

더덕에서 Aluminum Induced Protein (*CIAIP*) 유전자의 분리 및 발현분석

김종학, 인준교, 이범수, 이강, 양덕춘^{1)*}

(주)바이오피아, 경희대학교 한방재료가공학과¹⁾

Isolation and Expression of Aluminum Induced Protein (*CIAIP*) Gene from *Codonopsis lanceolata*

Jong-Hak Kim, Jun-Gyo In, Bum-Soo Lee, Kang Lee, Deok-Chun Yang^{1)*}

BioPia Co., Ltd, Yongin 449-701, Korea

¹⁾Dept. of Oriental Medicine Material and processing, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

A cDNA clone (GenBank accession no. CF924621) homologous to aluminum induced protein gene was isolated and characterized from *Codonopsis lanceolata* (*CIAIP*). The *CIAIP* is 906 nucleotides long and has an open reading frame of 711 bp with a deduced amino acid sequence of 236 residues. The *CIAIP* shows high homology to *A. marina* (84%), *G. hirsutum* (83%), *V. radiata* (83%), *A. thaliana* (80%), *B. napus* (78%) and *T. aestivum* (68%). The deduced amino acid sequence of *CIAIP* also has homology to the N-terminal end of plant Asn synthetase. This region does not contain the active sites of the enzyme and the significance of this conservation is currently not clear. To investigate the expression of *CIAIP* against several heavy metal stresses, we treated the sliced tap root of *C. lanceolata* with various heavy metals. The expression of *CIAIP* was increased by 25 uM Al₂(SO₄)₃ in proportion to incubation time and also increased by 50 uM CdCl₂.

Key words : aluminum stress, Asn synthetase, *Codonopsis lanceolata*, heavy metal, RT-PCR.

서언

Aluminum은 지구 표면에 7.5%를 차지하고 있는 많은 중금속 중에 하나이고, 식물이 생장하는데 중요 미네랄 원소이다. 현재 지구의 토양은 산성화가 급속히 진행 중에 있으며, 산성화로 인한 작물의 피

해 또한 빠르게 확산되고 있는 상황이다. 그 원인으로는 화학비료의 과다사용과 산성비로 인한 비옥한 토양의 산성화 때문으로 aluminum은 토양의 산성화를 더욱 가중시키고, 토양에 존재하여 pH 5이하로 산성화를 야기시키는 중금속으로서 식물의 뿌리 생장을 억제시키고 생장을 저해하는 작용을 한다

*교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

(Haug, 1984). 또한 aluminum독성은 산림 쇠퇴를 유발시키는 중요한 인자이며, 많은 동물과 식물들이 aluminum에 의해 피해를 입고 있는 실정이다. 산성토양 내에서 가용화된 aluminum은 식물의 생장, 특히 뿌리의 생장을 억제 시키고(Clarkson, 1965), 식물이나 동물 세포에 산성화를 촉진하는 독성물질로서 작용하고 있다(Cakmak and Horst, 1991; Yamamoto *et al.*, 1997).

현재까지 담배, 애기장대풀, 밀, 콩 등 몇몇 식물에서 aluminum 스트레스에 관여하는 유전자들이 밝혀져 있으며(Snowden and Gardner, 1993; Cruz-Ortega and Ownby., 1993; Hamel *et al.*, 1998; Delhaize *et al.*, 1991; Ezaki *et al.*, 1995, 1996, 1997; Sugimoto and Sakamoto, 1997; Richards *et al.*, 1998), aluminum 스트레스와 관련된 유전자들은 low phosphate (Ezaki *et al.*, 1995), 중금속 스트레스(Snowden *et al.*, 1995 ; Sugimoto and Sakamoto, 1997), wounding(Snowden *et al.*, 1995), 병원균(Cruz-Ortega and Ownby., 1993; Hamel *et al.*, 1998) 또는 산화 스트레스(Sugimoto and Sakamoto, 1997; Richards *et al.*, 1998)등 다른 여러 종류의 스트레스와 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다

본 연구에서는 더덕(*Codonopsis lanceolata*)으로부터 분리된 aluminum induced protein (CIAIP)유전자의 발현분석을 위하여 aluminum 처리 농도와 시간에 따른 CIAIP유전자의 발현양상과 다른 중금속 및 산화 스트레스와의 연관성을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서는 충남농업기술원에서 재배된 4년 생 더덕(*C. lanceolata*)의 주근과 기내에서 배양한 더덕을 시료로 사용하였다.

RNA 추출과 cDNA library 의 제작

Aqueous phenol extraction 방법(Morris *et al.*, 1990)

을 사용하여 더덕의 주근으로부터 total RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하는 과정은 공급자 매뉴얼을 따라 cDNA synthesis kit(Clontech, SMART cDNA library construction kit, USA)를 이용하여 수행하였다.

DNA 염기서열 분석

더덕의 뿌리 cDNA library에서 선별된 cDNA clone은 벡터 특이적인 sequencing primer를 이용하여 automatic DNA sequencer (ABI prism 3700)로 sequencing 하였다. 분석된 EST clone들의 기능 동정은 NCBI의 blastx프로그램을 사용하여 GeneBank의 중복되지 않은 단백질 database와의 비교를 통해 이루어졌다. 뉴클레오타이드와 아미노산의 서열 분석 및 비교는 BioEdit(Ver 5.0.9) 프로그램을 사용하여, 먼저 clustalW multiple alignment를 수행한 후 graphic view를 실행하였다. 염기 서열의 비교는 NCBI의 DNA와 아미노산 database를 바탕으로 blast 연산(Altschul *et al.*, 1990)을 통해 수행하였으며, Phylogenetic tree는 TreeView(ver 1.6.1)을 사용하여 나타내었다.

기내배양 및 스트레스 처리

더덕의 기내배양은 MS 배지를 사용하였고, 광 16hr과 8hr 암 조건 하에서 5주 간격으로 계대배양을 하였다.

더덕의 뿌리를 25°C에서 25 uM Al₂(SO₄)₄ (Al³⁺ 50 uM)를 함유한 MS액체배지에 시간별(0, 30분, 2, 4, 24, 및 48시간) 처리하였다. 중금속에 대한 유전자 발현을 분석하기 위해서 더덕의 뿌리를 slice하여 각각 50 uM CdCl₂, 20 uM CuSO₄, 50 uM Fe₂O₃를 처리하였고, Salt(100 uM NaCl)를 위와 동일한 방법으로 2 일간 처리하였다. 마지막으로 온도에 따른 유전자의 발현을 확인하기 위해 heat shock(42°C)을 4시간 처리하였다.

RT-PCR

기내 배양한 더덕의 뿌리를 재료로 하여 각각의 스트레스를 처리한 후 각각의 total RNA를 추출하여

cDNA(Promega)를 합성하여 RT-PCR (bio-online, Top-pfuTM)을 수행하였다. 대조 유전자로 actin을 사용하였으며, actin primer는 (forward) 5' CGT GAT CTT ACA GAT AGC TTG ATG A 3' 와 (reverse) 5' AGA GAA GCT AAG ATT GAT CCT CC 3' 을 사용하였고, CIAIP유전자의 primer는 5' TCC ATG GTA TGT TGG GAG TGT TTA GCA G 3' 과 5' CAG GAT CCT TAG CAA ATG CCA CAT ACC 3' 를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

cDNA합성 조건은 57°C에서 10분간 RNA denaturation 시킨 후 42°C에서 1시간동안 cDNA를 합성하고 94°C에서 5분간 reverse transcriptase를 불

활성화 시켰다.

PCR 조건은 96°C에서 10분간 pre-denaturation을 한 후 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 30 cycle을 수행하고 72°C에서 10분간 처리 한 후 0.7% agarose gel에 전기 영동하여 결과를 관찰하였다.

결과 및 고찰

더덕 4년생 주근으로 제작된 cDNA library로부터 1000개의 clone을 확보하였다. 각 positive clone들에

1	GGCCATTACG	GCCGGGGATG	TCTTTAACCT	TCAATTCTCA	AGAGAGGAAA												
51	AAAACAGTCC	GTGTGTGCTT	GCATATATAC	GTATAGAATA	TACATATAGC												
101	AAGCGAAAGA	GAGTTGTAAG	CTTTGCAAGT	<u>ATGTTGGAG</u>	<u>TGTTTAGCAG</u>												
	M	L	G	V	F	S	S										
151	CTCAATAATG	TCGCCACCAGG	AGGAGCTGGT	GGCTGCCGGT	AGTCGAACAC												
	S	I	M	S	P	P	E	E	L	V	A	A	G	S	R	T	P
201	CGTCACCGGAA	GATCACCGGCG	ACGGCGCTGG	TGAACCGGTT	CCTCAAATCA												
	S	P	K	I	T	A	T	A	L	V	N	R	F	L	K	S	
251	AACGCTTCGG	CGGTGTCCAT	GCAGGTCGGC	GATGACGTTTC	ATTTGGCTTA												
	N	A	S	A	V	S	M	Q	V	G	D	D	V	H	L	A	Y
301	CACTCACCAAC	AACGAGTCCC	CGTCCGCTCC	CAGATCATTT	GCGGTTAAAG												
	T	H	H	N	E	S	P	S	A	P	R	S	F	A	V	K	D
351	ATGAGATTTT	CTGCTTGTTT	GAGGGAGCAC	TAGACAACTT	AGGTAGTCTG												
	E	I	F	C	L	F	E	G	A	L	D	N	L	G	S	L	
401	AAGCAGCAGT	ACGGTCTCTC	TAAGTCTGCA	AACGAGGTCG	TTTTGGTCAT												
	K	Q	Q	Y	G	L	S	K	S	A	N	E	V	V	L	V	I
451	TGAGGCCCTAC	AAAGCTCTTC	GCGACCGGGC	TCCTTATCCT	CCCAACCATG												
	E	A	Y	K	A	L	R	D	R	A	P	Y	P	P	N	H	V
501	TTGTGGGACA	TCTGGAAGGA	AATTITGCA	TTGTGGTCTT	TGACAAGTCA												
	V	G	H	L	E	G	N	F	A	F	V	V	F	D	K	S	
551	ACCTCGACAT	TGTTTGTGGC	TACCGACCAA	GCTGGTAAGG	TTCCGCTATA												
	T	S	T	L	F	V	A	I	D	Q	A	G	K	V	P	L	Y
601	TTGGGGAAATC	ACTGCTGATG	GGTATGTGGC	ATTTGCTAAT	GATGCTGATT												
	W	G	I	T	A	D	G	Y	V	A	F	A	N	D	A	D	L
651	TGCTGAAAGG	TGCTTGTGGC	AAAGTCACITG	CTTCTTCCC	TCAAGGTTGT												
	L	K	G	A	C	G	K	S	L	A	S	F	P	Q	G	C	
701	TTCTATTCCA	CAGCAGTCGG	AGAACTTAGA	TGCTATGAGA	ATCCTAAGAA												
	F	Y	S	T	A	V	G	E	L	R	C	Y	E	N	P	K	N
751	CAAAATCACA	GCCGTTCTCG	CCACTGAGGA	AGAAATCTGG	GGGGCTAAAT												
	K	I	T	A	V	P	A	T	E	E	E	I	W	G	A	K	F
801	TCATGGTTGA	AGGGCCAGGA	GTTCTTACAG	CCACAGAGTA	AAGATCCTCT												
	M	V	E	G	P	G	V	L	T	A	T	E	*				
851	CGTTAGATCT	CCATAAATT	CCCTGTTGAA	GGATATGATT	GCATCAAATG												
901	AAGGGC																

Fig. 1. The nucleotide sequence of *CIAIP* gene. Underline indicated primer for PCR amplification. The amino acid Underline is Asn synthesis site.

Table 1. List of *CIAIP* registered in other plants

Species	Gene	Amino acid residue	Nucleotide identity(%)	GeneBank accession No.	Lineage
<i>Codonopsis lanceolata</i>	<i>CIAIP</i>	236	-	CF924621	Plant
<i>Avicennia marina</i>		236	84	AF363286	Plant
<i>Gossypium hirsutum</i>		236	84	AAQ74889	Plant
<i>Vigna radiata</i>	<i>ARG10</i>	236	83	T07820	Plant
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g19140	234	80	NP_197415	Plant
<i>Brassica napus</i>	<i>bali</i>	244	78	T07830	Plant
<i>Triticum aestivum</i>	<i>wali7</i>	270	68	L28008	Plant

C. lanceolata 1 NLGVFSSS1D5PPEDELVIAAGSPTPSS1IT1A1WNPFLKSTIAAEVEMQVH1P1D1H1A1F1T1H1 60
A. marina 1 NLGVFSSS1W5PPEDELVIAAGSPTPSS1EW1A1WNPFLKSTIAAEVEMQVH1P1D1A1F1H1 60
G. hirsutum 1 NLGVFSSS1W5PPEDELVIAAGSPTPSS1IT1A1WNPFLKSTIAAEVEMQVH1P1C1M1H1H1W1F1T1H1 60
V. radiata 1 NLGVFSSS1W5PPEDELVIAAGSPTPSS1IT1A1WNPFLKSTIAAEVEMQVH1P1C1M1H1H1W1F1T1H1 60
A. thaliana 1 NLG1PSSGATW5PPEDELVIAAGSPTPSS1EW1A1WNPFLKSTIAAEVEMQVH1P1C1M1H1H1W1F1T1H1 60
B. napus 1 NLGR1PSSG1W5PPEDELVIAAGSPTPSS1EW1A1WNPFLKSTIAAEVEMQVH1P1C1M1H1H1W1F1T1H1 60
T. aestivum 1 -L1EV1S1G1E1W1E1V1P1E1W1A1S1P1T1P1S1E1T1S1E1W1A1P1A1F1P1T1H1 59

C. lanceolata 61 NEST1SAPP1FA1K1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 120
A. marina 61 N0S1R1P1R1S1A1K1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 120
G. hirsutum 61 KESPL1Q1S1F1E1W1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 120
V. radiata 61 SES1P1Y1P1F1A1K1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 120
A. thaliana 61 NESPL1R1P1S1F1E1W1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 120
B. napus 61 KESPL1R1P1S1F1E1W1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 120
T. aestivum 60 N0S1L1P1P1F1A1K1E1P1C1F1E1D1N1Q1S1K1Q1Y1S1H1A1E1W1V1E1A1Y1F1A1D1P1R1A1Y1P1 119

C. lanceolata 121 PSHVYVGH1E1W1F1A1F1V1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 180
A. marina 121 PSHVYVGH1Q1W1F1A1F1V1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 180
G. hirsutum 121 PSHVYVGH1D1S1F1E1W1F1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 180
V. radiata 121 AAKVYVCH1E1W1F1A1F1V1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 180
A. thaliana 121 AAHVYVAK1L1S1F1E1W1F1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 180
B. napus 121 AAHVYVAK1L1S1F1E1W1F1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 180
T. aestivum 120 AEF1M1S1Q1T1S1F1E1W1F1D1T1S1T1L1F1V1A1T1I1A1G1E1P1Y1W1G1T1A1D1P1F1A1P1A1Y1P1 179

C. lanceolata 181 KELAS1F1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1E1 225
A. marina 181 KELAS1F1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1 225
G. hirsutum 181 KELAS1F1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1 225
V. radiata 181 KELAS1F1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1 225
A. thaliana 181 KELAS1F1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1 225
B. napus 181 KELAS1F1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1 225
T. aestivum 180 KELA1P1P1Q1C1F1Y1S1T1A1V1G1E1C1E1L1C1E1Y1N1K1Q1H1A1T1A1P1A1E1E1E1 239

C. lanceolata 226 VEGPGVLTATE----- 236
A. marina 226 VEGPGM1A1ASK----- 236
G. hirsutum 226 VEGPAVVAATE----- 236
V. radiata 226 VEGSAVLA1TEY----- 237
A. thaliana 226 VEGSATVLAD----- 234
B. napus 226 VKEQQFLHMESERIK1H1S----- 244
T. aestivum 240 RLCR1A1K01TPF1CR1W1CN1M1Q1G1AC1T1L1 270

Fig. 2. Comparison of the amino acid residues among *CIAIP* isolated in other species. Identical amino acids are shown in white against black.

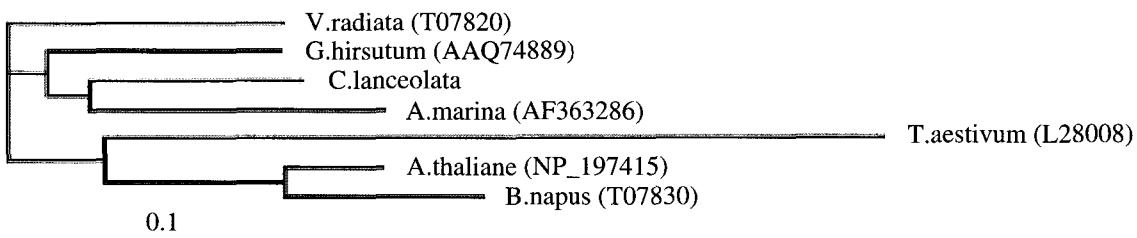


Fig. 3. Phylogenetic tree of *CIAIP* gene based on the nucleotide sequence.

대한 염기 서열에 대한 blastx 검색 결과 2개의 clone이 기존의 aluminum induced protein 유전자와 상동성을 나타내었다. 이 중 full length clone(GenBank accession no. CF924621)을 대상으로 분리된 aluminum induced protein cDNA를 *CIAIP*로 명명하였다.

더덕(*C. lanceolata*)으로부터 *CIAIP*을 분리하여 염기서열을 분석한 결과 906 bp 길이로, 236개의 아미노산으로 번역되는 711 bp의 ORF를 가지고 있으며, N-terminal 시퀀스에는 pea (Tsai and Coruzzi, 1990), asparagus(Davies and King, 1993), *Escherichia coli*(Scofield *et al.*, 1990)와 human(Andrulis *et al.*, 1987)에서 밝혀진 것과 같은 Asn synthesis 유전자가 존재하고 있다(Fig 1).

*CIAIP*유전자의 다른 식물들과의 homology를 조사하기 위해서 NCBI의 blastx프로그램을 사용하여 GeneBank의 database와 비교를 해본 결과 *A. marina*(AF363286) 84%, *G. hirsutum*(AAQ74889) 84%, *V. radiata*(ARG10) 83%, *A. thaliana*(At5g19140) 80%, *B. napus*(bali) 78%, *T. aestivum*(wali7) 68%와 같이 여러 식물에서 *CIAIP*유전자와 높은 유사성을 나타내었다(Table 1).

Aluminum induced protein 유전자들간의 아미노산 서열을 비교 및 분석하기 위하여 분석 프로그램인 BioEdit(Ver 5.0.9) 프로그램을 사용하여 *CIAIP*아미노산 서열과 다른 식물들에서 밝혀진 aluminum induced protein 유전자들과 비교·분석한 결과 높은 상동성을 나타내며, 또한 어떠한 효소에도 변하지 않고 보존되어지는 Asn synthesis 영역이 일치하고 있음을 보여준다(Fig. 2).

계통간의 유연성을 비교하기 위하여 TreeView프로그램을 사용하여 더덕에서 얻어낸 *CIAIP*유전자의 아미노산 서열(ORF)과 여러 가지 식물에서 밝혀진 aluminum induced protein 유전자들의 아미노산 서열(ORF)을 계통발생적으로 비교한 결과 aluminum induced protein 유전자들 중 더덕에서 분리한 *CIAIP* 유전자는 *A. marina* (AF363286)과 가장 근연관계에 있는 것을 볼 수 있으며, *G. hisutum* (AAQ74889), *V. radiata* (T07820) 순으로 가깝게 나타났다(Fig. 3).

더덕에서 분리된 *CIAIP*유전자의 aluminum stress에 대한 발현 양상을 조사하기 위해서 더덕 뿌리를 50 uM농도의 Al³⁺가 함유된 MS 액체 배지에 0, 30분, 2, 4, 24, 48시간 동안 담가 스트레스 처리를 하였으며, 대조구는 아무것도 처리하지 않은 더덕의 뿌리를 사용하였다. 각 실험군 별로 더덕의 뿌리에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과, *CIAIP*의 발현량이 대조구에 비해 30분, 2시간에서는 감소하였으나, 4시간부터 48시간까지의 실험군에서는 증가하는 것으로 보아 aluminum stress 처리 후 발현량이 감소하였으나 시간이 지남에 따라 *CIAIP* 유전자의 발현이 증가되는 것을 알 수 있다(Fig. 4A). 따라서 aluminum stress에 의해 *CIAIP* 유전자 발현은 스트레스가 지속됨에 따라 증가된다고 할 수 있다.

다른 중금속 및 염에 대한 *CIAIP*의 발현양상을 조사하기 위하여 50 uM CdCl₂, 20 uM CuSO₄, 50 uM Fe₂O₃, 100 uM NaCl를 위와 동일한 방법으로 2일 동안 처리하였고 온도에 대한 발현양상을 조사하기 위해서 42℃에서 4시간 처리하였다. RT-PCR 분석을 통한 *CIAIP* 유전자의 발현량을 조사한 결과 CuSO₄, Fe₂O₃ 등의 중금속에 대해서는 *CIAIP* 유전자의 발현

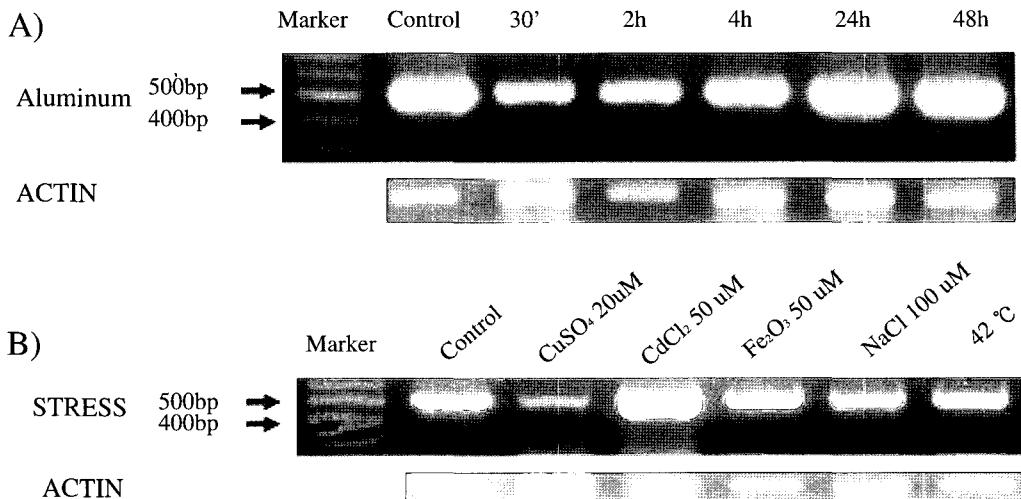


Fig. 4. Expression of *CLAIP* in *Codonopsis lanceolata*. (A) Roots of *C. lanceolata* were treated with Al³⁺ 50 uM for 0, 0.5, 2, 4, 24 and 48h. B. Roots of *C. lanceolata* were treated heavy metal stress 50 uM CdCl₂, 20 uM CuSO₄, 50 uM Fe₂O₃, 100 uM NaCl for 2 day and heat shock at 42 °C for 4h.

이 감소하였으나, CdCl₂를 처리한 더덕의 뿌리에서는 대조구에 비해 유전자가 다량으로 발현이 증가되었다. 이는 *CLAIP*유전자가 aluminum과 Cd에 대해 특이적으로 발현한다는 것을 보여준다(Fig. 4B).

따라서 본 연구에서는 Al³⁺과 Cd에 대한 농도 및 시간별 처리를 통해 중금속 이온과 저항성에 대한 연구를 수행한 결과 유전자의 발현량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었고 이 유전자를 활용하여 더덕에 재도입함으로써 aluminum스트레스 및 각종 중금속 스트레스에 대해서 저항성을 갖는 더덕의 분자육종을 위해 지속적으로 연구를 수행할 것이다.

사사

본 연구는 농진청 Biogreen 21 사업의 특용작물사업단의 연구 지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다

적요

더덕의 뿌리로부터 aluminum 스트레스와 관련이 있는 aluminum induce protein(*CLAIP*)유전자를 분리하였다. *CLAIP* 유전자의 염기서열을 분석한 결과 906 bp 길이로, 236개의 아미노산으로 번역되는 711 bp의 ORF를 가지고 있으며, *A. marina*(84%), *G. hirsutum*(84%), *V. radiata*(83%), *A. thaliana*(80%), *B. napus*(78%), *T. aestivum*(68%) 등 다른 식물에서 밝혀져 있는 aluminum induce protein과 높은 상동성을 나타내었고, N-terminal에는 Asn synthetase영역이 존재하고 있다. 더덕에서 분리한 aluminum induced protein(*CLAIP*)을 aluminum처리 농도와 시간에 따른 *CLAIP*유전자의 발현양상을 알아보기자 50 uM Al³⁺를 처리 후 시간대별로 RT-PCR을 수행한 결과 시간이 지남에 따라 *CLAIP*유전자의 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 중금속, 염, 온도에 대한 유전자의 발현양상을 조사하기 위해 50 uM CdCl₂, 20 uM CuSO₄, 50 uM Fe₂O₃, 100 uM NaCl를 2일과 42 °C에서 4시간 처리 후 발현량을 조사한 결과 카드뮴(Cd)에 대해서 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다.

인용문헌

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol Biol* 215: 377-403-410.
- Andrulis, I.L., J. Chen, and P.N. Ray. 1987. Isolation of human cDNAs for asparagine synthetase and expression in Jensen rat sarcoma cells. *Mo1. Cell Biol.* 7: 2435-2443.
- Cakmak, I. and W.J. Horst. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* 83: 463-468.
- Clarkson, D.T. 1965. The effect of aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Ann. Bot.* 29: 309-315.
- Cruz-Ortega, R. and J.D. Ownby. 1993. A protein similar to PR(pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol. Plant* 89: 211-219.
- Davies, K.M. and G.A. King. 1993. Isolation and characterisation of a cDNA clone for a harvest induced asparagine synthetase from *Asparagus officinalis L.* *Plant Physiol.* 102: 1337-1340.
- Delhaize, E., T.J.V. Higgins, and P.J. Randall. 1991. Aluminum tolerance in wheat: analysis of polypeptides in the root apices of tolerant and sensitive genotypes. Zn RJ Wright, VC Baligar, RP Muinann, eds, *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1071-1079.
- Ezaki, B., M. Koyanagi, R.C. Gardner, and H. Matsumoto. 1997. Nucleotide sequence of a cDNA for GDP dissociation inhibitor (GDI) which is induced by aluminum (Al) ion stress in tobacco cell culture (accession no. AF012823) (PGR 97.133). *Plant Physiol.* 115: 314.
- Ezaki, B., S. Tsugita, and H. Matsumoto. 1996. Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiol. Plant* 96: 21.28.
- Ezaki, B., Y. Yamamoto, and H. Matsumoto. 1995. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol. Plant* 93: 11.18.
- Hamel, F., C. Breton, and M. Houde. 1998. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta* 205: 531-538.
- Haug, A. 1984. Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit Rev. Plant Sci.* 1: 345-373.
- Kinraide, T.B and D.R. Parker. 1989. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. *Plant Cell Environ.* 12: 479-487.
- Morris, P.C., A. Kumar, D.J. Bowles, and A.C. Cuming. 1990. Osmotic stress and abscisic acid regulate the expression of the Em gene of wheat. *Eur. J. Biochem.* 190: 625-630.
- Richards, K.D., E.J. Schott, Y.K. Sharma, K.R Davis, and R.C. Gardner. 1998. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 409-418.
- Scofield, M.A., W.S. Lewis, and S.M. Schuster. 1990. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* asn B and deduced amino acid sequence of asparagine synthetase B. *J. Biol. Chem.* 265: 12895-12902.
- Snowden, K.C and R.C. Gardner. 1993. Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum L.*) Roots. *Plant Physiol.* 103:855-861.
- Snowden, K.C., K.D. Richards, and R.C. Gardner. 1995. Aluminum induced genes: induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.* 107: 341-348.
- Sugimoto, M and W. Sakamoto. 1997. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes Genet Syst.* 72: 311-316.

Tsai, F-Y and G.M. Coruzzi. 1990. Dark-induced and organ specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. EMBO J. 9: 323-332.

Yamamoto, Y., A. Hachiya. and H. Matsumoto. 1997. Oxidative damage to membranes by a combination

of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. Plant Cell Physiol. 38: 1333-1339.

(접수일 2004. 3. 16)

(수락일 2004. 8. 13)