생명과학회지
Korean J. Life Science, 8(1), 8-13, 1998

PCR 기법을 사용한 옥수수 미토콘드리아 변이체 (NADH-dehydrogenase)의 선별과 재분화

설 일 환†

경북대학교 농업과학 기술 연구소

Identification of mitochondrial mutant (NADH-dehydrogenase) using PCR method and regeneration of mutants from *Zea mays*

Ill-Whan Sul†

Kyungpook National University, Institute of Agricultural Science Technology

Abstract

The maize mitochondrial mutant (NCS2) is derived from homologous recombination between genes encoding NADH dehydrogenase subunit 4 and subunit 6. Plants from mitochondria mutants exhibited severe retarded growth and development including dwarfism and striping on the leaves. Aborted embryos from NCS2 mutants have been rescued and cultured on the N6 medium supplemented with 2,4-D 1 mg/l. Most calli from NCS2 aborted embryos showed slow growing pattern at first stage. However, upon continuous culturing them on the medium, those were segregated into mutant and normal callus lines. These segregations could be detected by using PCR method with three primers. Such segregation seems to be resulted from the preferential growth of normal cells over the mutant cells on the normal culture condition. Therefore, this method can be used for determining rate of indirect cytoplasmic segregation by estimating amplified band intensities. When NCS2 mutant callus lines cultured on regeneration medium, no adventitious shoot induction was observed. However, callus lines with more mitochondria induced adventitious shoots. These studies suggest that mitochondria NADH-dehydrogenase for electron transport in the inner membrane of mitochondria is essential for the differentiation and development of plants.

Key words : *mitochondria, mutant, NADH-dehydrogenase, callus, PCR*

서 론

미토콘드리아는 생물체가 필요한 energy (ATP)를 생성하는데 가장 중요한 역할을 담당하는 기관일 뿐 만 아니라 세포질 웅성불임 생성에 관여하는 아주 중요한 기관이다[8, 16]. 특히 옥수수 미토콘드리아에서 기인된 변이체들은 일반적으로 식물 성장이 저해되어 왜소한 형태가 생성될 뿐만 아니라 잎에서 반점이나 줄(striping)등이 생성이 된다.

† Corresponding author

NCS (Non Chromosomal Stripe)란 핵내에 존재하는 염색체들의 변이에서 생성되는 것이 아니라 세포질 즉 대부분 미토콘드리아에 의해서 생성이 되는 것을 일컬으며 옥수수에서 여러 가지 종류의 NCS 변이체가 발견되었다[11]. NCS 변이체들은 대부분 미토콘드리아에서 필수적인 유전자의 변이에 의해서 야기 되다고 보고되었다. 알려진 옥수수의 변이체를 보면 NCS 5 와 6 는 전자전달계의 마지막에 관여하는 cytochrom oxidase의 subunit 2 (COX II)에 관여하는 유전자가 변이 되었고, NCS2는 NADH-dehydrogenase subunit 4 (NAD4)의 유전자가 재조합으로 인해 변이가 생긴 경우이다[7,10,11]. 이들 변이체들은 전자전달계에서 임무를 원활히 수행하지 못함으로 인하여 식물의 성장이 억제되거나 표현형 (잎의 형태, 크기 그리고 반점) 들의 변이를 야기시킨다.

NCS2의 경우는 NADH-dehydrogenase subunit 4 와 subunit 7의 유전자들에서 CAGAACAAAAGGGAAG의 부분에서 서로 상동 재조합 (homologous recombination)이 일어나서 3' 부분의 subunit 4 와 5' 부분의 subunit 7의 유전자들이 소실되어 하나의 새로운 유전자가 생성이 된 경우이다[10]. 이들 유전자들의 변이로 말미암아 Complex I의 생성이 원활하지 않고 이로 인한 전자 전달을 이행하지 못함으로 인하여 ATP 생성이 방해를 받아 결국에는 식물 성장에 많은 지장을 초래한다고 보고되었다[2,13].

하나의 세포 내에서 정상적인 미토콘드리아나 비정상인 미토콘드리아들만 존재할 때 이를 homoplasmic line들이라고 하고 이들의 혼합된 상태를 heteroplasmic line들이라고 한다. 이론적으로는 homo와 heteroplasmic의 한 세포 내에서 공존이 가능하나 실질적인 증거는 아직까지는 미흡한 상태이다. 본 연구는 선발된 미토콘드리아 변이체들 (NCS 2)에게서 채취한 미성숙 배에서 callus를 유도하여 기내에서 증식을 시킴으로서 변이된 미토콘드리아 와 정상적인 미토콘드리아의 분리를 PCR을 통하여 확인하고 분리된 각각의 callus line에서 재분화를 시도하여 전자전달계 내의 변이가 실질적으로 재분화에 어떤 영향을 미치는가의 대한 관계를 관찰하고자 하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

옥수수의 미토콘드리아의 변이체 선발과 기내에서 증식과 재분화 유도

이 실험에서 사용된 시료는 NCS2 변이체로 이들의 생성은 cmsT (세포질 웅성불임체)에서 발생하며, 일반적으로 정상적인 식물과 비교하여 성장 상태 즉 키, 잎의 크기와 변이 상태 등에 입각하여 먼저 선발한다. 선발된 변이체들은 수정후 약 7 일에서 10 정도에서 ear들을 채취하여 일반적인 소독 방법에 의하여 표면 살균한 후 각각의 kernel에서 미성숙 배를 채취하여 2,4-D 1 mg/l 와 25mM의 proline을 첨가한 N6 배지에서 TypeII callus 유기 시켰다[3]. 정기적으로 3 내지 4주 간격으로 계대 배양을 하여 지속적인 callus의 성장을 유기 시켰다. 재분화는 선발된 callus들은 BA 1 mg/l를 첨가한 N6 배지에 치상하여 유도하였다.

미토콘드리아 변이체의 선발

NCS2 변이체는 미토콘드리아 내의 전자전달계에서 NADH dehydrogenase를 구성하는 subunit 4 와 7 의 유전자들이 재조합에 의해서 생성이 된 것으로 알려졌다[10]. 재 조합된 부분에서 upstream과 down stream의 NAD4 유전자의 2 개의 primer를 조성하고 또한 NAD7의 재조합 영역 downstream에서 1 개의 primer를 작성하여 3개의 primer를 동시에 사용하여 callus에서 변이체를 선발하는데 사용하였다 (Fig. 1). NCS2 변이체의 재조합 영역의 좌우에서 PCR primer들의 sequence 들은 다음과 같다.

Primer 1 (common) : 5' AAAAAGAAAAGCAAGGAC-CACTACG 3'

Primer 2 (normal) : 5' GCCCAGCCCACTATTACTA-CAAAAA 3'

Primer 3 (mutant) : 5' CGTCTGTGATTTAATCGGCC-CTAAG 3'

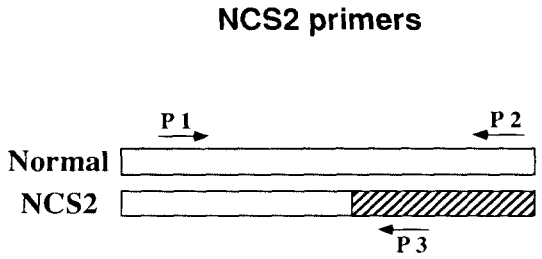

Fig. 1. Hypothetical PCR amplification using 3 different primers. Normal band is larger than mutant band.

각기 다른 미성숙 배에서 유기 되어 성장하고 있는 callus 들을 지름이 2mm 정도의 크기로 채취하여 원심 분리 튜브에 넣는다. 15 ul의 0.2 N NaOH를 첨가한 후에 callus를 잘 분쇄한 후 5 분간 microwaving 시킨다. 다시 15 ul의 0.2 N HCl을 첨가한 후 잘 혼합하여 10,000g 로 5 분간 원심한 후 1 ul를 PCR 증폭하는데 사용하였다. PCR의 조건은 primer 2개 대신에 3개를 사용한 것을 제외하고는 일반적인 방법을 사용하였다. 즉 25 ul의 volume에서 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 1.5 mM dNTPs, 100 ng의 각각의 primer들, 1 Unit의 Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus)를 사용하였다. PCR의 증폭은 94℃에서 30 초, 55℃에서 30 초, 72℃에서 1 분으로 30 cycle로 수행한 후 2%의 agarose를 사용하여 전기 영동 후에 증폭된 DNA band들을 UV상에서 확인하였다.

결과 및 고찰

2,4-D를 첨가한 N6배지에 치상한 미성숙 배에서 대부분의 callus가 유도되었지만 NCS2 aborted kernel들에서 유래한 대부분의 callus line들은 성장 속도가 아주 저해되는 것이 관찰되었다. 약 6개월의 지속적인 계대 배양을 통하여 이들의 callus line들을 증식 시킨 후 약간의 sample을 채취하여 PCR을 수행하였다. 정상적인 배에서 유래한 callus line들과 미토콘드리아 mutant 배에서 유래한 callus line들을 3 가지 primer들을 동시에 섞은 후 PCR을 수행한 결과, 정상적인 개체에는 하나의 DNA band가 증폭되었고, aborted kernel들에서 유래한 callus line들에서는 서로 다른 형태의 band들이 생성된 것을 관찰하였다 (Fig. 2). 즉 mutant band들만 증폭이 된 경우, mutant와 정상적인 band가 동시에 증폭된 경우로 관찰되었다 (Fig. 2). 따라서 이들 mutant callus line들은 heteroplasmic 한 경우가 대부분으로 생각된다. Marienfeld et al. (1993)은 3가지의 PCR primer들을 동시에 상용하여 NCS6 미토콘드리아의 변이체 (Cox II)를 선별하는데 사용하였다. NCS2의 경우도 미토콘드리아 변이체 구별과 선별에 있어서 이와 같은 방법이 효과를 보여주었다.

변이된 미토콘드리아들로 만 구성된 세포들 (즉 homoplasmic)은 세포 대사가 원활하지 못하여 실질적으로는 세포

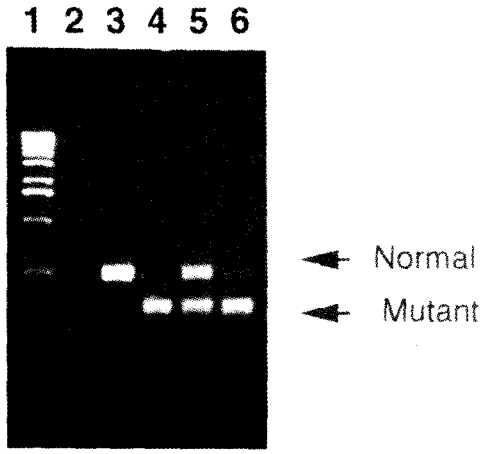

Fig. 2. PCR amplification of calli derived from normal and mutant mitochondria.
Lane 1 : 1 kb ladder
2 : control
3 : from normal
4−6 : from different callus lines

분열을 하지 못하거나, 또는 체세포 분열에 하는 동안 정상적인 미토콘드리아를 가지는 세포들과의 증식 속도가 비교할 수 없을 만큼 차이가 나서 단시간 내로 정상적인 세포가 비정상적인 세포를 압도할 수 있다고 생각된다. 이러한 양상은 증폭된 DNA band의 양에 따라서 간접적으로 추측할 수 있다. Fig. 2의 5 번과 6 번의 경우들 은 2 개의 band들이 증폭되었지만 5 번의 경우에는 비슷한 band의 intensity로 정상적인 미토콘드리아와 비정상적인 미토콘드리아가 세포 내에 비슷하게 존재하고 있다고 생각된다. 반면에 6번의 경우에는 비정상적인 미토콘드리아가 많이 존재하고 있다고 생각된다.

Fig 2의 4 번의 경우 mutant band만 증폭이 되어 하나의 callus line을 mutant 미토콘드리아만 존재한다고 생각된다. 이러한 가설을 입증하기 위하여 4 번에서 선발된 mutant callus line을 6 개월 동안 지속적인 계대 배양을 하여 다시 7 개의 callus line들로 증식을 시켰다. 이들은 같은 origin을 가진 callus line들로서, 위와 같은 방법으로 PCR의 재 수행한 결과, 서로 다른 DNA band 양상이 나타났다 (Fig. 3). 5번의 callus line들은 단지 mutant band들만 증폭이 되었으나 다른 line들은 증폭된 양은 다

르지만 2 개의 DNA band들이 나타나는 것이 관찰되었다. Fig. 2에서 선발된 original callus line에서 단지 mutant band들만 나타났지만 실질적으로는 PCR 증폭에서도 감지할 수 없을 정도의 정상적인 미토콘드리아를 함유한 것으로 사료된다. 따라서 세포가 분열이 됨으로서 인하여 정상적인 미토콘드리아를 가진 세포의 성장과 증식이 mutant 미토콘드리아를 가진 세포보다 빠름으로 인하여 처음에는 극소수의 세포에서 존재하는 미토콘드리아는 체세포 분열을 거듭함으로서 정상적인 미토콘드리아를 가지고 있는 세포로 전위된다는 것을 의미하고 또한 정상적인 미토콘드리아를 포함하는 세포들이 궁극적으로는 callus line에서 압도적으로 우위를 차지한다는 것이다. 따라서 Fig. 3에서 1, 2, 3, 4, 6 번 그리고 7번의 callus line들은 이런 과도기를 거치는 중간 단계라고 생각된다. 특히 2번과 4번 의 callus line들은 정상적인 band의 증폭이 상당히 적은 경우로 미루어 보아 정상적인 미토콘드리아들의 분리가 아직 초기 단계라고 사료되며, 3, 6 그리고 7 번 callus line들은 정상적인 미토콘드리아와 mutant 미토콘드리아의 분리가 상

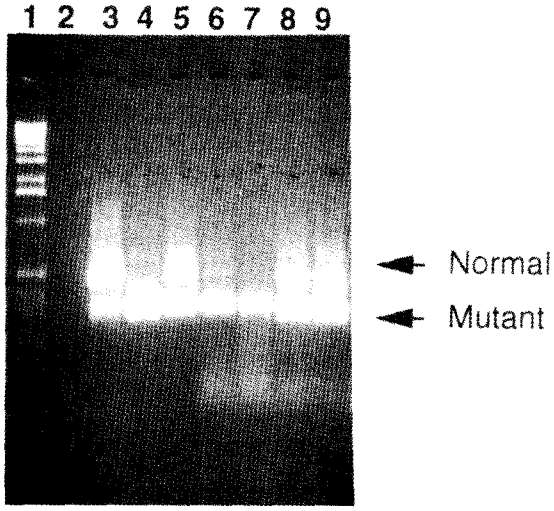

Fig. 3. PCR reamplification of callus derived from #4 (Figure 1) after six months subculture *in vitro*. Calli were subdivided into seven and cultured independently.
Lane 1 : 1 kb ladder
2 : control
3−9 : different callus lines

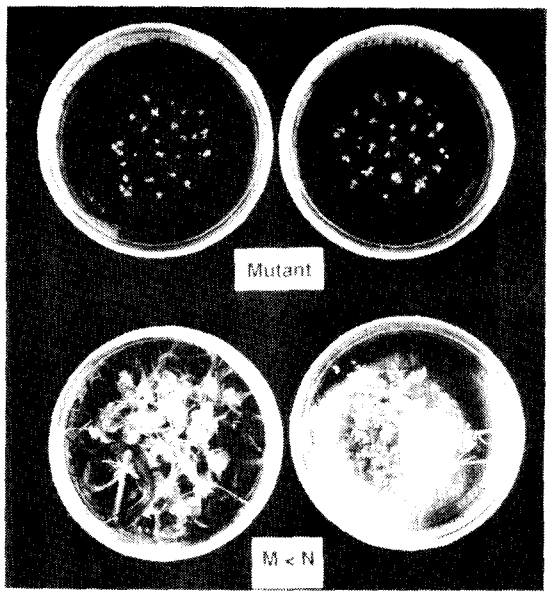

Fig. 4. Regeneration of NCS2 callus lines from homoplasmic (mutant) and heteroplasmic mitochondria (M<N) mutants. Mutant homoplasmy indicates only mutant band appeared after PCR amplification but heteroplasmic cases (M<N) indicate that normal bands show more intense than that of mutant.

당히 진행이 된 상태를 나타내며 1번의 callus line은 정상적인 미토콘드리아들이 비정상적인 미토콘드리아 보다 우세한 경우를 나타낸다. 따라서 세포 내의 미토콘드리아들은 체세포 분열시 random으로 이분이 되어 생성이 되며, 세포 내에 mutant 미토콘드리아 많이 존재할 경우 세포의 성장과 증식 속도는 느려지나, 반면에 세포 내에 정상적인 미토콘드리아 존재가 많아지면 세포의 증식 속도는 가속화되어 끝내는 cell line들을 점유하게 된다고 판단된다.

미토콘드리아 변이를 가진 세포들이 재분화에 영향을 미치는 정도를 알기 위하여 선발된 callus line들을 Duncan과 Widholm (1986)의 방법, 즉 BA 1 mg/l를 첨가한 N6 재분화 배지에 치상하여 유기 시켰다. 치상 후 6주후에 관찰한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 mutant 미토콘드리아 band만 감지된 callus line에서는 재분화가 전혀 되지 않았지만 정상적인 미토콘드리아가 mutant 보다 증폭 율이 많

은 callus line (M : mutant〈N : nomal)에서는 재분화가 잘 일어나는 것을 관찰하였다. 이러한 견지로 볼 때 미토콘드리아 내에서의 변이 즉 전자전달계 내에서의 변이는 식물의 재분화에 직접적인 영향을 미치는 것을 알 수 있다. Mutant 미토콘드리아가 많은 callus line에서는 부정 줄기의 유기가 전혀 되지 않고, 반면에 정상적인 미토콘드리아가 많을수록 부정 줄기가 형성되는 것을 알 수 있다 (Fig. 5). 서로 다른 heteroplasmic callus line들에서의 재분화에서는 각각의 특이한 양상을 보여주고 있다 (Fig. 5). M=N (비정상=정상) 과 M〉N (비정상〉정상)의 경우는 adventitious shoot의 분화는 보여주지 않고 단지 소수의 부정근만 유기 되었다. 반면에 M〈N (비정상〈정상) 인 경우에는 부정 줄기의 유기가 관찰되었다. Fig. 4와 5의 결과를 종합해 볼 때 미토콘드리아 변이의 정도에 따라서 부정 줄기의 유기가 상당한 차이가 생기는 것을 알 수 있다. Mutant homoplasmic 한 경우에는 부정 줄기의 유기가 되지 않지만

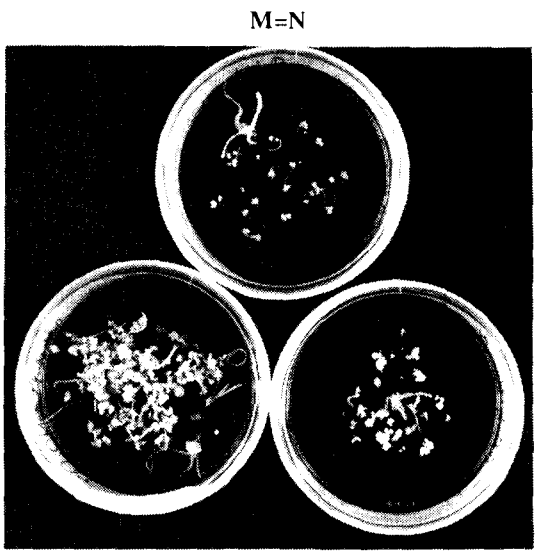

Fig. 5. Regeneration of NCS2 callus lines from mutant and heteroplasmic mitochondria (M〈N, M〉N). Mutant heteroplasmy indicate only mutant band appeared after PCR amplification but heteroplasmic case (M〈N) indicated that normal bands show more intense than that of mutant, and vise versa in M〉N case.

heteroplasmic 한 경우 즉 정상적인 미토콘드리아가 많아질수록 유기가 잘된다고 생각된다. 담배의 경우에서도 보면 정상적인 미토콘드리아가 정상 성장을 위한 필수 요소라는 보고되었다[6,15]. 따라서 미토콘드리아 내의 전자전달계에서의 변이는 기내에서 callus 유기와 성장, 그리고 재분화에 상당한 영향을 초래한다고 사료된다. 또한 하나의 세포 내에서 공존하는 정상적인 미토콘드리아와 비정상적인 미토콘드리아들은 공존을 할 수 있으며, 이들은 세포가 분열하는 동안 무작위로 분열이 되어진다고 보여진다.

요 약

옥수수의 미토콘드리아 변이체 (NCS2)는 전자전달계 내의 NADH dehydrogenase를 구성하고 있는 subunit 4 와 7 유전자의 재조합에 의해서 생성된 변이체이다. 이들의 변이체들은 식물의 성장과 발육에 절대적인 영향을 미치며, 또한 기내에서의 callus line들의 생성과 발달에도 상당한 영향을 미친다. 이들의 미토콘드리아 mutant 들은 3개의 primer를 사용하는 PCR 방법에 의해서 쉽게 선별이 가능하며, 세포 내의 미토콘드리아 변이 정도를 간접적으로 추측케 하며, 체세포 분열시 세포질 내의 기관들이 random으로 분리되는 현상을 간접적으로 알 수 있다. NCS2 mutant들에서 유기된 callus line들은 식물체 재분화에도 영향을 미쳐 mutant 미토콘드리아가 많은 call line들에는 실질적인 부정 줄기의 유기를 방해하는 것으로 사료된다. 결론적으로 NADH-dehydrogenase는 식물체가 재분화 또는 성장하는데 있어서 필요한 요소라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bonnett, H. T., Dhurber, I., Fajardo, M., Glimelium, K. : A mutation causing variegation and abnormal development in tobacco is associated with an altered mitochondrial DNA, Plant J., 3, 519(1993).
2. Coe, E. : Maternally inherited abnormal plant types in maize.. Maydica. 28, 151(1983).
3. Duncan, D. R., Widholm, J. M. : Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine, Plant Cell Rep., 7, 452(1988).
4. Gu, J., Dempsy, S., Newton, K. J. : Rescue of a maize mitochondrial cytochrome oxidase mutant by

tissue culture, Plant J. (submitted).
5. Kofer, W., Glimelium, K., Bonnett, H. T. : Modifications of floral development in tobacco induced by fusion of protoplasts of different male-sterile cultivars. Theor. Appl. Genet., 79, 97(1990).
6. Kofer, W., Glimelium, K., Bonnett, H. T. : Modifications of mitochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants of tobacco, Plant Cell, 3, 759(1991).
7. Lauer, M., Knudsen, C., Newton, K. J., Gabay-laughnan, S., Laughnan, J. R. : A partially deleted mitochondrial cytochrome oxidase gene in the NCS6 abnormal growth mutant of maize. New Biol. 2, 179 (1990).
8. Levings, C. S. : Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. Plant Cell. 5, 1285(1993).
9. Marienfeld, J. R. and Newton, K. J. : PCR-mediated detection of heteroplasmy in maize mitochondria mutants. PCR methods and Application, 3, 205(1993).
10. Marienfeld, J. R. and Newton, K. J. : The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric nad4-nad7 mitochondria gene and is associated with reduced complex I function. Genetics. 138, 855(1994).
11. Newton, K. J. : Nonchromosomal stripe mutants of maize, With emphasis on RNA editing and cytoplasmic male sterility, edited by A. Brennicke and U. Kuck, 341(1990).
12. Newton, K. J., Brian, W., Katsuyuki, Y., Shelley, L. and David, B. S. : Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the cox 2 gene of perennial teosintes. EMBO. 14, 3, 585.
13. Newton, K. J., Coe, E. : Mitochondrial DNA changes in abnormal growth mutants of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83. 7363.(1989).
14. Newton, K. J., Kundsen, C., Gabay-Laughnan, S., Laughnan, J. R. : An abnormal growth mutant in maize has defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. Plant Cell. 2, 107(1990).
15. Rosenberg, S. M., Bonnet, H. T. : Floral organogenesis in Nicotiana tabacum : A comparison of two cytoplasmic male-sterile cultivars with a male-fertile cultivar. Amer. J. Bot., 70, 266(1983).
16. 한창렬 : 고등 식물의 웅성불임성, 최근의 진보. 식물조직배양 학회지, 23, 5, 259(1996).