

옥수수 미토콘드리아 NAD4 유전자의 cDNA cloning과 특이한 RNA editing 현상

설 일 환†

경북대학교 농업과학 기술연구소

Molecular cDNA cloning and unusual RNA editings of NAD4 gene from *Zea mays* mitochondrion

Ill-Whan Sul†

Kyungpook National University, Institute of Agricultural Science Technology

Abstract

NAD4 as a gene encoding NADH dehydrogenase subunit 4 in the mitochondrion from maize has been cloned using RT-PCR and sequenced for examining RNA edited sites. Analysis of mt cDNA sequences showed the typical RNA editing patterns and unusual base changes as well; RNA editing from cDNA sequences occurred base change from C to U in most cases, however transitions from T to G and G to A were also observed. Even though those editings appeared to be occurred randomly, RNA edited sites showed mostly in exon 1 and exon 4 regions. When compared with NAD4 cDNA from wheat, locations of edited sites did not consistent with each other suggesting that the phenomenon of RNA editing occurred randomly not site-specific manner.

Key words : mitochondria, NAD, RNA editing

서 론

미토콘드리아의 가장 중요한 기능 중의 하나는 전자전달계와 이에 coupling이 되어 있는 ATPase에 의해 ATP를 생성하는 것이다. 식물 미토콘드리아의 inner membrane 내에 존재하는 전자전달계는 4가지 단계로 구분이 되어 있으며, 1 단계로 알려진 NADH dehydrogenase는 전자를 ubiquinone pool에 전달해 주는 역할을 한다⁹⁾. Complex I 으로 불리는 NADH dehydrogenase는 적어도 27개의

subunit 들로 구성되고 있으며, 이중 4 번째의 subunit 즉 NAD4 유전자는 약 56 KD의 크기로서 hydrophobic의 성격을 가지며, integral membrane 단백질로서 inner membrane 내에 존재한다고 보고되었다⁶⁾.

미토콘드리아와 엽록체들은 독립적인 DNA 와 RNA들을 포함하고 이들의 복제, 전사 그리고 번역에 관여되는 모든 기능이 이들 기관 내에 존재한다. 특이한 점은 이들 두기관 내에서 존재하고 있는 유전자들로부터 전사 된 후의 RNA 들은 무작위로 염기가 치환, 삭제 그리고 삽입되는 현상

† Corresponding author

이다. 하지만 특정 염기 치환이 일반적으로 많이 일어나며 대부분 C에서 U로 변하고 드물게는 U에서 C로 변하기도 한다고 보고되었다⁵⁾. 이러한 기작들을 통칭하여 RNA editing이라고 하며 대부분 단백질의 정보를 포함하는 coding 부분에 일어나지만 non-coding 부분 즉 structural RNA나 intron에도 이런 현상이 생성된다고 보고되고 있다⁷⁾. RNA editing 현상은 유전자 발현에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 단백질의 개시(initiation)와 정지(stop) 코드를 변화시키거나, tRNA의 2차적인 구조와 intron의 splicing에 영향을 미친다고 보고되고 있다^{1,2)}. 현재까지는 세포질 내의 미토콘드리아와 엽록체 내에서만 이러한 RNA editing 현상이 밝혀졌다⁵⁾.

밀과 옥수수에서의 NADH dehydrogenase의 subunit 4 (NAD4)에 관여되는 genomic DNA 유전자의 염기 서열은 이미 결정되어 보고된 바가 있다⁴⁾. 밀의 경우에는 NAD4 유전자의 cDNA의 염기 서열이 또한 결정되어 RNA editing에 대한 보고가 되고 있으나, 옥수수의 경우는 아직까지는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 옥수수의 NAD4 cDNA를 mtRNA로부터 조제하여 cloning 시킨 후 염기 서열을 결정하고 이에 따른 RNA editing의 유무를 확인하고자 성격을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

미토콘드리아의 분리와 mtRNA의 분리

표면 살균제로 소독한 ear shoots의 약 20-50g을 grind로 먼저 먼저 분쇄한 후 Stern and Newton (1986)의 조제 방법에 의해서 crude mitochondria pellet를 획득하였다. Pellet은 washing buffer (0.35M sorbitol, 50 mM Tris-HCl 그리고 20 mM EDTA)에서 다시 resuspension 시켰다. 현탁된 용액들은 35/47/60%로 만들어진 sucrose step gradient 위에 조심스럽게 첨가하여 150,000g로 1시간 원심을 시켰다. 분리된 mitochondria는 35와 47%의 중간에 위치함으로 조심스럽게 pipett으로 취하여 3 배 volume의 washing solution을 조심스럽게 첨가 한 후 다시 10,000 g 로 15분 동안 원심 하여 pellet을 취한다. RNA washing buffer 2-3 ml를 pellet에 첨가하여 resuspension 시킨 후 1/4 volume의 RNA lysis buffer(10% sarcosyl, 25mM Tris-HCl, 20 mM Na₂EDTA)를 첨가 한후

열음에 5 분 동안 방치한다. 미토콘드리아가 lysis가 일어난 것을 확인한 후 1 : 1 volume의 (chloroform 과 phenol)로 진탕한 후 10 분간 원심을 한다. 상층을 취한 후 1/5 volume의 12M LiCl를 첨가하여 40C에 적어도 6 시간 이상 동안 침전시킨다. 미토콘드리아 RNA는 10,000g에서 40 분 동안 원심한 후에 획득하였다. RNA pellet은 1x TE buffer에 녹인 후 전기 영동에 의해서 확인 유무를 결정하였다.

Primer 조제와 RT-PCR

알려진 옥수수의 NAD4 유전자에서 transcription initiation 과 termination을 포함하는 다음과 같은 PCR primer 들을 제조하였다.

ND # 1 : 5' GTCGACAAGCTTGACGTCGTCTGAC-CAATGCCCCACCT 3'

ND # 2 : 5' CCTAGGCGGCCGCGAGCTCAGAAGAT-TTCTTTTCT3'

특히 NAD1은 5' 에 제한 효소 Xho1 site가 있고, NAD 2는 NotI의 site의 염기 서열을 포함하고 있어서 이 primer들로 증폭된 PCR product들이 vector에 cloning이 쉽게 하도록 제작 되었다. Primer들의 PCR product의 크기들은 약 1.5 kb 정도로 기대된다.

Total RNA에서의 single stranded cDNA의 조제와 PCR 증폭

First cDNA 의 제조는 미토콘드리아에서 추출한 mtRNA 1 ug를 사용하였다. 먼저 total mtRNA 1 µl (1 ug)를 취하고 ND # 2 primer (50 pmole)를 1 µl를 첨가하여 ddH₂O로 total volume 10 µl로 조절하여 70°C에 10 분간 incubation을 시켰다. Tube는 37°C에서 10분간 다시 incubation 한 후, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl RT (Reverse Transcriptase) buffer (10x), 1 µl Reverse Transcriptase, 2 µl dNTPs (10 mM), 그리고 1 µl RNasin 을 첨가하여 total 20 µl로 되게 하여 42°C에서 40분 동안 반응시켜 1st stranded cDNA를 조제하였다. 이들의 tube를 90°C에 15 분 동안 반응시켜 RT의 활성을 제거하였다. 여기에서 각각 1 내지 2.5 µl씩 취하고, 각각 1 µl ND # 1과 ND # 2 primer들을 첨가하고, 다시 5 µl 10x PCR buffer, 2 µl

dNTPs (10 mM), 1 μ l Taq polymerase를 넣은 후 total 50 μ l로 양을 조정하여 PCR을 행하였다. Cycle들은 95 $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 1st cDNA을 완전히 denature 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, 52 $^{\circ}$ C에서 30 초, 그리고 74 $^{\circ}$ C에서 1 분 동안 30 cycles을 수행하였다. PCR product들은 1.6%의 agarose를 사용한 agarose gel에 전기 영동 후 ethidium bromide로 staining 시켜서 UV transilluminator에서 Polaroid film으로 현상하여 확인하였다.

Cloning 과 DNA 염기 서열 결정

상기의 방법에서 획득한 약 1.5 kb의 NAD4 cDNA 유전자는 양쪽에 각각의 제한 효소 site들을 포함하고 있어서, 이들을 XhoI과 NotI의 효소로 동시에 처리하였다. 또한 pBlueScript KS(+)에 같은 제한 효소로 처리한 후, ligation을 시켜 competent *E.coli* strain DH5 α 에 형질 전환 시킨 후 ampicillin (100 μ g/ml)을 첨가한 LB배지에서 선 발하였다. 확인된 *E. coli*를 대량생산을 한 후에 CsCl의 방법을 사용하여 순수 정제된 plasmid를 획득하였다. 약 4 μ g의 plasmid를 사용하여 DNA sequencing에 사용하였다. Sequencing의 방법은 T7 sequenase의 방법을 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

순수 정제된 mtRNA에서 RT를 사용하여 1st cDNA를 조제한 후 ND #1 과 #2의 primer를 사용하여 증폭한 결과, 1.5 kb의 PCR product를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 증폭된 PCR product를 pBlueScript II (KS+)에 cloning 시켜서 부분적인 DNA 염기 서열을 수행하였다. cDNA의 염기 서열은 이미 알려진 옥수수의 NAD4 genomic DNA의 염기 배열과 비교하여 본 결과 많은 부분이 editing이 된 것을 알 수 있었다 (Fig. 2). 특이한 것은 대부분 C에서 U로 변화되었지만 T가 G로 그리고 G가 A로 변화되는 부분도 각각 있는 것을 알 수 있었다. RNA editing은 C에서 U로 또는 극히 일부이지만 U에서 C로 치환되는 것이 대부분이다⁵⁾. 옥수수의 NAD4 유전자의 경우는 일반적인 RNA editing에서 볼 수 없는 현상이라고 할 수 있다.

옥수수의 NAD4에 관한 genomic DNA의 염기 배열이 밝혀져 있지만 cDNA에서의 염기 배열과 이에 따른 RNA

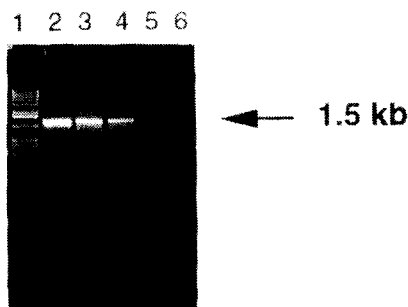


Fig. 1. RT-PCR amplification from mtcDNA using ND #1 and #2 primers. Arrow indicates 1.5kb amplified PCR products of NAD4 cDNA.

- Lane 1 : 1 kb ladder
- 2 : 2 μ l of 1st stranded cDNA
- 3 : 1.5 μ l of 1st stranded cDNA
- 4 : 1 μ l of 1st stranded cDNA
- 5 : 0.5 μ l of 1st stranded cDNA
- 6 : control

editing의 증거는 현재까지는 보고된 바가 없다. 본 실험에서 본바 와 같이 상당히 많은 부분이 editing이 되었는 것을 알 수 있다. 밀의 경우는 옥수수와 95%의 이상의 염기 서열들이 genomic DNA에서 존재하는 NAD4 유전자와 같다고 알려졌다⁴⁾. 밀의 경우를 보면 C에서 U로 변환 부분이 23개이며 이로 인하여 변화된 단백질은 22 부분이고 전체의 4.5%의 RNA 부분이 editing이 된 것을 알 수 있다⁴⁾. 밀과 옥수수에서의 NAD4 유전자는 4개의 exon과 3개의 intron으로 구분되고 있으며, 밀의 경우 RNA editing들이 대부분 exon1 과 exon4에 국한되고 있는 것을 알 수 있다. 옥수수의 경우를 보면 비록 부분적인 cDNA 염기 서열을 보여주고 있지만, 밀과 비슷한 RNA editing 현상을 보여주고 있다 (Fig. 2). RNA editing이 된 부분이 exon 1 과 exon 4에 국한되고 있는 현상은 단백질의 functional domain과 밀접한 관계가 있다고 보고되었다^{1,3)}. 또한 밀에서의 NAD4 cDNA 유전자의 염기 서열에서 RNA editing이 된 부분과 옥수수의 NAD4 cDNA의 염기 서열에서의 RNA editing부분과의 자리들은 일치하지 않은 점으로 미루어 보아 RNA editing을 무작위로 생성이 된다고 본다.

- F., Litvak, S., Araya, A. : Direct protein sequencing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9 confirms RNA editing in plants, *J. Mol. Biol.*, **214**, 1 (1990).
4. Lamatina, L., Grienberger, J. M. : RNA editing of the transcript coding for subunit-4 of NADH dehydrogenase in wheat mitochondria - Uneven distribution of the editing sites among the 4 exons, *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3275(1991).
5. Maier, R. M., Zeltz, P., Kossel, H., Bonnard, G., Gualberto, J. M., Grienberger, J. M. : RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts, *Plant Mol. Biol.*, **32**, 343(1996).
6. Marienfeld, J. R., Newton, K. J. : The nad4 gene of maize mitochondria is highly conserved, *Plant physiol.*, **104**, 301(1994).
7. Schuster, W., Hiesel, R., Wissinger, B., Brennicke, A. : RNA editing in the cytochrome b locus of the higher plant *Oenothera berteriana* includes a U-to-C transition., *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2428(1990).
8. Stern, D. B., Newton, K. J. : Isolation of plant mitochondrial RNA, *Methods Enzymol*, **118**, 488(1986).
9. Taiz, L., Zeiger, E. : *Plant physiology*. The Benjamin /Cummings publishing company, Inc. (1991).