

완두(*Pisum sativum* L.) 근관의 생장과 관련된 표피세포의 분화와 유전자 발현

우호형¹ · 장매희*

¹아리조나 주립대학 식물병리학 및 분자세포생물학과, 서울여자대학교 자연과학대학 원예학과

Molecular Analysis of the Border Cell Differentiation in Root Cap of *Pisum sativum* L.

Ho-Hyung WOO¹ and Mae Hee CHIANG*

¹Departments of Plant Pathology and Molecular & Cellular Biology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA:
and Department of Horticultural Science, Seoul Woman's University, Seoul, 139-774. *Corresponding author.

Border cells are differentiated cells which originate from meristematic cells in the root cap. Experimentally, border cells can be released from the root cap by a physical treatment, for example dipping the root tip in the water. After 20-25 hours of release, the new border cell layer forms in the root cap. During the border cell differentiation, new gene expressions were observed in the root cap of pea which was determined by mRNA differential display. These new gene expressions may be involved in the border cell differentiation. Border cells had unique gene expressions which were determined by mRNA differential display. This suggests that border cells are differentiated cells which are different from the other tissues (ie., leaves, stems, roots or root caps).

Key words: differential gene expression, mRNA differential display

근관 표피세포 (border cell)는 단일세포로 분화되어 있으면서, 뿌리를 감싸고 있는 근관 표피세포층을 형성한다 (Hawes and Brigham, 1992). 즉, 이러한 근관 표피세포층은 뿌리와 토양간의 생물적 또는 물리적 막을 형성하게 된다. 근관 표피세포는 근관의 분열조직(root cap meristem)에서 유래한다. 즉, 세포분열후에 근관의 분열조직은 여러 분화 단계를 거쳐서 근관 표피세포가 된다. 이 근관 표피세포는 실험실내에서는 뿌리끝을 물속에 담가두면, 즉시 근관에서 분리된다. 이들 근관 표피세포들간의 분리는 세포벽 분해효소들이 펙틴층(pectin layer)을 분해하면서 시작된다고 알려져 있다(Hawes and Lin, 1990). 그 예로, 근관의 세포벽 분해에 관여하는 pectin methylesterase의 활성이 근관 표피세포가 분화되기 바로 직전에 증가했다가 감소하는 것이 관찰되었다(Stephenson and Hawes, 1994).

근관 표피세포는 근관의 분열조직에서부터 계속 분화되고 있는 세포로서의 대사작용 및 단백질 합성이 활발한 세포이다(Brigham et al., 1995). 근관 표피 세포의 기능은 확실치 않지만, 지금까지의 관찰로 알려져 있는 것은 근관 표피세포가 토양병원균을 유인하는 기능을 가지고 있음이 관

찰되었다. 즉, 근관 표피세포를 제거한 뿌리와 단일세포로 분화된 근관 표피세포를 한 시험관에 넣어주고, 토양병원균을 넣어주면 근관 표피세포에만 토양병원균이 달라붙고, 근관 표피세포를 제거한 뿌리에는 달라붙지 않는다(Hawes and Brigham, 1992). 이는 분화된 단일세포인 근관 표피세포가 알려져 있지않는 화학유인제를 방출하여 토양병원균을 유인함으로써, 뿌리로 침입하는 토양병원균을 대신 막아주는 구실을 하는 것으로 추측된다. 지금까지의 연구로는 근관 표피세포가 *Agrobacterium*의 *vir* gene의 발현을 유도하는 화학유인제(inducer)나 *Rhizobium*의 *nod* gene의 발현을 유도하는 화학유인제를 방출하는 것으로 밝혀졌다(Zhu et al., 1995). 한편, 근관 표피세포를 제거한 근관은 이들 화학유인제를 방출하지 않는다고 한다.

본 실험에서는 완두콩의 근관 표피세포가 분화할 때, 근관(root cap)에서 새로운 유전자들이 발현되는 것을 규명하였다. 아울러, 완두콩의 근관 표피세포에서 발현되는 유전자들을 처음으로 관찰하였고, 또한 근관 표피세포는 분화된 단일세포로서 다른 세포와는 다른 유전자 발현이 일어나고 있음을 제시하였다.

재료 및 방법

완두콩 종자의 발아

완두콩(*Pisum sativum* L.: cv Little Marvel) 종자를 10분 동안 95% 에탄올로 씻은 후 100%표백제(5.25% sodium hypochlorite)로 30분간 소독하였다. 그 후 증류수로 여러번 세척한 후, 6시간 동안 증류수속에 담가두었는데, 매번 1시간마다 증류수를 갈아주었다. 그 후, 표면 살균한 종자를 한천배지(1.2% agar)에 등근 여과지를 올려놓은 petri dish에서 2-3 일간 발아시켰다. 2-3일 후 2.5 cm가량의 뿌리가 나오면 배양을 중지하였다.

RNA 분리와 mRNA Differential Display

근관의 RNA 분석을 위한 시료는 발아 후 2.5 cm 가량 자란 뿌리에서 근단부위의 1.5 mm의 뿌리끝을 면도날로 잘라서 채취 하였다. 또한, 근관 표피세포 시료는 발아된 종자의 뿌리의 끝을 증류수로 씻어서 근관 표피세포를 모았다. 근관 표피세포의 분화를 유도하기 위한 실험재료는 뿌리끝을 증류수로 씻어 근관 표피세포를 제거한 후, 다시 근관에서 근관 표피세포의 분화를 유도하였는데 15분, 30분 그리고 60분간 재배양한 후에 1.5 mm의 뿌리끝을 면도날로 잘라서 채취하였다. 또한, 발아된 완두콩 종자를 growth pouch에서 2-3주일 키운 후, 잎, 줄기와 뿌리를 채취하였다.

Total RNA는 guanidine thiocyanate를 사용하여 분리하였다(Sambrook et al., 1989). 하나의 뿌리끝에서는 평균 25 mg의 Total RNA가 나왔고, 하나의 근관에서 분리된 약 3,500개의 근관 표피세포서는 평균 10-20 μ g의 Total RNA가 나왔다.

mRNA differential display (Liang and Pardee, 1992)는 RNA Map kit (GenHunter, Brookline, MA, USA)를 사용하였다. 200 ng의 Total RNA를 사용하여 single strand cDNA를 만들고, 이 single strand cDNA를 Template로 하여서 PCR을 하였으며, 모든 반응조건들은 RNA Map kit의 방법에 준하였다. PCR primer는 arbitrary 10-mer와 T₁₂MN (M=degenerated sequence of A, C와 G: N=A, C, G 또는 T)을 사용하였다. PCR조건은 94°C에서 10초, 40°C에서 2분, 그리고 72°C에서 30초를 40회 반복하였다. PCR이 끝난 후 반응물은 6% urea denaturing PAGE에서 분리한 후 gel dryer에서 말리고 X-ray film에 감광, 현상하였다.

Ribonuclease Protection Analysis

각 식물조직 (잎, 줄기, 뿌리 그리고 근관 표피세포)으로부터 분리된 10 μ g의 total RNA들을 사용하여 ribonuclease protection analysis를 하였다. RPAII kit (Ambion, Austin,

Texas, USA)를 사용하였다. 모든 반응조건들은 RPAII kit의 방법에 준하였다. Ribonuclease protection이 끝난 후 반응물은 5% urea denaturing PAGE에서 분리한 후 X-ray film에 감광, 현상하였다.

결 과

근관 표피세포의 분화에 대한 형태학적 관찰

근관이 성장하면서 근관 표피세포의 분화는 계속 일어나는데, 완두콩의 뿌리 끝을 물속에 잠시 넣어 두면, 곧바로 이 분화된 근관 표피세포가 근관으로부터 단일세포로 분리되어 나오는 것을 관찰할 수 있었다. 일반적으로 완두콩의 경우 뿌리의 길이가 2.5 cm에 도달했을 때 최대량의 근관 표피세포가 분리되는데, 그 숫자는 평균 3,500개 정도이다 (Fig. 1C). 근관 표피세포가 분리된 후 근관은 새로운 분화를 시작하여 20-25 시간이 지나면 새로운 층의 근관 표피세포가 형성되고, 이로써, 근관 표피세포의 분화는 일단락된다 (Fig. 1A, B).

뿌리끝을 물로 씻어내어 단일세포로 분화된 근관표피 세포를 근관에서 분리하면, 새로운 층의 근관 표피세포가 근관에서 분화되기 시작한다. 즉, 근관 표피세포의 제거는 근관에서 새로운 층의 근관 표피세포의 분화를 유도한다는 것을 알 수 있다.

이때 외부로부터의 물리적인 힘, 또는 알려지지 않은 생물화학물질들의 변화가 근관의 분열조직에 신호를 전달하여 새로운 유전자 발현이 일어나고, 결국 새로운 근관 표피 세포층이 형성된다고 볼 수 있다. 이 새로운 유전자 발현이 일어나는 것을 확인하기 위하여 mRNA differential display를 수행하였다. 근관에서 근관 표피세포를 제거한 후 15분, 30분 그리고 60분간 재배양한 후에 근관에서 발현되는 유전자들을 비교한 결과, 많은 유전자들이 새로이 발현되고 있음이 관찰되었다(Fig. 2). 즉, 근관 표피세포의 분화를 유도하고 15분이 경과된 후부터 근관에서는 유전자 발현에 큰 변화가 일어나고 있음이 관찰되었다(Fig. 2A 와 B, lanes 5, 6, 7). 일례로, mRNA A의 경우 근관 표피세포의 분화를 유도한 후 15분이 경과된 근관에서만 발현되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2B, lane 5). 이에 따라, 새롭게 발현되는 이러한 유전자들의 일부는 근관 표피세포의 분화에 관여하는 것으로 추측되었다. 하지만, 잎, 줄기 그리고 근관을 제거한 뿌리에서는 유전자 발현이 비슷하게 일어나고 있음이 관찰되었다 (Fig. 2A 와 B, lanes 1, 2, 3).

근관 표피세포는 세포형태학적으로 근관의 세포들과는 다르다는 것이 알려져 있다(Hawes and Brigham, 1992). 분자수준에서 유전자 발현도 다른가 하는 것을 밝히기 위하여 mRNA differential display로 근관 표피세포에서 발현되



Figure 1. Morphology of the pea root tip and border cells suspended in the water. The root tip and border cells were observed under the Stermi SV80 magnifier (Zeiss, Germany) with 50-64 X magnification. (A) The pea root tip releasing border cells in the water. (B) The washed pea root tip without border cells. (C) Border cells suspended in the water.

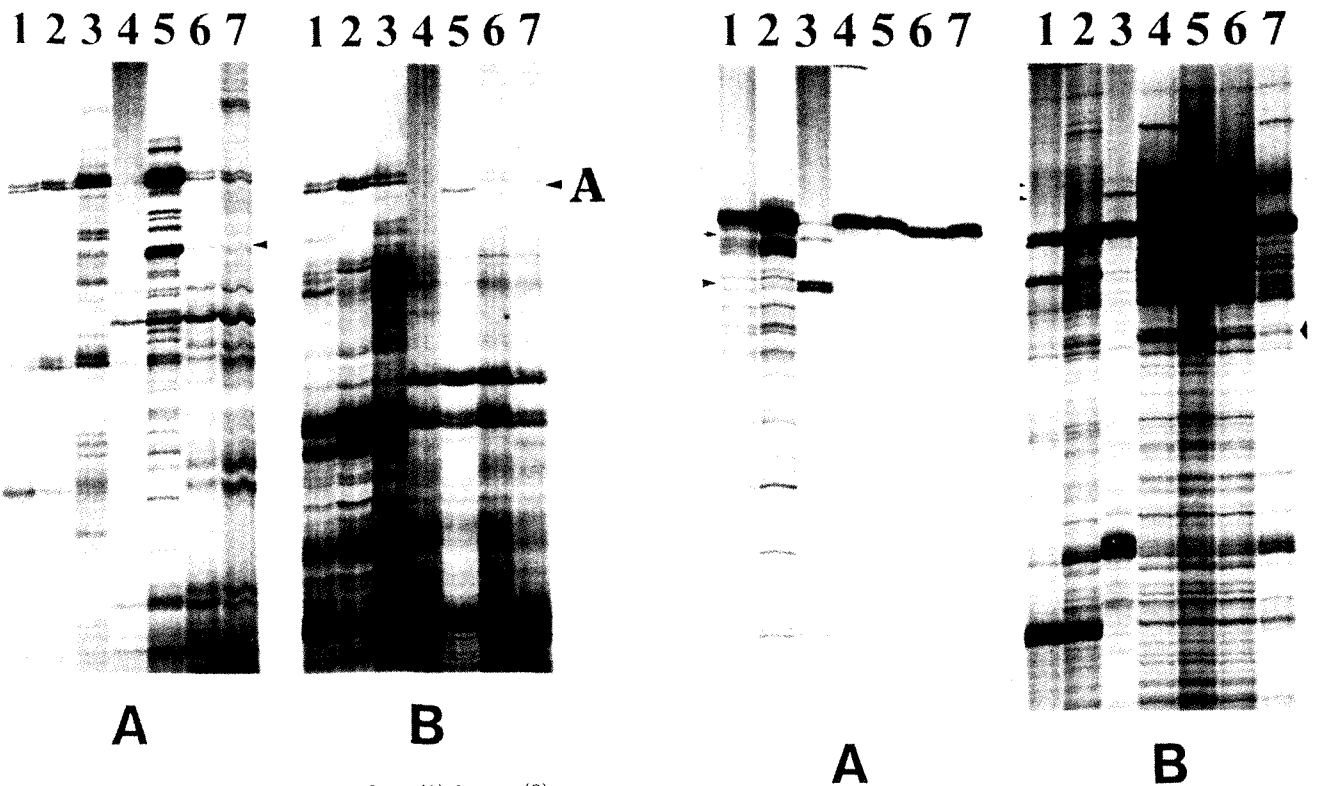


Figure 2. Differential display of mRNAs from (1) leaves, (2) stems, (3) roots without root tips, (4) root tips with border cells, (5) root tips 15 min. after washing, (6) 30 min. after washing and (7) 60 min. after washing. The arrow indicates mRNA A which was expressed in (5) root tips 15 min. after washing (Fig. 2B).

Figure 3. Differential display of mRNAs from (1) root tips with border cells, (2) washed root tips without border cells, (3) border cells, (4) leaves, (5) stems, (6) roots and (7) roots without root tips. Arrows indicate the (3) putative border cell-specific messages.

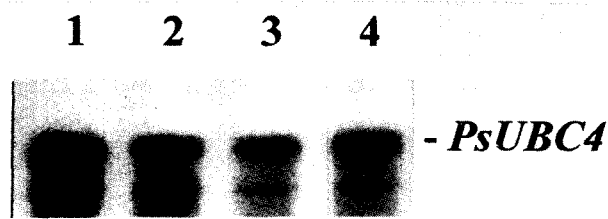


Figure 4. Expression of *PsUBC4* detected by ribonuclease protection analysis. (1) Leaves, (2) stems, (3) roots and (4) border cells.

는 mRNA들을 다른 조직 (잎, 줄기 그리고 뿌리와 근관 표피세포를 제거한 근관)에서 발현되는 mRNA들과 비교하였다. 이미 2-D gel을 이용하여서 근관 표피세포에는 많은 다른 종류의 단백질들이 존재한다는 것이 알려져 있어서 (Brigham et al., 1995), 유전자 발현이 다를 것으로 예측되었기 때문이다.

잎, 줄기 그리고 뿌리와 근관 표피세포를 제거한 근관을 비교한 경우 유전자 발현이 매우 비슷한 것을 알 수 있었다 (Fig. 3A와 B, lanes 1, 2, 4, 5, 6, 7). 하지만 근관 표피세포의 유전자 발현은 다른 조직의 유전자 발현과는 매우 다르게 나타났다 (Fig. 3A와 B, lane 3). 이 실험의 결과로 알 수 있는 것은 근관 표피세포는 다른 조직과 마찬가지로 유전자 발현이 활발하지만, 다른 조직과는 달리 독특한 유전자들이 발현되는 분화된 특수세포라는 것이다. 예를 들어, 한 set의 PCR Primer를 사용한 경우 평균 50-100개의 mRNA들을 관찰할 수 있었고, 이 경우 근관 표피세포에서는 1-2개의 독특한 유전자들이 발현되고 있는 것이 관찰되었다.

하지만, 대부분의 유전자들은 다른 조직(즉, 잎, 줄기, 뿌리 그리고 근관)에서와 마찬가지로 근관 표피세포에서도 비슷한 정도로 발현되었다. 일례로, 근관 표피세포를 포함해서 식물의 다른 조직에서 비슷하게 발현되는 유전자들중의 하나를 분리하여서 염기배열을 조사한 결과 ubiquitin conjugating enzyme (UBC)을 코딩하는 유전자가 밝혀졌다 (Woo et al., 1994). 이 UBC는 세포내 비정상 단백질을 제거하는 효소로서 필수단백질이다. 즉, UBC를 포함한 필수 단백질을 코딩하는 유전자들은 식물의 다른 조직과 마찬가지로 근관 표피세포에서도 비슷한 수준으로 발현되고 있음을 추측할 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

80년전 처음으로 근관 표피세포가 관찰된 이후 (Merrill, 1915) 지금까지도 근관의 성장과 관련된 근관 표피세포의 기능에 대해서는 알려져 있는 것이 없다. 본 논문은 처음으로 근관 표피세포에서 활발한 유전자 발현이 일어난다는 증거를 제시함으로써, 근관 표피세포가 대사작용이 활발한

살아있는 단일세포라는 증거를 보여 주었다. 이러한 실험 결과는 지금까지의 근관 표피세포에 대한 개념을 바꾸는 동시에, 또한 근관 표피세포가 알려져 있지않은 중요한 기능을 가지고 있다는 증거를 제시하였다.

완두콩의 근관 조직은 10-15개의 세포층으로 구성된 간단한 구조를 가지고 있다. 지금까지 알려져 있는 근관의 기능은 토양속에서 뿌리가 자랄때, 근관 표피세포층이 근관의 성장점을 보호하면서 뿌리를 도와 토양속을 쉽게 통과하도록 하는 것으로 추측된다 (Esau, 1960). 또한, 근관은 지구의 중력을 감지하여 뿌리가 자라는 방향을 결정하는 것으로 알려져 있다 (Fahn, 1990). 근관의 최외각 세포층은 근관 표피세포로 분화가 되는데, 이 근관 표피세포는 근관의 분열조직 (root cap meristem)에서 유래된 것이다. 근관의 간단한 구조와 근관 표피세포의 분화특성은, 이 근관을 고등식물의 세포분화 연구에 적합한 실험 대상으로 제시하고 있다. 근관에서 근관 표피세포를 물리적으로 제거하면 4시간 이내에 근관의 분열조직에서의 활발한 분열 및 근관 표피 세포의 분화가 일어나고, 20-25 시간후에는 새로운 층의 근관 표피세포가 만들어진 것을 관찰할 수 있었다. 이 새로운 근관 표피세포층이 분화되는 기간 동안 Fig. 2에서 제시한 것처럼 1시간 이내에 새로운 유전자들이 발현되는 것을 확인하였으며, 이 유전자들 중의 일부는 근관 표피세포의 분화에 관련되어 있다고 추측된다.

적 요

근관 표피세포 (border cell)는 근관 (root cap)의 최외각 세포층에서 분화된 단일세포로서, 물리적인 힘을 가하면 예를 들어 근관의 근관 표피세포를 물로 씻어내면, 20~25시간 이후에는 새로운 층의 근관 표피세포가 근관에 형성된다. 이 새로운 층의 완두 근관 표피세포가 형성되는 동안 근관 표피세포가 제거된 근관에서는 새로운 유전자 발현이 일어나고 있음이 mRNA differential display로 확인되었다. 즉, 이들 근관에서 새롭게 발현되는 유전자들의 일부는 근관 표피 세포의 분화에 관련되어 있다고 볼 수 있다. 또한, 단일 세포로 분화된 근관 표피세포에서는 독특한 유전자 발현이 일어나고 있음이 mRNA differential display로 확인 되었다. 이 결과로 알 수 있는 것은 근관 표피세포는 다른 조직(잎, 줄기, 뿌리와 근관 표피세포가 제거된 근관)과는 다른 독특한 기능을 가졌다는 것이다.

인용 문헌

Brigham LA, Woo HH, Nicoll SM, Hawes MC. (1995) Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of

- Pisum sativum* L. Plant Physiology 107,10
- Czako M, An G.**(1991) Expression of DNA coding for diphtheria toxin A is toxic to plant cells. Plant Physiology 95: 687-692
- Esau K.**(1960) Plant Anatomy. Wiley and Sons. New York
- Fahn A.**(1990) Plant Anatomy Fourth edition. Pergamon Press. Oxford
- Hawes MC, Lin HJ.**(1990) Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*), Plant Physiology 94: 1855-1859
- Hawes MC, Brigham LA.**(1992) Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. Advances in Plant Pathology 8: 119-148
- Liang P, Pardee AB.** (1992) Differential display of eukaryotic messenger mRNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971
- Mariani C, De Béuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB.** (1990) Induction of male sterility in plants by a chimseric ribonuclease gene. Nature 347: 737-740
- Merrill MC.**(1915) Ann. Missouri Bot. Gardens 2: 507-572
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989) Molecular cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Stephenson MB, Hawes MC.** (1994) Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. Plant Physiology 106. 739-745
- Woo HH, Brigham LA, Hawes MC.** (1994) Primary structure of the mRNA encoding a 16.5-kDa ubiquitin-conjugating enzyme of *Pisum sativum*. Gene 148. 2: 369-370
- Zhu YM, Pierson LS, Hawes MC.** (1995) Selective induction of microbial genes by chemicals from root border cells. Plant Physiology 107: 11

(1995년 6월 5일 접수)