

Isolation and Characterization of Expansin Genes in a Halophyte, *Suaeda japonica*

Soong-Taek Hwang, Suk Kyu Kim, Jong Gil Na, Jeom Sook Lee and Dongsu Choi*

Department of Biology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

Received November 30, 2012 / Revised December 14, 2012 / Accepted December 17, 2012

Halophytes are unique land plants that are capable of thriving in a high salt environment. They are attracting public attention due to their ability to synthesize bioactive substances such as UV protectants or antioxidizing agents. To achieve unaffected growth under high salinity, halophytes may take advantage of the activities of cell growth factors such as expansins. Expansins are well-known cell wall proteins that are responsible for cell enlargement. They loosen cell walls, thereby contributing to actual plant growth. This study aimed to identify positive roles of expansins in the growth of halophytes. Three expansin cDNA clones were isolated from seedlings of *Suaeda japonica*. Comparing the deduced amino acid sequences of the expansin genes of *S. japonica* with those of other plant species suggested that the cDNA clones isolated from *S. japonica* belong to the *EXPA* (*α*-expansin) gene family. A phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences revealed that the expansins of *S. japonica* share a close evolutionary relationship with those of strawberry (*Fragaria ananassa*) and jujube (*Ziziphus jujuba*), both of which are woody dicots. *SjEXPAs* did not show any remarkable change in the gene expression level in different NaCl concentrations, providing a clue to the unaffected seedling growth of *S. japonica* in a high-salt environment. In conclusion, the present study presents the first report of expansin genes from halophytes and suggests a putative role for these genes in plant growth under high salinity.

Key words : *Suaeda japonica*, halophyte, expansin, growth, NaCl

서 론

식물 세포벽은 다당류인 cellulose와 hemicellulose 간의 수소결합으로 복잡하게 얽혀있는 견고한 기본 구조를 가지고 있다. 따라서 식물 세포의 성장과 분열이 일어나기 위하여 우선 세포벽의 구조가 느슨하게 풀려야 한다[7, 10, 11]. Expansin은 식물 고유의 세포벽 단백질로서 식물 세포벽을 느슨하게 함으로써 식물세포가 신장하도록 유도하므로 식물의 성장에 있어서 반드시 필요한 단백질이라고 할 수 있다[11]. Expansin은 산성 조건 하에서 C-말단 부위를 cellulose에 고정된 채 N-말단 부위에 있는 활성부위를 이용하여 cellulose와 hemicellulose 사이의 수소결합을 분쇄함으로써 세포벽을 느슨하게 하고 팽압의 증가에 따라 세포가 팽창할 수 있도록 한다. Expansin은 단백질의 구조에 따라 EXPA, EXPB, EXLA 및 EXLB의 4개의 subfamily로 나뉜다[7, 14].

Expansin은 세포벽의 물리적 성질에 변화를 줌으로써 식물

생장과 발달 전반에 걸쳐 영향을 준다. 특히 벼의 일종인 부도(deepwater rice)에서 expansin 유전자가 절간의 성장과 깊이 관련되어 있다는 사실이 밝혀지면서 expansin이 식물생장을 직접적으로 유도하는 중요한 역할을 수행할 것이라는 가설이 지지를 얻고 있다[19, 20]. Expansin은 또한 뿌리의 성장과 발달에도 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 애기장대의 expansin 유전자 중 *AtEXPA7*와 *AtEXPA18*의 발현이 뿌리털 형성과 밀접하게 연관되어 있다는 것이 확인된 바 있으며[2], 대두 유식물체의 뿌리를 사용한 실험에서는 오직 뿌리의 성장 부위에서만 expansin 유전자가 강하게 발현된다는 것이 확인되었다[17]. 토마토, 벼, 바나나 같이 다양한 식물 중에서 expansin은 세포벽의 연화 과정에 영향을 미치거나, 열매가 발달하는 동안 열매의 크기가 증가하는데 중요한 역할을 하기도 한다[1, 4, 5, 6, 13, 25].

최근에는 세포의 팽창(expansion), 열매 조직의 연화(softening), 탈리(abscission), 발아, 스트레스 반응 및 기생 관계(parasitism) 등의 다양한 생리 및 생태적 현상에 있어서 expansin의 기능에 대한 연구가 수행되고 있다. 일련의 연구 결과에 따르면 expansin의 활성이 호르몬 작용에 의하여 영향을 받는 것으로 나타났다[3]. 이와 같이 expansin은 식물의 성장과 분화에 필요한 세포벽의 변화를 유도하는 중요한 요소라고 할 수 있다.

염생식물은 일반 육상식물이 성장할 수 없을 정도로 토양의

*Corresponding author

Tel : +82-63-469-4583, Fax : +82-63-463-1560

E-mail : choid@kunsan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

염분농도가 높은 바닷가, 호숫가 및 암염이 농축되어 있는 내륙의 토양환경에서 효과적으로 성장할 수 있는 식물을 말한다. 생육지의 수분 함량에 따라서 건엽생식물과 습엽생식물로 구분하지만 모두 세포 내에 많은 용질을 함유하고 있어 삼투압이 높기 때문에 토양의 염분농도가 높은 경우에도 물을 흡수할 수 있다. 우리나라에 자생하는 염생식물에는 통통마디 (*Salicornia herbacea*), 갯질경이(*Limonium tetragonum*), 통보리사초(*Carex kobomugi*), 나문재(*Suaeda asparagoides*), 칠면초(*Suaeda japonica*) 및 해홍나물(*Suaeda maritima*) 등이 있다[21].

염생식물은 염분이 많은 해안의 염생습지에서 서식하면서 먹이 연쇄의 기초 생산자 역할을 하는 식물이다. 이들은 세립질 토양 입자에 뿌리를 단단히 내리므로 조류로 인한 해안 침식 활동을 억제하며, 조간대의 염분농도에 따라 서식지를 이동하는 특징을 가지므로 염생식물 서식지의 분포 변화를 통한 조간대의 환경변화를 파악할 수 있는 적절한 환경 요소로도 이용되고 있다[16]. 최근 들어 염생식물이 오염물질의 정화 능력이나 다양한 약리적인 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀져 관심의 대상이 되고 있으며 재배를 통한 이용 가능성이 날로 증가하고 있다[16, 18, 21].

칠면초는 명아주과 나문재속에 속하는 일년생 초본식물로 *Salicornia*와 *Atriplex*와 더불어 높은 염분 농도에서 성장할 수 있는 대표적인 내염성 식물로서 한국 서해안 조간대에 광범위하게 분포하고 있으며 중국,일본 간의 해안 식생을 대표하는 종이다[9]. 나문재속 식물에 대한 국내의 연구는 주로 생리적 특성, 분포특성, 생육에 미치는 환경요인이나, 지역에 따른 형태적 차이 등에 집중되고 있으며 분자생물학적 연구는 시작단계에 있다[22].

최근에는 expansin이 염분을 비롯한 각종 스트레스 반응에 밀접하게 관련되어 있다는 연구 결과들이 보고되고 있다[12, 23, 24]. Expansin 과다발현 애기장대를 이용한 스트레스 실험에서 염분 스트레스와 ABA를 처리한 곳에서의 유식물의 크기와 야생형의 유식물의 크기가 차이가 없는 것이 확인되었다[12]. 내염성 옥수수를 이용한 연구에서 염분농도에 따른 옥수수 expansin 단백질의 발현양상을 분석한 결과, 염분 처리구와 대조구에서 모두 expansin이 발현될 뿐만 아니라 내염성 옥수수에서 야생형 옥수수보다 더 많은 양의 expansin이 발현된다는 사실이 보고된 바 있다[24].

본 연구에서는 분자생물학적인 연구가 미진한 국내산 염생식물 중에서 칠면초를 재료로 expansin 유전자를 분리하여 특성을 밝히는 한편, 토양환경의 염분 농도에 따른 성장 정도와 expansin 유전자 발현양상과의 연관성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 명아주과 나문재속의 칠면초(*Suaeda japon-*

ica Makino)를 사용하였다. Expansin cDNA 합성을 위한 RNA 분리용 식물 재료로는 전북 군산시 옥서면 선연리 염습지에서 채취한 평균 초장 10 cm인 칠면초 유식물을 사용하였으며, 발아 및 스트레스 처리 실험을 위한 재료로는 농어촌공사 김제지사에서 분양받은 칠면초 종자(2010년 채집)를 사용하였다.

NaCl 농도 별 배양

칠면초 종자를 70% 에탄올과 2% NaOCl로 표면 소독한 후 각각 0, 1, 2, 5, 10, 20 ppt (part per thousand)의 NaCl을 함유한 1/2 MS 배지에서 2주간 발아 및 배양하여 염분농도별로 칠면초 유식물의 성장을 관찰하고 total RNA 분리에 사용하였다.

RNA 추출 및 Full-length cDNA 합성

cDNA 합성을 위한 total RNA는 TRI Reagent (Sigma, USA)를 이용하여 칠면초 유식물로부터 추출하였다. 칠면초 total RNA에서 expansin 유전자의 cDNA를 합성하기 위해 CapFishing full-length cDNA premix kit (Seegene, Korea)를 사용하였다. Expansin 유전자의 기관별 발현과 스트레스 조건에서의 발현양상 분석을 위해 필요한 1st strand cDNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit (TAKARA, Japan)를 사용하여 합성하였다. cDNA 합성의 주형으로는 2 µg의 total RNA를 사용하였으며, oligo dT primer를 사용하여 1st strand cDNA를 합성하였다. Expansin 유전자 cDNA의 PCR 증폭을 위하여 Rose *et al.* (1997)과 Kim *et al.* (2000)이 사용한 expansin의 보존적 공통염기서열을 분석하여 만든 degenerate primer 5'-GSNCA YGCNACNTTYTAYGGNG-3', 5'-YTGCCARTTYTGNCCCCARTT-3'을 각각 forward와 reverse primer로 사용하였고[15, 25], PCR 효소로는 TAKARA EX Taq™ DNA 중합효소(TAKARA, Japan)를 사용하였다. 이 결과 확보한 partial cDNA를 토대로 full-length cDNA를 합성하기 위해 5' RACE PCR과 3' RACE PCR을 수행하였다. 5' RACE PCR에 사용한 주형은 CapFishing Full-length cDNA Premix kit를 이용해 합성한 cDNA를 사용하였다. Full-length cDNA를 합성하기 위한 다른 방법으로 5'-Full RACE Core set (TAKARA, Japan)을 이용한 inverse PCR을 수행하였다. Primer는 제조사의 제작방법을 이용하여 제작하였다(Table 1).

Semi-quantitative RT-PCR의 대조구(internal control)로 사용하기 위하여 GenBank 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 나문재 및 해홍나물의 actin 유전자의 염기서열을 확인하고 이들의 공통염기서열을 파악하였다. 공통염기서열을 토대로 칠면초 actin 유전자의 cDNA를 합성하기 위해 5'-GATCTTGCTGGTCGTGATCT-3', 5'-CTCCAATCCAGACACTGTAT-3'을 각각 forward와 reverse primer로 제작하였으며 TAKARA EX Taq™ DNA 중합효소를 사용하여

Table 1. Primer sequences for inverse PCR

Primers	Primer sequences (5'-3')
EXP-RT-Primer-1	(P)GACCAAATTGCCAA
EXP-RT-Primer-2	(P)GGAATTGTGCACCAG
SjEXPA1-A1	CGAAGTTCGTAGCATGAACC
SjEXPA1-A2	GATTTCCGTATCCACATGCC
SjEXPA1-S1	TATCGTGCTGGAATTGTGCC
SjEXPA1-S2	CGGTCACCTACTTCAACT
SjEXPA2-A1	CGAAGACACCATTGTGGGTC
SjEXPA2-A2	GCCTTGACTATACAAGTTCC
SjEXPA2-S1	ATACGGTTCACCATAAACGG
SjEXPA2-S2	AGATGGCAAGCCATGTCAAG
SjEXPA3-A1	GCACGAAAGTTCGTAGCATG
SjEXPA3-A2	AAGTCTCCATATCCGCAAGC
SjEXPA3-S1	TACCGTGCCTAAGAAGTGGT
SjEXPA3-S2	CGCAGTTGTTGATTAAGGG

Table 2. Primer sequences to amplify cDNAs for expansin genes

Gene names	Primers	Primer sequences (5'-3')
SjEXP1	SjEXP1-F1	ACTTAGCACGGCCTCGTTCA
	SjEXP1-R1	CCCATTAGGAGCGAATTGC
SjEXP2	SjEXP2-F1	GGCATCAAACCTCCCCTAAA
	SjEXP2-R1	TGGGAGTTCAACAATTGCAT
SjEXP3	SjEXP3-F1	GAGGGTGGTCAATTCTAAGA
	SjEXP3-R1	CATTGATCAATTCCGAGATC

칠면초 actin cDNA를 증폭하였다.

cDNA 클로닝과 염기서열분석

PCR을 통하여 합성된 expansin 및 actin 유전자의 cDNA는 pGEM T-easy vector system (Promega, USA)을 이용하여 plasmid에 삽입하였다. 완성된 plasmid를 열충격 방법으로 대장균 DH5a에 도입한 후, 항생제 screening을 거쳐 배양한 다음 Axyprep plamid miniprep kit (Axygen, USA)를 사용하여 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid는 전기영동으로 분리하고 염기서열을 확인하였다.

Expansin 유전자의 발현양상 분석을 위한 semi-quantitative RT-PCR

칠면초의 expansin 유전자의 발현양상 분석을 위한 주형으로 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit를 사용하여 합성한 cDNA를 사용하였으며, semi-quantitative RT-PCR 반응을 위하여 Table 2의 primer를 사용하였다. TAKARA EX Taq™ DNA 중합효소를 사용하여 98℃ 10초, 55℃ 30초 그리고 72℃ 30초의 25, 30 또는 35 cycle로 PCR을 수행하였다. 각 유전자의 발현량 비교에 적절한 PCR cycle 수는 반복 실험을 통하여 결정하였다[8].

기관별 및 염분 농도별 expansin 유전자 발현양상 분석을

위한 semi- quantitative RT-PCR 에 동일한 양의 1st strand cDNA를 사용하였다는 것을 보여주기 위한 대조군 유전자로는 칠면초 actin 유전자 염기서열을 사용하였다.

결 과

칠면초 Expansin cDNA 분리, 염기서열 및 아미노산서열 분석

칠면초 expansin 유전자의 cDNA를 분리하기 위해 degenerate primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 여기에서 확보한 cDNA를 주형으로 하여 5' RACE PCR과 3' RACE PCR을 수행한 결과 3종의 full-length cDNA 클론을 확보하였으며 각각 *SjEXPA1*, *SjEXPA2* 및 *SjEXPA3*로 명명하였다. 염기서열을 분석한 결과 *SjEXPA1*, *SjEXPA2* 및 *SjEXPA3*는 각각 930개, 1391개 및 1214개의 염기로 이루어져 있으며, 각각 253개, 257개 및 247개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화하는 것을 확인하였다.

칠면초 expansin 단백질 구조 분석

칠면초의 expansin 단백질 3종이 EXPA, EXPB, EXLA 및 EXLB 단백질군 중에서 어디에 속하는지 알기 위해 유추한 아미노산서열을 이용하여 단백질 구조분석을 수행하였다.

칠면초 expansin 아미노산서열을 이용하여 유사도가 비슷한 다른 종의 expansin 아미노산서열을 GenBank 데이터베이스에서 선별하였다. 다른 종의 expansin 아미노산서열은 애기장대(AtEXPA1), 딸기(FaEXPA2), 고사리(MqEXPA1), 담배(NtEXPA1), 옥수수(ZmEXPA1), 이끼(PpEXPA5), 토마토

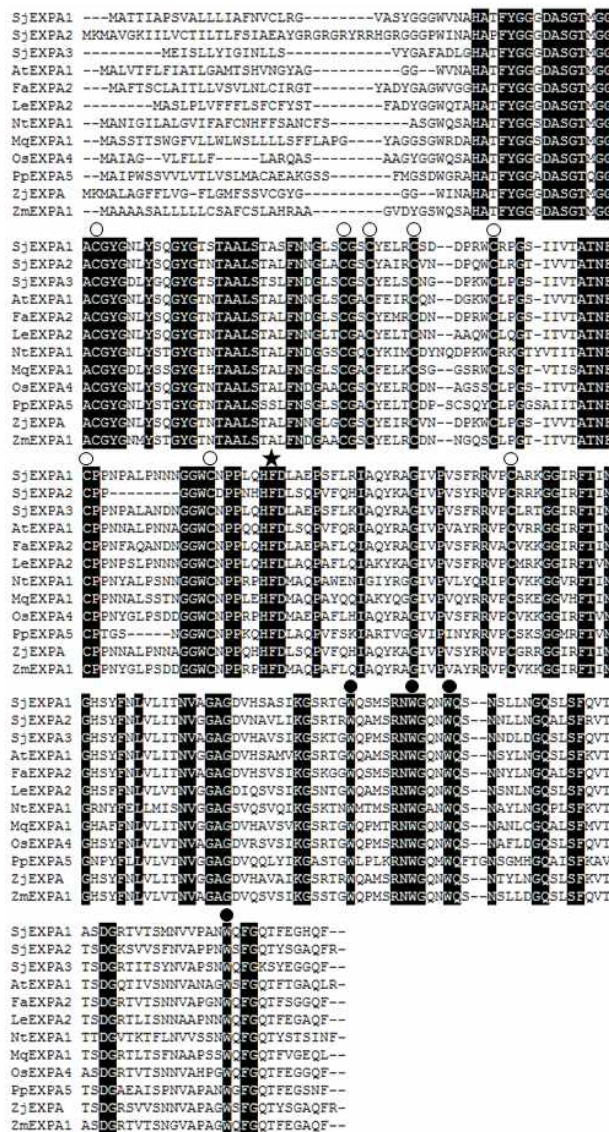


Fig. 1. Comparison of expansin amino acid sequences among 10 plant species suggesting that SjEXPs are classified into EXPA (α-expansin) family [SjEXPA1, SjEXPA2, SjEXPA3, AtEXPA1 (NP_177112), FaEXPA2 (AAF21101), LeEXPA2 (NP_001234165), NtEXPA1 (AAC96077), MqEXPA1 (AAF17570), OsEXPA4 (AAL24481), PpEXPA5 (AAN08123), ZjEXPA (ACK43223) and ZmEXPA1 (NP_001105040)]. Amino acid sequence alignment was performed using the MEGA5 program. Conserved cysteine (C), tryptophan (W) residues and His-Phe-Asp (HFD) domain are marked by circles, dark circles and asterisk, respectively.

(LeEXPA2), 벼(OsEXPA4) 및 대추나무(ZjEXPA)에서 확보하였다. 상기 9종의 expansin과 칠면초 expansin의 아미노산서열을 비교한 결과, 칠면초 expansin 단백질에 시스테인(C), 트립토판(W) 및 히스티딘-페닐알라닌-아스파르트산(HFD) domain이 존재함을 확인하였다(Fig. 1).

아미노산서열 비교를 통한 계통수 작성 결과, 칠면초 expansin 중 SjEXPA1과 SjEXPA3는 딸기의 expansin (FaEXPA2)과, SjEXPA2는 대추나무 expansin (ZjEXPA)과 유사도가 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

칠면초 actin cDNA 클로닝 및 염기서열 분석

Expansin의 발현양상 분석에 대조구 유전자로 사용할 actin 유전자를 GenBank 데이터베이스에서 검색한 결과, 칠면초에서는 actin 유전자가 보고된 바 없으므로 같은 명아주과 염생식물인 해홍나물(*Suaeda maritima*)과 나문재(*Suaeda glauca*)의 actin 유전자의 염기서열을 확보하였다. 두 식물의 actin 유전자 염기서열을 비교하여 두 유전자 모두에 공통적으로 존재하는 염기서열을 찾아 제작한 primer로 PCR 증폭하여 칠면초의 actin 유전자 cDNA를 합성하였다. 염기서열 분석 결과 칠면초 actin 유전자는 해홍나물과 나문재의 actin 유전자와 염기서열이 매우 유사함을 확인하였다(Fig. 3).

기관별 expansin 발현양상 비교 분석

3종의 칠면초 expansin cDNA의 염기서열을 분석하여 각 expansin 유전자에 특이적인 염기서열로 primer를 각각 제작하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 모든 expansin 유전자가 유식물의 지상부에서 발현되며, 잎에서는 SjEXPA1과 SjEXPA2의 발현이 강한 반면 SjEXPA3는 발현이 약함을 확인하였다. 한편, 뿌리에서는 SjEXPA1과 SjEXPA2의

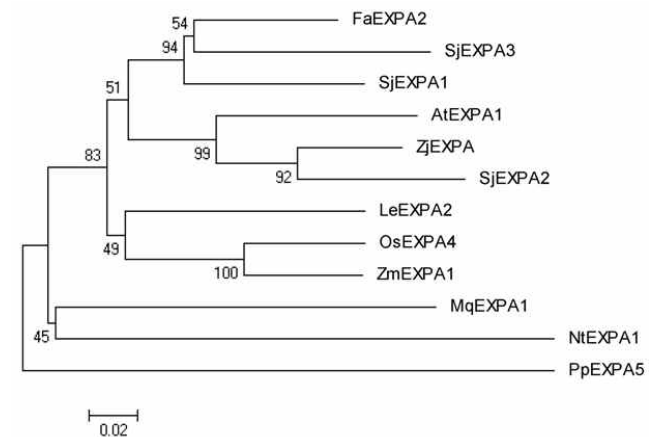


Fig. 2. Phylogenetic tree of expansin proteins. The full-length amino acid sequences of EXPAs were obtained from the GenBank database. The tree was constructed with the MEGA5 program. Bar below diagram represents genetic distance.

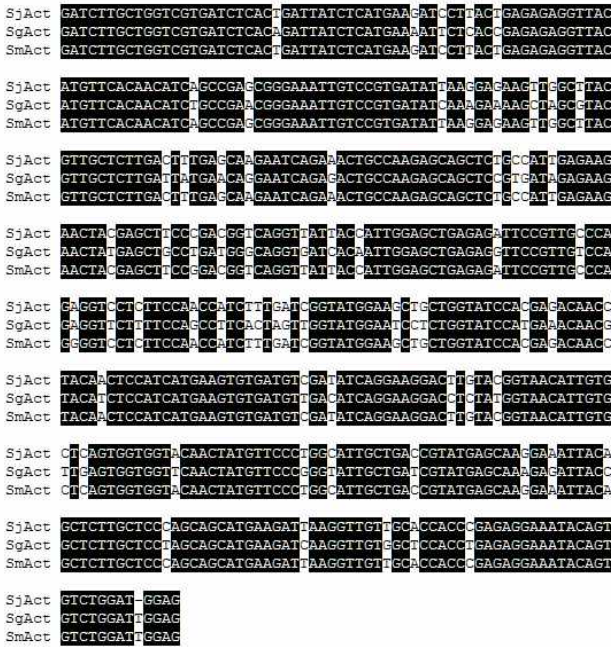


Fig. 3. Comparison of actin cDNA nucleotide sequences among halophyte of goosefoot family [*SjAct* (*Suaeda japonica*), *SgAct* (*Suaeda glauca*) and *SmAct* (*Suaeda maritima*)] suggesting that *SjAct* belongs to actin gene family.

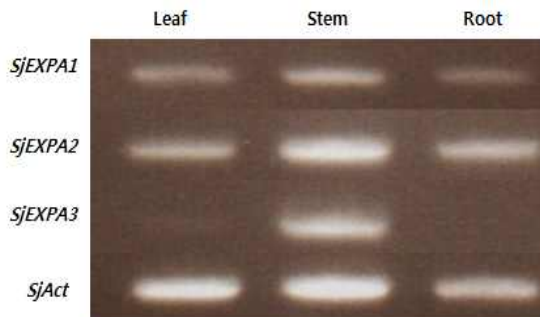


Fig. 4. Expression of *Suaeda japonica* expansin genes in different plant organs (leaf, stem and root). Semi-quantitative RT-PCR was conducted with *SjAct* as an internal control. Results are representative of those from repeated experiments.

발현이 강하며, *SjEXPA3*은 전혀 발현되지 않았다(Fig. 4). 유식물의 줄기를 세분화하여 칠면초 expansin의 발현양상을 비교한 결과 줄기에서는 모든 expansin이 발현되었으며, 잎에서는 *SjEXPA2*가 강하게 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 5).

NaCl 농도별 칠면초 성장 변화 분석

28°C 24시간 연속광 조건의 배양기에서 각각 0 ppt, 1 ppt, 2 ppt, 5 ppt, 10 ppt 및 20 ppt의 NaCl을 함유한 1/2 MS 배지에서 2주간 배양한 칠면초 유식물의 성장도를 측정하였다. 실험에 사용한 NaCl 농도 범위 내에서 칠면초의 성장도는 큰

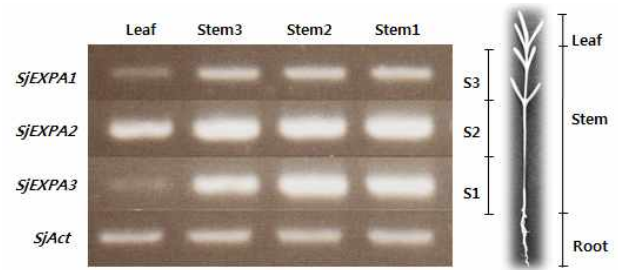


Fig. 5. Expression of *Suaeda japonica* expansin genes in different plant organs [leaf, stem3 (S3), stem2 (S2) and stem1 (S1)]. Semi-quantitative RT-PCR was conducted with *SjAct* as an internal control. Stem was dissected along the shoot axis as shown on right panel. Results are representative of those from repeated experiments.

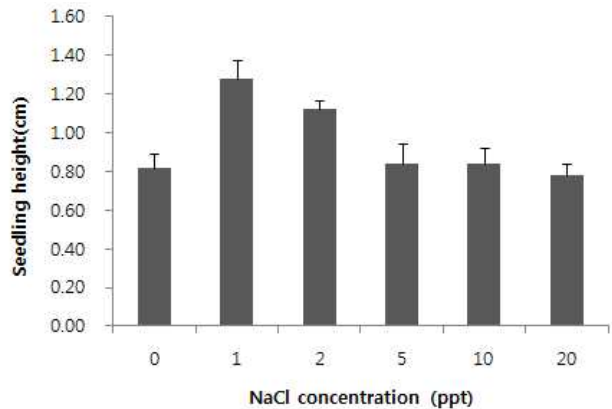


Fig. 6. Growth measurements of two-week-old *Suaeda japonica* seedlings on 1/2 MS media containing 0 ppt, 1 ppt, 2 ppt, 5 ppt, 10 ppt and 20 ppt NaCl. Bars indicate standard errors (n=30)

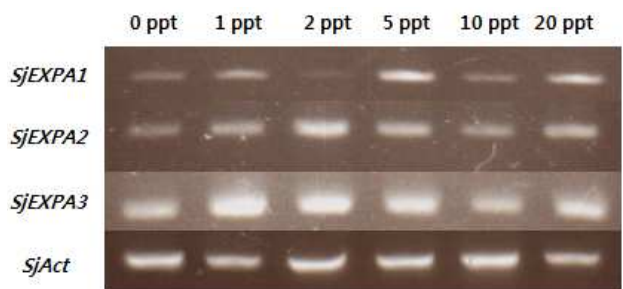


Fig. 7. Expression pattern of *SjEXPA* genes under increasing concentrations of NaCl (0 ppt, 1 ppt, 2 ppt, 5 ppt, 10 ppt and 20 ppt). Semi-quantitative RT-PCR was conducted with *SjAct* as an internal control. Results are representative of those from repeated experiments.

차이를 나타내지 않았으나 1 ppt와 2 ppt 처리구에서 가장 높은 성장도를 보였다(Fig. 6). 각 NaCl 농도에서 유식물의 평균 초장은 0.82 cm (0 ppt), 1.28 cm (1 ppt), 1.12 cm (2 ppt), 0.84 cm (5 ppt), 0.84 cm (10 ppt) 및 0.78 cm (20 ppt)로 측정되

었다. NaCl 농도에 따른 expansin 유전자의 발현을 확인하기 위해 semi-quantitative RT-PCR을 수행한 결과 expansin 유전자의 발현은 NaCl 농도의 영향을 받지 않고 발현됨을 확인하였다(Fig. 7).

고 찰

본 연구에서는 염생식물에서는 최초로 칠면초(*Suaeda japonica*)의 expansin 유전자의 cDNA 3종을 분리하였으며, 이를 이용하여 칠면초 EXPA 단백질 3종의 1차구조와 각 유전자의 발현양상을 분석하였다.

분리한 3종의 칠면초 expansin cDNA 염기서열 분석 및 단백질 1차 구조의 비교분석 결과 시스테인 잔기의 위치 및 배열 간격과 트립토판의 위치, 그리고 활성부위의 일부로 생각되는 HFD 도메인이 잘 보존되어 있다는 점에서 이들이 α -expansin (EXPA)에 속한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

애기장대, 벼, 옥수수, 딸기, 토마토, 담배, 고사리, 이끼와 대추나무에서 밝혀진 expansin 단백질과 칠면초의 expansin 단백질을 대상으로 계통수를 작성한 결과 SjEXPA1과 SjEXPA3는 딸기의 expansin과 가까우며 SjEXPA2는 대추나무 expansin과 가장 가까운 것으로 나타났다(Fig. 2). 목본인 대추나무 및 목본성의 딸기와 계통적으로 가까운 것으로 나타나는 이유는 칠면초의 생육특성과 관련이 있는 것으로 생각된다. 칠면초는 일년생 초본이지만 생육초기에는 초본성으로 자라다가 나중에 목질화되는 경향이 있다. 따라서 칠면초의 expansin이 목본 식물의 expansin과 유사한 기능을 가질 것으로 추측할 수 있으며 이는 단백질 구조의 유사성과 밀접한 관계가 있다고 볼 수 있다. 이의 확인을 위하여 생육 단계별 expansin 유전자의 발현양상 변화를 추적하는 실험이 차후 필요할 것이다.

칠면초의 기관별 expansin 유전자의 발현양상을 알아본 결과 SjEXPA1과 SjEXPA2는 모든 기관에서 발현되었으며, SjEXPA3는 뿌리에서 발현되지 않는 것을 확인하였다(Figs. 4, 5). 줄기와 잎에서는 모든 expansin 유전자가 발현되지만 SjEXPA1과 SjEXPA3는 SjEXPA2 유전자에 비하여 잎에서 발현량이 적은 것으로 나타났다(Fig. 4). 줄기에서 모든 expansin 유전자가 발현되고 발현량도 다른 기관에 비하여 많은 이유는 줄기에 위치한 분열조직의 영향인 것으로 생각된다. 뿌리에서도 expansin 유전자의 발현량이 많을 것이라고 추측되지만 비교적 발현량이 적은 이유는 뿌리 특이적인 expansin 유전자가 따로 존재함에도 불구하고 본 연구에서 분리하지 못한 데 있다고 생각된다. 벼의 경우 뿌리 특이적인 expansin 유전자가 분리되어 연구된 바 있으며 콩의 경우에도 뿌리 특이적인 expansin 유전자의 발현이 뿌리의 생장도와 밀접하게 관련되어 있다는 증거가 제시된 바 있다[2, 17]. 따라서 칠면초에도 뿌리

생장과 밀접하게 관련된 expansin이 존재할 가능성이 있다. 향후 칠면초의 뿌리 특이적 expansin 유전자의 분리를 통하여 칠면초의 뿌리 생장에 있어서 expansin의 역할을 구명해야 할 것이다.

내염성이 없는 식물의 경우 일반적으로 고염도 환경에서 생장이 저해되는데 이는 expansin과 같은 생장 관련 유전자의 발현이 저해된 결과일 것으로 생각된다. 최근의 한 보고에 의하면 내염성 옥수수의 경우 고염도 환경에서도 식물이 정상적으로 성장하고 expansin 유전자도 염분농도와 무관하게 일정하게 발현된다. 그러나 내염성이 없는 정상 옥수수의 경우에는 고염도 환경에서 생장이 저해될 뿐만 아니라 expansin 유전자 발현도 현저하게 줄었다[24]. 고염도 환경에서의 칠면초 유식물의 생육 실험결과에 따르면 실험에 사용된 NaCl 농도 범위(0, 1, 2, 5, 10 및 20 ppt) 내에서 유식물의 생장이 현저하게 억제되지 않았을 뿐만 아니라 expansin의 발현량에도 큰 변화가 없었다(Figs. 6, 7). 이 결과로 미루어 내염성을 가진 식물이 고염도 환경에서도 정상적으로 성장할 수 있는 이유 중 하나로 expansin과 같은 생장관련 유전자의 발현이 NaCl의 농도에 크게 영향을 받지 않고 정상적으로 유지됨으로써 식물의 생장 저하가 일어나지 않도록 할 것이라는 점을 들 수 있다. SjEXPA1의 경우 다른 expansin 유전자들과 달리 염분 농도의 증감에 따라 발현량이 일정하지 않지만 SjEXPA2와 SjEXPA3의 경우 발현량이 일정하게 유지되었다(Fig. 7). 또한 SjEXPA2와 SjEXPA3의 발현이 SjEXPA1보다 월등히 강한 것으로 보아 염분 환경에서의 칠면초 유식물 성장에는 SjEXPA2와 SjEXPA3 두 유전자가 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 이를 증명하기 위해서는 expansin 유전자를 과다발현 시키거나 억제하도록 조절된 형질전환 칠면초를 이용한 실험이 필요하다. 그러나 칠면초의 유전자 조작에 관한 연구는 아직까지 이루어진 바 없기 때문에 앞으로 많은 노력과 연구가 필요하다.

본 연구의 결과로 염생식물인 칠면초가 고염도 환경에서 정상적으로 생육할 수 있도록 하는데 expansin이 중요한 요소 중 하나일 것이라고 결론지을 수 있다. 최근 들어 염생식물이 정화능력을 가지고 있으며 해안 염습지의 침식을 방지하는데 효과적으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 생리활성물질을 다량 함유하고 있다는 점이 알려지면서 많은 관심을 끌고 있다. 염생식물의 보존 및 활용을 위해서 활발한 분자생물학적 연구가 필요하다. 따라서 칠면초 expansin 유전자의 기능에 대한 연구는 염생식물의 응용에 대한 기초연구로서 중요한 의미를 가진다.

감사의 글

이 논문은 2010년 한국연구재단 일반연구지원사업(과제 번호: 2010-0023667) 지원에 의한 연구결과임.

References

- Anjanasree, K. N. and Bansal, K. C. 2003. Isolation and characterization of ripening-related expansin cDNA from tomato. *J Plant Biochem Biotechnol* **12**, 31-35.
- Cho, H. T. and Cosgrove, D. J. 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 3237-3253.
- Cho, H. T. and Cosgrove, D. J. 2004. Expansins as agents in hormone action. pp. 262-281. In Davies, P. J. (ed.), *Plant Hormones* 3rd edn. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Cho, H. T. and Kende, H. 1997a. Expansins in deepwater rice inter-nodes. *Plant Physiol* **113**, 1137-1143.
- Cho, H. T. and Kende, H. 1997b. Expansins and internodal growth of deepwater rice. *Plant Physiol* **113**, 1145-1151.
- Cho, H. T. and Kende, H. 1997c. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell* **9**, 1661-1671.
- Choi, D., Cho, H. T. and Lee, Y. 2006. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Plant Physiol* **126**, 511-518.
- Choi, D. 2007. Ethylen-induced stem growth of deepwater rice is correlated with expression of gibberellin- and abscisic acid-biosynthetic genes. *J Plant Biol* **50**, 595-599.
- Choi, J. I., Kim, Y. J., Kim, J. H., Song, B. S., Yoon, Y., Byun, M. W., Kwon, J. H., Chun, S. S. and Lee, J. W. 2009. Antioxidant activities of the extract fractions from *Suaeda japonica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 131-135.
- Cosgrove, D. J. 1998. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol* **118**, 333-339.
- Cosgrove, D. J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326.
- Gao, X., Liu, K. and Lu, Y. T. 2010. Specific roles of AtEXPA1 in plant growth and stress adaptation. *Russ. J Plant Physiol* **57**, 241-246.
- Hiwasa, K., Rose, J. K. C., Nakano, R., Inaba, A. and Kubo, Y. 2003. Differential expression of seven alpha-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Plant Physiol* **117**, 564-572.
- Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H. T., Cosgrove, D. J., Fleming, A., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S. M., Rose, J. K. C. and Voesenek, L. A. 2004. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol* **55**, 311-314.
- Kim, J. H., Cho, H. T. and Kende, H. 2000. α -Expansins in the semiaquatic ferns *Marsilea Quadrifolia* and *Regnellidium diphyllum* evolutionary aspects and physiological role in rachis elongation. *Planta* **212**, 85-92.
- Kim, Y. A., Um, Y. R., Lee, J. I., Kim, H. J., Lim, S. Y., Nam, T. J. and Seo, Y. W. 2009. Comparative studies on the fatty acid compositions of the Korean salt marsh plants in the west sea. *Korean J Biotechnol Bioeng* **24**, 521-526.
- Lee, D. K., Ahn, J. H., Song, S. K., Choi, Y. D. and Lee, J. S. 2003. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiol* **131**, 985-997.
- Lee, H. J., Kim, Y. A., Ahn, J. W., Lee, B. J., Moon, S. G. and Seo, Y. 2004. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants. *Korean J Biotechnol Bioeng* **19**, 57-61.
- Lee, Y., Choi, D. and Kende, H. 2001. Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol* **2001**, 527-532.
- Lee, Y. and Kende, H. 2002. Expression of alpha-expansin and expansin-like genes in deepwater rice. *Plant Physiol* **130**, 1396-1405.
- Min, B. M. 1998. Vegetation on the west coast of Korea. *Ocean Polar Res* **20**, 167-178.
- Mim, B. M. 2005. Seed distribution and burial properties of *Suaeda japonica* in tidal-flat. *J Ecol Field Biol* **28**, 141-147.
- Mühling, K. H. and Läuchli, A. 2002. Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *Plant Physiol* **159**, 137-146.
- Pitann, B., Zorb, C. and Mühling, K. H. 2009. Comparative proteome analysis of maize (*Zea mays* L.) expansins under salinity. *J Plant Nutr Soil Sci* **172**, 75-77.
- Rose, J. K. C., Lee, H. H. and Bennett, A. B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5955-5960.

초록 : 칠면초(*Suaeda japonica*) expansin 유전자의 분리 및 특성 분석**황승택 · 김석규 · 나종길 · 이점숙 · 최동수***

(국립군산대학교 자연과학대학 생물학과)

본 연구에서는 염생식물에서는 최초로 expansin 유전자를 분리하고 특성을 분석하였다. 염생식물 중 생리활성 물질 등으로 최근 들어 관심의 대상이 되고 있는 칠면초로부터 expansin 유전자의 cDNA 3종을 분리, 합성하였다. 확보한 3종의 칠면초 expansin cDNA 염기서열 분석 및 단백질 1차 구조의 비교분석 결과 시스테인 잔기의 위치 및 배열간격과 트립토판의 위치, 그리고 활성부위의 일부로 생각되는 HFD 도메인이 잘 보존되어 있다는 점에서 이들이 α -expansin (EXPA)에 속한다는 것을 확인하였다. 다른 식물들과 칠면초의 expansin 단백질을 대상으로 계통수를 작성한 결과, 목본성인 딸기와 대추나무의 expansin과 가장 가까운 것으로 나타났다. 칠면초는 일년생 초본이지만 생육초기에는 초본성으로 자라다가 나중에 목질화되는 경향이 있다. 따라서 칠면초의 expansin이 목본 식물의 expansin과 유사한 기능을 가질 것으로 추측할 수 있다. 고염도 환경에서의 칠면초 유식물의 생육 실험결과에 따르면 실험에 사용된 NaCl 농도범위 내에서 유식물의 생장이 현저하게 억제되지 않았을 뿐만 아니라 expansin의 발현량에도 큰 변화가 없었다. 이 결과로 미루어 내염성을 가진 식물에서는 expansin과 같은 성장관련 유전자의 발현이 NaCl의 농도에 크게 영향을 받지 않으므로 식물의 생장이 저해되지 않는다고 유추할 수 있다. 이는 염생식물인 칠면초가 고염도 환경에서 정상적으로 생육할 수 있도록 하는데 expansin이 중요한 요소 중 하나일 것이라는 점을 의미한다.