

## 시토신 탈메틸화 관련 *NtROS2a* 유전자 발현을 제어한 RNAi 식물의 DNA microarray 분석

최장선 · 이인혜 · 정유진 · 강권규

### DNA microarray analysis of RNAi plant regulated expression of *NtROS2a* gene encoding cytosine DNA demethylation

Jang Sun Choi · In Hye Lee · Yu Jin Jung · Kwon Kyoo Kang

Received: 24 June 2016 / Revised: 26 June 2016 / Accepted: 26 June 2016  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** To study the transcript levels of epigenetically regulated genes in tobacco, we have developed a transgenic line OX1 overexpressing *NtROS2a* gene encoding cytosine DNA demethylation and a RNAi plant line RNAi13. It has been reported that salt- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- stress tolerance of these transgenic lines are enhanced with various phenotypic characters (Lee *et al.* 2015). In this paper, we conducted microarray analysis with Agilent Tobacco 4 x 44K oligo chip by using overexpression line OX1, RNAi plant line RNAi 13, and wild type plant WT. Differentially expressed genes (DEGs) related to metabolism, nutrient supply, and various stressed were up-regulated by approximately 1.5- to 80- fold. DEGs related to co-enzymes, metabolism, and methylation functional genes were down-regulated by approximately 0.03- to 0.7- fold. qRT-PCR analysis showed that the transcript levels of several candidate genes in OX1 and RNAi lines were significantly (*p* < 0.05) higher than those in WT, such as genes encoding KH domain-containing protein, MADS-box

protein, and Zinc phosphodiesterase ELAC protein. On the other hand, several genes such as those encoding pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein, histone deacetylase HDAC3 protein, and protein kinase were decreased by approximately 0.4- to 1.0- fold. This study showed that *NtROS2a* gene encoding DNA glycosylase related to demethylation could regulate adaptive response of tobacco at transcriptional level.

**Keywords** DNA demethylation, methylation, microarray analysis, *NtROS2a* transgenic tobacco, transcriptional level

### 서 론

애기장대 및 벼와 같은 모델식물의 계놈 염기서열분석이 완료된 이후 확보된 무수한 유전자들의 기능을 규명하기 위하여 여러 분석 기법들이 활용되고 있다. 이 중 후성유전학(epigenetics)은 DNA 염기서열 변화는 수반하지 않고 DNA의 methylation 및 histone 단백질의 아세틸화(acetylation)등의 후천적인 수식에 의해 유전자발현이 제어되고, 그 현상이 후대에까지 유지되는 현상을 말하며, 이는 DNA의 methylation과 같은 DNA modification, DNA와 histone의 결합 위치를 변화시키는 chromatin remodeling, histone modification의 변화 등에 의해 초래된다 (Sano *et al.* 1990; Zhang *et al.* 2006). 식물의 경우 동물과 비슷한 DNA methylation기작으로 설명하고 있으며, 몇몇 돌연변이체를 이용하여 세대 간 methyltransferase 및 demethyltransferase의 작용이 복잡하게 일어나고 있다고 하였다(Li *et al.* 1992; Reik *et al.* 2001; Law and Jacobsen 2010). 최근 들어 Tilling 및 microarray기술 등의 개발로 DNA meth-

<sup>†</sup>To whom co-correspondence should be addressed.

J. S. Choi<sup>†</sup>

농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과  
(Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Korea)

I. H. Lee · Y. J. Jung (✉) · K. K. Kang (✉)

국립환경대학교 원예학과  
(Department of Horticulture, Hankyong National University, Ansan, Gyeonggi-do 456-749, Korea)

국립환경대학교 유전공학연구소  
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansan 456-749, Korea)  
e-mail: yuyu1216@hknu.ac.kr, kykang@hknu.ac.kr

ylation 및 histone modification의 변화는 게놈 전체 수준에서 연구되고 있으며, DNA bisulfite sequencing과 next generation sequencing을 통하여 게놈 전체의 methyl cytosine의 위치를 정확하게 동정 가능하게 되었다(Law and Jacobsen 2010). 다양한 epigenetic regulator의 돌연변이체에서의 stress 저항성 확인을 통하여 biotic / abiotic stress 저항성을 변화시키는 epigenetic regulator를 동정하고 whole genome bisulfite sequencing과 microarray를 통하여 그 target gene과 조절 기작을 규명하고 있다(Steward et al. 2002; Choi and Sano 2007). 또한 식물의 생장과 발육과정, 병 저항성, 스트레스 저항성 등과 같은 환경 자극에 의해 일어나는 빠른 신호 전달 과정에서도 DNA methylation과 같은 epigenetic 조절이 매우 중요한 역할을 하고 있다(Choi and Sano 2007, Boyko et al. 2010). 식물에서 DNA 탈메틸화 기구는 DNA 메틸화와 함께 발현이 억제된 상태에 있는 유전자가 DNA 탈메틸화를 따라 활성화되어 전사될 때까지의 과정은 명확하게 밝혀진 것은 아니다. 그러나 DME와 ROS1 등의 연구에서 DNA 탈메틸화 효소로 인해 염기 제거 수복기구가 DNA 탈메틸화 과정에서 반드시 필요하며, 크로마틴의 기능 변환도 필요하다고 보고되고 있다(Aguis et al. 2006). 식물에서 DNA 탈메틸화와 유전자 발현과정에는 DNA 탈메틸화에 DEMETER을 포함한 염기 제거 수복기구와 FACT 히스톤 보호자 복합체의 구성 단백질인 SSRP1가 필요하다는 연구가 보고되었다(Morales-Ruiz et al. 2006). SSRP1 돌연변이체는 주변의 FWA 유전자의 DNA 탈메틸화가 유도되지 않기 때문에 최소한 DMETER를 포함한 염기 제거 수복기구만으로는 DNA 탈메틸화는 일어나지 않고, SSRP1의 한 염색질내의 복합단백질이 반드시 존재한 상태에서 탈메틸화가 일어난다(Morales-Ruiz et al. 2006). 또한 DEMETER DNA glycosylase는 애기장대의 배발생 과정에서 메틸 시토신을 시토신으로 대체시키는 DNA demethylase 역할을 하며 배유에서 MEDEA, FWA, F IS2 유전자의 자성 대립유전자만을 발현시키는 유전자 각인(gene imprinting)에 결정적인 역할을 하고 있다(Huh et al. 2008). 이와 같이 후성유전은 실질적으로 염기서열의 변화에 기인하지 않더라도 유사분열 또는 감수분열을 통하여 세포세대 또는 개체 간 안정적으로 특정 유전자나 형질의 변형 발현이 유지되기도 한다(Goldberg et al. 2007). 이전에 본 연구팀은 식물이 다양한 환경 스트레스의 적응 과정에서 후성유전학 조절이 매우 중요하다고 생각하여 담배에서 알루미늄이나 염분 및 저온 스트레스 처리에 의해 glycerophosphodiesterase-like protein (*NtGPDL*) 유전자의 demethylation을 유도하는 것이 보고하였다(Choi and Sano 2007). 그리고 담배유래 탈메틸화 관련 유전자(*NtROS2a*) 유전자를 분리 및 발현특성 살펴보고, 형질전환체를 육성하여 삼투와 염분 스트레스에 의해 DNA hypermethylation을 유도하는 것으로 보고하였다(Lee et al. 2015). 따라서 본 연구에서는 탈메틸화효소로 알려져 있는 *NtROS2a* 유전자가 도입된 담배 RNAi 및 overexpression 형질전환체의 microarray

분석을 통하여 후성유전관련 유전자들의 세포 내 발현 제어 및 발현 양상을 분석하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물 과발현 및 RNAi 벡터구축

담배로부터 분리된 시토신 탈메틸화관련 *NtROS2a* (*Nicotiana tabacum Repressor Of Silencing 2a*) 유전자를 식물(*Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc)에 과발현(overexpression) 시키기 위하여 pBI121 벡터를 이용하였으며, RNAi (RNA interference) 형질전환체를 위하여 PDK 인트론을 끼고 고안된 PCR 증폭 산물을 pKANNIBAL 벡터에 클로닝 하였다. 유전자의 발현 조절을 위한 프로모터는 두 벡터 모두 CaMV 35S를 사용하였다(Lee et al. 2015). 식물 발현용 vector 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켜 담배에 도입하였다. 형질전환된 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 NPTII 유전자를 이용하였고, 35S 프로모터 영역(F-5' TGAGACTTTCAACAAAGGGTA)과 *NtROS2a* (R-3' GGGAACTGATGAGCGGTTG) 영역의 프라이머를 이용하여 형질전환 여부를 확인하였다(Lee et al. 2015).

### Total RNA 분리, cDNA 합성 및 qRT-PCR

Total RNA를 얻기 위해 3주된 어린 식물체에서 잎을 채취하여 사용하였다. Total RNA 분리는 Trizol reagent (Invitrogen)의 실험 방법에 따라 균질된 시료에서 total RNA를 분리하였다. 0.1 g 조직에 1 ml Trizol 넣어서 실온에 5분간 두고 200 $\mu$ l chloroform을 첨가 한 후 15분 동안 4°C, 13,000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 회수하여 세로운 1.5 ml tube에 넣어 500  $\mu$ l isopropyl alcohol을 첨가 한 후 실온에 10분 동안 정치 한 후 4°C, 13,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거한 후 형성된 RNA pellet을 99.9% ethanol로 1회 세정하였고, 다시 75% DEPC-ethanol로 1회 세정한 후 4°C, 13,000 rpm으로 원심분리 하여 얻은 RNA pellet을 DEPC (diethyl pyrocarbonate) treated water 50  $\mu$ l를 넣어 용해시킨 다음, smarspec TM 3000(Bio-red, USA)으로 1차 추출된 양을 측정하였다. 그 후 DNaseI (Takara Shuzo Co., Ltd., Japan)을 첨가한 뒤 37°C에서 30분간 처리하고 제공된 방법에 따라 정제한 뒤, total RNA 농도(g/ $\mu$ l) 및 A260/280 이 1.8이 되는 것을 선정하여 실험에 공시하였다. 정량한 RNA는 다음과 같이 Oligo (dT) primer를 사용한 cDNA를 합성하여 분석을 실시하였다. cDNA는 1st strand synthesis 키트(Oligo dT primer, Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. 합성 방법을 Invitrogen 사의 방법을 응용하여 모든 samples 의 total RNA의 5  $\mu$ g를 이용하였으며, RNA sample에 1×DEPC를 8  $\mu$ l 첨가하고, 1  $\mu$ l의 Oligo (dT)(5  $\mu$ g/ $\mu$ l)와 10mM dNTP 1  $\mu$ l를 혼합하-

여 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 1분간 얼음에 냉각시켜 first strand cDNA 합성을 정지 시켰다. 합성된 first-strand cDNA 반응액에 10×RT buffer 2 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, RNase Inhibitor 1 µl를 혼합하여 42°C에서 1분간 반응시킨 후 strand synthesis polymerase 반응 효소를 sample 당 5 U을 첨가하여 42°C에서 50분간 반응 시킨 후 72°C에서 15분간 반응시킨 후 얼음에 급랭하여 cDNA를 합성하였다. RNase H를 1 µl 넣은 후 37°C에서 20분간 반응 시켜 cDNA 합성을 완료하여 사용하였다. qRT-PCR 분석은 합성한 cDNA를 사용하여 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO co., Japan)를 사용하여 권장하는 방법에 의해 수행하였다. Threshold cycle (C<sub>t</sub>) 값에 의한 발현양 분석은  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 으로 계산하였으며,  $\Delta\Delta C_t$ 은 처리식물체의 ( $C_t$  target gene -  $C_t$  actin gene) - 대조식물체의 ( $C_t$  target gene -  $C_t$  actin gene)에 의해 계산하여 수치화 하였다(Livak and Schmittgen 2001).

#### Microarray 분석을 통한 high-throughput screening

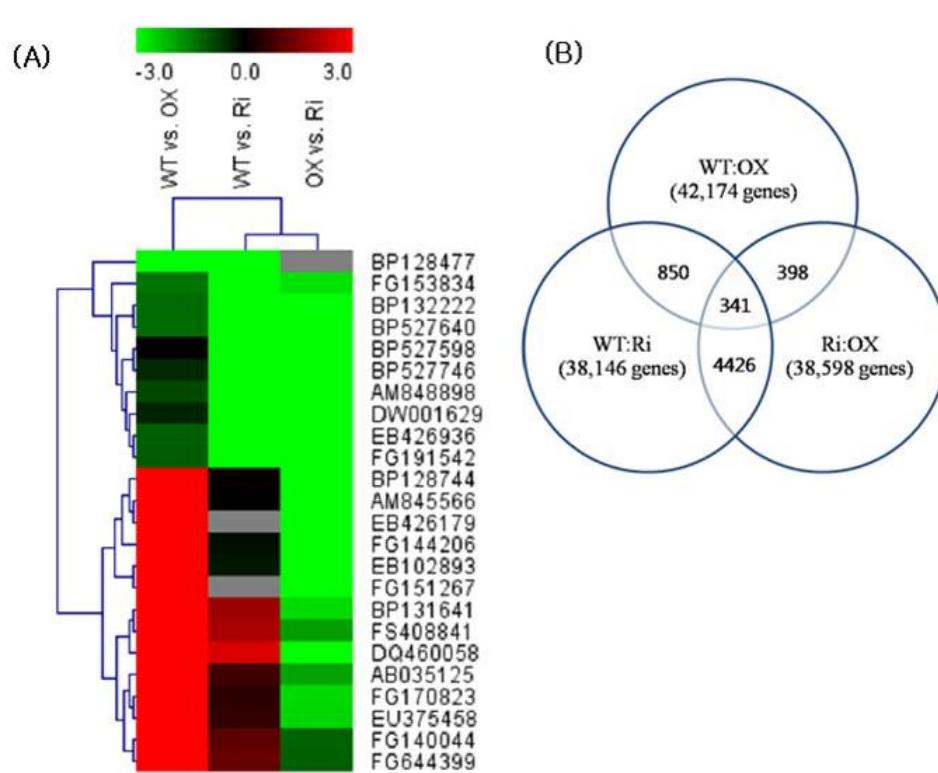
담배 과발현(OX) 및 RNAi 형질전환체에 대한 transcript의 발현양상을 규명하기 위해 대조구인 wild type과 형질전환 OX1과 RNAi13 계통에서 RNA를 추출한 후, microarray 분석을 2반복으로 수행하여 발현 차이를 분석하였다. 목적 cRNA probes와 hybridization은 Agilent's Low RNA Input Linear Ampli-

fication kit (Agilent Technology, USA)을 사용하였으며, Microarray 분석을 위한 chip은 상용화 되고 있는 Agilent Tobacco 4 x 44K Oligo microarray을 사용하여 hybridization 후, image quantification은 GenePix Pro 4.0을 사용하였고, LOWESS 프로그램을 이용하여 각 spot의 normalization을 수행하였다. 분석 프로그램은 Agilent GeneSpringGX 7.3을 사용하였으며, Hybridization은 각각 2 반복으로 수행되었다.

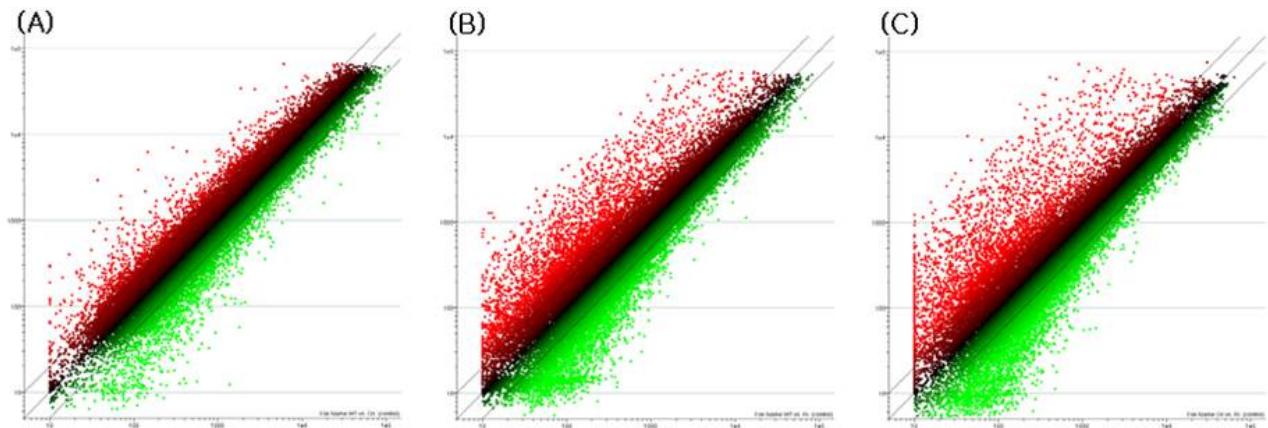
#### 결과 및 고찰

##### *NtROS2a* 유전자 도입 형질전환체 육성 및 검토

시ト신 탈메틸화관련 *NtROS2a* 유전자가 도입된 과발현 및 RNAi 형질전환계통 육성을 위하여 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 NPTII 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터인 pBI121와 pKANNIBAL을 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켜 담배에 도입하여 선발된 과발현 및 RNAi 형질전환체들의 발현 양상과 고염과 건조 내성에 대한 특성은 보고하였다(Lee et al. 2015). 따라서 이전의 연구에서 선발한 OX1 계통과 RNAi13 계통을 이용하여 microarray 분석을 수행하였다(Fig. 1).



**Fig. 1** Microarray investigation of various genes in WT vs. *NtROS2a* overexpression transgenic line OX1, WT vs. *NtROS2a* RNAi transgenic line RNAi13, *NtROS2a* overexpression transgenic line OX1 vs. *NtROS2a* RNAi transgenic line RNAi13 under non-stress conditions. (A) Hierarchical Clustering. (B) Venn diagram through microarray analysis



**Fig. 2** Global expression pattern. (A) WT vs. overexpression of *NtROS2a*, (B) WT vs. RNAi of *NtROS2a*, (C) overexpression of *NtROS2a* vs. RNAi of *NtROS2a*

### Microarray 분석을 통한 전사체 대량해석

*NtROS2a* 유전자에 의하여 발현이 조절되는 유전자들을 탐색하고자 형질전환체 중에서 얻어진 OX1 계통과 RNAi13 계통 T<sub>2</sub>종자를 받아 후 3주된 어린 식물체의 잎으로부터 추출된 Total RNA를 이용하여 microarray 분석을 수행하였다. 반복된 microarray 분석에서 총 reliable gene 중 *p*-value가 0.05 이하인 유전자 수는 WT:OX1에서 42,174, WT:RNAi13은 38,146, RNAi13:OX1은 38,598 만큼이 reliable한 유전자로 발현양이 비교되었다. 이러한 발현 양상 중 세 시료간에 유전자의 발현이 공통적으로 나타나는 유전자 수는 341개였다(Fig. 1). 각 시료의 전체적인 유전자의 발현 양상을 산포도 곡선으로 살펴본 결과 유전자 발현양이 대각선을 중심으로 분포하고 있는 것으로 보아 2회 반복 실험의 재현성이 입증 되었다(Fig. 2). 산포도 곡선에서 표시된 점들은 유전자를 의미하며, red와 green 색으로 표시된 유전자는 그 발현양의 변화를 추이할 수 있는 유용한 결과이다. Microarray 결과를 바탕으로 data mining을 수행하여 transcript 발현 양상의 차이를 살펴본 결과 Table 1과 Table 2와 같이 metabolism, abiotic stress, biotic stress, antimicrobial peptide 및 methylation 관련 유전자들이 각각 up- 또는 down-regulation 되었다. 형질전환된 OX1 계통과 RNAi13 계통에서 up regulation 된 유전자들을 살펴보면, KH domain-containing protein, MADS-box protein, arachidonic acid-induced DEA1 precursor, Zinc phosphodiesterase ELAC protein, C2H2-type zinc finger protein, receptor protein serine/threonine kinase, RAB GTPase-like protein 등의 유전자들이 1.5에서 80 정도 높게 발현 되었다(Table 1). 이들 유전자는 대부분 세포 내 이온 수송, 영양 공급 등과 같은 물질대사와 생물적 비생물적 스트레스 및 methylation과 관련되어 영향을 주는 유전자로 알려져 있다. 또한 down regulation된 유전자들은 pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein, histone deacetylase HDAC3 protein, copper ion transmembrane transporter,

zinc-finger protein, protein kinase, *Pinus pinaster* early response to drought 3 (erd3) gene, multi antimicrobial extrusion family protein 등으로 물질대사관련 유전자와 세포 내 기능유전자의 역할을 담당하는 조효소, 그리고 다양한 스트레스 및 methylation 관련 유전자 등이 0.03에서 0.7정도로 낮은 발현량을 보였다 (Table 2). 이러한 결과를 바탕으로 시토신 탈메틸화관련 *NtROS2a* 유전자의 과발현 및 발현억제에 따른 mRNA의 전사 레벨은 WT과 형질전환체 간에 qRT-PCR로 분석하였다. WT과 OX1 형질전환체의 microarray 분석에서 *NtROS2a* 유전자가 도입됨에 따라 전사레벨이 크게 증가한 up-regulation 유전자 9개(accession number: FG144206.1, AM845566.1, DQ460058.1, EB102893.1, FG644399.1, BP131641.1, FG151267.1, FG170823.1, FS408841.1)를 선정하여 비교 분석한 결과 KH domain-containing protein (FG144206.1), *Solanum lycopersicum* chromosome 3 clone (AM845566.1), Zinc phosphodiesterase ELAC protein (DQ460058.1), magnesium-chelatase subunit H family protein (EB102893.1) 및 C2H2-type zinc finger protein (FG644399.1) 유전자들에서 WT 보다 발현양이 0.4에서 1.2정도 높게 나타났고, *Glycine max* lysosomal beta glucosidase-like (BP131641.1), O-fucosyltransferase family protein (FG151267.1), flavin-containing monooxygenase family protein (FG170823.1), 5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase (FS408841.1) 유전자들에서 WT 보다 0.04에서 0.6정도로 발현양이 낮게 나타났다(Fig. 3). 이는 식물에서 co-suppression 이라고 알려진 현상과 같이 식물체내 존재하는 특정 유전자를 식물에 도입하여 과발현시킬 경우 내재적인 유전자가 도입유전자를 외부유전자로 인식하여 RNA간섭 경로에 의하여 발현이 저해된 것일 수도 있다는 것을 배제할 수 없다고 생각한다. DNA 메틸화는 세포가 분열하면서 식물체가 발육하는 동안 가역적으로 변하는 특성을 갖고 있다고 알려져 있다(Zhang et al. 2006; Zhu et al. 2008). 그러므로 같은 개체 내에서도 조직이나 세포마다 DNA 메틸화 패턴과 관련된 유전자의 발현 양상은 각각 다를 수

**Table 1** Partial list of up-regulated genes in overexpression transgenic of *NtROS2a*

Accession Number	Fold Change	Description
FG144206.1	80	KH domain-containing protein At4g18375-like
EB426179.1	15	MADS-box protein SEP1-a
AM845566.1	25	Solanum lycopersicum chromosome 3 clone C03HBa0257N18
AB035125.1	24	arachidonic acid-induced DEA1 precursor
DQ460058.1	24	Zinc phosphodiesterase ELAC protein
EB102893.1	23	magnesium-chelatase subunit H family protein, expressed
FG644399.1	19	C2H2-type zinc finger protein
BP131641.1	17	Glycine max lysosomal beta glucosidase-like
FG151267.1	16	O-fucosyltransferase family protein
FG140044.1	16	Neutral/alkaline nonlysosomal ceramidase family protein
FG170823.1	16	flavin-containing monooxygenase family protein / FMO family protein
EU375458.1	16	FIE (FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM) nucleotide binding / transcription factor / transcription regulator
EB427701	10	3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase/methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating)/ oxidoreductase
EB450851	2	Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase (OSAK)
AF053077	3	Nicotiana tabacum osmotic stress-induced zinc-finger protein (zfp)
EB450851	2	osmotic stress-activated protein kinase [Nicotiana tabacum]
AY081175	2	Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase (OSAK)
AF142596	2	TMK1 (TRANSMEMBRANE KINASE 1); transmembrane Receptor protein serine/threonine kinase
BP534708	1.5	Hypothetical protein PTH [Pelotomaculum thermopropionicum SI] Hypothetical membrane protein [Pelotomaculum thermopropionicum SI]
EB428276	1.5	RAB GTPase-like protein A4D [Arabidopsis thaliana]
EB450542	2	Rab11/RabA-family small GTPase [Physcomitrella patens subsp. patens]
AB286961	2	multi antimicrobial extrusion family protein [Nicotiana tabacum]
AB120534	3	Nicotiana tabacum mRNA, transcriptionally up-regulated region Associated with genomic hypomethylation
AB120530	6	Nicotiana tabacum mRNA, transcriptionally up-regulated region Associated with genomic hypomethylation
DV162525	1.5	transcriptionally up-regulated region associated with genomic hypomethylation
DV161823	1.5	Lupinus albus plasma membrane H <sup>+</sup> ATPase(LHA2) mRNA
AB120523	1.5	Transcriptionally up-regulated region associated with genomic hypomethylation
U71108	2	Transcriptionally up-regulated region associated with genomic hypomethylation
FS408841.1	20	5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase
BP128744.1	25	Unknown

있고, 같은 계념에 수많은 epigenome이 존재할 수 있어서 DNA 메틸화나 탈메틸화로 인하여 다양한 표현형도 나타낼 수 있게 된다(Choi and Sano 2007). 식물의 DNA 메틸화 레벨은 메틸화와 탈메틸화의 상호 대립적인 반응에 따라 조절되는데, 식물에는 동물과 달리 5mC를 직접 제거할 수 있는 유전자가 존재하므로 보다 효율적인 DNA 탈메틸화 시스템을 갖추고 있다고 보고된다(Wu and Zhang 2010). 식물의 발달과 관련된 DNA 탈메틸화 현상은 애기장대의 종자 연구에

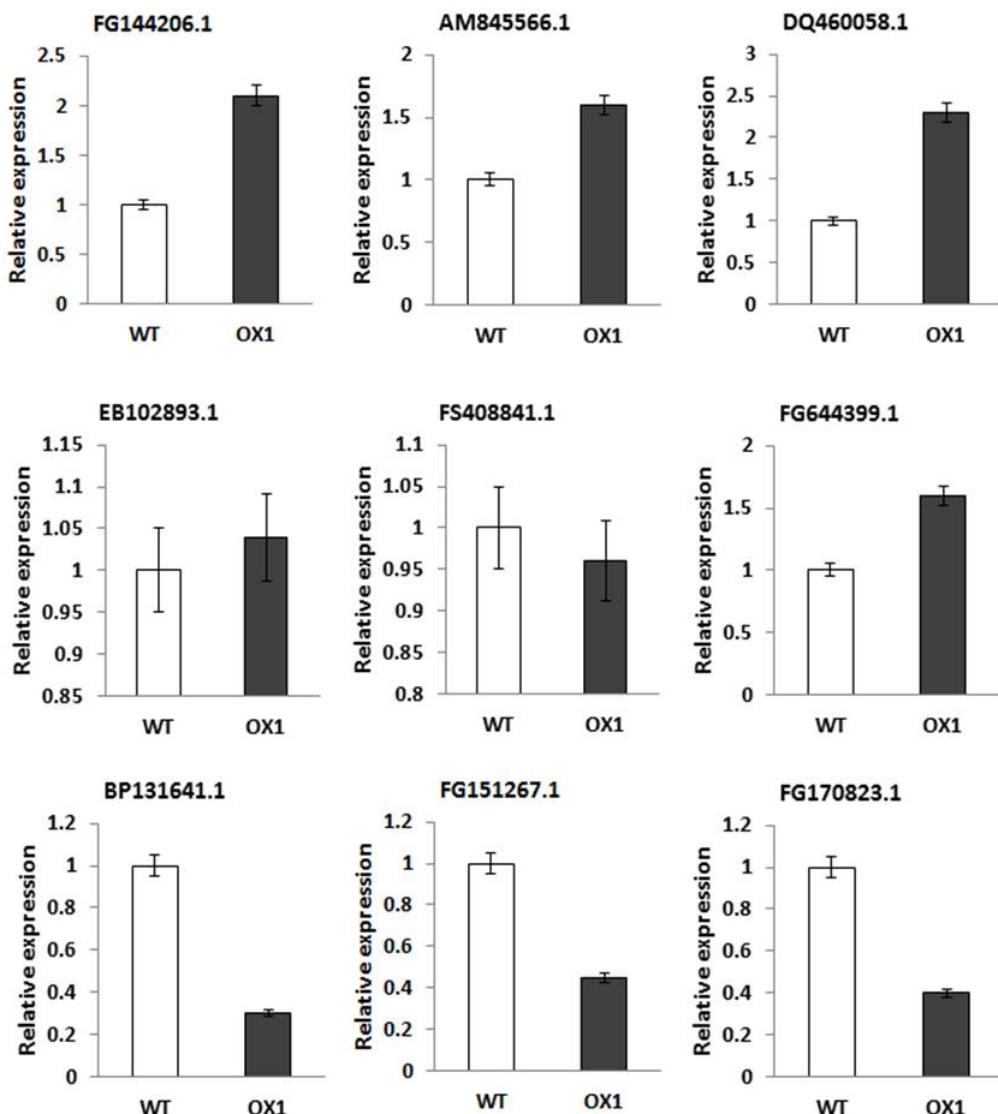
서 밝혀진 DEMETER(DME) 유전자가 대표적이다(Huh et al. 2008). DME에 변이가 생길 경우 종자 발달에 중요한 현상 중의 하나인 유전자 각인현상(gene imprinting)이 정상적으로 이루어지지 않으며, 결과적으로 종자가 퇴화되는데, 이러한 유전자 각인이 DME에 의해서 직접적으로 조절된다(Huh et al. 2008). 따라서 DME의 목표 유전자인 MEDEA(MEA)는 MEA 프로모터의 메틸화 레벨이 DME에 의해서 감소되어 정상적인 DME가 존재할 때에만 발현이 된다고 보고되었다

**Table 2** Partial list of down-regulated genes in RNAi transgenic of *NtROS2a*

Accession Number	Fold change	Description
BP527640.1	0.03	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
BP527598.1	0.04	olfactory receptor 52D1-like
FG153834.1	0.05	putative histone deacetylase HDAC3 protein
EB426936.1	0.06	E-Z type HEAT repeats; Present in subunits of cyanobacterial phycocyanin lyase
AM848898.1	0.07	copper ion transmembrane transporter/ transferase, transferring glycosyl groups / zinc ion transmembrane transporter
BP128477.2	0.06	TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1); auxin binding / protein binding / ubiquitin-protein ligase
AM793818	0.02	Solanum lycopersicum cDNA, clone; LEFL1026BA06, HTC in leaf
FG156522	0.05	ATPANK1 (PANTOTHENATE KINASE 1); pantothenate kinase
BP527177	0.05	C-terminal domain phosphatase-like protein
EB427133	0.05	probable pectate lyase 15-like
EB428453	0.05	Solanum tuberosum clone RH168B16, complete sequence
DV161823	0.3	N.plumbaginifolia pma4 mRNA for plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase
AY081175	0.5	Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase (OSAK)
AF053077	0.5	Nicotiana tabacum osmotic stress-induced zinc-finger protein (zfp)
EB450851	0.7	Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase (OSKA)
AY965682	0.7	Nicotiana tabacum putative annexin (ann12) mRNA
AB120529	0.3	Pinus pinaster early response to drought 3 (erd3) gene
AY965683	0.6	Nicotiana tabacum cell-line BY2 putative annexin (ann12)
FG191542.1	0.06	Chain A, Crystal Structure Of Highly Glycosylated Peroxidase From Royal Palm Tree
EB428276	0.7	RAB GTPase-like protein A4D [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
AB286961	0.4	multi antimicrobial extrusion family protein [Nicotiana tabacum]
U71108	0.4	S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase
AY567977	0.2	Nicotiana tabacum cultivar Havana SR1 cytosine-5-methyltransferase (MET1)
U62735	0.3	Nicotiana tabacum caffeoyl-CoA O-methyltransferase 3 (CCoAOMT-3)
FG168673	0.1	transcriptionally up-regulated region associated with genomic hypomethylation
AY567977	0.2	Nicotiana tabacum cultivar Havana SR1 cytosine-5-methyltransferase (MET1)
U62735	0.3	Nicotiana tabacum caffeoyl-CoA O-methyltransferase 3 (CCoAOMT-3)
BP527746.1	0.03	unknown gene
BP132222.1	0.04	unknown gene
DW001629.1	0.07	unknown gene

(Gehring et al. 2006). WT과 RNAi13 형질전환 담배의 microarray 분석에서 *NtROS2a* 유전자가 도입됨에 따라 전사레벨이 크게 감소한 down-regulation 유전자 9개(BP527640.1, BP527598.1, FG153834.1, EB426936.1, AM848898.1, FG191542.1, BP527746.1, BP132222.1, DW001629.1)를 선정하여 비교 분석한 결과 이들 유전자 모두 WT보다 0.4에서 1.0정도로 발현양이 낮게 나타났다(Fig. 4). 이 중 pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (BP527640.1)은 현저하게 낮게 나타났으며, histone deacetylase HDAC3 protein (FG153834.1)은 0.4 정도로 낮게

발현됨을 알 수 있었다. RNAi는 목표유전자와 동일한 염기 서열을 갖는 이중 가닥의 dsRNA가 전사 후 단계에서 해당 유전자의 발현을 억제하는 현상으로, 다양한 식물의 기능 연구에 활용이 되고 있다. 이러한 방법을 이용하여 진핵생물의 발달을 후성유전학적 관점에서 해석하려는 연구가 상당수 이루어지고 있다(Feng et al. 2010). 지금까지 식물에서 후성유전학 연구는 FLC라는 개화억제 유전자의 발현조절을 이해하려는 연구가 다수 이루어 졌다(Amasino 2010; Kim et al. 2009; Heo and Sung 2011). FLC는 춘화처리에 의해서 발



**Fig. 3** qRT-PCR analysis of the transcriptional levels of candidate genes identified by microarray analysis of *NtROS2a* overexpression transgenic line OX1 vs. wild type controls

현이 억제된 이후 후대를 위한 수정란 형성 후 resetting 되는 후성유전학적 조절 특성을 보인다고 보고되었다(Heo and Sung 2011). 후성유전학적 조절은 식물의 전형성능, 조직세포의 탈분화, 생장, 개화, 휴면, 탈휴면 등에서 식물발달과 진화를 예측하기에 유용하다. 또한 다양한 비생물적, 생물적 스트레스 반응성 관련 후성유전학적 조절 메커니즘에 대한 이해도 필요하다(Bird 2002). 식물은 스트레스를 기억하는 메커니즘을 보유하고 있어 저온에 대한 전처리 없이 갑작스런 저온이나 환경 변화에 노출이 되면 식물은 저항성을 보여주지 못하고 고사한다. 반면에 환경변화나 저온 등에 전처리된 식물은 관련 스트레스에 대하여 내성을 보여준다고 보고된다(Gao et al. 2003; Choi and Sano 2007; Zhu et al. 2007). 이러한 스트레스의 기억은 후성유전학적 메커니즘을 통하여 해석될 것이라고 판단되며, 향후 다양한 학문

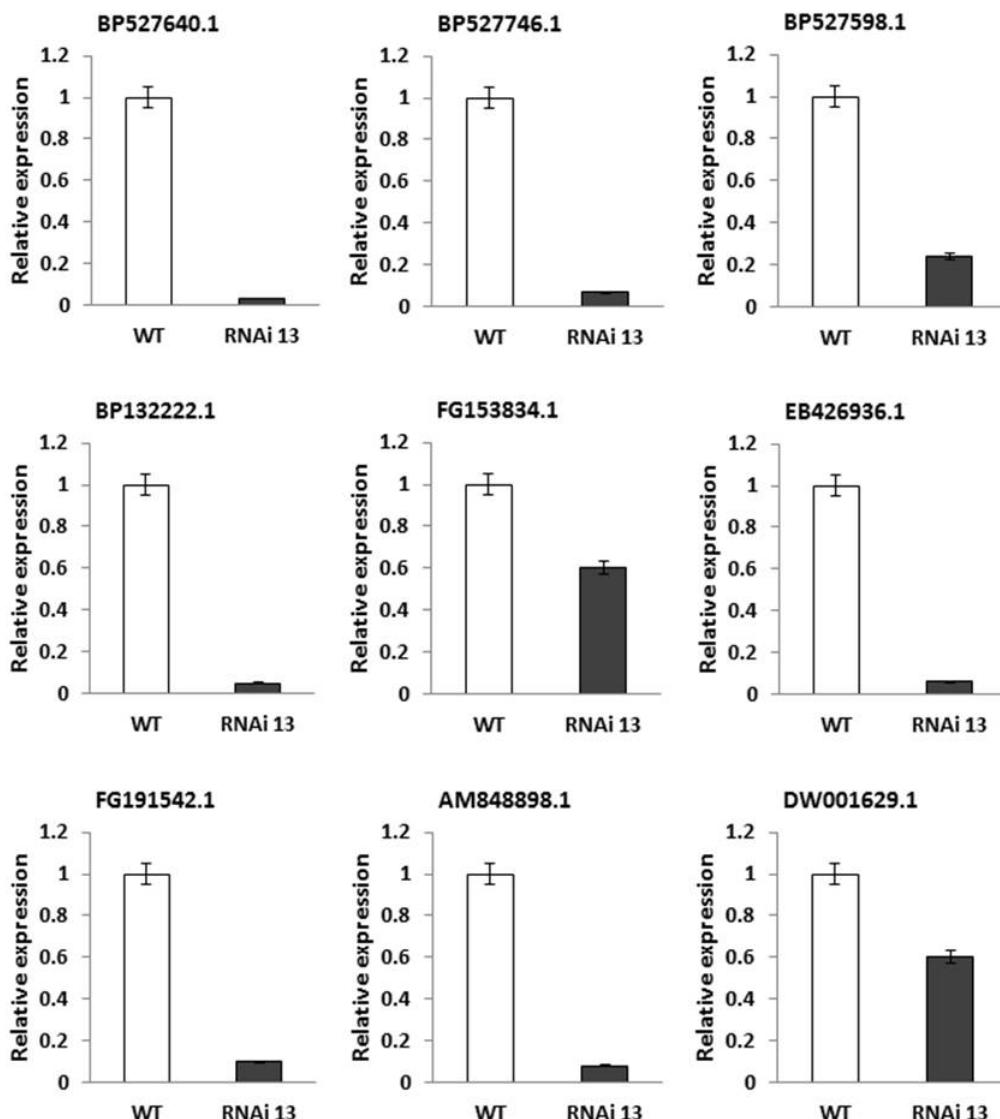
분야를 비롯한 후성유전학적 조절과 유전자의 발현 연구를 통하여 농업의 발달을 내다볼 수 있을 것이다.

## 사사

본 성과물은 농촌진흥청 차세대바이오그린21, GM작물개발사업단 연구사업(세부과제명: Gene editing 기술을 이용한 농업형질개량 유용작물개발, 세부과제번호: PJ01185201)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 적요

담배에서 후성유전관련 유전자의 발현연구를 위해 담배유



**Fig. 4** qRT-PCR analysis of expression levels of candidate genes identified by microarray analysis of *NtROS2a* RNAi transgenic line RNAi13 vs. wild type controls

래 시토신 DNA 탈메틸화 관련 *NtROS2a* 유전자를 과발현 및 RNAi 식물체를 육성하였다. 이들 형질전환체들은 고염 및 산화 스트레스하에서 내성이 증진되었으며, 다양한 표현형변이를 보였다(Lee et al. 2015). 본연구에서는 선발된 과발현(OX1), RNAi 식물체(RNAi13) 및 대조식물체(WT)를 이용하여 Agilent Tobacco 4 X 44K Oligo chip으로 microarray분석을 수행하였다. OX1과 RNAi13 계통을 이용하여 WT과 함께 비교 분석한 결과, 대부분 세포 내 이온 수송, 영양 공급 등과 같은 물질대사와 생물적 비생물적 스트레스 및 methylation과 관련되어 영향을 주는 유전자들에서 up-regulation 되었고, 물질대사관련 유전자와 세포 내 기능유전자의 역할을 담당하는 조효소, 그리고 다양한 스트레스 및 메틸레이션 관련 유전자군에서 또한 down-regulation되었다. 각각의 up-, down-regulation된 유전자들을 WT과 비교하여 qRT-PCR을 수행한

결과, KH domain-containing protein, MADS-box protein 및 Zinc phosphodiesterase ELAC protein 유전자들에서 발현이 높게 나타났으며, 반면에 pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein, histone deacetylase HDAC3 protein 및 protein kinase는 0.4 ~ 1.0-fold 발현양이 감소되었다. 따라서 DNA glycosylase를 암호화하는 *NtROS2a* 유전자는 demethylation과 관련되어 담배 식물체에서 다양한 전사레벨을 조절하는 것으로 판단된다.

## References

- Amasino R. 2010. Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* 61:1001–1013

- Bird AP. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16:6-21
- Boyko A, Kovalchuk I. 2010. Transgenerational response to stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 5:995-998
- Gao MJ, Schafer UA, Parkin IA, Hegedus DD, Lydiate DJ, Hannoufa A. 2003. A novel protein from *Brassica napus* has a putative KID domain and responds to low temperature. *Plant J* 33:1073-1086
- Choi CS, Hiroshi Sano. 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycero-phosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics* 277:589-00
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W. 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330:622-627
- Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg R, Fischer RL. 2006. DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA* polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124:495-506
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635-638
- Heo JB, Sung S. 2011. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331:76-79
- Huh JH, Bauer MJ, Hsieh TF, Fischer RL. 2008. Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell* 132:735-744
- Kim DH, Doyle MR, Sung S, Amasino RM. 2009. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:277-299
- Law JA, Jacobsen SE. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204-220
- Lee IH, Choi JS, Marjoh N, Cho YG, Kang KK, Jung YJ. 2015. Regulation of abiotic stress response through *NiROS2a*-mediated demethylation in tobacco. *Plant Breed. Biotech.* 3(2):108-118
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25:402-408
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, Martinez-Macias MI, Ariza RR, Roldan-Arjona T. 2006. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6853-6858
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093
- Sano H, Kamada I, Youssefian S, Katsumi M, Wabiko H. 1990. A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and under methylation of genomic DNA. *Molecular Genetics and Genomics* 220:441-447
- Steward N, Ito M, Yamakuchi Y, Koizumi N, Sano H. 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J. Biol. Chem.* 277: 37741-37746
- Wu SC, Zhang Y. 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:607-620
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE et al. 2006. Genome-Wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189-1201
- Zhu J, Jeong JC, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Shi H, Yun DJ, Bressan RA. 2008. Involvement of *Arabidopsis* HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:4945-4950