

Real-time PCR을 이용한 스트레스에 따른 벼의 Receptor like kinase (RLK) 유전자의 발현 변화 분석

강민희, 김일욱, 한상훈, 윤충효^{1*}, 윤병수^{*}
경기대학교 이과대학 생명과학과, ¹농촌진흥청 농업생명공학연구원

Analysis of receptor like kinase (RLK) gene to stress in rice (*Oryza sativa* L.) using real-time PCR

Min Hee Kang, Il Wook Kim, Sang Hoon Han, Choong Hyo Yun^{1*}, and Byoung Su Yoon^{*}

Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

¹National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT In plant, Receptor-like kinases (RLKs) are protein family, though its function is not yet understood, consisted of a predicted signal sequence, single transmembrane region, and cytoplasmic kinase domain. RLKs are involved in hormonal response pathways, cell differentiation, plant growth and development, self-incompatibility, and symbiont and pathogen recognition. In this study, expression levels of RLG1, RLG5, RLG6, RLG#6, RLG8, RLG10, RLG17, RLG18 and RLG20 were analyzed by Real-time PCR, when rice (*Oryza sativa*) was treated abiotic stress. The expression levels of all RLGs were compared each other by analyzed value of threshold cycles (C_T). Consequently, RLGs were suppressed by NaCl as salinity stress, and expression of each RLK genes were showed difference treated salicylic acid and wound, respectively. However, All RLGs were induced under low temperature condition. Therefore, our results indicate protection-function of RLK genes to be an early response of rice against cold weather.

서 론

작물은 성장하는 전 기간 동안 하나 또는 그 이상의 복합적인 환경요인이나 생물학적 요인에 의하여 비정상적인 생리적 과정을 수반하게 됨으로써 잠재적 생산손실을 내포하게 된다. 이러한 요인들을 작물의 스트레스라 하며, 작물이 가지는 높은 적응력 (Kreps et al. 2002)에도 불구하고, 스트레스는 전 세계적으로 벼 (*Oryza sativa*)를 비롯한 대부분의 주요 농작물 생산의 50% 이상을 감소시키는 작물 생산 감소의 원인이 된다 (Boyer 1982).

이러한 스트레스는 식물에 존재하는 다양한 수용체 (receptor)를 통해 외부 신호로 인지되며, 수용체로 분류되는 Receptor-like kinases (RLKs)는 17년 전에 옥수수 (*Zea mays*)에서 처음으로 발견되었으며 (Wiker and Zhang 1990), 세포 외 영역 (extracellular domain), transmembrane 단백질, kinase 영역이 보존되어있는 세포질 영역 (cytoplasmic domain)으로 구성되어 있음이 밝혀졌다.

식물의 RLK는 동물의 receptor kinases (RKs)와 유사한 구조를 가지며, 많은 연구를 통해 식물의 RLK 활성 메커니즘이 동물의 Receptor tyrosine kinases (RTKs)의 활성 메커니즘과 유사할 것이라 보고되었으나 (ven der Geer et al. 1994; Shiu and Bleecker 2001; Castells and Casacuberta 2007), 동물이 6개의 RLK/Pelle 그룹을 갖는데 비해 식물의 RLKs는 거

*Corresponding author Tel 031-249-9645 Fax 031-243-1707

E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr; chyun5311@rda.go.kr

대한 유전자 그룹으로 되어있어 (*Arabidopsis*) 600개 이상의 그룹을 갖는 것으로 알려져 있으며 (Shiu and Bleeker 2003), 그 기능에 대해 아직 많이 알려져 있지 않고 있다.

현재까지 많은 식물 중에서 RLKs가 확인되었고, 식물의 생활사에서 RLKs의 다양한 역할이 보고되고 있다 (Becraft 2002; Dievert and Clark 2003). 식물의 RLK는 transmembrane 단백질로서 세포로 하여금 외부로부터의 신호를 인지하며 그로부터 세포 내 kinase 영역을 통하여 신호를 증폭함으로써 (Ohtake et al. 2000) 식물의 세포의 신호 전달에 주요한 역할을 한다.

식물의 RLKs는 세 개의 그룹으로 분류되며, 첫 번째 그룹은 Brassica에서 발견된 세포 외 S-도메인을 포함하는 S-locus receptor kinases (SRKs)와 S-locus glycoproteins (SLGs)이다. SRK와 SLG는 암술머리에서 발현되며 자가수분 억제와 관련된다 (Nasrallah and Nasrallah 1993; Takasaki et al. 2000).

두 번째 그룹은 독특한 세포 외 도메인으로 분류되는 CrRLK1과 Wak1이며, *Catharanthus roseus*에서 발견된 CrRLK1은 다른 RLKs와 비교하여 세포 안과 밖의 중간이 아닌 세포 내부의 인산화 메커니즘에 사용된다고 알려져 있다. Wak1은 *Arabidopsis thaliana*에서 발견되었으며, 병원체와 salicylic acid에 의해서 발현이 유도된다.

세 번째 leucine-rich repeat (LRR) 단백질 그룹은 식물의 세포의 분화 및 증식, 형태 형성의 성장과 발달을 조절하는 기능을 하며 (Torii et al. 1996; Li and Chory 1997; Becraft 2002; Mstsubayashi et al. 2002), 또 다른 기능은 병원성 미생물의 저항성을 갖는 벼의 Xa21과 같이 식물과 미생물의 상호 작용 및 식물의 방어 작용에 관련 되는 (Song et al. 1995; Gomez and Boller 2000; Endre et al. 2002; Nishimura et al. 2002; Stracke et al. 2002) 세포적 기능에서 주요한 역할을 한다고 보고되어 있다.

본 연구에서 RLK의 발현을 분석하기 위해 사용된 Real-time PCR은 thermal cycle와 spectrophotometer를 함께 구동하여, 실시간으로 PCR 산물의 변화를 형광시약을 통해 측정할 수 있는 정량방법으로 (Wilhelm and Pingoud 2003), 다양한 질병 진단 (Baczynska et al. 2004; Ratti et al. 2004), 유전자 변형 작물의 선별 (Paradigol et al. 2003; Ronning et al. 2003; Han et al. 2007), 특정한 유용 유전자의 발현 (Lee et al. 2004; Wang and Levin 2006) 등에 널리 응용되고 있다 (Klein 2002).

따라서 본 연구에서는 주요 작물 중에 하나인 벼에 대해

여 그 생산성에 영향을 주는 스트레스 중, 물리적 스트레스인 온도 (temperature), 화학적 스트레스에 해당되는 염 (salts) 그리고 생물학적 스트레스로 병원체의 침입에 관여하는 호르몬의 처리 (salicylic acid), 인위적 상처 (artificial wound)를 벼에 처리한 후 Real-time PCR정량법을 적용하여 RLK 유전자의 발현 변화를 mRNA 수준에서 분석함으로써 그 RLKs 유전자의 특성을 분자생물학적 수준에서 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

유전자 분석과 계통발생학적 분석

PCR 증폭 및 일반적인 molecular cloning을 통해 확보된 모든 receptor like kinase genes (RLGs)의 염기서열은 NCBI의 Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)를 통해 GenBank에 등재된 RLGs의 염기서열과 비교하여 상동성을 확인하였다. 분석에 적용된 염기서열의 GenBank accession number는 table 1에 나타내었다. 염기서열이 확인된 RLGs의 단백질 서열은 ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)에서 아미노산 서열을 정렬하고, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 3, <http://www.megasoftware.net/>) 프로그램에서 Neighbour-Joining 방법으로 계통발생학적으로 분석하였으며, TreeView 프로그램 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)를 통해 확보한 계통발생학 (Phylogenetic) tree를 확인하였다.

식물재료 및 스트레스 처리

본 실험에서는 국내 재배용 벼인 낙동벼 (*Oryza sativa* L. cv. Nakdong)를 농촌진흥청 유전체실험실에서 제공받아 사용하였으며, 벼씨 파종 후 14일이 지난 식물체에 각각의 stress를 처리하였다. 환경적인 stress로는 상처와 저온의 온도를 처리하며, 화학적인 stress로는 Salicylic acid (Duchefa, Netherlands) 처리와 Sodium chloride (Daejung, Korea)를 처리함으로써 염에 따른 stress를 처리하였다.

상처에 대한 단백질 발현 효과를 위해 멸균된 바늘을 사용하여 잎에 상처를 낸 후 1시간과 24시간 후 두 번에 걸쳐 수확하였으며, 대조군은 상처를 내지 않은 잎을 수확하였다. 저온의 처리는 배지를 포함한 식물체를 4°C에서 1시간과 24시간 후 수확하고, 대조군은 상온에서 배양하였다. 화학적

Table 1 Quantitative detection primer sets of RLG clones with control gene

Gene	Name	Sequence	mer	Tm(°C)	GC%	Product(bp)	Source
RLG1	RLG1Q-F	AATCATCGCCATACAACATC	20	53	40	227	AF237567
	RLG1Q-R	CATACCATCCAAAGGAGTCA	20	55	45		
RLG5	RLG5Q-F	CCCACAAGTATTGGAAAACA	20	53	40	180	AF238477
	RLG5Q-R	CGGAGAGTAGCACACCTTTA	20	57	50		
RLG6	RLG6Q-F	GGATTTGCTCTGAAGGAAC	20	55	45	221	NM001048371
	RLG6Q-R	ATGTTGTGAGGCTTGATGTC	20	55	45		
RLG#6	RLG#6Q-F	GACAGATTGGAGGTGAAAGAGT	22	58	45	216	AP008207
	RLG#6Q-R	AACCTTGCTGGTGATAGAGC	20	57	50		
RLG8	RLG8Q-F	AGAGGCACAATGGGTACAT	20	55	45	171	NM001048353
	RLG8Q-R	CCACTCTGGAACAAAACCT	20	55	45		
RLG10	RLG10Q-F	TTGTTCCAAGGAGATAACGA	20	53	40	209	AF238471
	RLG10Q-R	TCAGGACATCAGCATAGCTT	20	55	45		
RLG17	RLG17Q-F	AGTGCGGTGTTCAATCCTA	19	55	47	218	AF238475
	RLG17Q-R	AATGATGTGGTGTGACTTGG	20	55	45		
RLG18	RLG18Q-F	GATATACGGTCCCCTTCAG	20	57	50	229	AF248493
	RLG18Q-R	CGGCAGTTGATACATTTGTT	20	53	40		
RLG20	RLG20Q-F	TGTGCTCTATCTCTCCCTGA	20	57	50	173	NM001048359
	RLG20Q-R	AGACAGTTCCAAATCCACCT	20	55	45		
Actin (<i>Oryza savita</i>)	RAc1 F	CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT	23	63	56		Kim et al. 2007
	RAc1 R	CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT	23	58	43		

Quantitative real-time PCR

처리를 위해 25 mM SA (Salicylic acid)와 100 mM NaCl (Sodium chloride)을 처리하였다.

Total RNA의 추출

식물의 잎 조직을 절단하여 500~600 mg씩으로 나눈 후, 조각 낸 시료 절편을 미리 액체 질소로 냉각된 막자 사발에 넣고 시료가 해동되지 않도록 액체 질소를 부어가며 완전한 분말형태가 될 때까지 분쇄하였다. 분쇄된 잎 조직을 멸균된 1.5 mL tube에 담고 RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 실험법은 제조사의 지시를 그대로 따르며, 순수 분리한 total RNA 시료는 spectrophotometer (Eppendorf, Germany)를 이용하여 정량 한 후 RT-PCR에 사용하였다.

First-Strand cDNA 합성

순수 분리한 식물체의 total RNA를 사용하여 cDNA를 합성하기 위해 역전사반응을 수행하였다. 과정은 2 µg의 total RNA를 oligo dT (100 pmole)와 섞어 준 후 65°C에서 10분간 가열하여, 바로 ice에 정치한 후 10×Reaction buffer, 100 mM DTT, dNTP (각 2.5 mM), 200unit MMLV 역전사 효소 (Bioneer, Korea), 10 unit RNase (Invitrogen, USA)를 이용하여 20 µL의 최종 부피로 38°C에서 30분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 반응이 종료된 cDNA mix는 RNaseH (Fermantas, USA)를 처리한 후 바로 quantitative real-time PCR에 사용하였다. 효소를 이용한 실험은 모두 제조사의 지시를 따랐다.

Quantitative real-time PCR 용 primer의 제작

본 연구에서 발현 분석에 대상이 되는 벼의 receptor like kinase 유전자들은 (RLGs; RLG1, RLG5, RLG6, RLG#6, RLG8, RLG10, RLG17, RLG18, RLG20) 선행 연구를 통해 유전자 염기서열이 규명되었으며, 그 염기서열을 바탕으로 Real-Time PCR에 사용된 primer (Q-primer)의 염기서열을 결정하였다. 염기서열이 결정된 Q-primer는 internet-based primer 제작 프로그램인 Primer3 v0.2을 이용하여 제작하였으며, NCBI의 BLAST search를 통해 primer 염기서열의 유일성을 검증하였으며, primer 제작 회사를 통한 주문 (Bionics, Korea)에 의해 제작되었다 (Table 1).

Quantitative real-time PCR

먼저 table 1의 선별된 Q-primer의 최적 annealing 온도를 알아보기 위해 Exicycler Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)의 gradient 기능을 이용하여 gradient PCR을 수행하였다. 재조합 pBX-RLG plasmid DNA 1 ng, 각 RLG-F/R Q-primer 10 pmole에 2x GreenStar PCR premix (Genetbio, Korea)를 첨가하여 최종 20 µL 반응용액을 사용하였다. 여기서 선정된 annealing 온도는 역전사효소 반응으로 합성된 cDNA를 주형으로 수행한 Quantitative real-time PCR에 적용되었다. 전사효소 반응액 20 µL 중 1 µL와 10 pmole의 각 RLG-F/R Q-primer로 총 20 µL 반응액으로 하여, 94°C로 10분간 전해리를 수행한 후, 94°C 20초간 해리, 각 annealing 온도에서 20초, 72°C에서 20초간 중합의 과정을 35 cycle 수행하였으며, 용융온도분석 (Melting point analysis)은 50-94°C 구간을 측정하여 Tm값을 결정하였다.

결과 및 고찰

Receptor like kinase genes (RLGs)의 유전자 분석 및 계통발생학적 분석

Receptor like kinase genes (RLGs)의 분석을 통해 유전자 간의 특징을 확인하고자 하였다. 유전자 분석을 위해 molecular cloning을 통해 전체 ORF를 포함하는 유전자를 확보하였으며, 유전자 분석 프로그램을 적용하여 유전자의 정확성을 확인하였다. 확인된 각 RLGs를 이용하여 단백질의 기능을 결정하는 요소인 아미노산 서열을 기준으로 하여 각 단백질

간의 차이를 확인하였다.

벼의 receptor like kinase (RLK)의 아미노산 서열 분석 결과에서 kinase 도메인으로 해석되는 약 390 아미노산 잔기부터 610 아미노산 잔기까지 비교적 높은 유사성을 보였으나, 신호 분자와 접촉이 예상되는 N-terminal 도메인을 포함한 부분은 그 유사성이 매우 낮은 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 이 결과는 RLK의 구조상 다양한 신호를 인지 할 것으로 예상되는 N-terminal 도메인의 아미노산 서열상의 다양성을 보여준 것이라 하겠다.

RLKs의 단백질 서열들에서 그 다양성을 확인하였고, 이들을 자료로 유전자 분석 프로그램을 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. 이 분석에서는 단백질 전체 서열에 대한 분석과 상동성이 높은 부분 즉, kinase 도메인을 중심으로 하는 부분만을 선정하여 분석하였으며 두 실험에 대한 결과로 계통발생학 (Phylogenetic) 연관성을 살펴보았다 (Fig. 2).

결과적으로, 형성된 두 종류의 phylogenetic tree에서 각기 세부적이 차이는 보였으나, 공통적으로 3개의 그룹이 형성됨을 확인할 수 있었다. RLG6, RLG18, RLG20, RLG8이 한 그룹으로 지정 되었고, RLG10, RLG5, RLG1, RLG17등이 또 하나의 그룹으로 지정되었으며, RLG# (sharp로 대체 표기함)6은 이들과는 별도의 각각의 그룹임을 보여 주었다 (Fig. 2).

기관별 Receptor like kinase genes (RLGs)의 quantitative real-time PCR

식물은 각 기관에 따라 특정 유전자 발현에 차이를 나타낸다고 보고된 연구 결과 (Jinn et al. 2000)에 의거하여 약 14일간 성장시킨 벼를 임의로 잎 (leaf), 줄기 (stem), 뿌리 (root)의 세 부분으로 구분하였으며, RNA 추출 kit를 사용하여 벼의 각 기관에서 추출된 total RNA 각 기관에 따른 receptor like kinase gene (RLGs)의 발현 차이를 확인 하였다. quantitative real-time PCR (QRT-PCR)에 사용되기 위해 제작된 Q-primer들의 annealing 온도를 결정하기 위한 gradient PCR에 주형으로 사용되었다. Q-primer의 annealing 온도는 RLG1, RLG5, RLG8가 55°C이며, RLG6, RLG#6, RLG17, RLG18, RLG20는 57°C로 결정되었다. 결정된 annealing 온도를 기반으로 QRT-PCR을 수행하였다.

Receptor like kinase gene 1 (RLG1)을 포함한 RLGs의 줄기에서 나타난 발현은 잎과 뿌리에 비교하여 threshold cycle (C_T) 값이 최대 2.0 cycle에서 0.83 cycle까지 증가하는 것으

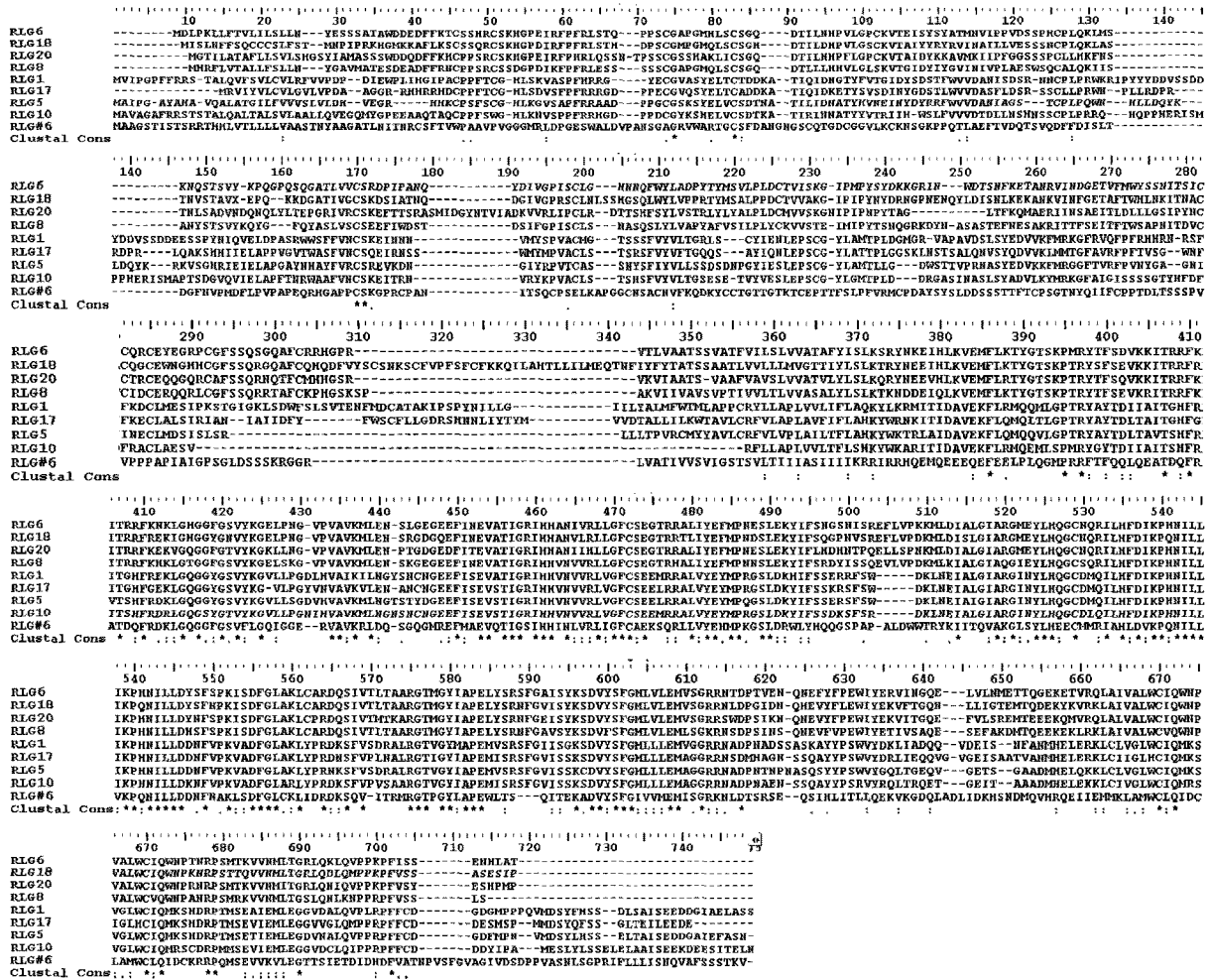


Figure 1. Alignment of amino acid sequence of receptor like kinases (RLKs) coded by receptor like kinase genes (RLG1, RLG5, RLG6, RLG#6, RLG8, RLG10, RLG17, RLG18, RLG20) from *Orizae sativa* L.

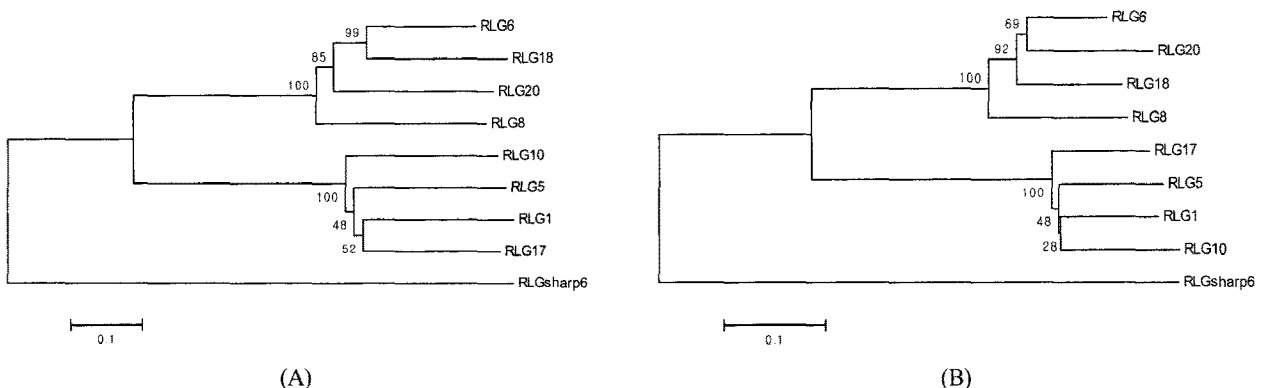


Figure 2. Phylogenetic analysis using Neighbour-Joining method showed a close relationship between the receptor like kinases (RLKs) secured by this study. Panel A shows a phylogenetic tree of RLKs using full amino acid sequence. Panel B shows the other phylogenetic tree of RLKs using a part of amino acid sequence.

로 확인되었다. C_T 값이 증가하는 것은 유전자의 발현이 작은 것을 의미하므로, 모든 RLGs의 발현이 줄기에 비교하여 잎과 뿌리에서 상대적으로 많은 것으로 해석되었다. 이러한

결과는 대조군인 actin 유전자가 줄기에서 C_T 값이 약 3 cycle 정도 앞당겨지는 것과 비교됨을 보여 주었다 (Fig. 3). Actin의 경우 줄기에서 가장 많은 발현을 확인 하였고 (줄기>뿌

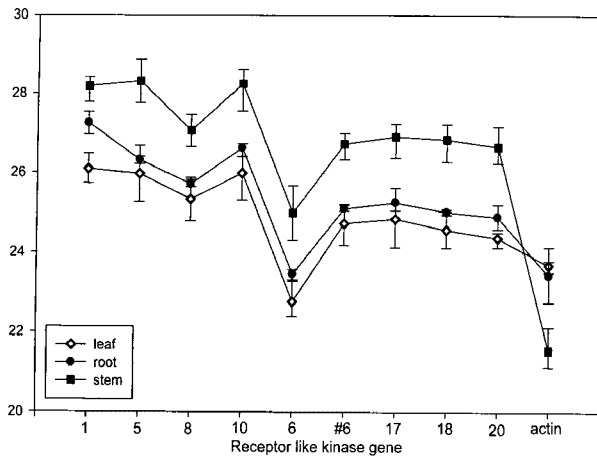


Figure 3. Variation of Threshold cycle (C_T) of receptor like kinase genes (RLGs) in different organs (leaf, stalk and root) of rice. These are numerical evaluates that results of C_T of Receptor like kinase genes in different organs from rice.

리>잎), RLGs들은 잎에서 가장 많이 발현되었으며, 다음으로는 뿌리에서 발현 되는 것을 확인하였다 (잎>뿌리>줄기).

식물의 RLK는 다양한 기능에 연관되어 있으며, 동물과 비교하여 거대한 그룹을 갖고 있기 때문에 (Morris and Walker 2003) 각 RLGs를 독립적으로 분석해야 할 것으로 판단되었다. 본 연구에는 모든 기관에서 RLG6의 발현이 가장 많았으며, 다음으로 RLG20, RLG18, RLG#6, RLG17, RLG8, RLG5, RLG10 순으로 발현의 차이를 보였다. RLG1의 경우 다른 RLGs와 비교하여 특히 뿌리에서 발현이 더 낮아지는 결과를 보여주었다. RLG1을 제외한 RLGs는 뿌리의 C_T 값을 기준으로 잎보다는 약 0.4 cycle이 큰 것을 보여주었으며, 줄기보다는 약 2.5 cycle이 작은 것으로 확인되었다. 결과적으로 잎과 줄기에서의 RLG 발현은 거의 차이를 나타내지 않았다. 그에 비교하여 RLG1의 발현은 줄기와 잎에 비교하여 각각에서 1 cycle이상의 차이를 보였다. 즉 다른 뿌리에서 RLG1의 발현이 작아졌다는 것을 의미하며, 이러한 결과는 식물체의 각 기관에서 RLGs의 기능이 다르게 작용한다는 것을 간접적으로 제시하는 것이라 하겠다.

본 실험의 결과를 바탕으로 이후 스트레스에 따른 벼의 RLK 유전자의 발현 변화를 확인하기 위한 실험에서는 모든 RLGs의 발현 형식이 같은 잎과 줄기를 사용하여 실험을 수행하였다.

저온에서의 Receptor Like Kinase Genes (RLGs)의 quantitative real-time PCR

저온의 처리를 통해 receptor like kinase gene (RLGs)의 발

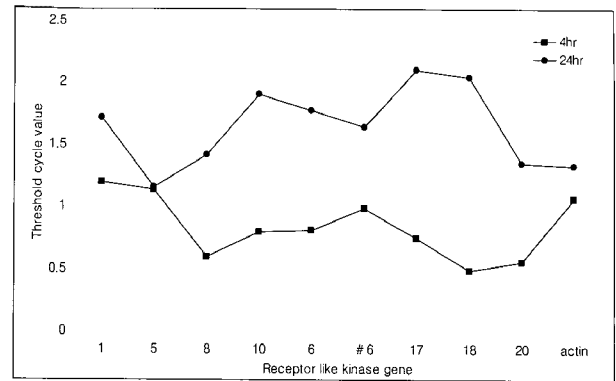


Figure 4. Variation of threshold cycle (C_T) of receptor like kinase genes from rice grown in low temperature condition. These are numerical evaluates that results of C_T of RLG from control rice (grown in 25~28°C) minus C_T of RLG from rice (grown in 4°C after 4hour and 24hour)

현 변화를 확인 하기 위해서 파종 후 14일 배양된 낙농벼를 저온 (4°C)에서 각 4시간과 24시간 배양한 후에 RNA를 추출 하였다. 역전사 반응을 통해 cDNA를 제작하였으며, 이 DNA를 주형으로 사용하여 낙농벼의 염기서열을 바탕으로 설계된 primer 쌍을 quantitative real-time PCR (QRT-PCR)에 적용하였다.

QRT-PCR에서 얻어진 각 RLGs의 threshold cycle (C_T)의 수치를 상온에서 배양된 대조군의 C_T 값과 비교하였으며, 대조군 C_T 값에 비교하여 수치가 모두 증가 한 것을 확인하였다. 정확한 비교를 위해 대조군 C_T 값에서 저온 처리를 한 벼의 각 C_T 값을 빼고 그 차 (대조군 C_T - 저온처리 C_T)를 확인 하였다 (Fig. 4).

각 C_T 값의 차가 양수를 나타내므로 대조군과 비교하여 각 RLK 유전자의 발현이 증가하였다. RLG5를 제외한 모든 유전자에서 4시간과 24시간에서의 발현 변화에는 차이가 있지만, 시간이 지날수록 발현이 증가하는 것을 확인하였다. RLG5의 경우 4시간 후와 24시간 후에서 발현의 차이가 없었으나 대조군에 비교하여 발현이 증가한 것은 확인 하였다. 이는 저온의 환경에서 RLGs의 발현이 증가하는 것을 말한다. 즉 저온의 환경에서는 RLGs 발현이 증가되어야 식물체가 유지될 수 있다는 것으로 해석 할 수 있었다. 따라서 식물이 저온의 환경에서 적응할 수 있도록 하는 RLGs기능에 대한 가능성을 의미한다고 하겠다.

NaCl 처리에 따른 Receptor like kinase genes (RLGs)의 quantitative real-time PCR

염은 식물의 발아 및 성장 등에 복합적으로 영향을 주는

스트레스 요인으로 보고되어 있으며, 특히 벼를 포함하는 주요 작물에서 염 스트레스에 대해 저항성을 갖는 유전자의 탐색과 분석이 활발히 진행되고 있다 (Diedhiou et al. 2008; Hu et al. 2008). 파종 후 14일 자란 벼에 100 mM NaCl을 처리한 후 각 4시간과 24시간 후에 RNA를 추출하여 Receptor like kinase genes (RLGs) 유전자의 발현 변화를 확인하였다.

RLGs 발현을 나타내는 threshold cycle (C_T) 값과 대조군의 C_T 값의 차를 통해 (NaCl 처리 C_T - 대조군 C_T) 유전자 발현 변화를 확인하였다 (Fig. 5).

NaCl이 처리된 벼에서 대조군에 비교하여 C_T 값이 커졌으며, 스트레스를 처리한 시점에서 4시간 후에는 2~3 cycle이 24시간 후에는 1.3~2 cycle의 차이를 보여주었다. NaCl 처리에 의해서 RLGs의 발현이 감소했다는 것을 확인하였으며, 전체적으로 NaCl을 처리한 벼는 저온의 환경에서 배양된 벼에서 보여진 결과와 비교하여 모든 RLGs가 감소되는 변화를 보였다.

그러나 저온의 벼에서 RLG5를 제외한 모든 RLGs의 발현이 시간이 지날수록 증가한 반면 NaCl을 처리한 벼에서는 24시간 후에 대조군에 비해서는 그 발현량이 감소 하였으나, 4시간에서 보여진 RLGs 발현의 감소보다는 증가한 것을 확인 하였다. 이 결과에서 또한 RLG5는 4시간에서와 24시간에서 그 차이를 보이지 않았으며, 저온에서는 발현 증가를 보였고, NaCl 처리에서는 발현감소를 보였다.

이 결과로써 염분에 의해서 RLGs의 발현이 억제된다는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 억제는 24시간 후에 RLGs의 발현이 증가하는 것으로 보아 염에 대한 적응이 형성되어 유전자 발현이 회복되는 것으로 판단되었다.

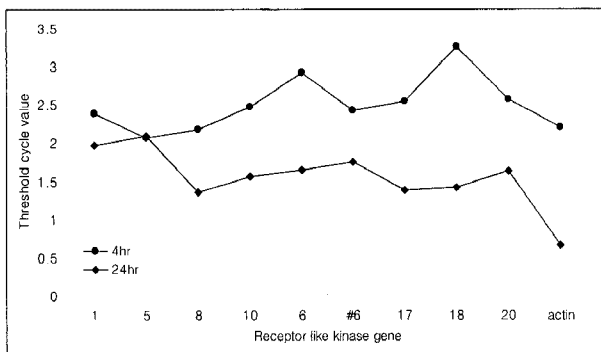


Figure 5. Variation of threshold cycle (C_T) of receptor like kinase genes from rice treated salinity stress. These are numerical evaluates that results of C_T of RLG from control rice (none treated NaCl) minus C_T of RLG from rice (treated NaCl after 4hour and 24hour)

Salicylic acid처리에 따른 Receptor like kinase genes (RLGs)의 quantitative real-time PCR

Salicylic acid (SA)는 식물체에서 미생물 침입에 반응하는 기능을 갖는 식물 호르몬으로 보고되었으며 (Loake and Grant 2007), 미생물 침입에 있어 RLGs의 발현 변화를 확인하기 위해 실험을 수행하였다. SA를 최종 농도 25 mM로 파종 후 14일 배양된 낙농벼에 처리하였다. 처리 후 각 4시간과 24시간 배양한 후에 RNA를 추출하였으며, 역전사 반응을 통해 cDNA를 제작하였다. cDNA를 주형으로 하여 Receptor like kinase gene의 발현 변화를 확인하기 위해 quantitative real-time PCR (QRT-PCR)을 수행하였다.

발현 변화의 확인은 QRT-PCR에서 얻어진 각 RLGs의 threshold cycle (C_T)의 수치를 상온에서 배양된 대조군의 C_T 값과 비교하였으며, 대조군의 C_T 값에서 각 RLG 유전자의 C_T 값을 빼고 (대조군 C_T - SA처리 C_T), 그 차이를 통해서 유전자 발현 변화를 확인하였다 (Fig. 6).

전체적인 결과에서 SA에 처리에 따른 RLGs의 발현은 시간이 지남에 있어 같은 현상을 보였다. 먼저 4시간 후 각 RLG 유전자의 C_T 값은 대조군과 비교하여 약 1 cycle 감소하였으며, 24시간 후에는 감소됐던 발현이 증가하여 C_T 값의 차가 회복 되는 것을 확인 할 수 있었다. 결과를 통해 RLGs는 두 개의 그룹으로 나누어 그 양상을 구분 할 수 있었다. RLG1, 5, 8, #6, 20을 포함하는 그룹은 24시간 후에도 대조군에 비해 발현이 감소된 상태를 보였으며, RLG 10, 6, 17, 18를 포함하는 그룹은 24시간 후에 발현이 대조군에 비해 증가된 양상을 보여주었다.

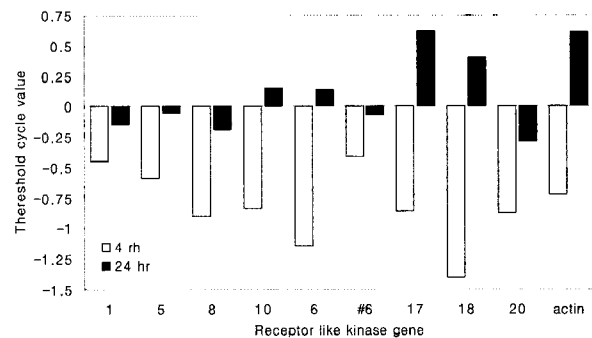


Figure 6. Variation of threshold cycle (C_T) of Receptor like kinase genes (RLGs) from rice treated Salicylic acid. These are numerical evaluates that results of C_T of RLG from control rice (none treated Salicylic acid) minus C_T of RLG from rice (treated Salicylic acid after 4hour and 24hour).

따라서 RLGs는 미생물 침입에 있어서 짧은 시간 발현이 급속하게 감소 되었지만 시간이 지남에 따라 발현이 회복되는 것은 RLGs이 미생물 침입에 직접적인 신호 전달에 의해서 그 발현이 억제 되었으나 이후, 발현이 회복되면서 이차적인 신호 전달 기능을 갖고 있을 것이라는 가능성을 보여 주는 것이라 해석하였다.

상처 처리 후 Receptor like kinase genes (RLGs)의 quantitative real-time PCR

식물의 상처는 자연적인 바람, 재배를 위한 인간의 행동 그리고 곤충에 의해서 입게 되며, 이러한 상처는 식물의 생산성에 영향을 주는 요인으로 작용한다 (Kreps et al. 2002). 따라서 상처에 따른 receptor like kinase genes (RLGs) 발현 변화를 확인 하기 위해, 벼에 인위적인 상처를 줌으로써 RLGs 발현 변화를 확인하였다.

과종 후 14일 배양된 낙농벼에 멸균된 바늘을 사용하여 잎에 상처를 주고 이전 실험과 같이 각 4시간과 24시간 배양한 후 RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA를 사용하여 역전사 반응을 통해 cDNA를 제작하였으며, 이 cDNA를 주형으로 낙농벼의 염기서열을 바탕으로 설계된 Q-primer쌍을 사용하여 quantitative real-time PCR (QRT-PCR)을 수행하였다.

본 과정에서 QRT - PCR에서 얻어진 각 RLGs의 threshold cycle (C_T)의 수치를 상온에서 배양된 대조군의 C_T 값과 비교하고, 대조군의 C_T 값에서 각 RLG의 C_T 값을 빼어(대조군 C_T - 상처 처리 C_T) 발현 변화를 확인하였다 (Fig. 7).

상처에 대한 발현 변화는 몇몇의 RLGs에서 확인 가능하였다. RLG 1, #6, 18, 20의 경우 4시간 후에는 뚜렷한 변화를

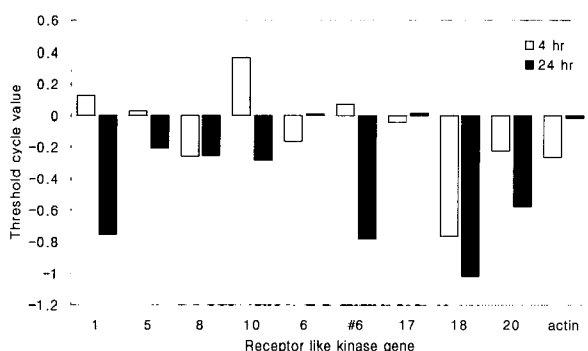


Figure 7. Variation of threshold cycle (C_T) of Receptor like kinase genes from rice by artificial wounds. These are numerical evaluates that results of C_T of RLG from control rice (none treated artificial wounds) minus C_T of RLG from rice (treated artificial wounds after 4hour and 24hour)

보이지 않았으나, 24시간 후에 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 4개의 RLGs를 제외한 유전자에서는 4시간과 24시간 후에는 대조군과 같은 수준의 발현을 보였다. 이는 상처에 대한 기준이 확실 하지 않아 얻어진 결과로 판단되었으며, 따라서 이에 따른 추가적인 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

식물의 Receptor like kinase (RLK) 단백질들은 signal sequence, single transmembrane region, cytoplasmic kinase 도메인으로 구성되어 있으며, RLK genes (RLGs)은 호르몬 반응 경로, 세포 분열, 식물의 성장과 발달, 자가 불수분 그리고 공생과 병원균 인식과 연관 되어 있다는 가능성은 이전 연구들에 의해서 보고되고 있으나, 주요 작물의 하나인 벼의 RLK에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 RLKs의 단백질 서열을 기반으로한 분석을 수행하여, 단백질간의 차이를 확인하였으며, 또한 RLKs를 암호화하는 RLGs의 발현 변화 mRNA 수준에서 확인하였다. 실험을 통해 확보된 RLGs (RLG1, RLG5, RLG6, RLG#6, RLG8, RLG10, RLG17, RLG18, RLG20)의 발현 변화를 real-time PCR을 사용하여 분석하였으며, threshold cycle (C_T) 수치의 비교를 통해 발현 변화를 비교하였다. RLGs의 발현 변화는 벼의 기관을 나누어 확인하였으며, 식물의 성장 및 생산성에 영향을 주는 주요 스트레스 (저온, 염분, 미생물 감염, 상처)에 의한 변화를 확인함으로써 그 기능에 대한 정보를 분석하였다.

벼의 receptor like kinase (RLK)의 아미노산 서열 분석 결과에서 일부 도메인으로 판단되는 위치를 제외한 부분에서 상당히 낮은 유사성을 보였으며 (Fig. 1), 유전자 분석 프로그램을 통해 제작된 phylogenetic tree에서도 3개의 그룹으로 분리되는 성향을 보여 (Fig. 2), 단백질 간의 차이 확인이 가능하였다. 이러한 결과에서 각각의 RLGs가 상당히 다양한 신호를 인지 할 것으로 예상되었으며, 이를 통해 단백질 서열 상에서도 큰 차이를 보이는 벼 유래 RLKs에 대해 각각의 기능을 분석하기 위한 연구가 분자수준에서 연구되어야 할 것으로 판단되었다.

Real-time PCR 을 적용한 RLGs의 발현 분석 결과에서 각 유전자는 앞에서 가장 많이 발현되는 것으로 확인 되었으며, 다음으로는 뿌리에서 발현 되는 것을 확인하였다 (잎>뿌리>줄기, Fig. 3). 실험의 결과를 통해 이 후 스트레스에 따른 RLK 유전자 발현 변화 실험은 잎을 사용하여 수행하였다.

식물체가 성장하면서 받는 스트레스는 식물의 성장에 큰

영향을 미치며, 특히 주요작물의 수확량의 50%를 감소시킨다고 보고 되었다. 따라서 현재 스트레스에 대한 저항성을 갖는 식물체를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 벼에 존재하는 RLK 유전자가 외부 스트레스에 대하여 어떠한 분자적인 특징을 갖는지 알아보고자 하였다. 스트레스로는 물리적 스트레스인 저온 (low temperature), 화학적 스트레스에 해당되는 염 (salts, NaCl) 그리고 병원체의 침입에 따른 스트레스에 관여되는 호르몬 처리 (salicylic acid, SA), 인위적 상처 (artificial wound)를 선정하였으며, real-time PCR을 사용하여 각 유전자의 발현을 측정하여 결과를 확인하였다.

저온의 환경에서 RLG5를 제외한 모든 유전자가 4시간과 24시간에서의 발현 변화에는 차이가 있지만, 시간이 지날수록 발현이 증가하였다 (Fig. 4). 이 결과로 저온에서 벼의 항상성을 유지하기 위해 RLGs가 과발현 된다는 사실을 확인하였으며, RLGs가 과발현된 벼는 저온에 대한 저항성을 갖게 될 수 있을 것이라 예상되었다. 다음으로 염에 대한 반응은 NaCl을 처리함으로써 확인하였으며, 처리에 따라 RLGs 모두 발현이 감소되었으나 4시간 후와 비교하여 24시간 후에는 어느 정도의 발현양이 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 저온에서 RLGs 발현이 증가한 것은 온도 저항성을 갖는다는 가능성 보여 주었으나, 염에 대해서는 반대로 발현이 감소하는 것으로 보아 이는 RLGs가 염에 대해서 저항성을 갖지 않는다는 것으로 해석 되었다.

병원균 감염에 대한 반응을 나타내는 호르몬인 SA와 인위적인 상처에 대해서는 각 RLGs에 따라 발현 변화가 다르게 나타났다. 두 스트레스에 대해 먼저 4시간 후 각 RLGs의 발현은 감소하였으나, 24시간 후에 SA에 대해서는 감소했던 발현이 회복되는 것을 확인 할 수 있었으나 (Fig. 6) 상처에 대해서는 더 억제되는 양상을 보이는 유전자가 많았다 (Fig. 7).

따라서 본 실험 결과 RLGs중에서도 외부 영향에 따라 발현이 증가 또는 감소에 대한 반응이 다르게 나타났으며, 이는 RLGs에 따라 인식하고 반응하는 것이 다르다는 것을 나타낸다는 것을 의미한다 하겠다.

본 연구 결과 스트레스에 의한 RLGs는 다양한 스트레스 중 저온에 대한 저항성을 가진다는 가능성을 제시하며, 냉해 등에 대한 저항성을 갖는 신 품종 개발을 위한 분자생물학적 자료로서 본 연구의 결과가 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농림기술개발사업(과제번호 20080101-080-005-001-03-00)과 경기대학교(과제번호 2007-084) 그리고 (주) 진클론의 지원에 감사드리는 바입니다.

적 요

식물의 Receptor like kinase (RLK) 단백질들은, 그 기능이 잘 알려져 있지 않지만, signal sequence, single transmembrane region, cytoplasmic kinase 도메인으로 구성되어 있다. RLK gene (RLGs)는 호르몬 반응 경로, 세포 분열, 식물의 성장과 발달, 자가 불수분 그리고 공생과 병원균 인식과 연관 되어 있다고 보고되었다. 본 연구에서는 벼의 RLGs 중 RLG1, RLG5, RLG6, RLG#6, RLG8, RLG10, RLG17, RLG18, RLG20의 스트레스에 따른 발현 변화를 real-time PCR을 사용하여 분석하여 분자적 특징을 확인하였다. Threshold cycle (C_T) 수치의 변화를 통해 발현 변화를 비교하여 결과적으로, NaCl에 대해서는 모두 감소하는 경향을 확인하였으며, Salicylic acid와 상처에 대해서는 각 RLGs에 따라 발현 변화가 다르게 나타났다. 이에 비교하여 저온에서는 모든 RLGs 발현이 증가하였다. 따라서 본 연구에서는 냉해에 의한 벼의 생산성 감소를 벼의 RLK에서 확인된 분자적 특징을 이용함으로써 신 기능성 품종의 개발을 통해 극복 할 수 있을 것이라는 가능성을 보여주었다.

인용문헌

- Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S (2004) Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. BMC Microbiol 35: 385-392
- Becraft PW (2002) Receptor kinase signaling in plant development. Annu Rev Cell Dev Biol 18: 163-192
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. Science 218: 443-448
- Castells E, Casacuberta JM (2007) Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinase in plants. J Expt Bot 58: 3503-3511
- Diedhiou CJ, Popova OV, Dietz KJ, Gollack D (2008) The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress responsive gene expression in rice BMC Plant Biol 8: 1-28
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB

- (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5: 1003-1011
- Han SH, Lee DW, Kim EH, Lee MK, Park YD, Kim SH, Yoon BS (2007) Selection of tobacco plants expressing chinese cabbage *myrosinase* gene and quantification of myrosinase gene expression level using quantitative real-time PCR method. *Kor J Jort Sci Technol* 25: 29-36
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice *Plant Mol Biol* 27: 169-181
- Jinn TL, Stone JM, Walker JC (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, control floral organ abscission. *Genes&Dev.* 14: 108-117
- Klein D (2002) Quantification using real-time PCR to food and agricultural systems: A review. *Food Biotech* 8: 257-260
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang Z, Harper JF (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiol* 130: 2129-2141
- Lee DB, Yang OS, Han SH, Lim YK, Yoon BS (2004) Rapid detection of *Panibacillus larvae larvae* caused american fowlbrood using real-time PCR. *Kor J Apiculture* 19: 97-108
- Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938
- Loake G, Grant M. (2007) Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10: 466-472
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* 296: 1470-1472
- Morris ER, Walker JC (2003) Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Current opinion in plant biology* 6: 339-342
- Nasrallah JB, Nasrallah ME (1993) Pollen—Stigma Signaling in the Sporophytic Self-Incompatibility Response. *Plant Cell* 5: 1325-1335
- Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429
- Ohtake Y, Takahashi T, Komeda Y (2000) Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 1038-1044
- Pardigol A, Guillet S, Popping B (2003) A simple procedure for quantification of genetically modified organism using hybrid amplicon standards. *Eur Food Res Technol* 216: 412-420
- Ratti C, Budge G, Ward L, Clover G, Autonell C, Henry C (2004) Detection and real-time quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and *Polymyza graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan). *J Virol Methods* 122: 95-103
- Ronning SB, Vaitilingom M, Berdal KG, Holstjensen A (2003) Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *Eur Food Res Technol* 216: 347-354
- Shiu SH, Bleeker AB (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci* 98: 10763-10768
- Shiu SH, Bleeker AB (2003) Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 530-543
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald PC (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene Xa21. *Science* 270: 1804-1806
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* 403: 913-916
- Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996) The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8: 735-746
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10: 251-337
- Walker TJ, Zhang R (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* 345: 743-746
- Wang S, Levin RE (2006) Rapid quantification of *Vibrio vulnificus* in clams (*Protochaca staminea*) using real-time PCR. *Food Microbiol* 23: 757-761
- Wilhelm J, Pingoud A (2003) Real-time polymerase chain reaction. *Chem bio Chem* 4: 1120-1128