식물조직배양학회지 제21권 제2호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 21, No. 2, 111~115 (1994)

벼 (*Oryza sativa* L.) 培養細胞의 高重力誘導性 cDNA의 探索

權純泰* · 金吉雄[1] · 大野淸春[2]
安東大學校 自然科學大學 園藝育種學科, [1]慶北大學校 農科大學 農學科,
[2]日本 農業生物資源硏究所 細胞育種部

Screening of Gravity Inducible cDNAs in Rice (*Oryza sativa* L.) Cultured Cell

Soon Tae KWON*, Kil Ung KIM[1], and Kiyoharu OONO[2]
Department of Horticulture and Breeding, Andong National Univ., Kyungpook, 760-749:
[1]Department of Agronomy, Kyungpook National Univ., Taegu 702-701: and
[2]National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba 305, Japan. *Corresponding author.

Two different gravity specific cDNA, namely, GSC 13 and GSC 124 with the length of 1.34 and 0.67 kilobase pairs, and transcripts of 2.0 and 1.9 kilobase pairs, respectively, were isolated by differential screening and Northern hybridization from rice (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) cultured cells exposed to gravity stress at 450,000 x g for 2 h. Northern hybridization of the total RNA isolated from treated and untreated cultured cells showed that the maximum levels of transcripts were achieved after 4 h of gravity stress at 450,000 x g for both clones, GSC 13 and GSC 124, suggesting that these mRNA could be expressed and translated into special polypeptites related to the response of the cell to extream gravity stress.

Key words: differential screening, mRNA, polypeptide, transcript

지구의 고유중력인 1 x g보다 수십만배에 해당하는 고중력환경은 생물의 정상적인 생활사나 진화과정에 한번도 노출되지 않았던 스트레스일 것으로 사료된다. 식물이 이와 같은 특수한 환경조건에 직면하여 나타내는 반응은 타 일상적인 스트레스에 대한 반응과는 다른 메카니즘일 것으로 기대되나 강한 스트레스에 노출된 식물체는 유전자 중에서 어떤 생존과 관련된 변화를 일으킬 것으로 가정할 수 있다. 탈분화한 식물세포가 일시적으로 미지의 환경이나 스트레스에 처할 경우 보통보다 높은빈도의 변이가 일어날 수 있으며, 이는 식물이 극히 호조건에 있으면 도태가 일어날 수 있는 유전자형을 생육조건에 부적합한 환경을 줌으로써 후천적으로 발현되는 환경적응성 인자나 유용변이를 선발하는데 이용될 수 있다(Morijima, 1989: Fukuda et al., 1991: Nakanish et al., 1991).

전보에는 벼 배양세포의 고중력스트레스에 대한 반응 및 단백질패턴의 변화등을 구명하였으며, 이를 근거로 배양세포내 mRNA를 이용하여 in vitro translation한 결과 고중력스트레스에 의해서 발현되는 특이성 mRNA가 다수 존재함을 밝혔다(Kwon et al., 1992). 전보의 결과를 바탕으로 cDNA library의 제작 및 스크리닝을 수행하여 다수의 고중력 특이성 유전자(GSC, gravity specific clone)를 크로닝하였는데(Kwon et al., 1992), 본 보고에서는 고중력스트레스에 강한 특이성을 보인 GSC 13 및 GSC 124유전자에 관해서 밝히고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 벼 품종은 일본청(*Oryza sativa* L. cv Nipponbare)으로 캘러스유도 및 현탁배양세포계의 확립을

위한 식물재료의 준비, 배지조성, 배양환경 및 고중력의 처리방법은 전보와 동일하다(Kwon et al., 1992).

cDNA library제작 및 스크리닝

cDNA의 합성은 무처리의 벼배양세포와 중력 450,000 x g에 2시간동안 처리한 세포로부터 분리·정제한 poly(A)$^+$RNA에 oligo(dT) primer (Pharmacia 社)를 붙여 M-MuLV (Moloney-Murine Leukemia Virus) 역전사효소, DNA polymerase I, T4 DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase 등 일련의 처리과정을 거쳐 합성된 DNA를 Zap크로닝벡터(Stratagene 社)의 *Xho*I과 *Eco*RI 효소의 제한부위사이에 ligation시킴으로써 수행하였고, cDNA library는 고중력(450,000 x g, 2시간)을 처리한 배양세포로부터 유래된 cDNA를 phage내로 도입시켜 작성하였다(Kwon et al., 1992; Sambrook et al., 1989). cDNA library의 스크리닝은 중력을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포로부터 합성된 두 종류의 cDNA를 프로브(probe)로 plaque, colony, 및 Southern dot hybridization을 순차적으로 수행하여 고중력을 처리한 프로브에만 특이성을 나타내는 크론을 선발하였다(Sambrook et al., 1989).

제효소지도 및 세포유전자내의 확인

제한효소지도 작성에 사용된 효소는 pBluescript SK-프라스미드의 multicloning 부위에 존재하는 제한효소 절단부위를 참고하여 *Not*I, *Xba*I, *Spe*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Xho*I(5 overhang enzyme)과 *Sac*I, *Sac*Ⅱ, *Pst*I, *Kpn*I(3' overhang enzyme)을 사용하였다. 한편, 선발된 유전자의 세포유전자내에서의 존재를 확인하기 위해 배양세포로부터 DNA를 추출한 후 제한효소 *Eco*RI, *Xho*I, *Hind*Ⅲ, *Bam*HI, *Sal*I 및 *Xba*I 등으로 절단하여 각각의 cDNA 프로브와 Southern hybridization을 실시하였다(Sambrook et al., 1989).

유전자의 고중력특이성 발현의 확인

선발된 유전자 GSC 13과 GSC 124의 고중력특이성 발현 검정은 우선 pBluescript SK-프라스미드의 *Eco*RI과 *Xho*I 부위로 부터 cDNA를 분리한 후 ^{32}P로 표식한 프로브를 만들고, 중력강도 300,000 x g 및 450,000 x g에 2, 4, 12시간을 처리한 세포로부터 각각의 total RNA를 추출하여 Northern hybridization을 실시하였다. Transcript의 확인은 Sambrook등(1989)의 방법에 따라 autoradiography에 의해 조사하였다.

결과 및 고찰

cDNA library 제작 및 스크리닝

본 실험에서 제작된 cDNA library는 총 6.5×10^{5}개(pfu, plaque forming unit)로 그 중 약 2.5×10^{5}개를 plaque hybridization한 결과 82개가 고중력을 처리한 프로브에 양성반응(positive signal)을 나타내었다. 이들 82개의 plaque를 XL1-Blue 숙주균과 R408 helper phage를 이용하여 in vivo excision (Short et al., 1988)을 실시하여 pBluescript SK-프라스미드를 만들고, XL1-Blue에 숙주균이 형성한 colony를 각 5개씩 선발하여 다시 스크리닝한 결과 113개의 양성 colony를 얻었다. 고중력을 받은 배양세포의 mRNA로부터 합성·제작된 library 6.5×10^{5}개 중 몇 종류의 독립된 유전자가 포함되어 있는지는 알 수 없으나 총 스크리닝한 plaque 중에서 고중력양성인 크론이 선발될 수 있는 확율은 약 2,200 : 1 (0.045%) 정도로 추정된다(자료 미제시).

Figure 1은 In situ DNA (plaque, colony) hybridization에 의해 선발된 고중력양성크론에 GSC (gravity specific clone) 일련번호를 정하여 각각 3개씩의 colony에서 프라스미드만을 분리하여 Southern dot hybridization을 실시한 것으로, 고중력을 처리한 cDNA 프로브에 강한 특이성을 나타낸 GSC 12, GSC 13 과 GSC 124을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러나, GSC 12는 유전자의 크기, 제한효소지도, transcript의 크기 및 발현특성이 GSC 13과 같아서 이들 두 유전자는 동일한 phage로부터 증식된 것으로 판명되어 GSC 13을 중심으로 보고한다. 한편, 본 실험에서 선발된 다수의 크론은 배양세포가 고중력을 받음으로서 특이적으로 유도한 mRNA로부터 합성된 cDNA일 것으로 추정되므로, 스크리

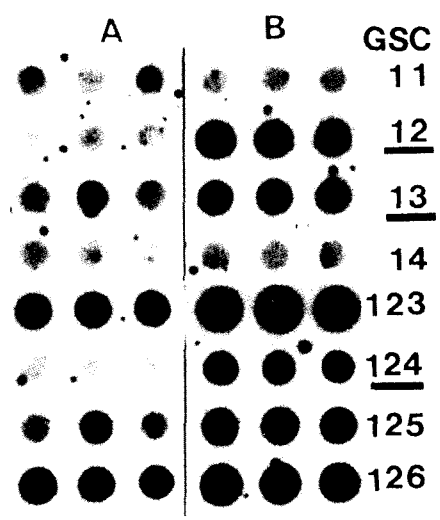

Figure 1. Screening of gravity specific clones (GSC) by Southern dot hybridization against ^{32}P-labelled cDNA probes from the untreated control (A) and treated rice cultured cells (B).

닝에 사용된 cDNA library내에는 고중력처리에 대해 특이성을 나타내는 유전정보가 함유되어 있음을 시사해 준다. 특정의 환경스트레스로부터 유도되어 크로닝된 유전자일지라도 타 종류의 일상적인 스트레스나 화학물질의 처리에 의해서도 발현이 가능하다고 보고되어 있는데(Mundy and Chua, 1990: Nordin et al., 1991: Parsons and Mattoo, 1991: Rickey and Belknap, 1991), 본 실험에서 선발된 크론들이 단지 고중력스트레스에 의해서만 유도될 수 있는 것인지 혹은 타 종류의 스트레스에 의해서도 유도가 가능한지를 알아보기 위해서는 이들 유전자의 발현특성을 타 스트레스와 연관지어 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

제한효소지도 및 세포유전자내의 확인

Figure 2는 GSC 13과 GSC 124 유전자가 포함된 pBluescript SK-프라스미드를 수종의 제한효소로 절단한 전기영동패턴으로 크로닝부위인 *Eco*RI과 *Xho*I 사이에 cDNA유전자가 확인되었다. GSC 13과 GSC 124의 크기는 각각 1.34 및 0.67 kilobase pair (kb)로 나타났으며, 이들 유전자의 제한효소지도는 Figure 3과 같다. 본 실험에서는 효소를 pBluescript SK-프라스미드의 multicloning 부위에 존재하는 효소군으로 한정하였으나 완전한 염기서열이 밝혀지면 타 제한효소의 절단부위도 유전자내에 존재할 것으로 추정된다.

Figure 4는 GSC 13과 GSC 124 유전자를 프로브로하여 배양세포의 게놈 DNA와 Southern hybridization을 실시한 것이다. 두 유전자 공히 벼 배양세포 유전자와 hybridization에서 강한 밴드를 보여, 이들 cDNA는 배양세포의 유전자로부터 발현된 mRNA로 부터 유래되어 합성된 것이라는 것을 증명해 준다. 한편, 제한효소에 의해 절단된 게놈 DNA와 뚜렷한 밴드를 보인 GSC 13 프로브의 *Eco*RI 5.8 kb 및 2.7 kb, *Xho*I 6.5 kb, 5.8 kb 및 1.4 kb, *Bam*HI 6.5 kb 및 5.8 kb 와 GSC 124 프로브의 *Eco*RI 2.0 kb 및 *Hind*Ⅲ 1.7 kb부위를 게놈 DNA로부터 분리하여 게놈 library를 만들었으며 관련 유전자의 크로닝을 실시하고 있다.

유전자의 고중력특이성 발현의 확인

Southern dot hybridization에 의해서 선발된 GSC 13과 GSC 124의 고중력특이성 발현을 조사하기 위해서 고중력

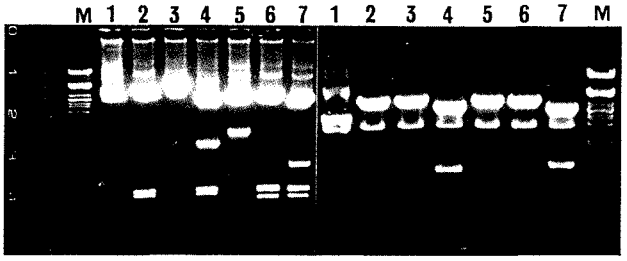

Figure 2. Restriction endonucleases analysis of GSC 13 and GSC 124 using multicloning site enzymes of pBluescript SK-plasmid. Lane 1: non-digested, 2: *Xho*I, 3: *Eco*RI, 4: *Xho*I-*Eco*RI, 5: *Kpn*I, 6: *Sac*I, 7: *Kpn*I-*Sac*I, Marker: Lambda *Pst*I.

Figure 4. Southern hybridization of rice genomic DNA digested with various restriction endonucleases and probed with GSC 13 and GSC 124. Lane 1: non-digested, 2: *Eco*RI, 3: *Xho*I, 4: *Eco*RI-*Xho*I, 5: *Hind*Ⅲ , 6: *Bam*HI, 7: *Sal*I, 8: *Xba*I.

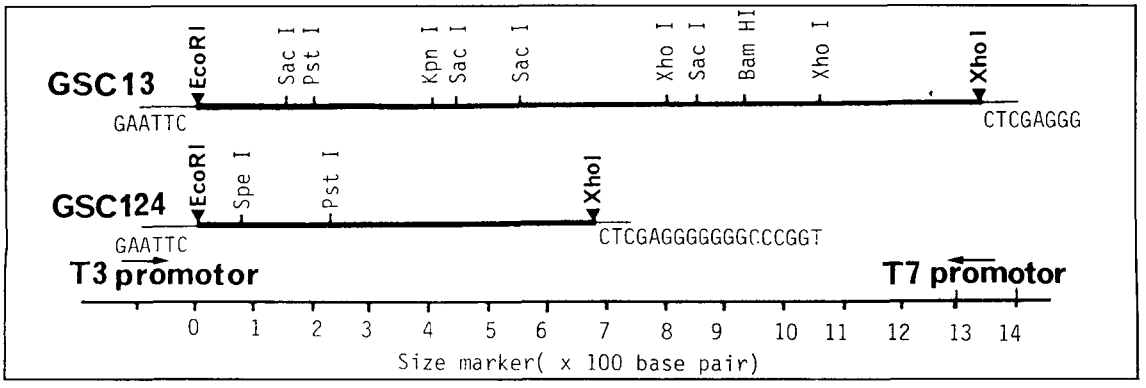

Figure 3. Restriction endonuclease maps of GSC 13 and GSC 124 inserts in pBluescript SK-plasmid.

을 처리한 배양세포의 total RNA에 상기 cDNA를 프로브로하여 Northern hybridization을 실시한 결과는 Figure 5와 같다. GSC 13와 관련된 세포내 transcript의 크기는 2.0 kb로 나타났으며, 무처리에서는 mRNA의 발현이 최소한의 수준으로 나타나지만 중력강도가 300,000 x g에서 450,000 x g로 증가하거나 처리시간이 2시간에서 4시간으로 증가하면서 더욱 강하게 축적되는 것을 볼 수 있다. 그러나, 450,000 x g 12시간처리는 4시간처리에 비해 약간의 감소를 보여 배양세포내 고중력유도성 mRNA의 축적이 한계점에 도달하지 않는 것으로 사료된다. 한편, GSC 124는 1.9 kb의 transcript가 관찰되었으며 고중력에 의한 특이성은 GSC 13과 비슷한 경향을 보이나 300,000 x g에 대한 민감성은 GSC 13에 비해 낮으며 450,000 x g처리에서는 무처리에 비해 mRNA의 축적이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. GSC 13과 GSC 124의 크기는 각각 1.34 kb 및 0.67 kb이며 transcript 크기는 각각 2.0 kb 및 1.9 kb로 cDNA의 길이가 transcript보다 작은 것은 cDNA 합성과정에서 poly(A)+RNA로부터 역전사되는 율이 낮았던 것으로 추정되며, 이렇게 합성된 cDNA는 역전사율에 관계없이 동일한 homology에 hybridization되므로 나타나는 현상으로 사료된다. Genomic Southern hybridization에서 세포내 관련 유전자가 cDNA의 크기에 비해 월등히 큰것도 이와 관련이 있을 것이다. 선발된 GCS 13과 GCS 124의 mRNA가 배양세포내에서 고중력하에서만 특이적으로 발현되는 유전자인지는 본 실험의 결과로 결론짓기 어려우나, 전보(Kwon et al., 1993)에서 고중력에 의해 강하게 축적되는 새로운 polypeptide와 mRNA가 확인된 것으로 보아 이들 유전자는 세포내에서 고중력에 의해 특이적으로 활성화되어 mRNA로의 전사 및 단백질번역에 관여할 수 있을 것으로 추정된다.

이상의 결과로, 벼 배양세포는 특이적인 mRNA와 단백질 합성을 유도하는 내부의 유전자를 활성화시키면서 고중력 스트레스와 같은 생존의 한계상황에 반응한다는 것을 알 수 있었다. 이들 유전자가 세포내에서 담당하는 기능이 단순한 스트레스유도성 인지, 아니면 생존의 한계상황과 관련이 있는지는 알기 어려우나, 본 실험의 결과는 스트레스에 대한 식물의 반응메카니즘 연구는 물론, 식물이 생존의 극한상황에 직면했을 때 일어날 수 있는 유전자의 변화를 탐색하는 연구에 도움이 되리라 사료된다. 금후, 이들 유전자의 염기서열결정은 물론 세포염색체 내에서의 위치확인 및 구조등을 밝히고 발현특성 및 저항성이나 스트레스의 적응 또는 극복과 관련된 연구를 수행할 필요가 있을 것이다.

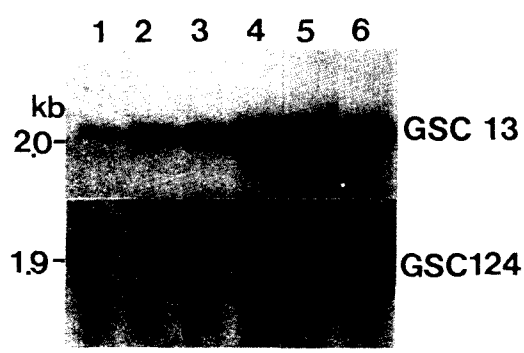

Figure 5. Northern hybridization of GSC 13 and GSC 124 against total RNA extracted from rice cultured cell after gravity treatment. Lane 1: untreated control, 2: 300,000 x g for 2 h, 3: 300,000 x g, 4 h, 4: 450,000 x g, 2 h, 5: 450,000 x g, 4 h, 6: 450,000 x g, 12 h.

적 요

벼(*Oryza sativa* L. cv Nipponbare)배양세포에 중력 450,000 x g를 처리하여 cDNA library를 만들고, 무처리 및 고중력을 처리한 cDNA 프로브로 스크리닝을 실시하여 고중력에 특이적으로 양성반응을 나타내는 GSC 13 및 GSC 124 cDNA를 선발하였다. 선발된 두 유전자 GSC 13 및 GSC 124의 길이는 각각 1.34 및 0.67 kilobase pairs였으며, 배양세포내에서 관련된 transcript의 크기는 각각 2.0 및 1.9 kilobase pairs인것으로 나타났다. 두 유전자를 프로브로한 Northern hybridization을 실시한 결과 GSC 13, GSC 124공히 배양세포내에 고중력처리에 의해 특이적으로 축적되는 mRNA가 나타났으며, 중력강도 300,000 x g에 비해 450,000 xg 처리에서 더욱 강한 축적을 보였고 450,000 x g 4시간 처리에서 최대의 수준을 보였다.

인 용 문 헌

Fukuda M, Akihama T, Oono K (1991) Effect of gravity on plant and cultured cell. J Jpn Breeding (suppl) **41**: 296-297

Kwon ST, Oono K, Kim KU (1992) Responses of rice (*Oryza sativa* L.) plant and cultured cell to strong gravity stress. Korean J Plant Tissue Culture **19**: 233-240

Kwon ST, Kikuchi S, Oono K (1992) Molecular cloning and characterization of gravity specific cDNA in rice (*Oryza sativa* L.) suspension callus. Jpn J Genet **67**: 335-348

Morijima K (1989) Genetics of stress avoidence in crop. Jpn Sci Res Report pp 63-85

Mundy J, Chua NH (1988) Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. EMBO J **7**: 2279-2286

Nakanish H, Moti S, Ueno N (1991) Effect of gravity stimulation on organ formation from wheat callus. J Jpn Breeding (suppl) **41**: 294-295

Nordin K, Heino P, Palva ET (1991) Separate signal pathways regulate

the expression of a low temperature-induced gene in *Arabidapsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Molecular Biology **16**:1061-1071

Parsons BL, Mattoo AK (1991) Wound-regulated accumulation of specific transcripts in tomato fruit: interaction with fruit development, ethylene and light. Plant Mol Bio **17**: 453-464

Rickey TM, Belknap WR (1991) Comparision of the expression of several stress-responsive gene in potato tubes. Plant Mol Biol **16**: 1009-1018

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse W (1988) LamdaZap: an expression vector with in vivo excision properties. Nucl Acids Res **16**: 7583-7599

(1994년 1월 30일 접수)