

Molecular Cloning and Expression of the Metallothionein Gene under Environmental Stresses in Sweet Potato

Young-Hwa Kim¹, Eun Jeong Yu² and Gyung-Hye Huh^{1,2*}

¹Ubiquitous Healthcare Research Center, College of Liberal Arts, Inje University, Gimhae 50834, Korea

²Institute of Digital Anti-Aging Healthcare, Graduate School of Inje University, Gimhae 50834, Korea

Received October 13, 2017 / Revised November 24, 2017 / Accepted November 27, 2017

The metallothionein (MT) gene (*IbMT3*) was selected from an EST library of suspension-cultured sweet potato cells. The MT gene, which is one of abundant ESTs in the library, is involved in stress regulation of cells and tissues. A full-length *IbMT3* cDNA was obtained and analysis of its nucleotide sequence revealed that *IbMT3* encoded a type 3 MT protein, based on its structural characteristics. The function of type 3 MT in plants is not yet known. Northern blot analysis showed stronger expression of *IbMT3* in suspension-cultured cells than in sweet potato plant leaves. Since cell culture is known to impose a state of oxidative stress on cells, sweet potato plants were subjected to oxidative stress to investigate the transcriptional regulation of *IbMT3*. When the herbicide methyl viologen (MV) was administered for 6, 12, and 24 hr, *IbMT3* transcription rapidly increased at 6 hr and then decreased. A cold treatment at 15°C for 24 and 48 hr resulted in a gradual increase in *IbMT3* expression. These findings indicate that *IbMT3* expression is regulated in response to environmental and oxidative stress. *IbMT3* isoform is expected to have antioxidant effects in sweet potato plants and may play an important role in cellular adaptation to oxidative stress.

Key words : Antioxidant, metallothionein, oxidative stress, sweet potato

서론

식물체는 토양에 고착생활을 하기 때문에 각종 환경 스트레스를 받았을 때, 다른 생물종처럼 안전한 곳으로 직접 이동할 수 없어 외부 스트레스에 대한 환경 적응능력이 다른 생물체보다 탁월할 것으로 간주된다. 실제로 식물은 다른 생물에 비해 많은 종류의 항산화물질을 생산한다. 식물체에서 산화적 스트레스원으로 온도, 건조, 오존, 중금속, 고농도의 염, 제초제와 같은 비 생물학적 스트레스와 병충해 등의 생물학적 스트레스가 있는데, 이러한 환경 스트레스들은 세포 내에 다양한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 유발한다[3, 20]. 식물체는 이와 같은 활성 산소종으로부터 자신을 보호하기 위하여 일련의 항산화 기구(antioxidative mechanism)를 구축하는 진화과정을 거치면서 현재까지 새로운 환경에 적응하여 왔다.

식물 현탁 배양세포는 산화 스트레스의 처리 없이 그 자체가 식물체보다 높은 산화 스트레스 상태에서 배양되고 있다고

간주되어 식물체와 함께 스트레스 연구에 아주 적합한 소재일 것으로 판단되고 있다. 뿐만 아니라 현탁 배양세포는 산화 스트레스 처리에 대한 세포반응 연구를 비롯한 세포 사멸 기작 연구, 단백질 기능분석, 세포 주기 분석 및 다양한 분야에서 사용되고 있다. 이전 연구에서, 산화 스트레스에 관여하는 유용 유전자를 발굴하기 위해 고구마 현탁 배양세포로부터 cDNA library를 제작하였다[10]. 본 연구에서는 cDNA library로부터 확보된 EST중, 배양세포에 많은 수로 존재하는 *metallothionein* (MT) 유전자를 선별하여 분석하였다.

MT는 시스테인(cysteine)이 많고 중금속과 친화력이 크며, 미생물, 곰팡이, 그리고 모든 식물과 동물에 존재하는 저분자량 단백질이다. 동물의 MT는 중금속의 해독과 Zn^{2+} 와 Cu^{+} 과 같은 금속의 항상성 유지에 관여하는 등 세포 독성을 억제하는 과정에 연관되어 있는 것으로 보고되었다[1, 2]. 뿐만 아니라, 산화 스트레스에 대해 자유 라디칼을 제거하는 항산화제로 작용함으로써 세포의 방어를 직접적으로 관여하는 것으로 알려졌다. 동물에서 먼저 MT 단백질의 기능이 규명되었으며, 식물에서도 주로 금속의 독성과 산화 스트레스에 반응하는 것으로 보고되었다[1, 11, 17]. 식물이 비생물학적 스트레스에 노출되었을 때, MT가 효율적으로 ROS를 제거할 뿐 아니라 [18], 식물의 성장 과정과 연관되어 있는 것으로 알려졌다[5, 22].

MT는 식물의 종, 조직 및 isoform 형태에 따라 다양하게 발현된다. 대표적인 모델작물인 애기장대(*Arabidopsis*)인 경우, 4가지 형태의 MT family를 가진다(*AtMT1~4*) [6]. *AtMT1*은

*Corresponding author

Tel : +82-55-320-3842, Fax : +82-55-339-3734

E-mail : igeuh@inje.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.

1a, 1b, 1c 형태로 존재하며, *AtMT1a*는 어린 식물체(seedling)에서 발현되고 Cu에 의해서 유도되지만, *AtMT1c*는 뿌리와 성숙한 잎에서 발현되며 Cu에 의해서 발현이 유도되지 않는다. *AtMT2* 유전자는 *AtMT2a*와 *AtMT2b*로 구성되는데 모두 성숙한 잎에서 나타나고, *AtMT2a*는 seedling에서 Cu에 의해 발현이 유도된다. *AtMT3* 또한 Cu에 잘 결합하는 것으로 보여 지지만, *AtMT4a, 4b*의 경우는 Zn에 더 잘 결합하는 것으로 알려졌다[5]. 위 결과로부터, 애기장대의 MT isoform은 반응하는 중금속의 종류가 다를 뿐 아니라 식물의 발달단계에도 각기 다른 기능을 할 것으로 추측되며, 유전자 발현은 조직 특이적으로 조절됨을 알 수 있다. 모델식물인 애기장대의 MT 유전자의 연구에 비해, 타 작물에서 MT 유전자의 연구는 아주 미흡한 실정이다. 보다 다양한 식물체에서 구조적 특징에 따른 유형별 MT 유전자의 발현 분석을 연구한다면, MT 단백질의 기능을 이해할 수 있을 것이다.

본 연구에서 고구마 현탁 배양세포의 EST library에 높은 빈도로 존재하는 *IbMT3* 유전자의 cDNA 전장을 분리하여 아미노산 서열 분석을 한 결과, *IbMT3* cDNA는 유형 3에 속하는 *IbMT3* 단백질을 암호화하고 있음을 알 수 있었다. 배양세포에서 강하게 발현되는 반면 식물체에서는 매우 낮은 발현을 나타내는 *IbMT3* 유전자의 발현 조절을 조사하기 위하여, 식물체에 산화 스트레스를 처리한 후 *IbMT3* 유전자의 발현 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

식물체와 세포 배양

고구마 현탁 배양세포주는 SP-47 (*Ipomoea batatas* (L) Lam. cv. White Star)를 이용하였다. 세포(1 g, fresh weight)를 50 ml MS [15] 기본 배지에 1 mg/l 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid와 30 g/l sucrose가 포함된 배지에 14일 간격으로 계대배양하여 25°C에서 100 rpm으로 암상태에서 배양하였다. 고구마 식물체(*Ipomoea batatas* cv. Yulmi (Ym))는 온실(25-28°C)에서 16시간/8시간(명/암) 주기로 배양하였다.

식물체의 스트레스 처리

과산화물을 유발시키는 제초제인 methyl viologen (MV, 50 µM solution containing 0.125% triton X-100)을 고구마 잎에 도포하여 6, 12, 24시간 동안 처리하였다. 저온 처리를 하기 위해, 고구마 식물체를 15°C에 24, 48시간 동안 노출시켰다. 스트레스 처리를 하지 않은 식물체 잎을 대조군으로 사용하였다. 상부에서 두 번째, 세 번째 잎을 취하여 액체질소에 바로 얼리고 실험 전까지 -70°C에 보관하였다.

RNA 분리

배양 15일째의 현탁 배양세포에서 RNA를 분리하였다. 고

구마 배양세포에 액체 질소를 첨가하면서 미리 얼려둔 막자사발에서 파쇄한 후, Tri reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 다당류가 많은 고구마 잎에서 RNA를 분리하기 위해서, 조직에 액체질소를 첨가하면서 파쇄한 후, 10 ml extraction buffer (250 mM Tris-Cl, pH 9.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 27 mM naphthalene disulfonic acid, 0.25 M ρ -aminosalicylic acid, 0.5 volume (V) phenol)를 넣고 vortex하여 잘 섞이도록 한다. 0.5 V의 chloroform을 첨가하고 1분간 vortex하여 잘 섞어 주고 실온에 10분 동안 두었다. 12,000× g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층을 새로운 tube에 옮기고 여기에 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)를 넣고 1분간 vortex하였다. 12,000× g, 4°C에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 새 tube에 옮겨 0.6 V의 isopropanol을 첨가한 후 잘 섞어 -20°C에서 3시간 두었다. 원심분리하여 RNA 침전물을 얻은 후 상층을 버리고 침전물을 TE buffer에 넣어 잘 녹였다. 얼음 속에 30분간 두었다가 원심분리하여 다당류를 제거하였다. 4 M LiCl를 동량으로 넣어 잘 섞은 후 4°C에서 하루동안 방치하였다. 30분간 원심분리 한 후 침전물을 TE에 녹였다. 분리된 RNA의 농도와 총량, 그리고 순도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

IbMT3 cDNA probe의 biotin 표지

IbMT3 cDNA를 주형으로 하고, biotin-14-dCTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 함유되어 있는 5X dNTPs mixture (0.4 mM biotin-14-dCTP, 10 mM dCTP, 10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP)를 이용하여 T3, T7 primer로 PCR을 수행함으로써 *IbMT3* 유전자에 biotin이 표지되도록 하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C 30초, 58°C 20초, 72°C 30초로 30 cycle을 수행한 다음 72°C에서 7분간 더 연장시켰다. PCR이 끝난 후, primer와 dNTPs를 제거하기 위해 PCR purification kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)로 정제하여 -20°C에 보관하였다.

Northern blot

배양세포와 잎에서 분리한 총 RNA 10 µg을 1.2% formaldehyde gel에 전기영동한 후, 0.5X TBE buffer를 사용하여 semi-dry 방법(Trans-Blot[®] SD DNA/RNA Blotting kit, Bio-Rad, Hercules, California, USA)으로 나일론 막에 흡착시켰다. 흡착된 막은 65°C 혼성화용액(1 mM EDTA, 7% SDS, 0.25 M sodium phosphate, pH 7.2)에서 1시간 동안 prehybridization시켰다. 100°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 biotin 표지 probe를 혼성화 용액에 넣어 65°C에서 24시간 반응시켰다. 혼성화 반응이 끝난 후, 2X SSC, 1% SDS로 상온에서 10분간 2회, 0.1X SSC, 1% SDS로 65°C에서 20분간 2회, 1X SSC로 상온에서 10분간 2회씩 세척하여 비특이적 결합을 제거하였다. 그 후 나일론 막은 biotin 표지 DNA를 이용한 화학 발광 검출법

인 Southern-Star system (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA)을 이용하여 X-ray film에 감광시켰다.

다중정렬과 계통분석

아미노산서열들은 Clustal W 프로그램을 이용하여 정렬하였다[12]. 다중정렬(multiple alignment) 결과는 MEGA 6.0 프로그램[19]을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성하였으며 bootstrap은 1,000번 수행하였다.

결과 및 고찰

고구마 현탁 배양세포 cDNA library로부터 MT cDNA 분리

대표적 뿌리작물 중의 하나인 고구마에서 스트레스 조절 유전자를 찾아내기 위해 고구마 현탁 배양세포의 cDNA library에서 1,411개 EST를 분석하였다[9]. MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences; database for genome and protein sequences) [14]를 이용한 기능적인 분류와 공용 데이터베이스 중 스트레스 관련 EST와의 비교 분석을 통해 스트레스 관련 유전자들을 추정하였다. 그 중, EST library에 높은 빈도 수로 존재하는 metallothionein (MT) 유전자를 선별하여 염기서열을 결정(GenBank accession number MG001450)하였고, *IbMT3*으로 명명하였다. *IbMT3* 유전자의 코딩 영역은 총 201 bp이며, 66개의 아미노산으로 구성되어 있다. 염기서열 중 GC%비율이 42%로 높았고, 아미노산 서열에서 시스테인 잔기는 총 11개로 16.7%를 차지하였다(Fig. 1).

***IbMT3* 유전자의 아미노산 서열 비교 분석**

일반적으로 MT는 시스테인이 많은 단백질이며, 두 개의 시스테인이 풍부한 도메인(C-rich domain)사이의 시스테인이 없는 영역(C-free spacer)으로 구성되어 있다. MT는 시스테인의 분포 정도와 C-free spacer의 특성에 따라 4가지 유형(유형 1~4)으로 구분되었다(Fig. 2A). 유형 1은 C-free spacer (약 40개의 아미노산)의 양 말단에 CXC 모티프가 각 3개씩 존재하며, 유형 2는 유형1의 N-말단 특징을 가짐과 동시에 CC 모티프가 한 개 더 존재한다. 유형 3은 4개의 시스테인을 가진 N-말단과 CXC 모티프가 3개 존재하는 C-말단을 가지며, 두 말단 사이에 30-40개의 아미노산으로 구성된 C-free spacer를 가지고 있다. 유형 4는 유형 1-3과는 구조적으로 큰 차이점을 보인다. 총 17개의 시스테인이 흩어져 분포하고 C-free spacer에는 15-40개의 아미노산으로 구성되어 있다[13]. 본 연구에서 분리한 고구마 *IbMT3*는 4개의 시스테인이 N-말단에 존재하고 6개의 시스테인이 3개의 CXC 모티프로 C-말단에 배열되어 있는 유형 3 구조에 속한다.

Chen 등은 고구마 잎(*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Tainong 57)에서 2개의 MT cDNA (*IbMT*, *IbMT2*)를 분리하였다[4]. 이

```

1 CGCGGCGGGCGGCGCTCTAGAAGTCTAGTGGATCCCCCGGGCT
41 GCAGGAATTCGGCACGAGGGTTGTGTTTGTAGGGATCGGA
81 GTAAGAGATGTCTTCCGGTTGCAAGTGTGGCTCCGACTGC
   M S S G C K C G S D C
121 AAGTGGCGGCGAGTGAAGTGTGAGAGGTTGACCCCA
   K C G S D C A C E E V T T
161 CCGTTACCATCATCGAGGGGGTTGCACCAGTGAAGTTGGC
   T V T I I E G V A P V K L A
201 CTTAGAGGGGTCTTCTGAGAGGGCTACAGAGGGAGGACAT
   L E G S S E K A T E G G H
241 GCCTGCAAGTGTGGATCAAACCTGCACCTGTGACCCCTTGCA
   A C K C G S N C T C D P C
281 ACTGTTAGGGCCAAAATAGTGCAAAATAAATAATCACCCC
   N C *
321 TTCAGCTATGTATGGATTGAGCATGTCTTATTAGGGTTTG
361 TCTAAATATATATACATATATGTGTATGTAAGTATGATAA
401 TTAATGGATGGGGCTTTTGCAGTGATGATGATGAGTGATA
441 TAATAAGCAGATTGCAGATGATGAGTTATGCAGATCTTTG
481 TTGAAGTGTCACTTAGATTTGTGCGATTCAATTTATGTTTG
521 GAATGTGTGGTTGCTTGGGTGTTTGGACTTTATCCTTAAT
561 GTATGTTGAAAGAGGGTTGACTGTACTGTATTGAACTAAAT
601 GGTATCATATTAATGTTGTGTAAAAAATAAATAAATAAATAA
641 AAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of MT gene (*IbMT3*) from *Ipomoea batatas* (GenBank accession number MG001450).

두 MT 유전자의 아미노산 서열을 *IbMT3*의 아미노산 서열과 비교한 결과, 각각 44%, 28%의 낮은 상동성을 나타내었다. *IbMT2* (clone Y459)는 유형 2와 유사한 새로운 유형이었고, *IbMT* (clone G14)는 유형 4와 유사하였다. Kim 등이 고구마 잎(*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Ym)으로부터 각각 유형 1, 2, 3으로 분류되는 *IbMT1*, *IbMT2*, *IbMT3* 유전자를 클로닝하였다[8]. 본 논문의 고구마 White star 품종에서 분리한 *IbMT3*와 같은 유형에 속하는 *IbMT3* (Ym)와는 28%의 상동성을 나타내었다. 이와 같이, 고구마 식물체도 애기장대처럼 계놈에 여러 유형의 MT 유전자가 존재하며, 각 *IbMT* isoform은 각기 다른 기능을 할 것으로 추측된다. 유형 3에 속하는 다른 식물체의 MT 아미노산 서열과 *IbMT3*을 비교하여 다중 정렬하였다. Fig. 2B에서 보는 것처럼 *Glycine max* (*GmMT3*), *Arabidopsis thaliana* (*AtMT3*), *Oryza sativa* (*OsMT3a*, *OsMT3b*)는 유형 3에 해당되는 구조적 특징을 잘 보여주고 있다. 하지만 아미노산 수준에서 상동성을 비교한 결과, *IbMT3*와는 각각 29%, 34%, 35%, 32%의 낮은 상동성을 보여주었다. 즉, 같은 유형에 속한다고 해서 높은 상동성을 나타내는 것이 아님을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 MT단백질은 아미노산 수준에서의 유사성보다 구조적 특징이 기능과 더 깊은 관련이 있을 것으로 추정된다.

*IbMT3*와 다른 식물체의 MT 단백질 간의 계통학적 분석을 한 결과는 Fig. 3에 제시된 계통수와 같다. MT 구조의 유형에 따라 계통이 나뉘어졌으며, *IbMT3*는 유형 3에 속하는 다른 식물체의 MT와 근연관계에 있음을 알 수 있다.

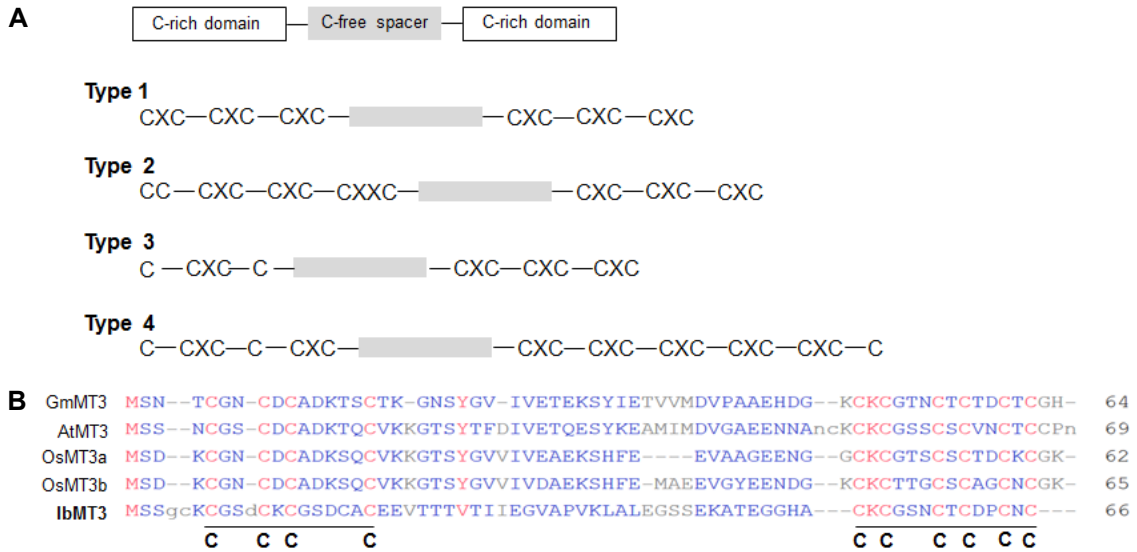


Fig. 2. (A) Structure and types of MT. (B) Amino acid sequence alignment of type 3 MT proteins in other plants. *GmMT3*, *Glycine max* (NP_001340546); *AtMT3*, *Arabidopsis thaliana* (O22433); *OsMT3a* (A2WLS0), *OsMT3b* (A3B0Y1), *Oryza sativa*. The bold C indicates cysteine, and the underline shows the cysteine pattern in the N-terminal and C-terminal. X denotes an amino acid except cysteine.

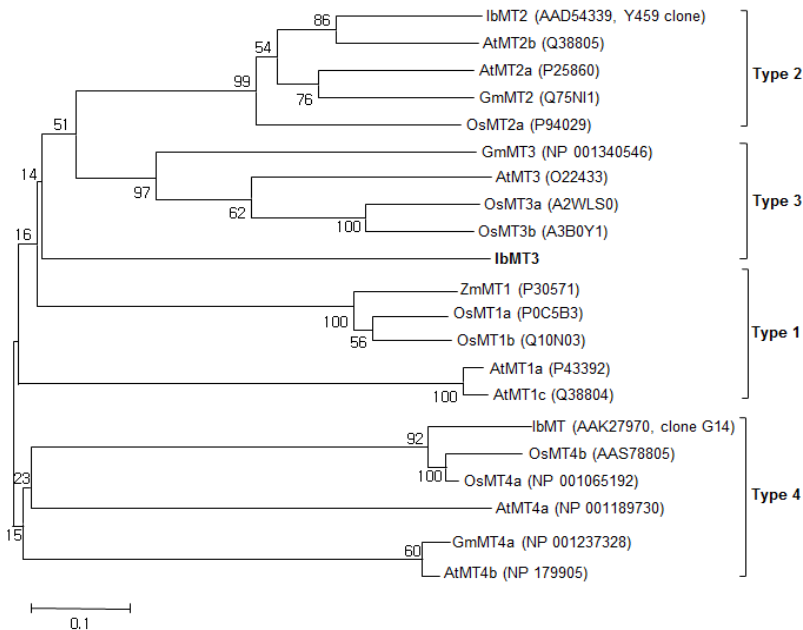


Fig. 3. Phylogenetic relationship of *Ipomoea batatas* (IbMT3) and other plant MTs from GenBank. Neighbor-joining algorithm was used to construct the phylogenetic tree. Numbers at the nodes are bootstrap values obtained from 1,000 replicates. Scale bar indicates 100 inferred nucleotide substitutions per 1,000 nucleotides. Nucleotide sequence accession numbers are shown in parentheses.

현탁 배양세포 및 산화 스트레스하의 식물체에서 IbMT3 유전자 발현

현탁 배양세포와 식물체 잎에서 *IbMT3* 유전자의 발현을 알아보기 위해, Northern blot 분석을 수행하였다(Fig. 4). 고구마 식물체보다 현탁 배양세포에서 *IbMT3* 유전자가 더 많이 발현되었다(Fig. 4A). mRNA가 분리된 대수증식기의 고구마 현탁 배양세포는 산화 스트레스를 많이 받는 상태로 보고되었다[9]. 현탁 배양세포 EST library에 다른 유전자보다 높은 빈도수로 존재하는 *IbMT3* 유전자의 분석 결과와 Northern blot

결과는 일치하였다. 따라서, *IbMT3* 유전자는 산화 스트레스 조건에서 고발현됨으로써 스트레스에 대응하여 조절하는 유전자임을 확인하였다.

이 결과를 바탕으로, 식물체에 MV 또는 저온 스트레스를 처리하여 *IbMT3* 유전자의 발현을 조사하였다(Fig. 4B). MV는 빛을 매개로 하여 광합성을 하는 식물 조직에 ROS를 축적함으로써 산화 스트레스를 초래하는 제초제이다. 이 MV를 식물체 전체에 뿌려 6, 12, 24시간 동안 처리하였다. 6시간 처리했을 때, 급격하게 많은 양이 발현되었으며, 시간이 지나면서

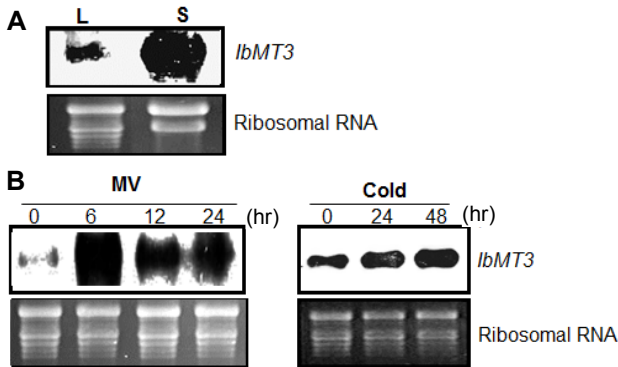


Fig. 4. (A) Expression of *IbMT3* gene in leaf (L) and suspension-cultured cells (S). (B) Expression of *IbMT3* gene under stress treatment in plant tissues of *Ipomoea batatas* cv. Yulmi. Ribosomal RNA was used as a control for equal loading.

발현양이 점차 감소하였다. 다른 식물체에서도 MV 처리에 따라 항산화효소가 발현됨을 보였는데, *Nicotiana plumbaginifolia* 에서 superoxide dismutase (SOD)가, 시금치(spinach)에서 ascorbate peroxidase의 발현이 유도되었다[20, 21]. MV 처리로 인한 스트레스에 대해 항산화효소를 세포 내에 축적시킴으로써, 세포의 방어에 관여하는 것을 알 수 있다. 고구마는 저온에 민감하게 반응하여 생장이 억제되는 작물이므로 저온 스트레스에 따른 *MT* 유전자의 발현도 조사하였다. 저온처리를 위해 고구마 식물체를 15°C에 24, 48시간 동안 노출시킨 후 고구마 잎 조직에서 *IbMT3* 유전자의 발현양상을 분석한 결과, 저온에 노출되는 시간이 길어질수록 *IbMT3* 유전자의 발현양이 점차 증가하였다. 저온 스트레스를 받은 식물에서는 ROS가 증가하고 이로 인해, 세포막의 지질, 단백질, 그리고 핵산에도 상해를 일으켜 결국에는 세포의 사멸을 초래하게 된다[16]. 그러므로, 스트레스 조건 하에서 ROS를 방어하기 위해 다양한 항산화효소계를 조절하는 것이 필수적이다.

Chen 등이 고구마 잎(*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Tainong 57)에서 분리한 *IbMT*와 *IbMT2* 유전자의 발현은 서로 다르게 나타났다. *IbMT2* 유전자는 잎에 비해 뿌리와 줄기에서 강하게 발현되었으며, 잎이 노화됨에 따라 발현양이 증가하였다. 하지만, *IbMT* 유전자는 모든 조직에서 일정하게 발현되었으며, 잎의 노화에 따라 발현차이가 거의 없었다[4]. 고구마 현탁배양 세포의 EST 중에서는 *IbMT*와 *IbMT2*와 유사한 서열을 가진 EST는 존재하지 않은 반면, *IbMT3*만 5개 존재하였다. 본 논문의 *IbMT3*와 같은 유형에 속하며 고구마 Yulmi 품종에서 분리한 *IbMT3* (Ym)의 경우, 잎에서 많이 발현되었고 배양세포(켈러스)에서는 발현되지 않았다. 또한, *IbMT3* (Ym)도 저온, MV와 같은 비생물학적 스트레스에 의해 강하게 발현이 유도되었다[8]. 고구마 품종에 따라 유전자 발현 양상이 다르게 나타났지만, 이 *MT* 유전자가 산화 스트레스에 의해 조절되는 것은 명확하다.

유형 2에 속하는 애기장대(*AtMT2a*)나 벼(*OsMT2b*)의 *MT* 유전자의 경우, 저온과 H₂O₂ 스트레스에 발현이 유도되었고, ROS 소거에 관여하는 것으로 보고된 바 있다[22, 23]. Koh 등 [11]은 *MT*가 SOD의 활성제로써 작용하며 superoxide를 제거함으로써 항산화계의 기능이 있음을 보여주었다.

식물에서 multigenic family로 존재하는 *MT* 유전자는 아미노산 서열의 구조적 특징에 따라 4개의 유형으로 구분하고 있지만, 현재까지 충분한 연구가 이루어지지 않아 이들 유형과 기능과의 상관관계를 알 수 없다. 단지, 본 연구와 현재까지의 보고를 바탕으로 multigenic family로 존재하는 *MT* 유전자는 발달 단계 및 스트레스 환경에 따라 특이적으로 발현함을 알 수 있었다. 향후 *MT* 유전자에 관한 더 많은 연구가 이루어지고 각 유형별 *MT* 유전자의 기능을 분석하여, 구조적 특징에 따른 *MT* 단백질의 기능이 규명되기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 산업통상자원부의 '창의산업융합 특성화 인재양성사업'의 지원을 받아 연구되었습니다(과제번호 N0000717).

References

- Andrews, G. K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 95-104.
- Beattie, J., H., Owen, H. L. H., Wallace, S. M., Arthur, J. R., Kwun, I. S., Hawksworth, G. M. and Wallace, H. M. 2005. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicol. Lett.* **157**, 69-78.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- Chen, H. J., Hou, W. C., Yang, C. Y., Huang, D. J., Liu, J. S. and Lin, Y. H. 2003. Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. *J. Plant Physiol.* **160**, 547-555.
- Grennan, A. K. 2011. Metallothioneins, a diverse protein family. *Plant Physiol.* **155**, 1750-1751.
- Guo, W. J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P. B. 2003. Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol.* **159**, 369-381.
- Huang, S. S., Deng, J. S., Chen, H. J., Lin, Y. H. and Huang, G. J. 2014. Antioxidant activities of two metallothionein-like proteins from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam. 'Tainong 57') storage roots and their synthesized peptides. *Bot. Stud.* **55**, 64.
- Kim, S. H., Jeong, J. C., Ahn, Y. O., Lee, H. S. and Kwak, S. S. 2014. Differential responses of three sweetpotato metal-

- lothionein genes to abiotic stress and heavy metals. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 6957-6966.
9. Kim, Y. H., Cho, E. H., Kwak, S. S., Kwon, S. K., Bae, J. M., Lee, B. R., Meen, B. I. and Huh, G. H. 2004. Alteration in intracellular and extracellular activities of antioxidant enzymes during suspension culture of sweet potato. *Phytochemistry* **65**, 2471-2476.
 10. Kim, Y. H., Hur, C. G., Shin, Y. H., Bae, J. M., Song, Y. S. and Huh, G. H. 2006. Identification and characterization of highly expressed genes in suspension-cultured cells of sweetpotato. *J. Plant Biol.* **49**, 364-370.
 11. Koh, M. and Kim, H. J. 2001. The effects of metallothionein on the activity of enzymes involved in removal of reactive oxygen species. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **22**, 362-366.
 12. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson T. J. and Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
 13. Leszczyszyn, O. I., Imam, H. T. and Blindauer, C. A. 2013. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics* **5**, 1146-1169.
 14. Mewes, H. W., Frishman, D., Güldener, U., Mannhaupt, G., Mayer, K., Mokrejs, M., Morgenstern, B., Münsterkötter, M., Rudd, S. and Weil, B. 2002. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **30**, 31-34.
 15. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
 16. Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B. and Gechev, T. S. 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front. Plant Sci.* **6**, 69.
 17. Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V. and Kizek, R. 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6044-6066.
 18. Sato, M. and Bremner, I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 325-337.
 19. Timura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
 20. Tsang, E. W., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M. and Inze, D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* **3**, 783-792.
 21. Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. 2001. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* **123**, 223-234.
 22. Yuan, J., Chen, D., Ren, Y., Zhang, X. and Zhao, J. 2008. Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, OsMT2b, downregulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice. *Plant Physiol.* **146**, 1637-1650.
 23. Zhu, W., Zhao, D. X., Miao, Q., Xue, T. T., Li, X. Z. and Zhening, C. C. 2009. Arabidopsis thaliana metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. *J. Plant Biol.* **52**, 585-592.

초록 : 고구마 metallothionein 유전자의 클로닝 및 환경 스트레스 하에서 발현 분석

김영화¹ · 유은정² · 허경혜^{1,2*}

(¹인제대학교 U-항노화헬스케어연구소 교양학부, ²인제대학교 디지털항노화헬스케어학과)

고구마 현탁배양세포의 EST library에 높은 빈도로 존재하는 *metallothionein* (MT) 유전자를 선별하였다(*IbMT3*). MT 유전자는 세포와 조직의 스트레스 조절과 연관되어 있다고 알려져 있다. 본 연구에서 *IbMT3* cDNA의 전장을 확보하여 염기서열 분석을 한 결과, *IbMT3* 유전자는 구조적으로 유형 3에 속하는 MT 단백질을 암호화하고 있었다. 식물에서 유형 3에 속하는 MT 단백질의 기능은 명확히 알려지지 않다. Northern blot 분석 결과, *IbMT3* 유전자는 고구마 식물체 잎보다 현탁배양 세포에서 매우 강하게 발현되었다. 일반적으로 세포배양은 세포에 산화 스트레스 상태를 부과하는 것으로 알려져 있다. 이에, 고구마 식물체에 산화 스트레스를 처리하여 *IbMT3* 유전자의 발현이 어떻게 조절되는지 조사하였다. 제초제인 methyl viologen (MV)을 6, 12, 24시간 동안 처리했을 때, *IbMT3* 유전자의 발현은 6시간 후에 아주 강하게 유도되었고 그 이후에는 감소함을 알 수 있었다. 저온 스트레스(15°C)를 24, 48시간 동안 처리했을 때, *IbMT3* 유전자는 처리시간이 경과함에 따라 발현이 더 많이 유도되었다. 이로써, *IbMT3* 유전자는 환경 및 산화 스트레스에 반응하여 발현이 조절되는 유전자임을 알 수 있었다. *IbMT3* isoform은 고구마 식물체 내에서 항산화제로써 작용할 가능성이 있을 뿐 아니라, 스트레스 하에서의 세포 적응 메커니즘에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.