식물조직배양학회지 제26권 제2호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 26, No. 2, 121~126 (1999)

참나물 현탁배양세포 유래 배발생캘러스에서 HD-Zip 유전자, *Phc5*의 클로닝과 특성

손수인* · 김준철
강원대학교 생명과학부

Cloning and Characterization of Homeodomain-Zip Gene, *Phc5* in Embryogenic Callus derived from *Pimpinella brachycarpa* Suspension Cultured Cells

SON, Su In · KIM, Joon Chul*
Department of Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT Calli were induced from the petiole explants of *Pimpinella brachycarpa* on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA after four weeks of culture. Compact clusters of small and dense cells among these calli were selected and suspension-cultured as the source of embryogenic calli. When transferred to MS medium with 0.1 mg/L NAA, the suspension-cultured cells grew to embryogenic callus. Somatic embryos derived from these embryogenic calli developed into plantlets. The cDNA library was constructed in the embryogenic callus and in order to screen the cDNA library, these cDNAs were plated at a density 1.5×10^5 plaques per 15 cm petridish. Among 19 clones showing preferential hybridization with petiole HD-Zip gene, five clones were obtained after second screening. Four clones among them, were highly homologous to *P. brachycarpa* shoot-tip *Phz4* gene, but one clone, *Phc5* was about 1.5 kb which has an extra 163 bp to 5' upstream of *Phz4*. The *Phc5* was 1,531 bp containing poly A tails of 18 bases. ATG start codon for *Phc5*, was located at position 284 with an open reading frame of 906 bp which encodes a polypeptide of 302 amino acids. The *Phc5* protein revealed that the polypeptides between 135 and 195 contain a homeodomain as the 'leucine zipper' motif.

Key words: Embryogenic callus, somatic embryo, plantlet, cDNA library, HD-Zip gene

서 론

식물 조직배양을 통해 배양세포는 배발생세포와 비배발생세포로 구분되고 재분화능력이 있는 배발생세포의 특성을 비배발생세포와 비교하여 차이점을 밝히는 많은 연구가 진행되었다 (Halperin 1986; Thorpe 1993). 그러나 식물의 배양세포들에서 이러한 두 종류의 특성과 기능을 나타내는 것은 세포내 생리적이고 일시적인 변화에 기인한 재분화능력의 차이때문인지 또는 유전적요인에 의한 세포형태가 재결정되고 유전자발현의 선택적변화가 일어나기 때문인지 확실치 않다. 체세포배발생을 통한 식물체 재분화과정의 분자유전학적 연구는 분화세포와 미분화세포간에는 DNA 유형에 상당한 차이가 있다는 것을 밝혔으며 (Loutos-Thevnot et al. 1990), 캘러스로부터 재분화과정에 대한 연구는 기내배양세포들의 shoot 형성능력을 높이는 정도에 그쳤다 (Lin et al. 1984; Franz et al. 1989; Aleith and Richter 1990). 또한 식물분화과정에 따

*Corresponding author. Tel 0361-250-8526
E-mail jckim@cc.kangwon.ac.kr

른 유전자 발현의 변화에서 cDNA library로부터 정단분열조직에서 특이적으로 전사되는 유전자들이 발현되는 것이 보고되었으며 (Meeks-Wagner et al. 1989), 기내 (*in vitro*)에서 식물의 조직으로부터 기관형성은 외적요인과 내적요인의 조절작용에 의해 일어난다고 알려졌다 (Thorpe 1993). 식물체를 비롯한 다양한 생물체의 발달 및 분화과정에는 그 과정에 필요한 유전자의 전사 과정을 조절하는 많은 종류의 전사조절자 (transcription factor)가 존재한다. HD 유전자는 가장 많이 알려진 DNA 결합 유전자로서 여러 생물체의 분화 및 발달과정의 조절에 중요한 역할을 하며, 다양한 생물체의 발달 프로그램의 차이와는 상관없이, 발달과정의 중요한 전사조절자임이 증명되었다 (Harvey and Melton 1988; Le Mouellic et al. 1992; Smith et al. 1992). 이들 전사조절자 중 HD-Zip 유전자는 기존에 보고된 바 없는 새로운 구조적 특징, 즉, HD와 leucine zipper 구조를 함께 가지고 있으며, 이러한 유전자가 지금까지 식물체, 특히 쌍자엽식물에서만 발견되었다는 사실은 HD-Zip 유전자가 쌍자엽식물의 고유적인 분화 및 발달에 관여하리라는 추측을 가능하게 한다. 따라서 쌍자엽식물체에서 HD-Zip 유전자를 분리하여 특성을 구명함은 이러한 부류의 전사조절자에 대한 전반적인 특성을 이해하는데 도움을 줄 것으로 여겨진다.

참나물 (*Pimpinella brachycarpa*)의 현탁배양세포로부터 배발생캘러스 (embryogenic callus)의 형성과 재분화체계를 확립하고, 배발생세포집단을 형태발생학적으로 이끄는 과정을 밝히고자, 참나물의 엽병조직으로부터 배발생캘러스를 유도하고 이들을 현탁배양하여 체세포배발생이 가능한 세포집단을 다량 분리하였으며, 이들로부터 cDNA library를 합성하여 배발생 관련 유전자를 클로닝하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

배발생캘러스의 선별 및 현탁배양

참나물 (*Pimpinella brachycarpa*)은 농촌진흥청 고령지 시험장에서 분양받았으며, 온실에서 3개월 이상 자란 식물의 엽병이 실험재료로 사용되었다. Callus 유도, 체세포배 발생 및 식물체 재분화를 위해 식물생장조절물질인 2,4-D, NAA, BAP, GA_3 및 MS염이 사용되었다. 엽병은 Triton X-100이 첨가된 4 % NaOCl를 포함한 유한락스 (유한코락스 제품)를 10배로 희석한 용액에서 15분간 소독하였으며, 멸균 증류수로 5회 세척하여 소독액을 제거하였다. 이 무균화된 엽병은 0.5 cm로 절단하고 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 MS배지에 접종되었다 (Kim et al. 1996). 배양조직의 접종개체수는 처리구당 10개체씩 3반복으로 하였고, 27℃ 암소에서 배양하여 배양절편체와 식물생장조절물질의 종류에 따른 캘러스 유도 정도를 비교하였다. 본 실험에 사용된 배지는 MS 기본배지에 3% sucrose와 0.2% gelrite를 첨가한 후 pH 5.8로 조정하였다. 이들 캘러스는 MS유도배지에서 계대배양을 하여 세포들이 매우 치밀하고 그 표면에 광택이 있으면서 nodular한 배발생line을 선별하였다. 이들 배발생캘러스 (embryogenic callus)는 현탁배양을 위해 약 1 g을 잘게 조각내어 50 mL의 MS액체배지 (0.5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BAP)가 포함된 배양병에 넣고 배양 2개월 동안은 3일 간격으로 27℃ 암소에서 100 rpm으로 진탕 계대배양하였으며, 2개월 후부터 520 μm, 380 μm, 230 μm의 시이브로 차례로 걸러 230μm보다 큰 세포덩어리를 제거하였으며, 이후에는 7일 간격으로 진탕 계대배양하였다.

체세포배발생 및 식물체 재분화

배발생캘러스는 0.1 mg/L의 NAA가 포함된 MS고체 (0.2% gelrite)배지에 옮겨 배의 발육을 유도하였으며, 체세포배의 발아를 위해 0.2 mg/L GA_3가 첨가된 MS 액체배지가 분주된 petridish에서 배양하였다.

cDNA library의 작성 및 Differential Screening

참나물의 배발생캘러스 10 g을 액체질소로 급냉각시켜 막자사발에서 마쇄한 후 6 mL의 추출용 완충액 [5 M guanidine isothiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarkocyl, 2 mM EDTA, 5% β-mercaptoethanol]을 첨가하여 50℃에서 10분간 처리하였다. RNA 추출은 20℃에서 20,000 × g로 20분간 원심분리하여 상장액을 얻고, CsCl을 0.1 g/mL되게 첨가하여 녹인 후 다시 원심분리하여 불순물을 제거하였다. RNA 침전물을 얻기 위해서는 3~5 mL CsCl 용액 위에 RNA 추출용액을 8~10 mL씩 얹은 후 20℃에서 150,000 × g로 18~24 시간 동안 초원심분리하였다. 원심분리를 통해 얻어진 RNA는 7 M urea 용액에 녹인 후 페놀/클로로포름으로 추출하고, 다시 클로로포름으로 추출한 후 3 M sodium acetate와 에탄올을 첨가하여 침전시켰다. 이렇게 얻은 RNA는 DEPC를 처리한 증류수에 녹이고 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다 (Nagy et al. 1988). Poly (A)+RNA는 Poly (A)+Quick mRNA Isolation Kit (Stratagene)를 이용하여 분리하였다. 분리한 mRNA는 DEPC를 처리한 증류수에 녹이고 ethidium bromide 평판분석에 의하여 그 양을 정량하여 약 5 μg을 cDNA합성의 시료로 사용하였다. Poly (A)+RNA는 Oligo (dT) primer를 사용하여 double strand의 cDNA를 합성한 다음 *Eco*RI adaptor를 이용하여 Uni-ZAP™ XR vector (Stratagene)에 삽입하여 cDNA library를 제작하였다.

cDNA library의 screening

파아지는 15 cm petridish당 약 1.5 × 10^5개의 밀도로 plating하였으며 총 1.5 × 10^6개의 plaque를 Hybond N+ filter (Amersham)에 전이하여 참나물의 HD-Zip유전자인 *Phz4* (Moon et al. 1996)를 탐침으로 하여 screening하였다. 탐침은 Prime-a Gene labeling System (Promega)를 사용하여 [α-^{32}P] dCTP (3,000ci/mM, Amersham)로 표지하였다. 전혼성화는 60℃하에서 6× SSC, 5× Denhardt's solution, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL salmon sperm DNA가 포함된 용액에서 2시간 처리하였으며, 혼성화는 전혼성화 용액에 탐침을 첨가한 후 18시간 동안 수행하였다. Probe washing 과정은 상온에서 2× SSC, 0.1% SDS가 포함된 용액에서 1분, 60℃, 2 × SSC, 0.1% SDS가 포함된 용액에서 15분, 60℃, 1× SSC, 0.1% SDS에서 15분, 60℃, 0.5× SSC, 0.1% SDS에서 15분, 60℃, 0.1× SSC에서 10분간 수행하였다.

염기서열의 결정 및 단백질 구조의 분석

분리된 클론으로부터 cDNA 삽입절편의 회수는 제조회사의 지침에 따라 Uni-ZAPTM XR vector로부터 *in vivo* excision을 통해 얻었으며, 염기서열의 분석은 USB sequenase ver. 2.0 Kit를 사용하여 6 μg의 double-strand DNA를 template로 사용하여 제조회사의 지침대로 수행하였다. 염기서열과 아미노산 서열의 분석은 DNASIS와 PROSIS program을 통해서, 염기서열 및 아미노산 서열의 유사성은 Blast version 1.4 program을 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

현탁배양 세포로부터 체세포배발생 및 식물체 재분화

기내배양에 의해 식물조직으로부터 유도된 배양세포를 현탁배양하였을 때 세포질이 풍부한 구형 세포들이 응집된 모양의 배발생캘러스를 구분할 수 있다 (Nabors et al. 1983; Data et al. 1990). 본 연구에서도 이렇게 구별되는 두 배양세포에 대하여 기관분화과정시 일어나는 세포내 유전자의 후천적 발현여부를 구명코자 참나물 (*Pimpinella brachycarpa*)의 엽병조직의 현탁배양세포로부터 체세포배 발생 가능성을 조사하였다. 기내에서 생장하고 있는 참나물의 엽병 절편체를 0.5 × 0.5 cm 크기로 절단하여 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 MS배지에서 4~6주간 계대배양했을 때 세포들이 매우 치밀하게 배열되고 표면에 광택이 있으면서 연한 노란색을 띠는 배발생캘러스를 선별할 수 있었다.

계대배양중인 배발생캘러스에서 약 1 g을 잘게 조각내어 50 mL의 액체배지에 넣고 현탁배양을 실시하였다. 초기 계대배양에서는 세포들이 작은 캘러스 군집으로 뭉쳐있었으나

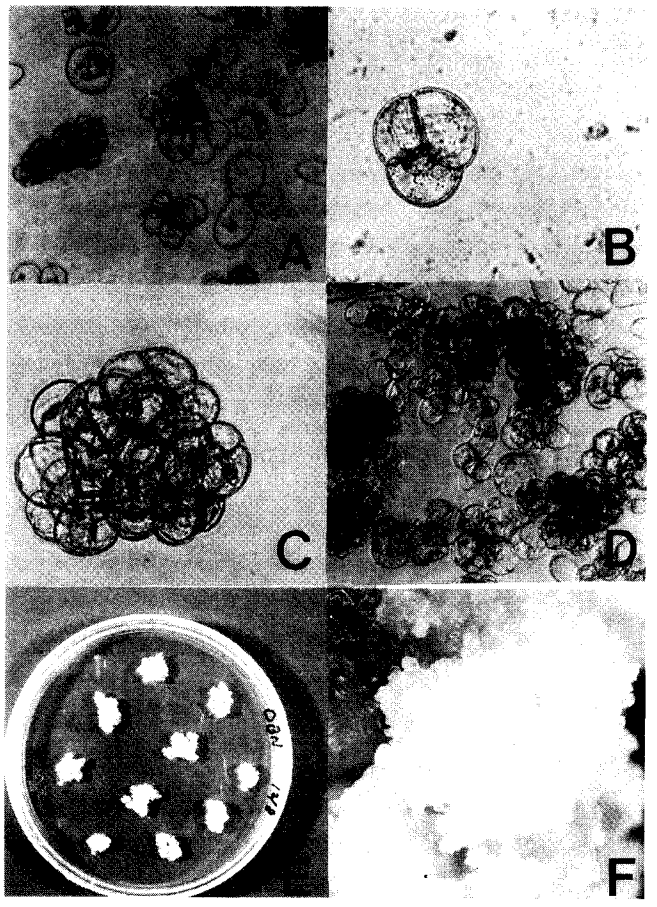

Figure 1. Suspension-cultured cell clusters and embryogenic calli of *Pimpinella brachycarpa* petiole explant. A & B, Cells and clusters isolated from the suspension cultures of micro calli after 1 month; C & D, Dividing cell clusters in MS suspension medium with 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP; E, Growing embryogenic calli on MS gelrite medium with 0.1% NAA; F, Early stage of somatic embryogenesis.

Figure 1A와 같이 계대배양 2개월 후부터 주로 3~10개의 세포집단 (cell cluster)이 관찰되었다. 또한 이들은 Figure 1B와 같이 세포질이 충만한 원형의 세포들로 관찰되었으며, 분열을 거듭하여 (Figure 1C) 계대배양 3개월 후에는 세포질이 가득찬 배발생세포괴가 대부분을 차지하는 배양물을 얻을 수 있었다 (Figure 1D). 이들 현탁배양세포를 0.2% gelrite가 포함된 고체배지에 옮겨 주어 균일한 배발생 캘러스로 유도가 가능하였다 (Figure 1E, 1F).

캘러스의 분화능력은 식물의 종에 따라, 또는 식물체 내에서도 배양에 이용되는 조직부위 및 배양조건과 방법에 따라 크게 다른 것으로 알려지고 있다 (Binh and Heszky 1990; Data et al. 1990; Litz and Gray 1995). 참나물의 엽병에서 유래된 현탁배양 세포집단은 일정한 크기가 될 때까지 체세포배를 형성할 능력을 갖고 있었으나 6개월 이상 계속 배양을 했을 때 분화능력이 감소되었다. 또한 세포집단들은 분열하여 계속적으로 체세포배로 분화하였으며 배발생세포들의 동조배양은 반복된 sieving에 의해 어느 정도 가능하였다. 4주 동안

고체배지에서 배양된 캘러스는 대부분 갈변되었으나, 부분적으로 갈변 캘러스에서 유래된 흰색 또는 연한 노란색의 캘러스가 관찰되었다 (Figure 2A). 이들 흰색 또는 연한 노란색의 캘러스를 MS고체배지에 계대배양하면 구상 (globular), 심장 (heart), 어뢰 (torpedo)의 여러 발생단계의 배가 형성되었고 (Figure 2B, 2C, 2D) 이것이 발아하여 경엽부가 형성되면서 소식물체를 이루었다 (Figure 3).

이와 같이 갈변된 캘러스로부터 연노란색 캘러스가 형성되어 체세포배로 발달되는 현상은 *Ostericum praeteritum* (Cho and Soh 1998), *Cichorium intybus* (Heiwegh et al. 1985), 샐러리 (Nedal et al. 1990), *Prunus mume* (Park and Choi 1992), *Angelicae gigantis* (Choi and Soh 1993; Cho et al. 1998)에서도 보고되었다. 체세포배로부터 식물체 재분화는 초기 2주 동안 암조건에서 이 후는 24 μE $m^{-2}sec^{-1}$의 연속광 하에서 배양했을 때 발아가 양호하였으며, 소식물체로 성장도 용이하게 이루어졌다. 이상의 결과에서 참나물의 현탁배양세포들로부터 체세포배의 발생경로를 거쳐 참나물의 번식이 가능함을 보였다.

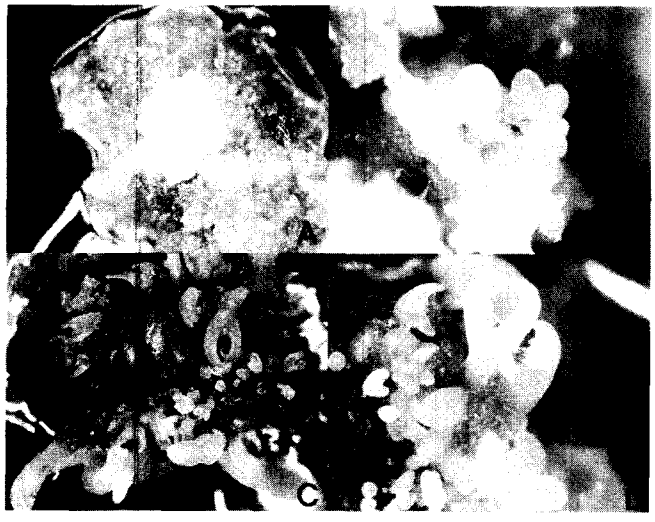

Figure 2. Somatic embryos developed from embryogenic calli. A, New growing embryogenic callus from old browning callus; B, Globular stage of somatic embryogenesis; C and D, Multiple somatic embryos.

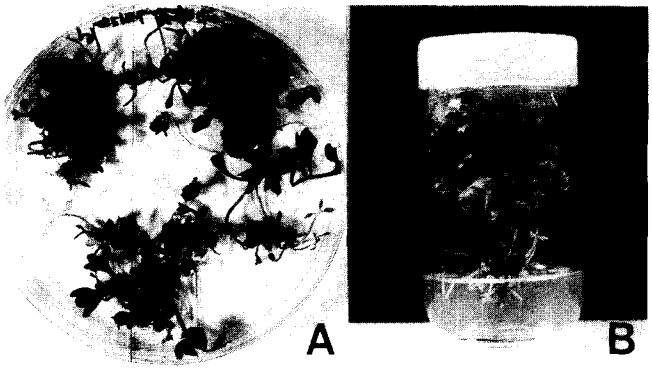

Figure 3. Plantlet regeneration from somatic embryos. A, Multiple shoots from germinated somatic embryos; B, Regenerants with roots in MS basal medium containing 0.1 mg/L NAA.

cDNA library 작성

재분화 과정을 거치는 배양세포는 세포분열을 일으키는 선택적 유전자가 활성화되는데, 이에 관여하는 특이적으로 합성되는 단백질의 기능과 이를 합성하는 유전자의 성질을 구명할 필요가 있다. 참나물의 배발생캘러스에서 mRNA의 변화를 추적하여 차이를 조사하고 mRNA로부터 cDNA library를 작성하였다. 배발생캘러스에서 분리한 mRNA는 약 1.5 μg/μL 정도였으며, 5 μg을 cDNA합성의 시료로 사용하였다. 이들 캘러스의 poly (A)+RNA로부터 1st strand cDNA를 alkaline agarose 겔에서 확인한 결과 900~1400 bp의 nucleotide 영역에서 가장 많은 것으로 나타났으며, 합성한 후 phage에 infection한 결과 9.84 × 10^5/μL의 재조합된 파아지를 포함하는 cDNA library가 만들어진 것이 확인되었다 (데이터 미제시). 또한 X-gal과 IPTG를 첨가하였을 때 2% 이하의 재조합되지 않은 plaque가 관찰되어 98% 이상의 재조합 효율을 확인하였으며 작성된 cDNA library는 plate에서 증식하여 40°C에 보관하면서 이후 실험에 사용하였다. 증폭된 파아지를 사용하여 mass *in vivo* excision을 수행하여 플라스미드 형태의 cDNA를 얻은 후 이들을 기질로 하여 PCR을 수행한 결과 제조된 library의 삽입절편의 크기가 대부분 500 bp이상임을 확인하였다 (Figure 4).

캘러스 cDNA library로부터 전체 1.5 × 10^6개의 파아지를 대상으로 하고 참나물 shoot에서 분리한 HD-Zip 유전자인 *Phz4*의 HD-Zip부위를 탐침으로 하여 1, 2차 screening을 수

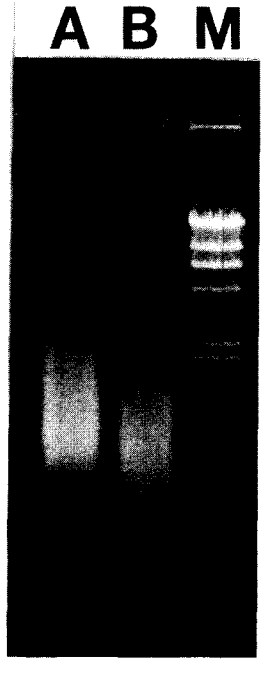

Figure 4. PCR products using plasmid-form total cDNAs of *Pimpinella brachycarpa* callus cDNA library and T3/T7 primers. Amplified inserts of the cDNAs are above 500 bp. A & B, PCR products of two different *Pimpinella brachycarpa* callus cDNA library; M, λ/*Hin*dIII DNA size markers.

행하였다.

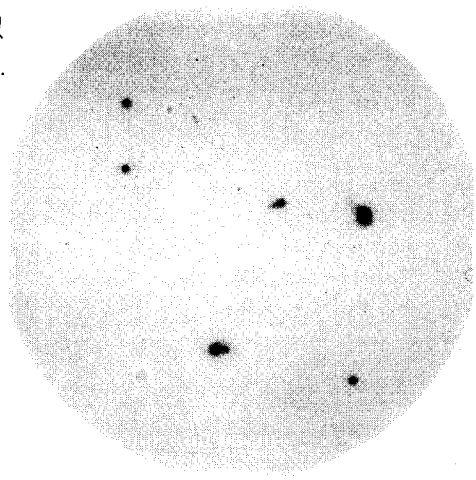

Figure 5. First screening of callus cDNA library with the probe synthesized from HD-Zip region of *Phz4*.

Screening과정에서 사용한 탐침은 Prime-a-Gene labeling system을 사용하여 [α-^{32}P]dCTP로 표지하였다. 참나물의 캘러스 cDNA library로부터 전체 1.5 × 10^6개의 plaque를 혼성화한 결과 1차 선별에서 19개의 phage 클론을 얻을 수 있었으며 (Figure 5), 이들 plaque를 따서 다시 혼성화하여 2차 screening한 결과 5개의 cDNA clone을 얻었다. 2만여 개의 plaque가 형성된 페트리디쉬 당 1 ~ 5개의 이와 같은 구형체 세포배의 특이성 클론일 가능성을 갖는 것들이 선별되었다. 이를 대상으로 제조회사의 지침대로 *in vivo* excision을 수행하여, 이들의 insert를 포함하는 plasmid를 획득하였으며, 이들 plasmid를 효소처리하여 insert의 크기를 확인하였다. 그 결과 4개의 cDNA clone은 약 1.4 kb정도인 것으로 나타났고, 1개의 cDNA clone은 약 1.5 kb정도의 크기를 나타내었다.

선별한 cDNA의 Nucleotide sequence 및 Amino acid sequence

이들 plasmid에 대한 염기서열을 Sequenase ver 2.0 (USB)을 사용하여 결정한 결과 4개의 cDNA clone은 참나물 shoot에서 분리한 HD-Zip 유전자인 *Phz4*와 100%의 homology를 갖는 염기서열을 나타냈으나, 그 중 한 개의 cDNA clone은 이것들과는 달리 *Phz4* 유전자의 5'쪽으로 163 bp의 염기가 추가로 발견되고 3'쪽의 염기서열 중 poly A tail 앞의 18개의 염기가 결손되어 총 1,531 bp에 해당하여 *Phc5*라 명명하였다 (Figure 6).

참나물의 엽병 callus에서 분리한 *Phc5*가 *Phz4*와 coding region은 일치하나 N-terminal의 non-coding 부위에서 차이가 나는 것은 *Phz4* cDNA의 불완전한 합성에 기인한 것으로 사료되며, rice에서 발견된 homeobox 유전자인 *OSH42*와 *OSH45*의 경우처럼 이들이 전사되어 나온 유전자가 두 개의

```
   1 GCA CGA GGA GAA TTG GTA CCC CTG ACA CCA CCA TGT CAT GAT TGG CCT TAC ACC CCC CCT   60
  61 CCC CCT TCT CTT CTT TCT ATA TAA CCC ATC TCT ACT CCC TTC CAT TTC TCT CCA TCA GCA  120
 121 TCT TCT GCT TTA ATA CAA CCC TCT CTC TCT CTT TGA ATT CTT GAA GAA CAT ATA TAT TTT  180
 181 TCA AGA AAG GCT AGG CTA ACC ACC ATA GTA ACC TAA GCT TGT TCC TTG CAT ATA AAT CAA  240
 241 GAA AAG CTA GTT TAT ATC AAG AAT TTA TAT ATA CAT ATA AGC ATG ATG ATT CAT CAA AGA  300
                                                     M  M  I  H  Q  R
 301 GAA GAT CAC TTG GGT CTA AGC CTA AGC TTG TCC TCT CCG GCA CAA ACT CAC AGG CCT TCA  360
      E  D  H  L  G  L  S  L  S  L  S  S  P  A  Q  T  H  A  P  S
 361 TCA TCT TCA TCA CCA CTC CAA CTA AAT CTA GCA CCT TCC ATG CCA ACC CCA TCA ACC CCA  360
      S  S  S  S  P  L  Q  L  N  L  A  P  S  M  P  T  P  S  T  P
 421 CCT TTC AAC CTC TTC CAC AAA AAA GAA ACC TCA GAT GGG TAC ATT CTT GAC GCG TGC AGA  480
      P  F  N  L  F  H  K  K  E  T  S  D  G  Y  I  L  D  A  C  R
 481 GTC GAA ACG AGG TCG TTT CTG AAG GGA ATC GAT GTT AAC CGG CTA CCG GCG ACG ACA GTG  540
      V  E  T  R  S  F  L  K  G  I  D  V  N  R  L  P  A  T  T  V
 541 GAC ATG GAA GAA GAA GCT GGG GTG TCA TCA CCC AAC AGC ACA ATA TCA AGT GTG AGT GGA  600
      D  M  E  E  E  A  G  V  S  S  P  N  S  T  I  S  S  V  S  G
 601 AAG AGG AGT CTT GAG AGA TCT GAC AAC GGT AAT GGA GAT GAT CTT CTA GAT TGT TCT AGA  660
      K  R  S  L  E  R  S  D  N  G  N  G  D  D  L  L  D  C  S  R
 661 GGG CTG ATT AAT AGT GAC GAA GAA GAT GGT GAT AAT TCT AGA AAG AAA CTC AGG CTT TCT  720
      G  L  I  N  S  D  E  E  D  G  D  N  S  R  K  K  L  R  L  S
 721 AAA GAC CAG TCC GCT ATT CTT GAA GAT AGT TTT AAA GAA CAC AAC ACT CTT ATT CCA AAG  780
      K  D  Q  S  A  I  L  E  D  S  F  K  E  H  N  T  L  N  P  K
 781 CAA AAG CTG GCC TTG GCA AAA AGA CTA GGG TTG AGA CCT CGT CAG GTG GAG GTC TGG TTC  840
      Q  K  L  A  L  A  K  R  L  G  L  R  P  R  Q  V  E  V  W  F
 841 CAG AAT AGA AGG GCA AGG ACT AAG TTG AAG CAA ACC GAG GTT GAT TGT GAG TTC TTG AAA  900
      Q  N  R  R  A  R  T  K  L  K  Q  T  E  V  D  C  E  F  L  K
 901 AGA TGC TGT GAG AAT CTA ACA GAT GAA AAC AGG AGA TTG ATG AAG GAG GTT CAA GAA CTG  960
      R  C  C  E  N  L  T  D  E  N  R  R  L  M  K  E  V  Q  E  L
 961 AGG GCA CTC AAA TTA TCC CCA CAA TTC TAT ATG CAA ATG AAC CCT CCC ACA ACC CTC ACC 1020
      R  A  L  K  L  S  P  Q  F  Y  M  Q  M  T  P  P  T  T  L  T
1021 ATG TGC CCT TCA TGT GAG CGT GTC TCG GCT CCA CCA TCG TCT TCT ACA GGC CCA TCT TCC 1080
      M  C  P  S  C  E  R  V  S  A  P  P  S  S  S  T  G  P  S  S
1081 ACA CCC GTC GAG ACC CCC CGG CCC CAC CAT TCG GGT TCT AGT CAC CAT CGC GTC GCT TTT 1140
      T  P  V  E  T  P  R  P  H  H  S  G  S  S  H  H  R  V  A  F
1141 AAT CCA TGG GCC ATT GCG CCT GCT GGT CAC CGA TCA TTC GAT GCA GTT CAC CAT TGA TCA 1200
      N  P  W  A  I  A  P  A  G  H  R  S  F  D  A  V  H  H  *
1201 AGG GTA ATT TGG TCA TTT AAA AGT TGC TAA AAT TCA ATG GAG AAA AGA AGA ATT TTC ACT 1260
1261 AGG ATA TCA TAT TAT CAT TAT GGT CTT GTA AAT TAT CTA GGA TTT GGT GGT TGA GAT GTG 1320
1321 ATA TGG TAG GGT CTT CAT ATG TTT TGT AAT ATT AAG ACC CCC TGC CTA GGT TTT TAG TCT 1380
1381 TTA CTC TTT AGT ATC AAT TCT TCC TTG CCT ATT TTA AGG GTA GAA GTC TTT GTC TTG GAA 1440
1441 ACT TGG GGA AGG GAG CTT TGG ATC ATT GGA TGT AAA GTC ATC TCT AAT CAT TTA GTA TTA 1500
1501 ACT TGT TAA GAT AAA AAA AAA AAA AAA AAA
```

Figure 6. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Phc5* cDNA clone from callus cDNA library of *Pimpinella brachycarpa*.

기능적으로 독립된 promoter를 가지고 있어서 서로 다른 개시점으로부터 전사되어 크기가 다른 산물이 만들어진 것은 아닌 것으로 추정되었다 (Tamaoki et al. 1995). 새로이 밝혀진 cDNA역시 284번째에 ATG개시코돈이 있고 302개의 아미노산을 암호화하는 906개의 단백질 암호화 부위를 갖고 있었다. 또한 참나물 shoot, 인간, 효모 및 동물에서 밝혀진 homeodomain을 갖고 있었으며, HD 부위로부터 N-말단쪽으로 RNA polymerase II 와 상호작용하여 전사과정을 활성화시키는 것으로 추정하는 산성부위를 포함하였다. 그리고 추정된 단백질은 기존 전사조절자에서 많이 보고된 HD의 구조적 특징을 갖고 있었으며, C-말단쪽에 규칙적으로 배열된 HD-Zip구조를 포함하고 있어 HD-Zip 특성이 상당히 존재할 것으로 추정되었다.

적 요

참나물 (*Pimpinella brachycarpa*)의 엽병 (petiole)절편체로부터 캘러스가 MS배지 (0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP)에서 유도되었으며 이들 캘러스로부터 치밀하게 배열된 세포집단 (cell cluster)을 선발하여 현탁배양하였다. 이들 현탁배양세포들은 0.1 mg/L NAA가 포함된 MS고체배지에 배양되

어 배발생 (embryogenic) 캘러스로 성장하였다. 배발생캘러스는 연한 노란색을 띠며 체세포배로 분화되었으며 이들 체세포배는 MS액체배지에서 발아되어 식물체로 성장하였다. 참나물 현탁배양세포 유래 배발생캘러스로부터 분리한 mRNA로부터 cDNA library를 합성하여 PCR을 수행한 결과 제조된 library의 삽입절편의 크기가 대부분 500 bp 이상임을 확인하였다. 이들 cDNA library로부터 전체 1.5×10^6 개의 plaque를 혼성화하여 일차의 screening을 통해 19개의 cDNA clone을, 이차의 screening을 통해 5개의 cDNA clone을 얻었으며 이중 4개의 cDNA clone은 참나물 shoot의 HD-Zip 유전자인 *Phz4* 유전자와 동일한 약 1.4 kb 정도인 것으로 나타났으나, 1개의 cDNA clone, *Phc5*는 약 1.5 kb정도의 크기를 나타내었다. 1.5 kb인 *Phc5*는 *Phz4* 유전자의 5' 쪽으로 163 bp의 염기가 추가로 발견되어 총 1,531 bp에 해당하였으며 18개의 polyA tail을 가지고 있었다. *Phc5*는 284번째에 ATG 개시코돈이 있고 302개의 아미노산을 암호화하는 906개의 단백질 암호화 부위와 Homeodomain을 갖고 있었다. *Phc5*로부터 추정된 단백질은 기존 전사조절자에서 많이 보고된 HD의 구조적 특징을 갖고 있었다.

사사 -본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학 연구)에 의하여 연구되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

Aleith F, Richter G (1990) Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. Planta **183**:17-24

Binh OQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long term cell culture in rice (*Oryza sativa*) by salt pretreatment. Plant Physiol **136**:336-340

Cho DY, Lee EK, Soh WY (1998) Anomalous structure of somatic embryos developed from leaf explant cultures of *Angelica gigas* Nakai. Kor J Plant Tiss Cult **25 (1)**: In press

Choi PS, Soh WY (1993) Effects of culture period on somatic embryo formation from callus culture of *Angelica gigas* Nakai. Kor J Plant Tiss Cult **20**:199-204

Data SK, Data K, Potrycus I (1990) Embryogenesis and regeneration from microspores of both indica and japonica rice (*Oryza sativa*) Plant Sci **67**:83-88

Franz G, Hatzopoulos P, Jones TJ, Krauss M, Sung ZR (1989) Molecular and genetic analysis of an embryogenic gene, DC 8, from *Daucus carota* L. Mol Gen Genet **218**:143-151

Halperin W (1978) Attainment and retention of morphogenetic capacity *in vitro*. In IK Vasil, ed, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant, vol 3, Academic press, New York, pp 3-37

Harvey RP, Melton DA (1998) Microinjection of synthetic *Xhox - 1A* homeobox mRNA disrupts somite formation in developing *Xenopus* embryos. Cell **53**: 687-697

Heiwegh KMG, Banerjee N, Nerum KV, Langhe ED (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L (witloof, compositae). Plant Cell Rep **4**:108-111

Kim JC, Park YC, Lee KW, Cho SH, Han TJ (1996) Multi-secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip cultures of *Pimpinella brachycarpa*. Kor J Plant Tiss Cult **23**:189-194

Le Mouellic H, Lallemand Y, Brulet P (1992) Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the *Hox - 3.1* gene. Cell **69**:251-264

Lin, PPC. (1984) Polyamine metabolism in germinating *Glycine max* L. seeds. Plant Physiol **76**:372-380

Litz RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World J Microbio Biotechnol **11**:416-425

Loutos-Thevnot P, Jouammeau JP, Brown S, Peitard V, Guerm V (1990) Embryogenic and non-embryogenic cell lines of *Daucus carota* cloned from meristematic cell clusters relation with cell ploidy determined by flow cytometry. Plant Cell Rep **8**:605-608

Meeks-Wagner DR, Dennis K, Tran TV, Peacock WJ (1989) Tobacco genes expressed during *in vitro* shoot initiation and their expression during plant development. Plant Cell **1**:25-35

Moon YH, Choi SB, Kim JI, Kim JC, Han TJ, Cho SH, Lee KW (1996) Isolation and characterization of three homeodomain-leucine zipper genes, *Phz1, Phz2, Phz4* from *Pimpinella brachycarpa* shoot tip. Mol Cells **6**:693-703

Nabors MW, Heyser TA, Dykes Demott KJ (1983) Long duration high frequency of plant generation from cereal tissue culture. Planta **157**:385-389

Nedal BL, Altman A, Ziv M (1990) Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. 2. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures. Plant Cell Tiss Org Cult **20**:119-124

Prak HB, Choi EG (1992) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of japanese apricot (*Prunus mume* Sieb et Zucc). Kor J Plant Tiss Cult **19**:261-266

Smith LG, Greene B, Veit B, Hake S (1992) A diminant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1* , causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. Development **116**:21-30

Thorpe TA (1993) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis : Physiological and biochemical aspects. In KA Roubelakis-Angelakis and AW Galston, eds., Markers of Plant Morphogenesis. Plenum Press, New York

Tamaoki M, Tsugawa H, Minami E, Kayano T, Yamamoto N, Yuriko KM, Matsuoka M (1995) Alternative RNA products from a rice homeobox gene. The Plant Journal **7**:927-938

(접수일자 1999년 3월 5일)