

Antisense Heat Shock Gene 도입에 따른 식물세포의 변화

(Altered Phenotypes of The Plant Cell by Introduction
of an Antisense Heat Shock Gene)

황 철 호
단국대학교 농학과

I. 서 론

모든 생물체는 끊임없이 환경에 의해 영향을 받는다. 여러 환경요인들 중 온도는 생물체의 성장과 생존 그자체 까지 결정하는 주요인으로 작용한다. 특별히 식물은 동물과는 다르게 스스로의 온도를 조절하는 기작이 덜 발달되었고, 위치의 변경을 통해 극한온도조건을 회피하는 기능 또한 결여되어 주변온도에 의해서 심하게 영향을 받는다. 그러나 식물을 포함한 모든 생물체들은 고온에 대하여 적응할 수 있는 능력을 획득하였다. 이러한 능력은 새로운 종류의 mRNA와 protein이 고온하에서 만들어지는 Heat Shock(HS) response와 밀접하게 연관되어져 있다(Lin *et al.*, 1984; Lindquist, 1986). HS Response에 대한 분자생물학적인 연구는 Ritossa(1962)에 의해서 *Drosophila hydei* 에벌레의 염색체에서 puffing이 고온처리후 발생하는 것을 발견한후로 시작되어, Tissieres등(1974)에 의해 처음으로 Heat Shock Protein(HSP)이 보고 되었다. 후에 E. coli에서 사람에 이르기까지 고온(정상 생육 온도보다 10° C 정도 높은 경우)에 반응하여서 일군의 단백질(HSP)이 생성됨이 알려졌다(Schlesinger *et al.*, 1982). 이러한 HS 반응은 거의 모든 생물체에서 발견되고, 그 기작이 상호 유사함이 밝혀졌다.

1. HS gene 발현의 조절

HS조건하에서 모든생물체는 기존의 많은 유전자들의 정상적인 발현을 멈추고 새

로운 일군의 유전자만을 발현시키는 상태로 급격히 전이된다. 이때 생성되어 축적되는 HSP은 해당 HS gene을 transcription수준에서 조절하는 것으로 알려져 있다. 상세히는 HS gene 의 5'-upstream sequence에 위치하고 있는 HS element(진핵생물의 경우 세개 또는 그이상의 nGAAn 의 inverted 반복으로 구성; Perisic *et al.*, 1989)에 HS Transcription Factor(HSTF)가 binding 하여서 RNA polymerase가 HS gene을 선택적으로 전사한다. 이처럼 HS gene의 발현을 유발시키는 HSTF는 정상온도(nonHS)에서는 비활성 상태로 존재하다가 온도상승시 활성인 형태로 변환된다. 이러한 활성화에는 HSTF를 phosphorylation하여 conformation을 변경시켜 감추어 있던 activator domain을 노출시키는 것으로 알려졌다. 그러나 무엇에 의해서 최초로 온도 변화가 감지되어 위에서 설명한 과정을 통해 HSP을 만드는지 아직도 알아보는 단계에 있다. 최근들어서 HSP중의 하나인 HSP70이 HS response 과정의 초기에 온도를 감지하는 thermosensor로 쓰여지는 것으로 생각되고 있다(Craig and Gross, 1991). E. coli에서 HSP70에 해당하는 DnaK는 E. coli의 HSTF인 σ^{32} 와 결합하고 있다가 HS조건하에서 생성되는 변성단백질과의 결합을 위해 떨어져 나오면서 σ^{32} 를 다른 HS gene을 발현시키는데 쓰이도록 한다. 이러한 모델의 경우 정상 온도조건에서 DnaK는 HS gene 발현에 negative regulator로 작용하는 것으로 여겨진다.

또한 HS gene은 translation 수준에서도 조절되는 것으로 알려져있다. 일반적으로 HS조건하의 초파리에서 HS mRNA들이 선택적으로 translation 되며, 이는 HS으로 변화된 translation 기구와 HS mRNA의 untranslated leader region과의 선택적 상호접촉에의해서 이루어진다(Storti *et al.*, 1980; McGarry and Lindquist, 1986). 특별히 Zimmerman(1989)등은 당근의 체세포 발생중 globular 단계에서 HSP의 발현이 주로 translation수준에서 조절됨을 밝혔다.

이상과 같이 외부 환경의 온도를 감지하여 분자수준에서의 급격한 변화를 보이는 특성으로 인해, HS gene에 대한 연구를 통해 signal transduction 과 유전자 발현기작에 대해 많은 이해가 이루어 졌다. 이외에도 HS에 대한 반응으로 생물체에 의해서 다량으로 만들어지는 여러 HSP의 기능에 대한 연구가 있어 왔다.

2. HSP의 기능

HSP의 존재가 밝혀진 이래로 HSP의 기능에 대한 이해를 위해 다양한 연구가 시

도되었다. HSP의 많은 종류가 만들어진 후에는 세포내의 특정 위치로 이동하여 HS 기간중 특정기능을 담당하는 경우가 밝혀졌다. 예로, 가장 분 자량이 큰 HSP110의 경우 핵안의 인의 구성요소가 되어 HS 기간중 ribosome 생산을 안정되게 보장하는 것으로 여겨진다(Nover *et al.*, 1986). 또한 식물에 있어서 Low Molecular Weight HSP(LMW HSP; 15-30 KDa)들이 엽록체(Chou *et al.*, 1989), mitochondria, nucleus, ribosome(Lin *et al.*, 1984)으로 이동하는 것으로 보고되었다. 이들 HSP들은 이동되어진 세포내의 소기관 또는 특정위치에서 각 구조의 안정성을 제고시키는 것으로 예측되어진다. 포유류의 HSP90는 steroid hormone receptor에 결합하여 해당 hormone에 의한 특정 유전자 발현을 조절하는데 기여한다. 효모의 HSP70의 경우는 일부 단백질이 translation 되어진 후에 mitochondria나 endoplasmic reticulum으로 들어가는 과정을 돕는 unfoldase로 작용한다. 이러한 HSP 개개의 특정한 기능 이외에도 HSP이 thermotolerance와 밀접한 연관이 있는 것으로 이해되고 있다.

생물체나 세포단위로 온화한 정도의 HS를 처리 하였을때 일시적으로 고온에 대한 내성이 획득 되어지는 현상("acquired thermotolerance")은 Yarwood(1961)에 의해 식물에서 처음으로 보고되었다. HSP의 생성 또는 소멸되는 과정과 thermotolerance의 그것들과 시간적으로 일치되는 점을 들어 HSP이 acquired thermotolerance에 직접적 관여하는 것으로 추측되어 왔다. 또한 초파리, 성게, 두꺼비가 초기 배발생과정에서 HSP을 만들지 못하는 사실과 이시기에 극도로 열에 약하다는 관찰은 HSP과 thermotolerance의 밀접한 연관을 보여주는 증거이기도 하다(Graziosi *et al.*, 1980; Heikkila *et al.*, 1985; Roccheri *et al.*, 1981). 이외에도 yeast, *Dictyostelium*, chinese hamster ovary cell에서 단백질 합성을 저해했을때 동시에 thermotolerance도 얻어질 수 없었다(Lindquist, 1981; Loomis and Wheeler, 1980; Henle and Leeper, 1982). 또한 개개의 HSP의 생성을 방해하였을때 HSP70(rat cell; Riabowol *et al.*, 1988; Lio *et al.*, 1991)와 HSP104(yeast; Sanchez and Lindquist, 1990)의 경우 thermotolerance의 급격한 감소를 야기 하였다. 그러나 yeast의 유일한 LMW HSP인 HSP26를 antisense gene을 이용하여 발현을 저해 하였을때 유의성 있는 변화를 보지 못하였다.

본고에서는 다른 생물체에 비해서 상대적으로 많이 알려지지 않은 식물에서의 HSP의 기능에 대해서 알아보려한다. 특별히 식물에서만 특이적으로 많이 만들어지고, 그 종류에 있어서도 다양한 LMW HSP에 대해서 그간의 연구 결과를 토대로 논의 하려 한다.

II. 본 론

1. 조직배양된 당근의 세포에서의 HS response

(1) 온도증가에 따른 HS gene의 발현

배양된 당근세포는 다른 식물 또는 식물세포와 마찬가지로(Mansfield and Key, 1987) HS에 반응하여 일군의 새로운 단백질 (HSP으로 정의)을 만들고, 정상조건에서 만들던 단백질의 생산을 중단한다(Hwang and Zimmerman, 1989). 당근세포에 의해서 HSP이 가장 많이 생성되는 최적의 HS(실험을 위한 조건으로)온도는 Figure 1에서 보여지는 것처럼 38° C이다. 이는 soybean이나 tomato에서 보여준 것과 유사하다(Key *et al.*, 1983b; Scharf and Nover, 1982). HS message의 축적도 역시 38° C에서 가장 많음을 보여준다(Figure 2). 23° C에서도 HSP70의 mRNA가 축적됨을 볼수 있다. 이는 많은 다른 생물에서 HSP70가 정상온도 조건에서 일정한 기능을 하고 있음을 고려할때 이해 가능하다. 그러나 HSP17도 상대적으로 거의 적은 수준이지만 23° C에 상응하는 message가 축적됨을 보여준다. Nuclei run on assay를 통해서도 위와 비슷한 결과가 얻어졌다(Zimmerman *et al.*, 1989).

(2) LMW HSP간의 유사성

당근에서 발견되는 HSP의 종류들은 Figure 3에 잘 나타나 있다. 거의 모든 생물에서 발견되는 High Molecular Weight HSP(HMW HSP; 70KDa, 84KDa, 92KDa)과 식물세포의 특유의 복잡한 양상의 LMW HSP(16 - 22KDa)이 약 16개정도 발견되어진다. 다른 식물들에서 만들어지는 LMW HSP과 비교할때(밀의 12개 에서 콩의 27개의 LMW HSP; Mansfield and Key, 1987), 당근의 세포는 전형적인 식물의 HSP의 양상을 나타내고 있다. 이처럼 다양한 LMW HSP은 mutigene family에 의해서 만들어진다 (Darwish *et al.*, 1991). 이들 LMW HS gene들은 상호 높은 nucleotide homology를 보여준다. Figure 4는 당근의 LMW HS gene중의 하나인 DChsp17.5를 사용하여 HS poly(A)RNA로부터 높은 stringency조건(65% formamide, 50° C)에서 hybrid-selection한후 *in vitro* translation을 통해 만들어진 단백질을 보여준다. 그결과에 따르면 다섯개의 HS gene이 DNA sequence상에서 높은 homology를 보여준다. Sequencing data에 따르면 coding sequence만을 비교하였을 때 90% 이상의

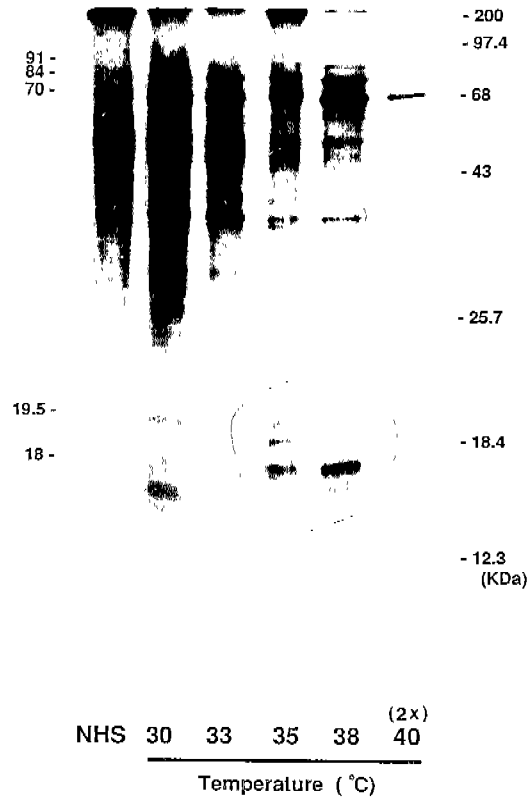


Fig. 1. Synthesis of heat shock proteins in carrot cells as a function of increasing temperature. Carrot callus cells incubated in the presence of 50 μ Ci of 32 S-methionin for the last two hours of a three hour incubation at the respective temperature. Total proteins were extracted and equivalent amounts (100 μ g) of each protein sample were seperated in 15%polyacrylamide gel. 2X amount of protein was loaded in the 40°C lane since the sample showed a low incorporation of the lable. Proteins were visualized by flouorography after fixation and treatment with Fluorohance(Research Products International Corp.). Molwcular Weight of standard proteins are indicated on the right and the major heat shock proteins in carrot are marked on the left.

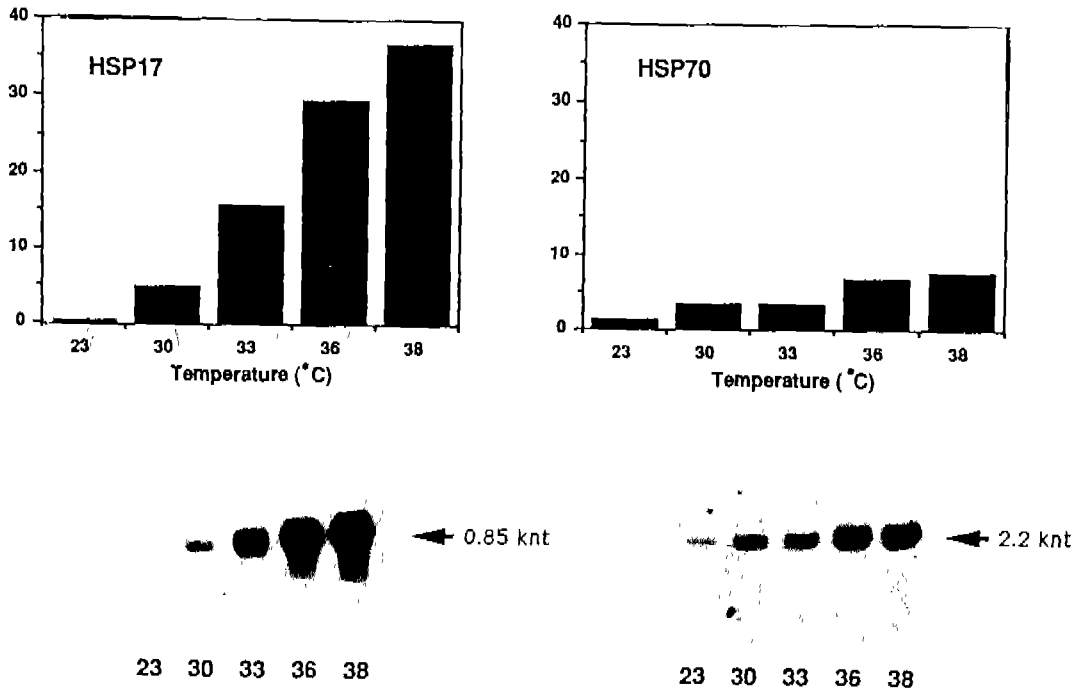


Fig. 2. Accumulation of HSP17 and HSP70 RNAs in carrot callus cells at increasing temperatures. Poly(A)⁺ RNAs were isolated from carrot callus cells incubated at increasing temperatures for 3 hours. 12 ug of poly(A)⁺ RNAs per sample was separated in a 1.2% agarose/formaldehyde gel and the blots were hybridized with radioactively labeled DNAs from the plasmids, pXB22 or pMON9508 containing a DChsp17.7 genomic gene and a maize HSP70 cDNA respectively. The level of the accumulated transcripts was measured by densitometry (Model 620, BioRad).

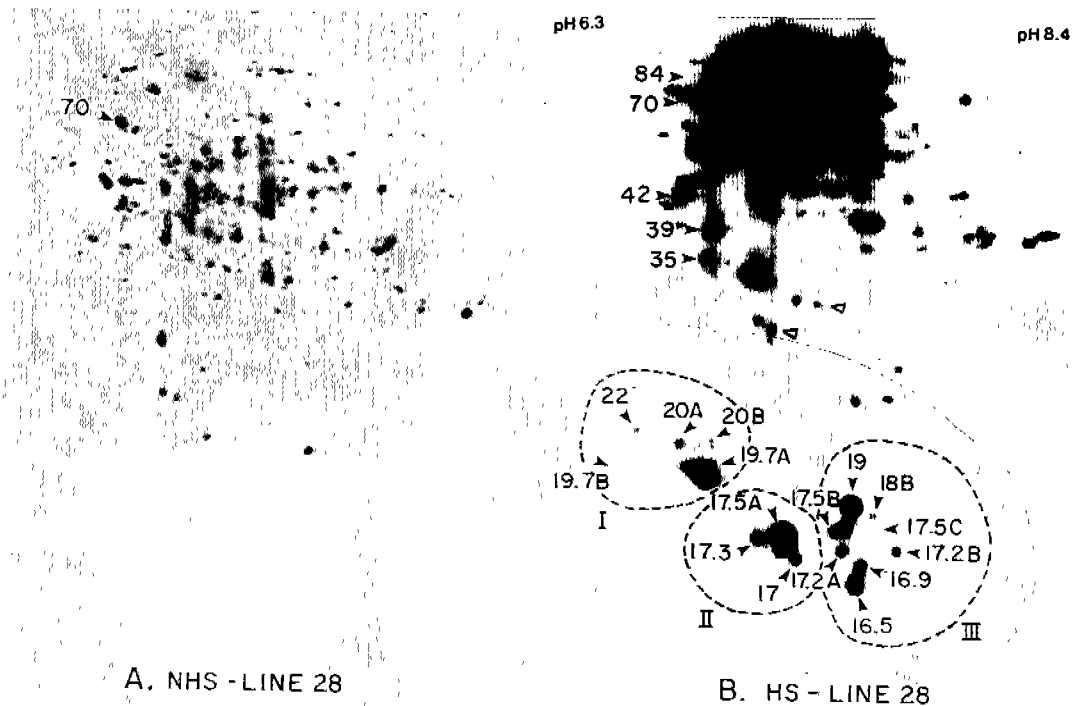


Fig. 3. Two-dimensional analysis of the proteins synthesized in callus cells under HS and non HS condition. The proteins labeled with ^{35}S -methionine in callus cells for 3 hours during HS or non HS were resolved through 2-D IEF/SDS-PAGE. Panel A shows the nonHS proteins and panel B shows the HSP. Equivalent cpms of TCA-precipitable proteins (6.2×10^6 cpm) was analyzed for each sample.

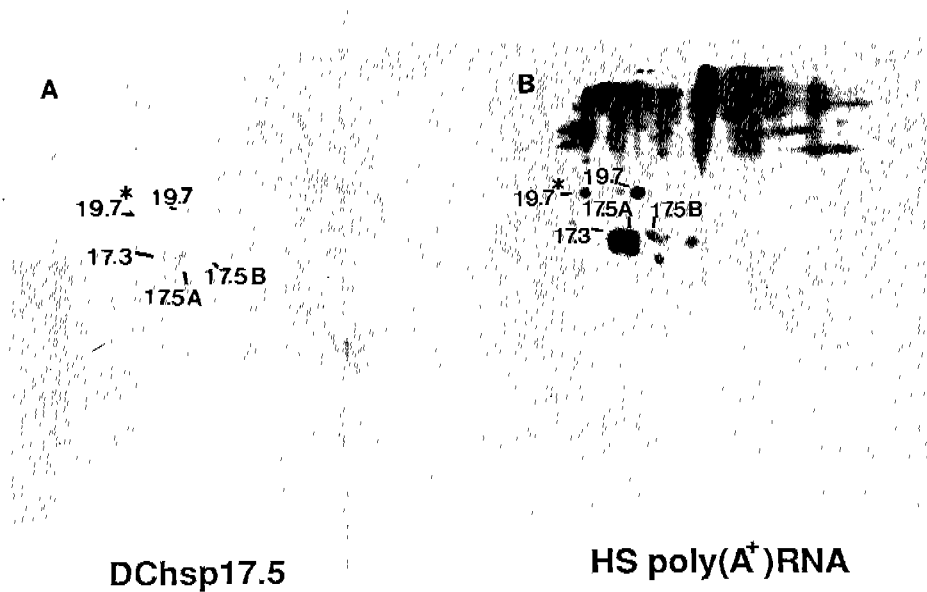


Fig. 4. DChsp17 hybrid selects a family of HS mRNAs. 5 ug of a gel-purified 0.5 Kbp Xbal fragment of the DChsp17 clone was used to select homologous HS mRNAs from HS poly(A)⁺RNAs were translated in vitro in the presence of ³⁵S-methionine using a rabbit reticulocyte lysate. The products from the in vitro translation were separated through 2-dimensional IEF/SDS-PAGE. Panel A shows the translation products of the hybrid-selected mRNAs with the DChsp17 clone and panel B shows the translation product of total poly(A)⁺RNAs isolated from heat shocked callus cells of carrot. The proteins were visualized by flurography.

homology를 나타냈다(Darwish *et al.*, 1991). 이외에도 LMW HSP은 antigenicity측면에서 서로 유사함을 나타낸다. Figure 5는 western blot analysis로 tomato HSP17을 사용하여 만들어진 polyclonal antiserum에 당근의 10개의 LMW HSP이 반응하는 것을 보여준다. 이는 같은 종내의 LMW HSP간 뿐만 아니라, 종간의 LMW HSP사이에서도 단백질수준에서 유사성 보여준다.

(3) HSP의 세포 내에서의 안정성

38° C에서 1.5시간이 지난후에 모든종류의 HSP이 만들어지기 시작 하였고, 3시간 경과후 가장 많은 HSP이 만들어졌다(Figure 6). 12시간 이상 HS을 처리 하였을때 LMW HSP은 거의 만들어지지 않았으나 HMW HSP은 꾸준히 만들어졌다. 이는 초파리 등에서 HSP70가 autoregulation되는 기작과 유사하게, 식물에서 LMW HSP이 autoregulation된다는 가능성과 조절인자로서의 가능성을 암시한다. 한번 만들어진 HSP은 HS 조건하에서나, 정상온도 조건 하에서나 최소 8시간까지 안정하다(Figure 7). Soybean HSP의 경우는 HS후 최소 21 시간 까지도 HS 또는 nonHS 조건에서 HSP이 안정됨을 보고 하였다(Key *et al.*, 1985).

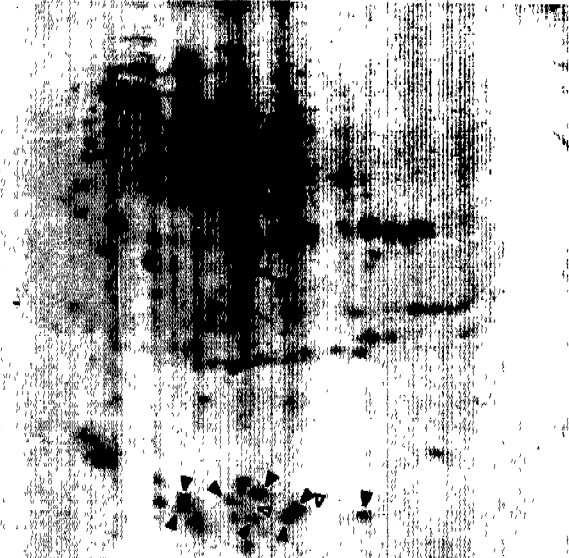
(4) Cell line에 따른 HSP의 다양성

HSP의 만들어지는 양상은 cell line에 따라 양적, 질적변이를 보여준다(Hwang and Zimmerman, 1989). 이러한 변이는 오랜 배양기간내에 일어나는 somaclonal variation으로 야기된 것으로 이해된다. Figure 8에서 보여지는 cell line 간의 HSP 양상의 차이는 반복적인 실험을 통해 일시적인 것이 아님이 확인 되었고, protease inhibitor를 사용하여서도 역시 같은 결과를 얻을수 있었다. GB-4와 OB-4는 temperature-sensitive(ts) variant로 특정 발생시기에 33° C로 처리하였을 때에 더이상 정상적인 발생을 수행하지 못하는 특성을 보여주는 line이다(Schnall *et al.*, 1988). 이들 variant의 경우 많은 LMW HSP의 생성이 감소 되었는데, ts-표현형과 연결지어 LMW HSP의 thermotolerance 에서의 역할을 추정할수 있겠다.

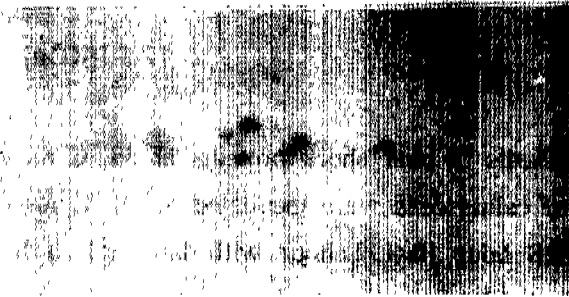
위의 실험들을 통하여 알려진 식물세포의 LMW HSP의 특성들을 이용하여, 식물세포내에서 그들의 기능에 대한 이해를 높이기 위해 antisense HS gene을 식물세포에 넣고, LMW HS gene의 발현을 억제하려고 시도하였다.

Fig 5. Antibody to tomato HSP17 cross reacts with a family of LMWHSPs from carrot. Heat shock proteins synthesized in the presence of S-methionine at 38°C were separated in 2-D IEF/SDS-PAGE and electro-blotted onto a nitrocellulose membrane. The blot was incubated with a tomato HSP17 antibody (kindly provided by Dr. L. Nover) and the proteins cross reacting with the antibody were visualized by an alkaline phosphatase reaction as shown in panel B. The blot was subsequently exposed to X-ray film to visualize the whole profile of HSPs as a reference. Panel A shows an autoradiogram of the blot used for western analysis and the proteins cross-reacting with the tomato HSP17 antibody have been marked with arrows. Open arrow indicated the proteins showing a weak reactivity with the antibody so the signal was not apparent in Panel B. Closed arrows correspond to the proteins visible in Panel B.

A.



B.



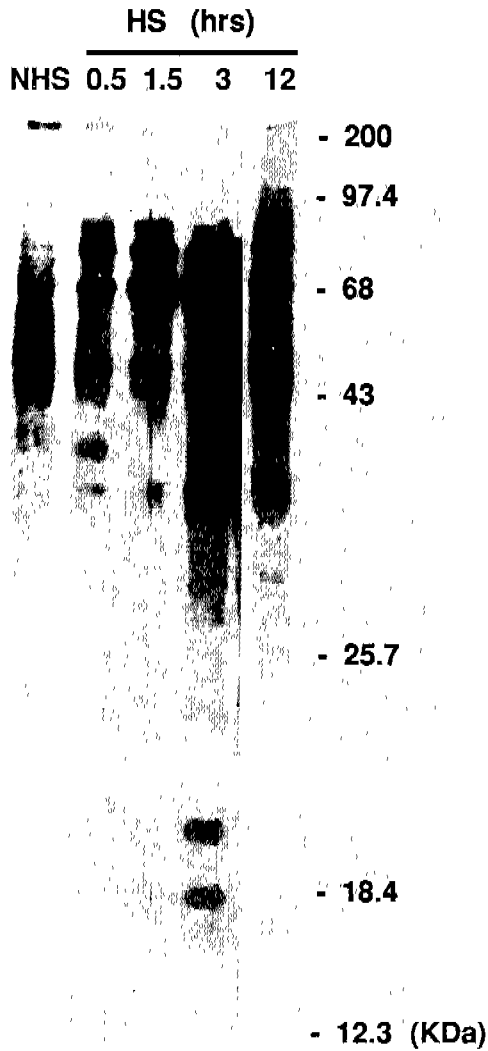
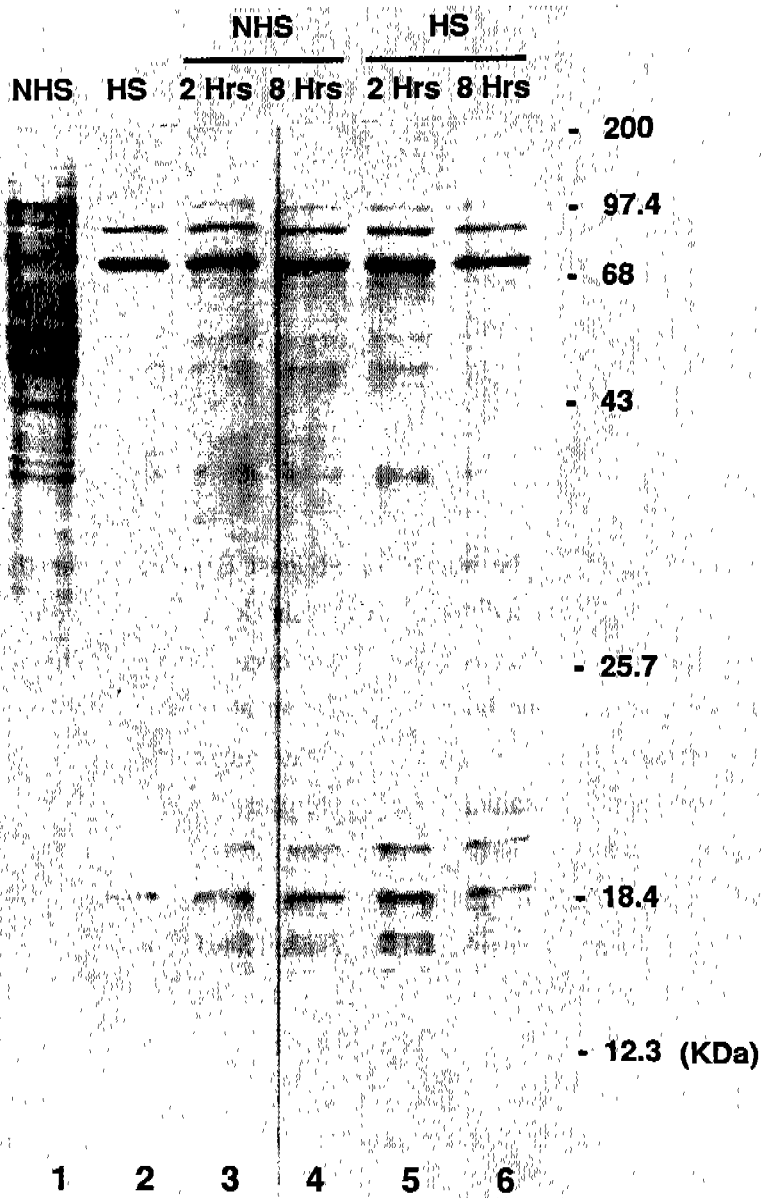


Fig. 6. The synthesis of heat shock proteins at 38 °C as a function of incubation time. Carrot callus cells were incubated at 38 °C for 0.5 hour (0.5 hour with labeling), 1.5 hour (last 1 hour with labeling), 3 hours (last 2 hour with labeling) and 12 hours (last 2 hour with labeling) and the proteins labeled with ³⁵S-methionine were analyzed in a 15% polyacrylamide gel. An equivalent cpm (1.1 X 10⁵ cpm) of TCA-precipitable protein per sample was analyzed. Proteins molecular weight standards are indicated on the right.

Fig. 7. HSPs were shown to be stable for at least 8 hours under the heat shock and non-heat shock conditions. Heat shock proteins were labeled by incubating carrot callus cells in the presence of ^{35}S -methionine for two hours at 38 °C after a one hour preincubation at the same temperature. After labeling, unincorporated ^{35}S -methionine was removed by washing the cells with MS^+ media pre-conditioned at the temperature for a further incubation. The washed cells were used for extraction of the HSP (lane 2) or further incubated, in the presence of cold methionine, at room temperature (about 23 °C) for 2 or 8 hours (lanes 3 and 4, respectively) and at 38 °C for 2 or 8 hours (lanes 5 and 6, respectively) before harvesting for extraction of the proteins. For comparison, the proteins synthesized at room temperature were also analyzed (NHS). The same cpm of TCA-precipitated proteins was resolved in 15% polyacrylamide gel and the proteins were visualized by fluorography.



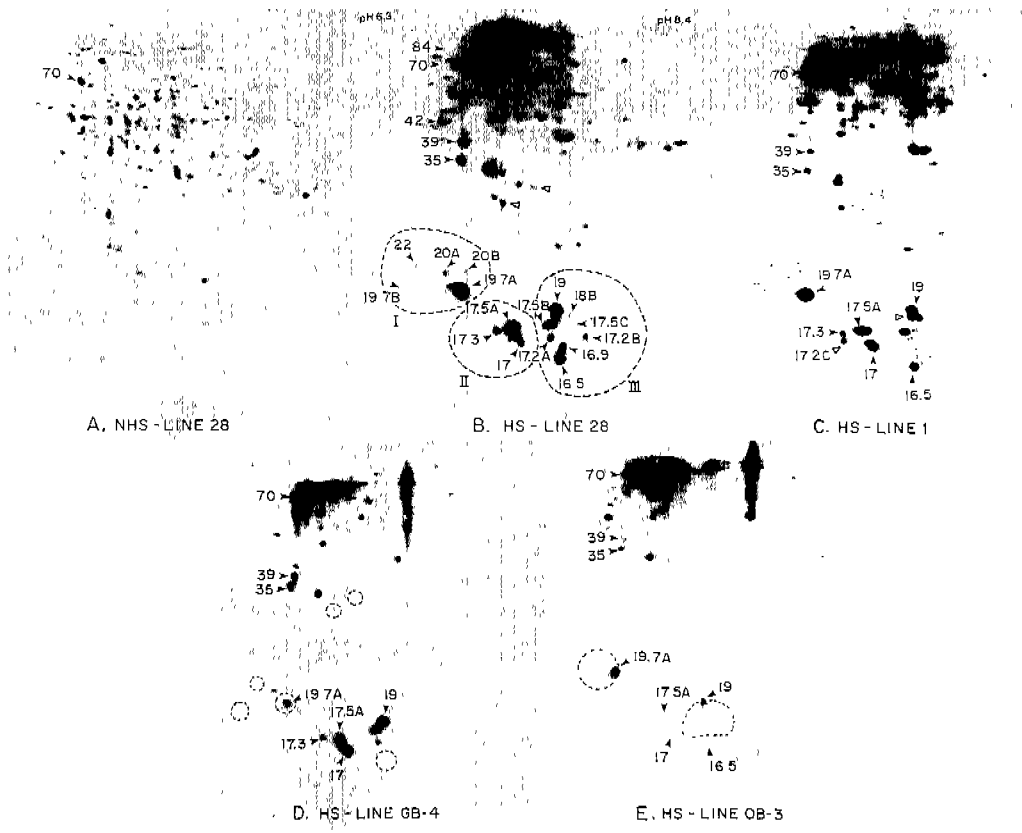


Fig. 8. Different carrot cell lines showed different two-dimensional profiles of heat shock proteins. Total proteins extracted from callus cells, incubated at 23 °C (panel A) and at 38 °C (panels B through E) in the presence of ³⁵S-methionine for the last 2 hours of a 3 hours incubation were separated through 2-D IEF/SDS-PAGE. All gels were loaded with 6.3 X 10⁶ cpm of proteins and were visualizes by autoradiography. The pH gradient ranged from approximate pH 6.3 to pH 8.4 from left to right [determined by the method of O'Farrell (1975)]. Panel B shows the boundary of three clusters of LMW HSPs, defined on the basis of the pI of the proteins, enclosed by dashed lines. The area surrounded by dashed lines in Panels C-E denote areas where the HSP profile differs from that of Panel B.

2. LMW HSP의 기능의 이해를 위한 antisense HS gene의 도입과 분석

(1) 식물체에 antisense gene의 도입과 이의 발현의 확인

LMW HSP의 식물세포에서의 기능을 이해하기 위하여 당근의 LMW HS gene (DChsp17.7)을 사용하여 antisense gene을 만들었다. Antisense gene을 위해 DChsp17.7의 non-coding sequence(300bp)와 대부분의 coding sequence가 사용되었고, promoter로는 CaMV 35S promoter(pCa)와 DChsp17.7의 HS-inducible promoter(pH2)를 사용하였다(Figure 9). 만들어진 antisense gene은 *Agrobacterium*을 사용하여 당근의 배축조직세포로 Thomas 등(1989)의 방법을 사용하여 도입 하였다. 얻어진 transformant로부터 cell line Ca(CaMV35S promoter-driven antisense HS gene)와 H2(HS promoter-driven antisense gene)를 만들어 Genomic Southern을 통하여 도입한 T-DNA의 존재를 확인 하였다(Figure 10). 도입된 antisense gene이 발현되는 것을 증명하기 위하여 nuclei run on assay를 사용하였다. 이는 antisense gene을 사용한 많은 예들에서 antisense message가 세포내에서 안정되지 못하여, northern analysis를 사용하여 축적된 양을 측정하는데 많은 문제점이 있었기 때문이다. 두개의 transgenic line, Ca와 H2의 HS 기간중에 동결된 nuclei를 사용하여 그당시 발현되고 있는 유전자의 transcription 속도를 측정하였다. Figure 11은 여러개의 독립된 실험의 결과들을 함께 보여주는데, antisense gene의 Ca와 H2 line에서의 활발한 transcription을 보여주고 있다.

(2)도입된 antisense gene에 의한 분자수준에서의 변화

이처럼 도입된 antisense gene의 발현이 target인 LMW HS gene의 발현에 미치는 영향을 보기위해 northern analysis를 하였다. Sense transcript(HSP17 message)만을 보기위해 single strand의 ribo-probe를 사용하였다. Figure 12에서 보여준 결과에 따르면 H2 line은 37° C에서 control로 쓰인 nontransformed line인 232와 비교하여 40%정도의 HSP17 transcript의 축적을 보여준다. 이는 HS promoter에 의해 antisense HS message가 37° C에서 가장 많이 만들어져 target message의 축적을 저해한 것으로 여겨진다. Line Ca의 경우는 30° C에서 Line 232와 비교하여 HSP17 message의 축적이 낮음을 보여준다.

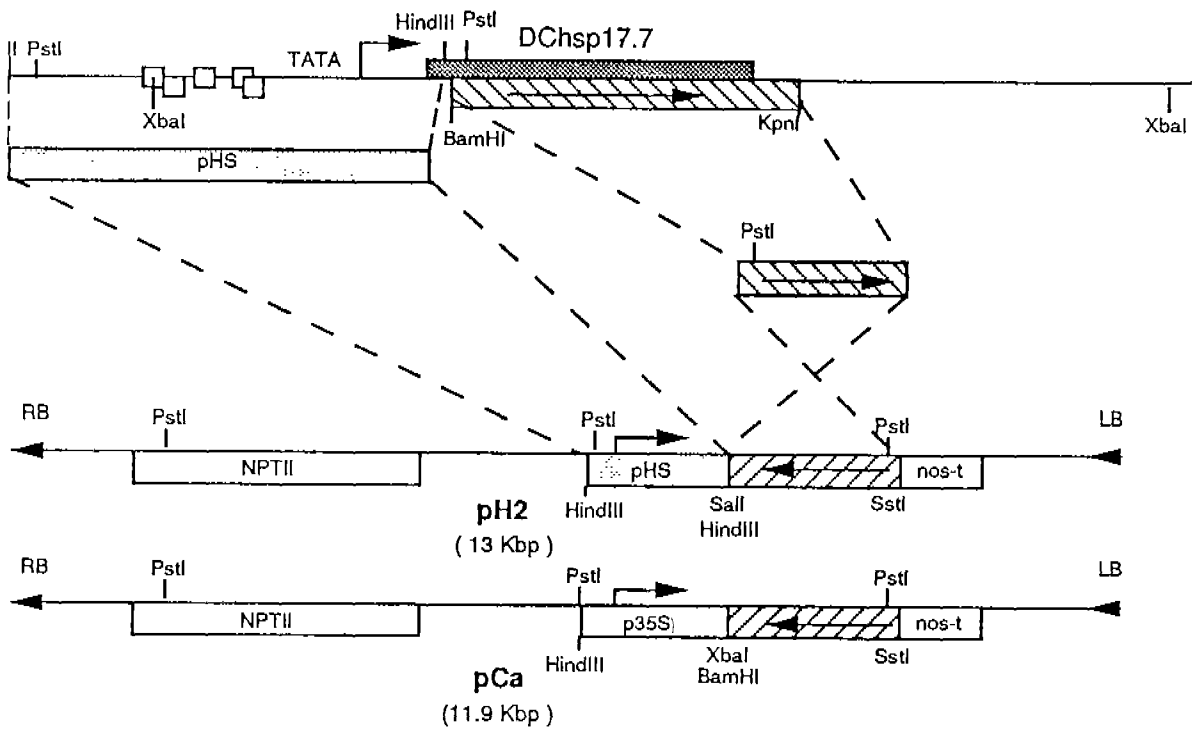


Fig. 9. A diagram showing the pH2 and pCa concentrations. Both the pH2 and pCa plasmids contain a RK2 origin of replication. RB and LB represent for a right border sequence and a left border sequence of T-DNA, respectively

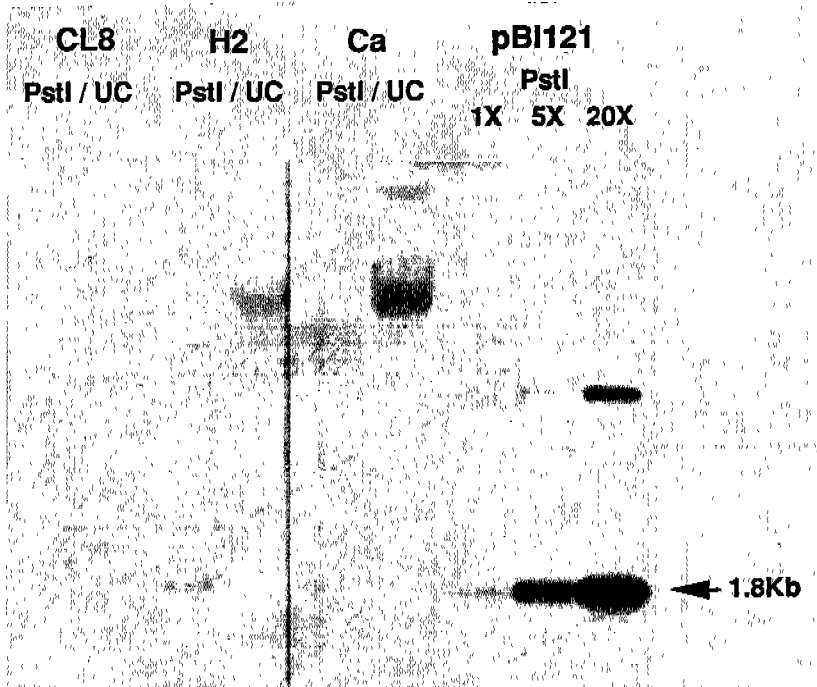
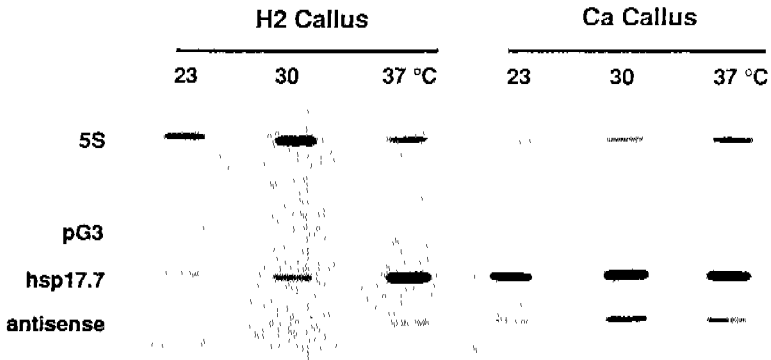


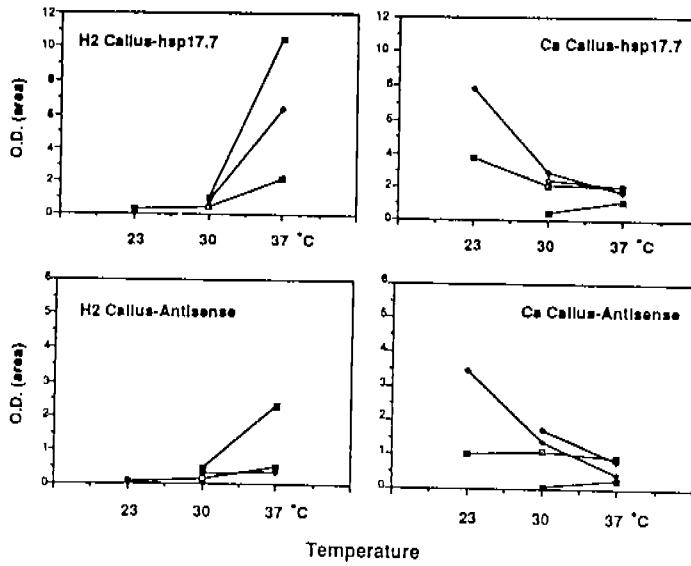
Fig. 10. Confirmation of the presence of T-DNA sequence in transgenic lines by Southern analysis. 15 ug of genomic DNAs, isolated from callus cells of two transgenic lines (H2 and Ca) and one control line (CL8), were analyzed either after digestion with PstI or as uncut DNAs. The probe was a 1.8 Kbp PstI fragment, containing part of the NPTII gene and the sequence spanning between the NPTII gene and the 35S promoter, of pBI121 (shown in Figure 15). A band of 1.8 Kbp, indicated by the arrow, appeared only in the transgenic lines, H2 and Ca, but not in the transformed line (CL8). To estimate the copy number of the T-DNA in the genome of the transgenic lines, DNA of pBI121, digested with PstI, was loaded in amount which represent 1 copy, 5 copies, and 20 copies of the plasmid per haploid genome of carrot. The amount of plasmid for 1X was calculated as: size of PstI fragment (1800 bp) / size of a carrot haploid genome (1.4×10^9 bp) X the amount of genome DNA used for Southern (15 ug) = 1.93×10^{-5} ug.

Fig. 11. The transgenic lines were able to transcribe an antisense RNA. Nuclei (5×10^{-1} nuclei per 300 μ l) isolated from callus cells of both the H2 and Ca lines which had been incubated at 23 °C, 30 °C, and 37 °C for three hours, were used for nuclear run on assay. The blot contained sense and antisense RNAs transcribed in vitro from the plasmids, pKPN and pKPN-R, linearized with XbaI, in addition to plasmid DNA containing a soybean 5S ribosomal RNA gene and pGEM3-Z. The blots were hybridized with the transcripts synthesized during the nuclear run on reaction. Panel A, which shows the hybridization from one set of the nuclear run-on assays, showed transcription of both sense (hsp 17.7) and antisense as well as 5S ribosomal RNA (5S; as an internal control). The background level of hybridization in this analysis was determined from the nonspecific hybridization of the probe to pGEM3-Z DNA. Panel B shows the accumulated data from several independent experiments after normalization with 5S. The value plotted were calculated by subtracting the value of a background (pG3) from the value of either sense (hsp 17.7) or antisense hybridization, and then dividing by the value of 5S after also subtracting a background, the pGEM3-Z from 5S.

A



B



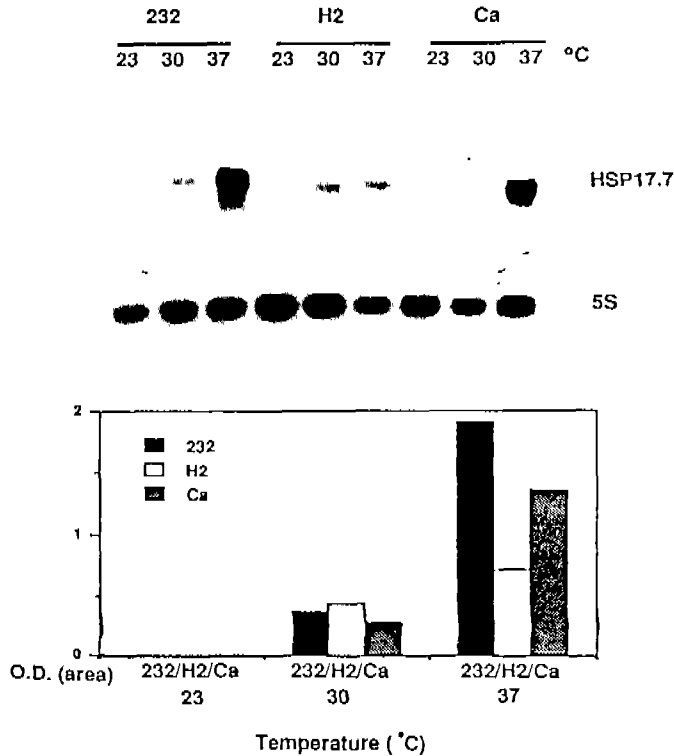


Fig. 12. The transgenic lines showed an alteration in the steady state level of HSP17 transcript in response to heat shock. 20 ug of total RNA isolated from callus cells incubated at room temperature, 30 °C, and 37 °C were separated in a 1.2 % agarose/formaldehyde gel and the blot was hybridized with an antisense-strand specific ribo-probe to measure only the level of HSP17 sense transcripts. In addition to the two transgenic lines, the nontransformed line 232 was used as a control. The blot was sequentially reprobed with radioactively labeled DNA of 5S ribosomal RNA clone, with an excess amount (250 ug) of non-labeled DNA of 5S ribosomal RNA to preserve the probe excess, and the intensity of 5S band was used for normalization of RNA loading per lane. The hybridization of HSP17.7 was quantitated using densitometry and normalized with the hybridization of 5S ribosomal RNA.

특이한 점은 globular embryo에서 만들어진 HSP17 message를 northern 방법 (Figure 13)으로 보았을때 transcript의 질적인 변화를 보여 주었다. 즉, 예상되는 HSP17 transcript의 크기(850nt)에 비해 큰 transcript이 관찰 되었다. 이러한 예상외의 transcript의 생성 과정을 밝히기 위하여 PCR(rapid amplification of cDNA ends, RACE; Frohman, 1990)을 통해서 Ca line의 HS poly(A)RNA로부터 예상외로 큰 transcript의 cDNA를 clone 하였다. 이 cDNA의 부분적인 sequencing과 이 cDNA를 probe로 사용한 northern analysis를 통해 antisense RNA에 의해서 HSP17 transcript의 생성시 termination process가 저해되어 polyadenylation signal site를 지나서 수 Kbp 까지 연장되어 transcript이 만들어진 것으로 생각된다. 실제로 도입된 antisense gene은 target gene의 polyadenylation site를 포함 하였다. 비슷한 예로 사람의 α -globin gene의 polyadenylation signal site의 point mutation이 위와 비슷하게 transcription termination을 저해하여 정상보다 훨씬 큰 transcript을 만든 예가 있다(Whitelaw and Proudfoot, 1986).

이처럼 transgenic line H2와 Ca에서 양적인 또는 질적인 변화를 HSP17 transcript에서 보았다. 이와같은 HSP17 transcript의 변화가 해당 단백질 수준에도 영향을 미치는지를 보기 위해 HS에 반응하여 만들어지는 HSP를 비교하였다. Figure 14-A의 lane 4-6의 비교를 통해 H2 line이 control line인 232와 다른 transgenic line인 Ca에 비해 전체적으로 HSP의 생성이 저하 되었음을 보여준다. 같은 그림의 panel B에 나타난 densitometry에 의한 정량적인 비교를 통해 특별히 LMW HSP이 HMW HSP에 비해 더많은 저해가 있음을 보여준다. HMW HSP의 저해는 그간의 연구를 미루어 antisense message의 직접적인 작용이기 보다는(왜냐하면 DChsp17.7와 HMW HS gene의 sequence homology는 거의 없다) LMW HSP의 부족량으로 야기된 세포환경의 불안정화를 통한 비선택적인 기작으로 기인된 것으로 생각된다.

(3) H2 callus cell에서의 acquired thermotolerance 능력의 손실

H2 line에서 보여준 감소된 HSP17 transcript과 단백질이 acquired thermotolerance에 어떤 영향을 미치는지를 알기 위해 Figure 15-B에 보여준 대로 처리하여 처리된 세포들의 생존도를 성장속도를 측정하여 비교하였다. 같은 그림의 panel A

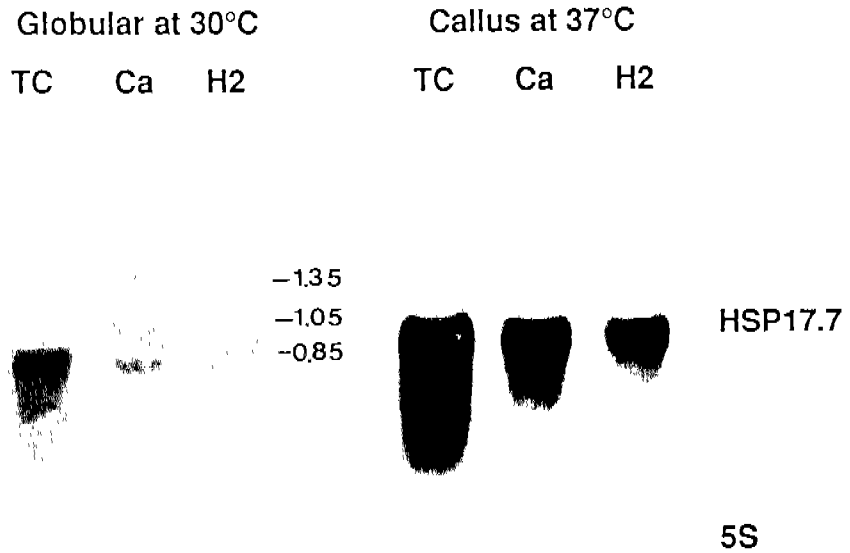
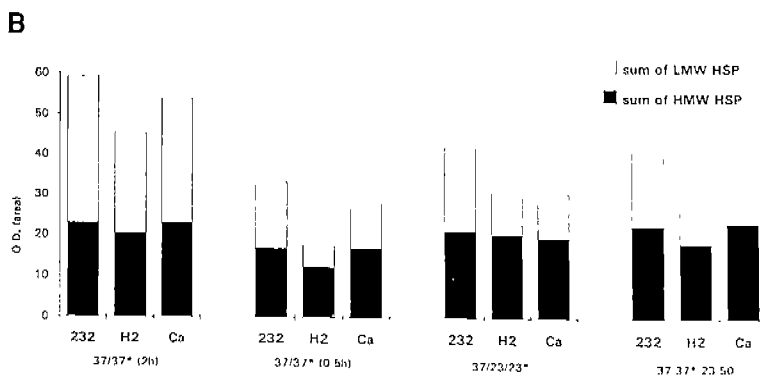
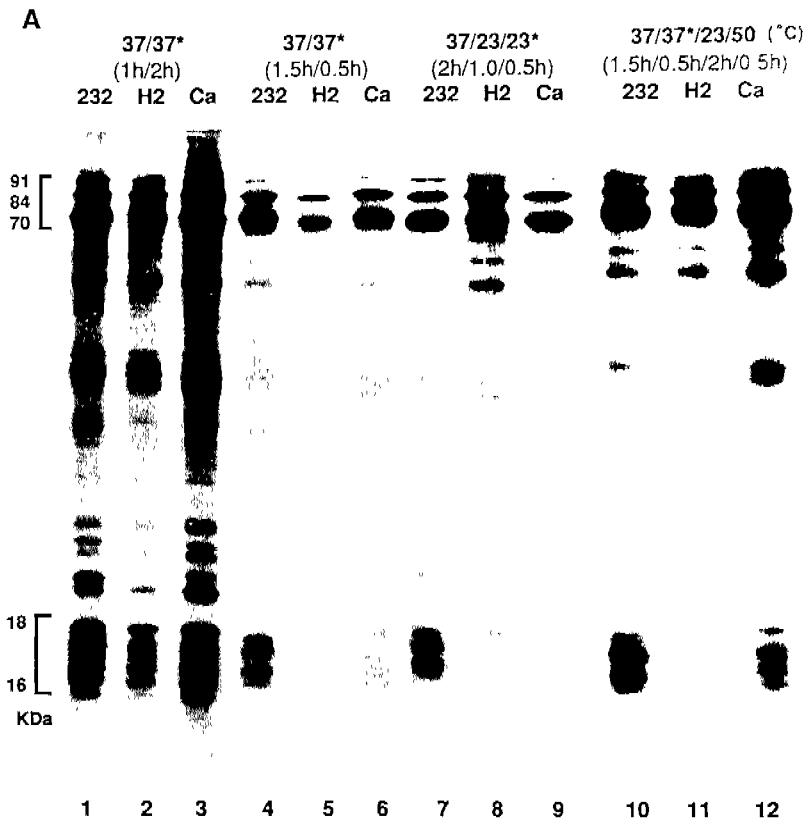


Fig. 13. The globular embryos of the transgenic lines produce extra bands for HSP17 transcripts in response to heat shock. Total RNAs (20 ug) extracted from globular embryos incubated at 30 °C were separated in 1.2 % agarose/formaldehyde gel, and the blot was probed with an antisense strand specific ribo-probe to detect the sense transcript. Two extra bands (1.35 and 1.05 Knt) appeared in addition to a band of correct size (0.85 Knt) in transgenic globular embryos at 30 C. The 5S ribosomal RNA bands resulted from reprobing the same blot in order to evaluate the RNA loading per lane. RNA samples from callus cells heat shocked at 37 °C were shown not to have such extra bands.

Fig. 14. The H2 callus cells showed as reduced synthesis of the heat shock proteins. Heat shock proteins (10 ug) isolated from callus cells were analyzed using 15% polyacrylamide gel. Lanes 1 to 3 show the proteins which were labeled (with ^{35}S -methionine) during the last two hours of a three hour incubation at 37°C . This regime of labeling has been shown to be optimal to observe a maximal accumulation of HSPs. Alternatively, proteins were labeled during the last 30 minute of a two hour incubation at 37°C (lanes 4 to 6). By reducing the durations of both incubation and labeling, a subtle difference in protein synthesis among three lines can be observed. Proteins were also labeled in the last 30 minute of a 1.5 hour recovery period after a two hour incubation at 37°C (lanes 7 to 9). This shows the HSPs which were synthesized during the recovery period. In order to evaluate stability of HSPs during the regime used for the subsequent thermotolerance experiments (Figure B), proteins were labeled in the same way as in the lanes 4 to 6. Subsequently, unincorporated labels (^{35}S -methionine) was removed. The cells were recovered at 23°C for 1,5 hours, and were then heat shocked at 50°C for 30 minutes. Protein was extracted from the cells and was analyzed (lanes 10 to 12). In order for quantitative comparison, amounts of the HMW HSPs (91, 84, and 70 KDa) and the LMW HSPs (ranging from 16 to 20 KDa) as marked in the left were measured using densitometer. Results of densitometry are shown in panel B.



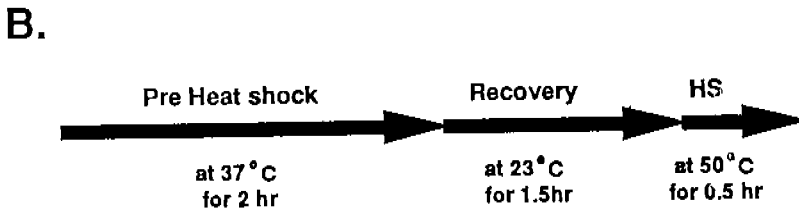
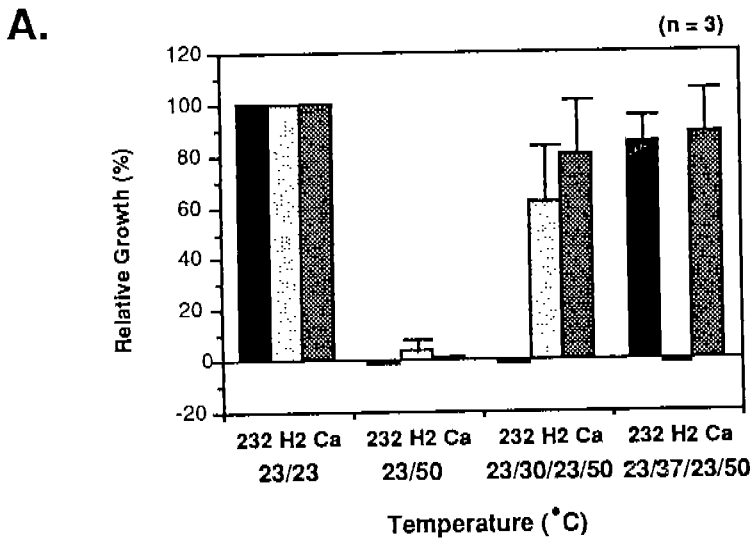


Fig. 15. The H2 callus cells showed a lack of ability to achieve thermotolerance. The cells were pre-incubated at 23°C, 30°C or 37°C for two hours pre-heat shock), and the cells were allowed to recover at 23°C for 1.5 hours and then were heat shocked again at 50°C for 30 minutes. After the treatment, the cells were allowed to grow for ten days, and then dry weight of the lyophilized cell mass was measured. As a control, another set of the cultures was prepared and incubated without any treatment. By dividing the net increase of the cells mass for the experimental with the net increase for the control and then by multiplying with 100, the relative growth (%) was calculated.

에 나타난대로 HS(30° C 또는 37° C)조건에서 preincubation이 없는 경우 어떤 line도 50°C의 처리에 생존하지 못하였다. 그러나 37° C에서 preincubation한 경우는 line 232와 Ca의 경우 높은 생존율을 보여 주었으나 H2의 경우 생존율이 0%로 나타났다. 즉, H2 line의 경우 사전의 HS(37° C 에서)을 통해서 thermotolerance를 얻지 못했다. 이는 LMW HSP이 식물의 thermotolerance와 밀접한 연관이 있음을 보여주는 결과이다. 특히적으로 30° C에서 preincubation을 한 경우는 오직 transgenic line들만이 어느정도의 생존율을 보여 주었다. 이는 30° C에서의 antisense gene의 발현이 도리어 thermotolerance를 증가 시킨 것을 보여주는 것으로 정상온도(30° C는 HS을 일으키는 가장 낮은 온도로, HSP과 nonHSP이 같이 만들어 진다)에서 LMW HSP이 negative regulator로 HS gene 발현에 관여했을 가능성을 제기하고 있다. 유사하게도 E.coli(Bukau and Walker, 1990)와 yeast(Craig and Jacobsen, 1984)의 경우 DnaK나 HSP70를 생성하지 못하게 유전적으로 만들었을때 정상온도 조건에서도 thermotolerance를 증대 시킨 것으로 보고 하였다. 현재로는 식물의 LMW HSP이 위의 예에서 HSP70가 보여준 것 처럼 HS gene 의 조절 작용을 할 가능성에 대한 실험적 보고는 없다. 단, Kimpel 등(1990)에 의해 단지 그 가능성을 언급하였을 뿐이다. 식물 LMW HSP의 negative regulator로서의 기능에 대한 연구를 위해서는 두개의 transgenic lines에 의해 30° C 또는 실온에서의 만들어지는(질지도 모르는) HSP을 조사해 볼 필요가 있겠다.

(4) Transgenic line의 세포와 식물에서의 특성의 변화

두개의 transgenic line은 thermotolerance에서 보여준 차이 외에도 체세포 발생시와 식물체로 재생된 후에도 중요한 차이점을 보여준다. Ca line의 callus cell은 다른 line의 것들과 비교할 때 그 형태가 꼭 차여지고, 마치 globular embryo처럼 구형에 가깝다(Figure 16). 체세포 발생을 유도하였을때 Ca line의 경우는 2일 내에 globular stage에 도달한다. 이는 보통의 경우 5-7일이 필요한 점으로 볼때 상당히 빠른 발생의 진전을 이루는 것이다. 또한 이들 transgenic line을 식물체로 재분화시켰을때 Ca 식물체는 H2로부터 재분화되어 만들어 지거나, 종자로부터 발아되어 자란 식물체에 비하여 그 크기가 작았다(Figure 17). 수치적인 비교를 하였을때 식물체당 줄기의 수와 줄기당 결가지의 수는 차이가 없었으나, 줄기의 길이와 잎의 면적에서는

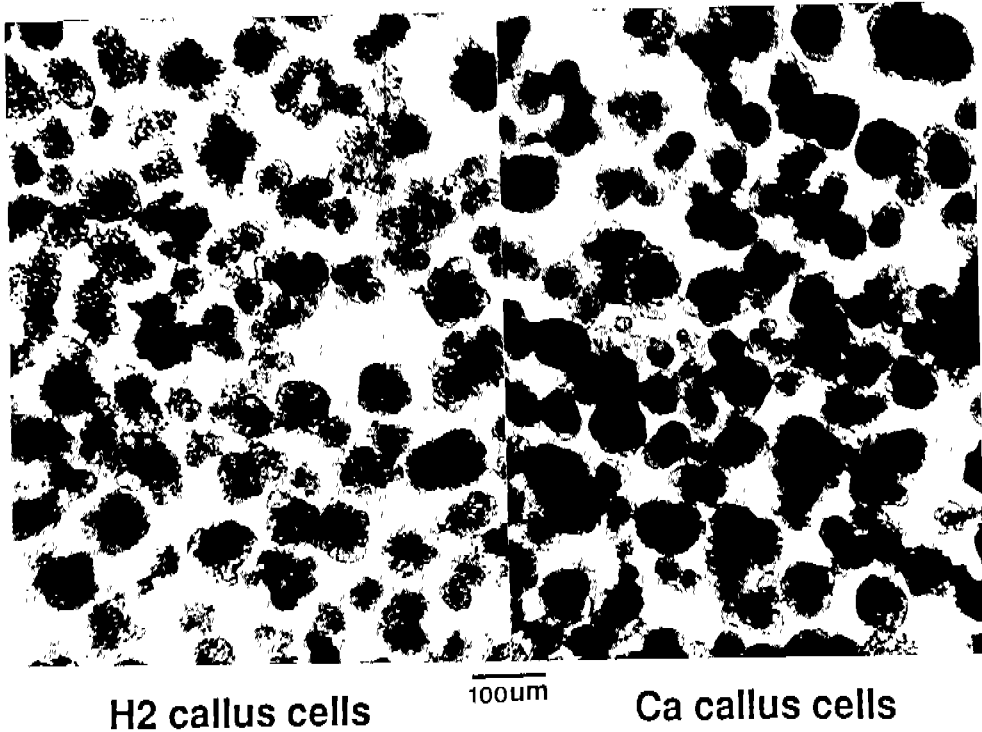


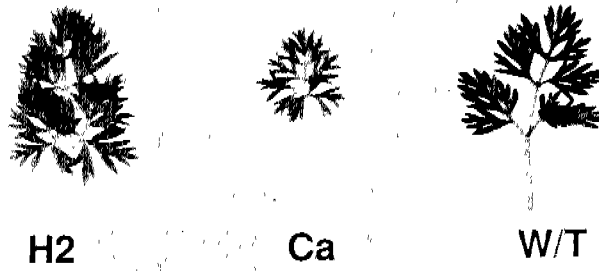
Fig. 16. The Ca callus cells growing in suspension culture showed some difference in morphology. the callus cells of the H2 and Ca lines were grown in MS⁺ liquid media containing 100 ug of kanamycin. The Ca callus cells appear to be more compact and rounder than the H2 callus cells. The pictures were taken through an inverted microscope (IMT-2, Olympus) using the same parameter.

Fig. 17. Transgenic plants regenerated from the Ca lines showed a dwarf phenotype. Both H2 and Ca plants were regenerated from callus cells through somatic embryogenesis. Panel A shows the regenerated plants and Panel B shows a representative leaf of the transgenic plants (H2 and Ca) as well as a leaf from a non-transformed plant grown from a seed. Panel C shows a quantitative comparison in several properties of the plants. The data were collected two months after the pictures shown in panel A and B were taken. The length (from the base to the top of the leaf) of the five largest leaves in each plant (two wild type plants, three H2 plants, and three Ca plants) was measured. A leaf of the medium size among the leaves measured for length, was picked and used to measure the area of the leaf. The number of the leaves (longer than 2 cm) per plant (two wild type plants, three H2 plants, and three Ca plants) and number of leaflets per leaf (10 leaves for wild type plants, 15 leaves for H2 plants, and 15 leaves for Ca plants) were also counted for comparison.

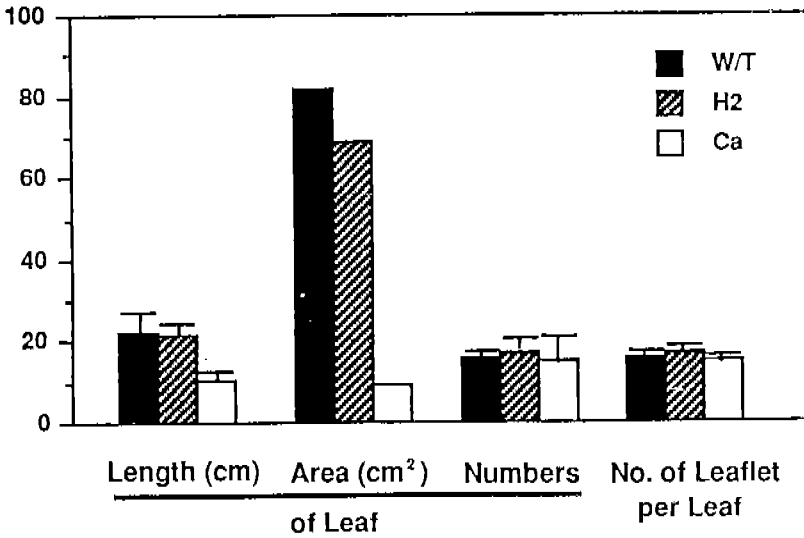
A



B



C



큰 차이를 볼 수가 있었다. 이는 Ca 식물이 거의 모든 형태에서는 H2나 종자로 부터 얻어진 식물과는 차이가 없고, 그 크기만이 작은, dwarf의 표현형을 나타내는 점을 보여주고 있다. 이러한 변이는 여러가지 요인들로 설명이 가능하다. antisense gene의 특성과 관계 없는 경우는 도입된 T-DNA가 성장에 관련된 유전자에 우연히 우연히 삽입되어 그 유전자를 무력화 시킨 경우일 수도 있고, 불필요한 antisense transcript의 nonHS 조건에서의 축적이 비특이적으로 세포의 정상기능을 교란 시켰을 수도 있겠다. 뚜렷한 증거는 없지만 LMW HSP이 nonHS 조건 하에서 발현되어 (transcription 수준에서 아주 적은 정도의 발현을 보여 주었음; Figure 2), 이들이 식물세포의 발생에 관여 한다면, nonHS 조건에서 Ca cell 내에서의 antisense gene 발현은 그러한 발생에서의 기능을 저해하여 dwarf 변이를 유도한 것으로 생각 할 수 있다. 이러한 생각들은 Ca 식물에 대한 생리학적, 분자생물학적인 연구의 진전을 통해 밝혀 질 것으로 기대된다.

III. 결 론

*E. coli*에서 사람에 이르기 까지 거의 모든 생물체는 생육온도보다 높은 온도에 반응하여 거의 유사한 형태의 반응을 나타내 보인다. 고등식물의 하나인 당근의 배양세포도 이와같은 HS response를 보여준다. 당근이 HS에 반응하여 HSP을 만드는 최적의 조건은 38° C에서 3시간 처리 하였을 때이다. 이때에 만들어진 HSP은 HS 또는 nonHS 조건하에서 최소 8시간 이상 안정되게 세포내에서 존재하였다. 당근의 경우도 다른 식물에서 알려진 대로 LMW HSP이 양과 수의 양면에서 주요한 group이다. 이들 LMW HS gene은 nucleotide sequence에서나 단백질 수준에서의 고도의 유사성을 보여 주었다. 또한 cell line 간에 만들어지는 HSP이 그 양과 종류의 차이가 있음을 보여주었다. 특히 temperature-sensitive line 의 경우 많은 양/수의 LMW HSP이 감소함을 보여주어 LMW HSP과 thermotolerance간의 연관을 제시하기도 하였다. 이러한 기초 연구를 바탕으로 식물에서 LMW HSP의 기능을 이해하기 위하여 antisense gene을 도입하여 line H2에서 HSP17 message와 protein의 생성을 저해하였다. 또한 37° C에서 처리함으로 일반적으로 얻어지는 acquired thermotolerance가 line H2에서는 결여 되었음을 관찰하였다. 이러한 여러 관찰들을 종합해 볼때 LMW HSP은 식물이 thermotolerance를 유도하는데 필수적이라 할수 있겠다. 이외에 30° C에서의 pre-incubation을 통해 H2와 Ca line들이 thermotolerance를 보여준 사실과 HS상태로 오래 지속 되었을때의 LMW HSP의 생성이 감소된 사실은 식물의 LMW HSP이 yeast 또는 *E. coli*에서 알려진 negative regulator의 역할을 담당할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

Ca line으로부터 재생된 식물체에서 보여지는 dwarf 표현형은 LMW HSP의 식물의 발생에 어떤 역할을 하는지에 대한 의문을 제시한다. 가령 LMW HSP이 protein degradation에 관여한다면 (예로, 75-76개의 아미노산으로 구성된 가장 작은 HSP인 ubiquitin(HSP8.5)은 사용되지않는/못하는 단백질의 분해에 관여한다) 발생/성장과정의 불필요한 단백질의 제거에 중요한 역할(예로, developmentally programmed cell death)을 할 수 있으리라 예상된다. 하지만 현재로서는 dwarf 표현형을 설명하기 위한 단지 하나의 가능성에 불과하다. 이에 대해서는 이후 식물 호르몬의 사용등을 통한 실험을 통해 조금 더 사실에 접근할 수가 있겠다.

참 고 문 헌

- Bukau, B., and G.Walker. 1990. Mutations altering heat shock specific subunit of RNA polymerase suppress major cellular defects of E.coli mutants lacking the DnaK chaperon. EMBO J. 9:4027-4036.
- Chou, M., Y.-M.Chen, and C.-Y.Lin. 1989. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. Plant Physiol. 89:617-621.
- Craig, E.A., and K.Jacobson. 1984. Mutations of the heat-inducible 70 Kilodalton genes of yeast confers temperature-sensitive growth. Cell 38:841-849.
- Craig, E.A., and C.A.Gross. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer. Trends Biochem Sci.16:135-140.
- Darwish, K., L.Wang, C.H.Hwang, N.Apuya, and J.L.Zimmerman. 1991. Cloning and characterization of genes encoding low molecular weight heat shock proteins from carrot. Plant Mol. Biol. 16:729-731.
- Frohman, M.A., M.K.Dush, and G.R.Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts. PNAS 85:8998-9002.
- Graziosi, G., F.Micali, R.Matzari, F.deCristini, and A.Salvoini. 1980. Variability of response of early *Drosophila* embryos to heat shock. J. Exp. Zool. 214:141-145.
- Heikkila, J.J., M.Kloc, J.Bury, G.A.Schultz, and L.W.Browder. 1985. Acquisition of the heat-shock response and thermotolerance during early development of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 107:483-489.
- Henle, K.J., and B.D.Leeper. 1982. Modification of the heat shock response and thermotolerance by cycloheximide, hydroxyurea, and lucanthone in CHO cells. Radiat.Res. 90:339-347.
- Hwang, C.H., and J.L.Zimmerman. 1989. Heat shock response in carrot:Protein variations between cultured cell lines. Plant Physiol. 91:552-558.
- Key, J.L., E.Czarnecka, C.Y.Lin, J.Kimpel, C.Mothershed, and F.Schoffl. 1983. A comparative analysis of the heat shock response in crop plants. in Current

- Topic in Plant Biochemistry and physiology, Vol.2.(D.D.Randall *et al.*, eds.), pp.107–118. University of Missouri, Columbia, MO.
- Key, J.L., J.A.Kimpel, C.Y.Lin, R.T.Nagao, E.Vierling, E.Czarnecka, W.B.Gurley, J.K.Roberts, M.A.Mansfield, and L.Edelman. 1985. The heat shock response in soybean in Cellular and Molecular Biology of Plant Stress(Key, J.L. and T.Kosuge eds.),pp.161–179. Alan R. Liss, New York.
- Kimpel, J.A., R.T.Nagao, V.Goekjian, and J.L.Key. 1990. Regulation of the heat shock response in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 94:988–995.
- Li, G.C., L.Li, Y.-K.Liu, J.Y.Mak, L.Chen, and W.M.F.Lee. 1991. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-KDa heat shock protein-encoding gene. *PNAS* 88:1681–1685.
- Lin, C.-Y., J.K.Roberts, and J.L.Key. 1984. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 74:152–160.
- Lindquist, S. 1981. Regulation of proteins synthesis during heat shock. *Nature* 293:311–314.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55:1151–1191.
- Loomis, W.F., and S.Wheeler. 1980. Heat shock response of *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* 79:399–408.
- Mansfield, M.A., and J.L.Key. 1987. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. *Plant Physiol.* 84:1007–1017.
- McGarry, T.J., and S.Lindquist. 1986. Inhibition of heat-shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. *PNAS* 83:399–404.
- Nover, L., D.Munsche, D.Neumann, K.Ohme, K.D.Scharf. 1986. Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat-shock conditions: Ribosomal RNA. *Eur. J. Biochem.* 160:297–304.
- Perisic, O., H.Xiao, and J.T.Lis. 1989. Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head to head and tail to tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell* 59:797–806.

- Riabowol, K.T., L. A. Mizzen, and W. J. Welch. 1988. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242:433–436.
- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571–573.
- Roccheri, M.C., M.G.DiBernardo, and G.Giudize. 1981. Synthesis of heat-shock protein in developing sea urchins. *Dev. Biol.* 83:173–177.
- Sanchez, Y., and S.L.Lindquist. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248:1112–1115.
- Scharf, K.D. and N.Nover. 1982. Heat shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell culture. *Cell* 30:427–437.
- Schlesinger, M.J., P.M.Kelley, G.Aliperti, and C.Malfer. 1982. Properties of three major chicken heat-shock proteins and their antibodies. in *Heat-Shock:From Bacteria to Man*(M.J.Schlesinger *et al.*, eds.),pp.243–250. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Schnall, J.A., T.J.Cooke, and D.E.Cress. 1988. Genetic analysis of somatic embryogenesis in carrot cell culture: Initial characterization of six classes of temperature-sensitive variants. *Dev. Genet.* 9:49–67.
- Storti, R.V., M.P.Matthew, R.Alexander, and M.L.Pardue. 1980. Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D.melanogaster* cells. *Cell* 22:825–834.
- Thomas, J.C., M.J.Guiltinan, S.Bustos, T.Thomas, and C.Nessler. 1989. Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 8:354–357.
- Tissieres, A., H.K.Mitchell, and U.M.Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389–398.
- Whitelaw, E., and N.Proudfoot. 1986. a-Thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human $\alpha 2$ globin gene. *EMBO J.* 5(11):2915–2922.

- Yarwood, C.E. 1961. Acquired tolerance of leaves to heat. *Science* 134:941-942.
- Zimmerman, J.L., N.Apuya, K.Darwish, and C.O'Carroll. 1989. Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development. *Plant Cell* 1:1137-1146.