

효모의 미토콘드리아 형질전환을 통한 인위적인 operon 형식의 유전자 발현 규명

김경민* · 설일환¹

상주대학교 생명자원과학대학 환경원예학과, ¹대구외국어대학교 생명공학부

Received January 9, 2006 / Accepted February 27, 2006

Identification of Artificial Operon Gene Expression via Yeast Mitochondrial Transformation. Kyung-Min Kim* and Ill Whan Sul¹. *Department of Environmental Horticulture, Sangju National University, Sangju, Kyungbuk, 742-711, Korea, ¹Department of Biotechnology, Daegu University of Foreign Studies, Kyungsan, Kyungbuk, 712-881, Korea* – Yeast mitochondrial transformation has been confirmed by cell death and GFP expression (CDF: cell death factor gene). Expression vector containing CDF and GFP driven by one TPI (Triose-phosphate isomerase) promoter (called artificial operon type) was bombarded to Yeast. Interestingly, yeast cells were progressively deformed into unusual shapes and lysed inner cytoplasm resulting in cell death after all after bombarding with expression vector (CDC and GFP). Since there is no report about more than one gene expression simultaneously in a single mitochondria, this report is very important to novel type of eukaryotic gene expression. Successful yeast cell transformation in this report implies possible eukaryotic mitochondrial transformation including plants and animals and moreover two or more gene expression which can be excellent applicable protocols to pharmaceutical field including antibody production.

Key words – Yeast, mitochondrial, transformation

식물의 분자생물학 영역에서 미토콘드리아(mt)를 효과적으로 이용한다는 것은 식물의 다양한 세포질적 연구에 매우 중요하다. 미토콘드리아의 유전체는 핵 DNA 보다 작고 그 구성이 단순하며, 모계로만 유전하는 특성이 있다. 식물의 미토콘드리아 genome은 동물이나 균류에 비해 일반적으로 크며 200~2400 kbp 정도이다. 또한 진핵생물의 미토콘드리아 유전체는 다양하고 복잡하게 재배열되는 핵 DNA와는 다르게 유전자간의 재배열은 거의 발견되지 않는다고 보고되고 있다 [1,6,11]. 이처럼 미토콘드리아 유전체는 단순한 유전체 구성을 갖으며 핵 DNA의 영향이 배제된 직선적인 유전양식을 갖고 있다. 따라서 생물의 분화 진화를 연구하는 데 있어 유용한 재료가 된다. 또한 미토콘드리아 유전체가 세포질로 유전되기 때문에 핵과 세포질 사이의 상호 진화 및 기원에 관한 연구에도 유용한 장점이 있다[13]. Pehu[8]는 mt의 추출과정이나 체세포 잡종에 관한 연구에서 mt 형질전환 연구를 제시하고 있으나, 형질전환 시키는 방법의 개발이 제대로 이루어지지 않고 있어서 mt에 관한 연구가 그다지 활발하게 진전이 되고 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *Arabidopsis*에서 mt에 관련된 유전자를 clone한 것을 이용하여, 이들의 유전자[3]를 효모에 형질전환 시켜 선발배지에서 발현되는 yeast functional screening 방법을 이용하여, 효모의 mt에서 발현되는 양상을 구명하고 mt 형질전환 효율을 높이고자 수행되었다.

재료 및 방법

미토콘드리아(mt) 관련 유전자 및 plasmid construction

효모(BF264-15Dau : MATa *ade1 his2leu2-3, 112 trp1-laura3*) [5]에 식물의 mt에 관련된 유전자를 형질전환하여 효모 mt에서 그 유전자가 발현되는 양상을 조사하여 본 실험에 이용된 mt 관련 유전자는 *Cdf1* (Accession No. AB210817) [3], *Cdf2* (Accession No. AB238794)를 이용하였고, 그 외 *Bcl2*[10], *Bax*[9], *AtBI*[2]를 각각 이용하였다. Plasmid는 NMV4[3]와 pYX112[12]를 효모에 형질전환 시킬 vector를 구축하는데 이용하였다. Fig. 1A는 NMV4 vector에 *AtBI*, *Bcl2*, *Bax* 유전자 3종류를 각각 cloning 하였고, Fig. 1B는 TPI (triose-phosphate isomerase) promotor가 달린 vector에 *Cdf1*과 *Cdf2*를 cloning 하였다.

효모의 형질전환 및 mt 확인

효모(BF264-15Dau)를 SD-glucose 액체배지[2]에 180 rpm, 30°C에서 2일간 배양한 후, 효모 형질전환 방법[2]을 이용하여 NMV4-*AtBI*, NMV4-*Bcl2*, NMV4-*Bax*를 형질전환하여 3개의 유전자가 각각 포함된 3종류의 클론을 얻었다. 이 3개의 클론을 SD 배지에서 2일간 배양한 후 pYX112, pYX112-*cdf1*, pYX112-*cdf2*, pYX112-*Bax*를 각각의 클론에 형질전환하여 SD-glucose와 SD-galactose의 선발배지에서 GFP의 발현 양상을 보았다. 발현부위가 mt임을 확인하기 위하여 Mito-Tracker[®] (Molecular Probes, Netherlands)로 염색하여 6시간에서 42시간 동안 Fluorescent Microscope (DMRD, Leica,

*Corresponding author

Tel : +82-54-530-5233, Fax : +82-54-530-5239

E-mail : kkm@sangju.ac.kr

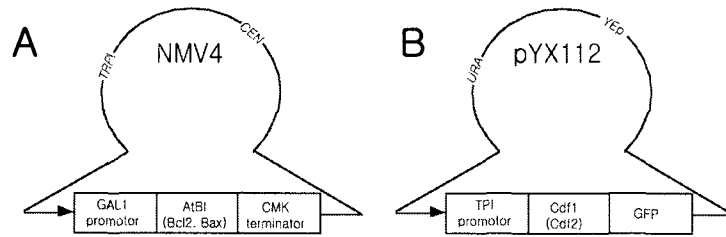


Fig. 1. Construction of plasmid for yeast transformation. A: NMV4 vector with *TRP1* and *CEN*, B: pYX112 vector with *URA* and *YEplac*

Germany)를 이용하여 관찰한 후 가장 적절한 발현양상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

재조합된 plasmid인 NMV4-AtBI과 pYX112-cdf1, NMV4-Bcl2과 pYX112-cdf1를 SD-Glucose 및 SD-Galactose 배지에 트립신(Trp)과 우라실(Ura)을 넣지 않은 선발배지에서 클론의 양상을 확인한 바(Fig. 2), *Cdf1* 과 *Cdf2* 유전자는 Bax와 같이 SD-Galactose-Trp-Ura에서는 클론이 생성되었고, 반면에 SD-Glucose-Trp-Ura에서는 클론이 생성되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 *GAL1* promoter가 있는 NMV4 vector와 *TPI* promoter가 있는 pYX112 vector에 *Cdf1* 과 *Cdf2* 유전자의 재조합들은 선발배지에서 각각의 유전자의 특성 발현이 정확하게 일어남을 알 수 있었다. Kawai-Yamada 등[3]은 *Cdf1* 유전자가 효모에서 *Bax*와 같은 경향을 나타낸다고 하여 본 실험의 결과와 일치하는 경향이였다.

Cdf1-GFP와 *Cdf2*-GFP plasmid를 구축하여 효모에 형질 전환 시켜 그 발현 양상을 조사한 바(Fig. 3), GFP 유전자가 약 60분부터 발현하기 시작하다가 300분 정도가 되면 발현이 약해지는 경향이였다. 그러나 *Cdf1*과 *Cdf2*는 60분까지는 발현되지 않다가 3시간 이후부터 300분까지 mt 부분에서 발현함을 알 수 있었다. 따라서 *Cdf* 유전자의 mt에서의 발현은 효모에 형질전환된 3시간 이후부터 그 발현양상을 확인할 수 있었다. 일반적으로 식물의 유용유전자를 형질전환하여 그

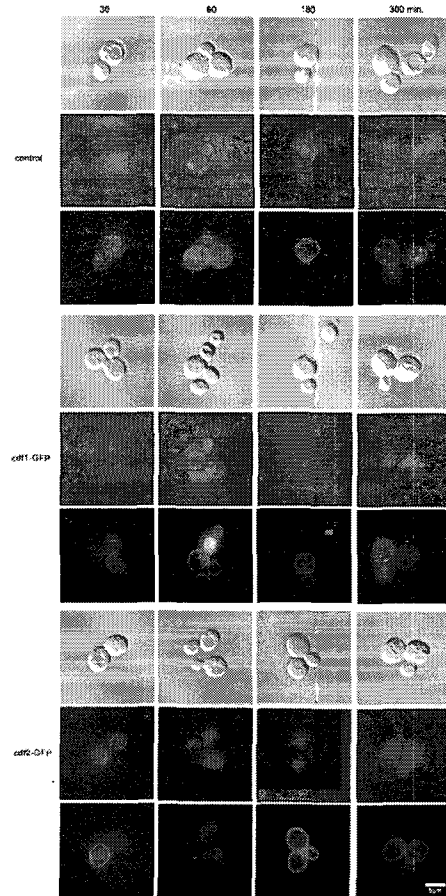


Fig. 3. Expression of *Cdf1* and *Cdf2* to time course in yeast.

A				B			
No.	Vector combination	Medium		No.	Vector combination	Medium	
		SD-Glucose-Trp-Ura	SD-Galactose-Trp-Ura			SD-Glucose-Trp-Ura	SD-Galactose-Trp-Ura
1.	NMV4-AtBI & pYX112-cdf1	-	+	1.	NMV4-AtBI & pYX112-cdf2	-	+
2.	NMV4-Bcl2 & pYX112-cdf1	-	+	2.	NMV4-Bcl2 & pYX112-cdf2	-	+
3.	NMV4-AtBI & pYX112-Bax	-	+	3.	NMV4-AtBI & pYX112-Bax	-	+
4.	NMV4-Bcl2 & pYX112-Bax	-	+	4.	NMV4-Bcl2 & pYX112-Bax	-	+
5.	NMV4-Bax & pYX112	+	-	5.	NMV4-Bax & pYX112	+	-

+; colony formed, -; colony not formed.

+; colony formed, -; colony not formed.

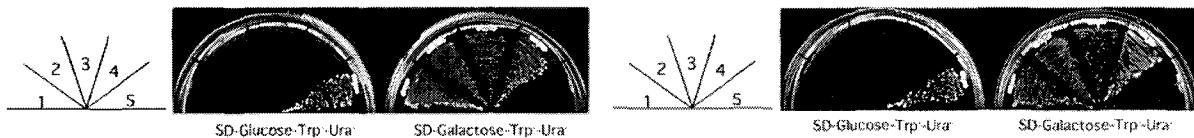


Fig. 2. Expression of *Cdf1* (A) and *Cdf2* (B) gene in selection medium.

형질전환 발현을 확인하려면 상당한 시간이 요구되나[3], 본 실험에서와 같이 효모를 이용하는 방법은 식물의 유전자 발현을 비교적 빠른 시간에 확인할 수 있다고 생각된다.

NMV4-AtBI과 NMV4-Bcl2 가진 효모를 SD-Galactose-Trp-Ura와 SD-Glucose-Trp-Ura 배지에서 각각 배양한 후 GFP, cdf1-GFP, cdf2-GFP를 형질전환 시켜, 형질전환된 효모를 SD-Glucose-Trp-Ura에서 배양하면서 *Cdf1*과 *Cdf2* 유전자의 발현 양상을 조사하였다(Fig. 4, Fig. 5). Fig. 4에서 cdf2-GFP::AtBI과 cdf1-GFP::Bcl2가 24시간째 mt에서 발현양상이 뚜렷하게 나타났으며, cdf1-GFP::AtBI과 cdf2-GFP::Bcl2에서는 그 발현 양상이 희미하게 나타났다. Fig. 5에서는 *AtBI*과 *Bcl2*를 가진 효모에 cdf1-GFP와 cdf2-GFP가 형질전환된 mt에서 그 발현양상을 희미하게 관찰할 수 있었다.

본 실험에서와 같이 식물의 mt 관련 유전자를 효모 mt에 형질전환 시켜 발현하기 위해서는, promotor와 효모의 배양 배지에도 다소 영향이 있음을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 연구결과는 Pan 등[7]이 mt와 관련 있는 유전자인 *Arabidopsis thaliana* ethylene-response element binding protein (*AtEBP*) 유전자의 효모에서의 발현양상과도 유사하였다. 따라서 지금까지 mt에 관련된 유전자를 효모에 이용함으로써 mt 관련 유전자가 도입되는 것을 확인할 수가 있었다.

이상과 같이 본 실험의 연구결과는 식물의 mt 관련 연구 분야에 기초적 자료로 중요하게 제공하게 될 것으로 사료된다.

요 약

본 실험에서는 식물의 유용유전자를 개발하여 그 발현양상을 확인하기 위하여 효모를 이용하면 그 발현양상을 비교적 빠르게 확인할 수 있는 미토콘드리아 형질전환 방법을 규

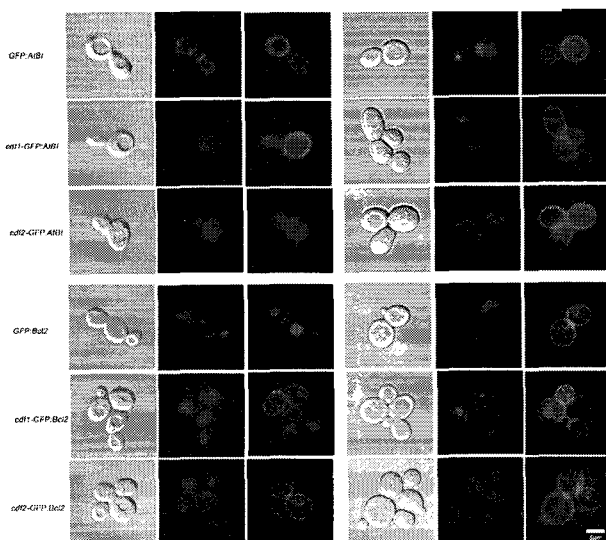


Fig. 4. Expression of cdf1-GFP and cdf2-GFP to time course on yeast cultured in SD-Galactose-Trp-Ura.

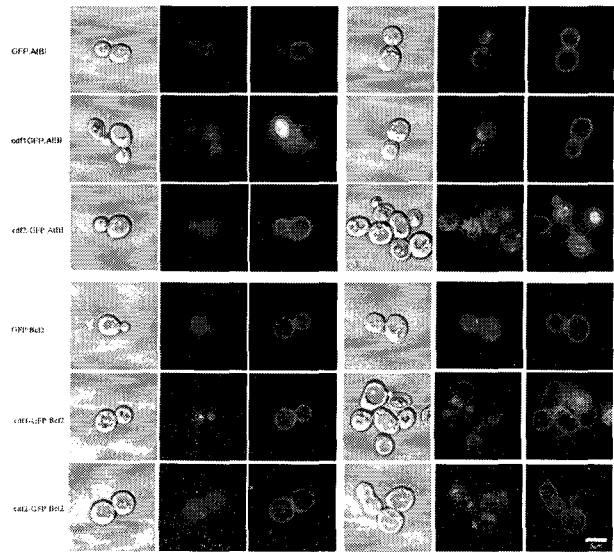


Fig. 5. Expression of cdf1-GFP and cdf2-GFP to time course on yeast cultured in SD-Glucose-Trp-Ura.

명하였다. 또한 미토콘드리아(mt)에 관련된 유전자를 *TPI* promoter를 가진 plasmid에 재조합한 후 효모에 형질전환 하여 mt에서 그 유전자의 특성이 발현 되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과로 mt에 관련된 유전자를 식물의 조직에 형질전환 하여 1개 이상의 유전자가 식물의 mt에 삽입되어 그 유전자의 특성이 발현되는데 이용되어 질수 있을 것이라 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업 (과제번호: 20050301-034-483-006-02-00)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

1. Cann, R. L., M. Stoneking and A. C. Wilson. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* **325**, 31-36.
2. Kawai, M., L. Pan, J. C. Reed and H. Uchimiya. 1999. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.* **464**, 143-147.
3. Kawai-Yamada, M., Y. Saito, L. Jin, T. Ogawa, K. M. Kim, L. H. Yu, Y. Tone, A. Hirata, M. Umeda and H. Uchimiya. 2005. A novel *Arabidopsis* gene causes Bax-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 39468-39473.
4. Kim, K. M., Y. H. Park, C. K. Kim, K. Hirschi and J. K. Sohn. 2005. Development of transgenic rice plants over-expressing the *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} antiporter CAX1 gene. *Plant Cell Reports* **23**, 678-682.
5. Lew, D. J., V. Dulic and S. I. Reed. 1991. Isolation of three

- novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* **66**, 1197-1206.
6. Nei, M. and R. K. Kohen. 1983. Evolution of genes and proteins. In chapter 4 (Evolution of animal mitochondrial DNA), Sinauer Associates, Sunderland, Ma., USA.
 7. Pan, L., M. Kawai, L. H. Yu, K. M. Kim, A. Hirata, M. Umeda and H. Uchimiya. 2001. The *Arabidopsis thaliana* ethylene-response element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS letters* **508**, 375-378.
 8. Pehu, E. 1991. RFLP analysis of organellar genomes in somatic hybrids. In: Plant Tissue Culture Manual D6, pp. 1-8, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
 9. Reed, J. C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **124**, 1-6.
 10. Reed, J. C. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776.
 11. Strachan, O. and A. P. Read. 1996. Human Molecular Genetics, In chapter 7, BIOS Scientific Publisher Ltd., Magdalen Road, Oxford, UK.
 12. Umeda, M., R. P. Bhalerao, J. Schell, H. Uchimiya and C. Koncz. 1998. A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 5021-5026.
 13. Wolstenholmn, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA : Structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 173-216.