

## 애기장대에서 두 액포막 칼슘펌프 돌연변이에 의하여 유도되는 세포사멸 표현형의 액포수식효소(VPE) 돌연변이에 의한 억제

박형철 · 이상민 · 김호수 · 정우식

### The vacuolar processing enzyme (VPE) mutation suppresses an HR-like cell death induced by the double knockout mutant of vacuolar $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in *Arabidopsis*

Hyeong Cheol Park · Sang Min Lee · Ho Soo Kim · Woo Sik Chung

Received: 15 April 2011 / Accepted: 29 April 2011  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signals have been implicated in regulating plant development and responses to the environmental stresses including a programmed cell death pathway. In animals and plants, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals have been involved in the activation of programmed cell death (PCD). Recently, we reported that disruption of *Arabidopsis* vacuolar Autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (ACAs), ACA4 and ACA11, resulted in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. Although extensive studies have revealed various components of a PCD in plants, executors to directly induce PCD are well unknown. Here, we provide that the vacuolar processing enzymes (VPEs) are involved in a PCD induced by the double knockout mutant of vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in *Arabidopsis*. The gene expression of VPE was rapidly up-regulated and the enzyme activity of VPE was increased in the double mutant plants. We also generated *aca4/aca11/avpe*, *aca4/aca11/vpe* and *aca4/aca11/avpe/vpe* mutant plants. Although cell death phenotype of the double mutant plants was not completely disappeared in the triple and quadruple mutant plants, the triple and quadruple mutant plants showed to significantly delay cell death phenotype of the double mutant plants. These results

suggest that the VPE is involved in the HR-like cell death in the double mutant of vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in *Arabidopsis*.

#### 서론

칼슘은 동물과 식물에서 세포 내 신호전달 과정의 이차 매개체로서 발달신호와 환경변화를 감지하여 다양한 생리학적 반응을 유발하는 중요한 기능을 수행한다. 세포질 내의 칼슘 농도의 변화는 내부와 외부의 다양한 자극들에 의해 유발되며, 이러한 칼슘 농도의 변화로 인해 식물의 다양한 생리학적 반응이 일어난다고 보고된다. (Sanders et al. 1999; Berridge et al. 2000; Lam 2000). 동물의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase는 오직 원형질막에 분포해서 기능을 수행하는 것과는 달리 식물의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase는 원형질막 뿐만 아니라 다양한 세포 내 소기관들에 위치하고 있기 때문에 이러한 세포내 소기관에서 특이적인 신호전달에 관여할 것으로 예상하고 있다 (Evans 1998; Geisler et al. 2000). 식물에서 액포는 세포 내부의 80% 이상을 차지하고 있으며, 칼슘을 포함하는 이온들의 주요 저장소로서 중요한 역할을 한다. 세포질은 100-200 nM 이하의 낮은 농도의 칼슘 농도를 유지하는 반면, 액포는 1 mM 이상의 높은 농도의 칼슘을 포함하고 있다. 액포는 여러 칼슘 channel들을 통해서 세포질로 칼슘을 공급하는 역할을 한다. 또한 신호전달 후 세포질 내 낮은 농도의 칼슘을 유지하기 위해서 액포막에 존재하는 high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase와 low-affinity  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter들을 통해서 세포질로부터 칼슘을 유입하는 역할을 한다 (Sze et al. 2000; Hetherington et al. 2004).

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

H. C. Park<sup>†</sup> · S. M. Lee<sup>†</sup> · H. S. Kim · W. S. Chung (✉)  
경상대학교 대학원 응용생명과학부, 식물분자생물학 및 유전자조작 연구소  
(Division of Applied Life Science (BK21 program), and Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea)  
e-mail: chungws@gnu.ac.kr

식물의 *Autoinhibited Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ACA)*, *ACA9* 단백질은 원형질 막에 존재하며, *ACA9* 돌연변이 식물체는 성장이 줄어들며 씨앗의 생성이 상당히 감소하는 것으로 보고된다 (Schlott et al. 2004). 이는 *ACA9* 유전자가 파괴되었을 때 부분적인 남성불임을 유발함으로써 수정이 제대로 이루어지지 않음을 의미한다. 또한 원형질막에 위치할 것으로 예상되는 *ACA10* 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 식물체의 경우에는 잎 발달이 저해되며 화서 마디가 제대로 성장되지 않아 꽃이 다발을 이루는 표현형이 관찰되었다 (George et al. 2008). 최근에 액포에 존재하는 *Ca<sup>2+</sup>-ATPases (ACA4와 ACA11)*가 이중으로 돌연변이된 식물체의 잎에서 세포사멸 표현형을 관찰할 수 있었으며, 이러한 세포사멸 현상이 salicylic acid (SA)에 의존적이라는 것을 확인하였다 (Boursiac et al. 2010). 그러나, 세포사멸 현상을 유발하는 직접적인 조절인자는 밝혀내지 못하였다.

세포사멸 현상은 동물과 식물의 발달과정과 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 반응으로 발생하는 기본적인 생리학적 과정 중 하나이다. 동물에서 세포사멸은 필요하지 않은 세포 또는 감염된 세포들을 제거하기 위해 일어나며, 이러한 세포사멸 과정 동안 DNA의 절단, 핵의 응축, 세포막의 수포현상, 그리고 세포 수축 등의 변화가 관찰된다. 분자 세포생물학적인 관점에서 세포사멸은 외인성 세포사멸과 내인성 세포사멸로 나뉘어진다. 외인성 세포사멸 과정은 외부에서 발생하는 세포사멸 리간드가 세포내 세포사멸 인지체에 결합함으로써 시작된다. 반면에 내인성 세포사멸은 세포내 미토콘드리아로부터 세포사멸을 유도하는 인자들이 방출됨으로써 시작된다. 두 세포사멸 과정 모두 결국은 세포내 cysteine protease인 caspase들의 활성을 유도하게 된다. 지금까지 동물의 외인성 또는 내인성 세포사멸 현상에 caspase의 활성화가 필수적이라는 것만 밝혀져 있을 뿐, 식물의 세포사멸 현상에 대한 직접적인 조절인자를 발견하지 못한 실정이다 (Wyllie et al. 1980; Raff 1998; Clarke 1999; Yu et al. 2001; Zamzami 2001; Ott et al. 2007; Riedl 2007).

최근 담배에서 caspase의 활성을 가지는 vacuolar processing enzyme (VPE)이 보고되었다. 담배에 존재하는 VPE 유전자들을 silencing 시키고 병원균을 침투시켰을 때 대조군인 야생형 식물체에서 세포사멸 현상이 발생하는 것과 달리 VPE 유전자들이 silencing된 식물체에서는 이러한 세포사멸 현상이 관찰되지 않았고, 이러한 세포사멸 현상의 원인으로 액포막 파괴를 제시하였다 (Hatsugai et al. 2004). 또한, 애기장대에서 caspase 활성을 가지는 VPE가 곰팡이 독소 (mycotoxin)로 의해 유도되는 세포사멸 현상에서 중심적인 역할을 한다는 보고가 있었다 (Kuroyanagi et al. 2005). 곰팡이 독소를 야생형 식물체와 VPE의 발현이 억제되는 돌연변이 식물체에 처리 하였을 때, 야생형

식물체와는 달리 VPE의 발현이 억제되는 돌연변이 식물체에서는 세포사멸 현상을 관찰할 수 없었으나 야생형 식물체는 액포막의 파괴로 인해 세포사멸이 유도된다는 것을 확인하였다. 이러한 일련의 결과들을 종합해 볼 때 VPE가 액포막을 파괴함으로써 세포사멸을 유도할 것으로 생각된다. 식물의 VPE는 caspase의 활성을 가지며 cysteine protease에 속한다. 애기장대의 genome에는 *aVPE*, *γVPE*, *βVPE*, 그리고, *δVPE*의 4종류의 VPE가 존재한다. 이러한 VPE들은 seed type과 vegetative type 두 종류로 분류할 수 있는데, seed type에는 *βVPE*와 *δVPE*가 그리고, vegetative type에는 *aVPE*와 *γVPE*가 존재한다. vegetative type인 *aVPE*와 *γVPE*는 잎의 노화와 병원균의 감염으로 인해 활성화된다 (Hara-Nishimura et al. 1995; Kinoshita et al. 1999; Lam 2000; Chichkova et al. 2004). 그러므로, VPE단백질은 식물체에서 세포사멸의 여러 형태에 관여할 것으로 예상할 수 있다. 본 연구에서는 애기장대의 액포막에 존재하는 두 개의 *Ca<sup>2+</sup>-ATPase*들이 기능을 하지 못할 때 발생하는 세포사멸 현상의 직접적인 원인이 동물의 caspase 활성을 가지는 VPE단백질들에 의해서 유발된다는 사실을 유전학과 분자생물학적인 방법으로 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 식물체에서 RNA의 분리

식물체를 절단하여 500~600 mg 씩 나눈 후, 시료를 미리 액체 질소로 냉각된 막자사발에 넣고 시료가 해동되지 않도록 액체 질소를 부어가며 완전한 분말 형태가 될 때까지 분쇄하였다. 분쇄된 식물체를 RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, USA)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 순수 분리한 총 RNA는 RT-PCR을 위해서 cDNA를 합성하였으며, 합성한 cDNA를 이용하여 유전자의 특이적 primer를 이용하여 유전자의 발현 여부를 확인하였다.

### Vacuolar processing enzyme의 효소활성 측정 방법

이중 돌연변이 식물체는 MS (Murashige and Skoog) 기본 배지에서 2주 동안 키운 후 흙으로 옮겨 심어 세포사멸이 일어나기 전 3일과 6일에서 시료를 준비 하였으며, 삼중과 사중 돌연변이 식물체는 흙에서 3주 동안 키운 식물체의 잎을 시료로 준비하였다. 준비된 시료에 100 mM sodium acetate (pH 5.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride가 첨가된 식물 단백질 추출용액을 넣은 후 시료를 분쇄하였다. 분쇄된 시료를 원심분리를 이용하여 15,000 g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리된 시료의 상층액을 모으고, 상층액에 있는 엽

록체를 분리하기 위하여 45,000 g에서 다시 한번 원심분리하여 상층액의 단백질을 실험을 위해 준비하였다. VPE의 인위적인 기질인 benzyloxycarbonyl-Ala-Ala-Asn-methylcoumaryl amide (Z-AAN-MCA, Peptide Institute, Inc., Japan)를 DMSO에 녹여 20 mM로 준비하였다. 분리된 단백질 1 mg을 추출용액 100  $\mu$ l에 준비하고 실험에 사용된 각각의 기질농도를 추출용액에 900  $\mu$ l가 되게 첨가하였다. 추출 단백질 100  $\mu$ l와 기질이 포함된 900  $\mu$ l를 합쳐서 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 1시간 후 각각의 효소 활성도를 스펙트로포토미터 (Bio-TEK, SFM25, Germany)를 이용하여 흡광도 465 nm에서 측정하였다.

### Genomic DNA의 분리

돌연변이 식물체의 잎 100 mg을 준비한 후, 시료를 액체 질소를 이용하여 얼린 후 완전히 분말 형태가 될 때까지 분쇄하였다. 분쇄된 잎을 Plant SV mini kit (GENE ALL, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 이용하여 T-DNA 삽입 유무를 PCR을 통하여 확인하였다.

### 삼중과 사중 돌연변이 식물체의 확보

일본의 Ikuko Hara-Nishimura 실험실로부터 애기장대의 *aVPE*와  *$\gamma$ VPE* 유전자에 T-DNA가 삽입되어 유전자가 발현되지 않는 각각의 돌연변이 식물체의 씨앗을 분양 받았다. 분양받은 씨앗을 발아시켜 키운 식물에서 각각 유전자가 발현되지 않는 homozygote 식물체를 분리하고 그들의 씨앗을 확보하였다. 또한 삼중과 사중 돌연변이 식물체를 만들기 위해서 *aca4/aca11*의 이중 돌연변이 식물체와 각각의 *aVPE*와  *$\gamma$ VPE* 돌연변이 식물체를 교배하여 삼중 돌연변이 식물체를 확보하였다. 또한 *aca4/aca11/aVPE* 삼중 돌연변이 식물체와  *$\gamma$ VPE* 돌연변이 식물체를 교배하여 *aca4/aca11/aVPE/ $\gamma$ VPE* 사중 돌연변이 식물체를 확보하였다.

### 돌연변이 식물체에 T-DNA 삽입의 확인과 RT-PCR을 위한 유전자 특이적 primer의 제작

삼중과 사중 돌연변이 식물체의 T-DNA 삽입을 확인하기 위하여 다음과 같은 primer를 제작하였다. *aVPE*에 삽입된 T-DNA를 확인하기 위하여 T-DNA left border primer: 5'-ATGCATCTGAATTCATAACCAATCTCG-3'와 *aVPE* 유전자의 reverse primer: 5'-CGGTTCTCCAGAAGGCCGGAC-3'를 제작하였다. 또한 *aVPE*의 유전자 발현을 확인하기 위해 forward primer: 5'-GCGGATACTGGAATTATCGTC-3'와 reverse primer: 5'-TCCAGGACAGTAAGTACCCCA - 3'를 제

작하였다. *aVPE*에 삽입된 T-DNA를 확인하기 위하여 T-DNA left border primer: 5'-ATAACGCTGCGGACATCTAC-3'와  *$\gamma$ VPE* 유전자의 reverse primer: 5'-CTTTTCCCAAAA TGAACAAG-3'를 제작하였다. 또한,  *$\gamma$ VPE*의 유전자 발현을 확인하기 위해 forward primer: 5'-AGTGGGAAGGTTGT GGATAG-3'와 reverse primer: 5'-CTTTTCCCAAAAATGAA CAAG-3'를 제작하였다. *Tubulin2*의 발현을 확인하기 위해서 forward primer: 5'-CCAACAACGTGAAATCGACAG-3'와 reverse primer: 5'-TCTTGGTATTGCTGGTACTCT-3'를 제작하였다.

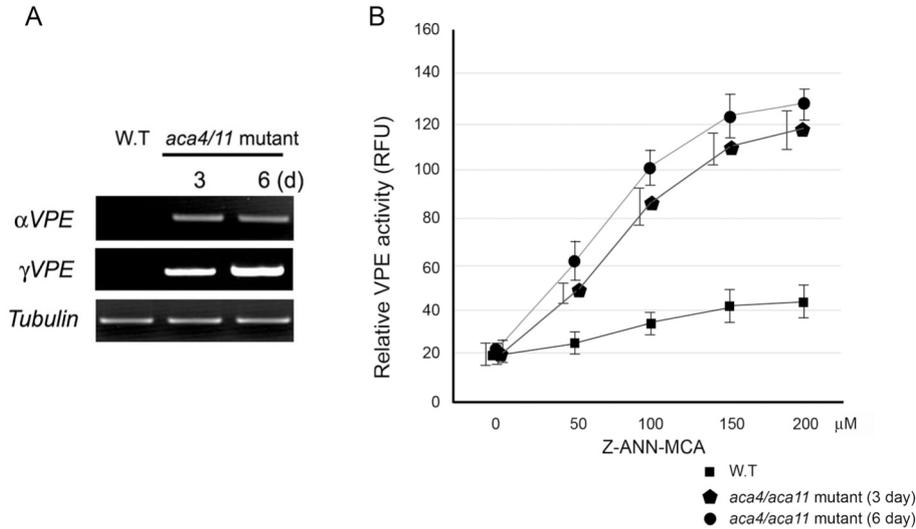
### 결과 및 고찰

#### *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체에서 VPE 유전자의 발현량과 효소의 활성화 측정

최근의 논문들에서 VPE가 식물의 세포사멸에 관련된다고 보고하고 있다 (Hara-Nishimura et al. 2005). 실제로 VPE가 *aca4/aca11*의 이중 돌연변이 식물체에서 세포사멸에 관련되는지 확인하기 위해서, 이중 돌연변이 식물체의 잎에서 발현되는 *aVPE*와  *$\gamma$ VPE*의 유전자 발현과 효소의 활성화를 조사하였다. 이중 돌연변이 식물체를 MS 기본배지에서 2주 동안 키운 후 식물체를 흙으로 옮겨 심었다. 그리고 이중 돌연변이 식물체의 잎에서 세포사멸 현상이 일어나기 전 3일과 6일째 잎에서 총 RNA를 분리하고 *aVPE*와  *$\gamma$ VPE* 유전자의 발현을 RT-PCR을 이용해서 확인하였다. 이중 돌연변이 식물체에서 *aVPE*와  *$\gamma$ VPE*의 유전자 발현량이 야생형 식물에 비해서 상당히 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 1A). 다음으로, 이중 돌연변이 식물체에서 VPE의 효소 활성이 증가하는지 조사하였다. 이중 돌연변이 식물체가 세포사멸을 일으키기 전 3일과 6일째 잎으로부터 단백질을 분리하고 VPE의 인공적인 기질인 Z-AAN-MCA를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 야생형 식물에 비해서 VPE의 활성이 3일과 6일에서 계속적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 1B). 앞서 식물의 세포사멸에 관련된다고 보고된 VPE 유전자 발현과 그들 효소 활성화의 증가를 이중 돌연변이 식물체에서 확인함으로써 VPE가 세포사멸에 직접 또는 간접적으로 관련된다는 것을 알 수 있었다.

#### *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체에 *aVPE*와 *$\gamma$ VPE*의 삼중과 사중 돌연변이 식물체 구축

앞선 실험결과로부터 VPE가 이중 돌연변이 식물체의 세포사멸에 관련될 수 있다는 것을 확인하였고, 이를 근거로 이중 돌연변이 식물체에 *aVPE*와  *$\gamma$ VPE* 각각의 삼중



**Fig. 1** Gene expression and enzyme activity of vegetative VPEs in the *aca4/aca11* double mutant plant. (A) Gene expression pattern of vegetative VPEs in the *aca4/aca11* double mutant plant. The total RNAs were extracted from leaves at 3 and 6 days before cell death of the *aca4/aca11* double mutant plant. RT-PCR analysis was performed with *αVPE* and *γVPE* specific primers. *Tubulin2* gene was employed as control. (B) The enzyme activity of vegetative VPEs in the *aca4/aca11* double mutant plant. The total proteins were extracted from leaves at 3 and 6 days before cell death of the *aca4/aca11* double mutant plant. The total proteins were preincubated with the VPE substrate, Z-ANN-MCA and then subjected to a VPE assay. RFU is relative fluorescence unit. Black pentagon and black circle indicate samples at the 3 days and 6 days in the *aca4/aca11* double mutant, respectively. Black square shows the wild type

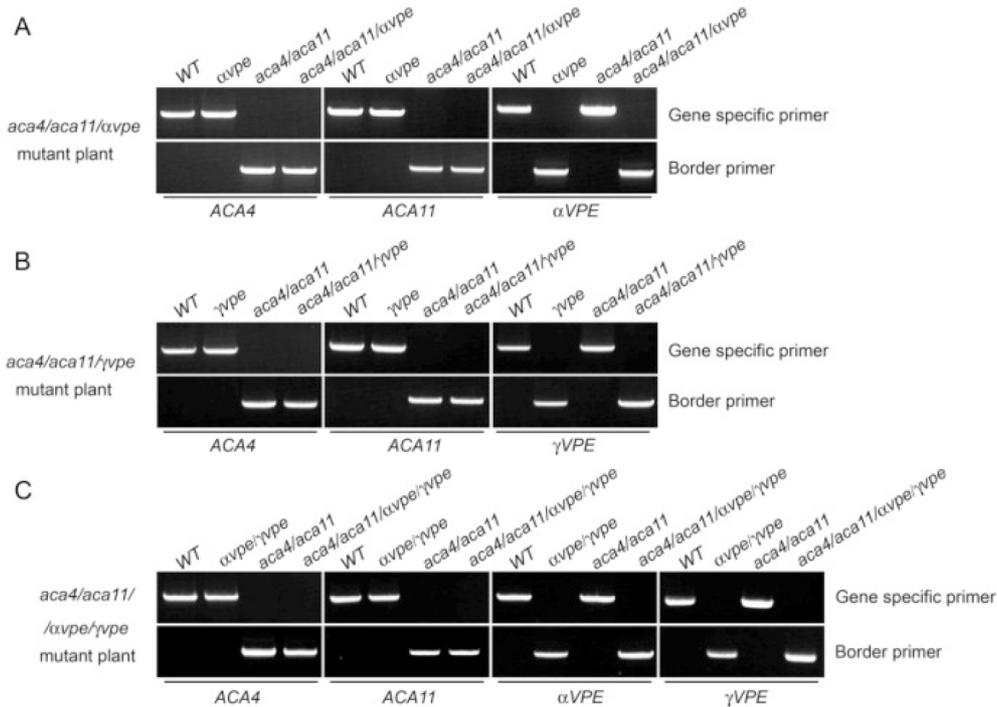
돌연변이 식물체와 *αVPE*와 *γVPE*가 이중 돌연변이체에서 동시에 발현되지 않는 사중 돌연변이 식물체를 구축하였다. 삼중과 사중 돌연변이 식물체들은 각각의 돌연변이 식물체들을 서로 교배하여 만들었으며, 이러한 삼중과 사중 돌연변이 식물체가 제대로 구축되었는지 확인하기 위해 돌연변이 식물체로부터 genomic DNA를 분리하였다. *aca4/aca11/αvpe*와 *aca4/aca11/γvpe* 돌연변이 식물체 그리고 *aca4/aca11/αvpe/γvpe* 돌연변이 식물체 각각에 유전자 특이적 primer들과 T-DNA border primer를 제작하였다. 분리된 genomic DNA와 유전자 특이적 primer들을 이용한 PCR을 통해 각각의 돌연변이체의 T-DNA 삽입을 확인하였다. *aca4/aca11/αvpe* 삼중 돌연변이 식물체의 T-DNA 삽입을 확인하기 위하여 야생형 식물체 (WT), *αvpe* 돌연변이 식물체, *aca4/aca11* 돌연변이 식물체를 대조군으로 사용하여 *aca4/aca11/αvpe* 돌연변이 식물체에 T-DNA가 제대로 삽입되었는지 확인하였다. *ACA4*, *ACA11* 그리고 *αVPE*의 유전자 특이적 primer를 사용하여 PCR을 통해 확인해 본 결과, *aca4/aca11/αvpe* 돌연변이 식물체에는 *ACA4*, *ACA11* 그리고 *αVPE*의 유전자가 증폭되지 않았으며, T-DNA의 border primer와 *ACA4*, *ACA11* 그리고 *αVPE*의 유전자 특이적 primer를 사용하여 확인한 결과 유전자가 증폭됨으로써 T-DNA의 삽입을 확인하였다 (Fig. 2A). 또한, *aca4/aca11/γvpe* 돌연변이 식물체와 *aca4/aca11/αvpe/γvpe* 돌연변이 식물체들도 이와 같은 방법으로 확인해 본 결과 이들 돌연변이 식물체에서도 T-DNA가 제대로 삽입된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B, C).

#### 삼중과 사중 돌연변이 식물체에서 VPE 유전자의 발현 조사

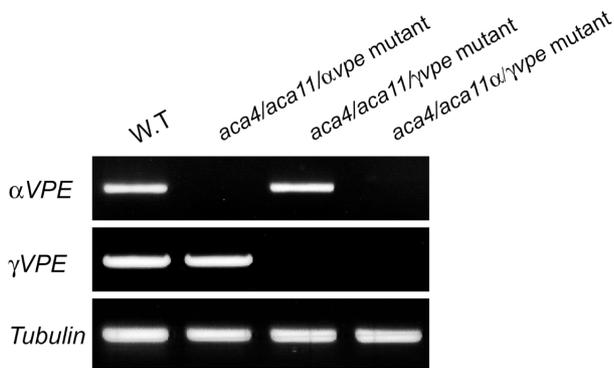
구축된 삼중과 사중 돌연변이 식물체들은 그들의 유전자에 T-DNA가 제대로 삽입되어져 있다는 것을 확인하였다. 이러한 돌연변이 식물체에서 실제로 *αVPE*와 *γVPE*의 유전자 발현이 억제되는지 확인해 보았다. 삼중과 사중 돌연변이 식물체로부터 그들의 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다. 이러한 cDNA를 이용하여 *αVPE*와 *γVPE* 유전자의 특이적 primer를 이용하여 RT-PCR로 그들의 유전자 발현을 조사하였다. 그 결과 삼중 돌연변이 식물체의 각각에서 *αVPE*와 *γVPE*가 발현되지 않는 것을 확인하였으며, 또한 사중 돌연변이 식물체에서도 *αVPE*와 *γVPE*가 동시에 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 위와 같은 돌연변이 식물체들에 T-DNA가 삽입되었으며, 이러한 돌연변이 식물체들에 유전자 발현이 억제되는 것을 확인함으로써 삼중과 사중 돌연변이 식물체가 제대로 구축되었다는 것을 확인할 수 있다.

#### 삼중과 사중 돌연변이 식물체의 표현형 조사

*aca4/aca11*의 이중 돌연변이 식물체의 앞에서 보여지는 세포사멸 현상이 위에서 구축 되어진 삼중과 사중 돌연변이 식물체에서 억제되는지 조사하였다. 씨앗을 3일 동안 저온에서 춘화처리한 후, 흙에 씨앗을 뿌리고 식물이 자라는 것을 관찰했다. 돌연변이 식물체가 자라는 것을 관찰해 본 결과, *aca4/aca11* 이중 돌연변이보다 삼중과 사



**Fig. 2** Genotyping of the *aca4/aca11/αvpe*, *aca4/aca11/γvpe* and *aca4/aca11/αvpe/γvpe* mutant plants. Genomic DNA was isolated from wild type plants, the *aca4/aca11/αvpe*, *aca4/aca11/γvpe* and *aca4/aca11/αvpe/γvpe* mutant plants. PCR was performed with gene specific primer and T-DNA border primer sets

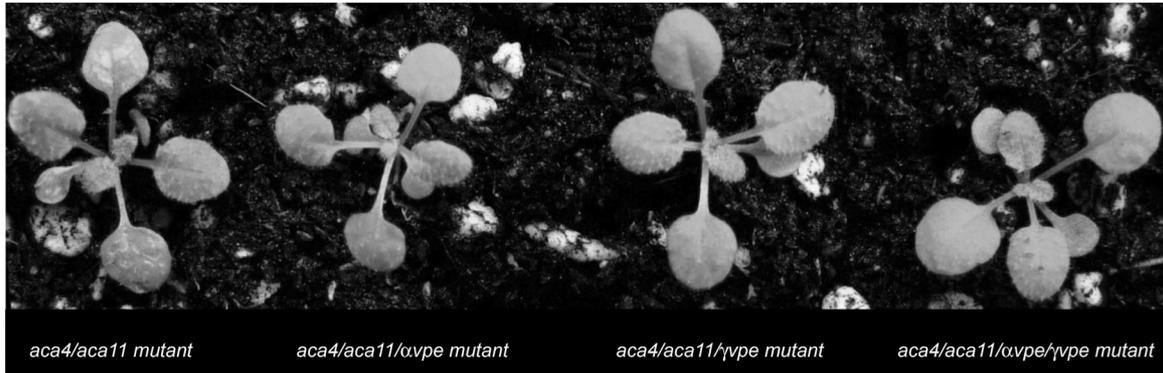


**Fig. 3** Gene expression of *αVPE* and *γVPE* in *aca4/aca11/αvpe*, *aca4/aca11/γvpe* and *aca4/aca11/αvpe/γvpe* mutant plants. Expression levels of the *αVPE* and *γVPE* in the triple and quadruple mutant plants were determined by RT-PCR. Each gene specific primer sets were used to identify *αVPE* and *γVPE* transcripts in mutant plants

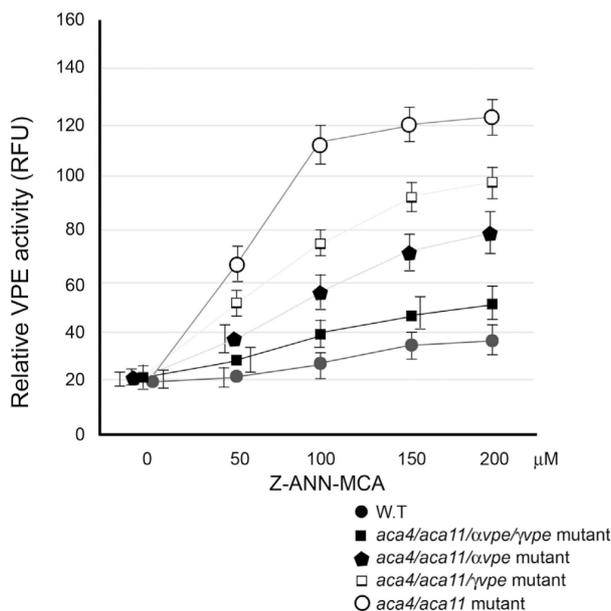
중 돌연변이 식물체에서 세포 사멸현상이 첫 3주 동안 현격히 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 하지만 식물이 3주 이상 자란 뒤에는 삼중과 사중 돌연변이 식물체에서도 세포사멸이 발생함을 관찰했다. 이러한 결과를 바탕으로 실제 VPE들이 *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체의 세포사멸에 관여한다는 것을 확인하였으며, 이러한 세포 사멸현상에 VPE들 뿐만이 아니라 영향을 미치는 다른 인자의 존재 가능성에 대해서도 시사한다고 볼 수 있다.

### 삼중과 사중 돌연변이 식물체에서 VPE의 효소활성 측정

삼중과 사중 돌연변이 식물체에서 VPE의 효소활성이 변화를 보이는지 알아 보기 위해서 VPE의 효소활성을 조사하였다. 야생형 식물체와 *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체, *aca4/aca11/αvpe*, *aca4/aca11/γvpe* 삼중 돌연변이 식물체 그리고, *aca4/aca11/αvpe/γvpe* 사중 돌연변이 식물체를 이용하여 *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체에서 세포사멸이 일어나기 전 6일째를 기준으로 모든 식물체의 잎에서 단백질을 분리하여 실험을 진행하였다. 그 결과, *aca4/aca11/αvpe/γvpe* 돌연변이 식물체의 VPE의 효소활성이 야생형 식물체와 거의 비슷해지는 것을 확인했다 (Fig. 5). 또한, *aca4/aca11/αvpe*와 *aca4/aca11/γvpe* 돌연변이 식물체도 그들의 VPE의 효소활성이 *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체보다 감소된다는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 실제로 표현형에서 세포사멸 현상이 억제되는 관찰을 뒷받침할 수 있었다. 두 *aca4/aca11/αvpe*와 *aca4/aca11/γvpe* 돌연변이 식물체 사이의 표현형 차이는 관찰할 수 없었지만 효소의 활성화를 비교해 보았을 때 *γVPE* 보다 *αVPE*가 세포사멸에 더 중요한 역할을 할 것이라 생각된다. 또한, *aca4/aca11/αvpe/γvpe* 돌연변이 식물체가 야생형 식물체보다 약간 높은 VPE 활성을 보인다는 점은 또 다른 protease가 *aca4/aca11* 이중 돌연변이 식물체에서 활성화됨을 의미한다.



**Fig. 4** Morphological phenotypes in *aca4/aca11* double mutant by the disruption of *VPE* genes. The double, triple and quadruple mutant plants grew at the same conditions on soil for 3 weeks



**Fig. 5** The enzyme activity of VPEs in triple and quadruple mutant plants. The total proteins were extracted from leaves in the wild type plants, double, triple and quadruple mutant plants. The total proteins were preincubated with the VPE substrate, Z-ANN-MCA and then subjected to a VPE assay. RFU is relative fluorescence unit. Open circle, open square, black pentagon and black square presented the double, triple, triple and quadruple mutant plants, respectively. Black circle indicates the wild type plant

## 적 요

칼슘은 동물과 마찬가지로 식물에서도 다양한 신호를 전달하는 2차 매개체로 잘 알려져 있다. 특히, 세포사멸 현상을 유도하는 신호전달에 칼슘의 관여는 잘 보고되어 있다. 최근 발표된 논문에서 액포막에 존재하는  $Ca^{2+}$ -ATPases (*ACA4*와 *ACA11*)가 이중으로 돌연변이된 식물의 잎에서 세포사멸 표현형을 관찰했으며, 이러한 세포사멸 현상이 salicylic acid (SA)에 의존적이라고 보고했다. 또한 앞

선 연구들에서 vacuolar processing enzymes (VPEs)이 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 의해서 유발되는 SA에 의해서 활성화 된다고 보고하였다. 본 연구에서는 액포막  $Ca^{2+}$ -ATPases (*ACA4*와 *ACA11*)가 이중으로 돌연변이된 식물체에서 VPEs의 유전자 발현이 상당히 증가되어 있고 효소 활성도 증가됨을 확인했다. 이 결과를 바탕으로, *aca4/aca11/αvpe*와 *aca4/aca11/γvpe* 그리고, *aca4/aca11/αvpe/γvpe*의 삼중과 사중 돌연변이체를 구축했다. 이들과 *aca4/aca11*의 이중 돌연변이체의 세포사멸 표현형을 비교 관찰한 결과, 삼중과 사중 돌연변이에서 세포사멸 현상이 일정기간 억제되는 것을 관찰했다. 또한, 삼중과 사중의 돌연변이체에서 VPEs의 효소 활성이 많이 감소되는 현상으로 나타났다. 결론적으로,  $Ca^{2+}$ -ATPases (*ACA4*와 *ACA11*)가 이중으로 돌연변이된 식물체에서는 SA가 유발되며, 이러한 SA에 의해서 VPEs의 단백질이 활성화되어 세포사멸 현상이 발생할 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 교육과학기술부의 World Class University (WCU) Program 연구비 (R32-10148)와 농촌진흥청의 Next-Generation BioGreen 21 Program (Grant#PJ008173)으로 수행되었음.

## 인용문헌

- Berridge M J, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21
- Boursiac Y, Lee SM, Romanowsky S, Blank R, Sladek C, Chung WS, Harper JF (2010) Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in *Arabidopsis* results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. *Plant physiol* 154:1158-1171
- Chichkova N, Kim SH, Titova ES, Kalkum M, Morozov VS,

- Rubtsov YP, Kalinina NO, Taliansky ME, Vartapetian AB (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 16:157-171
- Clarke PG, Clarke S (1999) Historic apoptosis. *Nature* 16:230
- Evans DE, Williams LE (1998) P-type calcium ATPases in higher plants: biochemical, molecular and functional properties. *Biochim Biophys Acta* 9:1-25
- Geisler M, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG (2000) Molecular aspects of higher plant P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1465:52-78
- George L, Romanowsky SM, Harper JF, Sharrock RA (2008) The ACA10  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase regulates adult vegetative development and fluorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146:716-728
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol* 8:404-408
- Hara-Nishimura I, Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M (1995) Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J Plant Physiol* 145:632-640
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305:855-858
- Hetherington AM, Brownlee C (2004) The Generation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55:401-427
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* 19:43-53
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 280:32914-32920
- Lam E, del Pozo O (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* 44:417-428
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-479
- Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S (2007) Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 14:1243-1247
- Raff M (1998) Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122
- Riedl SJ, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8:405-413
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11:691-706
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF (2004) A plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9502-9507
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF (2000) Diversity and regulation of plant  $\text{Ca}^{2+}$  pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:433-462
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306
- Yu T, Wang X, Purring-Koch C, Wei Y, McLendon GLA (2001) A mutational epitope for cytochrome c binding to the apoptosis protease activation factor-1. *J Biol Chem* 276:13034-13038
- Zamzami Z, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev* 2:67-71