

## 곡물류의 형질전환 유도에 관한 연구 (IV) 벼 배발생 세포의 생화학적 특징

鄭炳均·宋貞媛·任炯卓·南佰熙\*·黃和  
(전남대학교 자연과학대학 생물학과, \*명지대학교 자연과학대학 생물학과)

### Studies on the Transformation of Crop Plants. IV. Biochemical Characteristics of Embryogenic Callus in Rice

Jung, Byung Kyun, Jeong Won Song, Hyoung Tak Im,  
Baek Hie Nahm\* and Baik Hwang  
(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju and  
\*Department of Biology, Myongji University, Youngin)

#### ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) calli containing both embryogenic callus (EC) and nonembryogenic callus (NEC) regions were initiated from the mature seed on MS medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin. The calli were developed into two callus type which can be distinguished by visual examination depending on color and appearance. In order to elucidate the polypeptide composition between EC and NEC, the total protein extracted from two types of callus was analysed by electrophoresis. By one-dimensional analysis of SDS-PAGE and Isoelectric focusing, several protein bands showed quantitative and qualitative difference in each type of callus. The further analysis of the total protein with two-dimensional electrophoresis showed at least 20 EC specific protein and 10 NE specific protein. Also 3 specific protein spots showing microheterogeneity of 90, 65, 50 kD were detected in EC, while a series of acidic heterologous protein spots were visualized in NEC.

#### 서 론

조직배양에 의해 기내(*in vitro*)에서 유도된 배양세포는 배발생 캘러스(EC)와 비배발생 캘러스(NEC)의 두 가지 특징적인 세포군으로 나누어지는데(Nabors *et al.*, 1983), 이 중 EC는 정상적인 체세포 배발생 과정을 통하여 재분화가 이루어지지만 NEC는 기관분화를 통하여 이루어지며 재분화 효율 또한 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Chen and Luthe, 1987; Nabors *et al.*, 1983). 쌍자엽 식물과는 달리 단자엽 식물 특히, 벼와 같은 주요 경제작물에서 EC 유기율은 매우 저조하고, genotype(Abe and Sasahara, 1982; Abe and Futshara, 1986; Mikami and Kinoshita, 1988)이나 배양조건(Inoue and Maeda, 1980) 등에 따라 배양

효율이 매우 상이하게 나타나므로 조직배양을 통한 우량 형질 육성에 장애가 되고 있는데, 배발생 세포의 형성기작 규명과 이로부터 재분화의 극대화는 체세포 배발생 과정을 통한 인공종자 개발은 물론 외래유전자 도입에 의한 형질 전환 식물체 개발에 있어 절대적으로 요구되는 연구로 사료된다. 최근 배발생 세포의 생화학적 특성에 관한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있는데, 당근 등의 세포배양을 통한 체세포 배발생에 관한 연구에서 EC가 NEC에 비해 핵산과 단백질 함량이 높게 나타나는 것으로 보고(Fujimura *et al.*, 1980; Sengupta *et al.*, 1980; Kiyosue *et al.*, 1990) 되어 있으며, 생화학적으로 분석할 수 있는 표지 단백질로 Peroxidase Isozyme(Franz *et al.*, 1989; Joersbo *et al.*, 1989)과 Esterase Isozyme(Chibbar *et al.*, 1988)의 발현

양상을 분석하여 그 지표로 삼고자 하는 연구가 시도되었다. 또한, 최근 De Jong 등(1992, 1993)과 Vijin 등(1993)이 당근 세포배양에서 배발생 세포 특이 단백질을 동정, 보고하였는데, 벼에서는 Hwang 등(1992)이 EC와 NEC의 생화학적 차이를 보고한 바 있으나, 표지 단백질의 발현 양상 등에 대한 EC의 특성에 관한 연구(Chen and Luthe, 1987)는 매우 미진한 실정이다.

본 연구에서는 벼 배발생 세포에서의 생화학적 특성에 대한 연구의 일환으로써 국내 재배종인 동진벼를 재료로 하여 이러한 두 가지 유형의 세포에 있어서 전기영동적 특성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험에 사용된 벼(*Oryza Sativa* L. cv. Dong Jin) 종자는 농촌진흥청으로부터 분양받아 4°C 암상태에 보관하면서 사용하였다. Acrylamide, *N,N*-methylene-bisacrylamide, *N,N,N,N*-tetramethylene-ethylene diamine, SDS, ammonium persulfate 등은 Sigma 제품을 사용하였으며, 단백질의 분자량 측정과 등전점 측정을 위한 표준물질과 ampholite는 Pharmacia 제품을 사용하였다.

**캘러스 유도 및 배양.** 벼 성숙종자를 70%(v/v) ethanol과 5%(v/v) sodium hypochlorite 용액에 각각 10분간 침적한 후 무균수로 3회 세척한 다음 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L Kinetin, 3% sucrose, 0.8% agarose가 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고형배지에 치상하여 암상태하에서 배양하였으며, 2주 후 동일 배지에서 한 번 계대배양한 다음 7일 후 배(embryo)로부터 유기된 캘러스만을 Nabors 등(1983)의 방법으로 해부현미경하에서 분리하여 시료로 사용하였다. 한편 EC와 NEC의 세포활성조사는 Gahan과 Kalina(1965)의 방법에 따라 수행하였다.

**캘러스로부터 전단백질 추출.** 전단백질 추출은 Chen과 Luthe(1987)의 방법을 수정하여 사용하였으며, 냉동 건조된 각 시료 100 mg을 액체질소로 동결시켜 막자사발에서 균질화시킨 후 1.0 mL의 전단백질 추출용액(62.5 mM Tris-HCl(pH 7.0), 10% glycerol, 1 mM PMSF, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 8 M urea, 2% SDS)으로 추출하였다. 이때 SDS-PAGE에 사용될 단백질의 추출에는 2% SDS를 등전점 전기영동과 2차원 전기영동에 이용될 전단백질의 추출에는 1% Triton을 이용하였다. 추출된 단백질은 13,000 g로 15분간 원심분리하여 시료로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford(1976) 방법으로 정량하였으며 표준물질로 BSA를 사용하였다.

**단백질의 1차원 전기영동.** 단백질의 1차원 전기영동은 10×10 cm slab gel(Mighty Small SE 250, Hoeffer Scientific Instrument) 기구를 이용하였다. 이때 사용된 겔

농도는 12.5%, SDS의 농도는 2.0%이었고 이밖의 겔조성을 위한 성분비율은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 조제하였으며, 20 mA에서 2시간 동안 분리하였다. 분리된 단백질은 고정용액(12% trichloroacetic acid, 3.5% sulfosalicylic acid)으로 30분간 고정 후 Coomassie brilliant blue G-colloidal suspension 용액(0.1% coomassie brilliant blue G, 2% phosphoric acid, 15% ammonium sulfate)로 염색한 다음 탈색용액(10% methanol, 7% acetic acid)으로 탈색한 후 확인하였다. 이때 표준단백질로는 Phosphorylase b(M.W. 94 kD), Bovin serum albumin(M.W. 67 kD), Ovalbumin(M.W. 43 kD), Carbonic anhydrase(M.W. 30 kD), Trypsin inhibitor(M.W. 20.1 kD),  $\alpha$ -lactalbumin(M.W. 14.4 kD)을 이용하였다.

**단백질의 등전점 전기영동.** 단백질의 등전점 전기영동에 사용된 Slab gel(80×100 mm)의 농도는 6.0% ampholite(Pharmalite pH 3~10), 6% acrylamide, 6 M urea이었으며, 4 mA로 4시간 동안 분리하였다. 이때 등전점 측정을 위한 표준물질로는 trypsinogen(pI 9.30), lentil lectin bands(pI 8.45, 8.15), horse myoglobin bands(pI 7.35, 6.85) human carbonic anhydrase B(pI 6.55), bovine carbonic anhydrase B(pI 5.85)  $\beta$ -lactoglobulin A(pI 5.20) 등이었다.

**단백질의 2차원적 전기영동.** 단백질의 2차원 전기영동 분석은 O'Farrel(1975)의 방법을 변형하여 사용하였으며 이때 running gel 조성은 375 mM Tris-HCl(pH 8.8), 12.5% acrylamide, 0.1% SDS, 0.05% ammonium persulfate, 0.005% TEMED 이고 stacking gel 조성은 125 mM Tris-HCl, 4% acrylamide, 0.1% SDS, 0.02% APS, 0.02% TEMED 이었다. 1차 등전점 전기영동으로 분획한 후, 겔 평형용액(125 mM Tris, pH 6.8, 0.1% SDS)에 20분간씩 2회 평형시킨 후, 25 mA로 2.5 h 동안 2차원 전기영동을 실시하였다. 2차원 전기영동 후 겔은 50% methanol, 10% acetic acid로 고정된 후, Wray 등(1981)의 방법에 따라 silver staining으로 착색하였다.

## 결과 및 고찰

**캘러스 유도.** 동진벼의 성숙종자로부터 유도된 배발생 캘러스(EC)는 비배발생 캘러스(NEC)와는 달리 희고 단단한 반면, 비배발생 캘러스는 황갈색의 부드러운 형태적 특징을 보여주었다(Fig.1). 이러한 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스의 대사 활성도를 검사하기 위해 INT(2-(p-iodophenyl)-3-p-nitrophenyl-phenyltetrazolium chloride)를 처리하여 530 nm에서 흡광도를 측정하여 본 결과 EC는 3.82 /g. fresh wt.이었고 NEC는 1.23/g. fresh wt.이므로 EC가 NEC보다 대사활성이 훨씬 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

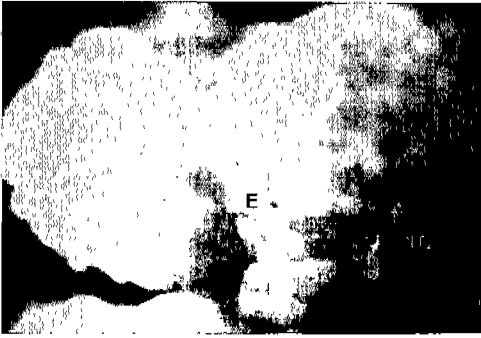


Fig. 1. Callus induced from rice matured seed on MS solid medium. Embryogenic (E) callus appears white and compact whereas nonembryogenic (NE) callus yellow to translucent and crystalline.

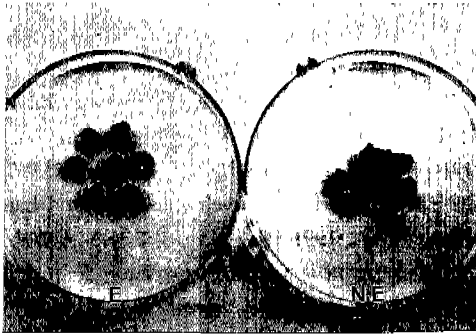


Fig. 2. Metabolic activity of embryogenic (E) and nonembryogenic (NE) callus treated with 0.1% INT solution. EC has more deeply stained in pink color than NEC.

**SDS-PAGE에 의한 전기영동 분석.** EC와 NEC로부터 추출한 전단백질을 SDS를 이용한 전기영동 결과 주요 단백질을 제외한 많은 밴드에서 매우 상이한 단백질 양상을 보여주었는데(Fig. 3), 89, 62, 47, 42, 41, 36, 33, 28, 25, 24, 23, 21, 19, 15 kD 등의 단백질들이 EC와 NEC에서 공통적으로 나타나고 있었으나 EC에서는 적어도 10개의 단백질이 전기영동상에서 특이하게 나타나거나 발현된 단백질의 농도가 NEC에 비해 높게 나타나는 반면, NEC에서는 적어도 3개의 단백질이 특이하게 또는 높은 농도로 발현되고 있는 것으로 나타났다. EC의 특이 단백질로는 90, 72, 65, 51, 49, 31, 29, 28, 26, 17, 14 kD 등으로 나타나는 반면, NEC에서는 78, 47, 27 kD의 단백질 등이 특이하게 나타났다. 이러한 결과는 Chen과 Luthe(1987)의 보고와는 상이한 것으로 아마도 품종이나 배양조건 그리고 배양기간 등에 따른 다양한 유전자 발현의 결과로 사료된다. Wilde 등(1988)은 체세포 배발생에 관여하는

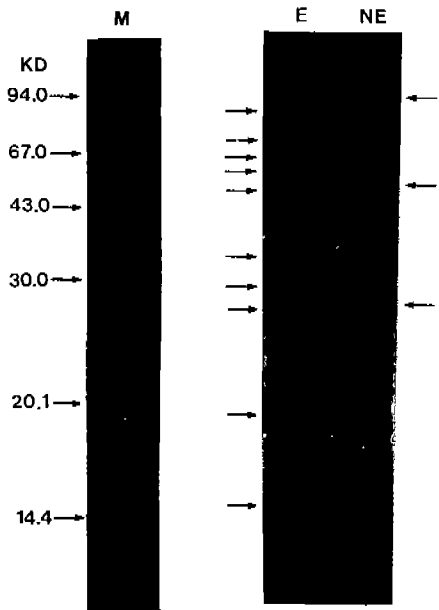


Fig. 3. SDS-PAGE pattern of total proteins extracted from embryogenic (E) and nonembryogenic callus (NE). Lane M showed the marker proteins. The distinct or specific proteins in embryogenic and nonembryogenic callus were marked as right and left arrow, respectively.

특정 유전자가 이미 EC에 존재하는 것으로 보고하였는데 아마도 이러한 EC에 있어서의 특이적 또는 높은 농도로 발현하는 단백질들이 캘러스의 embryogenic potential에 관여하는 것으로 사료된다.

**등전점 전기영동에 의한 단백질 분석.** EC와 NEC로부터 추출한 전단백질의 등전점 전기영동 결과(Fig. 4) 약 13개의 주요 단백질이 공통적으로 나타났으며, 특이성 단백질의 경우 강알칼리 단백질은 거의 유사한 양상을 보여주는 반면, 산성과 중성 그리고 약알칼리 단백질들에서는 EC와 NEC의 서로에 대하여 특이적 또는 높은 농도로 발현되는 매우 다른 양상을 보여주었다.

**2차원 전기영동에 의한 발현 단백질의 양상.** Fig. 5와 같이 EC와 NEC로부터 추출한 전단백질의 2차원 전기영동 결과, 적어도 20여개의 단백질이 EC에서 특이적으로 발현되고 있었는데 특이 발현 단백질 양상을 보면, 10여종의 20 kD 미만의 저분자 단백질은 주로 중성 단백질을 이루고 있는 반면, 25~45 kD, 70~90 kD의 배발생 캘러스 특이 단백질은 산성 단백질로 구성되어 있으며 알칼리성 단백질에서는 전반적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 아울러 특이한 점은 90, 65, 48 kD 내외의 단백질들은 microheterogeneity 현상을 보여주는 단백질군으로 glycoprotein으로 유추되는 단백질이 배발생 캘러스에서만 특이하게 발현되

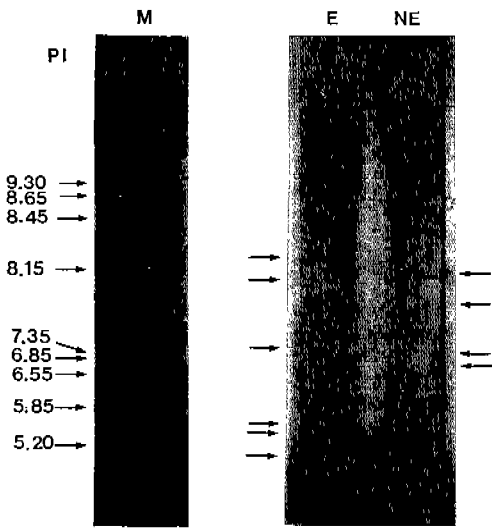


Fig. 4. Isoelectric focusing pattern of total proteins extracted from embryogenic (E) and nonembryogenic (NE) callus. Lane M showed the marker proteins.

는 특징을 보여주고 있는 반면, 비배발생 캘러스에서의 30~90 kD 단백질은 분자량의 변이가 매우 높은 heterogeneity를 보여 주는 특이 단백질군으로서 불안정한 당화과정에 기인한 당화과정 동안의 중간 산물의 단백질군으로서, 비배발생 세포에서는 단백질의 glycosylation 과정이 정상적으로 일어나지 못하고 있는 현상을 나타내는 것으로 사료된다. De Jong 등(1992)은 당근에서 배발생 세포의 세

포배양액에 분비되는 32 kD의 glycoprotein인 acidic endochitinase가 온도변이주에서의 비배발생 세포를 체세포 배발생 과정으로 유도하여 변이효과를 보상할 수 있다는 결과를 얻어냄으로써 체세포 배발생 과정에 chitinase가 중요한 작용을 하고 있는 것으로 보고하였으며 Vijin 등(1993)은 endochitinase의 산물과 유사한 구조를 갖는 Rhizobium의 Nod factor인 N-acetylglucosamine lipooligosaccharide에 의해 체세포 배발생 과정을 유도하였는데, 이러한 점에서 캘러스에서의 acidic endochitinase에 의한 배발생 유도는 콩과 식물에서의 뿌리혹과 유사한 구조의 발달에 관여하는 것으로 유추하고 있다(De Jong *et al.*, 1993). 또한 Cordewener 등(1991)은 glycosylation inhibitor에 의해서 체세포 배발생이 억제되었으나 38 kD의 glycoprotein을 첨가시킴에 의해서 회복될 수 있음을 보여주었다. 유사한 연구로서 최근 Park과 Kim(1993)은 버 세포의 현탁배양 중에 적어도 20 kD 미만의 저분자량의 단백질을 포함한 10종의 chitinase가 발현되고 있음을 확인하였는데, 이 중 적어도 4종은 chito oligosaccharide에 의하여 유도되었으며, 그 중 3종은 26(28) kD, 45 kD, 66 kD의 acidic chitinase로, 1종은 basic chitinase로 확인된 결과가 보고되었다. 그러나 유도된 chitinase가 이미 유전자 서열로부터 유추된 32~37 kD의 3종의 basic chitinase(Zhu and Lamb, 1991, Huang *et al.*, 1991)와 동일한 것인지는 확실치 않은데, 이는 연구자에 따라 chitinase isozyme의 분류 방법의 차이에 의한 것으로 사료된다. 그러나 본 실험결과 벼에 있어서 chitinase의 유도가 체세포 배발생 과정에 직접적으로 관여하고 있다는 결과는 아직 없으나 당근 등에서의

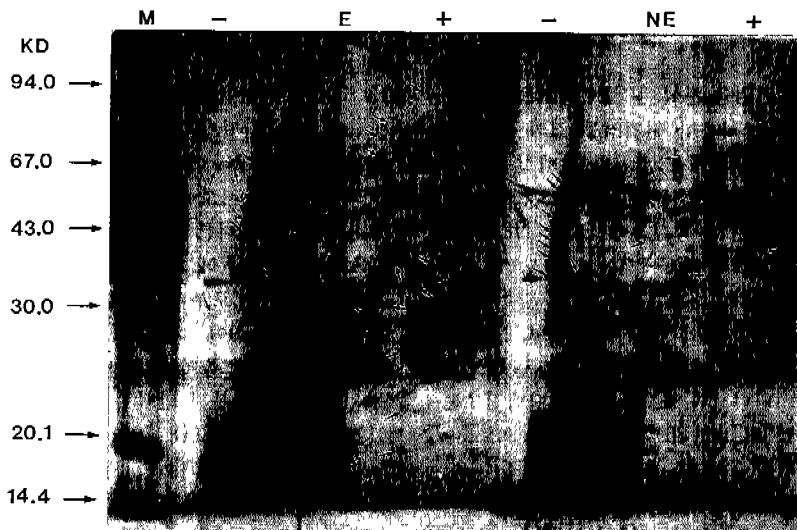


Fig. 5. Two dimensional electrophoretic analysis of total proteins extracted from embryogenic (E) and nonembryogenic callus (NE). Lane M showed the marker proteins. The quantitative and qualitative difference in embryogenic and nonembryogenic callus were marked as arrows.

발현과 비교하여 볼 때 적어도 단백질의 glycosylation 과정이 체세포 배발생 과정에 관련된 가능성을 내포하고 있는 것으로 사료된다.

## 적 요

벼(*Oryza sativa* L.) 캘러스는 2.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L kinetin이 첨가된 MS 배지에서 성숙종자로부터 유도되었으며, embryogenic callus(EC)와 nonembryogenic callus(NEC)는 색깔과 외부형태에 의해 경시적으로 선별되었다. EC와 NEC의 전체 단백질로부터 SDS-PAGE와 등전점 전기영동에 의한 전기영동적 분석은 EC와 NEC의 각각에 대해 특이적, 양적인 차이를 보여주었다. 또한 EC와 NEC의 2차원 전기영동 분석은 약 20여개 이상의 EC 특이단백질과 10여개의 NEC 특이 단백질 양상을 보여주었으며, 아울러 EC 특이적인 90, 65, 50 kD의 단백질은 microheterogeneity를 보여주는 반면, NEC에서는 분자량의 변이가 큰 일련의 산성 이질단백질군을 보여주었다.

## 사 사

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학연구조성비 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Abe, T. and T. Sasahara. 1982. Variation in callus formation from seed in japonica, indica, their hybrides, and large grain varieties in rice. *Japan. J. Breed.* **32**: 53-60.
- Abe, T. and Y. Futsuhara. 1986. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. App. Genet.* **72**: 3-10.
- Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chen, L.J. and D.S. Luthe. 1987. Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.* **48**: 181-188.
- Chibbar, R.N., J. Shyluk, F. Georges, C.S. Mallard and F. Constabel. 1988. Esterase Isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *J. Plant Physiol.* **133**: 367-370.
- Cordewener, J., H. Booij, H. Van Der Zandt, F. Van Engelen, A. Van Kammen and S. De Vries. 1991. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* **184**: 478-486.
- De Jong, A.J., J. Cordewener, F.L. Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A.V. Kammen and S.C. De Vries. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4**: 425-433.
- De Jong, A.J., R. Heidstra, H.P. Spaink, M.V. Hartog, E.A. Meijer, T. Hendriks, F.L. Schiavo, M. Terzi, T. Bisseling, A.V. Kammen, and S.C. De Vries. 1993. Rhizobium lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* **5**: 615-620.
- Franz, P.F., N.C.A. de Ruijter and J.H.N. Schel. 1989. Isozyme as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize. *Plant Cell Rep.* **8**: 67-70.
- Fujimura, T., A. Komanine and H. Matsumoto. 1980. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Physiol Plant.* **49**: 255-260.
- Gahan, P.B. and M. Kalina. 1965. The validity of using neotetrazolium for studying labile NADP-linked dehydrogenase in histological section; A quantitative study. *Biochem. J.* **96**: 11-12.
- Huang, J.K., L. Wen, M. Swegle, H.C. Tran, T.H. Thin, H.M. Naylor, S. Muthkrishnan and G.R. Reeck. 1991. Nucleotide sequence of a rice genomic clone that encodes a class I endochitinase. *Plant Mol. Biol.* **16**: 479-480.
- Hwang, S.J., Y.J. Min, G.S. Ha, T.J. Han, J.C. Kim, B.J. Ahn and B. Hwang. 1992. Biochemical characteristics of embryogenic and nonembryogenic cells in rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture* **19**: 197-203.
- Inoue, M. and E. Maeda. 1980. Effect of auxin and cytokinins on the occurrence of green regions in rice callus culture. *Japan J. Crop Sci.* **49**: 167-174.
- Joersbo, M., J.A. Andersen, F.T. Okkels and R. Rajagopal. 1989. Isoperoxidase as marker of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiol Plant.* **76**: 10-16.
- Kiyosue, T., J.G. Dong, S. Satoh, H. Kamada and H. Harada. 1990. Detection of embryogenic cell antigen in carrot. *Plant Cell Physiol.* **31**: 947-950.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Mikami, T. and T. Kinoshita. Genotypic effects on the callus from different explants of rice, *Oryza sativa* L. 1988. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **12**: 311-314.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* **15**: 73-497.
- Nabors, M.W., T.A. Heyser and K.J. Dykes Demdtt. 1983. Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. *Planta* **157**: 385-389.
- O'Farrell, P.Z. 1975. High resolution two-dimensional elect-

- rophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Park, H.Y. and S.I. Kim. 1993. Induction of chitinase in rice cell suspension culture treated with chitooligosaccharides mixture. *J. Korean Agr. Chem. Soc.* **36**: 1-6.
- Sengupta, C. and V. Raghavan. 1980. Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. I. Pattern of protein and nucleic acid synthesis. *J. Exp. Bot.* **31**: 247-251.
- Vijin, I., L. das Neves, Ab van Kammen, H. Franssen and T. Bisseling. 1993. Nod factors and nodulation in plants. *Science* **260**: 1764-1765.
- Wilde, H.D., W.S. Nelson, H. Booij, S.C. Vries and T.L. Thomas. 1988. Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta* **176**: 205-211.
- Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray and R. Hancock. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**: 197-203.
- Zhu, G. and C.J. Lamb. 1991. Isolation and characterization of a rice gene encoding a basic chitinase. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 289-296.

(1993. 10. 2 接受)