

## 배추 유래 phytolectin 유전자, *Brcpi1*의 분리 및 발현특성 분석

정유진 · 조용구 · 강권규

### Isolation and characterization of *Brcpi1* gene encoding phytolectin from chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) seedlings

Yu-Jin Jung · Yong-Gu Cho · Kwon-Kyoo Kang

Received: 3 December 2009 / Accepted: 21 December 2009

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** A cDNA clone encoding phytolectin was isolated from *Brassica rapa* seedlings, through rapid amplification of cDNA ends (RACE). This gene (name as *Brcpi1*; GenBank accession no.: EF079953) had a total length of 881 bp with an open reading frame of 609 bp, and encoded predicted polypeptide of 203 amino acid (aa) residues including a putative N-terminal signal peptide. Other relevant regions found its sequence included the G and PW conserved aa motifs, and the consensus LARFAV sequence for phytolectins and the reactive site QVVAG. The BrCPI1 protein shared 95, 94, 81, 80 and 78% identity with other CPI proteins isolated from *Brassica oleracea* (BoCPI-1), *Arabidopsis thaliana* (AtCY SB), *Glycine max* (GmCPI), *Oryza sativa* (OsCYS-2) and *Zea mays* (ZmCPI) at amino acid level, respectively. Southern blot analysis showed that *Brcpi1* was a low copy gene. Expression pattern analysis revealed that *Brcpi1* was a tissue-specific expressing gene during reproductive growth and strongly expressed at mature seedling stages. Furthermore, overexpression of *Brcpi1* in transgenic *Arabidopsis* was enhanced

tolerance to salt and cold stresses. Meanwhile the juvenile seedling of *Brcpi1* transgenic plants was not affected by various concentrations ABA in MS medium. Taken together, the results showed that *Brcpi1* functioned as a cysteine protease inhibitor and it exhibited a protective agent against diverse types of abiotic stress, which induced this gene in a tissue- and stress-specific manner.

#### 서론

동 식물체 내의 생리대사 특히 생체방어와 관련된 다양한 생리반응들은 단백질 분해과정을 통해 특정단백질이 활성화 되는 방식으로 진행된다. Cysteine protease 저해제는 세포 내부 또는 외부로부터 cysteine protease에 의한 비우호적인 단백질 분해 활성으로부터 세포를 보호하며, 침략자에 대한 생물학적 방어 체계로서 중요한 역할을 담당한다 (Sajid and McKerrow 2002). 지금까지 cysteine protease 저해제는 cathepsin B, H, L, S와 papain등으로 thiol기를 갖는 cysteine 계열 단백질분해효소 작용을 저해하는 단백질로 동식물에 널리 분포하고 그 종류와 특성이 다양하다 (Arai et al. 2002). 식물유래 cysteine protease 저해제는 약 30개 정도 알려져 있으며, 12내지 16 kDa의 크기로 Q × V × G의 활성 부위 및 이황화 결합이 되지 않은 상태로 존재하며 계란 유래의 동물 cysteine protease 저해제와 매우 높은 상동성을 갖는다 (Shuy et al. 2004). 염기배열에 따라 식물유래 cysteine protease 저해제는 phytolectin의 용어로 새로운 subfamily 분류되고 있다. 이들 단백질은 식물의 생장과 발육과정에서 상이한 발현 양상을 보이며, 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다 (Massonneau et al 2005). 식

Y.-J. Jung, K.-K. Kang  
한경대학교 유전공학연구소  
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University,  
Ansung 456-749, Korea)

Y.-G. Cho  
충북대학교 식물자원학과  
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,  
Cheongju, Korea)

K.-K. Kang (✉)  
한경대학교 원예학과  
(Department of Horticulture, Hankyong National University,  
Ansung, 456-749, Korea)  
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

물세포내에서 이들 단백질의 역할은 세포자살 (Programed cell death) 과정에서 사용하기 위해 비축한 생물학적 활성을 갖는 cysteine protease작용이 억제함으로써 세포를 보호 할 뿐만 아니라 종자발아 및 유묘생장속도를 조절한다 (Solomon et al. 1999, Hong et al. 2007). 또한 외부로부터 침입한 바이러스 (Gutierrez et al. 1999), 진균 (Soaris et al. 2002), 선충류 (Samac et al. 2003) 및 딱정벌레 (Haq et al. 2004) 등으로부터 식물을 보호하기위한 방어기작은 cysteine protease이 세포 복제 및 소화기관 (gut)에서 소화효소로서 중요한 역할을 하고 있기 때문에 inhibitor가 매우 중요한 면역 요인으로 작용한다. 특히 비생물학적 스트레스 반응에서의 cysteine protease inhibitor는 cold shock 및 암흑상태에서 자란 보리의 생체조직에서 mRNA 축적이 높게 나타났으며 (Massonneau et al 2005), 추위, 염분 및 고온 스트레스 처리한 밤나무의 뿌리 및 잎에서 발현량이 높게 나타났다 (Pernas et al. 2000). 또한 phytoalexin은 식품산업의 보조제로 사용하고 있으며, 생물공학기술에 적용하고 있다 (Jiang et al. 2002; Douglas et al. 2004). 브로컬리, 양배추, 케일 등이 포함한 *Brassica* 속 식물들은 자가불화합성 연구의 모델식물로 알려져 있다. 그러나 아시아에서 매우 중요한 채소작물 중 하나인 배추 (*Brassica rapa* L.)에서 방어기작에 관한 연구는 전무한 상태이다.

본 연구에서는 배추 유묘로부터 phytoalexin 유전자 *Brcpi 1*의 분리, 발현분석 및 형질전환실험을 통한 유전자의 기능을 구명하고자한다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

배추 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 종자를 유리 온실에서 12°C 이하의 저온을 일정기간 유지하여 화아분화를 유도하였다. 개화 전에 뿌리, 줄기, 잎, 주두, 꽃잎, 수술, 꽃받침, 화경 등을 분리하여 액체질소에 넣어 동결한 후, -80°C 냉동고에 보관하여 RNA 추출 재료로 이용하였다. 또한 발아 초기의 식물 재료를 얻기 위해, 배추 종자를 여과지상에서 25°C 암 상태에서 발아시킨 후, 1, 2, 4, 8, 10일의 유묘를 각각 채취하여 액체질소에 넣어 동결한 후, -80°C 냉동고에 보관하여 total RNA를 분리하였다.

### Total RNA 분리

배추유묘 0.1 g을 측정하여 미리 차갑게 준비해 놓은 막자사발과 막대를 이용하여 액체질소로 마쇄하였다. 마쇄한 조직은 1 ml의 TRIzol-reagent가 담긴 1.5 ml 원심분리용 튜브에 넣어 섞어주고, 핵단백질체가 완전히 분리

되도록 상온에 15분간 두었다. 1 ml TRIzol-reagent에 대해 0.2 ml chloroform을 넣어 15초 동안 vortex하고, 상온에서 5분간 방치한 후 11,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 상등은 0.5 ml의 iso-propanol과 0.25 ml의 high salt precipitation solution (0.8 M sodium citrate/1.2 M NaCl)을 넣어 잘 섞어주고 상온에서 10분간 방치하여 RNA를 침전시켰다. 이렇게 추출한 산물을 11,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 버리고 RNA 침전물에 1 ml의 75% ethanol을 넣고 11,000 rpm으로 4°C에서 5분 동안 원심분리 했다. 그 다음 상등액을 제거하고 RNA 침전을 진공상태에서 5-10분간 건조시켰다. 마지막으로 50-100 µl의 DEPC 처리된 멸균수에 녹여 spectrophotometer로 RNA양을 정량하여 사용하였다.

### *Brcpi1* 유전자 분리 및 염기서열 분석

Total RNA는 RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) protocol에 따라 수행하였으며, first strand cDNA는 5 µg total RNA로부터 합성하였다. 합성된 cDNA 2 µl를 주형으로 10× PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) 5 µl와 50 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 µl, 10mM dNTP mix 1 µl, *Taq* DNA polymerase (5 units/µl) 0.4µl, forward primer (10µM), reverse primer (10 µM)를 각각 1µl씩 첨가하고 멸균수 38.1 µl로 최종 부피 50 µl를 만든 후 PCR을 실시하였다. 이때 사용한 primer는 NCBI database로부터 얻어진 정보로부터 (5'-GAACTTGGAAAGTACTG-3'), (5'-AGTTTTCGCTTCAGGCA-3')를 합성하여 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension과정을 35cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. 증폭산물은 pGEM T-Easy vector (Promega)에 cloning하여 염기서열을 조사하였고, 유전자간 상동성 비교는 BLAST분석에 의하여 실시하였다. Full length cDNA를 분리하기 위하여 얻어진 단편의 염기서열을 토대로 RACE용 primer를 합성하여 TAKARA사에서 시판하고 있는 5' RACE 및 3' RACE kit를 이용하여 미지의 영역을 증폭하였다. 각각의 RACE 방법으로 얻어진 산물을 염기서열을 조사였다. 또한 유전자간의 계통수 유연관계는 MEGA version 3.0 프로그램 (Kumar et al. 2001)을 이용하였다.

### Southern blot 분석

*Brcpi1* 유전자의 소송체 계놈에서 copy를 알아보기 위하여 소송체 염으로부터 genomic DNA 분리는 CTAB 방

법 (Sambrook et al. 2001)에 따라 수행하였다. 분리한 DNA (20 µg)를 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III와 *Pst* I으로 각각 소화하여 0.8% agarose gel 에 전기영동한 후, Hybond N 나이론 membrane (Amersham)에 전이시켰다. Southern blot을 위한 Probe 및 detection 과정은 DIG labelling and detection system (Roche)를 사용하여 회사에서 제공한 매뉴얼에 따라 수행하였다.

**Brcpi1 유전자 도입 형질전환 애기장대 육성**

형질전환을 위한 식물 발현벡터는 pBIG vector (TAKA RA)에 *Sfi*I 처리한 후, *Brcpi1* 유전자 말단에 *Sfi*I 제한효소 site를 primer에 의해 PCR합성하여 얻어진 단편과 ligation 하여 구축하였다 (Fig. 5A). 따라서 *Brcpi1* 유전자는 35S promoter의 지배 하에 발현되며, 선발 marker 유전자로 hygromycin 저항성유전자 (HPT)를 포함하고 있다. 애기장대의 형질전환은 *Brcpi1* 유전자가 삽입된 *Agrobacterium*을 이용하여 Steven 등 (1998)이 보고한 스프레이 방법에 의해 수행하였다. 얻어진 T1종자를 hygromycin 이 포함된 MS배지에서 정상적으로 생육한 식물체를 선발하여 T2 세대를 육성하였다.

**Abiotic stress 처리에 따른 유전자 발현 분석**

*Brcpi1* 유전자의 비생물학적 스트레스에서 반응을 알아보기 위해 형질전환 애기장대에 스트레스 처리 후, 얻어진 조직에서 유전자의 발현 양상을 RT-PCR 분석에 의해 조사하였다. 스트레스의 종류는 100 mM ABA, drought, osmotic (15% PEG6000, 250 mM NaCl, 4°C cold 등으로 하였다. 처리방법은 종자 발아 후, 14일된 육묘을 이용하여 Yosida 양액 (Yosida et al. 1976)에서 온도 25°C, 상대습도 70~75% 조건의 성장상에서 처리하여 시간대별로 식물 조직의 잎과 뿌리를 채취하였다. Total RNA 추출과 RT-PCR분석은 인트론 바이오사에서 시판하고 있는 plant RNA extraction kit과 one-step RT-PCR kit를 각각 사용하였다. 각각의 유전자 특이적으로 증폭할 수 있는 Primer들은 유전자의 3'-UTR부위 중심으로 BCM Program (Baylor college of Medicine HGSC))을 이용하여 GC함량 비율 등을 고려하여 선정하였다. Primer합성은 Takara사에 의뢰하여 제작하였다. Real-time qPCR은 BIO-RAD iQ5 real-time PCR system (BIO-RAD, USA)을 사용하여 Huang 등 (2008)이 기술한 방법에 의해 수행하였다. *Brcpi1* 유전자의 qRT-PCR을 위해서, 2 µg의 Total RNA을 이용하여 역전사효소 (Promega)에 의해 cDNA를 합성하여 이용하였다. 유전자의 상대적 발현량을 위해 reference 유전자로 actin을 사용하여 Ct 방법으로 계산하였다.

**결과 및 고찰**

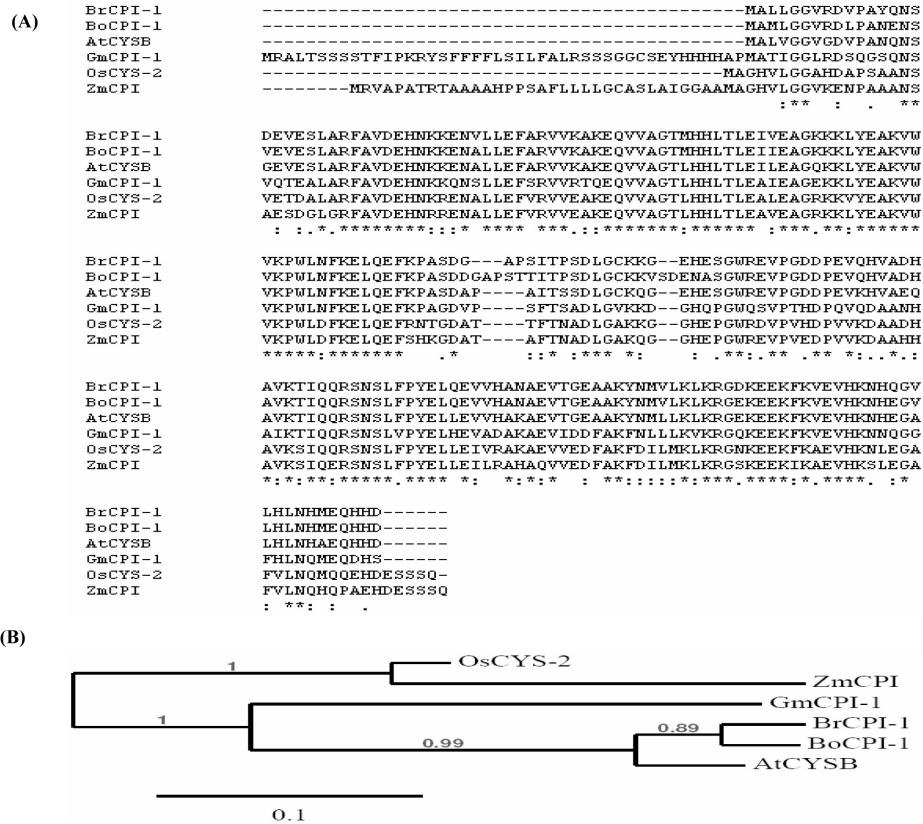
**Brcpi1 유전자의 분리 및 구조분석**

배추 유래 phytoecystatin 유전자를 분리하기 위해 NCBI data 분석을 통해 primer Br1 (5'-CAGGAGGTTGTTTCATGCTAA-3')과 Br2 (5'-AGTTTTGCGCTTCAGGCA-3')를 합성하였다. 이들 두 primer을 사용하여 RT-PCR 분석한 결과 171 bp 단편을 얻었으며, 애기장대 유래 *AtCYSB* 유전자와 상동성이 98 % 이었다. 따라서 RT-PCR에서 얻어진 단편은 배추 유래의 phytoecystatin 라고 생각되어진다. 따라서 이 단편의 염기서열을 이용하여 RACE 방법을 통해 full-length을 얻은 결과 3' RACE에서 575 bp cDNA 단편을 5' RACE에서 531 bp의 단편을 얻었다. 또한 3' RACE 얻어진 단편에는 17개 A tail이 존재하며, 209개의 염기가 UTR (untranslated region)으로 존재하며, 처음 분리한 단편과 125개 염기가 중복되었다. 5' RACE 얻어진 단편에서 처음 분리한 단편과 62 bp가 중복되었다. 따라서 분리한 유전자는 881 bp 크기로서 *Brcpi1*으로 명명하고, NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 GeneBank EF079953로 등록하였다. *Brcpi1* 유전자의 구조 분석은 DNA star 프로그램 (코아바이오)에 의해 분석한 결과 개시코돈은 63번째 염기, 종지코돈은 673번째 염기에 존재하였고, 그 후에 poly A가 존재하는 full-length cDNA이었다 (Fig. 1). 따라서 *Brcpi1* 유전자는 609개의 염기로 구성하는 ORF영역으로 203개의 아미노산으로 이루어졌으며, 15.5 kDa의 크기로 pI=4.6을 예측할 수 있었다.

```

ATGATGCAAAGCCGTTTCTCAATCTTCTCTTCATCTCGTCTCCTCTGATCGTCAGT
GACATGGCCTTGCTCGGCGCGTTCGGGATGTACCTGCTTATCAGAAACAGCAGGAGGTC - 60
1 - M A L L G G V R D V P A Y Q N S D E V
GAGAGCCTCGCTGTTTCGGTGTGATGAACATAACAAGAAGAGAATGACTGCTAGAG - 120
21 - E S L A R F A V D E H N K K E N V L L E
TTTGGAGGGTTGTGAAAGCGAAGGAACAAGTTGGCGGGAACGATCATTTAAACG - 180
41 - F A R V V K A K E Q V V A G T M H H L T
CTGGAGATGCTCGAGGCTGGGAAGAAGAAGCTTITAGAACCCAAAGTGTGGTGAAGCG - 240
61 - L E I V E A G K K K L Y E A K V W V K P
TGGTGAACCTCAAGGAGTTGCAAGGTTCAAGCCTGCCTCTGATGCTGCTCCTCCATC - 300
81 - W L N F K E L Q E F K P A S D G A P S I
ACTCCTCTGATCTGGCTGCAAGAAAGGTGAACATGAATCTGGGTGGAGGAAGTTC - 360
101 - T P S D L G C K K G E H E S G W R E V P
GGGGATGATCCAGAGTACAGCAGTGTGATCATGCTGTTAAGACTATTCAGCAGAGG - 420
121 - G D D P E V Q H V A D H A V K T I Q Q R
TCTAACTCTTGTCCCTTATGAGCTTACAGGAGTTGTTTCATGCTAACGCTGAGTTACT - 480
141 - S N S L F P Y E L Q E V V H A N A E V T
GGTGAGGCTGCAAAGTACAACATGGTTTGAAGTTGAAGAGAGAGACAAGGAGGAGAAG - 540
161 - G E A A K Y N M V L K L K R G D K E E K
TTCAAGTGGAGGTTTACAGAACAACATCAAGGTTTCTTCATCTCAACACCATGGAGCAA - 600
181 - F K V E V H K N H Q G V L H L N H M E Q
CACCATGACTAGCCTTATTGACTAAGTCTATTTCTTGTTCGTAAGTCCCATATATA - 609
201 - H H D -
ATCGGACAAAACAAAATGTGTATGATGTAATCTATTAGCAATGGGTTAATAGTTTGG
TCTATAAAGATGTTTTACGTTGTACATAAATAAAGGTAATAATGTTATGAAGATGTGAT
AAATTACTGAAATTTTGGCTGTCACAAAAA
    
```

**Fig. 1** Nucleotide and deduced amino acid sequences of a *Brcpi1* gene encoding phytoecystatin in *B. rapa* plant



**Fig. 2** Multiple alignment of deduced amino acid sequences of *Brcpi1* with other phytolectin proteins and phylogenetic tree analysis. A, Alignment of deduced amino acid sequences of phytolectin genes (*AtCYSB* (NM112084), *BoCPI-1* (AY065838), *GmCPI* (D31700), *OsCYS-2* (AP001073), *ZmCPI* (EU961198)). Putative signal peptide and active site domain are shaded. B, phylogenetic tree of phytolectin genes by Clustal W. The number next to the nodes give bootstrap values from 100 replicates

아미노산 alignment와 phylogenetic tree 분석

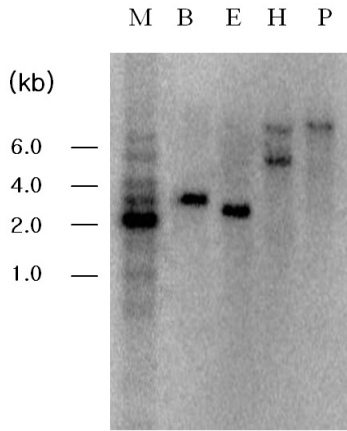
*Brcpi1* 유전자와 GenBank에 보고된 식물 유래의 phytolectin 유전자들 간의 계통수를 구축하기 위해 아미노산 배열을 나열하였다 (Fig. 2A). 아미노산 레벨수준에서 BrCPI 단백질은 *Brassica oleracea* (BoCPI-1), *Arabidopsis thaliana* (AtCYSB), *Glycine max* (GmCPI), *Oryza sativa* (OsCYS-2) 및 *Zea may* (ZmCPI)와의 상동성이 각각 95, 94, 81, 80 및 78 % 를 보였다. BrCPI 단백질은 Q × V × G motif가 존재하고 있으며, 이들 배열은 cysteine protease inhibitor에 특이적으로 보이고 있다. BrCPI 단백질을 구성하는 아미노산은 disulfide 결합을 형성하는 것으로 모든 papain계의 유전자에서 보고되었다 (Rawlingsand 1994; Trysellius et al. 1997; Pernas et al. 1998). 또한 C 말단 영역에는 2개의 매우 유사한 보존영역이 존재하며 이들 영역은 토마토, 사탕수수, 키위, *Arabidopsis* 등 에서도 잘 알려져 있다 (Belenghi et al. 2003; Diop et al. 2004; Gianotti et al. 2006; Jacinto et al. 1998; ).

*Brcpi1* 유전자의 계통수 작성은 6개의 유전자들을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 구축한 결과 총 7개의 단백질에서 3개의 그룹으로 나눌 수 있었다 (Fig. 2B). 각각

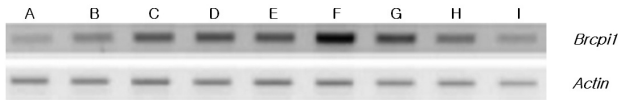
의 group에 해당되는 유전자들의 생리적 기능에 대한 정보는 거의 없기 때문에 BrCPI 단백질의 기능을 예측할 수 없으나, 3개 그룹의 유전자간 기능적으로 분리되어 있을 가능성을 시사하고 있다. 따라서 본 실험에서 분리된 BrCPI은 애기장대 및 양배추유래의 phytolectin과 같은 cluster를 형성하고 있기 때문에 이들 유전자와 거의 유사한 기능을 가지고 있을 것으로 예측된다.

*Brcpi1* 유전자의 copy 수와 발현분석

소송체 계놈 상에서 *Brcpi1* 유전자의 copy 수를 알아보기 위해, 배추 잎으로부터 분리한 genomic DNA 20 µg를 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III와 *Pst* I으로 각각 절단하였다. Southern blot 분석은 *Brcpi1* 유전자의 3' UTR 영역 특정 염기서열부위를 probe로 하였다. 그 결과 *Hind*III로 절단한 lane를 제외한 나머지 3개의 lane 에서 단일 밴드를 보였다 (Fig. 3). 이는 *Brcpi1* 유전자가 배추 계놈에 낮은 copy 수의 유전자임을 시사한다. 지금까지 *Brassica* 속에서 phytolectin 유전자는 7-8개정도 알려져 있다 (Hong et al. 2008). 이들 유전자간에 높은 상동성을 보였는데, Southern blot 분석에서 낮은 copy를 보였다, 이는 *Brcpi1* 유전



**Fig. 3** Southern blot analysis with *Brcpil* in *B. rapa* plant. The 3' region specific to *Brcpil* gene was used as a probe. Restriction enzymes used were as follows; M: molecular marker, B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, P: *Pst* I

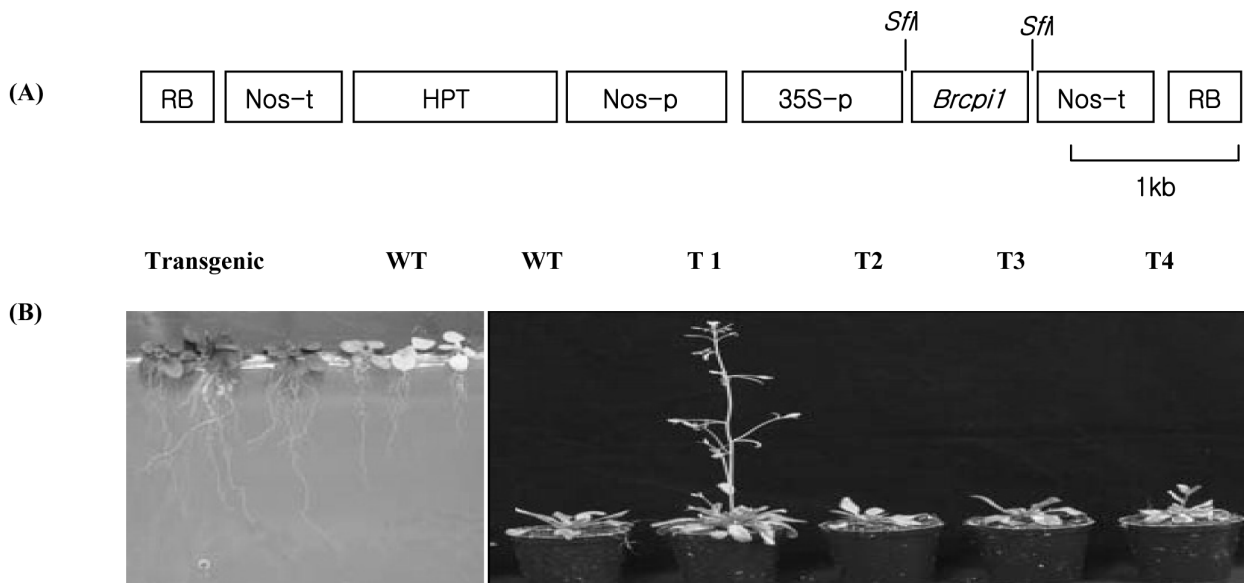


**Fig. 4** Analysis of *Brcpil* gene expression in organs of the *B. rapa* plants. A: Roots, B: stems, C: young leaves, D: mature leaves, E: stigmas, F: stamens, G: petals, H: Calyx, I: flower stalks

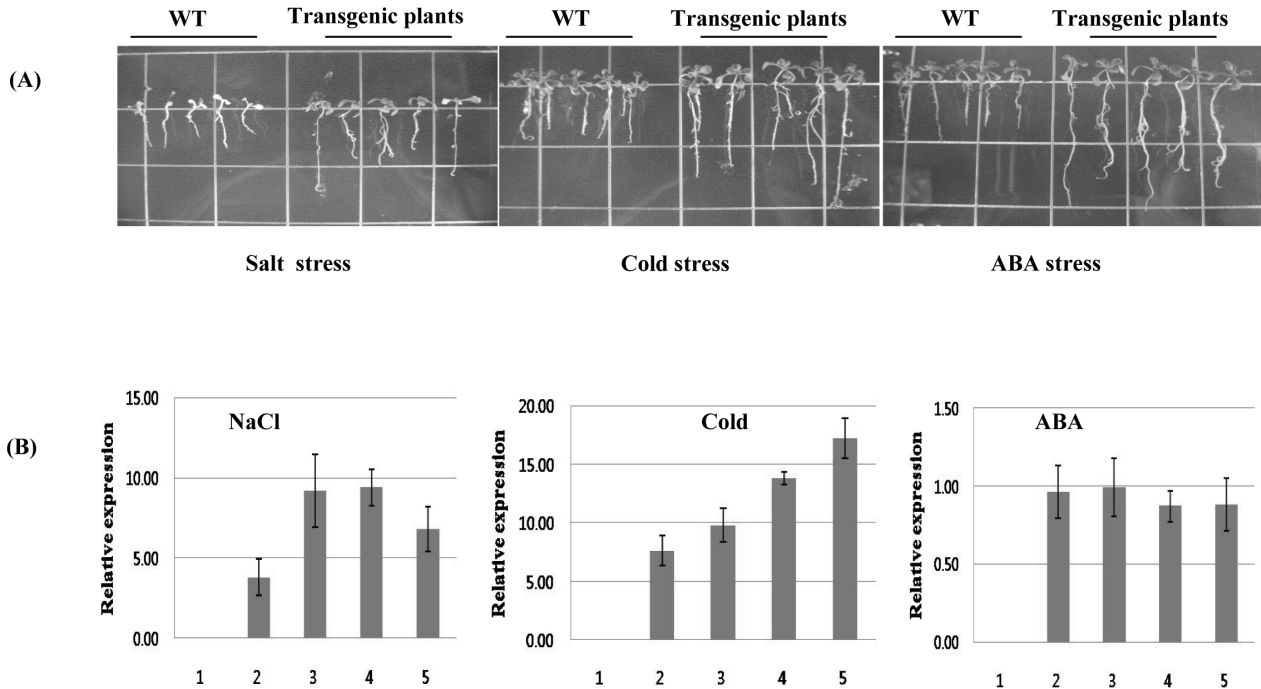
자의 3' UTR 영역 특정 염기서열부위를 probe사용하였기 때문에 배추 계통 내에 *Brcpil* 만이 특이적으로 hybridization 되었기 때문으로 생각된다. 또한 *Brcpil* 유전자의 발현 분석은 뿌리, 줄기, 어린잎, 성숙한 잎, 주두, 꽃잎, 수술, 꽃받침, 화경 등 9개 조직을 이용하여 RT-PCR분석을 수행하였다 (Fig. 4). *Brcpil* 유전자의 기관별 발현양은 수술이 가장 높게 나타났으며, 꽃받침, 주두 및 꽃잎 등의 기관에서 뿌리 및 잎보다 높은 경향을 보인 것으로 미루어 볼 때 기관 특이적으로 발현하고 있음을 시사한다.

형질전환 애기장대를 이용한 *Brcpil* 유전자의 기능분석

*Brcpil* 유전자의 기능을 분석하고자 사용한 식물 발현 벡터는 pBig vector로 *Brcpil*는 35S promoter의 조절지배 하에 발현하도록 구축하였다. 형질전환은 애기장대를 생장시킨 후, 개화전에 *Agrobacterium*을 스프레이로 화아기관에 축축하게 감염시킨 후, 종자를 채취하였다. 얻어진 T1종자를 hygromycin이 포함된 MS배지에서 30개의 형질 전환체 중 정상적으로 생육한 10개 식물체를 선발하여 T2 세대를 육성하였다 (Fig. 5B). 형질전환 식물체들에서 도입 유전자의 확인은 *Brcpil* 및 HPT 유전자를 이용하여 PCR 분석으로 확인하였다. 그리고 유전자의 도입이 확인된 개체를 이용하여 RT-PCR 분석을 통해 *Brcpil* 유전자의 발현



**Fig. 5** Vector construction and transformation. A, Ti-plasmid vector construction for overexpression of *Brcpil* gene. Nos-p; nos gene promoter, Nos-t; nos gene terminator, HPT; hygromycin phosphotransferase gene, 35S-p; Cauliflower mosaic virus 35S-promoter, LB; left border, RB; right border. B, *Arabidopsis* plants transformed with pBIG vector containing *Brcpil* gene. Left photo. transgenic plant on the selection medium, right photo; phenotypes of transgenic plants. WT; non transgenic plants T1, T2, T3, and T4; transgenic plants



**Fig. 6** Growth pattern and gene expression pattern in transgenic plants. A, growth pattern under salt, cold and ABA stress of transgenic plants containing *Brcpil* gene. B, real-time qRT-PCR analysis of *Brcpil* gene under salt, cold and ABA stress. Relative expression level of were measured in wild type (lane 1), transgenic plant (non stress) (lane 2) and transgenic plants under each stress condition (lane 3, 4, 5). Amount of cDNAs were calibrated using the actin gene (GenBank no. FJ969844) as a reference. Data presented are means and standard deviation of three independent replicated experiments

을 확인하였다 (결과 미제시). 정상성장조건에서 WT과 transgenic plants 간의 phenotype을 비교한 결과 형질전환체가 성장 속도 및 개화시기가 빠른 게 나타났다. 식물생장에 영향을 주는 성장조절물질 중 ABA 처리 후 *Brcpil* 유전자의 발현 정도를 살펴본 결과 ABA 처리한 형질전환체에서 ABA를 처리하지 않은 형질전환체와 거의 유사한 발현량을 보였다 (Fig. 6B). 또한 환경 스트레스 변화에 따른 *Brcpil* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해 250 mM NaCl 및 저온 (4°C)을 처리하여 지상부의 발현량을 분석한 결과 *Brcpil* 유전자의 발현은 250 mM NaCl 및 저온 (4°C)을 처리한 형질전환체에서 처리하지 않은 형질전환체에 비해 높게 나타났다 (Fig. 6B). 또한 250 mM NaCl 및 저온 (4°C) 및 ABA 처리에 따른 형질전환체의 생육은 형질전환하지 않은 대조구에 비해 뿌리 및 지상부의 생육이 양호하였다 (Fig. 6A). 통상 염해 스트레스는 NaCl에서 유래되어지는 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 이온 농도가 원인이 되어 세포 내에 Ca<sup>2+</sup> 이온의 증가를 초래하게 되고, 순간적으로 변화된 세포질내의 Ca<sup>2+</sup> 이온농도는 second messenger로서 작용하여, 세포의 스트레스에 대한 신호전달체계를 활성화하고 세포내의 염해 스트레스 적응에 관여하는 K<sup>+</sup> 이온의 유입과 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 관계를 조절된다. 이런 측면에서 *Brcpil* 유전자는 세포내의 염해 스트레스를 적응하여 생육의 증가 및 유전자의 발현이 높게 나타난 것으로 사료된다. 따라서 *Brcpil* 유전자는 비생물학적 스트레스 반응에 넓은

스펙트럼을 갖고 있는 식물 성장과 발육에 중요하게 관여하고 있음을 시사한다.

## 적 요

식물 유래 cystein protease 저해제는 phytocystatin 으로 분류되어, 식물의 성장과 발육과정상에서 상이한 발현 양상을 보이고 있다. 본 연구에서는 배추 유묘로부터 phytocystatin 유전자를 분리하여 *Brcpil* (GenBank accession no.: EF079953)으로 명명하고, 분자적 특성 및 기능 분석을 수행하였다. *Brcpil* 유전자는 전장이 881 bp이고, ORF가 609 bp으로 203개의 아미노산으로 구성되었다. BrCPII 단백질은 아미노산 motif로써 G와 PW 및 LARFAV가 있고, 식물 유래 phytocystatin 활성부위인 QVVAG가 잘 보존되었다. 또한 BrCPI 단백질은 *Brassica oleracea* (BoCPI-1), *Arabidopsis thaliana* (AtCYSB), *Glycine max* (GmCPI), *Oryza sativa* (OsCYS-2) 및 *Zea may* (ZmCPI)와의 아미노산 서열에서 각각 95, 94, 81, 80 및 78 %의 상동성을 보였다. *Brcpil* 유전자의 계통수를 분석한 결과 기존에 알려진 6개의 단백질에서 3개의 group으로 나눌 수 있으며, 애기장대 및 양배추와 같은 cluster을 보였다. 또한 Southern blot 분석한 결과 *Brcpil* 유전자는 배추 계통에 낮은 copy 수로 존재하였다. 기관별 *Brcpil* 유전자의 발현양상은 수

술이 가장 높게 나타났으며, 꽃받침, 주두 및 꽃잎 등의 순으로 나타났다. *Brcpil* 유전자의 기능을 알아보기 위해, 형질전환 애기장대를 이용하여 염, 저온 및 ABA 처리에 따른 도입 유전자의 발현양상을 살펴본 결과 고염 및 저온 하에서 뿌리의 생장이 대조 구에 비해 크게 나타났으며, 유전자의 발현에서도 강하게 나타났다. 그러나 ABA처리에서는 큰 변화를 볼 수 없었다. 따라서 본 연구에서 분리한 *Brcpil* 유전자는 염 및 저온에 민감하게 반응하며, 조직 및 기관 특이적으로 기능하여 다양한 환경 stress에 저항할 수 있는 방어가작을 갖고 있는 것으로 예측된다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업 (과제번호: 200705010)과 농림기술개발사업 (과제번호:204068-3)의 일환으로 수행되었다.

## 인용문헌

- Arai S, Matsumoto I, Emori Y, Abe K (2002) Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin, *J. Agr. Food Chem.* 50:6612-6617.
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Delledonne M (2003) AtCYSI, a cystatin from *Arabidopsis thaliana* suppresses hypersensitive cell death, *Eur. J. Biochem.* 270:2593-2604.
- Chen W.-Q, Swart W.J (2001) Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with root rot of *Amaranthus hybridus* in South Africa, *Plant Dis.* 85:1076-1080.
- Diop N.N, Kidrič M, Repellin A, Gariel M, d'Arcy-Lameta A, Pham Thi A.T, uily-Fodil Y (2004) A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) leaves, *FEBS Lett.* 577:545-550.
- Felton GW, Korth KL (2000) Trade-offs between pathogen and herbivore resistance, *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:309-314.
- Gianotti A, Rios WM, Soares-Costa A, Nogaroto V, Carmona AK, Oliva MLV, Andrade S, Henrique-Silva F (2006) Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*), *Protein. Expres. Purif.* 47:483-489.
- Gutiérrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, Gómez-Lim MA (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants, *Nature Biotechnol.* 17:1223-1226.
- Haq SK, Atif SM, Kham RH (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection, *Arch. Biochem. Biophys.* 431: 145-159.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux P.S, Pagni M, Sigrist C.J (2006) The PROSITE database, *Nucleic Acids Res.* 34:D227-D230.
- Hong JK, Hwang JE, Chung WS, Lee KO, Choi YJ, Gal SW, Park BS, Lim CO (2007) Expression of a Chinese cabbage cysteine proteinase inhibitor, BrCYS1, retards seed germination and plant growth in transgenic tobacco plant, *Plant Sci* 172:556-563
- Huang J, Wang MM, Jiang Y, Wang QH, Huang X, Zhang HS (2008) Stress repressive expression of rice *SRZ1* and characterization of plant *SRZ* gene family, *Plant Sci.* 174:227-235.
- Hwang JE, Hong JK, Je JH, Lee KO, Kim DY, Lee SY, Lim CO (2009) Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phytocystatin isoform, *AtCYS6*, *Plant Cell Rep* 28:1623-1632
- Jacinto T, Fernandes KVS, Machado OLT, Siquiera-Junior CL (1998) Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin, accumulate high levels of cystatin, *Plant Sci.* 138:25-42.
- Jiang ST, Tzeng SS, Wu WT, Chen GH (2002) Enhanced expression of chicken cystatin as a thioredoxin fusion form in *Escherichia coli* AD494 (DE3)pLysS and its effect on the prevention of surimi gel softening, *J. Agr. Food Chem.* 50:3731-3737.
- Joshi C.P, Zhou H, Huang X, Chiang V.L (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants, *Plant Mol. Biol.* 35: 993- 1001.
- Kuroda M, Kiyosaki T, Matsumoto I, Misaka T, Arai S, Abe K (2001) Molecular cloning, characterization and expression of wheat cystatins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:22-28.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGAR2: Molecular evolutionary genetic analysis software, Arizona state University, Tempe, Arizona, USA, 2001
- Lim CO, Lee SI, Cheng WS, Park SH, Hwang I, Cho M.J (1996) Characterization of a cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. Pekinensis) flower buds, *Plant Mol. Biol.* 30:373-379.
- Martínez M, Zamira A, Gambardella M, Echaide M, Carbonero P, Diaz I (2005) The strawberry gene *Cyfl* encodes a phytocystatin with antifungal properties, *J. Exp. Bot.* 56:1821-1829.
- Massonneau A, Condamine P, Wisniewski J.P, Zivy M, Rogowsky P.M (2005) Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought, *Biochim. biophys. Acta* 1729:186-199.
- Misaka T, Kuroda M, Iwabuchi K, Abe K, Arai S (1996) Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin, *Eur. J. Biochem.* 240:609-614.
- Pernas M, Sánchez-Monge R, Salcedo G (2000) Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut, *FEBS Lett.* 467:206-210.
- Samac DA, Smigocki AC (2003) Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode, *Phytopathology* 93:799-804.
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (third ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Sánchez M.C, Osada S, Teliz D, Espitia E, Rendón G (1990) Etiología e incidencia de la mancha negra del tallo en *Amaranthus* sp. y otras enfermedades, *Rev. Mex. Phytopatol.* 8: 102-106.
- Shyu DJH, Chou WN, Yiu TJ, Lin CPC, Tzen JTC (2004) Cloning, functional expression and characterization of cystatin in sesame seeds, *J. Agr. Food Chem.* 52 :1350-1356.
- Soares-Costa A, Beltramini L.M, Thiemann O.H, Henrique-Silva F (2002) A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 296:1194-1199.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Levine A (1999) The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in programmed cell death in plants, *Plant Cell* 11:431-444.
- Sugarawa H, Shibuya K, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S (2002) Is a cystein proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus cariophyllus* L.) flowers?, *J. Exp. Bot.* 53:407-413.
- Steven JC, Andrew FB (1998) A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* The Plant J. 16:753-743
- Turk B, Turk V, Turk D (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors, *Biol. Chem.* 378:141-150.
- Yang AH, Yeh KW (2005) Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung ) *Planta* 221:493-501.