 볼 수 있겠다. 염기서열로 보아 rpl23 의 일부분으로 151bp sequence 는 실제로 rpl23 로부터 각각 20 kb, 40 kb 떨어져 위치하고 있으나 Mt-0 에서 보는 바와 같이 두개의 주변 유전인자인 rpl2 와 rbcL 을 연결하고 있음을 알수있다. 이것은 151bp sequence 가 구조적으로 direct repeat 을 이루게 어 유전자 재결합에 관여하고 있음을 시사해 주고 있다.

## 결 론

이상의 결과를 종합하여 볼 때 벼 엽록체 DNA 에 있어 rbcL 유전인자군의 복합성은 rbcL gene downstream 에 위치하는 151 bp repeated sequence 에 의한 gene



rearrangement 에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 지금까지 확인된 151 bp repeated sequence 에 의한 homologous recombination 기작결과로 추정되는 rpl2-rbcL 유전인자군인 Mt-0 가 벼의 mitochondria 내 에서 발견되고 있으나 실제로 homologous recombination 의 시점은 분명하지 않다. homologous recombination 에 의한 gene rearrangement 이후에 세포내 mitochondria 로 전이되는 하나의 가능성과 이와는 반대로 일어나는 또 하나의 가능성 또한 배제할 수 없다. 지금까지의 연구는 후자의 가능성을 많이 고려해 왔다 (Moon *et al.*, 1988). 그러나 rbcL, rpl2, psbA, petA, atpI 등의 엽록체 유전인자의 엽록체 발달에 따르는 Southern Blot 분석 결과 minor band 의 변화가 rbcL, psbA, rpl2 등의 특정한 유전인자에만 국한되는 현상을 고려하여 볼 때 전자의 가능성이 높은 것으로 볼 수 있다 (Nahm *et al.*)

이러한 repeated sequence 에 의한 gene rearrangement 는 그 수가 single copy region 에 증가 할수록 그의 복잡성은 Inverted repeat sequence 의해 급증하므로 이에 대한 조직적인 연구를 위하여 본 연구에서 다른 151 bp short repeated sequence 는 엽록체 유전인자의 재조합 연구에 그 의의가 매우 크다고 볼 수 있겠다.

## 참 고 문 헌

1. Day, A. and Ellis, T.H.N. (1986). The location and possible evolutionary significance of small dispersed repeats in wheat ctDNA. *Curr. Genet.* 10, 931-941
2. Howe, C.J. (1985). The end point of an inversion in wheat chloroplast DNA are associated with short repeated sequences containing homology to att-lambda. *Curr. Genet.* 10, 139-145
3. Moon, E., Kao, T.H. and Wu, R. (1987). Rice chloroplast DNA molecules are heterogeneous as revealed y DNA sequences of a cluster of genes. *Nucleic Acids Res.* 15, 611-630

4. Moon, E., Kao, T.H. and Wu, R. (1987). Sequence of the chloroplast -encoded atpB-atp-E-trnM gene clusters from rice. *Nucleic Acids Res.* 15, 4358-4359
5. Moon, E., Kao, T.H. and Wu, R. (1988a). Rice mitochondrial genome contains a rearranged chloroplast gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 213, 247-253
6. Moon, E. and Wu, R.(1988b). Organization and nucleotide sequence of genes at the two junctions between the two inverted repeats and the large single-copy region in the rice chloroplast genome. *Gene* (in press)
7. Nahm, B.H., Moon, E. and Wu, R. Unpublished results
8. Palmer J.D. (1983). Chloroplast DNA exists in two orientations. *Nature*, 301, 92-93
9. Palmer, J.D. and Thompson, W.F. (1981). Rearrangements in the chloroplast genomes of mung bean and pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5533-5537
10. Palmer, J.D. *et al.*(1987). Chloroplast DNA evolution among legumes: loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr. Genet.* 11, 275-286
11. Shinozaki, K. *et al.*(1986). The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2050
12. Stern, D.B. and Palmer J.D.. (1984). Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1946-1950
13. Wu, N., Cote, J., and Wu, R. (1987). Structure of the chloroplast psbA gene encoding the QB protein from *oryzae* L. *Devel. Genet.* 8, 339-350

## 지 자 약 력

### 남 백 회 박사

- 1953. 3. 23. 생
- 1975. 2 서울대학교 농화학과 (농학사)
- 1977. 2 한국과학기술원 생물공학과 (이학석사)
- 1986. 8 미국 Ohio주립대학교 생화학과 (Ph. D.)
- 1977. 2 - 80. 8. 한국과학기술원 (연구원)
- 1980. 9. - 86. 8. 미국 Ohio주립대학교 생화학과 교육조교 및 연구조교
- 1986. 9. - 87. 12. 미국 Cornell대학교 유전학과 박사후과정
- 1987. 12. - 89. 1. Cornell대학교 생화학, 분자 및 세포생물학과 박사후과정
- 1989. 3. - 현재 평지대학교 생물학과 교수

### 문 은 표 박사

- 1958. 5. 5. 생
- 1981. 2 서울대학교 미생물학과 (이학사)
- 1983. 2 서울대학교 대학원 미생물학과 (이학석사)
- 1988. 6 미국 Cornell대학교 생화학, 분자 및 세포생물학과 (Ph. D.)
- 1988. 6. - 현재 Cornell대학교 생화학, 분자 및 세포생물학과 박사후과정