

Expansin 유전자를 이용한 담배의 형질전환

최동수¹⁾ · 김호방²⁾ · 김정희³⁾ · 신주식⁴⁾ · 석영선⁴⁾ · 정찬문⁴⁾ · 이이^{4)*}

¹⁾ Michigan State University-Department of Energy Plant Research Laboratory,
Michigan State University

²⁾ 서울대학교 자연과학대학 생명과학부

³⁾ 경북대학교 자연과학대학 생물학과

⁴⁾ 충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
(2005년 11월 15일 접수)

Tobacco Transformation Using Expansin Genes

Dongsu Choi¹⁾, Ho-Bang Kim²⁾, Jeong-Hoe Kim³⁾, Ju-Sik Shin⁴⁾,
Yeong-Seon Seok⁴⁾, Chan-Moon Chung⁴⁾ and Yi Lee^{4)*}

¹⁾ Michigan State University-Department of Energy Plant Research Laboratory, Michigan State University

²⁾ School of Biology, Seoul National University

³⁾ Department of Biology, Kyoungpook National University

⁴⁾ Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University

(Received November 15, 2005)

ABSTRACT : Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells were transformed with rice expansin genes, *OsEXPA4*, *OsEXPB3*, *OsEXPB4*, and *OsEXPB6*, to elucidate the function of the genes in tobacco cells. The transformation increased the mass of the callus by 36% - 65%, and the cell length by 12% - 28%. The cell width was decreased by 3% for *OsEXPB3*, not changed for *OsEXPB4*, increased by 25% and 20% for *OsEXPA4* and *OsEXPB6*, respectively. From database search, seven expansin genes were found and six of them belong to EXPA group and one of them belongs to EXPB group. EXLA and EXLB were not found. All tobacco expansin genes were evenly distributed in the phylogenetic tree of rice and Arabidopsis expansin genes.

Key words : expansin, phylogenetic analysis, *Nicotiana tabacum*, transformation,

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 산성성장설이다. 그리고 직접적으로 세포벽의 이완을 유도하는 매개체를 찾는 연구를 통하여 Cosgrove 박사 등이 expansin 단백질 을 발견함으로써 그 구체적인 실체가 밝혀지기 시

*연락처 : 361-763, 충북 청주시 개신동 12번지, 충북대학교, 농업생명환경대학, 특용식물학과

*Corresponding author : Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, 12 Gaeshin-dong, Cheongju 361-763, Republic of Korea

작하였다(McQueen-Mason *et al.*, 1992; Cosgrove, 2000a, 2000b).

Expansin 단백질은 크게 세 부위로 나눌 수 있는데, N-말단 부분에는 세포 외부로 보내기 위한 signal-peptide가 위치하고 있어서 대부분의 expansin 단백질은 세포 외부로 보내지는 것으로 생각되고 있다. 두 번째로 signal-peptide에 이어서 나타나는 부분이 endoglucanase family 45에서 나타나는 것과 비슷한 부분이 있다. 이 부위에는 상당히 보존된 Cys 잔기가 6~10 개 연달아 분포하고 있고 이들 중 6개는 모든 expansin 단백질에서 공통적으로 나타나서 Cys 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 부위라고 추정되고 있다 (Cosgrove, 1999).

Expansin 유전자의 구조는 매우 보존되어 있다. 이 유전자에서 나타나는 intron은 발견 순서에 따라 A, B, C, D, E, F, G 등의 이름이 붙여졌으며, 이들 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. 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 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 이들은 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 통일에 합의하였다. α -expansin 또는 EXP α 1으로 불리던 맨 처음 발견된 expansin은 α -expansin (EXPA), β -expansin 또는 EXP β 1로 불리던 것은 β -expansin (EXPB), expansin-like 또는 EXP β 2로 부리던 것들은 expansin-like A (EXLA), expansin-related 또는 EXP β 3로 불리던 것들은 expansin-like B (EXLB)로 부르기로 합의하였다 (Kende *et al.*, 2004).

Expansin의 기능으로 알려진 것은 매우 다양하다. 가장 먼저 세포의 길이신장과 관련이 깊다는 것이 알려진 이후로 과실의 후숙 (Brummell *et al.*, 1999, Hiwasa *et al.*, 2003; Kitakawa *et al.*, 2005), 잎의 이층형성 (Belfield, 2005), 꽃의 기관분화 (Gookin *et al.*, 2003), 뿌리털의 발달 (Cho and Cosgrove, 2002), 기생식물과 식물사이의 공생, 상처에 대한 반응, 환경변화에 대한 반응 등과 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.

Expansin에 관한 최근의 연구결과에 의하면 담배의 경우 잎의 형태형성에 관여해서 이 단백질이 발현되는 부위에서 엽원기가 발생하고 엽원기에 국부적인 유전자발현을 유도한 경우 그쪽으로 잎이 신장하는 것을 보인 바 있다 (Pien *et al.*, 2001). 그리고 expansin 단백질은 벼의 경우 마디에서 다량으로 발현되는 것을 볼 수 있는데 마디는 부정근과 결순의 발달이 일어나는 부위이고 (Lee and Kende, 2001, 2002), expansin 단백질중 하나인 OsEXPB3에 대한 항체를 이용해서 immunohistochemistry를 이용하여 연구한 바에 따르면 결뿌리가 발달하는 부위에 expansin 단백질이 특히 많이 발현되는 것을 확인한 바 있다 (Lee and Choi, 2005).

담배의 경우 잎을 수확하는 작물로서 생식생장에 의해 영양생장이 저해되기 때문에 생식생장 억제의 일환으로 순지르기를 하는데 순지르기 이후 정단이 없어지는 관계로 액아가 활성화되어 3회에 걸쳐 적아 작업을 해야 한다. 이에 따른 노동력이 많이 소요되어 결순의 제거를 위하여 다양한 종류의 약제가 사용되는데 이들 약제의 사용으로 인하여 농약 잔류문제가 생기고 품질이 저하 되는 문제가 다시 발생한다. 노동력의 절감을 위하여 결순의 성장이 저해되는 품종의 개발이 필수적이다.

이번 연구에서는 담배의 결순과 관련된 유전자를 이용하여 형질전환을 통한 결순이 없는 담배의 개발을 위한 준비작업의 일환으로 담배에서 expansin 유전자를 발굴하고 이들 유전자를 이미 다른 작물에서 발굴된 expansin 유전자와의 계통학적인 비교를 수행하고 이미 발굴된 여러 expansin 유전자를 이용하여 담배의 형질전환 체계를 확립하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

실험재료

실험재료로는 담배 (*Nicotiana tabacum* L.) BY2 cell을 이용하였다.

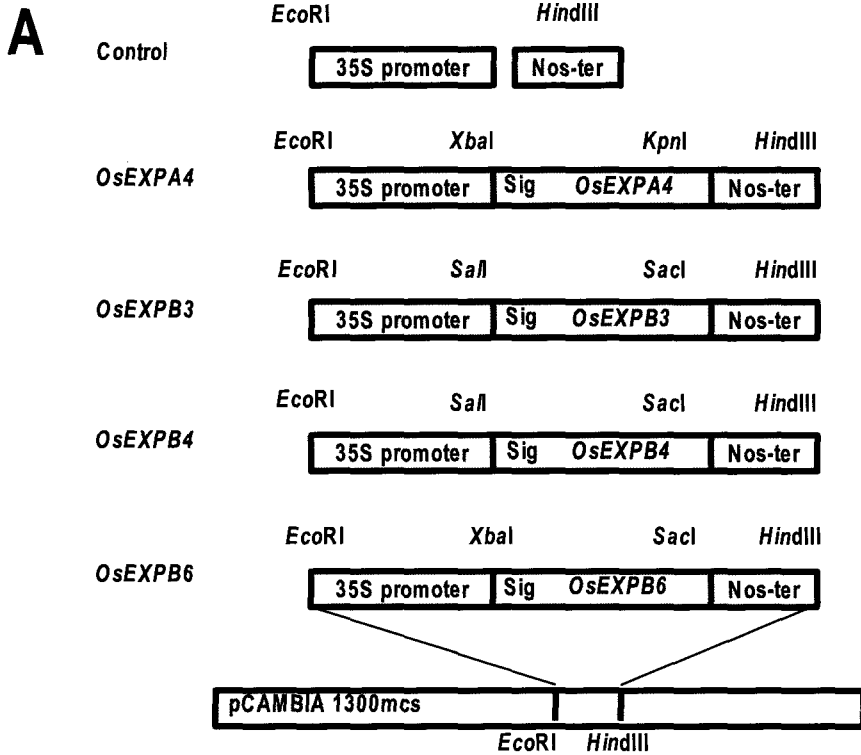
vector 제작

Fig. 1A와 같이 pCAMBIA 1300mcs vector를 이용하여 네 가지 vector construct를 제조하였다. 유전자를 도입하지 않은 vector를 이용하여 형질전환 시킨 세포를 대조구로 사용하였다. OsEXPA4는 cDNA clone U85246을 *Xba*I과 *Kpn*I, OsEXPB3와 OsEXPB4는 *Sal*I과 *Sac*I을 이용하여 각각 EST clone S1104와 C51142로부터 잘라내었으며 OsEXPB6는 *Xba*I을 가진 T7 primer (GCTCTAGAGTAATACGACTCACTATAGGGC)와 T3 primer (ATTAACCCCTCCTAAAGGGA)를 이용하여 EST clone C51730으로부터 증폭한 후 *Xba*I과 *Sac*I을 이용하여 잘라내어 pCAMBIA1300mcs에 도입하였다.

형질전환

제조한 vector를 sequencing을 통하여 유전자서열을 확인한 후 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 freeze-thaw 방법을 이용하여 도입하였다. 유전자의 도입이 확인된 *Agrobacterium* 세포를 hygromycin이 들어있는 LB 배지에서 하루밤 동안 배양한 후 계대배양한 지 3일째 되는 BY2 cell 50 mL에 20 mM acetosyringone 50 μ L를 첨가한 후 피펫을 이용하여 20 회 빨아들었다 내뿜기를 반복해서 세포에 상처를 유도한 후 4 mL의 세포를 페트리디쉬에 넣고 100 μ L의 *Agrobacterium* 세포를 첨가하여 잘 섞어주었다. Parafilm으로 포장한 후 28°C에서 3일간 배양하였다.

각 페트리디쉬에 500 μ g/mL의 carbenicillin이 첨가된 NT배지 (MS salt 4.3 g/L, sucrose 30 g/L, MES 0.5 g/L, thiamine 1 mg/L, myo-inositol 0.1 g/L, KH₂PO₄ 0.18 g/L, 2,4-D 1 μ M, pH 5.7)인 NTC배지를 10 mL 넣어 50 mL conical tube에 세포를 모은 후 swing bucket rotor를 이용하여 1000 rpm에서 4분간 원심분리 하였다. 감압장치를 이용하여 상등액을 제거한 후 50 mL의 NTC 액체 배양액을 첨가하고 현탁시킨 후 다시 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이것을 5 mL의 NTC 배양액을



B

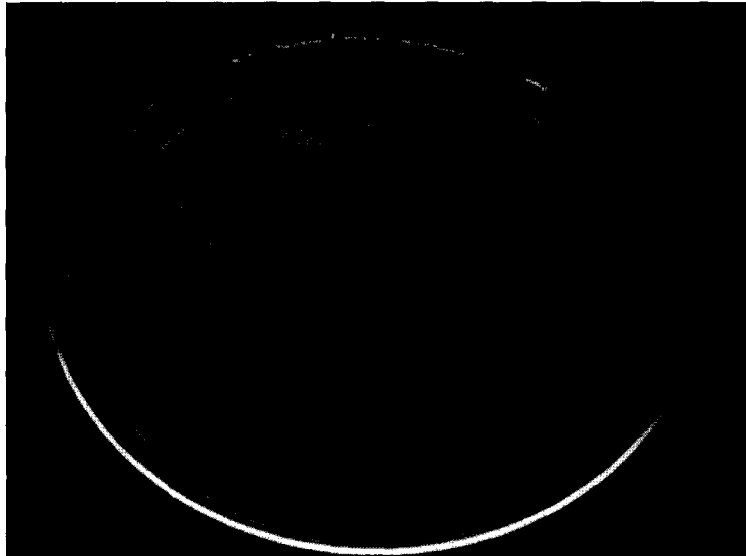


Fig. 1. Structures of constructs for tobacco transformation and transformed tobacco cell. **A**, expansin constructs under the control of the constitutive CaMV35S promoter. **B**, the growth of the transformed cells from selectable medium (NTC) containing hygromycin.

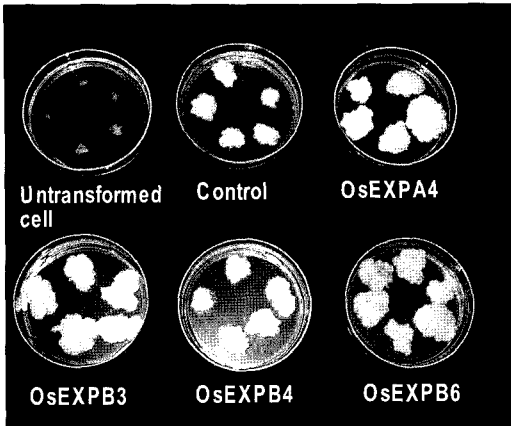


Fig. 2. Callus growing on the medium containing hygromycin 3 weeks after subculture.

이용하여 현탁한 후 2 mL씩 hygromycin이 첨가된 NTC 고체배지에 도말하였다. Parafilm으로 포장한 후 28°C에서 3주간 배양하였다. 배양 후 Fig. 1B와 같이 항생제 배지에서 자란 세포 덩어리를 골라 hygromycin이 들어있는 NTC 고체배지에서 배양하였다 (Fig. 2).

형질전환된 캘러스의 확인은 PCR과 면역학적 방법을 병용하여 수행하였다. PCR을 통한 형질전환체의 확인은 OsEXPA4의 경우 유전자 특이적인 primer인 GATGCTTCGGAACCATGG와 ATTCCGTTGCAAGGCCATCACTCC를 이용하여, OsEXPB3의 경우 TTCCATCTCCAAGAAGGCT와 TAATTATGACCTTTGTTCTG, OsEXPB4의 경우 CCGCCACCTCTCTCATCG와 CCTTGTACGCCTACC TCCTCCATT, OsEXPB6의 경우 ACTACCACTACTACTGCTGC와 CTGTAGCCTTAAGATTTGGTT를 이용하여 PCR을 수행하였다. 면역학적인 방법은 전에 기술한 방법에 따라 OsEXPA4와 OsEXPB3에 특이적인 항체를 이용하여 수행하였다 (Lee and Choi, 2005).

세포의 크기 측정

고체배지에서 배양한 형질전환 세포를 NTC 액체 배지에서 1일 동안 현탁 배양하여 광학현미경을 이용하여 디지털 사진기를 이용하여 사진을 촬영하고

대물마이크로미터를 같은 배율에서 촬영하여 세포의 폭과 길이를 측정하였다.

계통학적 연구

담배의 expansin 단백질의 아미노산 서열은 GenBank에서 수집하였으며 벼 (*Oryza sativa* L.)와 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* L.)의 expansin super-family 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 분류하였다. 계통수는 먼저 Clustal X (1.81) 프로그램을 이용하여 align 한 후 MrBayes (3.0) 프로그램을 이용하여 (Jones 아미노산 모델, gamma estimation, 500,000 generation, 4 channels) 만들었고 root는 *Dictyostellium*의 expansin 유사단백질 (accession No. XP_647352)을 이용하였다 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

결과 및 고찰

세포의 형질전환

현탁배양 세포의 형질전환을 통하여 대조구를 포함한 각 처리구에서 독립된 20 라인씩 총 100 라인의 형질전환체가 선발되었으며 PCR을 통하여 유전자의 도입이 확인되었다 (Fig. 3A). 또한 형질전환된 담배세포라인으로부터 OsEXPA4와 OsEXPB3에 대한 항체 (Lee and Choi, 2005)를 이용하여 면역학적인 실험을 한 결과 선택배지에서 자란 모든 캘러스에서 도입된 단백질의 발현을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B, C). OsEXPB4와 OsEXPB6에 대해서는 항체가 없어 단백질의 발현을 면역학적으로 확인하지 못하였다. 담배세포를 이용한 세포의 형질전환은 오래전부터 시도되어 오고 있는 잘 확립된 실험과정이지만 이번 실험에서는 expansin 유전자를 이용하여 형질전환을 시도함으로써 다른 식물의 expansin 단백질이 담배에서 발현되더라도 세포에 치명적인 효과를 주지 않고 세포가 잘 생존할 수 있음을 확인할 수 있었다.

세포의 무게 측정

계대배양 후 3주후에 각 처리구당 callus의 무게를 측정된 결과 (Fig. 2, Table 1) 각 처리구의 평균 callus의 무게는 대조구에 비하여 36%에서 65%

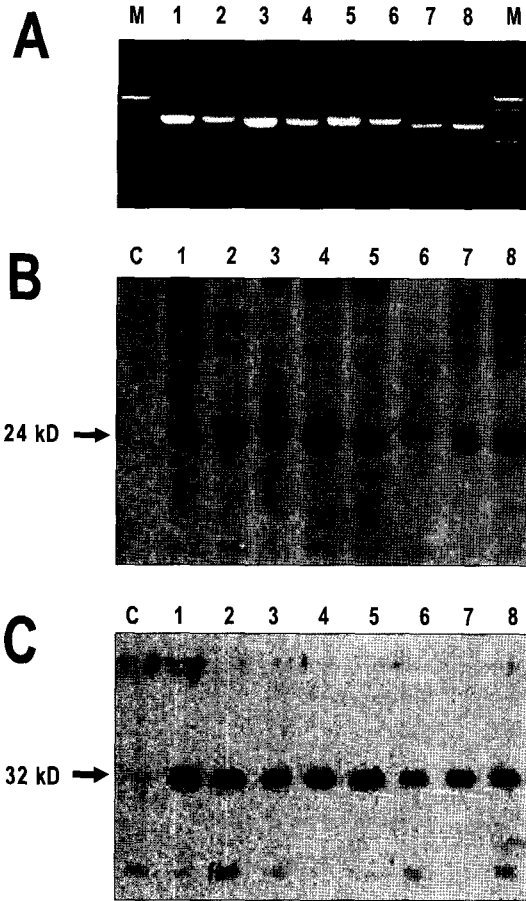


Fig. 3. Confirmation of transformation and expression of introduced expansin genes. **A**, PCR reaction of transformed cell lines with gene specific primers. M, DNA size marker (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Carlsbad, California, USA); 1 and 2 lanes, *OsEXPB3*; 3 and 4 lanes, *OsEXPB4*; 5 and 6 lanes, *OsEXPB6*; 7 and 8 lanes, *OsEXPA4*. **B**, Immunoblot of transformed cell lines probed with polyclonal antibody against *OsEXPA4*. **C**, control; 1 through 8 lanes, independent cell lines transformed with *OsEXPA4*. **C**, Immunoblot of transformed cell lines probed with polyclonal antibody against *OsEXPB3*. C, control; 1 through 8 lanes, independent cell lines transformed with *OsEXPB3*.

만큼 증가하였다. 그리고 callus의 무게는 대조구를 포함하여 모든 처리구에서 편차가 비교적 크게 나왔는데 그 이유는 callus를 계대하는 과정에서 옮기는 callus의 크기가 callus의 성장에 많은 영향을 주기 때문으로 생각된다. 실제로 callus의 크기별로 계대실험을 한 결과 callus의 크기가 일정한 수준이 하인 경우 초기의 생육속도가 현저히 저하되는 것을 알 수 있었다 (data는 제시하지 않음). 계대배양 시 callus를 멸균된 편셀을 이용하는 관계로 일정한 크기의 callus를 떼어내는 것은 실험자의 경험에 의존할 수밖에 없는 한계가 있는데 이와 같은 실험을 하는 경우에는 편차를 고려하여 측정하는 callus의 숫자를 충분히 많게 늘리는 것이 하나의 해결책이라고 생각된다. Callus의 무게 증가가 세포의 크기에서 유래했는지 아니면 세포의 세포분열 속도에서 유래했는지를 알아보기 위하여 각 처리구에서 세포의 크기를 측정하여 비교하였다.

Table 1. Weight and size of the transformed tobacco BY2 cells

treatment	callus weight g/callus ± SD (% of control)	cell length µm (± SD) (% of control)	cell width µm (± SD) (% of control)
Control	0.86±0.50 (100%)	92.0±32.3 (100%)	41.3±10.1 (100%)
OsEXPA4	1.42±0.66 (165%)	118.4±36.4 (128%)	51.5±11.5 (125%)
OsEXPB3	1.31±0.69 (152%)	103.5±44.6 (112%)	40.0±10.8 (97%)
OsEXPB4	1.18±0.59 (136%)	107.2±44.9 (117%)	41.8±10.9 (101%)
OsEXPB6	1.29±0.70 (150%)	111.4±35.5 (121%)	49.7±11.0 (120%)

Callus weight was calculated from 20 independent callus lines and cell size was calculated from 100 cells (5 cells from each 20 independent lines).

세포의 크기측정

형질전환된 세포를 액체배지에 현탁하여 하루 동안 배양한 후 현미경과 디지털사진기를 이용하여 사진을 촬영한 후 세포의 길이와 폭을 측정한 결과 (Table 1) 세포의 길이는 대조구에 비하여 12%에서 28%가 증가하였으나 세포의 폭은 OsEXPB3의 경우 3% 감소하였고 OsEXPB4, OsEXPB6, OsEXPA4는 각각 1%, 20%, 25%가 증가하였다. 종합적으로 평가할 때 callus의 증량증가는 세포수의 증가보다는 세포의 크기가 커진 결과에 의한다고 생각된다. 이러한 결과는 expansin 유전자를 이용하여 식물을 형질전환한 경우 식물체의 크기가 증가하고 세포의 크기도 증가한다는 기존의 결과 (Cho and Cosgrove, 2000; Choi *et al.*, 2003)와 일치한 결과이며 실험에 사용된 유전자들이 세포내에서 정상적으로 발현되었음을 보여준다.

담배의 expansin 유전자 분석

이번 실험은 담배의 유전자가 아닌 벼의 유전자를 이용하여 담배를 형질전환한 결과인데 앞으로 담배를 형질전환을 통하여 신종종을 개발하는 경우 다른 식물의 유전자를 이용할 수도 있겠으나 기존의 담배의 유전자를 이용하는 것이 가장 좋을 것으로 사료되고 특히 유전자의 발현을 증가시키는 경우에는 다른 식물의 유전자를 이용하는 것이 별 문제가 없어 보이나 기존의 유전자를 antisense 기술이나 RNAi 기술을 이용하여 유전자 발현을 억제하는 경우 담배의 유전자를 거의 모두 알고 있어야 체계적인 접근이 가능하다. 이에 따라 database의 유전자 검색을 통하여 담배의 유전자를 검색하여 보았다.

담배에서 모두 7개의 유전자가 발견되었다 (Fig. 4). 이들 유전자를 이용하여 추정된 아미노산 서열을 비교적 보존되어있지 않은 signal peptide 부분을 제거한 상태로 컴퓨터프로그램을 이용하여 분석한 결과 6개는 EXPA에 속하였고 1개는 EXPB에 속하였다. 그리고 담배에서는 벼와 애기장대에서 공히 발견된 EXLA와 EXLB에 속하는 유전자가 하나도 발견이 안 되어서 아직 담배의 유전자는 행이 불완전하다는 것을 알 수 있다.

애기장대와 벼에서 EXPA가 각각 26개와 34개

발견되고, EXPB가 각각 6개와 19개가 발견된 것과 비교해서 유전자의 수가 현저히 적게 발견된 것을 볼 수 있는데 애기장대와 벼가 쌍자엽식물과 단자엽식물의 모델 식물로서 게놈의 크기가 각각 1.2×10^8 과 (www.arabidopsis.org; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) 3.9×10^8 로서 (Sasaki and Burr 2000) 매우 작고, 담배의 경우 인간과 유사한 3.5×10^9 으로써 (Schmitt *et al.*, 1997) 애기장대보다는 29배, 벼보다는 9배정도 게놈의 크기가 커서 expansin 유전자가 최소한 벼나 애기장대와 비슷한 수로 존재할 것으로 추정된다. 그럼에도 불구하고 현재 총 7개의 유전자가 발견된 것으로 보아 앞으로 담배의 게놈이 분석된다면 더 많은 expansin 유전자가 발견될 것으로 예상된다.

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 식물 호르몬, 환경적 자극 등 다양한 요소에 의해서 조절을 받아 현저하게 그 발현이 변화하고 있다. 그러나 그러한 유전자 발현의 급격한 변화가 식물의 생장에 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 line (Shin *et al.*, 2005)과 경상대학교의 AC, DS line이 확보되어 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

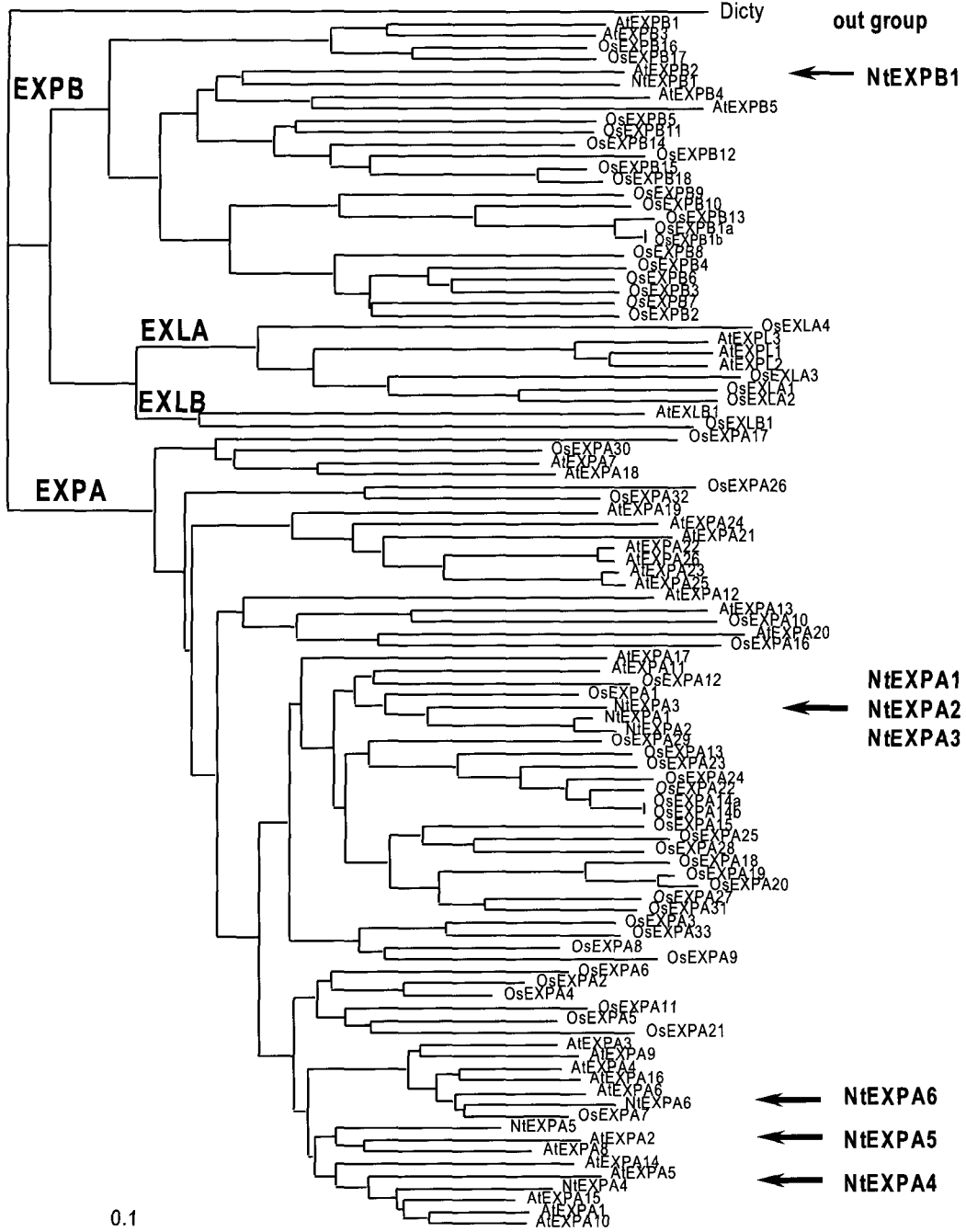


Fig. 4. Phylogenetic analysis of expansin genes. The dendrogram was generated on the basis of the alignment of the deduced amino-acid sequences encoded by seven tobacco expansin genes and all expansin genes of rice and Arabidopsis, using the Clustal X and MrBayes program. The GenBank accession numbers are listed at URL www.bio.psu.edu/expansins.

것으로 추정되고 있다 (Cosgrove *et al.*, 1997). 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.

결 론

담배 (*Nicotiana tabacum* L.)에서 expansin 유전자의 기능을 알아보기 위하여 벼의 expansin 유전자 (*OsEXPA4*, *OsEXPB3*, *OsEXPB4*, *OsEXPB6*)를 형질전환기술을 이용하여 담배에 도입하였다. Expansin 유전자의 도입은 callus의 무게를 36%에서 65%정도 증가시켰으며 세포의 크기를 측정할 결과 세포의 길이는 12%에서 28%가 증가하였으나 세포의 폭은 *OsEXPB3*의 경우 3% 감소하였고, *OsEXPB4*의 경우에는 변화가 없었으며, *OsEXPA4*와 *OsEXPB6*의 경우에는 각각 25%와 20% 증가하였다. 담배의 유전자를 database를 이용하여 검색한 결과 7개의 유전자를 발견하였고 이중 6개는 *EXPA*에 속하였고 1개는 *EXPB*에 속하였으며 벼와 애기장대에서 발견된 *EXLA*와 *EXLB*는 발견되지 않았다. 벼와 애기장대 유전자와의 계통학적인 분석 결과 발견된 담배의 유전자는 계통수에서 비교적 고르게 분포하고 있는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀:

*OsEXPB*의 EST clone은 Agrobiological Resources (Tsukuba, Japan)에서 공급받았음. 본 연구는 2004년도 충북대학교 학술연구지원 사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Belfield, E. J., Ruperti, B., Roberts, J. A. and McQueen-Mason, S. (2005) Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J. Exp. Bot.* 56: 817-823.
- Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civallo, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B. and Dunsmuir, P. (1999) Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11: 2203-2216.
- Cho, H-T. and Cosgrove, D. J. (2000) Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 9783-9788.
- Cho, H-T. and Cosgrove, D. J. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- Choi, D., Lee, Y., Cho, H-T. and Kende, H. (2003) Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell* 15: 1386-1398.
- Cosgrove, D. J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:391-417.
- Cosgrove, D. J. (2000a) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:321-326.
- Cosgrove, D. J. (2000b) New genes and new biological roles for expansins. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3:73-78.
- Cosgrove, D. J., Bedinger, P. and Durachko, D. M. (1997) Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 6559-6564.
- Gookin, T. E., Hunter, D. A. and Reid, M. S. (2003) Temporal analysis of alpha and beta-expansin expression during floral opening and

- senescence. *Plant Sci.* 164: 769-781.
- Hiwasa, K., Rose, J. K. C., Nakano, R., Inaba, A. and Kubo, Y. (2003) Differential expression of seven α -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiol. Plant.* 117: 564-572.
- Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Kende, H., Bradford, K. J., Brummell, D. A., Cho, H-T., Cosgrove, D. J., Fleming, A. J., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S. J., Rose, J. K. C. and Voesenek, L. A. C. J. (2004) Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol. Biol.* 55: 311-314.
- Kitagawa, M., Ito, H., Shiina, N., Nakamura, N., Inakuma, T., Kasumi, T., Ishiguro, Y., Yabe, K. and Ito, Y. (2005) Characterization of tomato fruit ripening and analysis of gene expression in F1 hybrids of the ripening inhibitor (rin) mutant. *Physiol. Plant.* 123: 331-338.
- Lee, Y. and Choi, D. (2005) Biochemical Properties and Localization of the β -Expansin OsEXPB3 in Rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Cells* 20: 119-126.
- Lee, Y., Choi, D. and Kende, H. (2001) Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4: 527-32.
- Lee, Y. and Kende, H. (2001) Expression of β -expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice. *Plant Physiol.* 127: 645-654.
- Lee, Y. and Kende, H. (2002) Expression of α -expansin and expansin-like genes in deepwater rice. *Plant Physiol.* 130: 1396-1405.
- Li, Y., Darley, C. P., Ongaro, V., Fleming, A., Schipper, O., Baldauf, S. L. and McQueen-Mason, S. J. (2002) Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol.* 128: 854-864.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. and Cosgrove, D. J. (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.
- Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S. J., Smart, C. and Fleming, A. (2001) Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 11812-11817.
- Sampedro, J., Lee, Y., Carey, R. E., dePamphilis, C. and Cosgrove, D. J. (2005) Use of genomic history to improve phylogeny and understanding of births and deaths in a gene family. *Plant J.* 44: 409-419.
- Sasaki, T. and Burr, B. (2000) International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3: 138-141.
- Schmitt, F., Oakeley, E. J. and Jost, J. P. (1997) Antibiotics Induce Genome-wide Hypermethylation in Cultured *Nicotiana tabacum* Plants. *J. Biol. Chem.* 272: 1534-1540.
- Shin, J. H., Jeong, D. H., Park, M. C. and An, G. (2005) Characterization of α -expansin gene family in rice. *Mol. Cells* 20: 210-218.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.