

## 식물 칼모듈린 체계에 미치는 환경적 요인의 영향

오석홍<sup>1\*</sup> · 양문식<sup>2</sup>

<sup>1</sup>우석대학교 생물공학과, <sup>2</sup>전북대학교 분자생물학과

**초록** : 식물체내 칼모듈린과 칼모듈린 메틸화의 기능에 대한 정보를 얻기 위하여 칼모듈린 유도체(lys → ile 115 칼모듈린)를 발현시킬 수 있고 하이그로마이신(Hygroscopicin) 내성을 보일 수 있는 형질전환 담배 식물체와 하이그로마이신 내성만 보일 수 있는 형질전환 담배 식물체(대조구)가 *Agrobacterium*-mediated 형질전환을 통해 만들어 졌다. 이들 형질전환 담배 식물체로 부터 얻은 씨앗의 하이그로마이신 내성과 민감성에 대한 비는 예상대로 3:1을 보였다. Western blot과 Chemiluminescence 방법을 병행하여 형질전환 식물체(F<sub>1</sub>)의 잎으로 부터 칼모듈린 단백질을 검출한 결과 칼모듈린 단백질이 발현 되었음이 확인되었다. 두 형질 전환 담배 식물체로 부터 얻은 씨앗의 발아에 미치는 표피살균제의 영향을 조사해본 결과 칼모듈린 형질전환체의 씨앗은 살균수의 처리만으로도 MS 배지에서 씨앗 주변에 곰팡이 등의 오염없이 정상 발아되었으며, 대조구는 살균수와 차아염소산나트륨 용액(유효 염소 함유량 4%)을 1:1 배합하여 처리해주어야 오염으로 부터 벗어날 수 있었다. 칼모듈린 유도체를 발현 시키는 담배 씨앗과 대조구 담배 씨앗의 발아에 미치는 칼슘 농도의 영향을 조사해본 결과 저 농도의 칼슘을 함유한 MS배지에서는 초기 발아율에 있어 별 차이가 없었지만 고농도(예, 30 mM)의 칼슘 함유배지에서는 칼모듈린 형질전환체 씨앗의 발아가 대조구 형질전환 식물체 씨앗의 발아에 비해 월등하게 잘 되었다. 이와 같은 결과들로 부터 칼모듈린 유도체의 담배 세포내 발현은 각종 환경적 요인에 대한 담배 씨앗의 적응능력을 증진시키는 것으로 제안할 수 있겠다(1995년 12월 4일 접수, 1996년 1월 15일 수리).

### 서 론

식물의 경우 많은 외부 환경적요인들(예, rain, wind, touch, wounding, darkness, heat, cold, pathogen attack, salt, 등)에 의해 세포내 칼슘농도의 변화,<sup>1-4)</sup> 칼모듈린 mRNA의 증가,<sup>5)</sup> 활성산소들의 증가<sup>4,6)</sup>가 관찰된바 있다. 예를들면, Braam과 Davis의 *Arabidopsis*를 모델 식물로한 연구결과 얻어진 touch genes에 관한 보고<sup>5)</sup>는 매우 흥미롭다. *Arabidopsis*에 주기적으로 물을 주거나, 바람을 불어 주거나, 만져주거나 했을경우 이와같은 자극없이 자란 대조구 식물체에 비해 키는 현저하게 적어지고, 줄기는 두꺼워짐이 관찰되었으며, 칼모듈린의 mRNA가 무려 100배나 증가됨이 관찰되어 식물의 환경적응과 칼모듈린과의 관계가 시사된바 있다. 이와 같은 결과는 *Arabidopsis* 식물이 생존을 위해 각종 환경적 요인의 신호를 효과적으로 전달해 주기위한 체계의 일환으로 칼모듈린 mRNA를 많이 생성한 것으로 생각된다.

진핵세포 내에서 수많은 세포내 활성들의 조절에 관여하는 것으로 알려진 칼슘은,<sup>7,8)</sup> 많은 경우 칼슘조절 단백질인 칼모듈린을 통해서 그 조절능력을 발휘하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>9-11)</sup> 실제적으로 칼슘의 존재하에 칼모듈린은 수많은 효소들을 활성화 시키는 활성화제로서 역할을 하고 있어 칼슘신호의 세포내 중요한 조절자임을 보여주고 있다.<sup>9-11)</sup> 칼슘과 칼모듈린 의존형 NAD kinase는 대부분의 식물체<sup>12-14)</sup>와 일부 동물조직내

예를들면, sea urchin eggs,<sup>15)</sup> neutrophils<sup>16)</sup> 등에서 발견되는데 ATP의 존재하에 NAD를 NADP로 전환하는 효소이다. 동물 유래의 칼슘/칼모듈린-의존형 NAD 인산화 효소에 의해서 생성된 NADP가 NADPH로 전환된후 NADPH 산화효소의 작용으로 활성산소의 생성 및 방출을 촉진시켜 세포외막구조의 변형(예, sea urchin eggs,<sup>17)</sup> 병원균에 대항한 방어체계구축(예, neutrophils<sup>18)</sup>) 등의 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 현재로서, 식물에서 발견된 칼모듈린-의존형 NAD kinases의 역할에 대해서 확립된 이론은 없다. 그러나 이미 언급한 바와 같이 식물이 환경으로 부터의 병원균의 공격으로 부터 견디어 내기 위한 수단으로 과산화수소 같은 활성산소류를 방출하기 때문에<sup>4)</sup> 상기의 동물 모델 시스템에서와 같이 식물 NAD kinase가 식물 세포의 외막구조 변형이나 병원균에 대항할 목적으로 활성산소의 생성을 위한 NADP(H) 공급을 위해 역할을 할 수 있음을 가정해 볼 수 있겠다.

식물 유래의 NAD kinase 활성은 칼모듈린의 115번째 lysine의 메틸화에 매우 민감한 것으로 관찰되었다.<sup>19-21)</sup> 즉, 칼모듈린 메틸화는 칼모듈린의 NAD 인산화 효소의 활성화제로서의 기능을 현저하게 줄여주는 것으로 나타났다. 그러나 115번째 lysine을 site-directed mutagenesis에 의해 arginine 혹은 isoleucine으로 치환한 경우 이들 칼모듈린 유도체들은 메틸화 되지 않지만<sup>14,22)</sup> NAD 인산화 효소를 언제나 높은 정도로 활성화 시켰다.<sup>20,23)</sup>

찾는말 : 칼모듈린, 형질전환 식물체, 칼슘, 발아.

\*연락처자

또한 isoleucine 115 칼모듈린은 칼모듈린 메틸화 효소의 강력한 저해제로 작용함이 *in vitro* 실험 결과 밝혀져 관심을 끌고 있다.<sup>20)</sup>

본 연구에서는 칼모듈린의 유도체(lys → ile 115)를 발현시킨 형질전환 담배 식물체를 만들어 형질전환된 칼모듈린 고발현 담배 식물체로부터 얻은 씨앗과 대조구 식물체로부터 얻은 씨앗과의 발아 특성이 여러 환경적 요인에 따라 다름이 관찰되었기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

형질전환된 담배 식물체를 생성해 내는데 사용한 모든 시약은 하이그로마이신 (Hygromycin B, Calbiochem)을 제외하고는 모두 Sigma제를 사용하였으며, 담배의 품종은 *Nicotiana tabacum* L. cultivar Wisconsin 38이다. Phenyl-Sepharose는 Pharmacia제를 사용하였으며, PVDF-membrane은 Bio-Rad제, Western blotting detection reagents는 Amersham제를 사용하였다. 기타 화학약품은 특급 시약을 사용하였다.

### 칼모듈린 유도체의 식물세포내 발현

칼모듈린 유도체(lys → ile 115 calmodulin)의 유전자를 발현시키는 형질전환 담배 식물체는 Roberts 등<sup>21)</sup>이 사용한 방법에 준하여 제조하였다. 칼모듈린 유도체의 유전자는 pVUC-4 플라스미드로부터 얻어 35S promoter를 갖고 있는 pRT101 플라스미드<sup>24)</sup>에 클로닝한 후 35S promoter/calmodulin/poly A signal gene을 *Hind*III 제한효소로 잘라내어 pGDW31 binary vector(Hygromycin<sup>R</sup>)에 다시 클로닝하였다. 이렇게 재조합된 vector로 *E. coli* S-17<sup>25)</sup>을 형질전환 시킨후 이 형질전환체와 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101<sup>26)</sup>을 접합시켜서 칼모듈린 gene을 가지고 있는 재조합 vector가 *Agrobacterium tumefaciens*에 전달되도록 하였다. 이어 칼모듈린 돌연변이체의 담배 세포내 발현을 위해 Horsch 등<sup>27)</sup>이 개발한 일반적인 식물형질전환 기법을 사용하였으며, 이를 위해 tobacco leaf disks를 상기와 같이 준비한 *Agrobacterium tumefaciens*으로 감염 시킴으로써 세포내로 칼모듈린 유도체 유전자를 전달시키도록 하였다. 이어 비타민 혼합물, sucrose, biotin, agar 등이 함유된 Murashige and Skoog(MS) 배지, pH 5.8<sup>28)</sup>에서 캘루스를 유도해낸 후 생성된 캘루스를 isopentyladenine과 hygromycin(20 µg/ml)이 첨가된 MS 배지에 넣어 shoots를 유도한 후 자란 shoots를 잘라 indolacetic acid와 hygromycin(20 µg/ml)이 첨가된 MS배지에 심어 roots를 유도해 내었다. 건강한 뿌리가 달린 tobacco plants는 표준토양에 옮겨 온실조건에서 자라게 하였다. 한편 대조구로 사용하기 위해 하이그로마이신 내성만 보일 수 있는 형질전환 담배 식물체도 pGDW31 binary vector(Hygromycin<sup>R</sup>)를 사용하여 상기와 동일한 실험 과정을 통하여 제조

하였다.

### 형질전환 식물체의 칼모듈린 검출 및 정제

칼모듈린 유도체 단백질의 검출을 위해 먼저 담배 잎을 액체질소와 유발을 이용하여 마쇄하고 완충액(100 mM KPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 20 mM β-mercaptoethanol, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 % (w/v) polyvinyl pyrrolidone, pH 7.4)으로 추출하여 3겹의 거즈로 여과하고 원심분리한 후(19,000×g, 4°C, 30 min) 상등액 중의 총 단백질은 Bradford 법<sup>29)</sup>으로 정량하였다. 이어 총 단백질양으로 20 µg을 1 mM의 EGTA가 함유된 15% SDS-PAGE상에서 분리한 후 Western blot을 실시하였다. Western blot을 위해 분리된 단백질을 PVDF-membrane(0.2 micron, Bio-Rad)에 전기적으로 옮긴후 칼모듈린 항체와 반응시키고 이어 제2차 항체로써 peroxidase가 부착된 anti-rabbit-IgG를 사용하였다. 칼모듈린 항체는 lys115 칼모듈린으로 만든 폴리크로날 항체<sup>29)</sup>를 사용하였으며, 칼모듈린 단백질의 검출을 위해 최종적으로 사용한 시약은 Chemiluminescence 원리를 이용한 Western-blotting detection reagents (Amersham)이다. 추출액으로 부터의 칼모듈린 단백질은 Roberts 등의 방법<sup>21)</sup>에 준하여 황산 암모늄 분별침전, 황산을 이용한 등전 침전, 그리고 phenyl-Sepharose를 이용한 소수성 크로마토그래피<sup>30)</sup>를 실시하여 정제하였으며, 정제된 칼모듈린은 1 mM EGTA가 함유된 15% SDS-PAGE를 통하여 다시 확인하였다.

### 형질전환 담배 식물체 씨앗의 발아 특성

#### (1) 하이그로마이신 내성 실험

형질전환된 담배 식물체(F<sub>0</sub>)로부터 수확한 씨앗의 하이그로마이신 내성 검사를 위해 차아염소산나트륨 용액(유효 염소 함유량 4%)과 살균수를 1:1로 혼합하여 아래와 같이 표피 살균을 실시한 후 하이그로마이신이 50 µg/ml 함유되어 있는 MS agar배지<sup>28)</sup>에 치상하였다. 표피 살균처리 과정으로는 약 100에서 150개 가량의 씨앗을 1.5 ml Eppendorf 시험관에 넣은 후 살균액 1 ml를 가하여 20분간 inverting하여 주었다. 이어 살균액을 제거하고 살균수로 3회 씻어준 후 페트리디쉬의 MS agar 배지에 씨앗을 치상하였다. 페트리디쉬는 파라필름으로 밀봉한 후 26°C 생장상의 암조건에서 일주일간 발아시켰다. 이어 명조건에서 자라게 하면서 관찰 하였다.

#### (2) 표피살균제의 영향

형질전환된 담배 식물체로부터 수확한 씨앗의 발아에 미치는 표피 살균제의 영향을 알아보기 위해: i) 차아염소산나트륨 용액(유효 염소 함유량 4%)과 살균수를 1:3 혹은 1:1 등의 비율로 섞어서 사용한 경우; ii) 살균수 만 사용한 경우 등으로 나누어 칼모듈린 형질전환 담배 식물체로부터 얻은 씨앗과 대조구 담배 식물체로부터 얻은 씨앗의 발아정도를 비교하여 보았다. 표피 살균처리 과정 및 발아 과정은 상기와 같으며 각종

살균액 1 ml를 사용하였다.

(3) 칼슘농도의 영향

씨앗의 발아에 미치는 칼슘농도의 영향을 알아보기 위해 먼저 칼슘이 없는 MS 기본배지<sup>28)</sup>에 sucrose, biotin, 비타민, agar 등을 넣어 MS 배지를 조합 하였다. 이어 이 배지에 칼슘의 농도가 0 mM, 0.3 mM, 3.0 mM, 30 mM 되게 첨가한후 20분간 고압살균후 45°C까지 냉각하고 하이그로마이신을 50 µg/ml 되도록 가하여 MS 고체 배지를 만들었다. 씨앗의 표피 살균을 위해 차아염소산 나트륨 용액(유효 염소 함유량 4%)과 살균수를 1:1의 비율로 섞어서 사용하였으며, 씨앗의 표피 살균처리 과정 및 발아 조건은 상기한 바와 같다.

결과 및 고찰

형질전환 담배 식물체중의 칼모듈린 발현

식물 칼모듈린의 생체내에서의 기능을 조사하기 위하여 칼모듈린 단백질 유도체 (lys → ile 115 calmodulin)를 발현시키고 하이그로마이신 내성을 보일 수 있는

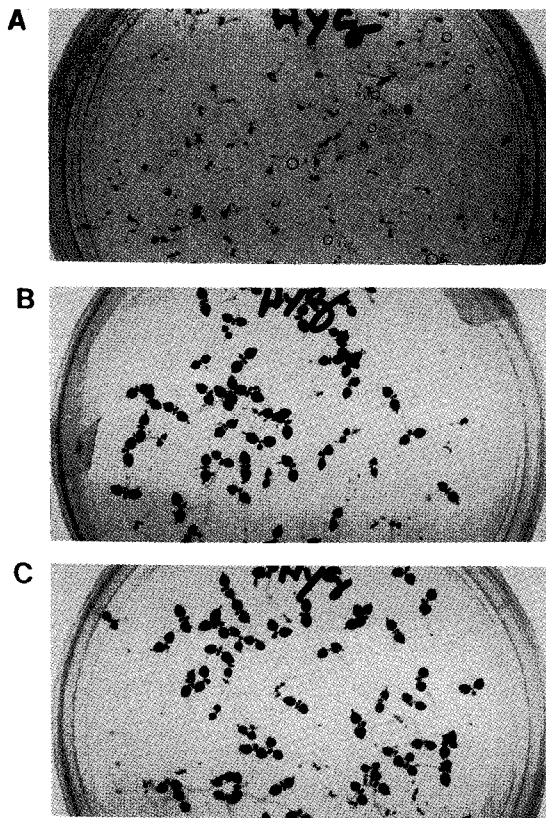


Fig. 1. Hygromycin resistance screening of tobacco seeds. Tobacco seeds were surface sterilized with 2%(v/v) sodium hypochlorite and were germinated on MS agar containing 50 µg of hygromycin per ml as described in Materials and Methods. A, seeds from untransformed tobacco plants; B, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector alone; C, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector containing 35S promoter/calmodulin/poly A signal gene(line 4-1).

형질전환 담배 식물체와 하이그로마이신 내성만 보일 수 있는 담배 식물체(대조구 식물체)를 *Agrobacterium tumefaciens* 형질전환 체계를 통해 만들었다. 이들 형질전환 담배 식물체로 부터 수확한 씨앗들은 50 µg/ml의 하이그로마이신이 함유된 배지에서 선택적으로 발아가 되었으며(Fig. 1), 분석해본 대부분의 씨앗들은 3:1의 하이그로마이신 내성:하이그로마이신 민감성의 비를 보여 주었다. 이들 식물체들 중의 칼모듈린 단백질 발현정도를 Western blot과 Chemiluminescence 방법을 병행하여 조사해본 결과 형질전환 되지 않은 담배와 하이그로마이신 내성 담배 식물체(대조구)로 부터는 식물체 고유의 칼모듈린 단백질 밴드 하나가 확인되었다(Fig. 2, lane 1, 2, 3). 반면에 칼모듈린 유도체의 유전자가 도입된 형질전환 담배 식물체로 부터는 두개의 칼모듈린 단백질 밴드가 확인되었다(Fig. 2, lane 4, 5, 6). 이는 담배 식물체 고유의 칼모듈린과 외부로 부터 도입된 칼모듈린 유도체가 1 mM EGTA를 함유하고 있는 15% SDS-PAGE 상에서의 이동 속도가 약간 다름<sup>21)</sup>을 응용한 발현분석 결과로써 조 추출액으로 부터 직접 유전자의 최종 산물인 칼모듈린 단백질의 발현 정도를 측정할 수 있어 매우 효과적이고 유용한 방법이라 여겨진다. 이 칼모듈린 유도체의 유전자는 합성 DNA로 부터 얻은 것으로서 시금치 칼모듈린과 소 뇌 칼모듈린의 conservative hybrid로 시금치 칼모듈린과는 5개의 아미노산이 다르며, 1 mM EDTA를 포함하는 SDS-PAGE상에서는 척추동물 유래의 칼모듈린과 동일한 이동 현상을 보여주고 있다.<sup>19,20)</sup> 밴드의 진하기 정도에 의한 발현정도는 외래

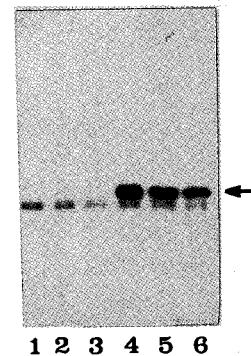


Fig. 2. Chemiluminescent detection of calmodulins from the tobacco plant extracts. 20 µg of protein from 2-month old tobacco leaf extracts was applied on 15% (w/v) SDS-polyacrylamide gel containing 1 mM EGTA to separate proteins. Proteins were blotted onto PVDF-membrane. After incubation with primary antibody(lys 115 calmodulin polyclonal antibody), anti-rabbit-IgG-peroxidase was used as a secondary antibody. For chemiluminescence detection, solutions from Amersham were used. Lane 1, calmodulin from untransformed tobacco plant; lane 2 and 3, calmodulins from transgenic tobacco plants transformed with binary vector alone(separate transformed line); lane 4, 5 and 6, calmodulins from transgenic tobacco plants transformed with binary vector containing 35S promoter/calmodulin/poly A signal gene(separate transformed line 4-1, 4-2, 4-3, respectively). The arrow indicates the position of foreign mutant calmodulin.

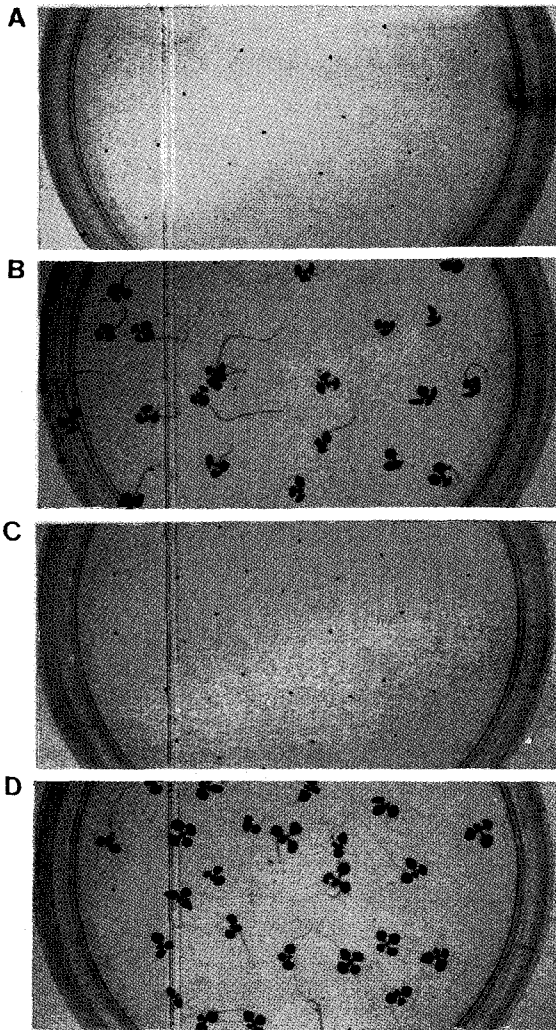


Fig. 3. Germination of transgenic tobacco seeds treated with sodium hypochlorite. Tobacco seeds were surface treated with 2% (v/v) sodium hypochlorite and were germinated on MS agar as described in Materials and Methods. A and B, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector alone, C and D, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector containing 35S promoter/calmodulin/poly A signal gene(line 4-1).

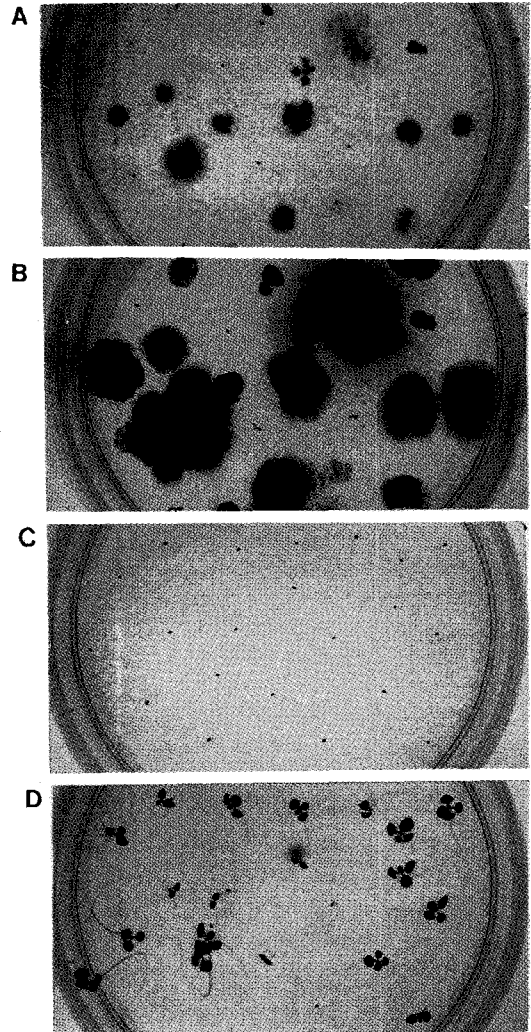


Fig. 4. Germination of transgenic tobacco seeds treated with sterilized water. Tobacco seeds were surface treated with sterilized water and were germinated on MS agar as described in Materials and Methods. A and B, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector alone; C and D, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector containing 35S promoter/calmodulin/poly A signal gene(line 4-1).

칼모듈린 단백질이 식물체 고유의 칼모듈린 단백질에 비해 적어도 2배 이상 높은 수준임을 알 수 있었다. 또한 칼모듈린 형질전환 담배 식물체의 성장 및 발달과정중의 transgene의 발현을 확인할 목적으로 발아초기의 씨앗으로부터 얻은 추출액중의 칼모듈린 단백질을 상기에 서와 같이 분석해본 결과 transgene product가 만들어졌음을 확인할 수 있었다 (data not shown). 이는 이미 보고된 다른 칼모듈린(lye 115 calmodulin)이나 칼모듈린 유도체(lys → arg 115 calmodulin)의 발현 정도<sup>21)</sup>와 유사한 수준으로 여겨지나 보다 더 정확한 정량적 분석 결과는 다른 방법(예, 경쟁적 radioimmunoassay)을 통해 얻을 수 있으리라 생각된다. 한편 칼모듈린 단백질을 정제하기 위해 가장 보편적으로 사용되는 phenyl-Sepharose 크로마토그래피<sup>30)</sup>를 포함한 방법들<sup>21)</sup>을 이용하여 담배

식물체로부터 칼모듈린 단백질을 정제한후 상기와 같은 조건에서 SDS-PAGE 분석을 하여 본 결과 Western blot과 Chemiluminescence를 병행하여 얻은 결과(Fig. 2)와 유사한 밴드 패턴을 보였다(data not shown). 이상의 결과를 종합해 볼 때 칼모듈린 단백질 유도체가 안정적으로 발현되고 하이그로마이신 내성을 보이는 담배 식물체와 칼모듈린 단백질 유도체는 발현되지 않지만 하이그로마이신 내성을 보일 수 있는 담배 식물체가 만들어졌음을 알 수 있다.

#### 씨앗 발아에 미치는 표피 살균제의 영향

F<sub>0</sub> 형질전환 담배 식물체로부터 얻은 씨앗을 MS 배지에서 발아 시킬 목적으로 표피 살균을 실시 하던중 칼모듈린 단백질 유도체가 발현되는 담배 식물체들로

부터 얻은 씨앗이 대조구 식물체들로 부터 얻은 씨앗에 비해 각종 표피살균제에 대해 다르게 반응을 보임이 관찰 되었다. 보편적으로 많이 이용되고 있는 차아염소산나트륨 희석액으로 처리한 후 배지에 치상하여 발아시킨 경우 대조구와 별다른 발아율에 있어 차이를 보이지 않았으나(Fig. 3), 살균수 만으로 처리한 경우 대조구 식물체들로 부터 얻은 씨앗은 MS 배지에서 씨앗 주변에 3일을 전후해서 곰팡이의 오염이 관찰되었고(Fig. 4A), 갈수록 점점 그 정도가 심해져 결국은 모든 씨앗의 발아가 저지됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 그러나 칼모듈린 단백질 유도체가 발현되는 담배 씨앗은 살균수의 처리만으로도 거의 모두 발아가 이루어져 곰팡이의 오염 정도가 심하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4C,D). 이상의 결과는 담배 식물 세포내 칼모듈린 유도체의 발현이 곰팡이가 싫어하는 어떤 물질을 생성하여 곰팡이의 근접을 막았을 가능성을 암시해 주는 것이어서 주목되고 있다. 이 어떤 물질의 후보로써 단연 꼽을 수 있는 것은 과산화수소와 수퍼옥사이드 같은 활성산소류일 것이다. 왜냐하면 활성산소류의 방출이 식물체가 환경으로 부터의 병원균의 공격으로 부터 견디어 낼 수 있는 수단 중의 하나가 되기 때문이다.<sup>4)</sup> *In vitro* 실험결과에 의하면 칼모듈린 유도체(lys → ile 115)는 메틸화 되지 않고 NAD 인산화 효소를 언제나 높은 정도로 활성화 시켰기 때문에<sup>20,22,23)</sup> 담배 세포내에서 NADP(H)의 생성을 촉진시켜 활성산소류의 생성에 관여할 수 있을 것으로 여겨진다. 앞으로 칼모듈린 유도체 고발현 담배 식물체내 니코틴 아마이드 보효소류의 농도측정 및 활성산소류의 농도 측정을 통해 칼모듈린 유도체 단백질의 발현과 곰팡이 내성과의 관계에 대한 답을 얻을 수 있을 것이다. 또한, 담배 모자이크 바이러스에 대한 감수성 테스트도 칼모듈린 유도체 단백질의 식물 세포내 기능에 관한 매우 유용한 정보를 제공해 줄 수 있을 것이다.

### 씨앗 발아에 미치는 칼슘농도의 영향

식물에 있어서 칼슘은 중요한 신호 전령의 하나로 씨앗의 발아, 세포 증식, 염색체 이동 등의 식물의 성장과 발달을 위한 조절에 깊이 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>31)</sup> 칼모듈린은 칼슘-의존형 단백질 인산화 효소(CDPK)와 더불어 식물 세포내에서 발견된 가장 잘 연구된 칼슘-수용체 단백질중의 하나이다.<sup>11)</sup> 따라서 칼모듈린 및 칼모듈린 유도체 등을 고발현시키는 식물체로 부터 얻은 씨앗은 칼슘농도에 따른 발아 특성이 다를 수 있음을 예견할 수 있다. 즉, 칼슘이 고갈된 배지나 칼슘이 과다한 배지에서 칼모듈린이 많으면 이들의 스트레스를 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 기대된다. 형질전환 담배 식물체(F<sub>0</sub>)로 부터 얻은 씨앗의 발아율을 하이그로마이신이 함유된 MS agar 배지에 칼슘농도를 달리하여 치상한 후 초기 2주간에 걸쳐 조사하였다. Table 1에서와 같이 칼슘을 함유하고 있지 않거나 칼슘을 0.3 mM 혹은 3.0 mM 함유하고 있는 MS agar 배지에

Table 1. Germination frequency of transgenic tobacco seeds on MS agar with various amounts of calcium chloride.<sup>a</sup>

Condition	tobacco	germinated well (%)	germinated poorly (%)	germinated not (%)
0.0 mM CaCl <sub>2</sub>	control	55(3)	3(1)	42(3)
	line 4-1	57(5)	13(1)	30(4)
0.3 mM CaCl <sub>2</sub>	control	59(4)	20(2)	21(1)
	line 4-1	58(7)	20(3)	22(4)
3.0 mM CaCl <sub>2</sub>	control	75(1)	21(2)	4(3)
	line 4-1	72(1)	17(5)	11(5)
30 mM CaCl <sub>2</sub>	control	30(2)	56(6)	14(4)
	line 4-1	69(1)	16(3)	15(4)

a. Tobacco seeds(100-150) were surface sterilized with 2%(v/v) sodium hypochlorite and were germinated on MS agar containing 50 µg of hygromycin per ml as described in Materials and Methods. Control, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector alone; line 4-1, seeds from transgenic tobacco plant transformed with binary vector containing 35S promoter/calmodulin/poly A signal gene(line 4-1). The values in the parenthesis represent the standard error of the mean percent value of 3 independent determinations.

서는 칼모듈린 유도체 발현 식물체 씨앗과 대조구 식물체 씨앗간에 발아율에 있어 큰 차이는 없었다. 다만 칼슘이 없는 배지상에서 칼모듈린 유도체 발현 씨앗의 미발아율(30%)이 대조구 씨앗의 미발아율(42%)보다 낮은 것으로 나타나 이는 세포내 증가된 칼모듈린과 씨앗중에 기 함유되어 있는 칼슘과의 상호 작용의 결과라 여겨진다. 배지중의 칼슘 농도가 30 mM 일 경우 예는 칼모듈린 유도체 발현 씨앗이 월등히 잘 발아 되었으며 (69%), 대조구 씨앗의 발아는 저조하였다(30%)(Table 1). 한편, 대조구 씨앗의 56% 정도는 느리고 불완전하게 발아되었으며 이를 발아로 간주한다면 전체적인 미발아율에 있어서는 차이가 없음을 알 수 있다. 이와같이 고농도의 칼슘존재 하에 칼모듈린 발현 씨앗의 초기 발아가 양호한 것은 칼모듈린이 칼슘과 결합하여 완충 작용을 해 주었거나, 칼모듈린이 Ca<sup>2+</sup>-ATPases의 활성화<sup>32)</sup>를 통하여 세포내 칼슘항상성 유지기능을 보강해 주었기 때문이라 여겨진다. 또한, 칼모듈린 단백질의 증가로 인한 다른 칼슘결합단백질의 homeostasis나 활성화에 변화가 생겨 칼슘 스트레스를 완화 시키는 작용이 증진 되었을 가능성도 배제할 수 없다.

### 감사의 글

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 pVUC-4 플라스미드와 칼모듈린 항체를 제공해준 테네시주립대 생화학과 Daniel M. Roberts 교수께 감사드리며, 본 연구 수행에 조력해준 김강민, 맹일경군 에게도 사의를 표합니다.

## 참고 문헌

1. Knight, M. R., A. K. Campbell, S. M. Smith and A. J. Trevas (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**, 524-526.
2. Knight, M. R., S. M. Smith and A. J. Trevas (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4967-4971.
3. Knight, M. R., N. D. Read, A. K. Campbell and A. J. Trevas (1993) Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *J. Cell Biol.* **121**, 83-90.
4. Mehdy, M. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**, 467-472.
5. Braam, J. and R. W. Davis (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**, 357-364.
6. Prasad, T. K., M. D. Anderson, B. A. Martin and C. R. Stewart (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74.
7. Poovaiah, B. W. and A. S. N. Reddy (1987) Calcium messenger system in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **6**, 47-103.
8. Berridge, M. J. (1990) Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* **265**, 9583-9586.
9. Klee, C. B. and T. C. Vanaman (1982) Calmodulin. *Adv. Prot. Chem.* **35**, 213-321.
10. Cohen, P. and C. B. Klee. (1988) Calmodulin; Molecular Aspects of Cellular Regulation. Vol. 5, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
11. Roberts, D. M. and Harmon, A. C. (1992) Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.
12. Muto, S. and S. Miyachi (1977) Properties of a protein activator of NAD kinase from plants. *Plant Physiol.* **59**, 55-60.
13. Anderson, J. M. and M. J. Cormier (1978) Calcium-dependent regulator of NAD kinase in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**, 596-602.
14. Roberts, D. M., S.-H. Oh, L. Besl, C. D. Weaver and G. Stacey (1990) Attenuation of calmodulin-dependent NAD kinase activation by posttranslational methylation. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **9**, 67-84.
15. Epel, D., C. Patton, R. W. Wallace and W. Y. Cheung (1981) Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: an early event of fertilization. *Cell* **23**, 543-549.
16. Williams, M. J. and H. P. Jones (1985) Calmodulin-dependent NAD kinase of human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**, 80-87.
17. Shapiro, B. M. (1991) The control of oxidative stress at fertilization. *Science* **252**, 533-536.
18. Baggiolini, M. and M. P. Wymann (1990) Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 69-72.
19. Roberts, D. M., R. Crea, M. Malecha, G. Alvarado-Urbina, R. H. Chiarello and D. M. Watterson (1985) Chemical synthesis and expression of a calmodulin gene designed for site-directed mutagenesis. *Biochem.* **24**, 5090-5098.
20. Roberts, D. M., P. M. Rowe, F. L. Siegel, T. S. Lukas and D. M. Watterson (1986) Trimethyllysine and protein function: Effect of methylation and mutagenesis of lysine 115 of calmodulin and NAD kinase activation. *J. Biol. Chem.* **261**, 1491-1494.
21. Roberts, D. M., L. Besl, S.-H. Oh, R. V. Masterson, J. Schell and G. Stacey (1992) Expression of a calmodulin methylation mutant affects the growth and development of transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8394-8398.
22. Oh, S.-H. and D. M. Roberts (1990) Analysis of the state of posttranslational calmodulin methylation in developing pea plants. *Plant Physiol.* **93**, 880-887.
23. Oh, S.-H. (1992) Calmodulin and posttranslational calmodulin methylation. *Biochem. News* **12**(3), 160-171.
24. Topfer, R., V. Matzeit, B. Gronenborn, J. Schell and H.-H. Steinbiss (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl. Acids Res.* **15**, 5890.
25. Simon, R., U. Priefer and A. Puhler (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **7**, 784-791.
26. Koncz, C. and J. Schell (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
27. Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
28. Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473-497.
29. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
30. Gopalakrishna, R. and W. B. Anderson (1982) Calcium induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-Sepharose chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830-836.
31. Hepler, P. K. and R. O. Wayne (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
32. Dieter, P. and D. Marme (1983) The effect of calmodulin and far-red light on the kinetic properties of the mitochondrial and microsomal calcium-ion transport system from corn. *Planta* **159**, 277-281.

---

**Environmental effects on plant calmodulin system**

Suk-Heung Oh<sup>1\*</sup> and Moon-Sik Yang<sup>2</sup> (<sup>1</sup>*Department of Biotechnology, Woosuk University, Chonju 565-800, Korea;* <sup>2</sup>*Department of Molecular Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756*)

**Abstract** : Transgenic tobacco plants expressing calmodulin derivative(lys → ile 115 calmodulin) and hygromycin resistance genes or hygromycin resistance gene alone(control) were generated by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Seeds obtained from the transgenic plants(F<sub>2</sub>) were tested for resistance to hygromycin and the expected 3 : 1 ratio was observed. The expression of calmodulin derivative in the tobacco plants was identified by a combined method of Western blot and Chemiluminescence. The effects of surface sterilizers on the germination of seeds from transgenic tobacco plants were tested in Murashige and Skoog agar medium. Seeds obtained from transgenic tobacco plants expressing the calmodulin derivative showed no fungi contamination with normal germination by treating with sterilized water alone or sodium hypochlorite(2% effective chlorine). In contrast, seeds from the control transgenic tobacco plants showed severe contamination with fungi by treating with sterilized water alone and showed no contamination with normal germination by treating with sodium hypochlorite(2% chlorine). The effects of calcium concentration on the germination of seeds from transgenic tobacco plants were tested in Murashige and Skoog agar medium. Seeds obtained from transgenic tobacco plants expressing the calmodulin derivative showed better germination frequency than that of the control transgenic tobacco seeds in the medium containing 30 mM CaCl<sub>2</sub>. The data raise the possibility that the expression of calmodulin derivative gene in tobacco plants could increase adaptability of the seeds to environmental stresses.

---

\*Corresponding author