

효모 기능 선발을 이용한 벼의 세포사 유발을 억제하는 유전자 선발

이규호 · 손예진 · 위디 · 손재근 · 김경민*

경북대학교 농업생명과학

Putative Bax inhibitor from rice a conserved cell death suppressor, is isolated by yeast functional screening

Gyu Ho Lee, Ye Jin Son, Widhi Diya Sawitri, Jae-Keun Sohn,
Kyung-Min Kim*

*Division of Plant Biosciences, School of Applied BioSciences, College of Agriculture & Life Science,
Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea*

Abstract

The plant-homologue of Bax Inhibitor, a gene described to suppress the cell death induced by Bax gene expression in yeast, was isolated from rice (*Oryza sativa* L.). Nucleic acid sequence and amino acid sequence were 741 bp and 247 bp, respectively. The amino acid sequence of the predicted protein was well conserved in plant (84 % in amino acids) and contained five membrane-spanning segments.

Key words : QX95001, AtBI-1, cell death, Bax inhibitor, rice

서 론

동물에서 스트레스의 메커니즘은 많이 밝혀졌으며, 식물분자에서 스트레스의 메커니즘은 아직 완전히 구명되지 않았다. 세포예정사의 연구에 대한 짧은 역사 동안 세포예정사는 유전적 요인 또는 생물적 스트레스 (biotic stress) 및 비생물적 스트레스 (abiotic stress)와 같은 환경적 자극들에 의해 유도된다고 밝혀

져 있다 (Kim et al., 2006; Eswaran et al., 2010). 예정세포사는 생물에서 스트레스를 가한 조건과 일반적인 조건 구분 없이 일어나고 있다. 그 중 일반적인 조건에서 예정된 세포사멸에 관한 연구는 많이 진행 되지 않아 본 실험에 스트레스가 적은 환경에서 생육한 생물체를 이용하여 연구를 하였다. Yeast functional screening 방법은 식물에서 스트레스에 대한 반응에 관여하는 유전자를 밝혀내기 위해 사용되어져 왔으며, *Jatropha curcas* 의 염분 스트레스 저항을 확인할 수 있다고 보고되었다 (Eswaran et al., 2010). 식물에서 Bax Inhibitor (BI-1)의 죽음 방지 메커니즘은

*Corresponding author. E-mail : kkm@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-5710, Fax : 82-53-958-6880
(Received November 30, 2011; Examined December 10, 2011; Accepted December 20, 2011)

Arabidopsis thaliana BI-1 (AtBI-1)의 yeast functional screen 에 의해 보고되었다 (Jin and Reed, 2002; Yamada et al., 2005). Yeast functional screening은 QX95001을 Reed가 처음 사용함을 보고하였다. QX95001의 Bax 유전자와 cDNA library가 결합하면 cDNA가 Bax를 억제하여 galactose 배지에서 자랄 수 있지만, 결합 하지 않는 경우에는 Bax가 발현 되어 galactose 배지에서 자라지 못 하였다 (Yamada et al., 2005). Yeast functional screening 메카니즘은 activation domain을 이용하였다. cDNA library는 activation domain이 많이 있으며 activation domain과 binding promoter가 결합하면, transcriptional activation이 활성화된다 (Greenwood et al., 2010). 벼의 예정된 세포사멸의 경로를 탐색함으로써 관련 유전자를 확인한다면 작물의 생산성 증대에도 영향을 줄 수 있을 것이라고 생각한다. 따라서 본 연구에서는 효모에서 활성화 되는 Bax inhibitor와 관련된 유전자를 동정하여 특성화 하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에 사용한 재료는 품종출원 중인 벼 ‘드리미 2호’로 경북대학교 작물육종학연구실로부터 분양받아 사용하였다.

2. 벼 잎의 total RNA 추출

Total RNA는 RNeasy plant mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 추출하였다. 파종 후 2주된 신선한 벼 잎 100mg 정량하여 autoclave에서 고온멸균된 막자사발에 넣고 액체질소와 막자를 이용하여 마쇄 하였으며, β -mercaptoethanol이 포함된 450 μ l RLT buffer를 첨가하여 완전히 마쇄한 뒤, 교반하여 QIAshredder spin column으로 옮기고 13,000 rpm으로 2분간 원심분리 하였다. 상층액은 새로운 2ml microtube로 옮기고 상층액의 0.5배 부피만큼의 99% 에탄올 (-20 °C)을 첨가한 뒤, RNeasy Mini spin column 에 옮겨 재차 1분간 원심분리 하였고, 700 μ l RW1

buffer로 column을 세척한 뒤 에탄올이 함유된 500 μ l RPE buffer를 첨가하여 plasmid DNA를 세척하였다. 이후 여분의 PE buffer 성분을 완전히 제거하기 위해 spin column을 1.5ml 튜브에 옮겨 끼우고 원심분리 하였고, 30 μ l RNase-free water를 첨가하여 15분간 정 치 후 13,000rpm으로 1분간 원심 분리하였다. RNase-free water를 첨가하여 원심 분리하는 과정을 재차 실행하여 RNA sample을 추출하였다.

3. cDNA Library 제작

cDNA Library의 제작은 total RNA를 사용하여 cDNA library kit (TaKaRa code 6119와 6130, TaKaRa Co., Japan)를 이용하였다. 우선 Master mixture를 만들기 위한 재료로 12.4 μ l 5X 1st strand synthesis buffer, 3.1 μ l dNTP mixture (10mM), 3.1 μ l RNase inhibitor (20 unit/ μ l), 6.2 μ l Oligo dT-TA primer (50ng/ μ l), 3.1 μ l M-MLV reverse transcriptase를 혼합하여 새로운 micro-tube에 4.5 μ l만큼 옮겨 닦고 얼음 속에 보관하였다. 앞에서 추출한 4.3 μ l total RNA와 1.2 μ l DEPC water (Sigma, 6130)를 섞어 5.5 μ l로 맞추어 65°C에서 5분간 가한 뒤 얼음에 보관하여 앞에서 만든 master mixture 4.5 μ l를 첨가하여 총 10 μ l를 섞어 이것을 실온에서 10분, 42°C에서 1시간, 80°C에서 5분간 차례로 정치하여 First strand cDNA를 제작하였다. 이 First strand cDNA는 Second strand cDNA 제작에 이용하였다. First strand cDNA synthesis mix와 15 μ l 5X 2nd strand synthesis buffer, 1.5 μ l dNTP mixture (10mM)를 혼합한 후 DEPC water로 총 량을 81 μ l로 조정하였다. 그 다음 1 μ l E. coli DNA Polymerase I (20unit/ μ l)와 1 μ l E.coli RNaseH/DNA ligase mixture를 섞어주었다. 16°C에서 2시간, 70°C에서 10분간 정치하였고, 2 μ l T4 DNA polymerase I (1unit/ μ l)를 첨가한 후 37°C에서 10분간 정치한 뒤, 6 μ l stop solution만큼을 처리하였다. 그리고 2 μ l CA-Cassette adaptor, 6 μ l ligation solution II를 섞은 뒤 12 μ l ligation solution I을 혼합하였으며, 16°C에서 다시 45 분간 정치하여 cDNA를 합 성하였다.

5 μ l 10X Ex Taq buffer, 4 μ l dNTP mixture (2.5mM), 0.5 μ l CA-EcoR I primer (20pmole/ μ l, 5'-

GGTCTAGAGAATTCTAAGTACGT-3'), 0.5 μ l RA primer (20pmole/ μ l, 5'-CTGATCTAGACCTGCAGG CCTC-3'), 0.25 μ l TaKaRa ExTaq™ (5unit/ μ l)를 혼합하여 총 반응액을 50 μ l로 조정하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 1분 반응 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, 60 $^{\circ}$ C에서 30 초, 72 $^{\circ}$ C에서 6 분간 35 주기로 증폭하고 72 $^{\circ}$ C에서 5 분간 추가로 반응하였다. 앞서 제작한 cDNA library와 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI* (TaKaRa, Japan)으로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 처리한 plasmid vector (pYX112)에 ligation하였다. pYX112는 ARS/CEN, triose-phosphate isomerase, URA3 등으로 구조화되어 있다 (Yamada et al., 2005). 제한효소 처리된 pYX112 vector는 self ligation을 방지하기 위해 alkaline phosphatase (TaKaRa, Japan)로 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 처리하였으며, ligation에는 TaKaRa ligation kit ver 2.1 (TaKaRa, Japan)을 사용하였다. 23ng cDNA와 50ng pYX112, 5 μ l ligation solution buffer I을 첨가하여 용량을 10 μ l로 만들고 16 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 정치하였고, 그 후 1 μ l ligation solution buffer III을 첨가하여 잘 섞은 후 얼음 위에 정치하였다.

Ligation된 pYX112-cDNA를 대장균에 형질전환 시키기 위하여 100 μ l DH5a competent cell에 10 μ l pYX112-cDNA를 첨가하여 얼음 위에서 30 분간 정치한 후, 42 $^{\circ}$ C에서 30 초간 처리하였다. 재차 얼음 위에서 2분간 정치하고 LB broth (10g/L Triptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L Sodium chloride) 대신 200 μ l SOC 용액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C의 shaking incubator에서 약 1시간 동안 150rpm으로 배양하였다. 배양액을 100ppm ampicillin이 첨가된 LB 평판배지에 도말한 후 37 $^{\circ}$ C에서 12 시간 배양하였다.

형질전환에서 얻어진 콜로니는 10ml LB broth에 넣어 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 배양액은 원심분리를 이용하여 균체를 모으고, 상층액을 제거한 뒤 250 μ l P1 buffer를 첨가하여 균체를 녹이고 같은 양의 P2 buffer를 넣어 잘 섞고 350 μ l N3 buffer를 첨가한 후, 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 spin column에 옮기고, 1분간 원심분리 하였다. Spin column의 밑 부분에 있는 여액은 완전히 제거하고 500 μ l PB buffer로 column을 세척한

후, 재차 750 μ l PE buffer 를 첨가하여 필터에 결합된 plasmid DNA를 세척하였다. Spin column은 1.5 ml 튜브에 장착한 후 원심분리 하여, 여분의 PE buffer 성분을 완전히 제거하고, 50 μ l nuclease-free water를 이용하여 plasmid DNA를 물에 용해시킨 다음 13,000rpm으로 원심분리한 뒤 추출하였다.

4. Yeast functional screening과 세포배양

Yeast functional screening을 실행하기 위하여 선별 배지에서 선발할 수 있는 QX95001 효모 vector를 이용하였다 (Fig. 1). QX95001은 *S. cerevisiae* (BF264-15Dau)에 Bax와 LEU2가 구조화된 YEp51-Bax를 포함하고, Leucine이 없는 배지에서 배양된다 (Kim et al., 2006; Xu et al., 1998).

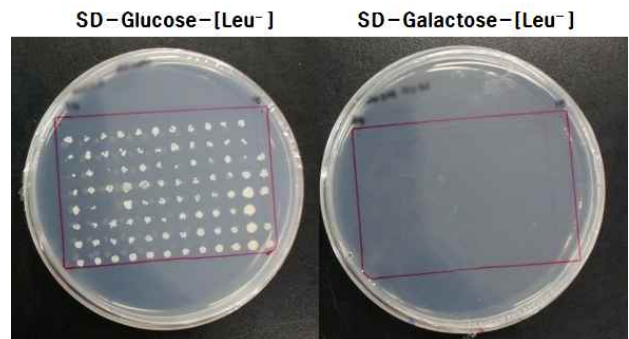


Fig. 1. Appearance of yeast strain QX95001 on selection medium. QX95001 grown on glucose medium without leucine and do not grow on galactose medium without leucine.

cDNA 형질전환용 QX95001은 SD-Glucose-Leu⁻ 액체배지로 30 $^{\circ}$ C의 shaking incubator에서 3일간 배양한 배양액을 3,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 균체를 포집하였다. 상층액을 제거한 후 2ml 1X TE (pH 8.0) 용액을 첨가하여 현탁하고 원심 분리하여 상층액을 다시 제거한 뒤, 2ml lithium acetate (0.1 M)에 현탁하고 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후, 1ml lithium acetate (0.1M)를 다시 첨가하고 현탁한 후 competent cell을 완성하였다. 만들어진 cDNA library의 yeast functional screening을 위한 방법은 다음과 같다. Competent cell QX95001은 200 μ l씩 tube에 분주하고 1 μ l plasmid DNA (500ng/ml), 5 μ l salmon DNA

(10mg/ml), 1ml polyethylene glycol 5000 (50%)을 첨가하여 잘 혼합한 후에 30°C에서 30분간 정치하였다. 100 μ l DMSO를 첨가하여 섞은 후 42°C에서 5분간 반응을 하고 상온에서 5분간 방치하였다. 이후 10,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였고, 침전물은 1ml YPD (10g/L yeast extract, 20g/L peptone, 20g/L dextrose) 액체배지에 용해한 후, 30°C의 shaking incubator에서 150rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5,000rpm으로 1분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하고, 500 μ l ddH₂O에 다시 용해한 후, 재차 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 50 μ l ddH₂O로 침전물을 완전히 희석하여 SD-glucose-Leu-Ura⁻ 고체배지에 도말하고 30°C에서 3일간 배양하였다. 얻어진 콜로니는 선발배지 SD-glucose-Leu-Ura⁻와 SD-galactose-Leu-Ura⁻ 배지에 멀티랙 (multitrack)을 이용하여 배양하였고, 양쪽 배지에서 모두 자란 clone을 선발하여 plasmid DNA를 추출하였다 (Panet al., 2001; Xu and Reed, 1998). 선발된 clone들은 cDNA의 도입 유무를 확인하기 위하여 *EcoRI*와 *XhoI*을 처리한 후 전기영동하여 확인하였다.

5. Putative clone 세포배양

cDNA가 도입된 pYX112를 Pan et al. (2001)과 Yamada et al. (2005) 방법에 의하여 세포배양을 하였으며, 세포배양 후 plasmid DNA 추출은 QIAGEN plasmid 추출 Kit (USA, Cat. No. 27106)를 이용하여 추출하여 솔젼트사에 염기서열을 의뢰하였다.

6. 상동성 분석

Putative clone의 *Oryza sativa* EST의 염기서열은 NCBI GeneBank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 nucleotide-protein blast (blast x)를 이용하였다. 각각의 염기서열들은 text 파일로 변환한 후에 GENETYX-WIN Version 3.2 (Japan)를 사용하여 서로 다른 균주간의 상동성을 비교하였다. WoLF PSORT (<http://wolfsport.org/>)의 단백질 예측 결과로 찾아낼 수 있었다.

결과 및 고찰

‘드리미 2호’에서 추출한 total RNA로 합성한 2nd strand cDNA의 5말단과 3말단에 adaptor 붙이는 PCR을 수행한 결과, smear band를 확인할 수 있었다. pYX112-cDNA를 *E. coli*에 형질전환을 수행한 결과, 약 2,000 개/petri-dish 이상의 콜로니를 획득하였다. 이들 plasmid DNA를 추출하여 QX95001로 형질전환하였다. QX95001 형질 전환하여 SD-glucose-Leu-Ura⁻와 SD-galactose-Leu-Ura⁻ 배지에서 선발하여 양쪽 배지에서 모두 자란 clone을 선발하였다. 그 결과, 864개의 클론 중 galactose 배지에서 자란 총 5개의 클론을 선발하였으며, 그중 4개 클론은 현재 알려져 있지 않은 세포사멸관련 유전자 일 것으로 추정되었고 나머지 1개의 클론은 741 nucleotide sequence와 247 amino acid sequence 및 5 membrane-spanning 단편으로 되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2).

WoLF PSORT의 단백질 예측 결과로부터 1개의 예정된 세포 사멸에 관련된 유전자를 찾아낼 수 있었다 (Table 1). Bax inhibitor (D2-243)는 NCBI에서 blast한 결과, *Arabidopsis thaliana* BAX inhibitor 1(BI1) mRNA, complete CDs와 86% 상동성을 나타내는 것으로 확인 되었다. *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Ricinus communis*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Capsicum annum*, *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Phyllostachys praecox*, *Medicago truncatula*, *Triticum aestivum*, *Triticum aestivum* 등 14 식물의 Bx inhibitor와 관련되어 벼에서 선발한 Bax inhibitor (D2-243)는 식물에서 amino acid sequence 결과로 84 % 정도 conserved sequence가 있음을 확인하였다 (Fig. 3). 따라서 벼에서 yeast functional screening에 의해 선발된 1개의 putative clone은 Bax inhibitor와 관련 있는 단백질이라고 판단된다. 또한 벼의 각 스트레스에 관련된 유전자 탐색은 yeast functional screening 방법을 이용한다면 예정된 세포사멸에 관련된 단백질 선발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

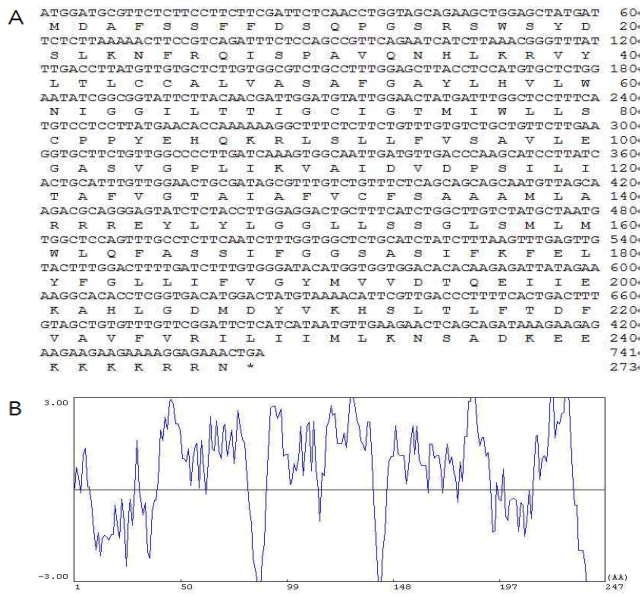


Fig. 2. Characterization of putative clone (D2-243) by yeast functional screening in rice. A : DNA and amino sequence of D2-243. B : Hydrophobicity of amino sequence.

적 요

본 연구에서는 효모에서 과 발현하는 Bax inhibitor와 관련된 유전자를 동정하여 특성화 하였다. Yeast functional screening이라는 방법을 이용하여, 일반적인 환경에서 재배된 벼의 cDNA를 QX95001에 형질전환하여 SD-galactose-Leu-Ura-배지에서 생성된 8개의 클론을 선발하였다. 그 중 AtBI-1과 같은 domain이 있는 D2-234를 포함하여 5개의 클론을 선발하였다. D2-243는 741bp의 염기서열과 247개의 아미노산으로 구성되었고 5 membrane-spanning 단편으로 되어 있음을 확인하였다. D2-234는 SD-galactose-Leu-Ura 배지에서 세포성장이 왕성하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 벼 식물에서 나타나는 세포예정사와 관련된 단백질을 선발하는데 유용하게 이용될 것으로 생각된다.

Table 1. Significant alignment of sequence compare with D2-243

| Accession | Description | Query coverage (%) | Max identification (%) |
|----------------|--|--------------------|------------------------|
| NP_199523.1 | BAX inhibitor 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 86 | 100 |
| ABD65015.1 | bax inhibitor, putative [<i>Brassica oleracea</i>] | 86 | 94 |
| AAK73101.1 | Bax inhibitor 1 [<i>Brassica napus</i>] | 86 | 95 |
| XP_002531791.1 | bax inhibitor, putative [<i>Ricinus communis</i>] | 86 | 81 |
| NP_001234450.1 | Bax inhibitor [<i>Solanum lycopersicum</i>] | 86 | 77 |
| ACC62519.1 | Bax inhibitor [<i>Capsicum annuum</i>] | 86 | 74 |
| ACS36610.1 | bax inhibitor 1 [<i>Capsicum annuum</i>] | 85 | 75 |
| AAK73102.1 | Bax inhibitor 1 [<i>Nicotiana tabacum</i>] | 86 | 74 |
| XP_003524122.1 | bax inhibitor 1-like [<i>Glycine max</i>] | 84 | 73 |
| ACG39435.1 | bax inhibitor 1 [<i>Zea mays</i>] | 86 | 72 |
| ABB84400.1 | Bax inhibitor-1 [<i>Phyllostachys praecox</i>] | 85 | 71 |
| XP_003611381.1 | Bax inhibitor [<i>Medicago truncatula</i>] | 85 | 70 |
| ACN59489.1 | BAXI.2 [<i>Triticum aestivum</i>] | 86 | 72 |
| ACN59488.1 | BAXI.1 [<i>Triticum aestivum</i>] | 86 | 71 |

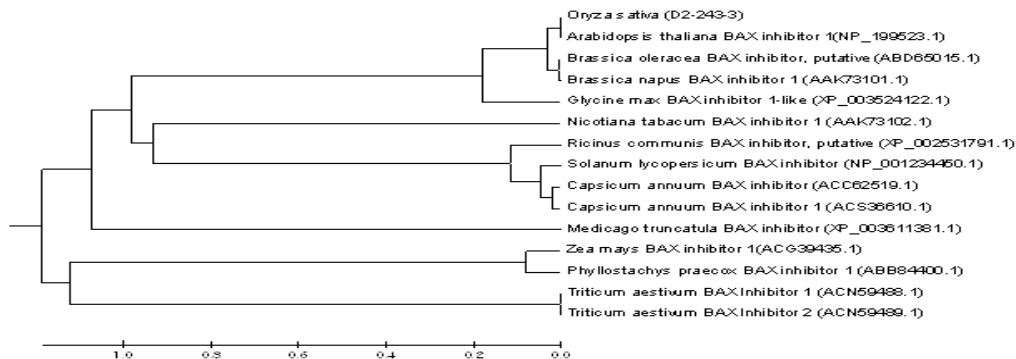


Fig. 3. Phylogenetic tree analysis Bax inhibitor (D2-243) proteins from plants was constructed by the UPGMA method.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업 (GM 실용화 사업단 : PJ0080822011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

1. Angadi, S. V., Cutforth, H. W., Miller, P. R., McConkey, B. G., Entz, M. H., Brandt, S. A., and Volkmar, K. M. 2000. Response of three *Brassica* species to high temperature stress during reproductive growth. *Canadian Journal of Plant Science* 80:693-701.
2. Conti, L., Price, G., O'Donnell, E., Schwessinger, B., Dominy, P., and Sadanandom, A. 2008. Small ubiquitin-like modifier proteases overly tolerant to salt1 and -2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20:2894-2908.
3. Eswaran, N., Parameswaran, S., Sathram, B., Anantharaman, B., Kumar, G. P. K., and Tangirala, S. J. 2010. Yeast functional screen to identify genetic determinants capable of conferring abiotic stress tolerance in *Jatropha curcas*. *BMC Biotechnology* 23:1472-6750.
4. Greenwood, M. T., and Ludovico, P. 2010. Expressing and functional analysis of mamalian apoptotic regulators in yeast. *Cell Death and Differentiation* 17:737-745.
5. Jin, C., and Reed, J. C. 2002. Yeast and apoptosis. *Nature Reviews* 3:453-459.
6. Kim, K. M., Lim, Y. S., Sul, I. W., Hirata, A., Yamada, M. K., and Uchimiya, H. 2006. Analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell growth defect factor2 (Cdf2) suppressing yeast cell proliferation. *Korean J. Genetics* 28:201-206.
7. Pan, L., Kawai, M., Yu, L. H., Kim, K. M., Hirata, A., Umeda, M., and Uchimiya, H. 2001. The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *Federation of European Biochemical Societies* 508:375-378.
8. Schwartz, S. M. 1998. Cell death and the caspase cascade. *Circulation Journal of the American Heart Association* 97:227-229.
9. Shaham, S., Shuman, M. A., and Herskowitz, I. 1998. Death-defying yeast identify novel apoptosis genes. *Cell* 92:425-427.
10. Wahid, A., Gelani, G., Ashraf, M., and Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plant: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61:199-223
11. Xu, Q., and Reed, J. C. 1998. Bax Inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular Cell* 1:337-346.
12. Yamada, M. K., Saito, Y., Jin, L., Ogawa, T., Kim, K. M., Yu, L. H., Tone, Y., Hirata, A., Umeda, M., and Uchimiya, H. 2005. Novel *Arabidopsis* gene causes Bax-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 47:39468-39473.