

토마토 자가불화합성에 관여하는 S RNase 유전자의 기능

강나영 · 김명희 · 조규형¹ · 신동일 · 김달웅² · 박희성 · 정일경*
대구효성카톨릭대학교 생명자원학부, ¹동경대학교 생물공학과, ²경북대학교 농학과

The Role of S RNase Associated with Gametophytic Self-Incompatibility in Tomato (*Lycopersicon peruvianum*)

KANG, Na Young · KIM, Myung Hee · CHO, Kiu-Hyung¹ · SHIN, Dong Ill ·
KIM, Dal Ung² · PARK, Hee Sung · CHUNG, Il Kyung*

Faculty of Life Resources, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan, 712-702, Korea

¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, Tokyo, 113, Japan

²Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

ABSTRACT *Lycopersicon peruvianum* has a gametophytic self-incompatibility (GSI) mechanism controlled by a single genetic locus (S locus) with multiple alleles. S RNases, an allelic series of abundant stylar proteins, are products of the S locus in *L. peruvianum* and other Solanaceous plants. The S₁₁ RNase gene from *L. peruvianum* was introduced into a self-compatible (SC) species (*Lycopersicon esculentum*) to examine whether the expression pattern in the heterologous host mimics that in *L. peruvianum*. The resultant transgenic *L. esculentum* plants expressed the introduced gene highly in their styles, which is similar manner to the expression in *L. peruvianum*. The S₁₁ RNase gene was expressed in the style at a similar stage of flower development in both transgenic plants of *L. esculentum* and *L. peruvianum* without any morphological changes.

Key words: *Lycopersicon*, Self-incompatibility, S RNases

서 론

지구상의 많은 현화 식물 중 상당수의 종은 자가수정을 방해하고 타가수정을 촉진하는 자가불화합성을 가지고 있다 (De Nettancourt 1977). 자가불화합성은 S locus로 알려져 있는 하나의 유전자군에 의해 조절된다 (De Nettancourt 1977). 자가불화합성 체계는 자기 화분의 유전자형을 구별하는 화주의 능력과 자기 화분의 성숙 또는 생장을 억제하는 화분 조직의 수용 능력을 기준으로 크게 배우자체 자가불화합성과 포자체 자가불화합성으로 분류된다 (Chung and Shin 1997; De Nettancourt 1997). 배우자체형에 속하는 식물로는 가지

과, 장미과, 양귀비과, 백합과 식물 등이 있고, 배추과, 국화과 식물은 포자체형에 속한다. 배우자체 자가불화합성의 경우 diploid인 암술과 haploid인 화분의 유전자형이 동일한 경우, 수분은 이루어지나 화분관이 화주의 전이조직의 상층부에서 신장을 정지하므로 자방에서 수정이 이루어지지 못하고 결국 종자가 형성되지 못한다 (Ebert et al. 1989; Haring et al. 1990; Kao and Huang 1994). 이와 같이 자가불화합성 유전자군에 의해 조절되는 자가불화합성은 유전학적, 형태학적 개념으로는 알려져 있지만, 생화학적, 분자생물학적인 기능은 아직 불분명한 상태로 남아 있다. 그러나 자가불화합성에 관여하는 화주조직의 특이적인 당단백질이 발견되면서 이 단백질이 배우자체의 자가불화합성에 관여한다고 생각하게 되었다 (Anderson et al. 1986). 이 당단백질은 등전점 전기영동에 의한 분석으로 자가불화합성 유전자형에 특이적으로 발현함이 밝혀짐에 따라 화주조직의 자가불화합성 유전자군의 산물

*Corresponding author. Tel 053-850-3178
E-mail chungik@cataegu.ac.kr

입을 추축하게 되었고, 이 단백질에 당이 첨가되는 분비단백질로 밝혀져 S당단백질 (self-incompatibility에 관여하는 당단백질)이라 명명되었다 (Ebert et al. 1989; Haring et al. 1990; Sims 1993). 최근 S당단백질은 가지과 작물에서 자가불화합성의 결정적인 요인으로 확인되어졌다 (Kao and Huang 1994; Newbigin et al. 1994; Sims 1993). *Nicotiana glauca* (McClure et al. 1989), *Petunia inflata* (Ai et al. 1990), *Solanum chacoense* (Xu et al. 1990) 그리고 *L. peruvianum* (Chung 1994; Kowiyama et al. 1994)에서의 S당단백질은 생물학적으로 ribonuclease (RNase) 활성을 가지며 화주조직에서 성장하는 동안 자가화분에 생물학적 독성효과를 일으킨다고 보고되었다 (McClure et al. 1990). 이것들은 *Rhizopus niveus* (Horiuchi et al. 1988)와 *Aspergillus oryzae* (Kawata et al. 1988)로부터 곰팡이의 RNase인 RNase Rh와 RNase T2의 아미노산 서열과 높은 상동성을 나타내어, 그 이후로부터 이 단백질은 S RNase라고 불리어지고 있다 (Chung 1994; Newbigin et al. 1993; Sims 1993).

*L. peruvianum*은 많은 복대립 유전자를 가진 하나의 유전자좌에 의해 유전적으로 조절되어지는 배우자체 자가불화합성 체계를 가진다 (Rivers et al. 1993; Tanksley and Loaiza-Figueroa 1985). *L. peruvianum*의 S당단백질에 대한 유전학적, 생화학적 연구는 Chung 등 (1994, 1995)에 의해 이미 밝혀졌던 바 있다. 또한 최근에는 자가불화합성 품종인 야생종 토마토 *L. peruvianum*을 이용한 교배실험에서 자가화합성으로 변화된 품종을 이용하여 자가불화합성의 원인을 밝힌 바 있다 (Kowiyama et al. 1994; Royo et al. 1994). 자가화합성 식물은 S RNase 효소가 비활성인 상태로 존재하였고 효소의 활성중심인 histidine이 asparagine으로 바뀌면서 기존의 활성이 상실되어 자가불화합성인 *L. peruvianum*이 자가화합성으로 변하게 되었다 (Royo et al. 1994). *P. inflata*와 *N. glauca*의 S RNase 유전자의 sense 혹은 antisense 구조를 이용한 두 개의 형질전환 연구에서 S RNase가 self 또는 non-selfpollen 인식에 결정적인 역할을 하는 요인이라는 직접적인 증거를 제시하였다 (Huang et al. 1994; Murfett et al. 1994). RNase 활성이 자가불화합성을 위해 필요한 것임을 나타낸 이후, *L. peruvianum*의 자가불화합성 유전자가 자가화합성 식물에 어떤 영향을 미치는가에 대한 의문이 제기되었다.

따라서, 본 실험은 *L. peruvianum*의 genomic S₁₁ RNase 유전자를 재배종 토마토이며 자가화합성을 나타내는 *L. esculentum*에 도입하여 재배종 토마토의 재분화된 조직에서 *L. peruvianum* 유래의 S₁₁ RNase 유전자의 발현 양상과 배우자체 자가불화합성의 mechanism에 S RNase 이외에 또 다른 요인들이 관련되어 있는지를 조사하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

형질전환에 이용된 재배종 토마토 종자는 흥농종묘의 서광과 서울종묘의 일광이다. 종자를 70% EtOH에 2분, 2% NaOCl 용액에 20분 침지하여 표면살균한 후 멸균수로 10회 이상 세척한 다음 물기를 제거하고 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상, 무균으로 배양하여 28°C, 16시간 1,200 lux의 조명상태에서 2주간 발아시킨 cotyledon과 stem조직을 explants로 이용하였다.

식물체 형질전환용 plasmid

Genomic S₁₁ RNase sequence를 포함한 유전자를 pBI101에 연결한 후 화주 특이적 발현을 나타내는 promoter를 연결하여 전체 3.0kb에 해당하는 재조합 Ti-plasmid pBI-S₁₁을 제작하였다.

Escherichia coli 형질전환

E. coli DH5 α 를 37°C에서 20 ml LB배지에 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 침전시키고 여기에 12.5 ml의 low buffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl)를 첨가하여 현탁시켜 4°C에서 4,000rpm으로 원심분리하였다. 균체 침전물에 12.5ml의 high buffer (0.1 M MOPS, 10 mM RbCl, 50 mM CaCl₂)용액을 첨가하여 현탁시키고 얼음에 30분간 방치한 후, 원심분리하여 균체의 침전물을 2.5 ml의 high buffer에 녹여 competent cell을 조제하였다. 여기서 얻은 competent cell 200 μ l에 0.1~0.5 μ g의 vector DNA를 첨가하여 얼음에 30분간 방치한 후 42°C에서 1.5분간 heat shock하였고, 1ml의 LB배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양 후 kanamycin 50 mg/L의 항생제가 첨가된 LB 고체배지에 도말하여 선발된 colony를 실험에 사용하였다.

식물 형질전환용 vector의 제작

Chung 등 (1995)에 의해 S₁₁S₁₂ 유전자형을 가진 야생종 토마토 (*L. peruvianum*) 식물체의 DNA에서 S₁₁ RNase를 포함한 21kb의 genomic DNA 단편을 이미 분리하였다. S₁₁에 대해 913-bp에 coding된 영역과 전사개시 부위에서 2138-bp의 상류영역을 포함한 *Xba*I-*Sal*I의 제한효소로 절단한 3051-bp의 단편의 RNase를 genomic clone으로부터 절단한 후 binary vector인 pBI101의 *Sal*I와 *Xba*I 사이에 연결하였으며 (Koekema et al. 1983) *Bam*H I과 *Sac*I 위치에 있는 β -glucuronidase (GUS) 유전자는 제거한 후 다시 연결하였다 (Figure. 1).

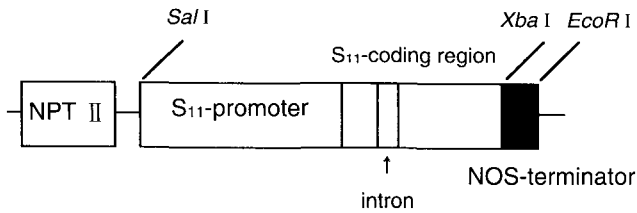


Figure 1. Construction of plant transformation vector containing *S*₁₁ RNase gene.

Agrobacterium tumefaciens 형질전환

*Agrobacterium tumefaciens*를 숙주로 Ti-plasmid pBI-*S*₁₁에 대한 형질전환은 freeze-thaw법 (Paul and Hooykaas 1988)에 의하여 실시하였다. *Agrobacterium* strain LBA4404를 host strain으로 YEP 5 ml에 접종하여 28°C에서 진탕 배양하였다. 배양 후 균체를 회수하여 10 mM Tris-HCl, pH 7.4로 세척하였고 원심분리한 균체를 500 µl의 YEP배지에 현탁하여 액체질소에 5분간 급속 냉동시킨 후 37°C에서 25분간 방치하였다. 그리고 70 µl의 YEP배지를 첨가하여 28°C에서 1시간 배양 후 이를 kanamycin 50 mg/L의 항생제가 첨가된 YEP 고체배지에 도말하고 28°C에서 2일간 배양한 후 나타난 colony를 선발하여 재배종 토마토 식물체의 형질전환 실험에 사용하였다.

재배종 토마토 식물체의 형질전환

Cotyledon explants로부터 조직의 재분화를 유도하기 위하여 MS salt, vitamin R₃, sucrose 30 g/L, Phytoigel 30 g/L의 배지에 식물 생장호르몬을 IAA 0.43 mg/L과 zeatin 0.87 mg/L, IAA 0.87 mg/L과 zeatin 1.75 mg/L, IAA 1.70 mg/L과 zeatin 3.50 mg/L, IAA 0.87 mg/L, zeatin 1.75 mg/L의 5가지 농도로 단용 또는 혼용 처리하여 재분화율을 조사하였다. 이들 식물 생장호르몬의 조합 중 가장 높은 재분화율을 나타낸 조합을 이용하여 형질전환 실험을 하였다. 생장실에서 무균으로 배양한 토마토의 절편은 pre-culture 배지 (MS 기본배지, IAA 0.87 mg/L, zeatin 1.75 mg/L)에서 2일 동안 배양한 후 *Agrobacterium*가 첨가된 액체 MS 배지에 담그어 28°C에 암상태로 2일간 co-culture시켜 감염시킨 후, 감염시킨 것은 멸균수로 *Agrobacterium*를 제거한 다음 다시 callus 유도 배지 (MS 기본배지, IAA 0.87 mg/L, zeatin 1.75 mg/L)에 옮겨 배양 약 3주 후 발생한 싹은 shoot 유도배지 (MS 기본배지, IAA 0.87 mg/L, zeatin 1.75 mg/L, kanamycin 75 mg/L, carbenicillin 500 mg/L)에서 신장시켰으며, 재분화된 shoot는 rooting 배지 (1/2 MS 배지, IAA 0.18 mg/L)에서 발근시킨 다음 순화시켜 온실에서 재배하여 분석재료로 사용하였다.

형질전환 토마토의 Southern분석

형질전환된 재배종 토마토의 genomic DNA 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법으로 하였다. 어린 잎 1 g을 채취하여 1.5 ml E-tube에 넣고 액체질소로 동결시킨 다음 마쇄한 후 extraction buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM β-mercaptoethanol) 600 µl를 첨가하여 플라스틱 봉으로 분쇄하였다. E-tube에 20% SDS 40 µl를 넣은 후 65°C에서 10분간 반응시킨 후 5M potassium acetate 200 µl를 넣고, -20°C에서 20분간 방치한 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취했다. RNA와 단백질을 제거하기 위하여 RNase A 30 unit를 원심분리한 상층액에 넣고 37°C에 1시간 반응시켜 식물세포의 RNA를 제거한 다음 phenol 3회, chloroform/isoamylalcol (24:1)에 1회 각각 정제하여 상층액을 취한 후 isopropylalcohol을 첨가하여 DNA 침전을 유도하고 -20°C에 30분 이상 두어 total DNA를 침전시켰다. 12,000 rpm에 10분간 원심분리하여 pellet화된 DNA를 얻어 70% EtOH로 salt를 제거하고 상온에서 진공건조기로 건조시킨 후 이를 멸균수에 녹여 Southern분석용 시료로 사용하였다.

*S*₁₁ 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 제한효소 *Xba*I과 *Sal*I을 처리하여 37°C에서 3시간 동안 절단하였다. 절단된 DNA 단편은 1% agarose gel상에서 전기영동하여 Gene-clean II (Bio 101 Inc.)으로 정제하여 random primer DNA labelling kit (Takara Co.)를 사용하여 [α -³²P] dCTP를 표식하였다.

제한효소 *Xba*I과 *Sal*I으로 절단된 형질전환 재배종 토마토의 total genomic DNA를 1% agarose gel상에서 전기영동하여 분리하여 0.25N HCl용액에 25분간 denaturation한 후 1.5 M NaCl을 함유한 0.5 M NaOH용액에서 30분간 변성시키고 1.5 M NaCl을 포함한 1 M Tris-HCl, pH 7.4 용액으로 중화하여 nylon membrane (Amersham Co.)에 옮겼다. Membrane에 옮겨진 DNA를 UV cross linker로 고정시킨 다음 prehybridization solution (0.5 M sodium phosphate, pH 7.2, 1 mM EDTA, pH 8.0, BSA 5 g, SDS 35 g/500 ml)을 넣고 60°C에서 4시간 동안 반응하였다. 반응 후 DNA probe를 첨가하여 60°C에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 이후 0.1% SDS, 2×SSC (300 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate)와 0.1% SDS, 1×SSC (150 mM sodium chloride, 15 mM sodium citrate)에 각각 15분씩 세척한 다음 X-ray film을 넣어 -70°C에서 이를 동안 보관한 후 현상하였다.

Ribonuclease activity staining

S당단백질의 ribonuclease 활성을 조사하기 위하여 화주에서 추출한 단백질의 활성을 유지시키기 위해 변성시키지 않

고, 12.5% acrylamide gel에 전기영동한 다음 SDS를 제거하기 위해 25% isopropanol과 10 mM Tris-HCl, pH 7.4의 buffer로 37°C에서 30분씩 2번 shaking한 다음 isopropanol을 제거하기 위해 10 mM Tris-HCl, pH 7.4로 동일한 온도와 시간에서 rinsing해주었다. Gel을 반응시키기 위해 0.05 mg/ml의 yeast rRNA를 10 mM Tris-HCl, pH 7.4에 녹여 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응시킨 gel을 염색하기 위해서 0.02% Toluidine blue로 5분간 37°C에서 염색시켰다. 활성이 있는 band가 보일 때까지 10 mM Tris-HCl, pH 7.4로 37°C에서 destaining하였다.

형질전환 토마토의 western분석

형질전환된 재배종 토마토의 화분, 화주, 화변, 잎, 줄기 조직들을 채취하여 액체질소로 급속 냉동시켜 protein extraction buffer (10 mM Sodium phosphate, pH 6.0, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% [W/V] polyvinyl pyrrolidone)를 넣어 마쇄시킨 다음, 원심분리하여 상등액을 분리하고 미세한 나머지 입자들은 0.45 µm Millex GV filter로 분리하였다.

단백질 농도는 Bradford 방법 (1976) 으로 정량하였고, standard curve를 결정하기 위하여 2.5~100 µg/ml 범위의 BSA를 사용하여 흡광도 595 nm에서 측정하였다.

형질전환된 재배종 토마토의 total 단백질 20 µg을 SDS-PAGE로 전기영동시킨 후, western분석용 transfer buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 150 mM glycine, 20% (v/v) metanol, 20% (w/v) SDS)로 10~25분간 gel을 평형화하였다. 평형화시킨 gel은 western transfer용 장치를 사용해 membrane (Hybond C)에 전류 20mA로 하룻밤 동안 transfer하였다. Transfer용 장치에서 membrane을 벗겨 PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄)로 잔재한 acrylamide를 씻은 후 건조시켰다. 1차 항체는 S₁₁ RNase의 hypervariable 영역의 peptide 항체를 5,000배로 희석하여 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase를 5,000배로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 검출은 ECL의 Western blotting 검출용 Kit (Amersham Co.)의 설명서를 따랐다.

Fluorescence microscope을 이용한 화분관 신장 조사

주두에서 화분관 신장 현상을 통해 자가불화합성을 확인하기 위하여 Jahnen 등의 방법 (1989)으로 실험을 수행하였다. 형질전환하지 않은 재배종 토마토와 야생종 유래의 자가불화합성 유전자로 형질전환한 재배종 토마토에 자가수분한 후 24시간 동안 3시간 간격으로 화주를 수집하였다. 수집한 화주는 전처리용액 (acetic acid : ethanol = 1 : 3)에서 2시간 동안 처리 한 다음, 10% anhydrous sodium sulfate solution에서

10분 동안 끓여 멸균수로 2번 washing하였다. 처리한 화주는 slide glass 위에서 0.1% aniline blue로 염색하고 ultra-violet light와 filter (395, 460 nm)를 가지고 fluorescence microscope (Axioplan) 상에서 화분관이 신장하는 형태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

재배종 토마토 식물체의 재분화

재배종 토마토의 cotyledon explants로부터 조직의 재분화를 유도하여 callus, shoot, root의 형성을 조사한 결과, IAA와 zeatin의 혼용처리에서는 토마토의 엽육조직이 배양 10일 경부터 팽대해지면서 절단면에서 callus가 형성되기 시작하였고, IAA나 zeatin의 단용처리에서는 callus가 형성되지 않거나 형성되더라도 시일이 경과할수록 갈변하며 정상적인 분화를 하지 않았다. MS 기본배지에 IAA 0.87 mg/L과 zeatin 1.75 mg/L을 첨가한 배지에서 표면이 비교적 단단한 형태의 기관분화성 캘러스가 형성되었고 그 후 3주째 되는 시점에서 치상체로부터 부정아가 직접 형성되는 것이 확인되었다. IAA와 zeatin의 혼용처리 중 다른 조합에 비해 IAA 0.87 mg/L과 zeatin 1.75 mg/L을 처리하였을 때 가장 높은 재분화율을 보여주었다. 반면 뿌리의 형성은 IAA 0.87 mg/L을 단용 처리하였을 때 가장 높은 분화율을 나타내었다.

형질전환 토마토의 선발

pBI-S₁₁ plasmid가 도입된 *Agrobacterium*를 leaf disc transformation 방법으로 재배종 토마토 *L. esculentum*에 형질도입하였다. Table 1에서 나타낸 것처럼 leaf disc를 IAA 0.87 mg/L과 zeatin 1.75 mg/L이 첨가된 배지에서 2일 동안 preculture하고 *Agrobacterium*가 첨가된 액체 MS 배지에서 coculture하여 감염시킨 후, 다시 callus 유도배지 (MS 기본

Table 1. Tissue culture media used for tomato regeneration.

Supplement (mg/L)	Media ^a				
	PM	CLM	CIM	SIM	RM ^b
IAA	0.87	-	0.87	0.87	0.18
Zeatin	1.75	-	1.75	1.75	-
Kanamycin	-	-	-	75	-
Carbenicillin	-	-	-	500	-

^a Basal medium: MS salt, Vitamin R₃, 30 g/L Sucrose and 3 g/L Phytigel

^b 1/2 MS salt, vitamin R₃, 30 g/L sucrose and 3 g/L. Phytigel
PM: pre-culture medium, CLM: co-culture liquid medium, CIM: callus induce medium, SIM: shoot induce medium
RM: rooting medium

배지, IAA 0.87 mg/L, zeatin 1.75 mg/L)에 옮겼다. 배양 약 3 주 후 발생한 싹은 shoot 유도배지 (MS 기본배지, IAA 0.87 mg/L, zeatin 1.75 mg/L, kanamycin 75 mg/L, carbenicillin 500 mg/L)에서 3주 이상 배양하여 kanamycin 저항성을 가지는 20개의 잠정적 형질전환체를 얻었다. 재분화된 형질전환체는 rooting 배지 (1/2 MS 배지, IAA 0.18 mg/L)에서 발근시켜 인공토양 (vermiculite)에서 5주 동안 순화 과정을 거쳐 온실에서 재배되었다. 이들 20개의 kanamycin 저항성을 가진 식물체를 *S₁₁* RNase sequence에 대해 특이적인 oligonucleotide를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)로 확인한 결과, 3개의 식물체가 *S₁₁* sequence를 포함하고 있었다. 이 식물체들은 다음의 분석을 위해 선발되었다. 형질전환된 식물체는 본래의 *S₁₁* vector의 construct가 존재하는지 여부를 확인하기 위하여 *SalI*과 *XbaI*으로 절단, total genomic DNA를 분리한 후, *S₁₁* 유전자를 probe로 하여 Southern분석하였다. 그 결과 형질전환하지 않은 식물체 (Figure 2의 lane N)에서는 나타나지 않은 3.0 kb의 위치에서 PCR분석에서 확인된 3개의 형질전환 식물체 TS1, TS2, TS4번에서 강한 signal이 나타났다. 이 결과로부터 재배종 토마토의 염색체 내에 자가불화합성 유전자가 안정된 구조로 도입된 사실을 확인하였다 (Figure 2).

형질전환 된 재배종 토마토의 화주조직에서의 RNase 활성 분석

각각의 형질전환 식물체의 화주 단백질을 추출하여 재료 및 방법에서 나타낸 방법으로 효모의 total rRNA를 기질로 사용하여 RNase 활성 염색을 하였다. 형질전환 식물체의 RNase 활성은 각 식물체에서 다양하게 나타났으나, Southern 분석에서 자가불화합성 유전자가 안정된 구조로 도입되었던 식물체인 TS1, TS2, TS4번 모두는 화주 내에 *S₁₁* RNase의 존재를 나타내는 23-kDa의 위치에서 RNase 활성을 나타내는 band가 검출되었다 (Figure. 3). 이 결과로부터 재배종 토마토의 화주조직에서 기존에 존재하지 않았던 RNase 활성을 획득한 식물체를 얻을 수 있었다.

형질전환 된 재배종 토마토에서 *S₁₁* RNase의 발현

야생종 토마토 유래의 자가불화합성 유전자가 형질전환 식물체내에서 S 단백질을 정확하게 발현하는지에 대한 여부를 조사하기 위하여 형질전환 식물체의 화주 단백질을 추출하여 *S₁₁* RNase의 hypervariable 영역 (Chung et al. 1994)의 peptide 항체와 반응시켜 western분석을 수행하였다. 그 결과 형질전환하지 않은 식물체 (Figure 4의 lane N)에서는 나타나지 않은 23-kDa의 *S₁₁* RNase가 형질전환 식물체 TS1, TS2, TS4번에서는 화주조직 세포 추출물에서 S RNase의 발현이 강하게 나타났으며, 또한 S RNase가 화주 특이적으로 발현하는 재배종 식물체를 선발할 수 있었다 (Figure 4)

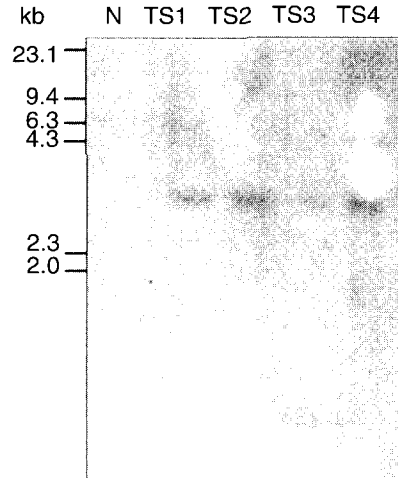


Figure 2. Southern blot analysis of transgenic tomato plants. Total genomic DNA from individual transgenic plants digested with *XbaI* and *SalI* was hybridized to radiolabelled *S₁₁* genomic gene. N, nontransformed control plant; TS1 ~ TS6, transgenic plants.

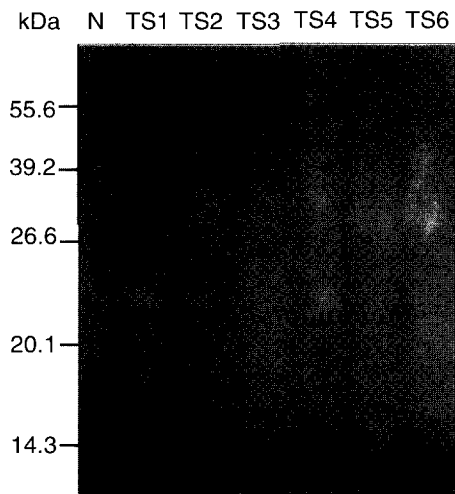


Figure 3. RNase activity staining performed with pistil proteins of individual transgenic tomatoes. Each lanes were loaded with 20 µg pistil proteins from individual transgenic plants. Protein size markers are indicated at left. N, nontransformed control plant; TS1 ~ TS6, transgenic plants.

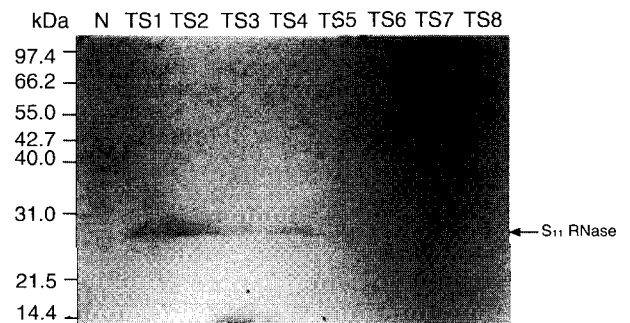


Figure 4. Western blot analysis of pistil proteins from individual transgenic tomatoes with *S₁₁* antiserum. Equal amounts of total proteins were loaded in each lane and separated by SDS-PAGE. Protein size markers are indicated at left. N, nontransformed control plant; TS1 ~ TS6, transgenic plants.

재배종 토마토 내에 도입된 S단백질의 조직 특이적 발현

Southern과 western분석에서 확인된 형질전환 식물체 TS1의 화분, 화주, 화변, 잎, 줄기 등 5개의 조직으로부터 total 단백질을 추출하여 S₁₁ 항체를 이용하여 western분석을 수행하였다. S단백질이 오직 화주에서만 발현하고 화분, 화변, 잎, 줄기에서는 전혀 발현되지 않는 것을 볼 수 있었다 (Figure 5). 이 결과로부터 S₁₁ RNase 유전자가 화주조직에서만 특이적으로 발현한다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5). 형질전환 식물체에서 S₁₁ RNase 유전자 발현에 대한 조직특이성은 S₁₁ RNase 유전자를 이용한 reverse genetics 실험에서 화분에서 발견되었던 것만 제외하면 *L. previanum*의 조직특이성과 유사했다 (Chung et al. 1993). 이러한 차이점은 재배종과 야생종 토마토의 화분 내에서 S RNase의 발현을 조절하는 물질이 존재한다는 사실과 화분에서 S RNase의 발현은 이루어지나 그 양이 아주 미약하여 항체를 이용한 면역학적 방법으로는 그 발현 여부를 판단하는 데 한계가 있다는 가능성을 제시할 수 있었다.

Fluorescence microscope 상에서 화분관의 신장 관찰

자가화합성인 재배종 토마토와 자가불화합성 유전자로 형질전환 된 재배종 토마토 식물체의 화분관이 어떤 형태적인 변화를 가지는지 관찰하기 위해 화주조직을 aniline blue로 염색하여 fluorescence microscope 상에서 관찰하였다. Figure. 6은 화분관이 화주조직의 전이조직 내에서 callus를 형성하면서 신장하는 모습을 나타내었다. Panel (A)와 (B)에서 흰 점처럼 보이는 것이 callus이다. 형질전환하지 않은 자

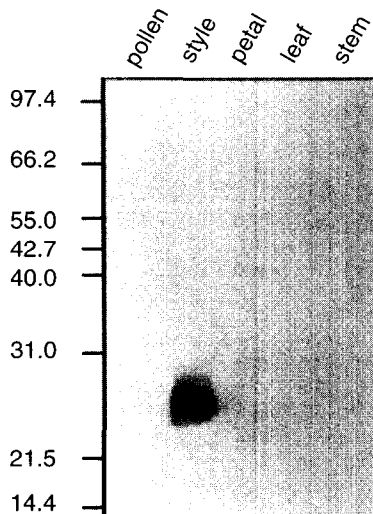


Figure 5. Western blot analysis of total proteins from various tissues of transgenic tomato with S₁₁ antiserum. Equal amounts of total proteins were loaded in each lane and separated by SDS-PAGE. Protein size markers are indicated at left.

가화합성 재배종 토마토 (Panel A)와 자가불화합성 유전자로 형질전환한 자가불화합성 재배종 토마토 (Panel B)는 callus의 차이는 있지만 화분관이 신장하고 있는 것에는 큰 차이가 없다는 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 야생종 유래의 S RNase 유전자 하나로만은 재배종 토마토의 자가불화합성 표현형에 변화를 줄 수 없다는 것을 시사하고 있다.

자가불화합성의 기작을 이해하는 데에는 몇 가지 model들이 제기되어 왔다. Lewis (1949, 1960)는 S 유전자군의 유전적 구조는 각기 다른 기능을 하는 3부분으로 구성되어 있다고 하는 tripartite model을 제안하였다. 3부분 중 특이적인 부분은 화주와 화분조직에서 대립유전자 특이성에 의해 결정된다. 화주와 화분 조직에서 활성이 있는 부분은 각각 특정 산물을 포함한다. 이 model은 화분과 화주에서 자가불화합성 작용에 대한 변이체를 기초로 설명하였다. 자가불화합성에 대한 최근의 연구 결과, 화주에서 활성을 가지는 산물은 S RNase인 것으로 나타났으나, 화분조직에서의 활성 부분은 많은 연구가 진행되고 있는데도 불구하고 아직까지 보고되고 있지 않다. 이와 반대로, 자가화합성의 식물체인 *P. hybrida*가 자가불화합성 식물체인 *P. inflata*와 교배시켰을 때, 몇몇의 교배된 식물체는 자가불화합성을 나타내었다 (Ai et al. 1990). 이것은 modifier 유전자가 자가화합성 식물체의 화주에서 발현되고, S RNase의 활성이 조절하는 것으로 추측하였다. 또 다른 가능성으로는 자가불화합성의 기능을 가진 몇몇 교배된 식물체는 유전적 재조합에 의해 자가불화합성의 유전자 군을 획득했을 가능성이 제시되었다. 그러므로 modifier 유전자가 자가화합성 식물체에서 존재하는 S RNase와 상호작용을 하는지 그렇지 않은지에 대한 직접적인 증거는 아직까지 알려진 바가 없다. 또 하나의 model은 화분의 구성 요소가 self 또는 non-self 화분을 구별하기 위해 S RNase의 억제 또는 수용체로서의 작용을 할 것이라고 Thompson과 Kirch (1992)에 의해 제안되었다. McClure (1990)에 따르면 S RNase는 자기의 화분관이 화주 내의 전이조직에서 신장을 할 때 그 화분관으로 침투하여 rRNA를 공격한다고 추측하였다. 자가 화분관에서의 거부는 S RNase의 기능적인 역할에 있어서 S RNase가 자가 화분관에 들어갈 수 있는 지 없는지에 대한 의문을 생기게 했다. 이런 의문은 Gray가 기내에

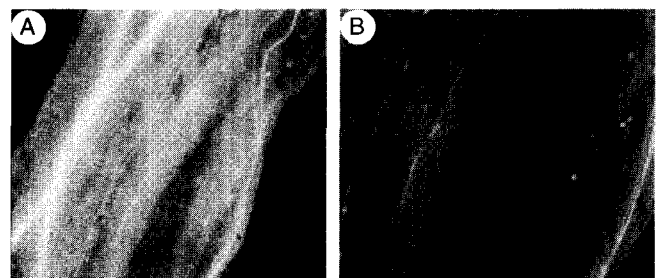


Figure 6. Pattern of pollen tube growth both non-transgenic (A) and transgenic tomato plants (B).

서 신장한 화분관에 의해 방사능 ³⁵S로 반응시킨 S 단백질이 화분관으로 흡수되는 과정을 증명하였다 (Gray et al. 1991). S RNase는 *in vitro*상에서 그 특이성에 관계없이 어떠한 유전자형의 화분관으로도 침투가 가능한 것으로 나타났다 (Gray et al. 1991). 그러므로, S RNase 기능에서 대립유전자적 특이성은 여전히 의문인 채로 남아있다.

본 실험에서 S_{II} RNase 유전자는 형질전환된 재배종 식물체의 화주에서 야생종과 동일한 수준으로 발현하는 것을 보여주었다 (Figure 4). 그러나, 형질전환된 재배종 식물체의 발달하고 있는 화분과 성숙된 화분에서 어떤 형태적인 변화도 관찰되지 않았다. 최근의 2가지의 형질전환 연구에서 화주에서의 S RNase 유전자의 발현은 형질전환된 *P. inflata*와 *N. tabacum*에서 자가불화합성의 표현형에 관련이 있는 것으로 나타났다 (Lee et al. 1994; Murfett et al. 1994). RNase 발현 수준에 의존하여, 자가 화분의 신장이 완전하게 거부되거나 혹은 중간정도의 거부반응이 형질전환된 식물체에서 관찰되었다 (Murfett et al. 1994). 본 실험에서 S_{II} 유전자를 포함한 화주 조직은 자가 수분 후, 화분관의 신장모습을 형광현미경 상에서 관찰한 결과, 형질전환되지 않은 재배종 토마토와 동일한 형태로 나타났다 (Figure 6). 이 형질전환 실험의 결과로부터, 배우자체 자가불화합성의 system에서 S RNase 유전자 외의 다른 요소가 화분 부분의 system에 관련되어 있는 것이 간접적으로 추측되었다.

적 요

야생종 토마토의 자가불화합성에 관여하는 S RNase 유전자를 자가화합성인 재배종 토마토에 도입하여 형질전환 식물체를 만들었다. 재조합 Ti-plasmid pBI-S_{II}을 제작하여 *Agrobacteria*를 이용한 leaf disc transformation 방법으로 재배종 토마토에 형질전환시켰으며, Southern 분석을 통해 형질전환 식물체의 염색체 내에 자가불화합성 유전자가 안정된 구조로 도입되었는지 확인하였다. 형질전환 식물체의 화주 단백질을 이용하여 RNase 활성 염색을 하여 화주 내 S 단백질의 활성을 확인하였다. 또한 형질전환 식물체의 화주 단백질을 이용하여 western 분석을 수행한 결과, 야생종 토마토 유래의 자가불화합성 유전자에 의해 S 단백질을 정확하게 발현하는 식물체를 확인, 선발하였다. 선발된 형질전환 식물체의 화분, 화주, 화변, 잎, 줄기 등 5개의 조직을 western 분석하여 S RNase 유전자가 야생종 토마토에서와 유사한 형태로 화주 조직에서만 높게 발현되며 형질전환된 재배종 토마토에서도 조직 특이적으로 발현한다는 것을 확인하였다. 위의 결과로 야생종 토마토에서 자가불화합성에 결정적인 영향을 미치는 S RNase를 재배종 토마토에 발현시켰을 때 자가불화합성을 나타내는 재배종 토마토의 표현형은 변화가 없다는 것과 어떠한 형태적인 변화도 없다는 사실을 확인하였다. 그리고 배우

자체 자가불화합성 기작에는 화주쪽의 S RNase 이외에 화분쪽의 또 다른 기구가 있다는 것을 추측할 수 있었다.

사사 - 연구는 1998년도 과학기술기초 중점연구 지원사업(유전공학과제 1988-019-G00004)의 지원에 의해 수행되었음.

인용문헌

Ai Y, Singh A, Coleman CE, Ioerger TE, Kheyr-Pour A, Kao TH (1990) Self-incompatibility in *Petunia inflata* : isolation and characterization of cDNAs encoding three S-allele-associated proteins. *Sex Plant Reprod* 3: 130-138

Ai Y, Kron E, Kao TH (1990) S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol Gen Genet* 230: 353-358

Anderson M A, Cornish EC, Mau SL, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bönig I, Grego B, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Niall JD, Tregear GW, Crawford JP, Clarke AE (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of Self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321: 38-44

Bradford M M (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Chung I K (1994) Molecular genetic studies on gametophytic self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. Ph. D. thesis. University of Tokyo, Tokyo

Chung, IK, Shin DI (1997) Characterization of S Glycoprotein Associated with Gametophytic Self-Incompatibility of *Lycopersicon peruvianum*. *J Kor Soc Hort Sci* 38(3): 205-210

Chung IK, Nakata K, Tanaka H, Ito T, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M (1993) Identification of cDNA clones coding for the style specific S_{IIa}-glycoprotein gene associated with gametophytic self-incompatibility in tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Biosci Biotech Biochem* 57: 1172-1176

Chung IK, Lee SY, Ito T, Tanaka H, Nam HG, Takagi M (1995) 5' Flanking sequences of two S alleles in *Lycopersicon peruvianum* are highly heterogenous but contain short blocks of similar sequences. *Plant Cell Physiol* 36(8): 1621-1627

Chung, IK, Ito T, Tanaka H, Ohta A, Nam HG, Takagi M (1994) Molecular diversity of three S allele cDNAs associated with gametophytic self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Mol Biol* 26: 757-762

De Nettancourt D (1977) Incompatibility in Angiosperms. (In : Frankel R, Gall GAE, Grossman M, Linskens HF, (eds), *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*, vol 3, Springer, Berlin

Ebert P R, Anderson MA, Bernatzky R, Altschuler M, Clarke AE

- (1989) Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Cell* **56**: 255-262
- Gray JE, McClure BA, Bönig I, Anderson MA, Clarke AE** (1991) Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (S-RNase) on *in vitro* grown pollen tubes. *Plant Cell* **3**: 271-283
- Haring V, Gray JE, McClure BA, Anderson MA, Clarke AE** (1990) Self-incompatibility: a self-recognition system in plant. *Science* **250**:937-941
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180
- Horiuchi H, Yanai K, Yano K, Wakabayashi E, Sanda A, Mine S, Ohgi K, Irie M** (1988) Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J Biochem (Tokyo)* **103**: 408-418
- Huang S, Lee HS, Karunanandaa B, Kao TH** (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**: 1021-1028
- Jahnen W, Lush WM, Clarke AE** (1989) Inhibition of *in vitro* pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana alata*. *Plant Cell* **1**: 501-510
- Kao TH, Huang S** (1994) Gametophytic self-incompatibility: A mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. *Plant Physiol.* **105**: 461-466
- Kawata Y, Sakiyama F, Tamaoki H** (1988) Amino-acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Euro J Biochem* **176**: 683-697
- Kowayama Y, Kunz C, Lewis I, Newbigin E, Clarke AE, Anderson MA** (1994) Self-incompatibility in a *Lycopersicon peruvianum* variant (LA2157) is associated with lack of style S-RNase activity. *Theor Appl Genet* **2**: 859-864
- Lee HS, Huang S, Kao TH** (1994) S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**: 560-563
- Lewis D** (1949) Structure of the incompatibility gene. II. Induced mutation rate. *Heredity* **3**: 339-355
- Lewis, D** (1960) Genetic control of specificity and activity of the S-antigene in plants. *Proc R Lond Ser B* **151**: 468-477
- McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE** (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**: 757-760
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE** (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonuclease. *Nature* **342**: 955-957
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA** (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**: 563-566
- Newbigin E, Anderson MA, Clarke AE** (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* **5**: 1315-1324
- Paul J, Hooykaas J** (1988) *Agrobacterium* molecular genetics. *Plant Molecular Biology Manual A4*, 1-13, Kluwer Academic Publishers London
- Rivers BA, Bernatzky R, Robinson SJ, and JahnenDechent W** (1993) Molecular diversity at the self-incompatibility locus is a salient feature in natural populations of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Mol Gen Genet* **238**: 419-427
- Royo J, Kunz C, Kowayama Y, Anderson M, Clarke AE, Newbigin E** (1994) Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6511-6514
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sims T L** (1993) Genetic regulation of self-incompatibility. *Crit Rev Plant Sci* **12**:129-167
- Tanksley SD, Loaiza-Figueroa F** (1985) Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5093-5096
- Thompson RD, Kirch HH** (1992) The S-locus of flowering plants: When self-rejection is self interest. *Trends Genet.* **8**: 383-387
- Xu B, Nevins DL, Grun P, Kao TH** (1990) Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense*. *Mol Gen Genet* **224**: 341-346