

벼 엽록체 DNA내의 151 bp 반복염기서열에 의한 유전자 재배열

남백희 · 김한집*

명지대학교 생물학과, 아주 대학교 생물학과*

초록: 엽록체 DNA 내에서 반복 염기서열의 존재와 이들에 의한 유전자 재배열 현상을 고찰하기 위하여 151 bp Repeated Sequence 갖는 이질적인 유전인자군의 존재를 여러가지 품종의 벼 엽록체 DNA에서 관찰 하였다. 또한 쌀 DNA를 벼의 생장과 조직부위에 따라 분리하고, rpl2 probe를 이용하여 Southern blot 분석하여 엽록체의 발달에 따르는 엽록체 DNA의 재배열 현상을 관찰하였다. 아울러 유전자 재배열 현상을 유발하는 반복염기서열을 database로부터 검색하여 유전자의 상호 비교 분석하였다. 그 결과 151 bp Repeated Sequence와 유사한 염기 서열을 갖는 rpl23 유전자를 포함하는 이질적인 유전인자군은 어느 특정한 품종의 벼에 국한되는 것이 아니고 본 실험에 사용된 다양한 품종의 벼에 일반적으로 나타나는 현상이 확인되었으며 또한 이들의 양상은 벼의 조직 부위에 따라 다르게 나타나고 있음을 확인하였다. 이러한 실험적 결과와 함께 엽록체 유전자 database의 검색과 유전자의 상호 비교분석을 통하여 151 bp 반복 염기 서열에 의한 벼 엽록체 DNA의 유전자 재배열현상은 식물 특히 단자엽 식물의 진화와 함께 발달된 현상으로 특히 151 bp 반복 염기 서열은 매우 다양한 유전자 재배열을 유발하는 변이유발 위치로 발달되어 왔음을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 반복염기서열에 의한 유전자 재배열 현상은 특히 벼에 있어서 plastid의 발달에 밀접하게 관여하고 있음을 제시하고 있다(1993년 4월 27일 접수, 1993년 6월 7일 수리).

엽록체는 식물세포만 존재하는 세포내 소기관으로 태양에너지를 화학에너지로 전환시키는 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 엽록체의 독특한 기능은 세포 내 핵의 유전정보 뿐만 아니라 엽록체 자체가 가지고 있는 고유의 환상 DNA에 포함되어 있는 유전정보에 의한 것으로 광합성의 중요성을 비추어 볼 때 엽록체 DNA의 구조에 관한 연구는 매우 중요하게 인식되어 왔다. 그 결과 최근 liverwort, *Nicotiana*, rice 엽록체 DNA 염기순서가 완전히 밝혀졌으며 각각 100여개 이상의 coding sequence가 확인되었다.¹⁾ 엽록체 DNA는 그 구조에 있어 large single copy region과 small single copy region이 한쌍의 inverted repeat sequence에 의해 분리되어 있는 독특한 환상구조로 이루어져 있고 이러한 구조로 인하여 엽록체 DNA 자체 내의 recombination이 방지되어 안정된 고유한 구조가 유지되고 있다고 알려져 왔다.²⁾ 그러나 그 후 엽록체 DNA 내의 inverted repeat sequence가 항상 불안정한 엽록체 DNA 구조를 유발하지는 않는다는 결과를 얻어냄으로서 inverted repeat sequence의 엽록체

DNA 내의 역할에 대하여 새로운 여지를 가지게 되었다.³⁾ 또한 엽록체 DNA 내의 inverted repeat sequence에는 100 bp 내외의 short repeated sequence가 여러가지로 존재하며 이들에 의한 엽록체 DNA 자체내에서 유전자 재조합 현상이 관찰된 바 있으나,⁴⁻⁶⁾ 이에 관련된 short repeated sequence가 동정 바 없다.

지금까지 벼 엽록체 DNA의 restriction map과 염기서열이 알려져 있으며,¹⁾ 또한 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase large subunit(rbcL)와 32 kd photosystem II protein(psbA) 유전인자의 엽록체 DNA에서의 위치를 확인하였다.⁷⁾ 또한 이 rbcL의 3'-noncoding region에 위치하는 151 bp의 염기순서가 inverted repeat sequence 내에 위치하는 ribosomal protein subunit L23의 염기순서와 유사하며 이 151 bp 염기순서에 의해 rbcL 유전인자와 이곳으로부터 20 kb 떨어져 위치한 ribosomal protein subunit L2(rpl2) 유전인자가 연결된 유전인자군이 확인되었다.⁸⁾

이러한 결과를 토대로 Moon 등⁹⁾은 엽록체 DNA가

부분적으로 미토콘드리아로 이전되었고, 그 이전된 엽록체 DNA 조각은 미토콘드리아내에서 151 bp repeated sequence 간에 homologous recombination에 의하여 rpl2-rbcL gene cluster가 미토콘드리아내에 존재하게 된 것이라고 유추하여 엽록체내에서의 유전자 재배열 현상의 가능성을 배제하였다. 그러나 151 bp repeated sequence에 의한 recombination에 의한 엽록체내에서의 recombination은 다음과 같은 여러가지 보고된 현상의 측면에서 많은 가능성을 보여주고 있다. 첫째로, 벼의 indica type 품종 중 하나인 Labelle의 엽록체내에는 rbcL gene을 포함하는 적어도 다른 두 개의 gene cluster가 존재하고,⁹⁾ 둘째로, cytochrome fgene도 엽록체 DNA의 모계유전을 고려하여 볼 때, 또다른 두가지의 gene cluster의 존재가 유추되며,¹⁰⁾ 셋째로, 151 bp repeated sequence를 probe로 사용하였을 때, 적어도 5개의 Hind III restriction fragment가 나타나며,¹¹⁾ 네째로, 쌍자엽 식물인 담배잎 엽록체내에서 여러 유전자발현은 단순한 엽록체 DNA가 숫적으로 증가하는 것에 기인하지 않고 전사 후 조절에 의한 것이라고 주장하고 있다.¹²⁾

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 151 bp repeated sequence를 포함하는 이질적인 유전인자군은 벼엽록체내에서 151 bp repeated sequence에 의한 유전인자 재배열에 의한 결과로 나타나는 유전인자군이라는 가능성을 배제할 수 없겠다. 이러한 현상의 가능성을 고찰하기 위한 지금까지의 연구들은 벼의 단일 품종내에서의 단편적인 관찰을 해왔었기 때문에 엽록체 DNA에서의 이러한 repeated sequence를 중심으로한 유전자 재배열과 유전인자군들의 이질성의 관계를 확립하기가 어려웠다. 이러한 의미에서 지금까지의 연구에서 알려진 rbcL 유전인자의 주변에 존재하는 151 bp repeated sequence는 엽록체 DNA내에서 short repeated sequence에 의한 recombination을 명확하게 추적할 수 있는 좋은 모델을 제공하고 있는 것이다. 더욱이 최근 liverwort, *Nicotiana*, rice등의 3가지 대표적인 식물들의 엽록체 유전자의 완전한 DNA Sequence가 보고됨에 따라 이들에서의 반복염기서열의 분포 등을 유전자 검색을 통하여 분석하는 것은 매우 중요한 의미를 가지게되었다. 따라서 본 연구에서는 151 bp repeated sequence를 포함하는 이질적인 유전인자군을 국내의 여러가지 벼 품종으로부터 확인하고 또한 식물 생장에 따르는 유전인자군의 변화를 관찰하여 short repeated sequence를 중심으로한 gene rearrangement를 살펴보고, 아울러 반복염기서열을 포함하는 유전인자군을 DNA sequence Database로부터 검색하여 이들의 유사서열관계를 비교분석하여 엽록체의 발달에 따르는 엽록체 DNA의 short repeated sequence에

의한 엽록체의 고유 환상 DNA의 재배열현상의 분자생물학적 의미를 규명하고자 시도하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

Tris Base, Sodium dodecyl sulfate (SDS), lysozyme, Triton X-100, Dithiothreitol(DTT), RNase A 등은 Sigma사의 Molecular Biology Grade를 사용하였으며, DNA polymerase(Klenow Fragment), Eco RI, Bam H I, Sau 3A I 등의 효소와 lambda Hind III size marker, dNTP, rATP 등은 Pharmacia 제품을 사용하였다.

벼 품종의 선발

벼 품종의 선발에 있어 국내외에서 재배되고 있는 대표적인 품종을 선발하였다. 본 실험에서는 indica type으로는 Labelle과, IR 31432를 선발하였고 japonica type으로는 전통적과 재배되어 온 추청을 선정하였다. 또한 통일계의 hybrid는 수원 230, 오대, 용주, 한양조 등을 선발하였으며, 찰벼계통으로는 신선찰벼와 한강찰벼를 선정하여 사용하였다. 이 품종시료들은 농촌진흥청 작물시험장으로부터 공급받아 사용하였다.

선발 품종의 발아 및 생장

위에서 선정된 품종의 벼로부터 또한 DNA를 추출하기 위하여 볍씨를 30°C로 유지된 암소에서 3일 동안 발아시켜 etiolate를 시료로 이용하였으며, 이것을 24시간 동안 빛에 노출시킨 조직을 seedling으로 사용하였다. 이때 성장한 뿌리부분을 따로 절단하여 뿌리시료로 이용하였으며, 총 1주일 동안 빛의 존재하에 발육시킨 식물체의 잎부분을 절단하여 young leaf로 이용하였으며, 포장에서 3개월 생육된 벼로부터 mature leaves를 사용하였다. 또한 proplastid로부터의 DNA 분리를 위하여서는 성숙된 벼 낱알에서부터 배아를 분리하여 직접 이용하였다.

벼 DNA의 분리

벼의 생장별 조직으로부터 DNA는 벼의 부위별 조직 100 mg을 액체 질소의 존재하에서 분쇄하여 Eppendorf tube에 옮긴 후 문 등의 방법⁹⁾을 이용하여 분리하였다.

DNA probe의 제조

151 bp repeated sequence를 포함하는 rpl2 probe로는 2.4 kb Eco RI-Eco RI fragment를 probe로 이용하였다 (Fig 1). Eco RI 제한효소로 절단한 DNA fragment를

1.0% low melting point agarose 상에서 전기 영동한 후 그 절편을 포함하는 agarose를 절취한 후 이를 65 °C에서 녹이고 이 용액을 phenol extraction 방법으로 처리하고 알콜 침전법으로 DNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 DNA 절편으로부터 alpha-32P-ATP(Specific activity: 800 Ci/mole)를 Random Primer Method로 삽입시켜 Radioactive DNA strand를 합성하였다.¹³⁾

Southern blot analysis

벼로부터 추출한 DNA를 각각의 제한효소로 절단한 후 Southern Blot analysis를 Sambrook 등의 방법을¹⁴⁾ 따라 하였다. 벼로부터 분리된 DNA를 각각의 제한효소로 절단한 후 0.9% Agarose Gel electrophoresis한 후 Nylon Membrane Filter(Nytran)에 10×SSC 용액의 존재하에 Blotting하고 이 membrane filter를 80°C에서 2 시간 동안 진공건조시켜 고정하였다. 이렇게 고정된 Membrane filter를 Prehybridization한 후 radioactive DNA probe를 섞어 Hybridization 하였다. 하루 동안 Hybridization된 Membrane Filter는 2×SSC 용액으로 30분 동안 2번 세척한 후 최종적으로 0.1×SSC, 0.1% SDS 용액으로 50°C에서 30분 동안 세척하고 X-ray Film (Agfa)에 감광시켜 Autoradiograph를 얻었다.

유사서열 유전자의 검색 및 유전자 염기서열 비교 분석

벼로부터 cloning된 151 bp 반복염기서열과 유사한 서열을 가진 유전자를 검색은 Gene Bank Database(R 71.0, NIH, USA)와 EMBL Sequence Database(R 20.0, European Molecular Biology Laboratory)에 수록된 염기서열을 이용하여 유사성을 검정하였다. 또한 검색된 유전자상호간의 유사서열의 배열상관 관계를 분석하기 위한 Harr Plot Analysis와 이들의 배열은 염기서열 분석 전산 프로그램인 DNASIS(ver 6.0, Hitachi, Japan) software를 이용하였다.

결과 및 고찰

151 bp 반복염기서열을 포함하는 유전자군

벼 엽록체 DNA에 있어 151 bp repeated sequence는 rbcL 유전인자의 3'downstream에 위치하고 있으며 또한 이는 두개의 inverted repeated sequence(IRS)와 large single copy(LSC) 영역의 접합점(J_{LA} and J_{LB})으로부터 2.5 kb에 위치한 rpl23 유전자와 유사한 염기 서열을 가지고 있다(Fig. 1). 또한 재배열된 6.9 kb Hind III 조각은 rpl2유전인자와 rbcL 유전인자를 모두 포함하고

있으며 이들은 151 bp repeated sequence에 의해 연결되어 있음이 밝혀졌다. 이러한 이질적인 유전자군의 유전자 재배열 현상이 151 bp repeated sequence에 의하여 일어나는 가능성을 찾기위하여 151 bp repeated sequence를 포함하는 2.4 kb rpl2유전자 조각을 probe로 이용하여 southern blot분석을 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 쌀 DNA를 EcoRI 제한효소로 절단한 후 rpl2 probe로 분석하였을 때 제한효소 지도에 의해서 예상할 수 있듯이 2.4 kb절편이 나타났다. 또 하나의 다른 3.5 kb절편은 rbcL probe를 이용하였을 때 동시에 나타나는 것으로 보아¹⁶⁾ 이는 rbcL유전자와 rpl2유전자를 포함하는 재배열 된 유전자군임을 알 수 있었다. 아울러 2.4 kb rpl2유전자 조각 이외에 3.0 kb 2.0 kb 등과 같은 minor band가 관찰되었는데 이들은 이미 알려진 제한효소 지도에 의하여 확인되지 않은 절편들이다. 그러므로 이러한 minor band의 존재는 151 bp repeated sequence에 의하여 재배열이 되어 생성된 새로운 유전인자군이라 할 수 있겠다.

이러한 이질적인 유전인자군의 존재를 더 확인하기 위하여 벼 DNA를 HindIII제한 효소로 분해한 후 rpl2 probe로 hybridization한 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 9.5, 8.0, 2.7, 1.3 kb 등의 절편이 주요한 제한효소 절편으로 확인될 수 있었다. 이들 중 9.5, 8.0, 2.7 kbp는 제

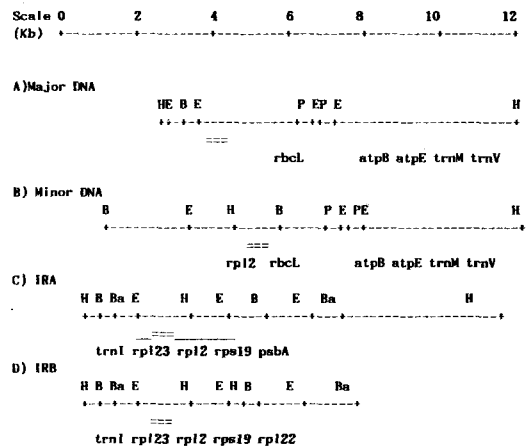


Fig. 1. Restriction map of gene clusters containing repeated sequence in rice chloroplast DNA. The gene cluster are the 9.5 Kb HindIII fragment containing rbcL gene (A), the one of the minor rearranged fragment containing rbcL and rpl2 gene (B), the junction part of the right inverted repeat sequence containing psbA gene (C), and of the left inverted repeat sequence (D), containing 151 bp repeated sequence. Probes used in this experiment are marked as line.

한효소지도에서 보는 바와 같이 각각 functional *rbcL* 과 *rbcL-rpl2* fused gene 그리고 functional *rpl2* 유전자 절편으로 이미 예상되는 절편이나, 1.3 kb 조각은 아직 확인되지는 않았으나 반복염기서열을 중심으로 재배열된 유전자군으로 유추된다.

생장발달에 따르는 유전인자군의 변화

이질적인 유전인자군의 존재와 유전자 재배열의 관계를 식물 발달에 따르는 생리적 의미를 고찰하기 위하여 벼의 잎이 생장되어 가는 동안 이질적 유전인자군의 제한 효소 절편의 양상을 관찰하였다. Fig. 2 와 Fig. 3에서 보는 바와같이 벼의 생장과 조직 부위에 따라서 유전인자군의 제한효소 절편양상은 조직부위에 따라 변화하였다. 특히 Etiolate, Seedling, 배아, 뿌리에서는 minor band의 상대적인 양이 상당량 존재하였으나, 성숙된 잎에서는 거의 발견되지 않았다. 재배열된 유전인자 중 *rbcL-rpl2* fused gene은 미토콘드리아 내에 존재한다고 보고된바 있으나,⁸⁾ 본 실험의 조직 부위별 양상의

분석 결과를 보면 plastid의 발달에 의한 엽록체 내에서의 반복염기 서열에 의한 다양한 유전적 재조합 현상이 가능하게 된다.

엽록체 내에서 유전자 재배열 현상이 일어난다면 그 결과로 나타나는 재배열된 이질적인 유전인자군은 매우 복잡하게 이루어 질 것이며 따라서 그 종류 매우 다양해질 것으로 보여진다. 이것은 엽록체 DNA의 독특한 구조인 두개의 inverted repeat sequence의 존재에 기인하는 것으로 반복 염기서열이 이 두개의 inverted repeat sequence에 존재할 때 매우 다양한 유전자 재조합 현상이 가능해지는 것이다. 그러나 본 연구에서 major band와 특정한 minor band의 변화가 관찰되었으며, 이는 또한 plastid의 발달과 동시에 수반되는 양상을 보여주고 있어 이들의 생물학적 의미는 엽록체의 발달과 관련되어 있을 가능성을 제시하고 있다. 또한 최근 담배 엽록체 DNA의 전사 조절에 관한 연구에서 엽록체가 발달함에 따라 이루어지는 전사수준에서의 조절은 매우 한정되어 있다는 실험결과,¹²⁾ 본 실험의 결과를 비교하여 볼 때 151 bp repeat sequence 등과 같은 반복염기서열의 존재와 이들에 의한 유전자 재배열의 현상이 엽록체의 발달과 관련된 유전인자의 발현에 관여 되어있을 가능성을 뒤받침 해 주고 있다.

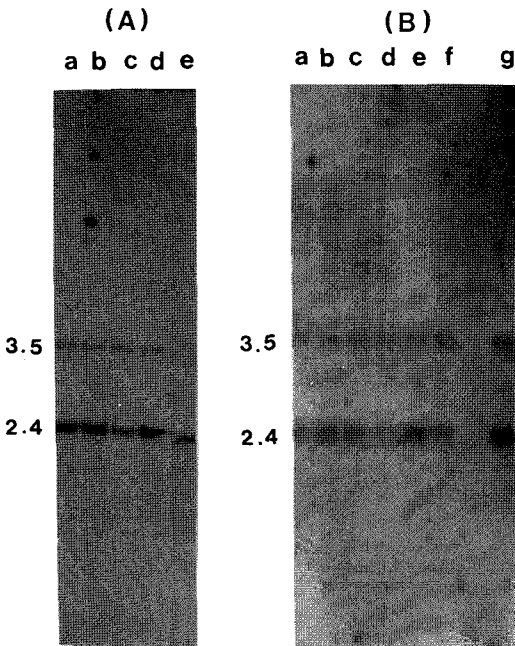


Fig. 2. Southern Blot analysis of Eco RI digested rice DNA hybridized with *rpl2* probe. In (A), DNA samples were prepared from etiolates (a), seedlings (b), roots (c), young (d) and mature leaves (e) of rice cultivar Labelle, respectively. In (B), DNA samples were isolated from embryo of rice cultivars, Suwon 230 (a), Shinseonchal wx (b), Odae (c), Yongju (d), Chucheong (e), Hankangchal wx (f), and IR31 432 (g).

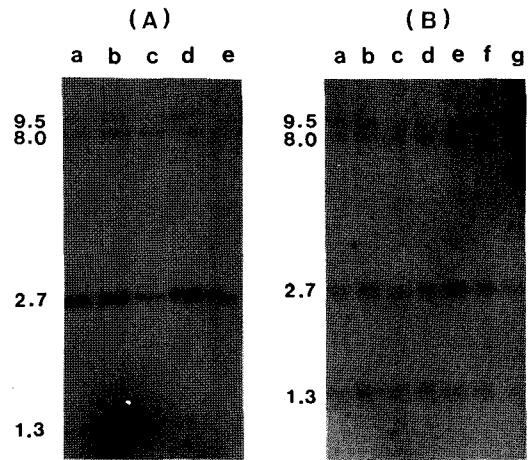


Fig. 3. Southern Blot analysis of HindIII digested rice DNA hybridized with *rpl2* probe. In (A), DNA samples were prepared from etiolates (a), seedlings (b), roots (c), young (d) and mature leaves (e) of rice cultivar Labelle, respectively. In (B), DNA samples were isolated from embryo of rice cultivars, Suwon 230 (a), Shinseonchal wx (b), Odae (c), Yongju (d), Chucheong (e), Hankangchal wx (f), and IR31 432 (g).

국내벼 품종에서의 이질적 유전인자군의 존재

151 bp repeated sequence와 유사한 서열을 갖는 반복염기 서열과 rpl2 유전인자를 포함하는 이질적인 유전인자군(heterologous gene cluster)의 존재를 확인하기 위하여 국내외에서 많이 재배되고 있는 indica type, japonica type 그리고 hybrid계통 벼의 배아로부터 DNA를 분리하여 제한효소로 처리한 후 southern blot 분석을 하였다. Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 대부분의 절편은 Labelle 품종의 제한효소 지도에 의하여 확인 될 수 있는 절편들이었다. 그러나 특이한 점은 다른 조직 부위에서 상대적으로 낮은 농도로 확인 된 절편들이, 배아로부터 얻어진 DNA에 있어서는 실험에 사용된 전 품종 모두 주요 절편들로 나타난 것이다. 이는 배아에 존재하는 proplastid는 엽록체의 전구체로서 엽록체로 완전하게 발달하기 이전이므로 유전자의 재배열 현상이 일어나기 이전의 유전자 배열 현상을 가지고 있을 것으로 유추되므로 성숙된 엽록체와의 차이가 매우 두드러지게 나

타난 것으로 해석될 수 있다. 따라서 본실험에서 얻어진 이러한 rpl2 유전인자를 포함하는 이질적인 유전인자군의 존재는 벼의 특정한 품종에만 국한된 현상은 아니고 벼에 있어서 전반적으로 일어나는 하나의 현상으로 여겨질 수 있으며, 이러한 결과는 벼엽록체 DNA내의 반복염기 서열에 의한 유전자의 재배열 현상이 엽록체의 발달과 매우 밀접하게 관여되고 있다는 가능성을 제시하고 있다.

엽록체 유전자내에서의 유사 반복 염기서열 비교분석

최근들어 유전자의 염기서열이 매우 급속하게 밝혀짐에 따라, 특히 그 구조가 매우 안정하게 유지되고 있다고 알려진 식물의 엽록체 유전자의 염기서열이 여러 식물에서 밝혀지고 있다. 지금까지 3개의 대표적인 식물 즉 Liverwort, Nicotiana, Rice 등의 엽록체 전 유전자의 서열이 이미 알려진 바 있으며, 이밖에 밀, 옥수수 등의 부분적인 유전자 서열이 알려지고 있다. 따라서 본실험에서 사용된 151 bp 반복염기서열에 의한 유전자 재조합 현상을 보다 면밀하게 검토하기 위하여 이 반복 염기서열과 유사한 염기서열의 존재를 벼를 비롯한 여러가지 엽록체 유전자와 상호 비교 분석하여 반복염기 서열 주변의 유전자 재배열 현상을 고찰하였다.

벼의 엽록체 유전자 내의 유전자 재배열이 가능한 151 bp 반복염기서열과 유사한 염기서열을 벼 엽록체 전 유전자 염기서열내에서 찾은 결과 반복염기서열내의 매우 다양한 길이별로 50% 이상의 유사성을 가지고 있는 유전자 부분이 22개 지역에서 검색되었다(결과는 보이지 않았음). 이미 앞에서의 결과에서 보아 알 수 있듯이, 특히 rbcL downstream 부분은 동일한 유전자로 100%

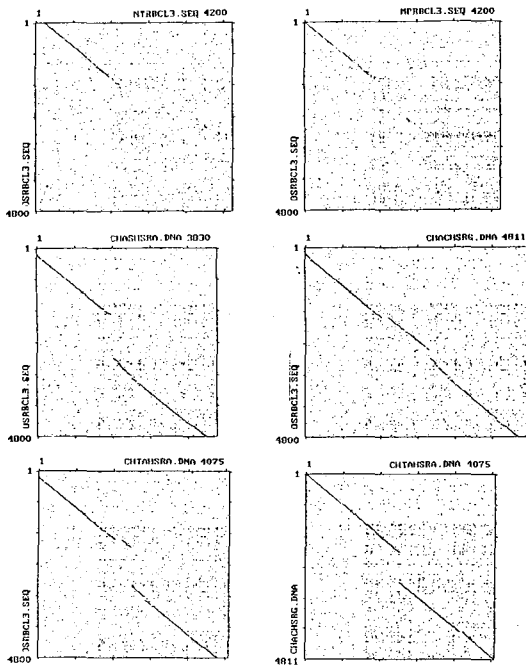


Fig. 4. Harr Plot Analysis of rbcL and its downstream region in chloroplast (ct) DNA in various plants. The number starts in each file from the starting codon of rbcL. Abbreviations in each axis are as follows. CHMPXX: Liverwort ct DNA, CHNTXX: Tobacco ct DNA, OSRBL: Rice ct DNA, CTAHSRA: Wheat ct DNA, CHACHSRG: Aegilops crass ct DNA, CHACHSRA: Aegilops crass ct DNA, CHTATSRA: Aegilops squarrosa ct DNA.

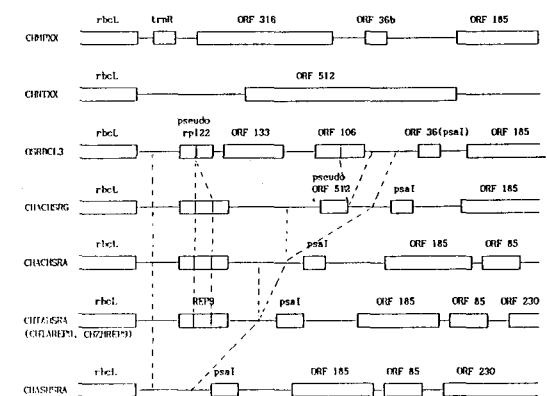


Fig. 5. The schematic comparison of 3'downstream of rbcL gene clusters containing the repeated sequence among various plant. The inserted sequence between plants are indicated by the dotted lines. The abbreviations are the same as in Fig. 4.

유사성을 보여주고 있으며, 또한 I_{RA} 와 I_{RB} 영역에 존재하는 functional rpl2 유전자와 부분적으로 일치하여 80% 이상의 유사성을 보여주고 있다. 이 밖의 유전자들과는 유사율이 유의성 있게 나타나고 있지 않으나, 특히 2개의 염기서열이 부분적으로 73%의 유사성을 보여주고 있는 부분은 psbA upstream 부분으로 short repeated sequence에 의한 유전자 재배열 현상을 예상할 수 있다. 이것은 이미 보고한 바와¹⁵⁾ 같은 psbA probe에 의한 Southern blot 분석결과 나타난 minor band인 이질적인 유전자군의 존재와 일치하는 것으로 short repeated sequence에 의한 재배열 결과인 것으로 유추된다.¹⁶⁾

아울러 여러가지 다른 식물의 엽록체 유전자 내에 유사 반복 염기 서열을 포함하고 있는 유전자군간의 상호 비교 분석은 반복 염기 서열에 의한 유전자 재배열 현상을 간접적으로 시사할 수 있는 중요한 단서라 하겠다. 벼 엽록체 151 bp 반복염기서열과 유사한 염기서열의 존재를 확인하기 위하여 벼 이외의 다른 식물의 엽록체 유전자내에서 검색한 결과 매우 다양한 유사율을 가지는 16개의 유전자군을 확인하였으며, 이들 중 70% 이상의 유의성 있는 유사한 유전자 부분들을 살펴보면 대부분의 식물에 있어서 functional rpl2 유전자와 유사한 것으로 나타났다. 이들 중 특이한것은 *Aegilops*, maize와 wheat 등의 엽록체 유전자 내에 유사 반복 염기서열이 functional rbcL 유전자와 psal 유전자사이에 존재하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 *Aegilops*, maize와 wheat 등의 엽록체 유전자 내에 유사 반복 염기서열을 포함하는 유전자군을 상호 비교하였다. 유전자군의 염기 서열을 비교 분석하기 위하여 Harr plot analysis(Fig. 4)를 하였고 이것을 토대로 하여 유전자간의 염기 서열을 비교하였다. 이 결과를 보면 표에서 보아 알 수 있듯이 반복염기 서열을 포함하는 유전자군 중 쌀과 liverwort간에 또한 쌀과 담배간에는 rbcL 유전자를 제외하고는 유사성이 전혀 없는 반면 쌀과 밀, 쌀과 *Aegilops*간에는 일부 유전자의 삽입된 형태를 제외하고는 유사성이 매우 높은 유전자 배열을 보여주고 있었다. 또한 밀(CHTAREP9)과 옥수수(CHZMREP9)에 존재한다고 알려진 반복 염기 서열은 일부 염기 서열이 삽입된 형태로 벼의 반복 염기 서열과 높은 유사성을 보여주고 있다. Harr plot analysis 결과를 토대로 유전자간의 각각의 염기 서열을 비교 분석하여 유전자 상호간의 관계를 모식도로 표시하였다(Fig. 5). 여러 식물의 엽록체 유전자에 있어 151 bp 반복 염기 서열을 포함하는 유전자군을 비교 분석한 결과, 이 표에서 보아 알 수 있듯이, 151 bp를 중심으로한 유전자 재배열 현상은 매우 단계적이었다. 즉, 벼 DNA에 있어서는 short repeated sequence에 의한 유전자 재배열을

통하여 가장 복잡한 형태의 유전자군을 형성한 반면, *Aegilops squarrosa*에 있어서는 반복 염기 서열이 존재하지 않는 가장 간단한 형태의 유전자군을 이루고 있다. 반면 밀과 옥수수는 반복 염기 서열이 삽입된 형태의 유전자군을 형성하고 있었으며, *Aegilops crassa*에서는 반복 염기 서열 아래 부분에 유사 ORF512를 포함하는 다소 복잡한 형태로 발전되어 왔다. 이에 반하여 벼 엽록체 DNA는 반복 염기 서열의 내부가 절단되어 나가고 유사 ORF512의 말단에 새로운 염기 서열이 삽입되어 ORF133과 ORF106을 이루는 가장 복잡한 형태의 유전자 군을 형성하고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 유전자 염기 서열 비교를 통하여 ORF36이라고 알려진 유전자는 psal 유전자로 확인할 수 있었다. 이상의 여러 식물간의 유전자 배열을 비교하여 보아 알 수 있듯이 반복 염기 서열 및 그 주변의 short repeated sequence를 통하여 유전자 재배열 현상이 이루어져 진화되어 왔음을 알 수 있다. 따라서, 이러한 유전자 재배열에 의한 새로운 유전자의 삽입과 이에 따르는 새로운 open reading frame(ORF)의 생성은 각 식물의 특성에 맞는 엽록체 유전자 구조를 이루게 된것으로 보여진다. 따라서, 엽록체 DNA에서의 유전자 재배열 현상은 진화적으로 이루어져 왔을 뿐만 아니라 한 식물에서의 엽록체 발달과 관련되어 재배열이 이루어 질것으로 유추된다. 특히, 이러한 재배열에 의한 새로운 ORF와 이들의 기능의 동정은 엽록체의 진화뿐만 아니라 엽록체의 발달에도 중요한 의미를 가질 수 있는 것으로 앞으로 연구되어야 할 과제라 하겠다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 교육부 학술 연구 조성(유전공학 분야) 연구비 지원에 의하여 수행된 연구사업으로 관계 당국에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Dcno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. & Sugiura, M. EMBO. J. 5, 2043 : 2049(1986).
2. Palmer J. D. Nature, 301, 92 : 93(1983)
3. Palmer, J. D. Curr. Genet. 11, 275 : 286(1987).
4. Stern, D. B. and Palmer J. D. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1946 : 1950(1984)
5. Day, A and Ellis, T.H.N. Curr. Genet. 10, 931 : 941

- (1986).
6. Howe, C. J. *Curr. Genet.* 10, 139 : 145(1985).
 7. Hirai, A., Ishibashi, T., Morikani, A., Iwatsuki, N., Shinozaki, K., and Sugiura, M. *Theor. Appl. Genet.* 70, 117(1985).
 8. Moon, E., Kao, T. H. and Wu, R. *Mol. Gen. Genet.* 213, 247 : 253(1988).
 9. Moon, E., Kao, T. H. and Wu, R. *Nucleic Acids Res.* 15, 611 : 630(1987)
 10. Wu, N., Cote, J., and Wu, R. *Devel. Genet.* 8, 339 : 350(1987)
 11. Moon, E. and Wu, R. *Gene* 70, 1 : 12(1988)
 12. Deng, X. W. and Gruissem, W. *Cell*, 49, 379(1987)
 13. Hodgson, C. P. and Fisk, R. Z. *Nucleic Acid Res.*, 15, 6295(1987).
 14. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. in 'Molecular Cloning, A Laboratory Manual', 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, USA.(1989)
 15. Nahm, B. H. and Moon E. *Proc. Plant Biotech. Symp.* 3, 391(1989)
 16. Nahm, B. H. and Kim, H. J. *Proc. Mol. Biol and Genet. Eng.* 5, 399(1990)

Gene Rearrangement through 151 bp Repeated Sequence in Rice Chloroplast DNA

Baek-Hie Nahm and Han-Jip Kim* (Department of Biology, Myungji University Department of Biology, Ajou University*)

Abstract : To investigate the gene rearrangement via short repeated sequences in chloroplast DNA, the pattern of heterologous gene clusters containing the 151 bp repeated sequence with the development of plastid was compared in rice and the homologous gene clusters from various plant sources were searched for comparative analysis. Southern blot analysis of rice DNA using rp12 gene containing 151 bp repeated sequence as a probe showed the presence of heterologous gene clusters. Such heterologous gene clusters varied with the development of plastid. Also it was observed that the heterologous gene clusters were observed in all of the rice cultivars used in this work. Finally the comparative analysis of DNA sequence of the homologous gene clusters from various plants showed the evolutionary gene rearrangement via short repeated sequence among plants. These results suggest the possible relationship between the plastid development and gene rearrangement through short repeated sequences.