

## 방사선 스트레스 반응 방어 유전자의 탐색 및 발현 분석

박누리 · 하혜정 · 사미나단 수브라야 · 최서희 · 전용삼 · 진용태 · 도옥화 · 쉬프라 쿠마리 · 이금주

### Expression profile of defense-related genes in response to gamma radiation stress

Nuri Park · Hye-Jeong Ha · Saminathan Subburaj · Seo-Hee Choi · Yongsam Jeon · Yong-Tae Jin · Luhua Tu · Shipra Kumari · Geung-Joo Lee

Received: 6 September 2016 / Revised: 6 September 2016 / Accepted: 15 September 2016  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** *Tradescantia* is a perennial plant in the family of Commelinaceae. It is known to be sensitive to radiation. In this study, *Tradescantia* BNL 4430 was irradiated with gamma radiation at doses of 50 to 1,000 mGy in a phytotron equipped with a  $^{60}\text{Co}$  radiation source at Korea Atomic Energy Research Institute, Korea. At 13 days after irradiation, we extracted RNA from irradiated floral tissues for RNA-seq. Transcriptome assembly produced a total of 77,326 unique transcripts. In plantlets exposed to 50, 250, 500, and 1000 mGy, the numbers of up-regulated genes with more than 2-fold of expression compared that in the control were 116, 222, 246, and 308, respectively. Most of the up-regulated genes induced by 50 mGy were heat shock proteins (HSPs) such as HSP 70, indicating that protein misfolding, aggregation, and translocation might have occurred during radiation stress. Similarly, highly up-regulated transcripts of the IQ-domain 6 were induced by 250 mGy, KAR-UP oxidoreductase 1 was induced by 500 mGy, and zinc transporter 1 precursor was induced by 1000 mGy. Reverse transcriptase (RT) PCR and quantitative real time PCR (qRT-PCR) further validated the increased mRNA expression levels of selected genes, consistent with DEG analysis results. However, 2.3 to 97-fold higher expression activities were induced by different doses of radiation based on qRT-PCR results. Results on the transcriptome of *Tradescantia* in response to radiation might provide unique

identifiers to develop *in situ* monitoring kit for measuring radiation exposure around radiation facilities.

**Keywords** Differentially expressed genes, Gamma radiation, Radiation indicator, *Tradescantia*, Transcriptome analysis

### 서론

자주달개비(*Tradescantia* spp.)는 닭의장풀과(Comelinaceae family)에 속하는 식물로 전 세계에 약 70 여 종이 분포하고 있고, 그 중 어떤 종은 이온화 방사선 또는 여러 화학물질에 노출되었을 때 체세포 변화 또는 유전적 변이가 상대적으로 쉽게 발생하여, 이러한 환경스트레스를 감지하기 위한 생물지표로 보고되고 있다(Ichikawa and Ishii 1991). 자주달개비 BNL 4430 (T-4430) 클론은 *T. hirsutiflora*와 *T. subcaulis* 간의 자연잡종개체군으로부터 선발한 교배 후대 중간 잡종으로, 돌연변이원(mutagen)에 노출이 되었을 경우 수술털 세포의 분열과정에서 남색의 수술털이 분홍색 또는 무색으로 바뀌는 체세포성 화색변화가 쉽게 일어나는 특징을 가지고 있다(Christianson 1975; Schairer et al. 1978). 특히 수술털 세포에서 일어나는 분홍색 화색변화는 방사선 조사시에 선량이 증가할수록 변이 발생율도 함께 증가하는 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타낸다고 보고되어 있다(Sparrow 1972; Nauman 1976). 이러한 특징때문에 자주달개비 클론 BNL 4430은 특히 방사선 지표식물로서 방사선 조사 환경에서 생물학적인 반응 연구 등에 효과적으로 이용되어 왔다(Ichikawa 1981; Cebulka-Wasilewska 1992).

저선량 이온화 방사선이란 통상적으로 100 mSv 이하의 선량을 의미한다. 국제 방사선방호위원회에서는 ‘100 mSv

N. R. Park · H.-J. Ha · S. Subburaj · S.-H. Choi · Y. S. Jeon · Y.-T. Jin · L. Tu · S. Kumari · G.-J. Lee (✉)  
충남대학교 원예학과  
(Dept. of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea)  
e-mail: gjlee@cnu.ac.kr

또는 그 이하'로(ICRP 2006), 미국 과학아카데미는 '0에 가까운 선량부터 약 100 mSv 사이'(NRC 2006) 등으로 규정되어 있다. 자주달개비를 이용한 저선량 방사선 처리 후 수술털 체세포 돌연변이 검출에 관한 연구는 0.25 ~ 6 cGy까지의 저선량의 X-선을 이용한 연구와 중성자에서는 0.01 cGy의 선량에서 분홍돌연변이 검출(Sparrow et al. 1972), 자주달개비 T-4430을 이용하여 0.36 mR/d(또는 150  $\mu$ R/h)의 공간 방사선량율에 대한 유의수준의 분홍 돌연변이 증가(Kwon et al. 1981) 등이 보고되어 있다. 이 보고들에 의하면, 자주달개비는 낮은 수준의 방사선에서도 돌연변이가 나타나는 특징을 확인할 수 있었다.

하지만 저선량의 방사선 조사 이후, 자주달개비의 세포 내에서 반응을 보이는 유전자에 대한 정보와 이들 유전자 발현상의 변화를 분석한 연구는 이제까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 방사선에 민감한 자주달개비 T-4430 종간잡종 유전자원을 대상으로 하여 0, 50, 250, 500, 1000 mGy에 해당하는 저선량의 방사선을 조사한 후, RNA-seq을 통해 얻은 전사체 정보를 바탕으로 선량별로 발현차이를 보이는 유전자들을 우선 찾아내고, 발현기작과 방사선 조사에 따른 반응 기작을 알아보고자 실험을 수행하였다. 따라서 본 연구를 통해 얻어진 유전자 및 발현정보는 저선량의 감마선에 특이적으로 반응하여 조절되는지를 유전자 전사(transcription) 수준에서 검증하고, 최종적으로 자주달개비의 저선량 방사선 지표 유전자로서 방사선 피폭과 정량적 변화를 세포수준에서 모니터링할 수 있는지 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물체 재료 및 방사선 처리

본 연구에 이용한 자주달개비 T-4430 식물은 한국원자력연구원 정읍 첨단방사선연구소에서 분양 받은 자원으로 영양번식을 통해 개체를 증식시키면서 유지하였다. 유리온실에서 직경 15 cm의 화분에 3개월 이상 생육시킨 후 꽃대가 올라온 식물체 전체를 대상으로 방사선 조사 실험을 진행하였다. 조사 시기는 3월 19일로 방사선 처리는 한국원자력연구원 정읍 연구소에 있는 감마파이트론(gammaphytotron)을 사용하였고, 25°C에서 감마선( $^{60}\text{Co}$ )을 0, 50, 250, 500, 1000 mGy의 선량별로 4개의 화분에 조사하였다. 감마파이트론으로부터 7.44, 3.16, 7.44, 5.14 m의 거리를 두고, 50, 250 mGy의 경우 1시간, 500, 1000 mGy의 경우 10시간을 조사한 후, 충남대학교 농장 유리온실에서 관리하였다.

### 전사체 염기서열 분석 및 발현 유전자 탐색

방사선 조사 후 시간에 따른 수술털 색의 변화를 조사하여,

변화율이 가장 높았던 13일 째 자주달개비 화기조직으로부터 total RNA를 추출하였고, 전기영동 분석과 Spectrophotometer 분석을 통해 추출한 total RNA의 순도와 농도를 확인하였다(manuscript in preparation). 전사체 염기서열 분석은 Illumina Hi-seq 2000을 이용하여 약 230 K의 전사체로부터 총 287 mbp의 염기서열 정보를 확보하였다(manuscript in preparation).

정제된 데이터를 이용하여 자주달개비의 선량별 유전자 세트를 생성하기 위하여 *de novo* transcriptome assembly를 수행하였으며, 생성된 유전자 세트를 이용하여 각 샘플의 발현값을 측정하였다. 마지막으로 측정된 발현값을 이용하여 DEG (differentially expressed gene)를 추출하고, clustering 기법을 이용하여 각각의 선량에서 상향 조절(up-regulated genes) 혹은 하향 조절(down-regulated genes)된 유전자들의 정보를 확보하였다.

방사선 비처리구에 비하여 최소 2배 이상의 높은 발현차이를 보이는 유전자 중 각 선량별로 특이적으로 up-regulated 되는 유전자 4개를 최종 선별하여 후속 검증실험을 실시하였다. 이들 유전자들의 기능분석은 Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) 데이터베이스에 존재하는 약 40종의 식물 유전체 정보들과 비교하여 실시하였고, 추가로 NCBI의 Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)의 검색을 수행하였다.

또한 annotation data로부터 얻어진 염기서열을 바탕으로 단자엽 모델식물인 벼(*Oryza sativa*), 옥수수(*Zea mays*), 숲개밀(*Brachypodium distachyon*)과 쌍자엽 모델식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 대두(*Glycine max*), 토마토(*Solanum lycopersicum*), 유채(*Brassica napus*) 등 총 7개의 식물체의 유전자들을 가지고 각각 해당하는 유전자의 유연관계를 분석하였다. 유전자간 유연관계 분석은 MEGA version 6.0 프로그램(Kumar et al. 2001)을 이용하였다.

### DEG 분석 선별 유전자의 RT-PCR 검증

감마선 조사 13일 후, 방사선 처리를 한 자주달개비를 대상으로 화기조직을 채취하여, 액체질소로 동결시킨 후 마쇄하여 100 mg의 샘플을 total RNA를 추출하는데 사용하였다. Total RNA의 추출은 Geneall Hybrid-R RNA kit를 사용하였다. RT-PCR은 TaKaRa PCR Thermal Cycler (TaKaRa TP600, Japan)을 이용하여 TaKaRa RNA PCR kit (AMV) Version 3.0 kit로 cDNA 합성 및 증폭을 진행하였다. PCR을 위해 사용한 total RNA는 200 ng으로 정량하였고, primer는 각 유전자 4종의 염기서열에 대한 특이적인 primer를 제작하였다(Table 1). PCR반응은 42°C에서 1시간동안 반응시킨 후 99°C에서 5분간 reverse transcriptase를 inactivation 시켰다. 합성된 cDNA를 template으로 유전자 증폭을 진행하였다(Table 2). PCR 산물은 1.0% agarose gel에 Ecodye (Bioneer, Korea)를 사용하여 염

**Table 1** Oligonucleotide primers used in RT-PCR

Target	Primer sequences	Expected size (bp)	Tm (°C)
Tr_RT_302-forward	5'-ATGGATCGGTCGGCTCGCAA-3'	1998	62.5
Tr_RT_302-reverse	5'-CTAAAGCTCATCATGTGAAT-3'		52.3
Tr_RT_46356-forward	5'-ATGGCCACTGTTGTTAGAGC-3'	1116	58.4
Tr_RT_46356-reverse	5'-TTAGGAACCATAGTAGCAGT-3'		54.3
Tr_RT_79838-forward	5'-ATGAGCATATATGATAAGGT-3'	1008	50.2
Tr_RT_79838-reverse	5'-TCAAGAAATAATTATTTTGA-3'		44.1
Tr_RT_44950-forward	5'-ATGACCACCAAGTCTATTCT-3'	1086	54.3
Tr_RT_44950-reverse	5'-CTATGCCACCTAGCAAGAA-3'		58.4
Actin-forward	5'-ATGGTTGGTATGGGRCAAAAAG-3'	300	57.4
Actin-reverse	5'-GGGAGCAAGGCCWGTGATC-3'		61.7

**Table 2** RT-PCR conditions for low-dose radiation specific genes

Gene	Reaction condition		
	Denaturation	Amplification	Final extension
Tr_RT_302	95°C, 5 min	95°C, 30 sec 55°C, 30 sec 72°C, 120 sec (30 cycle)	72°C, 5 min
Tr_RT_46356	95°C, 5 min	95°C, 30 sec 55°C, 30 sec 72°C, 72 sec (30 cycle)	72°C, 5 min
Tr_RT_79838	95°C, 5 min	95°C, 30 sec 50°C, 30 sec 72°C, 60 sec (30 cycle)	72°C, 5 min
Tr_RT_44950	95°C, 5 min	95°C, 30 sec 55°C, 30 sec 72°C, 67 sec (30 cycle)	72°C, 5 min
Actin	95°C, 5 min	95°C, 30 sec 55°C, 30 sec 72°C, 30 sec (30 cycle)	72°C, 5 min

색한 후, band를 확인하였다.

**qRT-PCR 분석을 통한 유전자 발현 재검증**

qRT-PCR은 각 선량별 방사선을 조사한 화기조직에서 total RNA 250 ng을 TaKaRa PrimeScript 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하고, 1/100로 희석한 것으로 template을 사용하였다. 희석한 template 4 ul, 2X SYBR Green (Geneer, Korea) 10 ul, 10 uM gene-specific primer (Table 3)를 각 0.4 ul, DEPC 처리한 T.D.W. 0.2 ul를 혼합하여 Illumina Eco 기기를 이용하여 유전자의 발현 양상을 분석하였다. Threshold cycle(Ct) 값에 의한 발현량 분석은  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 으로 계산하였고,  $\Delta\Delta Ct$ 은 방사선 처리 식물체(Ct<sub>target gene</sub> - Ct

actin gene) - 방사선 비처리 식물체(Ct<sub>target gene</sub> - Ct<sub>actin gene</sub>)에 의해 계산하여 수치화 하였다(Livak and Schmittgen 2001).

**결과 및 고찰**

1000 mGy 이하의 저선량의 이온화 방사선에서 반응하는 자주달개비 T-4430 자연 잡종개체로부터 total RNA를 추출하여 EST 염기서열 정보를 분석한 결과 총 77,326개의 전사체 (전사체 평균 길이 약 850 bp)를 얻을 수 있었다(manuscript in preparation). 그 중 방사선 비조사 대조구와 비교하여 높은 발현 차이를 보이는 유전자 중 선량별로 특이적으로 발현이 증가된 유전자는 총 2,296개였고, 그 중 방사선 비처리구

**Table 3** Oligonucleotide primers used in qRT-PCR

Target	Primer sequences	Expected size (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
Tr_qRT_302-forward	5'-AGACAAGGGCACTGGTAAAT-3'	300	55.0
Tr_qRT_302-reverse	5'-CTTCAGCCTCCCTAACCATT-3'		
Tr_qRT_46356-forward	5'-GAAGAGTGGCAGCTATTTCG-3'	300	55.0
Tr_qRT_46356-reverse	5'-TCAGTTGACATTCGGACTCG-3'		
Tr_qRT_79838-forward	5'-GCCAGCAATGGAGAAAGAAC-3'	300	55.0
Tr_qRT_79838-reverse	5'-AGTGGTGATGGAGGCCATAG-3'		
Tr_qRT_44950-forward	5'-ATGACCACCAAGTCTATTCT-3'	300	55.0
Tr_qRT_44950-reverse	5'-GATGCCACCTAGCAAGAA-3'		
Actin-forward	5'-ATGGTTGGTATGGGRCAAAAAG-3'	300	55.0
Actin-reverse	5'-GGGAGCAAGGGCWGTGATC-3'		

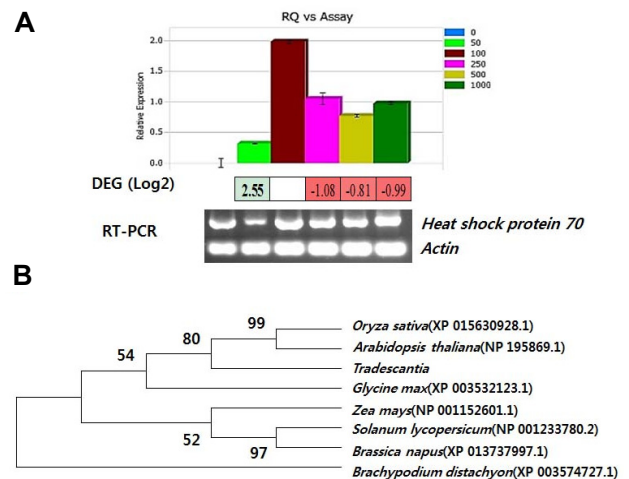
**Table 4** Selected genes with about 2-fold change in expression compared to that in plant without radiation

Assembled transcripts	Fold change at each dose (mGy) vs. control				TAIR description
	50	250	500	1000	
Tr 302	2.55	-1.08	-0.81	-0.99	Heat shock protein 70 (HSP 70)
Tr 46356	1.61	4.11	3.92	3.74	IQ-domain 6
Tr 79838	1.19	1.71	4.45	0.39	KAR-UP oxidoreductase 1
Tr 44950	-0.07	1.72	1.86	2.22	Zinc transporter 1 precursor

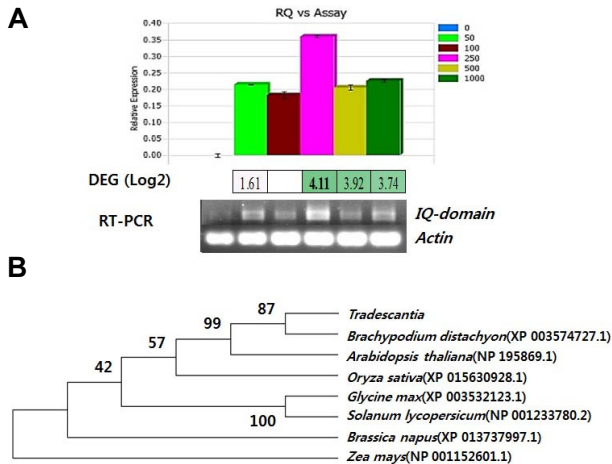
에 비해 2배 이상 발현 차이를 보이는 유전자는 각 선량 별로 116, 222, 246, 308개였다. 한편 방사선 비처리구에 비하여 최소 2배 이상의 높은 발현값을 가지는 유전자 중 각 선량에서 특이적으로 발현이 증가된 유전자 4개를 선별하였는데 (Table 4), 이들 유전자로는 Heat shock protein 70 family protein, IQ-domain 6, KAR-UP oxidoreductase, zinc transporter 1 precursor가 포함된다. 이들의 특징은 주로 세포가 스트레스를 받았을 때 세포 내 방어 및 신호전달 기작과 밀접한 관련이 되어 있는 것으로 보고되고 있다(Samali and Cotter 1996; Jäättelä et al. 1998; Ellis et al. 2004; Miaoying et al. 2011). 따라서 이러한 유전자의 발현양상과 방사선에 대하여 민감도가 검증된다면 낮은 선량의 방사선에 자주달개비 식물체가 노출되었을 경우에도 반응을 보여 방사선 지표유전자로서의 기능을 기대할 수 있을 것으로 판단되었다.

### Heat shock protein 70 유전자 발현특성

Heat shock protein (HSP)은 세포질뿐만 아니라 소포체, 미토콘드리아, 핵에 위치해 스트레스에 의해 손상된 단백질의 복구 및 단백질 응집을 방지하는 샤페론(chaperon) 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Vierling 1991; Boston et al. 1996). 또한 식물체에서 열, 저온, UV와 같은 비생물학적 스트레스에 반응할 뿐만 아니라(lindquist and Craig 1988; Vierling 1991; Boston et al. 1996), 생물학적 스트레스인 병원균 감염, 곤충에 의한 피해에 의해서도 반응(Boston et al. 1996; Bhattarai et al. 2007; Breiman 2014)한다고 밝혀져 있다.

**Fig. 1** Verification of *Tradescantia* heat shock protein 70 gene expression. (A) Expression patterns based on qRT-PCR, DEGs, and RT-PCR; (B) Phylogenetic tree of heat shock protein 70 gene

선량별 방사선 처리구와 비처리구에서 RNA를 추출하여 heat shock protein 70에 특이적인 primer를 디자인하여 유전자 발현 정도를 DEG, RT-PCR, qRT-PCR를 사용하여 비교 분석하였다(Fig. 1A). 분석 결과, DEG 결과와 RT-PCR, qRT-PCR 패턴이 상당히 유사하며, 저선량 스트레스 처리시 heat shock protein 70 유전자의 발현은 50 mGy에서 2.1배, 100 mGy에서 96.6배, 250 mGy에서 11.2배, 500 mGy에서 5.9배, 1000 mGy에서 9.5배로 방사선 스트레스 처리를 한 식물체가 전반적으로 높은 발현을 보이고 있다.



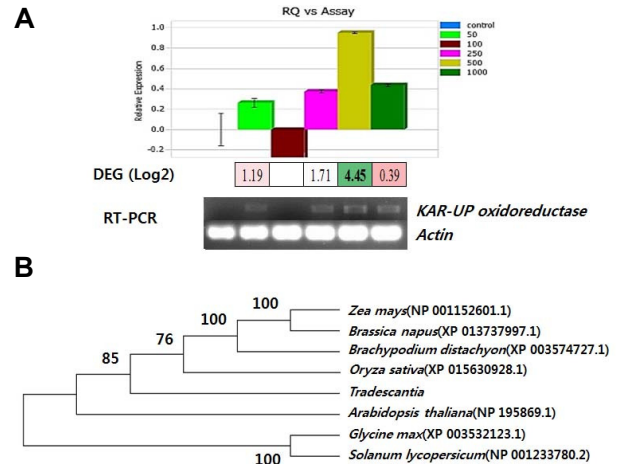
**Fig. 2** Verification of *Tradescantia* IQ-domain gene expression. (A) Expression patterns based on qRT-PCR, DEGs, and RT-PCR; (B) Phylogenetic tree of IQ-domain gene

특히 저선량인 100 mGy에서는 방사선 비처리구에 비하여 96.6배의 가장 높은 발현율을 보였던 결과로 비추어 볼 때 비생물학적 스트레스인 감마선 조사, 특히 저선량의 방사선 처리에도 heat shock protein 70이 선량 특이적으로 민감하게 반응함을 알 수 있었다. 실험에 사용한 유전자를 단자엽과 쌍자엽 모델식물 7종에 있는 heat shock protein 70 유전자와 비교한 결과, 자주달개비의 heat shock protein 70 유전자는 벼와 애기장대의 유전자와 가장 가까운 것을 알 수 있다 (Fig. 1B).

**IQ-domain 유전자 발현특성**

선발한 4개의 유전자 중 IQ-domain은 isoleucine-glutamine (IQ)이 들어있는 모티프로, IQxxxRGxxxR의 서열을 가지고 있으며, x에는 어떤 잔기라도 대체 결합이 가능한 구조이다 (Rhoads et al. 1997). IQ-domain은 신호전달에 관여하는 calmodulin과 결합하는 핵 단백질로 calmodulin은 Ca<sup>2+</sup>과 특이적으로 결합하는 단백질이다. 선량별 방사선 처리구와 비처리구에서 RNA를 추출하여 IQ-domain 유전자 발현 정도를 분석한 결과, RNA-seq을 통해 얻은 DEG 값과 RT-PCR, qRT-PCR 패턴이 유사하다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 2A).

저선량 스트레스 처리시 IQ-domain 유전자의 발현은 50 mGy에서 1.6배, 100 mGy에서 1.5배, 250 mGy에서 2.3배, 500 mGy에서 1.6배, 1000 mGy에서 1.7배로 방사선 스트레스 처리를 한 식물체가 전반적으로 높은 발현을 보이고 있었다. 이는 방사선을 처리한 경우 세포 내 신호전달 과정에 영향을 끼쳐 세포막의 Ca<sup>2+</sup> 이온 전달에 관여하는 IQ-domain에 영향을 주었을 것이라는 가능성을 시사해 주고 있다. 실험에 사용한 유전자를 단자엽과 쌍자엽 모델식물 7종에 있는 IQ-domain 유전자와 비교한 결과, 숲개밀과 애기장대의 유



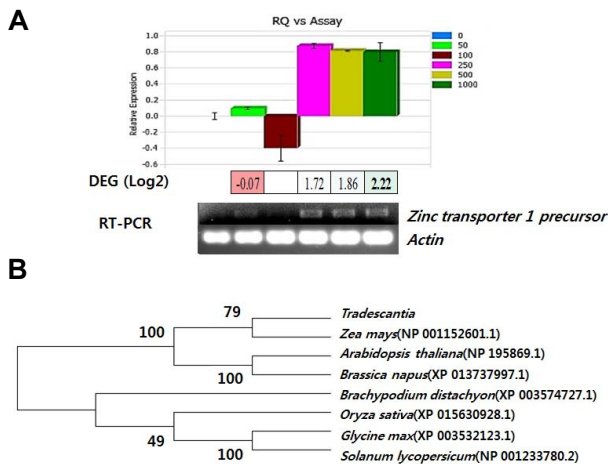
**Fig. 3** Verification of *Tradescantia* KAR-UP oxidoreductase gene expression. (A) Expression patterns based on qRT-PCR, DEGs, and RT-PCR; (B) Phylogenetic tree of KAR-UP oxidoreductase gene

전자와 유전적 유사도가 높은 것을 알 수 있다(Fig. 2B). 식물체에 열 스트레스가 가해지면 세포 세포질 안에 Ca<sup>2+</sup> 농도의 상승을 유도하게 되고, Ca<sup>2+</sup>과 calmodulin이 이러한 환경변화 조건에서 신호 전달 경로를 조절하는 역할을 하는 것과 유사한 반응기작이라고 할 수 있다(Gong et al. 1998; Liu et al. 2003; Wu et al. 2012). Ca<sup>2+</sup>는 또한 직접적인 상호작용을 통하여 heat shock factors (HSFs)의 DNA 결합 활성도에도 관여하고 있다(Mosser et al. 1990; Li et al. 2004).

**KAR-UP oxidoreductase 유전자 발현 특성**

선발한 4개의 유전자 중 KAR-UP oxidoreductase 중 KAR (karrikin)은 식물체를 연소할 때 발생하는 화합물이다(Keeley and Pizzorno 1986; van Staden et al. 2004; Nelson et al. 2012). 셀룰로오스와 설탕과 같은 탄수화물의 열분해에 의해서 발생하고 (Flematti et al. 2011), 종자의 발아와 묘목의 성장에 연관되어 있다고 알려져 있다(Cook CE et al. 1966; Humphrey and Beale 2006; Stevens et al. 2007; Chiwocha et al. 2009; Light et al. 2009). 각각의 선량에서 방사선 비처리구와 KAR-UP oxidoreductase 유전자 발현 정도를 비교한 결과, RNA-seq을 통해 얻은 전사체의 DEG 값과 RT-PCR, qRT-PCR 패턴이 유사하다는 사실을 검증할 수 있었다(Fig. 3A).

저선량 방사선 스트레스에서 이 유전자의 발현은 50 mGy에서 1.8배, 100 mGy에서 0.2배, 250 mGy에서 2.4배, 500 mGy에서 8.9배, 1000 mGy에서 2.7배로, 100 mGy의 방사선 스트레스 처리를 한 식물체를 제외한 나머지는 전반적으로 높은 발현을 보이고 있다. Nelson et al. (2010)은 karrikin 연관 유전자가 *A. thaliana*에서 종자의 발아를 유도하는데, 특히 UV-B 처리시 KAR-UP oxidoreductase의 발현 정도가 약 7배 정도 높게 발현한 것을 확인하였다. 따라서 이번 저선량 방



**Fig. 4** Verification of *Tradescantia* zinc transporter 1 precursor gene expression. (A) Expression patterns based on qRT-PCR, DEGs, and RT-PCR; (B) Phylogenetic tree of zinc transporter 1 precursor gene

사선 처리의 경우에도 UV-B를 처리한 것과 비슷하게 강한 에너지 자극을 주었기 때문에 KAR-UP oxidoreductase가 발현을 높게 했을 것이라는 가능성을 보여준다. 실험에 사용한 유전자를 단자엽과 쌍자엽 모델식물 7종에 있는 KAR-UP oxidoreductase 유전자와 비교한 결과, 대두, 유채, 숲개밀, 벼와 유사성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). KAR-UP oxidoreductase의 경우 그동안 애기장대에서 발아와 관련된 실험이 진행되어 왔으나, 이번 실험을 통하여 이 유전자가 식물체에 저선량 방사선을 처리하였을 때, 세포 내 방어 기작에도 관련될 가능성이 있을 것으로 보여진다.

### Zinc transporter precursor 유전자 발현

선발한 4개의 유전자 중 zinc transporter precursor 는 소포체에서 아연 이온의 수송을 담당하는 유전자로, 아연은 생물체에서 단백질들의 중요한 보조인자 역할을 한다. 또한 아연이 결핍될 경우 생물체의 다양한 범위에서 unfolded protein reponse (UPR)을 유도하게 된다(Ellis et al. 2004). 선량별 방사선 처리구와 비처리구에서 zinc transporter precursor 유전자 발현 정도를 DEG, RT-PCR, qRT-PCR를 사용하여 분석한 결과, DEG 값과 RT-PCR, qRT-PCR 패턴이 상당히 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 4A).

저선량 스트레스 처리시 유전자의 발현은 50 mGy에서 1.3배, 100 mGy에서 0.4배, 250 mGy에서 7.5배, 500 mGy에서 6.5배, 1000 mGy에서 6.3배로 방사선 스트레스 처리를 한 식물체 중에서도 250 mGy 이상의 선량에서 전반적으로 높은 발현을 보이고 있다. 식물체에 방사선을 조사하게 되면, 식물체 내부에서는 단백질이 합성되는 과정에서 단백질의 구조적 변화(unfolding 혹은 misfolding)가 일어나게 되고, 작은 크기의 단백질들의 축적이 소포체와 같이 다른 세포 소기

관에서 방어기능을 담당하게 됨을 보고하고 있다(Miaoqing et al. 2011). Miaoqing et al. (2011)은 애기장대에 염 스트레스가 주어졌을 경우 zinc transporter인 ZTP29의 발현이 증가되면서 소포체 내의 아연 이온을 감소시키고, 결과적으로 단백질이 해체되면서 삼투조절 작용을 하는 방어기작을 유도하여 염 스트레스에 저항하는 것을 확인하였다. 따라서 자주달개비의 zinc transporter 유전자도 소포체 내의 아연 이온 농도의 변화를 가져와 방사선 스트레스로부터 식물체를 보호 또는 방어하는 기작을 보일 것으로 여겨진다. 단자엽과 쌍자엽 대표식물 7종에 있는 zinc transporter 유전자와 유사성을 확인해본 결과, 자주달개비는 옥수수, 애기장대, 유채와 유사성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4 B).

식물체에 저선량 방사선을 조사했을 때, 세포 수준에서 특정 유전자의 발현 촉진 등의 다양한 생리학적 변화를 보인다(Wi et al. 2007). 이미 보고된 생물대사적 반응으로는 항산화 효소의 증가 (Kim et al. 2005; Rakwal et al. 2009; Vandenhove et al. 2010), hormesis 현상(Mitchel 2006), UV-B 조사에 대한 상호 적응, 높은 강도의 빛과 건조 스트레스에서 반응을 보이는 유전자들의 발현 증가 (Kim et al. 2005; Moussa 2011), 수확량, 식물의 활력과 성장 유도(Wiendl et al. 1995; Mashev et al. 1995; Kim et al. 2005; Singh and Datta 2009), 과일 숙성(Assi et al. 1997), 배아의 강화(Arabi et al. 2005) 및 trichome 형성(Nagata et al. 1999)에 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있다.

이 실험에서 검증한 유전자인 heat shock protein, IQ-domain, zinc transporter의 경우 세포 내 단백질의 구조적 변성에 관여하여, 갈슘 또는 아연 이온의 결합과 세포 내 신호전달 기작에 영향을 주어 식물체가 방사선 스트레스 환경에 놓였을 때 생육 또는 대사의 변화를 유도할 것으로 해석된다. 따라서 방사선 선량 특이적으로 민감하게 반응하는 이들 유전자들의 발현 차이를 실시간으로 모니터링 하게 된다면 방사선 피폭을 사전에 감지하거나, 사고 지역에서 환경복원 시점을 예측할 수 있는 수단으로도 활용이 가능할 것으로 여겨진다.

### 적 요

자주달개비는 닭의장풀과의 다년생 식물로, 자주달개비의 수술털은 이온화 방사선에 노출될 경우 분홍색 또는 흰색으로 체세포 돌연변이가 쉽게 일어나 방사선 지표식물로 생물학적인 반응 연구 등에 효과적으로 이용되어 왔다. 본 연구에서는, 자주달개비 BNL 4430을 대상으로 50, 250, 500, 1000 mGy에 해당하는 감마선( $^{60}\text{Co}$ )을 조사한 후 13일차에 있는 샘플을 대상으로 만개한 꽃을 채취하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 바탕으로 Illumina Hi-seq를 이용하여 각 선량에 해당하는 전사체 및 특이발현유전자(Differentially

expressed genes, DEGs)를 분석하였다. 전사체는 총 77,326개로, 방사선 비처리구에 비해 2배 이상 상향 발현된 유전자는 50 mGy에서 116개, 250 mGy에서 222개, 500 mGy에서 246개, 1000 mGy에서 308개로 밝혀졌으며, 이 중 각 선량별 특이적으로 반응하는 유전자인 heat shock protein 70 family protein, IQ-domain 6, KAR-UP oxidoreductase, zinc transporter 1 precursor를 선별하여 13일차의 RNA 샘플을 대상으로 RT-PCR 및 qRT-PCR을 이용하여 저선량 방사선에 반응하는 유전자를 검정하였다. 검정 결과 DEGs data와 매우 유사한 양상을 보였으며, 선량별로 2.3배에서 최대 96.59배의 높은 발현을 확인하였다. 선별한 유전자는 대부분 세포 내 방어기작과 관련이 되어있는 유전자였으며, 이중 KAR-UP oxidoreductase의 경우 *A. thaliana*에서 발아와 관련이 있는 유전자로 알려져 있었는데, 이번 연구를 통해 저선량 방사선에 의해서 반응하는 유전자로도 확인이 되었다. 저선량 방사선에 노출된 자주달개비의 유전자 정보를 바탕으로, 저선량의 방사선이 식물체에 미치는 영향과 발현 기작을 연구하는 데에 분자적 수준의 정보를 제공할 수 있게 되었으며, 저선량 방사선의 생물학적 안정성 확보를 위한 감시 보조수단으로 자주달개비가 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 한국연구재단의 방사선융합기술개발사업(NRF-2013M2A2A6043621)과 농림수산식품기술기획평가원(IPET)의 생명산업기술개발사업(No. 312033-5)의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

- Assi NE, Huber DJ, Brecht JK (1997) Irradiation-induced changes in tomato fruit and pericarp firmness, electrolyte efflux, and cell wall enzyme activity as influenced by ripening stage. *J Am Soc Hortic Sci* 122:100-106
- Arabi MIE, Al-Safadi B, Jawhar M, Mir-Ali N (2005) Enhancement of embryogenesis and plant regeneration from barley anther culture by low doses of gamma irradiation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:762-764
- Bhattarai KK, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar SP, Kaloshian I (2007) The *MI-1*-mediated pest resistance requires *Hsp90* and *Sgt1*. *Plant Physiol* 144:312-323
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E (1996) Molecular chaperone *Hsp104*—a molecular machine for protein disaggregation. *J Struct Biol* 156:139-148
- Breiman A (2014) Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Curr Protein Pept Sci* 15:232-244
- Cebulska - Wasilewska A (1992) *Tradescantia* stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later. *Mut Res* 270:23-29
- Chiwocha DS, et al. (2009) Karrikins: A new family of plant growth regulators in smoke. *Plant Sci* 177:252-256
- Christianson ML (1975) Mitotic crossing-over as an important mechanism of floral sectoring in *Tradescantia*. *Mutat Res* 28:389-395
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH (1966) Germination of witchweed(*Striga lutea* Lour): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154:1189-1190
- Ellis CD, Wang F, MacDiarmid CW, Clark S, Lyons T, Eide DJ (2004) Zinc and the *Msc2* zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol* 166:325-335
- Flematti GR, Scaffidi A, Dixon KW, Smith SM, Ghisalberti EL (2011) Production of the seed germination stimulant karrikinolide from combustion of simple carbohydrates. *J Agric Food Chem* 59:1195-1198
- Gong M, van der Luit AH, Kinght MR, Trewavas AJ (1998) Heat-shock-induced changes in intracellular  $Ca^{2+}$  level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol* 116:429-437
- Humphrey AJ, Beale MH (2006) Strigol: Biogenesis and physiological activity. *Phytochemistry* 67:636-640
- Ichikawa S (1971) Somatic mutation rate at low levels of chronic gamma-ray exposures in *Tradescantia* stamen hairs. *Jpn J Genet* 46:371-376
- Ichikawa S (1972) Somatic mutation rate in *Tradescantia* stamen hairs at low radiation levels: finding of low doubling doses of mutations. *Jpn J Genet* 47:411-415
- Ichikawa S (1981) In situ monitoring with *Tradescantia* around Nuclear power plants. *Environmental Health Perspectives* 37:145-164
- Ichikawa S, Ishii C (1991) Validity of simplified scoring methods of somatic mutations in *Tradescantia* Stamen hairs. *Envir exp Bot* 31:247-252
- International Commission on Radiological Protection (2006) Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk. Publication 99. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands p 13
- Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M (1998) Hsp 70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO Journal* 17(21):6124-6134
- Keeley SC, Pizzorno M (1986) Charred wood stimulated germination of two fire-following herbs of the California chaparral and the role of hemicellulose. *Am J Bot* 73:1289-1297
- Kim JH, Chung BY, Kim JS, Wi SG (2005) Effects of in planta gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *J Plant Biol* 48:47-56
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244-1245
- Kwon SH, Lee YL, Chung KH, Oh JH (1981) Mutation frequency of *Tradescantia* (BNL clone 4430) stamen hairs exposed to low dose of gamma ray in the KAERI  $\gamma$ -field. *J Kor Nuc Soc* 13:162-167

- Light ME, Daws MI, Van Staden J (2009) Smoke-derived butenolide: Towards understanding its biological effects. *S Afr J bot* 75:1-7
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677
- Liu HT, Li B, Shang ZL, Li XZ, Mu RL, Sun DY. et al (2003) Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. *Plant Physiol* 132:1186-1195
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25:402-408
- Mashev N, Vassilev G, Ivanov K (1995) A study of N-allyl N-2pyridylthiourea and gamma radiation treatment on growth and quality of peas and wheat. *Bulg J Plant Physiol* 21:56-63
- Mitchel RE (2006) Low doses of radiation are protective *in vitro* and *in vivo*: evolutionary origins. *Dose Response* 4:75-90
- Moussa HR (2011) Low dose of gamma irradiation enhanced drought tolerance in soybean. *Bulg J Agric Sci* 17:63-72
- Nagata T, Todoriki S, Hayashi T, Shibata Y, Mori M, Kanegae H, et al (1999) Gamma-radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120:113-120
- National Research Council (2006) BEIR VII: Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation. The National Academies Press. Washington D.C. p 2
- Nauman CH, Sparrow AH, Schairer LA (1976) Comparative effects of ionizing radiation and two gaseous chemical mutagenes on somatic mutation induction in one mutable and two non-mutable clones of *Tradescantia*. *Mut Res* 38:53-70
- Nelson DC, Flematti GR, Riseborough J-A, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM (2010) Karrikins enhance light response during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7095-7100
- Nelson DC, Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM (2012) Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annu Rev Plant Biol* 63:107-130
- Rakwal R, Agrawal GK, Shibato J, Imanaka T, Fukutani S, Tamogami S, et al (2009) Ultra low-dose radiation: stress responses and impacts using rice as a grass model. *Int J Mol Sci* 10:1215-1225
- Rhoads AR, Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* 11:331-340
- Samali A, Cotter TG (1996) Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Experimental Cell Research* 223(1):163-170
- Schairer LA, Van't Hof J, Hayes CG, Burton RM, de serres FJ (1978) Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenicity activity with the *Tradescantia* stamen hair system. *Environm Health Perspect* 27:51-60
- Singh B, Datta PS (2010) Gamma irradiation to improve plant vigour, grain development, and yield attributes of wheat. *Radiat Phys Chem* 79:139-143
- Sparrow AH, Underbrink AG, Rossi HH (1972) Mutations induced in *Tradescantia* by small dose of X-rays and neutrons : analysis of dose-response curves. *Science* 176:916
- Stevens JC, Merritt DJ, Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW (2007) Seed germination of agricultural weeds is promoted by the butenolide 3-methyl-2H-furo[2,3-c]pyran-2-one under laboratory and field conditions. *Plnat Soil* 298:113-124
- Van Staden J, Jager AK, Light ME, Burger BV (2004) Isolation of the major germination cue from plant-derived smoke. *S Afr J Bot* 70:654-659
- Vandenhove H, Vanhoudt N, Cuypers A, van Hees M, Wannijn J, Horemans N (2010) Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiol Biochem* 48:778-786
- Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 42:579-620
- Wang M, Xu Q, Yuan M (2011) Zinc homeostasis is involved in unfolded protein response under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* 6(1):77-79
- Wi SG, Chung BY, Kim JS, Kim JH, Baek MH, Lee JW, et al (2007) Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron* 38:553-564
- Wiendl FM, Wiendl FW, Wiendl JA, Vedovatto A, Arthur V (1995) Increase of onion yield through low dose of gamma irradiation of its seeds. *Radiat Phys Chem* 46:793-795
- Wu HC, Luo DL, Vignols F, Jinn TL (2012) Heat shock-induced biphasic  $Ca^{2+}$  signature and *OsCaMI-1* nuclear localization mediate downstream signaling in acquisition of thermotolerance in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Cell Environ* 35:1543-1557