식물생명공학회지 제36권 제1호
J Plant Biotechnol
Vol. 36, No. 1, 68-74 (2009)

BrMT3 고발현에 의한 애기장대의 카드뮴 저항성 증진

김선하[1,2] · 송원용[1] · 안영옥[2] · 이행순[2] · 곽상수[2] · 최관삼[1*]
[1]충남대학교 농업생명과학대학 대학원, [2]한국생명공학연구원 환경바이오 연구센터

Enhancement of cadmium resistance by overexpression of BrMT3 in *Arabidopsis*.

Sun Ha Kim[1,2] · Won Yong Song[1] · Young Ock Ahn[2] · Haeng-Soon Lee[2] · Sang-Soo Kwak[2] · Kwan Sam Choi[1*]
[1]Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[2]Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT We have previously demonstrated that overexpression and characterization of *Brassica rapa* type-1 metallothionein gene (BrMT1) in *Arabidopsis* which showed enhanced resistance to cadmium and ROS. Here, we present the consistent study of our previous report about BrMTs. *BrMT3* expressing DTY167 cells showed resistance to Zn and Pb as well as Cd. Thus, we have developed the *BrMT3* overexpression Arabidopsis to enhance capacity for metal stresses. Successful expression and localization were achieved using the rubisco transit peptides of *RbcS-BrMT3-GFP* protein, which was confirmed by western blot analysis with the GFP antibody and green fluorescence signal from the chloroplast. *BrMT3* overexpression Arabidopsis plants exhibited a higher resistance to cadmium compared to control plants. This result indicates that *BrMT3* would be applicable to the development of plants with enhanced resistance against heavy metal stresses.

서 론

식물은 중금속이나 병원균의 감염, 상처 등 다양한 스트레스에 노출 되었을 때 뿐만 아니라 정상적인 호흡과 광합성기작을 통해서도 산화 스트레스를 받는다 (Apel et al. 2004). 산화 스트레스는 거의 모든 스트레스 반응에서 공통적으로 나타나는 과정이다. 산소는 호기성 생물의 생존에 필수적인 분자이지만 반응에 따라서는 치명적인 유해분자로 변할 수 있다. 여기 된 상태의 산소에 전자가 추가되어 화학반응 속도가 빠르게 된 분자를 활성산소종이라 하며 여기에는 singlet oxygen ($^1O_2$), superoxide (O_2-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (-OH) 등이 있다. 특히 엽록체는 식물에서 광합성이 일어나는 세포 내 소 기관으로 에너지 획득을 위한 고 에너지 전자 전달계의 존재와, 활성산소의 대량 생산으로 인해 항상 높은 산화스트레스 조건으로 생각되어진다. 따라서 식물은 이러한 산화스트레스에 대항하기 위한 다양한 항산화 시스템을 가지고 있다. 식물이 가지고 있는 항산화 물질에는 tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid 등이 있으며, 항산화 효소로서는 SOD (superoxide dismutase), APX (ascorbrate peroxidase), Catalase 등 기타 여러 가지 reductase들이 알려져 있다. 그러나 이러한 자체 항산화 기작에도 불구하고 비정상적인 조건에서 유입되는 산화스트레스들을 무독화 하는 데는 한계가 있다 (Lee et al. 2004).

Metallothioneins (MTs)는 낮은 분자량 (<10 kDa)의 cysteine (Cys)-rich 단백질로서 중금속과 결합할 수 있다 (Hamer 1986; Robinson et al. 1993). 이 단백질은 곰팡이, 식물, cyanobacteria 그리고 포유동물에 이르기 까지 다양한 생물체에 폭넓게 분포 하며, 세포 내에서는 금속이온의 항상성 그리고 중금속의 무독화에 관여한다 (Cobbett and Goldsbrough 2002; Andrews 2000; Cobbett 2000; Quesada et al. 1996). 식물 MT유전자의 발현은 일차적으로 금속이온에 의해 조절되고, 다른 요인으로는 salt stress, ABA, sucrose starvation, heat shock, 상처 그리고 바이러스의 감염 등과 같은 스트레스에 영향을 받는다 (Haq et al. 2003; Robinson et al. 1993; Choi et al. 1996). 식물 MTs는 아미노산 서열에 기초하여 Class I, Class II, Class III의 3가지 분류 군으로 나뉜다 (Rauser 1999; Murphy et al. 1997). Class I MTs는 중앙의 Cys-free spacer에 의해 분리된 두 개의 Cys rich 도메인을 가지며, 또한 아미노산과 COOH 도메인에서의 cysteine 잔

*Corresponding author Tel 042-821-5766 Fax 042-821-5768
E-mail: kschoi@cnu.ac.kr

기의 배열에 따라 4가지 type으로 나뉜다 (Yu et al. 1998). Type 1 MT는 두 개의 말단 도메인에 특이적인 Cys-Xaa-Cys motif를 갖는다. Type 2 MT는 N-terminal domain 안쪽에 Cys-Cys와 2개의 Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys motif를 통한 8개의 보존된 Cys 잔기를 가지며, C-terminal domain 역시 6개의 Cys-X-Cys가 고도로 보존되어 있다. Type 3 MT는 전형적인 특징으로 N-terminal에 4개의 보존된 Cysteine 잔기를 가진다. Type 4 MT는 종자에서 특이적으로 발현한다. Class II MTs는 밀의 Ec protein으로 전체 아미노산 서열 내에 Cys 잔기가 흩어져 있다. 마지막으로 Class III MTs는 Phytochelatins으로서 poly-glycin 구조로 효소적으로 합성되는 팹티드이다.

MTs의 또 다른 기능 중의 하나는 항산화 기능이다. Wong (2004) 등은 벼의 type 2 metallothionein (OsMT2b)를 과발현시켰을 때 super-oxide (O_2-), hydrogen peroxide (H_2O_2)의 scavenger로서의 활성이 증가 된다는 것을 보고하였다. 또한 Andrew (2000)는 MT유전자의 발현이 산화스트레스에 의해 유도되고 antioxidant로서의 활성이 있음을 보고하였다.

최근 급격한 산업화에 따른 환경오염은 식물이 갖고 있는 환경내성을 위협할 수 있는 수준으로 심각한 상태에 이르고 있다. 따라서 최근 산화스트레스뿐만 아니라 여러 가지 환경스트레스에 강한 식물체를 만들려는 노력이 진행되고 있고 이러한 문제를 해결하기 위한 전략적 연구로 항 산화 시스템관련 효소들을 도입하여 과발현 시키거나 (Kwon et al. 2002; Wong et al. 2004; Lee 2004) 여러 가지 중금속의 chelator나 수송자를 도입하는 연구가 진행되고 있다 (Song et al. 2004; Lee et al. 2004; Murgia et al. 2004; Allen et al. 1997). 이러한 최근의 연구에 입각하여 본 연구팀은 중금속이온의 무독화와 산화 스트레스에 강한 환경복합내성 작물을 개발하기 위한 기초 연구를 수행하고 있다. 특히 배추로부터 얻어진 type 1 MT 유전자가 엽록체에서 과다한 중금속의 유입이나 과도한 ROS 생산에 대해 어떤 기능을 하는지를 알아보기 위해 BrMT1 유전자를 chloroplast에 targeting 하도록 Rubisco small subunit (RbcS) transit peptide (Lee et al. 2002) 를 이용하여 식물 형질전환용 벡터를 제작하였다. 이 벡터를 모델식물인 애기장대에 형질 전환하여 광계 I 에서 전자를 탈취하여 스스로 라디칼화 되고 식물체내에 산화스트레스를 높여 식물체를 고사 시키는 것으로 알려진 Paraquat과 중금속인 카드뮴을 통해 BrMT1을 식물체의 엽록체에 과발현시킨 형질전환 애기장대에서의 카드뮴저항성과 엽록체내에서의 ROS에 대한 저항성 기능이 어떻게 나타나는지를 알아보았다 (Kim et al. 2007).

본 연구에서는 같은 배추로부터 얻은 type 3 MT인 BrMT3를 효모에 과발현시켜 중금속에 대한 내성을 보고 애기장대에 형질전환하여 카드뮴에 대한 저항성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 형질전환방법

RbcS-BrMT3, BrMT3, RbcS-GFP를 *Agrobacterium tumefacience* GV3101에 electroporation을 통해 형질 전환 시킨 후 이것을 *Arabidopsis thaliana* (Col-0)에 floral dipping 방법 (Clough and Bent et al., 1998)을 통해 형질전환 하였다. Agrobacterium을 접종한 후 3~4주 후에 seed pod가 충분히 익으면 한꺼번에 받아서 BASTA selection을 통해 T_0 식물체를 선발하였다.

유전자 분석 및 클로닝

배추로부터 분리한 BrMT3의 계통분석을 위하여 BrMT3 cDNA 서열을 기초로 BLAST search 를 통해 애기장대를 포함한 배추과 작물의 MT3 cDNA (*BjMT3c*; Accession no. AB057415.1, *BjMT3b*; Accession no. AB057414.1, *BjMT3a*; Accession no. AB057413.1, *AtMT3*; Accession no. NM_112401.1)를 찾았고 각각의 cDNA에 따른 아미노산 서열을 기초로 CLUSTAL W를 통해 계통 분석하였다.

BrMT3를 효모와 식물체에 발현시키기 위해 배추로부터 분리한 BrMT3 cDNA의 Start 코돈과 Stop 코돈을 포함하는 full-length 유전자를 확보하였다. 벡터 클로닝을 위해서 5' 에 *BamH* I site (밑줄)를 넣은 sense primer BrMT3-F: ggatccATGTCTTCGTGCGGAAA 와 3'에 *Xho* I과 *Xba* I (밑줄) 사이에 stop 코돈을 포함하도록 하는 antisense primer BrMT3-R: ctctagaTTActcgagATTGGG 를 각각 제작하였고 이들 primer 를 이용하여 BrMT3을 PCR을 통해 확보하였다. PCR 증폭은 Tm 온도 55℃에서 26 cycle을 실시하였다. 그 결과 약 200 bp정도의 PCR product를 얻었고 1.5% agarose gel에 전기 영동 하여 gel purification kit (General Bio.)를 사용하여 BrMT3 단편들을 분리하였다. 이렇게 분리한 BrMT3를 앞으로의 실험에 이용하였다. 한편, BrMT3의 cloning 에는 T-vector (Yeastern Biotech co, Ltd)를 이용하였고 이 단계에서 유전자 서열을 확인하기 위한 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과, 전체 size 204 bp의 완전한 BrMT3 유전자가 제대로 클로닝 되었음을 확인 할 수 있었다.

효모 형질 전환 방법

pYES2 효모 발현용 벡터에 *BamH* I 과 *Xho* I 을 처리해서 자른 후 T-vector로 cloning 한 BrMT3 유전자를 같은 제한효소로 처리한 뒤 ligation 하여 발현 벡터를 완성하였다. 효모에서 납 (Pb)과 카드뮴 (Cd) 그리고 비소 (As) 같은 중금속의 무독화에 관련된 단백질인 YCF1 유전자가 deletion되어 중금속에 과민감한 돌연변이종 (DTY 167)을 사용하여 Lithium acetate (Ito et al. 1983) 방법으로 발현벡터를 효모에 형질 전환하였다.

발현 벡터 제작 및 애기장대로의 형질전환

BrMT3 유전자를 식물체에 형질전환하기 위하여 BASTA 유전자가 선발 마커로 들어간 식물 형질전환용 벡터 pCAMBIA를 이용하였다. 엽록체에 BrMT3를 targeting 하기 위해 chloroplast transit peptide로 알려진 Rubisco small subunit (RbcS) (Lee et al. 2002) 의

signal peptide를 포함하는 벡터와 35s promoter를 이용하여 식물체 전체에서 발현을 유도하는 벡터를 제작한 후 엽록체에 BrMT3이 정확히 targeting하는지를 알아 보기 위한 GFP (Green Fluorescence Protein)를 추가하였다. 이를 위해, Rubisco small subunit (RbcS) chloroplast transit peptide를 제한효소 *Eco*R I 과 *Bam*H I 을 포함하는 primer를 이용하여 PCR을 통해 증폭 한 뒤 *Eco*R I 과 *Bam*H I 으로 자른 pCAMBIA에 ligation 한 뒤 cloning을 거쳐 GFP tag를 추가한 pCAM-RbcS-GFP 를 제작하였다. 이렇게 완성된 벡터에 *BamH* I 과 *Xba* I 을 처리한 뒤 BrMT3를 같은 제한효소를 이용하여 자른 다음 각각 ligation 하여 본 실험에서 완성하고자 하는 BrMT3의 엽록체 targeting vector인 pCAM-RbcS-BrMT3-GFP 를 완성하였다. 완성된 발현벡터를 Agrobacterium을 이용하여 형질전환 하여 스크리닝 한 결과 15개의 독립된 형질전환체를 얻었으며 이중 BrMT3 유전자의 발현이 높은 7번과 12번 라인이 본 실험에 사용되었다.

RNA 추출 및 RT-PCR

애기장대 실험은 형질전환체를 1/2 MS (1/2 Murashige and Skoog salts including vitamin, 0.8% plant agar, and 1.5% sucrose) 에서 약 2주간 키운 유묘 0.5 g을 액체질소 하에서 막자사발을 이용해 마쇄한 후 추출 버퍼 (*p*-Aminosalicylic acid 13.5 g, Tri-isopropyl Naphthal Sulfonic acid 2.25 g, 0.25 M Tris-HCl pH 9.0, 0.25 M NaCl, 0.05M EDTA, 2-mercaptoethanol 5 ml, Phenol 6 ml, Distilled Water/DEPC) 를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 이렇게 분리한 total RNA를 RT-PCR 분석에 이용하였다. *B. rapa* 를 이용한 실험에서는 1/2 MS 액체배지에 3주간 수경재배한 식물체를 50 μM $CdCl_2$을 2, 5, 24 시간 동안 처리한 뒤 뿌리와 줄기로부터 RNA (Spectrum plant total RNA kit, Sigma) 를 추출하고 cDNA (Superscript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen) 를 합성하였다. PCR에 사용된 primer 는 다음과 같다. BrMT3 primer (BrMT3 sense: GGAAACTGCGACT GTTCTGA, BrMT3 antisense: TAGAGCCACACTTGCATTGG), BrActin primer (BrActin sense: TGTGTGATGTCGGAGATGGT, BrActin antisense: AACCCTGTGGGTGCTAAGTG). PCR은 94℃에서 20초 변성, 55℃에서 30초, 72℃에서 45초의 조건에서 29와32 cycles을 수행하였다.

원형질체 (protoplast)의 분리 및 GFP형광의 관찰

GFP 형광을 관찰하기 위한 원형질체를 분리 하기 위해 RbcS-GFP, RbcS-BrMT3-GFP그리고 WT 애기장대를 1/2 MS agar 배지에서 2주 동안 키운 후 잎을 따서 enzyme solution (1-1.5 % Cellulase R10, 0.2-0.4% Macerozyme R10, 0.4 M mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES, pH 5.7, 0.1% BSA) 을 처리하였다. 22℃에서 dark상태로 한 시간 동안 천천히 흔들어준 뒤 screen cup을 사용해서 solution 상태로 걸렀다. 500 rpm에서 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물에 5~10 ml의 W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl, 25 mM KCl, 2 mM MES, pH 5.7) 용액을 넣고 천천히 현탁 하였다. 분리된 원형질체를 슬라이드 글라스에 놓고 커버글라스로 덮은 다음 형광현미경 (Carl Zeiss)을 통해 관찰하였다.

Western blot을 위한 엽록체 및 엽록체 단백질의 분리

엽록체의 분리는 Obokata (1987)의 방법을 수정하여 0-4℃에서 수행하였다. RbcS-BrMT3-GFP와 RbcS-GFP 그리고 WT의 잎 10g을 채취하여 냉각시킨 막자 사발에 넣고 STN buffer (0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, pH 8.0, 0.01 M NaCl) 10ml에 넣어 마쇄 한 다음 2겹의 거즈로 여과하여 여과 액을 300 g에서 1분간 원심 분리하여 침전물은 버리고 상등액을 새로운 튜브로 옮겼다. 600 g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 따라 버린 다음 침전물에 STN buffer (pH 7.8) 10 ml 을 분주하여 현탁 하였다. 이 후 1,000 g에서 10분간 다시 원심분리 하여 얻은 침전물을 이용하였다. 분리된 엽록체와 전체 잎을 마쇄 한 뒤 단백질 추출 버퍼 (20 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.7μg/ml pepstain A, 20 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml aprotiuin, 10mM DTT)를 넣고 4°C, 10,000 g에서 5분간 원심분리 하였다. 이 상층액을 새 튜브에 옮긴 다음 spectrophotometer를 이용하여 단백질을 정량 하였다. Western blot을 위하여 10~45 μg의 총단백질을 SDS-PAGE에서 전기 영동 한 뒤 nitrocellulose membrane에 electro blotting을 통해 옮겼다. 이 membrane을 7.5% nonfat-dry milk를 넣은 1X TBST (0.1% Tween 20, 1X TBS)로 상온에서 1시간 blocking 한 후에 1X TBST로 5분 간 두 번 씻은 다음 GFP-antibody를 상온에서 3시간 처리하였다. 이 membrane을 다시 1X TBST로 10분간 3번 씻은 다음 sheep anti-mouse I gG에 1시간 처리하였다. 그런 다음 1X TBST로 membrane을 10분간 3번 씻은 후 ECL regent (Amersham Pharmacia Biotech)을 통해 시그널을 확인하였다.

형질전환체의 카드뮴에 대한 저항성 기능 분석

형질전환 애기장대에서 카드뮴에 대한 저항성을 실험 하기 위해 애기장대 WT (Col-0)와 RbcS-BrMT3 형질전환 종자들의 표면을 소독한 후 CdCl2를 포함하는 1/2 MS, 1.5% sucrose와 0.8% agar 배지에서 3일간 4°C 에서 저온처리 하였다 이 후 21°C±1°C 광 조건에서 2~3주 동안 세워서 키웠다.

결과 및 고찰

BrMT3 유전자의 분리 및 다른 MT 유전자와의 비교 분석

배추과 식물은 대부분 중금속에 대한 축적성과 저항성이 높다고 알려져 있다 (Baryla et al. 2001; Milner et al. 2008; Verbruggen et al. 2009). 본 연구에서는 카드뮴 저항성에 관여하는 유전자의 선발을 위해 카드뮴을 처리한 *B. rapa* 식물체의 cDNA library로부터

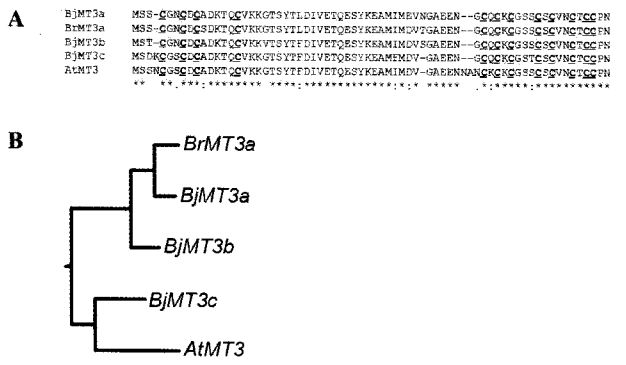

Figure 1. (A) Multiple alignment of the BrMT3 amino acid sequences with other plant type-3 MT genes. Conserved cysteine residues in MT3 are underlined. *Arabidopsis thaliana* (At), *Brassica rapa* (Br), *B. juncea* (Bj). (B) Dendrogram of *MT3* in *B.* family. The tree was generated using CLUSTRALW (origin2) based on the amino acid sequence homology. Organisms and accession numbers for these sequences are: BjMT3a, *B. juncea MT3a* (AB057413); *BjMT3b*, *B. juncea MT3b* (AB057414); *BjMT3c*, *B. juncea MT3c* (AB057415); AtMT3, *A. thaliana MT3* (NM_112401.1)

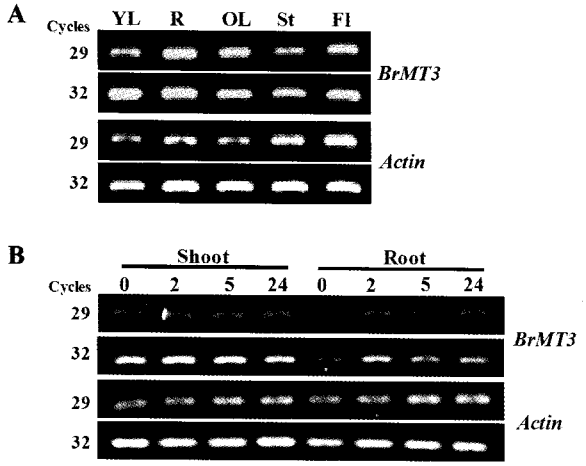

Figure 2. The expression of BrMT3 in different tissues of *B. rapa* and under Cd stress
(A) RT-PCR analysis of BrMT3 in different *B. rapa* tissues. The RNA was extracted and RT-PCR was performed with specific primers for the target gene. R, root; YL, Young leaf; A L, leaf from flowering plant; St, stem from flowering plant; Fl, flower. For quantitative analysis, 29 and 32 cycles were performed
(B) RT-PCR analysis of BrMT3 in 3-week-old *B. rapa* seedlings response to 50 μM Cd for different durations. Actin was used for template control

BrMTs를 분리하였다. 이중 Class I 의 type 1에 속하는 BrMT1의 유전자를 선행연구에서 효모와 애기장대에 과발현 시켜 카드뮴과 ROS에 대한 저항성을 살펴보았다. 본 연구에서는 type 3에 속하는 metallothionein의 유전자 특성을 확인하기 위하여 BrMT3의 full-length 서열을 확보하였다. 전체 뉴클레오티드는 204 bp이며 68개의 아미노산을 암호화 하고 있다. 다른 배추과 작물들의 MT3 유전자와 아미노산 서열을 비교 분석 해 본 결과 BrMT3는 type3 metallothionein의 전형적인 특징인 N-terminal에 4개의 보존된 cystein 잔기를 포함하고 있었다 (Figure 1A). BrMT3를 애기장대를 포함한 다른 배추과 작물들의 MT3 유전자와의 유연관계를 살펴보기 위해 근연계통도를 그려본 결과 애기장대의 MT3와는 약 86%, *B. juncea*의 MT3와는 93% 이상의 homology를 보였으며 특히 BjMT3a와는 98%이상의 높은 homology를 보였다 (Figure 1B).

카드뮴 처리에 의한 BrMT3의 발현 양상 조사

B. rapa 식물체에서 카드뮴 저항성 유전자들이 카드뮴 처리에 의한 발현이 어떻게 변화하는지를 확인하기 위해 50 μM 카드뮴을 각각 2, 5, 24 시간 처리한 배추의 뿌리와 지상부로부터 RNA를 추출한 후 BrMT3 유전자 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행했다 (Figure 2A). 그 결과 카드뮴 처리 후 지상부에서는 모든 유전자의 발현양상이 거의 변하지 않았으나 뿌리에서는 카드뮴 처리에 의해 *BrMT3* 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이는 뿌리를 통해 식물체에 흡수되는 것으로 알려진 카드뮴이 지상부에는 거의 영향을 미치지 않아 유전자의 발현에 변화가 없었지만 직접 카드뮴을 흡수하는 뿌리에서는 관련 유전자들의 발현에 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한 BrMT3의 발육시기 및 조직 특이적 발현을 조사하기 위해 B. rapa 식물체의 조직별 RT-PCR을 수행했다. *BrMT3*는 어린 잎보다는 성숙한 잎으로 발달이 진행될수록 더 많이 발현하였고 지상부 보다는 뿌리조직에서 더 발현이 높았다 (Figure 2B). 이는 많은 중금속들이 식물체의 뿌리를 통해 직접적으로 흡수되는 내용에 부합하여 관련 유전자도 강하게 발현하는 것으로 생각된다.

효모에 발현시킨 BrMT3 유전자의 중금속에 대한 저항성 분석 결과

Yeast strain DTY167은 YCF라는 카드뮴 factor가 결핍되어 금속이온에 매우 민감한 돌연변이 종이다. 이 strain에 BrMT3를 과발현시켜 금속이온에 대한 회복능을 실험하였다. BrMT3를 형질전환시킨 효모를 중금속이 없는 배지와 카드뮴, 납이 첨가된 배지에 각각 키웠을 때, 중금속이 첨가돼지 않은 배지에서는 각 효모들 간에는 생장 차이가 없었으나 카드뮴 및 납이 첨가된 배지에서는 BrMT3를 과발현시킨 효모가 빈 벡터가 들어간 효모보다 생장을 더 잘 했다 (Figure 3). 이로써 *B. rapa* 식물체에 카드뮴을 처리하여 분리한 BrMT3 유전자가 카드뮴과 납을 포함하는 중금속에 저항성이 있음이 확인되었다.

BrMT3 유전자의 애기장대 도입과 BrMT3 단백질의 확인

발현벡터 RbcS-GFP와 RbcS-BrMT3-GFP를 Agrobacterium을 이용하여 애기장대에 형질전환 하고 스크리닝 한 결과 17개의 독립된 형질전환체를 얻었으며 (결과 미제시), 이중 BrMT3 유전자의 발현이 높은 7번과 12번 라인을 대상으로 BrMT3 단백질이 엽록체에 제대로 발현하는지를 확인하기 위해 GFP형광을 분석하였다. WT

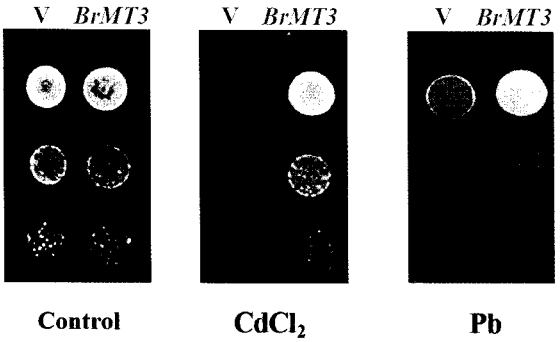

Figure 3. Metal resistance of *BrMT3* overexpressing yeasts
DTY167 yeast cells were transformed with empty vector (V) and *BrMT3*. The yeast strains were grown on plates without (control) or with heavy metals (40μM $CdCl_2$, 1.2mM Pb) at 30℃ for 4 days

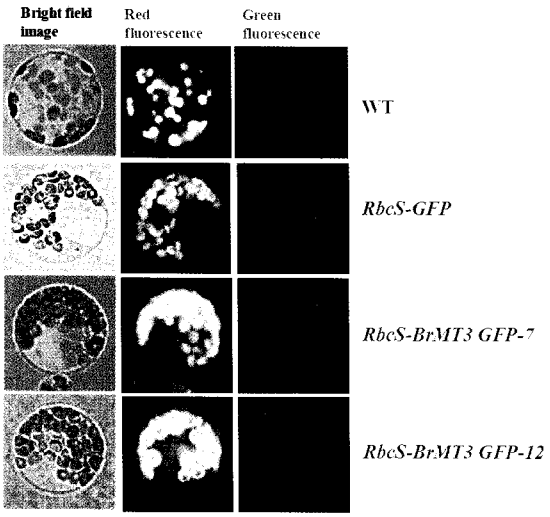

Figure 4. Fluorescence in chloroplasts from transgenic Arabidopsis plants
Total soluble proteins were extracted from transformed Arabidopsis chloroplast containing 35S::RbcS-BrMT3-GFP construct. WT, non-transformed Arabidopsis

과 GFP만 도입된 RbcS-GFP 형질전환체, GFP와 BrMT3가 함께 도입된 RbcS-BrMT3-GFP 형질전환체들로부터 원형질을 추출하였다. 형광현미경을 통해 GFP를 관찰해 본 결과 WT의 엽록체로부터 나오는 자가 형광보다 두 형질전환체의 엽록체에서 더 강한 녹색 형광을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 이로써 애기장대에 도입된 BrMT3 유전자가 의도한대로 엽록체에서 발현됨을 확인하였다. 또한 GFP만을 발현시킨 형질전환체의 잎 전체와 엽록체에서 각각 총단백질을 분리하여 GFP antibody를 이용해 western blot을 실시한 결과 두 단백질 시료 모두에서 GFP 단백질이 존재하는 것을 다시 한번 확인 할 수 있었다 (결과 미제시). 이를 토대로 BrMT3 유전자가 도입된 RbcS-BrMT3-GFP 형질전환체의 잎으로부터도 엽록체를 분리한 후 추출한 단백질과 전체 잎으로부터 추출한 단백질을 대상으로 GFP antibody를 이용해 western blot을 실시해 본 결과 전체 입과 엽록체 내에 GFP 단백질을 확인할 수 있었다. GFP 형광실험과

Figure 5. Western blot analysis of BrMT3 transgenic Arabidopsis plants
BrMT3 was detected with GFP antibody. WT, non-transformed Arabidopsis; 7 and 12, independent T3 BrMT3 transgenic lines

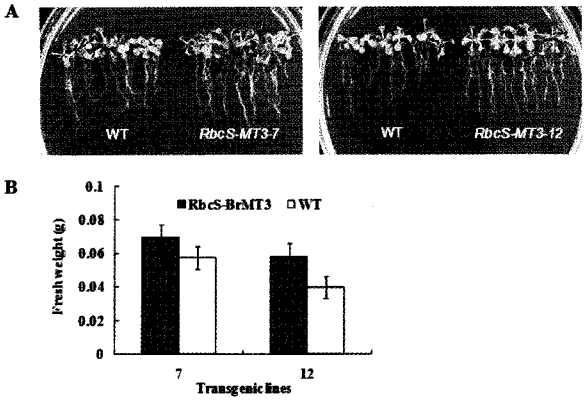

Figure 6. Enhanced cadmium resistance in the T_2 generation RbcS-BrMT3 plants
Wild type and RbcS-BrMT3 grown for 2 weeks on 50 μM Cd (II) containing 1/2 MS agar medium. Error Bars show means ± standard deviations of triplicate experiments

western blot 결과로부터 도입된 BrMT3 유전자가 애기장대의 엽록체에서 단백질 수준으로 발현함을 확인 할 수 있었다 (Figure 5).

형질전환체의 카드뮴에 대한 저항성 기능 분석

잎에서 높은 카드뮴 농도는 chlorophyll 생합성 경로에서 효소의 활동과 광계의 색소 단백질 조합의 대사과정 혼란을 초래해 노화를 촉진하고 세포의 산화적 손상, chlorophyllase의 활성을 증폭, 또는 Fe나 Mg와 같은 필수 원소의 결핍들을 만든다고 보고되어왔다 (Baryla et al. 2001). 따라서 BrMT3을 엽록체에 과발현시킨 형질전환체 (RbcS-BrMT3-GFP)가 $CdCl_2$에 저항성을 가지는지를 알아보기 위하여 Cd (II)이 각각 50, 60, 70 uM 의 농도로 포함된 1/2 MS agar 배지에서 2주간의 생장을 비교해 보았다. 그 결과, RbcS-BrMT3 형질전환체는 Figure 6A 에서 보여주는 것처럼 WT (Col-0) 보다 뿌리와 지상부 모두에서 더 잘 생장하는 것을 확인하였다. 이것은 아

마도 BrMT3 유전자를 엽록체에 과발현시킨 형질전환체가 카드뮴으로 인한 엽록체의 손상과 산화스트레스에 저항성을 나타내는 것과 함께 일차적인 카드뮴의 흡수가 엽록체가 없는 뿌리의 세포들을 통해 이루어짐으로써 상대적으로 손실이 적었을 것으로 사료된다. 보다 정확한 양적 측정을 위해 카드뮴 처리 후 생체량을 비교해 본 결과 WT보다 RbcS-BrMT3-GFP-7의 경우 1.3배, RbcS-BrMT3-GFP-12의 경우 1.4배 생체량이 큰 것으로 나타나 이들 형질전환체가 대조구보다 카드뮴의 저해를 덜 받는 것으로 확인되었다 (Figure 6B).

적 요

*B. rapa*로부터 분리한 BrMT3 유전자를 도입시킨 효모와 애기장대가 카드뮴을 비롯한 중금속에 저항성을 보이는 것이 확인 되었고 이 결과를 토대로 이 유전자가 중금속 흡착을 통한 환경 정화 및 스트레스에 내성을 갖는 형질전환 식물체를 개발하는데 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 연구사업단, 한국생명공학연구원 기관고유사업 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

Allen RD, Webb RP, Schake SL (1997) Use of transgenic plants to study antioxidants defenses. Free Rad Biol med 23:473-479

Andrews GK (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem Phyrmacol 59:95-104

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. Annu Rev Plant Biol 53:373-399

Baryla A, Carrier P, Frank F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M (2001) Leaf chlorosis in oilseed rape plants (Brassica napus) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. Planta 212:696-709

Choi D, Kim HM, Yun HK, Park JA, Kim WT, Bok SH (1996) Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol 112:353-359

Cobbett CS, Goldsbrough PB (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles on heavy metal detoxification and homeostasis. Annu Rev Plant Biol 53:159-182

Cobbett CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol 123:825-832

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16:735-743

Haq F, Mahoney M, Koropatnick J (2003) Signaling events for metallothionein induction. Mutation Research 533:211-226

Hamer DH (1986) Metallothionein. Annu Rev Biochem 55:913-951

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol 153: 163-168

Kim SH, Lee HS, Song WY, Choi KS, Hur YK (2007) Chloroplast-targeted BrMT1 (Brassica rapa type-1 metallothionein) enhances resistance to cadmium and ROS in transgenic arabidopsis plants. J Plant Biol 50:1-7

Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismuase and ascorbate peroxidase in chloroplast against methyl viologen-mediated oxidative stress. Plant Cell and Envrionm 25:873-882

Lee JH, Shim DS, Song WY, Hwang IH, Lee Y (2004) Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. Plant Mol Biol 54:805-815

Lee KH, Kim DH, Lee SW, Kim ZH, Hwang IH (2002) In vivo import experiment in protoplasts reveal the importance of the overall context but not specific amino acid residues of the transit peptide during import into chloroplast. Mol Cells 14:388-397

Milner JM, Kochian LV (2008) "Investigating Heavy-metal Hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. Annals of Botany 102:3-13

Murphy A, Zhou J, Golasbrough PB, Taiz L (1997) Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 113:1293-1301

Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C (2004) Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidaes show increased resistances to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide induced cell death. Plant J 38:940-953

Obokata J (1987) Preparation of etioplasts, Tanpakushitsu Kakusan Koso 30:86-91

Quesada AR, Robert W, Byrnes S, Krezoski O, Petering DH (1996) Direct reaction of h2o2 with sulfhydryl group in hl-60 cells: zinc-metallothionein and other sites. Arch Biochem Biophys 334: 241-250

Rauser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. Cell Biochem Biophys 31:19-48

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C Jackson PJ (1993) Plant Metallothioneins. Biochem J 295:1-10

Song WY, Martinoia E, Lee JH, Kim DW, Kim DY, Vogt E, Shim DH, Choi KS, Hwang IH, Lee Y (2004) A novel family of cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in Arabidopsis. Plant Physiol 135:1-13

Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New phytologist 181: 159-776

Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K (2004) Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen

scavenger, by the small GTPase OsRsc1 in rice. Plant Physiol 135:1447-1456

Yu LH, Umeda M, Liu JY, Zhao NM, Uchimiya H (1998) A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node protein of the stem. Gene 206:29-35

(접수일자 2009년 3월 18일, 수리일자 2009년 3월 23일)