

효모에서 산화적 스트레스 처리에 따른 유전자 발현

김수현¹ · 박희전¹ · 김진규^{1*} · Nada Wilhelmova²

¹한국원자력연구원 방사선과학연구소

²체코실험식물학연구소

E-mail: jkkim@kaeri.re.kr

중심어 (keyword) : 이온화 방사선, 활성산소종, 염화수은, 효모

서론

모든 호기성 생물들은 분자형태 산소의 부분적인 감소로 인한 산화적 스트레스를 받는다. 활성산소종의 높은 활성과 DNA, 지질, 단백질들의 세포적 손상을 일으키며, 다양한 생물들의 세포는 활성산소종을 방어하는 기작을 가지고 있다 [1]. 이러한 활성산소종은 이온화 방사선 조사 혹은 산화환원반응의 물질 등에 의해서 생성된다. 이온화 방사선은 치료, 진단, 질병예방, 식품멸균 등에 이용되며, 이온화 방사선같이 산화적 손상을 일으키는 물리적 요인으로 DNA 손상을 일으키는 물질의 세포노출 시 유전 안정성을 유지하기 위해 DNA 손상회복, cell cycle arrest, 전사적 반응, 세포죽음 등 복잡한 반응이 일어난다 [2-3]. 또한, 수은독성도 산화적 성질을 가지고 있으며 단백질, 지질 및 DNA의 손상을 주는 산화적 스트레스를 일으킨다. *ycf* 유전자는 yeast cadmium factor로 ABC transporter protein을 생성하고 bZIP transcriptional activator인 YAP 단백질이 *ycf* 유전자의 promoter 부위에 붙어서 전사를 조절 한다 [4-5]. 이러한 연구결과들을 바탕으로 본 연구에서는 방사선과 중금속의 복합적인 처리에 의한 효모의 생존변화와 유전자의 특이적 발현을 살펴보았다.

재료 및 방법

Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast) W303-1A strain MATa {*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*} 를 YPD 배지에서 30 °C, 48시간동안 배양하여 이용하였다. 산화적 스트레스를 처리하기 위하여, 염화수은을 0.1 mM에서 0.9 mM 범위로 처리하여 주었으며, 이온화 방사선은 방사선과학연구소 내의 조사시설 ⁶⁰Co γ-ray irradiator (MDS Nordion, Canada) 를 이용하여 100 Gy/hr, 400 Gy/hr, 800 Gy/hr, 1200 Gy/hr 의 선량을 조건에 최종흡수선량이 100 Gy, 400 Gy, 800 Gy 가 되도록 조사하였다.

세포의 생존율을 측정하게 위하여 CFU (colony forming unit) 을 이용하였으며, OD 600 nm 에서의 흡광도 측정하여 세포 일정량을 희석 분주하여 균체를 계수하였다. 유전자의 발현을 확인하기 위하여 각 실험군의 세포에서 RNA를 추출하여 각 유전자에 맞는 primer를 이용하여 cDNA 생성 후 Real-time PCR을 수행하였다.

결과 및 고찰

효모에 방사선을 조사했을 때 방사선의 최종 흡수선량이 높을수록 세포의 생존율을 감소하였다. 또한, 방사선 조사선량이 높을수록 세포의 생존율이 감소하였다. 즉, 동일한 흡수선량을 짧은 시간에 받을수록 세포가 받는 영향력이 큼을 알 수 있다. 0.4

mM 이상농도의 염화수은을 세포에 처리하였을 때 거의 생존한 세포가 없었다. 반면, 적은 농도인 0.15 - 0.2 mM의 범위에서 세포의 생존율이 증가하는 경향을 보였다. 이로서 세포의 생존에 염화수은이 긍정적인 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 염화수은과 방사선을 같이 처리한 세포에서의 생존율은 수은 농도가 높고, 최종 흡수선량이 높을수록 감소하였다. 두 가지의 스트레스에 의해 세포의 생존율이 더욱 감소함을 알 수 있었다.

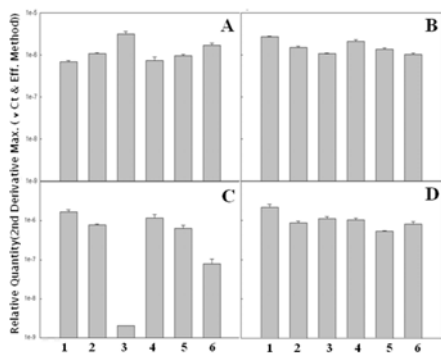


Figure 1. Gene expression of *YAP*, *YCF* assessed by the Real-time PCR. A. 0.0 mM mercury chloride (II) treated; B. 0.2 mM mercury chloride (II) treated ; C. 0.25 mM mercury chloride (II) treated; D. 0.3 mM mercury chloride (II) treated. Lane 1 and 4 was non treated with ionizing radiation. Lane 2 and 5 was treated with 400 Gy ionizing radiation. Lane 3 and 6 was treated with 800 Gy ionizing radiation. Lane 1-3 was appeared gene *YCF*. Lane 4-5 was appeared *YAP*.

산화적 스트레스에 의한 *YCF*와 *YAP* 유전자들의 발현정도를 파악해 본 결과, *YCF* 유전자 발현은 처리된 염화수은의 농도가 높을수록 발현이 증가하는 경향을 보였고, 방사선처리 시 최종 흡수선량이 높을수록 유전자 발현이 증가 하였다. 방사선과 염화수은을 같이 처리한 경우, 유전자 발현이 증가하였다. 반면, 0.2 mM 농도의 수은을 처리한 경우는 예외적으로 흡수선량이 낮은 경우에 발현이 증가되었다. *YAP* 유전자의 경우도 마찬가지로 *YCF* 유전자 발현양상을 보였다.

결론

세포 생존율의 변화를 살펴볼 때 두가지 산화적 스트레스를 복합 처리한 세포 생존율의 감소양상이 단독 처리한 세포 생존율과 비교하여 더 큰 것을 알 수 있었다. 이는 산화적 스트레스의 복합작용에 의해 세포가 받는 스트레스 효과의 상승작용을 의미한다.

또한 산화적 스트레스 방어작용을 하는 유전자들의 발현 양상을 볼 때 세포가 받은 스트레스가 클수록, 유전자 발현이 증가하여 산화적 스트레스를 방어하는 것을 알 수 있었다. 즉, 스트레스에 따른 세포 생존과 유전자 발현은 반비례적인 관계를 나타냈다.

참고 문헌

1. D.J. Jamieson. Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisia*., Yeast 14 (1998) 1511-1527.
2. C.B. Bennett, L.K. Lewis, G. Karthikeyan, K.S. Lobachev, Y.H. Jin, J.F. Sterling, J.R. Snipe, M.A. Resnick. Genes required for ionizing radiation resistance in yeast, Nat. Genet. 29 (2001) 426-434.
3. A. Watson, J. Mata, J. Bahler, A. Carr, T. Humphrey. Global Gene Expression Response of Fission Yeast to Ionizing Radiation, Mol. Biol. Cell 15 (2004) 851-860.
4. N. Bouganim, J. David, R. Wysocki, D. Ramotar. Yap1 overproduction restores arsenite resistance to the ABC transporter deficient mutant *ycf1* by activating *ACR3* expression, Biochem. Cell Biol. 79 (2001) 441-448.
5. A. Wemmie, M.S. Szczypka, D.J. Thiele, W. Scott Moye-Rowley. Cadmium Tolerance Mediated by the Yeast AP-1 Protein Requires the Presence of an ATP-binding Cassette Transporter-encoding Gene, *YCF1*, J. Biol. Chem. 269 (51) (1994) 32592-32597.