


EXPANSIN 유전자군의 연구 동태

이 이
충북대학교 특용식물학과 

I. 서 론

식물세포는 동물세포와 달리 단단한 세포벽에 쌓여 있기 때문에 식물세포의 성장을 위해서는 세포벽의 이완이 요구된다. 세포벽의 이완은 식물의 외부로부터 내부로 들어온 물에 의한 팽압에 의해 유도된다. 이렇게 세포벽을 비가역적으로 이완시키는 기작에 대한 연구가 진행되었고 그 대표적인 것 중 하나가 옥신에 의한 산성생장설이다. 그리고 직접적으로 세포벽의 이완을 유도하는 매개체를 찾는 연구를 통하여 Cosgrove 박사 등이 expansin 단백질을 발견함으로써 그 구체적인 실체가 들어나기 시작하였다 (McQueen-Mason et al. 1992; Cosgrove 2000a, 2000b). 세포벽풀림요소 (cell wall loosening factor)라 할 수 있는 새로운 단백질의 이름으로는 extensin이라는 이름이 더 잘 어울리는 이름이지만 extensin이라는 이름이 이미 세포의 신장과는 별 상관이 없는 세포벽 단백질에 대해서 이미 붙여졌기 때문에 비슷한 뜻을 가진 expansin이라는 이름을 가지게 되었다. 본 기고에서는 하나의 거대한 유전자군인 expansin이 어떤 방식으로 연구되고 있는지에 대해서 알아보고 expansin 유전자군에 대한 연구가 다른 유전자군에 대한 연구의 본보기가 될 수 있음에 대해서 소개하고자 한다.

II. 본 론

• Expansin 단백질의 구조

Expansin 단백질은 크게 세 부위로 나눌 수 있는데, N-말단 부분에는 세포 외부로 보내기 위한 signal-peptide가 위치하고 있어서 대부분의 expansin 단백질은 세포 외부로 보내어 지는 것으로 생각되고 있으나

signal-peptide의 아미노산 서열이 보존되어 있지는 않다. 두 번째로 signal-peptide에 이어서 나타나는 부분이 endoglucanase family 45에서 나타나는 것과 비슷한 부분이 있다. 이 부위에는 상당히 보존된 시스테인 잔기가 6-10개 연달아 분포하고 있고 이들 중 6개는 모든 expansin 단백질에서 공통적으로 나타나서 시스테인 잔기가 expansin의 기능에 매우 중요한 기능을 가질 것으로 생각된다. 그리고 catalytic 부분으로 생각되는 HFD (His-Phe-Asp) domain이 있어서 expansin 단백질의 중요한 특징이 된다. 마지막으로 C-말단 부분에는 4개의 보존된 Trp 잔기가 있다. 이 부분은 cellulase의 cellulose binding domain에서 보이는 Trp 잔기와 유사한 부분이 있어서 cellulose에 결합하는 부위로 생각된다.

• Expansin의 유전자 구조

Expansin 유전자의 intron은 매우 보존되어 있다. intron의 발견 순서에 따라 A, B, C, D, E, F, G 등의 이름이 붙여졌으며, 이들 인트론은 α -expansin의 경우 A와 B 인트론의 조합에 의한 0, 1, 2개의 인트론이 분포하고 있고, β -expansin의 경우 A, B, C, D, E, F, G 인트론의 조합에 의한 0개에서 5개의 인트론이 분포하고 있다. 인트론이 위치한 자리가 매우 보존되어 있는데, 아미노산 서열로 align 했을 경우 인트론이 나타나는 자리는 정확하게 일치하고 있다. 뿐만 아니라, 이들 인트론의 phase (인트론이 코돈 중 어느 위치에 있는지에 따라 코돈과 코돈 사이이면 0, 코돈의 첫째와 둘째 염기사이이면 1, 둘째와 셋째 염기사이이면 2로 표시함)도 정확히 일치한다. A 인트론은 phase 1, B 인트론은 phase 2, C 인트론은 phase 0, E

인트론은 phase 2, F 인트론은 phase 0에 위치하며 D와 G인트론은 5' UTR 부위에 존재해서 phase를 말할 수 없다. 이처럼 유전자의 구조가 보존됨으로 인해서 expansin 유전자의 경우 유전자의 구조를 이용해서 유전자의 진화가 연구되었다 (Lee et al. 2001; Li et al. 2002; Sampedro et al. 2005). 그리고 계통학적으로 하나의 group으로 묶이는 유전자들은 거의 예외 없이 같은 유전자 구조를 가지고 있다.

• Expansin 유전자군

Expansin 유전자군에 대한 연구는 다른 유전자군에 대한 연구와 같이 2000년대 초 벼와 애기장대의 게놈 프로젝트가 급진전을 보이면서 유전자가 많이 발굴되어 연구되었다. 그 결과로 총 4개의 sub-family를 가진 super-family가 밝혀졌다. 두 개의 family는 이미 언급한 바 있는 α -expansin과 β -expansin인데 이

들은 이미 expansin의 기능을 측정하는 extensometer를 이용한 실험을 통해 그 기능이 알려진 단백질들이다. 새로이 발견된 두 개의 family는 아미노산 서열과 유전자 구조를 보면 분명히 expansin 유전자군과 같은 조상으로부터 분리된 것임은 확실하지만 아직 세포벽을 이완시키는 expansin 고유의 특성이 확인되지 않은 관계로 expansin-like 유전자로 명명한 것인데 계통학적으로 분명히 두개로 구분되어서 expansin-like A와 expansin-like B로 불리고 있다.

expansin이 가지는 다양한 기능이 알려지고 특히 식물의 생장에서의 중요성이 인식되면서 많은 연구자들이 이 유전자군에 대해서 관심을 가지고 연구하였고 수많은 유전자가 존재하는 관계로 학자들이 유전자의 이름을 독립적으로 붙여서 학자들이 이해하는데 혼돈이 생겼다. 따라서 이러한 문제를 없애고자 expansin을 연구하는 학자들이 모여 유전자 명명의

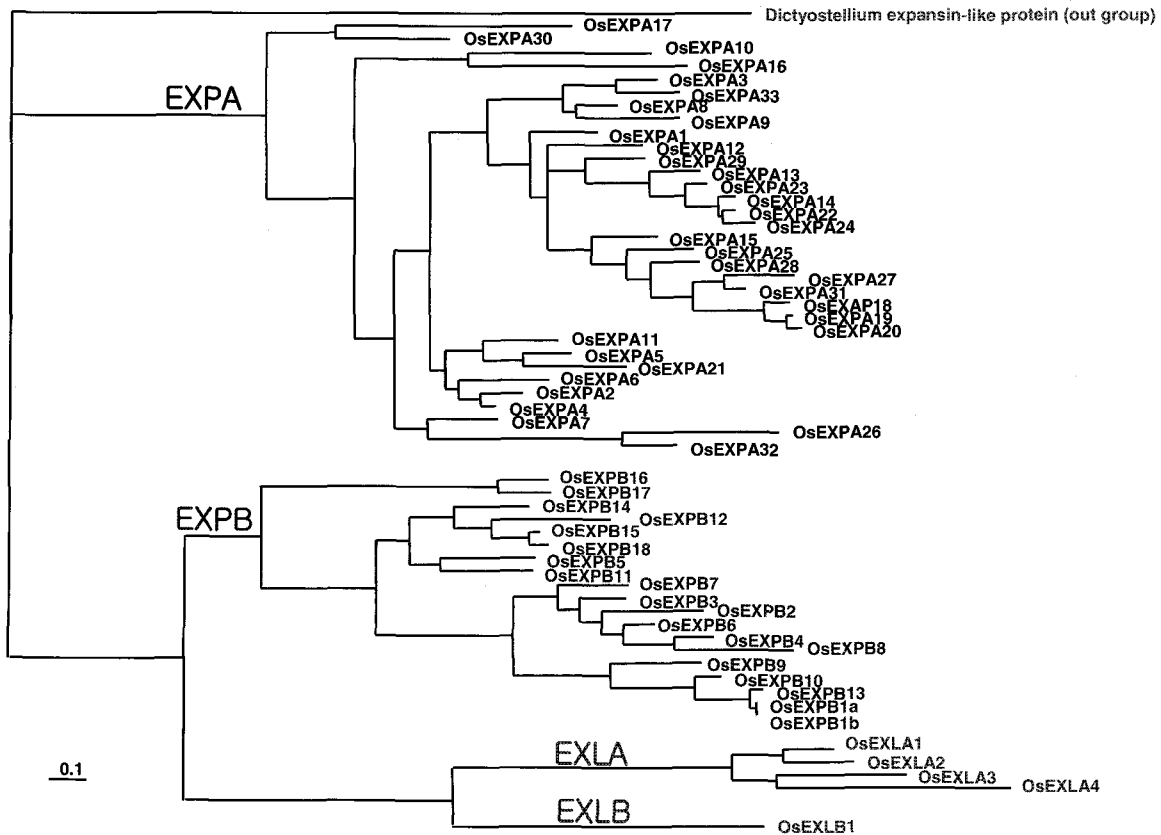


그림 1. 벼 expansin 유전자군의 계통수. MrBayes program을 이용하고 Dictyostellium의 expansin 유사 단백질을 out group로 설정.

통일에 합의하였다. α -expansin 또는 $EXP\alpha$ 1으로 불리던 맨 처음 발견된 expansin은 α -expansin (EXPA), β -expansin 또는 $EXP\beta$ 1로 불리던 것은 β -expansin (EXPB), expansin-like 또는 $EXP\beta$ 2로 부리던 것들은 expansin-like A (EXLA), expansin-related 또는 $EXP\beta$ 3로 불리던 것들은 expansin-like B (EXLB)로 부르기로 합의하였다 (Kende et al. 2004).

EXPA는 벼에서 34개, 애기장대에서 26개 발견되었으며, EXPB는 벼에서 19개, 애기장대에서 6개가 발견되었고, EXLA는 벼에서 4개, 애기장대에서 3개, EXLB는 벼와 애기장대에서 각각 1개씩이 발견되었다 (그림 1). 각종 식물에서 발견된 expansin 유전자의 accession 번호와 이름은 Daniel Cosgrove 박사 (Pennsylvania State University, U.S.A.)에 의해서 운영되는 웹사이트 <http://www.bio.psu.edu/expansins/>에서 쉽게 확인할 수 있다.

• Expansin은 유전자의 진화

벼와 애기장대의 게놈을 분석해 보면 expansin 유전자들은 게놈상에 병렬로 연속해서 존재하는 경우가 많다 특히 벼의 경우 전체의 반 이상의 유전자가 두개 이상의 유전자가 병렬로 연결되어 있는 구조로 되어 있다. 이 말은 expansin 유전자들이 비교적 최근에 duplication 되었다는 것을 의미하며 이는 유전자의 복제와 진화를 연구하는데 좋은 재료가 될 수 있다. 특히 expansin 유전자의 염기와 단백질 서열이 매우 보존된 유전자이기 때문에 더욱 좋은 연구재료가 될 수 있다. 2001년 Lee 등이 expansin 유전자군의 진화에 대해서 발표한 이후로 많은 연구자들이 expansin 유전자군을 재료로 진화를 연구했으며 진화를 근거로 유전자군을 계통화하고 그룹화하여 수많은 expansin 유전자들의 기능을 추정하고자 노력하고 있다. 그 결과 expansin 유전자군의 4개 family 모두 하나의 조상으로부터 진화되어 왔으며 이들의 분리순서는 α -expansin이 가장 먼저 분리되고 다음으로 β -expansin이 분리 되었으며 마지막으로 EXLA와 EXLB가 분리되었던 것으로 분석되었다. 또한 최근에는 단자엽식물인 벼와 쌍자엽식물인 애기장대에서 나타나는

microsynterny를 이용해서 expansin 유전자군의 진화를 추정하였으며 이와 같은 유전자군의 진화에 대한 연구가 유전자군의 계통학적 연구에 도움이 될 수 있음을 보이는 연구 결과가 발표되기도 하였다 (Sampedro et al. 2005).

• 유전자 발현

지금까지의 expansin 유전자의 발현은 다양한 원인에 의해서 조절되는 것으로 알려지고 있다. expansin 유전자는 일주기에 의해서 변화되고, 상처나 침수, 식물호르몬 처리 등에 의해서 유전자의 발현이 수 십 배에서 수 천 배까지 증가한다. 특히 식물호르몬에 의한 변화에 대해서는 비교적 잘 알려져 있는데 옥신, 지베렐린, 시토키닌, 앱시스산, 에틸렌 등의 처리에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려졌다 (Lee et al. 2001; Cho and Cosgrove 2004). 실제로 expansin 유전자의 promoter 부분을 분석해 보면 옥신에 의해 영향을 받는 TGA나 AuxRR element가 자주 발견되며, 지베렐린의 영향을 받는 GARE, P element가 있고, 앱시스산에 영향을 받는 ABRE, 에틸렌의 영향을 받는 ERE 등의 element가 발견되고 있다. Expansin 유전자 중에는 기관이나 조직 특이적으로 발현되는 유전자가 많은데 이들 유전자의 promoter는 식물의 형질전환에 응용하면 유용할 것으로 생각된다.

• Expansin의 기능

Expansin의 기능으로 알려진 것은 expansin 유전자의 수만큼 다양하다. 가장 먼저 세포의 길이신장과 관련이 깊다는 것이 알려진 이후로 과실의 후숙, 잎의 이층형성, 꽃의 기관분화, 뿌리털의 발달, 기생식물과 식물사이의 공생, 상처에 대한 반응, 환경변화에 대한 반응 등 과 연관이 있는 것으로 알려지고 있다. expansin 유전자가 기관 특이적으로 발현되고 각각의 유전자가 여러 가지 자극에 대해서 특이적으로 발현되는 것은 expansin 유전자가 식물의 발달과 생장에 매우 중요한 유전자이어서 유전자의 발현이 매우 정밀하게 조절되게 하기 위해서인 것으로 풀이된다. 유전자의 수가 많은 것도 유전자의 양을 늘리기 위한 것일 수도 있으나 유전자의 정밀한 조절과도 상관이 있는

것으로 생각된다. 왜냐하면 expansin 유전자의 높은 아미노산 identity로 볼 때 최소한 최근에 duplication된 높은 아미노산 identity를 보이는 단백질들의 생화학적 기능이 모두 다를 것으로 생각되지는 않기 때문이다.

• Expansin의 작용기작

Expansin의 작용기작에 대한 연구는 매우 어려운 편이다. 그 이유로는 기질로 작용하는 세포벽이 매우 큰 고분자 물질이어서 정량적인 실험이 불가능하고, 재조합단백질의 생산이 성공하지 못한 때문이다. 따라서 아직 정확한 작용기작은 알려져 있지 않고 몇 가지 설이 제시되고 있다. 일단 expansin은 원자사이의 공유결합을 끊는 방식으로는 작용하지는 않는 것으로 생각되고 있으며 세포벽의 근간이 되는 cellulose fibril과 그 사이를 연결하고 있는 hemicellulose 사이의 수소결합을 끊는 것으로 추정되고 있다. 하지만 이러한 기작을 보이는 효소가 아직 알려져 있지 않고 이러한 작용기작을 보여줄 수 있는 방법이 아직 없는 실정이어서 아직 추정단계에 머무르고 있다. 하지만 expansin의 작용 부위만은 확실해 보인다. 지금까지 발견된 expansin 유전자의 거의 대부분이 N 말단 부위에 세포외부로 단백질을 보내는 signal peptide를 가지고 있다. 따라서 expansin은 세포막의 외부인 세포벽에서 작용을 하리라 예견되어 왔고 최근 immunogold electron microscopy에 의해서 α -expansin과 β -expansin이 모두 세포벽에 존재한다는 것이 확인되었다. 특히 OsEXPB3에 특이적인 항체를 이용한 실험에서는 OsEXPB3단백질이 1차 세포벽에만 존재하며 2세포벽이 비후된 이후에도 세포벽에 그대로 존재해서 세포벽의 구성성분이 될 수도 있다는 추론을 가능하게 했다. 그리고 세포벽에 결합되어 있는 β -expansin은 salt, 환원제, 계면활성제, 열처리 등에 의해서 세포벽으로부터 이탈되지 않으며 오직 SDS 처리에 의한 변성만이 세포벽으로부터 이탈되게 한다는 것도 알려졌다. 담배 BY2 세포에서 발현되어 정제된 재조합 OsEXPB3 단백질은 세포벽에 결합할 수 있고, SDS에 의해서 단백질이 제거된 세포벽에도 결합하며 순수한 cellulose에도 결합할 수 있음이 알

려졌다 (Lee and Choi 2005).

β -expansin의 작용 기작에 대해서는 최근에 많은 논란이 되고 있는데 일부 그룹에서는 이들 단백질이 cysteine계 단백질분해 효소인 papain 계통의 효소와 유사한 특성을 가지고 있으며 세포벽에 존재하는 단백질사슬을 분해하여 세포벽의 이완을 유도한다고 주장하고 있으며(Grobe et al. 2002) 다른 그룹에서는 식물에서 분리 정제한 Lol p 1, Phl p 1, Zea m 1 등의 β -expansin을 이용한 실험에서 이들이 expansin의 특이적 활성인 cell wall loosening활성을 가지고 있으나 단백질 분해효소의 활성은 가지고 있지 않으며 단백질 분해효소의 활성 억제에 의해서 이들 정제된 단백질의 expansin 활성이 억제 되지도 않고, 역으로 여러 가지 단백질 분해 효소가 expansin활성을 가지지도 않는다는 사실을 들어 반박하고 있는 실정이다 (Li and Cosgrove 2001).

• 세계적인 expansin 연구추이

지금까지의 연구들을 통하여 학자들은 EXPA와 EXPB의 기능을 extensometer라는 기기를 이용한 creep test를 통해서 확인할 수 있었고 따라서 기능을 알고 있는 단백질을 expansin 이라고 명명하고 아직 기능이 밝혀지지 않은 expansin과 구조가 비슷한 것들을 expansin-like 단백질이라고 명명하고 있다. 그리고 EXPB중에서도 꽃에서 발현되어 소위 pollen allergen이라고 알려진 몇 개의 (벼의 경우 19개의 유전자중 5개) 것들은 기능을 알지만 나머지 14개의 유전자는 영양기관에서 발현되어 vegetative EXPB라고 부르며 이들이 줄기의 길이생장과 상관관계가 있다는 것은 알지만 아직도 실질적인 기능이 무엇인지 모르고 있다.

펜실베이니아주립대의 Cosgrove를 비롯한 위시한 최초의 expansin 연구팀은 다양한 생물체에서 expansin과 유사한 유전자를 발굴하려고 노력하고 있으며 조류나 선대류 등 하등생물체로부터 expansin을 발굴하여 expansin 유전자의 기원을 밝히려고 하고 있으며 단자엽식물과 쌍자엽식물의 세포벽의 구성성분이 다른데 착안해서 단백질의 기능을 추론하려고 노력하고 있다. 또한 다양한 단백질 발현 시스템을 이용하

여 재조합 expansin을 합성하려고 시도하고 있다. Fleming, McQueen-Mason 등 유럽의 expansin 연구그룹에서는 다양한 식물체의 형질전환을 통해서 expansin 유전자의 기능을 밝히려는 노력을 하고 있으며 expansin 유전자의 진화에도 관심을 보이고 있어서 미생물 등의 생물에서 expansin 유사 단백질을 찾으려 노력하고 있다. 미시간주립대의 Kende 그룹에서는 α -expansin과 β -expansin을 이용해서 벼와 담배 등의 형질전환을 통해 유전자의 기능을 알아내려 하고 있으며 (Choi et al. 2003), UC Davis의 Brummell 그룹에서는 토마토 등 작물의 유전자 변형을 통해서 작물의 형질을 개선하려는 노력을 하고 있다. 국내의 연구진으로는 포항공대 안진홍교수팀에서 α -expansin 전체 family 수준의 유전자 발현을 연구하였고, T-DNA mutant를 이용하여 유용한 expansin 유전자를 발굴하려고 하고 있으며 (Shin et al. 2005), 서울대 이종섭교수팀에서는 콩의 expansin을 연구하여 발표한 바 있다 (Lee et al. 2003). 충남대 조형택교수팀에서는 expansin 단백질의 생화학적 기능이 단백질의 어느 부위에 의존하는지를 연구하고 있으며 식물의 진화동안에 세포의 성장 메커니즘이 어떤 방식으로 변화되어 왔는지를 연구하기 위하여 조류의 expansin을 연구하고 있다. 충북대 이이교수연구실에서는 기능이 잘 알려지지 않은 세 가지 유전자군, 즉, EXPB, EXLA, EXLB의 기능을 알아보기 위하여 포항공대의 안진홍교수팀과 공동으로 벼의 T-DNA 돌연변이 라인을 이용하여 이들의 knock out과 activation tagging 라인을 선발하여 형질을 연구하고 있다. 이들 중 homozygous로 추정되는 몇 개의 라인에서는 심한 표현형을 보여서 각 유전자의 기능을 연구하는데 유용한 돌연변이가 될 것으로 기대된다 (그림 2). 또한 지금까지 재조합 expansin 단백질의 생산에도 여러 가지 시도를 해 왔는데 대장균, *Pichia*, 효모, vaculovirus, 담배세포, 벼 캘러스세포 등을 이용한 시도를 해왔으며, 담배세포의 경우 pCambia1300MCS를 이용한 경우 성공적으로 발현이 되어 정제가 가능하였으나 벼줄기나 자엽초를 이용한 실험에서 expansin 활성을 검출하지는 못하였다. 여러 가지 발현시스템을 이용하



OsEXLA1 Over-expressor Control

그림 2. expansin-like 유전자의 하나인 OsEXLA101 over express된 벼

여 활성을 가진 재조합 단백질을 생산하기 위하여 시도하고 있다. 재조합 단백질의 생산은 이 단백질의 생화학적 기능을 밝히는데 많은 도움이 될 것으로 기대된다. 지금까지 대장균에서 발현된 재조합 단백질을 이용하여 OsEXPA4와 OsEXPB3에 특이적인 항체를 제조하였고 이들을 이용하여 expansin의 발현을 단백질 수준에서 연구하고 전자현미경을 이용하여 expansin 단백질의 세포내 위치를 밝힌 바 있다 (Lee and Choi 2005).

III. Expansin 연구의 전망

최근의 expansin에 대한 연구 결과를 보면 expansin이 세포벽의 이완이 수반된 다양한 생물학적 과정에 관여한다는 사실을 확인할 수 있고 이러한 일은 수십 개의 expansin 유전자가 하나의 식물체에 존재함으로써 이루어지는 것으로 보인다. 또한 expansin 유전자 발현은 식물호르몬, 환경적 자극, 등 다양한 요소에 의해서 조절을 받아 현저하게 그 발현이 변화하고 있다. 그러나 그러한 유전자발현의 급격한 변화가 식물의 성장에 어떠한 의미를 가지는지는 아직도 잘 알려지지 않고 있다. 식물에 왜 그렇게 많은 expansin 유전자가 필요한지에 대해서도 연구가 필요하며 이를 위해서는 각각의 expansin 유전자에 대한 돌연변이체의 확보가 필수적이라고 생각된다. 다행히 포항공대의 T-DNA mutant line과 경상대학교의 AC, DS line이 확

보되어 있어 expansin의 연구에 크게 도움이 될 것으로 기대하고 있다. 하지만 expansin의 경우 매우 큰 redundancy를 보이고 있어 하나의 유전자의 knock-out mutant는 형질에 변화가 없을 가능성이 커서 중복돌연변이를 만들어야 할 것 같고 각각의 단백질에 대한 특이적인 항체의 생산도 이러한 연구에 큰 도움이 될 것이다. 지금까지 비교적 잘 연구된 EXPA와 pollen allergen (주로 꽃가루에서 발현되는 EXPB)과 달리 vegetative EXPB, EXLA, EXLB에 대해서는 아직 그 기능을 잘 모르고 있는 실정이다. vegetative EXPB는 단자엽식물의 세포벽 이완에 크게 기여할 것으로 추정되고 있다. 각 expansin 단백질의 생화학적 기능에 대해서는 아직 논란이 많이 있으며 이러한 문제의 해결을 위해서는 생화학적으로 활성을 가지는 재조합 단백질의 생산이 필수적인데 아직 선충류에서 발견된 expansin 유사 단백질 외에는 성공한 사례가 없는 실정이다. expansin은 식물의 키, 과육의 강도, 뿌리의 발달, 꽃의 분화 등 수 많은 부분에 영향을 미치는 단백질로서 그 기능이 잘 알려진다면 작물의 개량에 잘 이용될 수 있는 잠재성을 가지고 있다고 하겠다. 앞으로 많은 연구자들의 관심이 기대되는 유전자군이다.

IV. 참고문헌

- Cho H-T, Cosgrove DJ (2004) Expansins as agents in hormone action. In *Plant Hormones*. 3rd ed. PJ Davies (ed.), Springer Publishers, pp 262-281
- Choi D, Lee Y, Cho H-T, Kende H (2003) Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell* 15: 1386-1398
- Cosgrove DJ (2000a) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:321-326
- Cosgrove DJ (2000b) New genes and new biological roles for expansins. *Curr Opin Plant Biol* 3:73-78
- Grobe K, Poppelmann M, Becker W-M, Petersen A (2002) Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur J Biochem* 269: 2083-2092
- Kende H, Bradford KJ, Brummell DA, Cho H-T, Cosgrove DJ, Fleming AJ, Gehring C, Lee Y, McQueen-Mason SJ, Rose JKC, Voeselek LACJ (2004) Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol* 55: 311-314
- Lee D-K, Ahn JH, Song S-K, Choi YD, Lee JS (2003) Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiol* 131: 985-997
- Lee Y, Choi D (2005) Biochemical Properties and Localization of the β -Expansin OsEXPB3 in Rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Cells* (in press)
- Lee Y, Choi D, Kende H (2001) Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol* 4: 527-32
- Li LC, Cosgrove DJ (2001) Grass group I pollen allergens (β -expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *Eur J Biochem* 268: 4217-4226
- Li Y, Darley CP, Ongaro V, Fleming A, Schipper O, Baldauf SL, McQueen-Mason SJ (2002) Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol* 128: 854-864
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433
- Sampedro J, Lee Y, Carey RE, dePamphilis C, Cosgrove DJ (2005) Use of genomic history to improve phylogeny and understanding of births and deaths in a gene family. *Plant J* (in press)
- Shin JH, Jeong DH, Park MC, An G (2005) Characterization of α -expansin gene family in rice. *Mol Cells* (in press)