

벼 성숙종자로부터 배상체 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 DNA methylation 억제제인 5-azacytidine의 영향

이연희*, 이정숙, 김수윤, 손성한, 김둘이, 윤인선, 권순중, 서석철
농촌진흥청 농업생명공학연구원

Effects of 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor, on embryogenic callus formation and shoot regeneration from rice mature seeds

Yeon-Hee Lee¹, Jung-Sook Lee, Soo-Yun Kim, Seong-Han Sohn, Dool Yi Kim, In-Sun Yoon, Soon-Jong Kweon,
and Seok-Chul Suh

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

ABSTRACT The modification of DNA and histone plays an important role for gene expression in plant development. The objective of this research is to observe the effects of methylation on the gene expression during dedifferentiation from rice mature seeds to callus and differentiation from callus to shoots. The embryogenic callus with ability to shoot regeneration was not induced on the N6A medium supplemented with 5-azacytidine and abnormal callus with brown color was formed. When the normal rice callus was placed on the regeneration MSRA medium supplemented with 5-azacytidine, the shoot regeneration was inhibited. The results showed that 5-azacytidine, DNA demethylating agent, had negative effects on normal embryogenic callus formation and shoot regeneration. This suggested that DNA methylation of some genes was required for normal cell dedifferentiation and differentiation in tissue culture. The microarray and GeneFishigTM DEG screening were used to observe the gene transcript profile in callus induction and regeneration on N6A (N6 medium + 5-azaC) and MSRA (MS regeneration medium + 5-azaC). Subsets of genes were up-regulated or down-regulated in response to 5-azaC treatments. The genes related with epigenetic regulation, electron transport, nucleic acid metabolism and response to stress were up and down regulated. The different expression of some genes (germin like protein etc.) during callus induction and shoot regeneration was confirmed using RT-PCR and northern blot analysis.

서 론

모든 생물에서 정상적인 발달 조절을 위해서 프로그램된 유전자 발현조절은 여러 가지 전사 촉진인자나 억제인자를

통해서 일어나는 것으로 알려져 왔으나 최근에 들어서는 cytosine methylation에 의한 DNA 변형을 통해서도 유전자 조절이 된다는 연구결과가 발표되고 있으며 이외에도 chromatin remodeling과도 연계되어서 유전자 발현조절이 이루어진다는 것이 알려지고 있다 (Finnegan et al. 2001). 식물 발달의 경우 여러 가지 환경신호에 의하여 강하게 영향을 받는데 이러한 발달의 유연성 (plasticity)은 생장발달 변화, 세

*Corresponding author Tel 031-299-1711 Fax 031-299-1692

E-mail: yhlee@rda.go.kr

포 분화 또는 탈분화 등에 의하여 형태적으로 표현된다. 식물은 발달과정 중에 식물의 유연성과 환경적응성을 위해서 유전자의 염기서열 변형 없이 변화에 조절되는 epigenetic regulation 시스템을 이용하는데 이러한 epigenetic regulation에 중요한 역할을 하는 것이 DNA methylation이다.

DNA methylation은 식물과 동물, 곰팡이 등의 모든 생물체에서 일어나는 것으로 유전자 발현, 염색체 구조 변화, transposable elements의 활성화, genomic imprinting, 암발생 등과 상당한 연관성이 있는 것으로 알려져 왔다 (Mohandas et al. 1981; Miura et al. 2001; Rabinowicz et al. 2003). 고등식물에서는 genomic DNA를 구성하고 있는 cytosine의 20-30%가 5-methylcytosine 형태로 methylation이 되어 있으며 CpG와 CpNpG의 자리에서 대부분 methylation이 일어난다 (Richards 1997). DNA methylation은 target site에 변이를 일으켜 전사 인자가 결합하는 것을 방해하고 methylation된 부분의 chromatin 구조 형태가 변화함으로써 전사를 억제하는 것으로 알려져 있다. 식물 발달 과정 동안에 methylation level이 변하는데 어린 유묘가 성숙한 잎보다 약 20%의 낮은 methylation 수준을 갖고 있으며 종자에서는 잎보다 methylation이 높게 돼 있는 것으로 나타났다. 또한 일부식물에서 methylation의 변화는 개화에 필수적인 vernalization을 대신하는 역할을 하여 조기개화를 유도하거나 왜소화, 불규칙한 기관수 형성 같은 정상발달과 다른 발달과정을 나타내는 것으로 보아 식물발달에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다 (Finnegan et al. 1998, 2001; Kakutani et al. 1996).

조직배양에서 관찰되는 체세포 변이 (somaclonal variation)는 많이 알려져 있는 현상으로 DNA methylation이 이러한 변이의 한 원인으로 제시되었다 (Kaepler et al. 2000). 식물에서 가장 잘 알려진 세포 분화 시스템은 당근의 체세포 배발생으로 이 과정 동안에 일어나는 DNA methylation 변화는 그동안 많이 연구되어져 왔다. 배지에 첨가되는 식물 성장 호르몬인 2,4-D, NAA, IAA 같은 호르몬의 농도가 높아짐에 따라 당근세포에서 관찰되는 DNA methylation 양도 증가한다고 알려져 있다. 더구나 DNA methylation 수준은 세포 분화 초기단계가 후반기 단계에서보다 더 낮은 것으로 나타났다 (Lo Schiavo et al. 1989; Munksgaard et al. 1995). Bernacchia 등 (1998)은 증식이 활발한 현탁배양 세포, shoot, root와 엽원기에서 DNA methyltransferase Met1-5와 Met2-21의 발현이 많은 것을 관찰하였으며 이로 DNA methylation이 체

세포 배발생 동안에 형태 형성과 증식에 필수적이라고 제시하였다. Chakrabarty 등 (2003)은 시베리안 인삼의 체세포 배발생 동안에 cytosine methylation의 정도와 양상을 본 결과 배상체 캘러스에서 전체적인 DNA methylation 비율이 상당히 낮았다고 보고하였다. 장미를 재료로하여 여러 가지 조직배양에 의하여 재분화된 장미, 미분화된 캘러스 조직, 배상체 캘러스, 기관분화 캘러스 등을 대상으로 AFLP 방법을 사용하여 DNA methylation 양상을 조사한 결과 methylation의 변화는 체세포 배발생 (somatic embryogenesis)과 기관분화 (organogenesis) 사이에 상당한 차이가 있었다 (Xu et al. 2004). 호박에서 체세포 배발생 시 배지에 첨가되는 질소원과 옥신 같은 조성물질이 초기 배 발생에 영향을 주었으며 높은 수준의 DNA methylation을 유지하였다고 하였다 (Leljak-Levanic et al. 2004). 사탕수수에서도 같은 식물체로부터 유기되어 다른 발달형태의 단계를 나타내는 3개의 사탕수수 cell line에 대해서 DNA methylation 수준의 변화를 조사하여 본 결과 methylcytosine 수준은 organogenic line에서 $18.3 \pm 0.6\%$ 에서부터 dedifferentiated line에서 $28.8 \pm 0.5\%$ 까지 다양하게 분포되었다. 즉 organogenic line에서부터 형태적 특징이 없어지는 dedifferentiated line으로 가면서 methylcytosine의 비율이 증가하는 것으로 나타났으며 methylation 수준을 조절하는 5-azaC (5-azacytidine) 등의 물질 처리 시에는 발달 형태 등이 달라지는 것을 관찰하였다 (Causevic et al. 2005). Yamamoto 등 (2005)은 당근의 표피세포로부터 직접적으로 유도되는 체세포 배발생 시스템을 사용해서 세포분화 상태의 변화 (체세포로부터 배상체 세포) 단계에서 DNA methylation의 역할을 조사하였다. DNA methylation 억제제인 5-azaC는 당근의 표피세포로부터의 배상체 세포 형성을 억제하였으며 배의 형태 형성 동안에 당근의 LEC1 (leafycotyledon 1)-like embryonic gene인 DcLEC1 유전자 발현을 억제하였다. 이러한 결과 당근에서 체세포 세포가 배상체 세포로 되는 과정에는 DNA methylation이 중요한 역할을 한다고 하였다.

식물 조직배양으로부터 식물체 재분화는 조직으로부터의 탈분화 (dedifferentiation)와 분화 (differentiation) 과정을 통해서 이루어지는데 이 과정동안에 DNA methylation이 세포 증식 및 형태 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 본 연구는 벼 종자로부터 캘러스 형성 및 식물체 재분화 단계에서 demethylation 물질인 5-azacytidine을 각 단계별로 처리하여 methylation이 배상체 캘러스 형성 및 형태 형성에 미

치는 영향을 알아보고 그에 따른 유전자 발현 양상을 분석하는 것을 목표로 하였다.

재료 및 방법

식물 재료

소독한 벼 종자를 2,4-D 2 mg/l가 첨가된 N6 배지 (Chu et al. 1975)와 5-azacytidine 50 mg/l 첨가된 N6배지 (N6A)에 각각 치상하여 28°C, 암 상태에서 약 3주간 배양하면서 켈러스를 유기하였다. 유기된 켈러스를 정상적인 재분화 MS (Murashige and Skoog 1962)배지 (MSR)와 5-azacytidine이 50 mg/l 첨가된 재분화 MS 배지 (MSRA)에 치상하여 빛 상태에서 배양하면서 재분화 현상을 관찰하였다. 유전자 발현 분석을 위한 total RNA 분리를 위하여 각 단계별로 켈러스를 선별하였다.

RNA 분리 및 유전자 발현 분석

total RNA 분리는 RNeasy isolation kit (QIAGEN)를 사용하여 분리하였다. 분리된 RNA를 사용하여 다음과 같이 reverse transcription을 하여 cDNA를 합성하였다 : 3 µg total RNA, 4 µl reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 µl dNTPs (each 2 mM), 2 µl 10 µM dT-ACP1 (5'-CTGTGAA TGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3'), 0.5 µl RNasin RNase Inhibitor (40 U/ µl Promega), 1 µl Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ µl Promega)를 포함하고 있는 반응액 20 µl를 42°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 이렇게 합성된 cDNA를 GeneFishing™ PCR에 사용하였다.

GeneFishing™ DEG kits (Seegene)를 사용하여 ACP-based PCR 방법 (Kim et al. 2004) 으로 다르게 발현되는 유전자를 스크리닝하였다. Second - strand cDNA 합성은 3-5 µl (about 50 ng) diluted first-strand cDNA, 1 µl dT-ACP2 (10 µM), 1 µl 10 µM arbitrary ACP, 10 µl 2 Master Mix (Seegene)를 포함하고 있는 20 µl 반응액을 94°C 1 min, 50°C 3 min, 72°C 1 min에서 한 cycle을 반응시켰다. 그 다음 단계인 PCR amplification은 94°C 40 초, 65°C 40 초, 72°C 40 초 조건으로 40 cycle을 반응시킨 후 72°C에서 5분 동안 처리하였다. 이렇게 생성된 PCR 산물을 2% agarose gel에서 분리하여 밴드 차이를 확인하였다.

Microarray 분석

벼 45K 올리고 chip (NSF rice oligonucleotide array 45K)을 사용하여 microarray 분석을 하여 5-azacytidine 처리에 따른 유전자 발현 분석을 하였다. total RNA는 Bioanalyzer 2100 (Agilent)를 이용하여 28S rRNA/18S rRNA ratio를 측정하여 RNA QC를 수행한 후 microarray분석에 사용하였다. Labelling은 Amino Alkyl MessageAmp™ aRNA Kit (Ambion Catalog #1752)을 사용하여 제조사의 방법으로 RNA를 합성한 후 10 µg antisense amino alkyl RNA (aRNA)를 cye dye coupling에 사용하였다. 대조구는 cy3, 처리구는 cy5 dye를 사용하여 labeling 된 cRNA 20 µg을 hybridization에 사용하였다. MAUI hybridization system에서 42°C, 16시간 반응 후 Axon4000B 스캐너에서 GenePix v6.0 프로그램을 이용하여 cy3, cy5의 intensity를 측정하였다. Normalization과 발현분석은 Genespring5.1 프로그램을 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Methylation이 벼 켈러스 유기 및 재분화에 미치는 영향

벼 종자로부터 켈러스 형성 및 켈러스로부터 식물체 재분화는 embryogenesis 과정을 거쳐서 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이는 식물 조직으로부터 켈러스로의 탈분화와 식물체로의 재분화 과정을 거치는 것으로서 각 단계에 methylation inhibitor인 5-azaC를 처리하여 일련의 분화과정에 methylation의 영향을 알아보려고 하였다. 벼 종자를 정상적인 N6 배지 (N6)와 5-azaC 50 mg/l이 첨가된 N6 배지 (N6A)에 각각 치상하여 켈러스를 유도하였다. 유도된 켈러스를 정상적인 MS 재분화 배지 (MSR)와 5-azaC가 첨가된 MS 재분화 배지 (MSRA)에 치상하여 켈러스 유기 정도와 상태 및 재분화 과정을 살펴보았다. 5-azaC가 첨가된 배지에서 벼 종자로부터 켈러스 유기는 되었으나 갈변정도가 5-azaC가 없는 배지에서 정상적으로 형성된 켈러스보다 심했다. 또한 정상적인 배지에서 형성되어 나오는 켈러스 색이 연노랑색이면서 표면이 매끄러운 특징을 나타내는 배상체 켈러스는 거의 형성되지 않았다. 이러한 현상으로 볼 때 배지내의 5-azaC 첨가가 켈러스 유기 및 배상체 켈러스 형성에 부정적인 영향을 준다는 것을 알 수 있었고 이러한 현상은 5-azaC에 의한 DNA demethylation에 의한 것으로 나타났다. 따라서 정상적

인 캘러스 유기 및 증식과 식물체로의 재분화가 이루어질 수 있는 배상체 캘러스 형성에는 이와 관련되는 유전자들의 methylation이 필수적인 것으로 생각되며 이들 유전자들의 발현에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. N6 배지에서 정상적으로 형성된 캘러스를 MSR 재분화 배지와 5-azaC가 첨가된 MSRA 재분화 배지로 옮겨 캘러스 상태 및 재분화를 관찰하여 본 결과 정상적인 MSR 배지에서는 2-3주 후에 녹색 점이 생기면서 식물체 재분화가 정상적으로 이루어졌다. 그러나 5-azaC가 첨가된 MSRA 배지에서는 캘러스가 갈변이 되면서 재분화는 거의 일어나지 않았다 (Figure 1 A). 이와는 반대로 5-azaC가 첨가된 N6A에서 형성된 캘러스가 MSR과 MSRA 배지에서 배양되었을 때는 MSR 배지에서 갈변되는 정도가 약해지면서 녹색 점이 형성되는 것도 있었으나 그 효율은 상당히 낮았고 식물체로의 재분화는 거의 이루어지지 않았다. MSRA 배지로 치상된 캘러스는 갈변정도가 심해졌으며 더 이상 정상적인 캘러스를 거의 형성하지 못했으며 재분화도 이루어지지 않았다 (Figure 1 B). 이러한 methylation이 체세포 배형성과 기관분화에 중요한 영향을 준다는 결과는 여러 식물에서 보고되었다. Causevic 등 (2005)은 같은 사탕수수 식물체로부터 shoot 재분화 능력이 있으면서 광합성이 활발하고 세포벽이 분화된 organogenic line (O), 광합성이 활발하고 세포벽이 분화된 nonorganogenic line (NO)과 엽록소가 없으면서 비정상적인 형태를 하고 있는 dedifferentiated line (DD) 3개의 cell line을 유기하였다. 이 cell line에 hydroxyurea같은 methylation을 증가시키는 물질과 5-azaC같은 methylation을 감소시키는 물질을 처리하였다. Hyper-

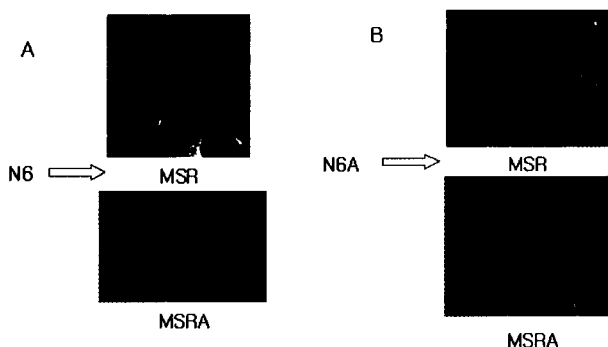


Figure 1. Effects of 5-azacytidine on the callus formation from mature rice seeds (dedifferentiation) and regeneration from callus to shoots (differentiation). N6: N6 medium + 2,4-D 2 mg/l, N6A: N6 medium + 2,4-D 2 mg/l + 5-azacytidine (50 mg/l), MSR : MS medium + NAA 0.1 mg/l + Kinetin 2 mg/l, shoot regeneration medium, MSRA : MS medium + NAA 0.1 mg/l + Kinetin 2 mg/l + 5-azacytidine (50 mg/l).

methylation 처리 결과 O line에서는 상당한 변이를 유기했으며 기관형성 특징이 없어지면서 dedifferentiated line에서 보는 하얀 색의 캘러스가 형성되었으며 NO line에서는 cell dedifferentiation 현상을 보였고 DD line에서는 하얀색 또는 갈변하면서 죽는 현상을 나타내었다. DNA hypomethylation 일 때는 O와 NO line에서 강한 dedifferentiation을 나타냈고 DD line에서는 탈색 현상을 보였다고 하였다. 또한 Yamamoto 등 (2005)은 당근의 표피세포로부터 체세포 배발생 단계 중 어느 과정이 5-azaC에 민감한지를 알아보기 위하여 체세포 배발생 동안의 여러 단계에서 5-azaC의 영향을 조사하여 DNA methylation의 역할을 알아보았다. 5-azaC를 2, 4-D와 같이 24시간 동안 배축에 처리한 결과 대조구와 비슷하게 체세포배 발생 빈도가 있었다. 2, 4-D로 24시간 처리 후 3일 동안 5-azaC를 처리하면 체세포 배형성이 심하게 억제되었다. 이 기간 동안에 DcLEC1c 유전자 발현도 억제되었다. 2,4-D 처리 후 3일부터 4일동안 5-azaC를 처리한 경우에도 체세포 배발생이 억제되었다. 2, 4-D 처리 후 7일부터 7일 동안 azaC를 처리 한 경우에는 체세포 배발생에 전혀 영향이 없었다. 이러한 결과로 2, 4-D를 24시간 처리 후 7일 동안에 DNA methylation이 체세포에서 배상체 세포로 변화하는데 필수적이라고 하였다. 시베리안 인삼에서 체세포 배발생 동안에 cytosine methylation의 정도와 양상을 본 결과 비배상체 캘러스의 게놈에서 5'-CCGG-3' 자리의 16.99%가 cytosine methylation이 일어난 반면, 배상체 캘러스의 경우에는 11.20%였고 보고하였다 (Chakrabarty et al. 2003). 장미의 경우 체세포 배발생 (somatic embryogenesis) 과정 동안에 DNA methylation 수준은 미분화된 캘러스에서 가장 높았고 배상체 캘러스, 배상체 캘러스로부터 재분화된 식물체 순으로 가면서 낮아지는 것으로 나타났다 (Xu et al. 2004). Shoot organogenesis 동안에도 미분화된 캘러스가 organogenesis를 받는 동안에 DNA methylation 변화가 있었으며 기관분화를 통한 재분화체에서는 원래의 수준으로 회복하는 것을 보였다. 이러한 모든 조직배양 과정에서 일어나는 DNA methylation 양상을 그룹화 하여 본 결과 기관분화와 기내 배양 식물체, 배상체와 배상체로부터 재분화된 식물체에서 비슷한 methylation 양상을 보였으며 미분화된 캘러스와 organogenic callus에서 비슷한 methylation 수준을 나타내었다. 특이한 것은 배상체로부터 재분화된 식물체와 기관분화를 통한 재분화체에서 DNA methylation 양상이 다르게 나타났다는 것이다 (Xu et al. 2004). 호박의 체세포배 발생과정에서 가장 높은 DNA methylation은

2, 4-D 첨가 배지와 질소원으로 NH₄Cl이 첨가된 배지에서 배양된 preglobular 와 globular 단계의 배에서 나타났으며 그 후 호르몬이 없는 배지나 5-azaC가 첨가된 배지에서 형성되는 heart와 torpedo 단계의 배로 발달하는 배에서는 DNA methylation이 상당히 감소하였다 (Leljak-Levanic et al. 2004). 이러한 methylation의 수준에 따라 세포의 형태적 특성 및 기관형성능이 변형될 수 있고 methylation이 배상체 세포 형성에 필수적이라는 결과는 본 연구결과에서도 유사하다고 할 수 있었다. 즉, 켈러스 형성 및 재분화 배지에 demethylation 물질인 5-azaC를 첨가 시에는 정상적인 배상체 켈러스 형성과 재분화가 일어나지 않았다. 따라서 DNA methylation은 켈러스 형성 및 이후의 재분화 과정 등 식물 세포 분화 및 발달 과정 동안에 적기 적소에서 유전자 발현을 조절하여 식물체가 정상적으로 분화 발달하도록 하는데 매우 중요한 기작이라고 할 수 있으며 일부 유전자들의 methylation이 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

Demethylation 처리에 의한 유전자 발현 분석

현재까지 기관분화나 체세포 배발생 과정에서 DNA methylation 정도가 발생 단계에 따라 변화한다는 결과는 많은 보고가 되어 있으나 전반적인 유전자들의 발현 양상에 관한 연구는 미흡하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 벼 켈러스 형성부터 재분화 단계까지 5-azaC에 의한 유전자 발현 양상을 알아보기 위하여 각 발달 단계별로 재료를 채취하여 GeneFishing™ DEG 스크리닝을 하였다. N6 배지와 5-azaC가 첨가된 N6A 배지에서 형성된 켈러스와 이 켈러스를 각각 MSR 재분화 배지와 5-azaC가 첨가된 MSRA 재분화 배지로 옮긴 후 10일, 21일 정도 배양한 켈러스를 이용하여 GeneFishing™

DEG 스크리닝을 하여 유전자 발현 양상을 보았다. 그 결과 벼 켈러스 유기 및 재분화 단계에서 5-azaC로 인한 유전자 발현에 차이가 있는 것을 알 수 있었고 약 41개 정도 유전자에서 발현차이가 있는 것을 확인하였다. Figure 2는 대표적인 예를 보여주는 것으로서 figure 2, I 유전자의 경우 5-azaC가 첨가된 켈러스 유기배지 (B-2)와 재분화 배지 (A-3, B-4)에서 발현양이 증가하는 것을 알 수 있었다. II의 경우에는 5-azaC가 첨가된 켈러스 유기배지 (B-2)에서 발현양이 뚜렷하게 증가되고 재분화 배지에서는 발현양이 많지 않은 것으로 보아 켈러스 형성 시에 발현되는 유전자이면서 methylation에 영향을 받는 유전자로 추측된다. Figure 2의 III은 5-azaC로 인해 유전자 발현이 감소되는 것을 나타낸 것으로 5-azaC가 첨가된 배지 (A-3, B-2, B-4)에서 발현양이 현저히 낮아진 것을 보였다. 이렇게 발현 차이를 보이는 밴드를 분리, 클로닝하여 유전자를 확인한 결과 putative splicing factor 3a (I), Glutathione-S-transferase (II), alcohol dehydrogenase, germin-like protein, phosphoglycerate kinase, protein translocase 등의 유전자들은 5-azaC 첨가로 발현양이 증가된 것으로 나타났다, AT-hook DNA binding protein (III), metallothionein-like protein, putative cystein proteinase inhibitor 등은 발현양이 감소하였다. Xu 등 (2004)은 장미 조직배양의 여러 분화 단계에서 AFLP 방법으로 methylation과 관련된 것으로 나타난 밴드들 중에서 조직 특이적으로 나타난 밴드를 클로닝하여 분석하여 본 결과 DET1와 Ca²⁺ dependent, solute carrier-like protein 이었다고 하였다.

최근에 들어 유전자 발현 양상 분석에 DNA chip을 이용한 microarray 방법이 널리 이용되고 있다. Chang과 Pikaard (2005)는 애기장대에서 DNA methylation과 histone acetylation 상태에 따른 유전자 발현을 알아보기 위하여 애기장대를 demeth-

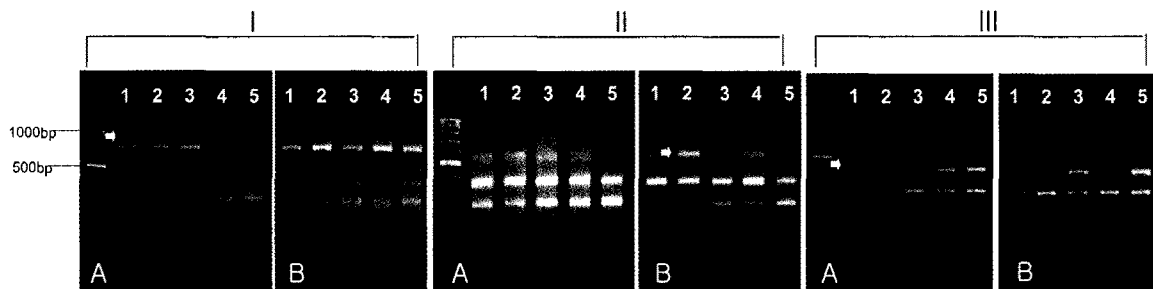


Figure 2. Electrophoretic fragments obtained by GeneFishing™ DEG screening. A-1, 2: callus induced from N6 medium, A-3: callus induced from N6 was cultured on MSRA for 10 days, A-4, 5: callus induced from N6 was cultured on MSR for 10 days (4) and 21 days (5), B-1: callus induced from N6 medium, B-2: callus induced from N6A medium, B-3, 5: callus induced from N6A medium was cultured on MSR medium for 10 days (3) and 21 days (5), B-4: callus induced from N6A medium was cultured on MSRA medium for 10 days.

ylation 물질인 5-azaC와 histone deacetylation을 억제하는 trichostatin A (TSA)로 각각 또는 동시에 처리하여 배양 후 microarray 분석을 하였다.

정상적인 N6배지와 5-azaC가 첨가된 N6A 배지에서 유기된 캘러스에서 DNA chip을 이용하여 유전자 발현 차이를 본 결과 N6배지에서 캘러스 유기 시 5-azaC 처리에 의해 384개의 유전자가 3 배 이상 발현 증가를 보였으며 재분화 배지에서 5-azaC 처리 효과는 116개의 유전자 발현이 증가되었다. 이는 캘러스 유기 시에 재분화 상태보다 5-azaC 처리에 의한 유전자 발현에 많은 영향을 주는 것으로 추측되며 마찬가지로 5-azaC 처리에 의해 3 배 이상 발현이 감소하는 유전자도 캘러스 유기 상태시가 재분화 상태시보다 701개와 295개 유전자로 2배 이상 많았다. TIGR annotation에 따르면 기능이 밝혀지지 않은 유전자들의 발현양이 높았으며 epigenetic regulation, 전자전달에 관여하는 유전자들, 핵산대사 유전자들, 스트레스 반응 유전자들의 발현이 높아지는 것을 알 수 있었다 (Figure 3 A). 이러한 현상은 정상적으로 N6 배지에서 유기된 캘러스를 5-azaC가 첨가된 재분화 배지 MSRA

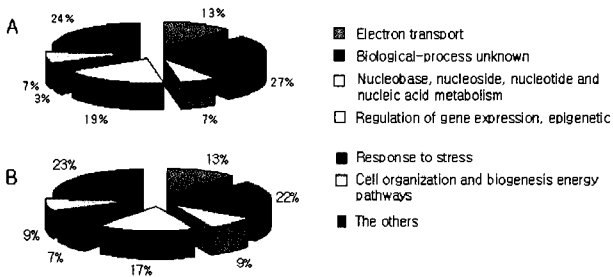


Figure 3. Grouping of differentially expressed genes in callus induced from mature seeds on N6A medium supplemented with 5-azacytidine by cDNA microarray analysis. A: grouping of up-regulated genes with >3-fold by 5-azaC, B: grouping of down-regulated genes with <3-fold by 5-azaC.

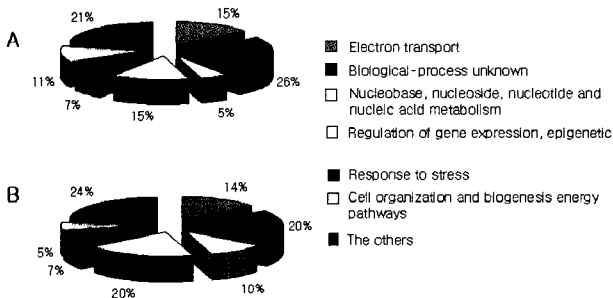


Figure 4. Grouping of differentially expressed genes in callus on MSRA medium supplemented with 5-azacytidine for 10 days by cDNA microarray analysis. A: grouping of up-regulated genes with >3-fold by 5-azaC, B: grouping of down-regulated genes with <3-fold by 5-azaC.

로 치상하였을 때도 같은 현상을 나타내었다 (Figure 4 A). 또한 발현양이 낮아지는 유전자 종류도 비슷한 경향을 나타내었다 (Figure 3 B, 4 B). 이러한 결과로 볼 때 methylation이 epigenetic regulation에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었고 유전자 발현 전반에 영향을 주는 것으로 추측되며 또한 캘러스 유기에 관여하는 유전자들 군으로는 전자전달, 핵산대사 유전자들이 관련돼 있다는 것도 알 수 있었다. Causevic 등 (2005)은 다른 발달 형태를 보이는 사탕수수 organogenic line과 nonorganogenic line에 5-azaC를 처리한 결과 soluble peroxidase 활성이 상당히 증가하였다고 하였으며 Southern 분석 결과 methylation 양상이 다르게 나타났다고 하였다. 본 실험에서도 DNA chip 분석 결과 peroxidase family protein 관련 유전자 발현이 상당히 증가한 것을 보여 주었다 (Table 1). Table 1은 microarray 분석 후 발현양에 따른 대표적인 유전자들의 목록을 나타낸 것이다. 각 분화 단계에

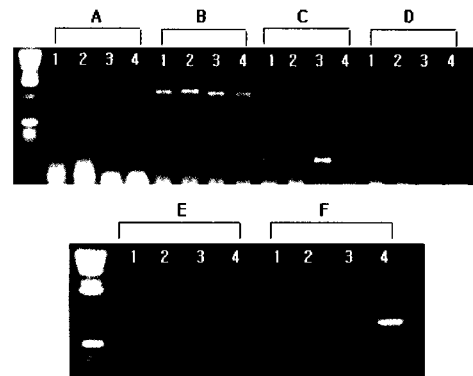


Figure 5. Gene expression in callus on different media by RT-PCR. A: Agamous like MADS protein (AY177696), B: Alcohol dehydrogenase (EF122490), C: Metallothionein like protein (AY833008), D: Germin like protein (AF032972), E, F: Glutathione-S-transferase (AY271619), 1: callus induced on N6 medium, 2: callus induced on N6A medium supplemented with 5-azaC 50 mg/l, 3: callus cultured on MSR regeneration medium for 10 days, 4: callus cultured on MSRA supplemented with 5-azaC 50 mg/l for 10 days.

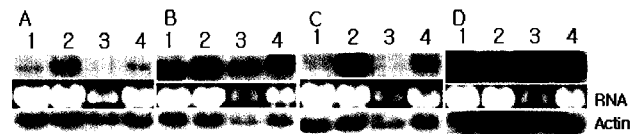


Figure 6. Northern blot analysis of gene expression in callus on different media. A: agamous like MADS (AY177696), B: glutathione-S-transferase (AY271619), C: germin like protein (AF032972), D: metallothionein like protein (AY833008). 1: callus induced on N6 medium, 2: callus induced on N6A medium supplemented with 5-azaC 50 mg/l, 3: callus cultured on MSR regeneration medium for 10 days, 4: callus cultured on MSRA supplemented with 5-azaC 50 mg/l for 10 days.

Table 1 Partial list of *Oryza sativa* genes affected by 5-azacytidine (5-azaC)

Gene ID	TIGR_annotation	Intensity
	5-azaC-up-regulated	
AF032972	Germin-like protein subfamily 1 member 7 precursor	69.8961
AK101772	Peroxidase 2 precursor, putative	32.2009
AF488522	Cytochrome P450 family protein	15.1365
AK108824	Peroxidase family protein	10.0388
CF317052	Glyoxalase family protein	9.5511
AY551918, AY177696	Agamous-like MADS box protein AGL6, putative	6.20202
AK102799	Alcohol dehydrogenase 2, putative	3.8018
AY271619	Glutathione S-transferase, putative	3.1636
	5-azaC-down-regulated	
AB040744	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein	0.0355
CI254938	Late embryogenesis abundant protein	0.0730
NM_188011	AT hook motif-containing protein, putative	0.1200
AY833008	Metallothionein family protein	0.2826
AK105278	Cysteine proteinase inhibitor-I, putative	0.4505

서 분리된 total RNA를 사용하여 GeneFishing™ 스크리닝과 microarray 분석에서 공통적으로 발현차이를 보이는 유전자들을 RT-PCR 및 northern 분석을 통하여 발현 차이를 확인하였다. Agamous like MADS protein과 germin like protein 경우 5-azaC 첨가 시, 즉 demethylation 시 유전자 발현이 증가된다는 것을 알 수 있었다 (Figure 5 A, D, Figure 6 A, C). 특히 germin like protein 경우 5-azaC 처리 시 재분화 상태에서 서보다는 켈러스 유기 상태에서 발현양이 높다는 것이 RT-PCR과 northern 분석으로 확인되었다 (Figure 5 D, Figure 6 C). Glutathione-S-transferase의 경우에도 5-azaC 처리에서 발현양이 약간 높게 나타났다 (Figure 5 E, F, Figure 6 B). Metallothionein like protein의 경우 5-azaC 처리 후 켈러스 형성과 재분화 상태에서 모두 발현양이 약간 낮아지는 것으로 나타났다 (Figure 5 C, Figure 6 D). 벼 켈러스 형성 및 재분화 단계에서 5-azaC 처리에 의한 demethylation으로 인한 유전자 발현 양상 분석은 처음 있는 시도라고 할 수 있고 위의 확인된 유전자 이외에 많은 유전자들의 발현양에 차이가 있는 것을 확인하였다. 벼 종자로부터 켈러스 형성, 켈러스로부터 재분화까지에는 수많은 유전자가 발현이 조절되면서 관여하는데 본 연구에서 발현양에 뚜렷한 차이가 있는 개개의 유전자 분석은 DNA methylation에 의한 식물 분화 발달 기작 연구에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

식물 조직 배양 및 식물 발달 단계에서 methylation의 영향을 알아보기와 벼 종자로부터 켈러스 형성 및 식물체 재분화 단계에서 demethylation 물질인 5-azacytidine을 처리하여 유전자 발현 양상을 분석하였다. 식물체로의 재분화 능력이 있는 벼 배상체 켈러스는 5-azaC가 첨가된 N6A 배지에서는 형성되지 않았으며 갈색을 띠는 켈러스가 형성되었다. 또한 정상적인 켈러스를 5-azaC가 첨가된 MSRA 재분화 배지에서 배양했을 때도 대조구와는 달리 식물체 재분화는 이루어지지 않았다. 이러한 결과는 5-azaC가 정상적인 배상체 켈러스 및 shoot 분화에 부정적인 영향을 미친다는 것을 나타냈으며 따라서 DNA methylation이 식물 조직배양에서의 정상적인 세포 dedifferentiation과 differentiation에 필수 요인이라는 것을 알 수 있었다. 벼 켈러스 형성 및 재분화 과정 동안의 methylation 영향을 알아보기와 각 단계별로 5-azaC를 처리 후 GeneFishing™ DEG와 DNA chip을 사용하여 유전자 발현 양상을 분석하였다. Epigenetic regulation, 전자전달, 핵산대사, 스트레스 반응에 관여하는 일부 유전자들의 발현이 증가하거나 감소하는 것을 알 수 있었다. 발현 차이가 있는 일부 유전자를 클로닝하여 확인하였고 RT-PCR 및 northern 분석으로 각 단계에서의 발현 차이를 확인하였다.

적 요

DNA와 histone 단백질의 변형은 식물 발달에 상당히 중

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업생명공학연구원 기관고유사업비와 GM 작물 실용화 연구비의 지원으로 수행되었음.

인용문헌

- Bernacchia G, Primo A, Giorgetti L, Pitto L, Cella R (1998) Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression. *Plant J* 13: 317-329
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Riguezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagege D, Maury S (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 681-691
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science* 165: 61-68
- Chang S and Pikaard CS (2005) Transcript profiling in Arabidopsis reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *The Journal of Biochemical Chemistry* 280(1): 796-804
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Ying KC, Chu CY, BinFY (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experimentation on nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-668
- Finnegan EJ (2001) Is plant gene expression regulated globally?. *Trends in Genetics* 17(7): 361-365
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA methylation in plants. *Anu. Rev. Plant. Mol. Biol* 49: 223-247
- Kakutani T, Jeddelloh JA, Flowers SK, Munakata K, Richards EJ (1996) Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12406-12411
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188
- Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, Hwang IT, Chun JY (2004) Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* 36: 424-426, 428, 430
- Leljak-Levanic D, Bauer N, Mihaljevic S, Jelaska S (2004) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep* 23: 120-127
- Lo Schiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti Ronchi V, Marazzati D, Vergara R, Orselli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiations, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet.* 77: 325-331
- Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, Toyama T, Shimada H, Kakutani T (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* 411: 212-214
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro Lj (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211: 393-396
- Munksgaard D, Mattsson O, Okkles FT (1995) somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Physiol Plant* 93: 5-10
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- Rabinowicz PD, Palmer LE, May BP, Hemann MT, Lowe SW, McCombie WR, Martienssen RA (2003) Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genom Research* 13: 2658-2664
- Richards EJ (1997) DNA methylation and plant development. *TIG* 13(8): 319-323
- Xu M, Li X, Korban SS (2004) DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor Appl Genet* 109: 899-910
- Yamamoto N, Kobayashi H, togashi T, mori Y, Kikuchi K, Kuriyama, Tokuji Y (2005) Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *Journal of Plant Physiology* 162: 47-54

(접수일자 2008년 5월 23일, 수리일자 2008년 6월 26일)