식물생명공학회지 제30권 제4호
Korean J. Plant Biotechnol
Vol. 30, No. 4, 329~334 (2003)

감자 (*Solanum tuberosum* L.) *CycD3* 유전자의 분리 및 특성 분석

강인홍, 최승호, 이홍근, 황현식, 이석찬*, 정태영, 임학태[1], 배신철[2]
성균관대학교 유전공학과, [1]강원대학교 생명공학부, [2]농업생명공학연구원

Isolation and Characterization of a cDNA Encoding *CycD3* Gene from Potato (*Solanum tuberosum* L.)

In Hong Kang, Seung Ho Choi, Hong Geun Lee, Hyun Sik Hwang, Sukchan Lee*, Tae Young Jung, Hak Tae Lim[1], Shin Chul Bae[2]
Department of Genetic engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea
[1]Department of Biotechnology, Kangwon University, Gangwon 200-701, Korea
[2]National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT D-type cyclins are believed to regulate the G1 to S phase transition in response to nutrient and hormonal signals. We investigated the expression characteristics of the key cell-cycle regulators, mitotic and G1 cyclins in potato (*Solanum tuberosum* L.). We isolated D-type cyclin gene from potato and it was classified as D3 cyclin by sequence similarities and a phylogenetic analysis, and named as St*cycD3*;1. The accumulation of transcripts was predominantly associated with mitotically active organs, such as stolons, roots, flowers, leaves, and stems. Transcription of St*cycD3*;1 can be induced by sucrose.

Key words: Cell cycle, cyclin, *Solanum tuberosum*

서 론

식물 성장과 기관형성은 세포 분열, 세포 신장, 그리고 분화의 과정을 거친다. 이 중 세포 분열은 일반적으로 분열조직에서 국한적으로 일어나지만 외부자극이나 내재된 발생 program에 의하여 이미 분화된 세포에서도 세포 분열이 관찰된다. 특히 고착 생활을 하는 식물은 환경에 적응하는 과정 중에 매우 특이한 조절 기작에 의하여 세포 분열이 조절된다 (Meijer and Murray 2001).

세포 분열과 세포 신장은 cell cycle 각각의 단계에서 특이하게 진행된다. 특히, G1기의 후기와 G2/M기의 조절이 중요하다. 이 시기에 작용하는 일반적인 세포주기 조절 단백질은 cyclin-dependent kinase (CDK)와 cyclin의 복합체로서 중요한 조절 역할을 수행하고 있다 (Pines 1995; Mironov et al. 1999). 이 복합체는 다른 조절 단백질과의 결합이나 인산화 과정 그리고 inhibitor에 의해 영향을 받는다 (Lees 1995). 계통적, 구조적, 기능적 유사성에 따라 CDKs는 다섯 그룹으로 나뉜다. 예를 들어, 동물과 yeast의 CDKs의 경우 CDK A~CDK E로 나뉜다 (Mironov et al. 1999). 가장 연구가 많이 수행된 CDK는 CDK A이며, 이는 PSTAIRE로 규명된 부분의 존재 여부에 의해 특성화된 yeast $p34^{cdc2/CDC28}$에 기능적 동일성을 갖는 그룹이다. CDK B 그룹은 식물에서만 관찰이 되었다. 식물에서 알려진 cyclin은 현재까지 모두 세 개의 그룹이 보고되었으며 각각 cyclin A, B, D이다 (Renaudin et al. 1996). A-type cyclin은 S기, G2기, M기의 초기에 작용을 하며, B-type cyclin은 G2기, M기의 초기에 작용을 하는데 이들은 유사분열이 끝날 때 ubiquin/26S proteasom에 의해 분해되기 전까지 주기적으로 작용한다 (Geneschik et al. 1998). A-type cyclin은 A1, A2, A3와 같이 3개의 sub-groups으로 되어 있으며, B-type cyclin은 B1, B2로 되어 있다 (Renaudin et al. 1998). D-type cyclin은 D1, D2, D3, D4로 나뉘어져 있으며 (De Veylder et al. 1999), D-type cyclin은 G1기를 조절하는 역할을 하며, 성장 호르몬이나 영양분에 영향을 받는다 (Dahl et al. 1995; Soni et al. 1995).

*Corresponding author Tel 031-290-7866 Fax 031-290-7870
E-mail sukchan@skku.ac.kr

본 연구에서는 감자에서 cell cycle과 관련된 유전자를 최초로 분리하였으며, 그 중 G1기에 관여하며 G1/S기로의 전환을 촉진하는 D3 cyclin이 sucrose의 농도에 따라서 그리고 각각의 기관에 따라서 발현양상을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 감자의 재배 및 선발

휴면이 타파된 감자 (*S. tuberosum* L. cv. superior)의 무병건전 씨감자를 파종하여 맹아를 유도한 뒤 16시간 광조건, 8시간 암 조건 하에서 배양하였다. 유전자 분리용 재료로 적당한 크기가 될 때까지 약 8주간 키운 후, 각 조직별로 채취하여 실험재료로 사용하였다. 또한 *CycD3* 유전자가 sucrose에 어떤 영향을 받는지 알아보기 위하여 MS (Murashige and Skoog 1962) 고체배지에 3%의 sucrose를 첨가하여 기내배양을 하였으며, 25℃, 16시간 광조건 아래에서 1주일 배양하였다. 기내 배양한 감자 잎을 0%, 3%, 6%의 sucrose가 첨가된 MS고체배지에 옮겨준 후 18℃의 암실에서 24, 72시간 배양 후 감자 잎 절편체를 채취하였다.

세포주기 관련 유전자 유사성 분석 및 primers 제작

세포주기 관련 유전자 중 D3 cyclin 유전자를 분리하기 위하여 감자와 같은 가지과에 속하는 담배 (*Nicotiana tabacum:* Nt) (CAA09853.1, CAA09854.1)와 토마토 (*Lycopersicon esculentum*: Le) (CAB60838.1, CAB60837.1, CAB60836.1)로부터 분리되어진 cyclin D계열의 유전자 염기서열을 비교 분석하였다. 이를 바탕으로 mixed base를 포함한 universe primer (UniCycD3)를 다음과 같이 제작하였다. UniCycD3(L) 5′-TGGATGADT-CAACTTGCTGCTGT-3′, UniCycD3(R) 5′-ATCVATAACHC-CACTTGGACTVC-3′.

Total RNA의 추출 및 *CycD3* 유전자의 분리 및 분석

담배, 토마토 및 감자 조직을 각각 0.2 g을 취한 후 액체질소에 급속 냉동시켜 아주 미세하게 파쇄 하여 분말화한 후 Shirras 등 (1984)의 방법을 약간 변형하여 total RNA를 추출하였다. 이렇게 분리한 total RNA 5 μg을 moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Promega Co., USA)를 이용하여 cDNA library를 제작하였다. 그리고 UniCycD3 primer를 이용하여 PCR 증폭을 통하여 insert 크기를 확인한 후 500 bp인 것을 선별하여 염기서열 분석을 하였다. *CycD3* 유전자의 full length cDNA를 분리하기 위하여 다음과 같은 primer를 사용하였고 StcycD3(F) ATGGCAATAGAG AATAATGAT, StcycD3(B) TTAATGAGGACTACCAACAGC, 이렇게 제작된 primer를 이용하여 PCR 증폭을 통하여 얻어진 product를 클로닝한 뒤 염기서열을 분석하였다.

Genomic DNA의 추출 및 full length *CycD3* 유전자 분리 및 분석

Genomic DNA의 추출은 Marmur의 방법을 변형하여 수행하였다 (Marmur 1961). 이렇게 추출한 genomic DNA는 GenomeWalker kit (Clontech Co., USA)에서 제공하는 실험방법에 따라 DNA library를 만들어서 long PCR과 touchdown PCR 방법을 통하여 증폭된 PCR 산물을 클로닝한 뒤 염기서열을 분석하였다. 이 과정에서 사용된 primers는 다음과 같다. Gene specific primer: GSP1(R); 5′ CATTGTTCTTTAGCCCAAGCC TCCTTA 3′, GSP2-1(R); 5′ GGTCACTGGATTCATCCTCCAT TTCAG 3′, GSP2-2(R); 5′ GAAAGACAAGTGACAGCAGCA AGTTGA 3′, GSP1(L); 5′ TCAACTTGCTGCTGTCACTTGTC TTTC 3′, GSP2(L); 5′ CTCAAGTTCCCCTTCTTCTTGACTTC C 3′. 분석된 clone은 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 homology 검색을 실시하였다. 그리고 DNAsis (Hitachi, Japan)를 사용하여 유전자 분석을 하였고 CLUSTAL W 프로그램 (DNASTAR, USA)을 사용하여 유연관계를 비교 분석하였다.

Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 기관별 발현양상 분석

감자유래 *CycD3* 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 감자의 조직 (flower, stem, leaf, tuber, stolon, root)을 채취한 다음 Joubes의 방법을 변형하여 수행하였다 (Joubes et al. 1999, 2000). 각각의 조직으로부터 준비된 5 μg의 total RNA를 이용하여 cDNA library를 제작한 뒤 그 결과물을 1/10로 희석하여 semi-quantitative RT-PCR 반응을 통해 비교하였다. *CycD3*에 대한 PCR 산물의 양적 발현양상의 분석은 densitometer를 사용하여 정량분석하였다.

결과 및 고찰

감자 유래 세포주기 유전자의 분리

감자 유래 *CycD3* 유전자를 분리하기 위하여 우선 가지과인 담배 (*N. tabacum*)와 토마토 (*L. esculentum*)로부터 분리된 D-type cyclin 유전자의 염기 서열을 비교 분석하였고, 그 결과 담배와 토마토 내에서 상당한 유사성을 관찰하였다. 이를 바탕으로 mixed base를 포함한 universe primer (UnicycD3)를 제작하여 담배와 토마토 조직 (callus, seedling, root, young leaf)으로부터 RT-PCR를 수행하였다. 검출 확인된 PCR 조건을 바탕으로 감자 조직에서 분리한 total RNA를 주형으로 RT-PCR을 실시하여 감자 유래의 *CycD3* clones를 일부 확보하였다. 이렇

게 확보된 유전자를 분석한 결과, 감자 유래의 *CycD3*에 해당하는 것임을 알 수 있었다. 확인된 유전자의 정보를 토대로 *CycD3* 유전자의 전체 염기서열을 분리하기 위하여 Genome Walker kit (Clontech)에서 제공하는 실험방법에 따라 DNA library를 제작하였으며 long PCR과 touchdown PCR 방법을 통하여 증폭된 PCR 산물을 클로닝한 뒤 염기서열을 분석하였다. 뿐만 아니라 감자 조직에서 분리한 total RNA를 주형으로 RT-PCR을 실시하여 다시 한번 감자 유래의 full *CycD3* gene을 분리하여 확인하였다. 분석된 clone은 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 homology 검색을 실시하였다. 그리고 DNAsis (Hitachi)를 사용하여 유전자 분석을 하였고 CLUSTAL W 프로그램을 사용하여 유연관계를 비교 분석하였다. 분석결과, 감자에서 분리된 *CycD3* 유전자의 크기는 1086 bp이며, 종결코돈을 포함하여 362개의 아미노산으로 구성되어 있었다 (Figure 1). 이렇게 분석되어진 유전자를 St*CycD3*;1로 명명하였다. St*CycD3*;1의 아미노산 서열 분석 결과 다른 D cyclin과 마찬가지로 cyclin box를 가지고 있으며 (Figure 2), retinoblastoma-related proteins과 결합하는 부위인 LxCxE 부위가 N-terminus에 존재하는 것을 알 수 있었다 (Figure 2) (Sherr 1993; Renaudin et al. 1996). 또한 G1 cyclins이 신속하게 생성되었다가 사라지게 될 때 필요한 PEST 부위가 C-terminal에 존재한다 (Figure 2) (Rechsteiner and Rogers 1996). 이러한 결과를 통하여 감자에서 분리되어진 St*CycD3*;1 유전자의 아미노산 서열을 다른 식물체에서 보고된 것의 아미노산 서열과 상동성을 비교한 결과 tomato와 93%로 제일 높게 나타났으며, tobacco와 83%, 애기장대와 71%의 높은 상동성을 나타내었다. 또한 아미노산 서열을 이용하여 계통분석을 실시하여 본 결과, 아미노산 서열에서 93%로 매우 높은 상동성을 나타낸 tomato 유래 Le*CycD3*;2와 감자 유래 D3 cyclin이 매우 가까운 유연관계에 있는 것으로 조사 되었다 (Figure 3).

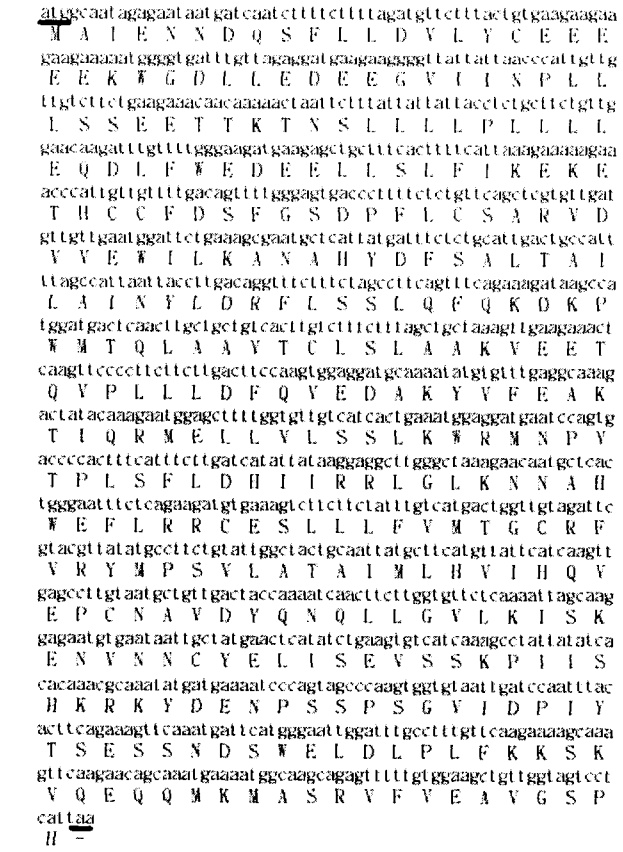

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of D cyclin isolated from potato. Translation initiation and termination codon are under lined.

감자기관에서 St*CycD3*;1의 발현 양상

감자유래 St*CycD3*;1 유전자의 발현양상을 알기 위하여 semi-quantitative RT-PCR 방법을 사용하였다. 이 방법을 통하여 알아본 결과 모든 기관에서 D3 cyclin이 발현을 하지만 지상부보다는 지하경에서 두 배, 뿌리에서 세 배 정도 많이 발현되는 것을 볼 수 있었다 (Figure 4). 감자 *CycD3* 유전자의 발현양상

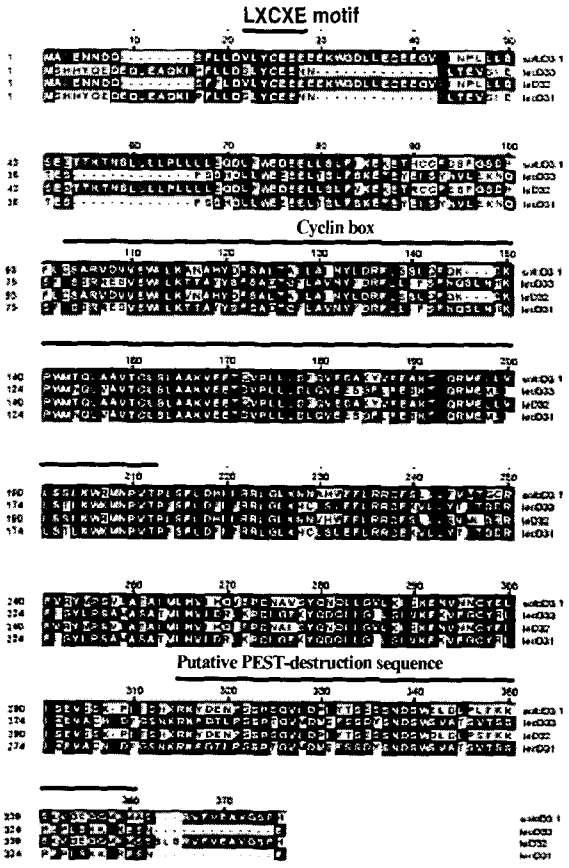

Figure 2. Comparison of the amino acid sequences of D3 cyclins. Deduced amino acid sequences for potato cyclin D3 was compared with the multiple alignment program CLUSTAL W version 1.7. Shaded areas are consensus regions among proteins in each respective group; identical amino acids are darkly shaded and similar amino acids are lightly shaded. Le*CycD3*;1 (accession number CAB60836.1), Le*CycD3*;2 (accession number CAB60837.1), Le*CycD3*;3 (accession number CAB60838.1).

은 Arabidopsis의 cycD4;1이 lateral root 초기 형성을 촉진하는 부분에 있어서는 유사하며, 같은 가지과에 속하는 tomato와 tobacco의 경우에 있어서는, 지하부에 비해 지상부인 어린 눈, 과일, 꽃 부분에서 1.5~2배 가량 많이 발현되는 것을 보면 D-type cyclin이 종에 따라 다른 기능을 나타내는 것임을 알 수 있다 (Kvarnheden et al. 2000; Sorrell et al. 1999). 감자 괴경은 전분을 저장하는 기관으로서 sucrose의 생성과 이동에 영향을 많이 받는데, 이는 또한 cell cycle과도 무관하지 않다. 이미 보고된 바에 따르면, 토마토의 경우에 있어서 배지 내 glucose가 존재하지 않을 때보다 존재했을 때 D3 cyclin의 발현 양이 많아진다는 사실을 확인할 수 있다 (Joubers et al. 2000). 그리고 Arabidopsis의 경우 D cyclin 유전자의 발현을 조절하는데 sucrose가 관여하는 것으로 보고되었다 (Riou-khamlichi et al. 2000). 본 연구에서도 감자 잎 절편체에 다른 농도의 sucrose를 처리해 보았다. 우선 감자 잎의 절편체를 sucrose의 농도가 각각 다르게 처리된 MS평판배지에서 배양시킨 후 24시간, 72 시간이 경과한 뒤에 추출된 total RNA에서 St*CycD3*;1 유전자의 발현 양상을 알아본 결과, sucrose의 농도가 최고 6%일 때 0%일 때보다 약 3배 가량, 3%일 때보다는 약 1.5배 많이 발현되는 것을 알 수 있다 (Figure 5). 이를 통해서, 감자 유래 *CycD3*;1도 토마토 D3 cyclin과 같이 배지 내 탄소원의 농도에 따라서 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구는 현재 감자 유래 *CycD3* 유전자가 토마토와 같이 3개 (St*CycD3*;1, St*CycD3*;2, St*CycD3*;3)로 존재할 것을 예상할 수 있으며 이들 각각 유전자의 발현 양상을 비교함으로써 감자 *CycD3* 유전자

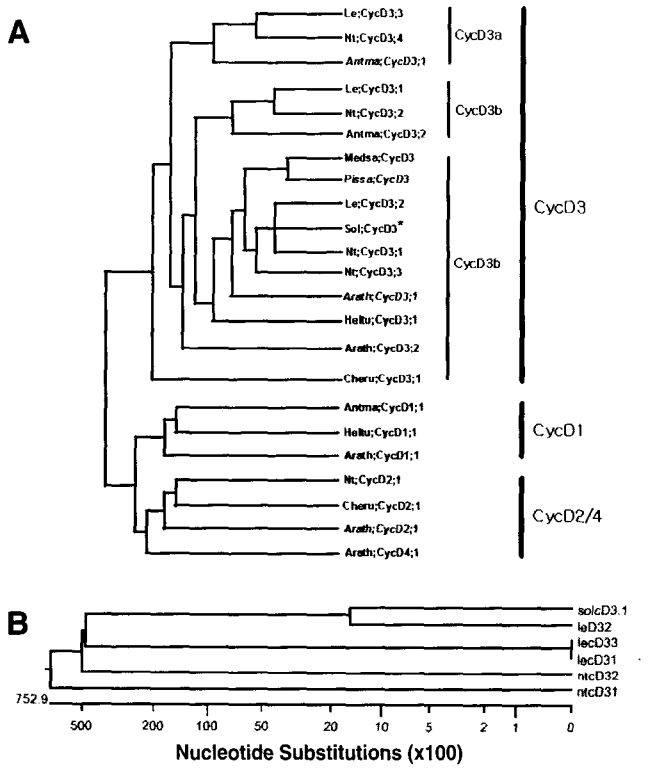

Figure 3. Relationships and phylogenetic analysis of plant D cyclins based on amino acid sequence data. (A) Antma, *Antirrhinum majus* (Gaudin et al. 2000); Arath, *Arabidopsis thaliana* (Soni et al. 1995) Cheru, *Chenopodium rubrum* (Renz et al. 1997); Heltu, *Helianthus tuberosus* (Murray 1999); Le, *Lycopersicon esculentum* (Kvarnheden et al. 1999); Nt, *Nicotiana tabacoum* (Sorrell et al. 1999); Pissa, *Pisum sativum* (Shimizu and Mori 1998); Sol, *Solanum tuberosum*. The three distinct groups of *CycD* cyclins, *CycD1*, *CycD2/4* and *CycD3*, are indicated on the right. (B)The relationship between the different *CycD3* cyclins suggests the probable existence of at least three subgroups. These have been designated *CycD3a*, *CycD3b* and *CycD3c*.

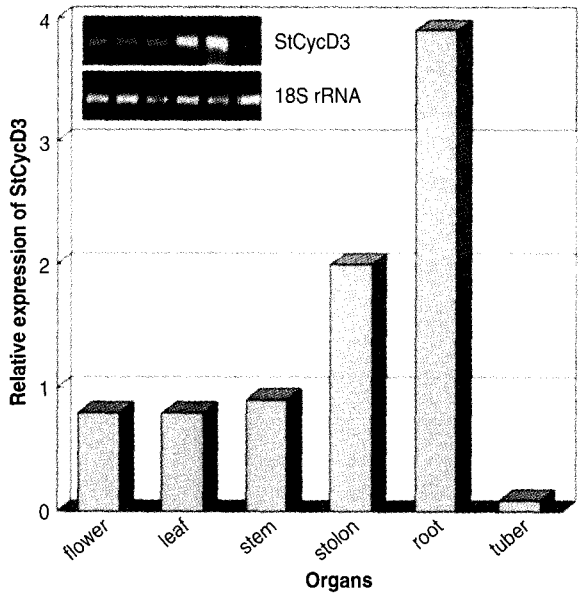

Figure 4. Analysis of St*CycD3*;1 gene expression in various potato organs by semi-quantitative RT-PCR. Quantitative analysis of *CycD3* expression was performed by densitometer. 1: flower, 2: leaf, 3: stem, 4: stolon, 5: root, 6: tuber.

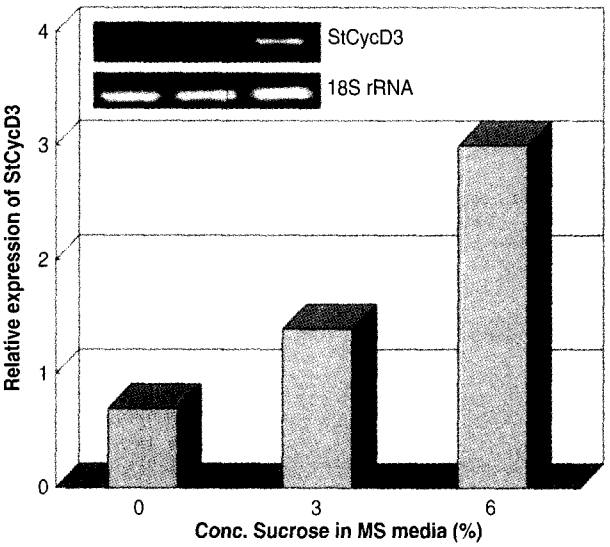

Figure 5. Analysis of St*CycD3*;1 gene expression in cell suspensions under the control of sucrose. Quantitative analysis of *CycD3* expression was performed by densitometer.

의 발생과정 중의 기능 분석의 기초를 제공하리라 생각된다.

적 요

D-type cyclin은 호르몬과 영양분의 영향을 받아 세포주기의 G1기에서 S기로 전환을 조절하는 인자이다. 우리는 감자에서 이 유전자를 분리해냈고, 염기서열 분석을 통하여 D3 cyclin으로 분류하였다. 그리고 St*CycD3*;1이라 명명하였다. 다른 D cyclin 유전자가 세포 분열이 활발한 조직에서 발현되는 것과 같이 St*CycD3*;1은 감자의 괴경, 뿌리, 꽃, 잎, 줄기, 뿌리줄기, 복지에서 다양한 발현 양상을 보였고, 영양분의 하나인 sucrose에 의하여 발현이 유도되는 것을 확인하였다.

사사 - 본 연구는 바이오그린 21사업에 의해 수행된 연구의 일부입니다.

인용문헌

Boniotti MB, Griffith ME (2002) "Cross-talk" between cell division cycle and development in plants. Plant Cell 14: 1-16

Cockcroft CE, Den Boer BGW, Sandra Healy JM, Murray JAH (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. Nature 405: 575-579

Dahl M, Meskiene I, Begre L, Cam Ha DT, Swoboda I, Hubmann R, Hirt H, Heberle-Bors E (1995) The D-type alfalfa cyclin gene cycMs4 complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. Plant Cell 7: 1847-1857

De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Van Montagu M, Engler G, Inze D (1999) A new D-type cyclin of Arabidopsis thaliana expressed during lateral root primordia formation. Planta 208: 453-462

Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. Nature 380: 520-523

Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J (1998) Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the protease inhibitor MG132. Plant Cell 10: 2063-2075

Grafi G (1998) Cell cycle regulation of DNA replication: the endoreduplication perspective. Exp Cell Res 244: 372-378

Joubes J, Lemaire-Chamley M, Delmas F, Walter J, Hernould M, Mouras A, Raymond P, Chevalier C (2001) A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins. Plant Physiol 126: 1403-1415

Joubes J, Phan TH, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P, Chevalier C (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. Plant Physiol 121: 857-869

Joubes J, Walsh D, Raymond P, Chevalier C (2000) Molecular characterization of the expression of distinct classes of cyclins during the early development of tomato fruit. Planta 211: 430-439

Kvarnheden A, Yao JL, Zhan X, O'Brien I, Morris BAM (2000) Isolatin of three distinct CycD3 genes expressed during fruit development in tomato. J Exp Bot 51: 1789-1797

Lees E (1995) Cyclin dependent kinase regulation. Curr Opin Cell Biol 7: 773-780

Meijer M, Murray JAH (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. Curr Opin Plant Biol 4: 44-49

Mironov V V, De Veylder L, Van Montagu M, Inze D (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants-the nexus. Plant Cell 11: 509-522

Murray JAH, Freeman D, Greenwood J, Huntley R, Majjerg J, Riou-Khamlichi C, Sorrell DA, Cockcroft C, Carmichael JP, Soni R, Shah ZH (1998) Plant D cyclins and retinoblastoma (Rb) protein homologues. In: Francis D, Dudits D, Inze D (eds) Plant cell division. Plant Cell Division, Portland Press, Colchester, UK, pp. 99-127

Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. Plant J 18: 243-252

Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C, Murray JAH (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. The Royal Society 357: 749-760

Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent Kinases: a biochemical view. Biochem J 308: 697- 711

Potuschak T, Doerner P (2001) Cell cycle controls: genome - wide analysis in Arabidopsis. Plant Biol 4: 501-506

Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci 21: 267-271

Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inze D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V, Murray JAH (1996). Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. Plant Mol Biol 32: 1003-1018

Renaudin JP, Savorue A, Philippe H, Van Montagu M, Inze D, Rouze P (1998) Characterization and classification of plant cyclin sequences related to A- and B-type cyclins. In: Francis D, Dudits D, Inze D (eds) Plant cell division. Portland Press, London, pp 67-98

Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. Science 283: 1541-1544

Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JAH (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. Mol Cell Biol 20: 4513-4521

Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. Cell 73: 1059-1065

Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. Cell 79: 551-555

Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. Plant Cell 7: 85-103

Sorrell DA, Combette B, Chaubet-Gigot N, Gigot C, Murray JAH (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. Plant Physiol 119: 343-352

Stals H, Inze D (2001) When plant cells decide to divide. Trends Plant Sci 6: 359-364

(접수일자 2003년 11월 17일, 수리일자 2003년 12월 7일)