

Smart Cycler® System을 사용한 *Lotus japonicus*의 균근 공생관련 유전자의 발현해석

동경대학 대학원 생명과학연구과 분자대사제어학분야

인산은 식물의 3대 영양소 중 하나임에도 불구하고 토양 중 함량이 낮은 경우가 많아, 인산을 포함하는 화학비료를 배지에 뿌려 더 많은 작물 수확을 꾀하고 있으나 이 방법은 하천이나 호수의 부영양화를 일으켜 환경오염의 원인으로 지목되고 있다. 또 작물의 병충해를 막기 위하여 사용된 화학농약은 다른 환경오염을 일으키고 있다. 자연계의 대부분 육상식물은 *arbuscular*균근균과 공생관계를 맺어 인산을 비롯한 무기양분을 쉽게 흡수하는 메커니즘을 가진다는 것이 알려져 있으며, 균근 공생은 식물의 병충해 저항성 건조 저항성을 향상시킨다고 한다. 따라서 균근 공생의 분자 메커니즘을 이해하는 것은 환경을 오염시키지 않고 미래형 농업을 하기 위해서 매우 중요하다.

본 연구실에서는 콩과 모델 식물인 *Lotus japonicus*와 *arbuscular*균근균(*Glomus mosseae* 또는 *Gigaspora margarita*)을 이용하여 균근 형성 분자 메커니즘을 밝히기 위해 식물 유전자의 발현 변동 검출에 Smart Cycler® System을 사용한 Real Time 정량 RT-PCR을 하였다. 1회의 mRNA 발현을 측정하기 위한 total RNA양이 Northern Blot에 비해 약 1/1000 수준으로, 소량의 식물 시료에서 추출한 RNA로 여러 가지 실험을 반복할 수 있었다. 또 Northern Blot에 비하여 실험 과정이 간단하다. 다만, 신뢰성 높은 결과를 재현성 좋게 얻기 위해서는 다수의 노하우도 필요하다. 본 고의 전반에서는 균근 형성에 따라 유도 혹은 억제되는 유전자의 Real Time RT-PCR을 사용한 발현해석 실험 예를 소개하고, 후반에서는 균근 특이적 인산 transporter 유전자의 RNAi knock down 실험에 적용한 Real Time RT-PCR의 예를 소개하고 있다.

균근 형성

식물은 육상에 진출한 4~5억년 전부터 곰팡이와 가까운 *arbuscular* 균근균과 세포 내 공생을 해 왔다. 균근균과 공생관계를 맺어 숙주식물은 토양에 부족하기 쉬운 인산을 쉽게 흡수하여 생육촉진을 꾀하고 건조 저항성, 병충해 저항성을 증진한다. 그 보답으로 숙주식물은 균근균에 광합성 산물을 공급한다. 이 상리공생은 식물이 육상에서 번영하는 요인 중 하나였다고 생각되고 있으며 실제로 현재 육상식물의 80% 이상은 *arbuscular* 균근균과의 공생능력을 가진다. 균근균과 공생관계에 있는 식물 뿌리를 균근이라 하는데 균근균은 뿌리에 침입하여 내생 균계를 늘리고, 표면적이 커진 수지상체(arbuscule)라는 기관을 피상세포에 넣는다. 이 때 수지상체는 식물 세포막 아래의 periarbuscular막에 싸여지지만 식물과 균근균과의 물질이동이 이루어진다. 한편 균근균은 외생균사를 토양 깊이까지 뻗어나가게 하여 식물의 뿌리 만으로는 도달하기 불가능한 장소에서 인산 등 무기양분을 흡수한다(그림 1). 지금까지 균근 형성의 현미경적

관찰은 이루어졌으나, 그 분자 구조는 아직까지 밝혀지지 않았다. 이는 *arbuscular*균근균이 절대 공생균으로, 살아있는 식물의 뿌리가 없으면 생육을 할 수 없다는 어려움이 있기 때문이다.



Lotus japonicus

- 공생미생물 : 균근균, 근입균
- Genome size : 472 Mbp
- 생육형태 : 자연성
- 세대기간 : 2~3개월

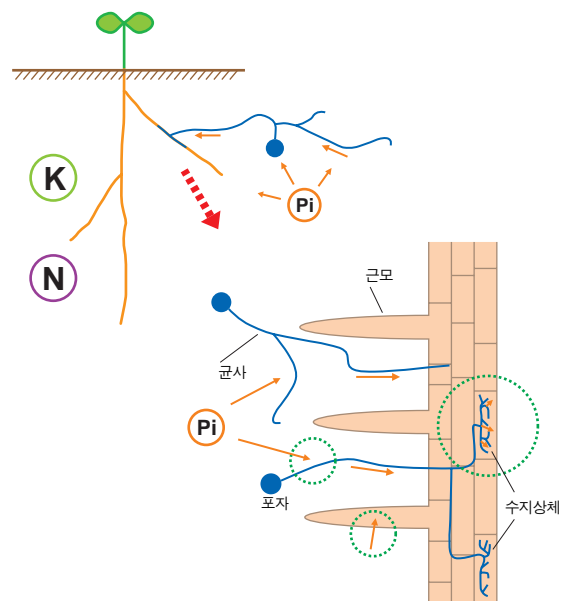


그림 1 콩과 모델 식물 *Lotus japonicus*의 특징과 균근 형성

균근 공생에 따른 유전자 발현 해석

저자는 nylon membrane에 약 18,000개의 중복되지 않는 cDNA를 spot한 대규모 macroarray를 사용하여 대조군에 비하여 균근에서 발현이 변하는 *Lotus japonicus* 유전자를 조사하였다. 그 결과 *Lotus japonicus*에 cysteine protease 약 20 isoform 중 Cyp1~Cyp4라는 4분자종의 유전자가 공생 성립과 함께 가장 현저하게 유도되는 것이 알 수 있었다(표 1). 해당 mRNA는 수지상체를 포함하는 세포에 국부적으로 존재하고 있다는 것을 *in situ* hybridization으로 확인하였다(2005). 공생이 활발하게 일어나는 시기에 균근균의 수지상체는 반감기 10일 전후로 생성과 분해를 반복하고 있으며, cysteine protease는 분해에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다. 또 균근균이 뿌리에 감염하는 초기과정에는 phenylalanine ammonia-lyase(PAL) 유전자가 유도되지만 감염이 진행됨에 따라 역으로 현저하게 억제된다는 것이 판명되었다. *Lotus japonicus*는 PAL이 적어도 12개 isoform으로 발현하여 균근 공생에 따라 여러 가지 영향을 미친다(표 1).

표 1 *Lotus japonicus*의 cysteine protease 유전자 패밀리와 PAL 유전자 패밀리

Isoform	초기반응	균근공생시	균근공생시
	<i>Gigaspora</i> /control	<i>Glomus</i> /control	<i>Gigaspora</i> /control
Cyp1	0.53	10.48	4.04
Cyp2	1.16	4.97	3.58
Cyp3	0.86	3.98	3.42
Cyp4	0.67	19.57	13.73
Cyp5	1.14	1.16	0.81
Cyp6	1.30	0.66	0.49
PAL1	2.16	0.26	0.37
PAL2	2.13	0.30	0.33
PAL3	2.09	0.24	0.35
PAL4	1.51	0.16	0.35
PAL5	1.71	0.15	0.34
PAL6	1.25	0.13	0.35
PAL7	1.54	0.77	0.33
PAL8	1.52	0.56	0.47
PAL9	0.94	0.25	0.40
PAL10	1.33	0.95	0.46
PAL11	0.97	0.94	0.78
PAL12	1.18	1.20	1.21

각 숫자는 대조군과의 발현량의 비교. 다른 발현 변화가 있는 색깔로 나누었다.

Smart Cycler® 를 사용한 Real Time 정량 RT-PCR

다음으로 Real Time RT-PCR로 array 실험 데이터를 검증하였다. *G. mosseae*로 균근 또는 대조군에서 추출한 total RNA에서 oligo(dT)primer를 사용하여 합성한 cDNA(1 반응당 total RNA 5ng에 해당)를 주형으로 하여 각 유전자 특이적 primer pair, TaKaRa Ex Taq® R-PCR Version1.0, 30,000배 희석한 SYBR® Green I (TaKaRa Code 50512/50513)으로 PCR(94°C 30초, 95°C 10초, X°C 10초, 72°C 20초, 35 cycle)하였다(그림 2 A). 또한 primer와 증폭 유전자마다 예비 실험을 통하여 annealing 온도에 최적 온도(53~68°C)를 사용하였다. 반응 종료 후 증폭산물을 60°C에서 95°C까지 서서히 가열하여 double strand DNA를

해리시키는 용해곡선을 그려 동일 유전자의 증폭산물은 용해온도가 한 점에 모이는 것을 확인하고(그림 2 B), double strand가 된 반응산물은 1.5% agarose gel 전기영동으로 primer dimer가 생기지 않는 사이즈 (100~300 bp)의 단일단편이 증폭됨을 확인 하였다(그림 2 C). mRNA 정량을 위하여 RT-PCR에 특이적 primer pair를 사용하여 일반적인 PCR로 목적서열을 증폭하여 그 농도를 측정하였다. 10~10⁶배 희석된 증폭산물을 주형으로 Real Time PCR로 각각의 증폭유전자 단편에 해당하는 검량선을 작성하고, Real Time RT-PCR로 얻어진 수치를 검량선과 비교하여 증폭 단편과 full length cDNA와의 길이의 비, double strand와 single strand와의 차이를 고려하여 단위량 total RNA당 mRNA량을 산출하였다.

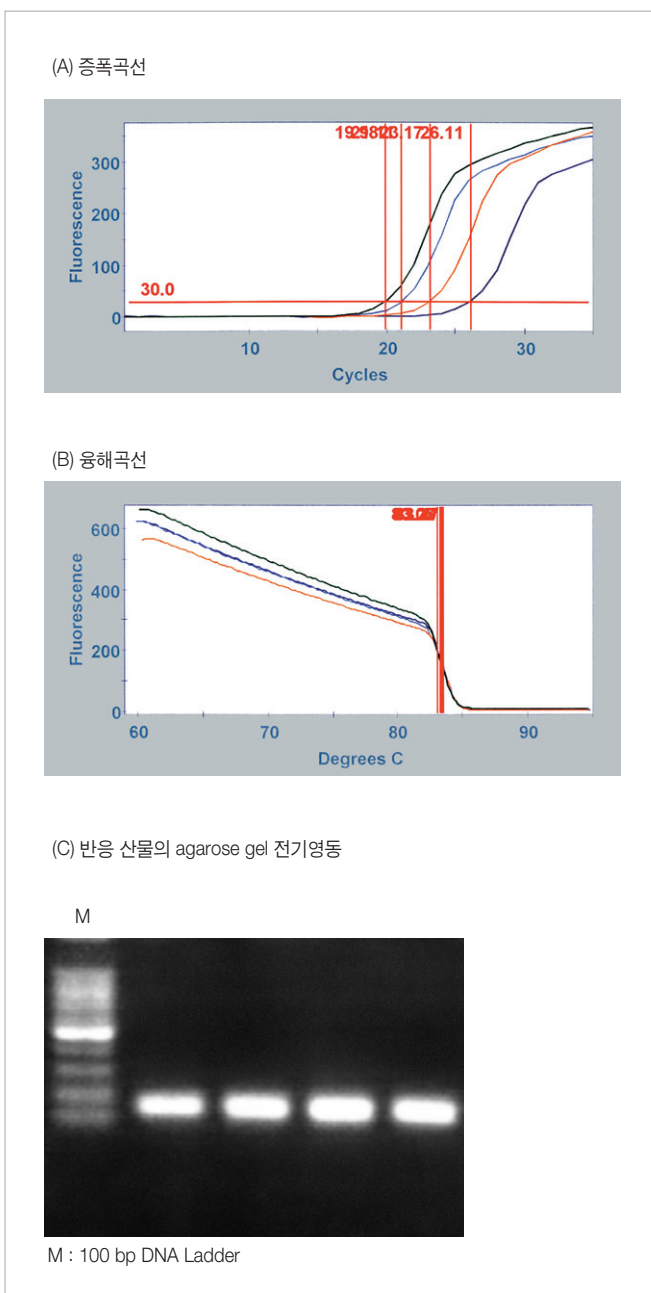


그림 2 Real Time 정량 RT-PCR 실험 예

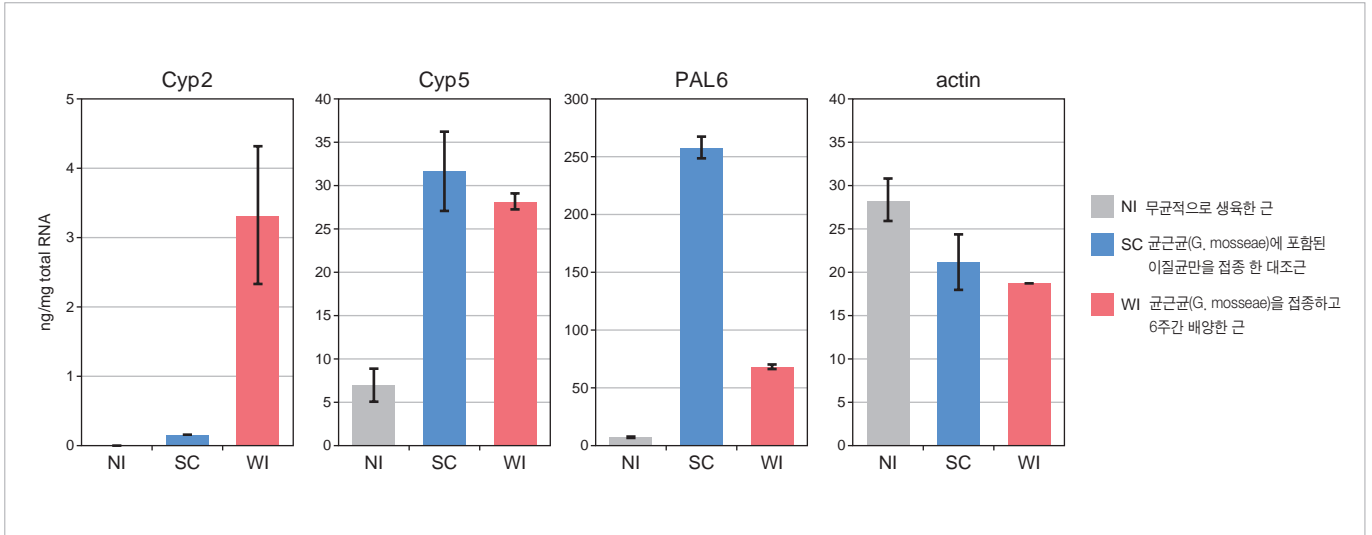


그림 3 Real Time 정량 RT-PCR에 의한 유전자 발현 검증 예

그림 3과 같이 Real Time 정량 RT-PCR의 결과는 대체적으로 macroarray의 결과를 재현하고 있으며 데이터의 신뢰성 또한 매우 높았다. 식물에서 PAL은 일차대사와 이차대사를 연결하는 중요한 효소로, 항균물질인 phytoalexin과 세포벽을 견고하게 하는 리그닌을 합성하는 경로에 영향을 미치는 효소로, 병의 원인균에 대한 response mediator salicylic acid의 합성경로에도 관여한다. 현재 표 1는 PAL1의 promoter 2 kb를 β -glucuronidase(GUS) reporter 유전자가 있는 *Lotus japonicus*에 도입하여 균근 형성에 따른 PAL의 발현 변화를 관찰하고자 하였다.

*Lotus japonicus*에서의 균근 특이적 인산 transporter 유전자의 cDNA 클로닝

균근의 periarbuscular막에 발현하는 인산 transporter를 코딩하는 식물 유전자는 감자, *Medicago truncatula*, 벼에서 동일한 것으로 알려져 왔다.

저자는 독자적으로 *Lotus japonicus* 균근에서 혼합 primer를 사용한 PCR로 *LjPT4*, *LjPT8*, *LjPT16*로 명명된 3종류의 인산 transporter cDNA를 분리하였다. 이는 모두 12회 막 관통형 전형적인 식물 세포막 국제성 transporter를 코딩하였다. 이들의 발현을 Real Time 정량 RT-PCR법으로 해석한 결과 그림 4에 나타난 바와 같이 *LjPT4*만이 *Lotus japonicus* 균근 특이적 인산 transporter 유전자라는 것이 밝혀졌고, *LjPT8*과 *LjPT16*은 균근이 형성됨에 따라 불필요해지기 때문인지 오히려 발현이 저하되었다(그림 4). *LjPT4*는 위에 기술한 대규모 cDNA array membrane에는 spot되어 있지 않아 균근균이 없을 때 발현수준이 낮음을 시사한다. 또한 *LjPT4*는 같은 콩과에 속하는 *Medicago truncatula*의 특이적 transporter와는 전혀 다른 아미노산 서열을 가지고 있어 분자 진화학적으로도 흥미롭다. 그 후 *in situ* hybridization으로 *LjPT4* mRNA는 수치상체를 포함하는 피상세포에만 발현한다는 것을 밝히고 고친화성 인산 transporter 결손 효모에 발현시켜 인산 수송 활성을 증명하였다.

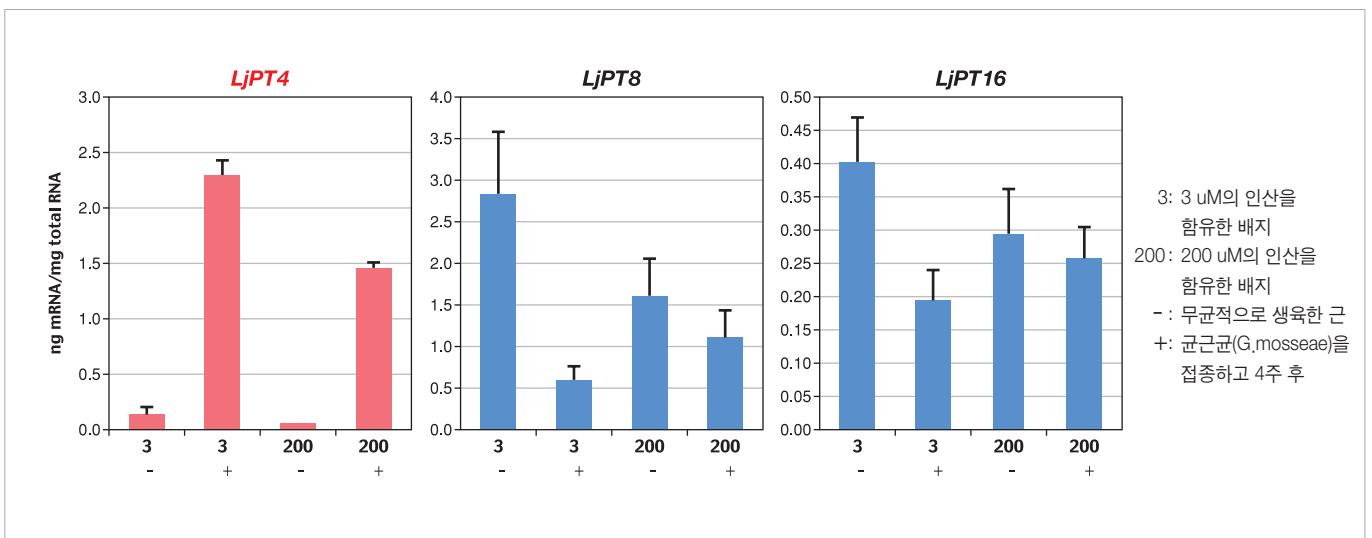


그림 4 *Lotus japonicus*균에서 3 개의 인산 transporter 유전자의 발현 각 농도의 인산 존재 하에서 키운 뿌리에서 RNA를 추출하여 Real Time 정량 RT-PCR으로 각 분자종의 mRNA를 정량하였다.

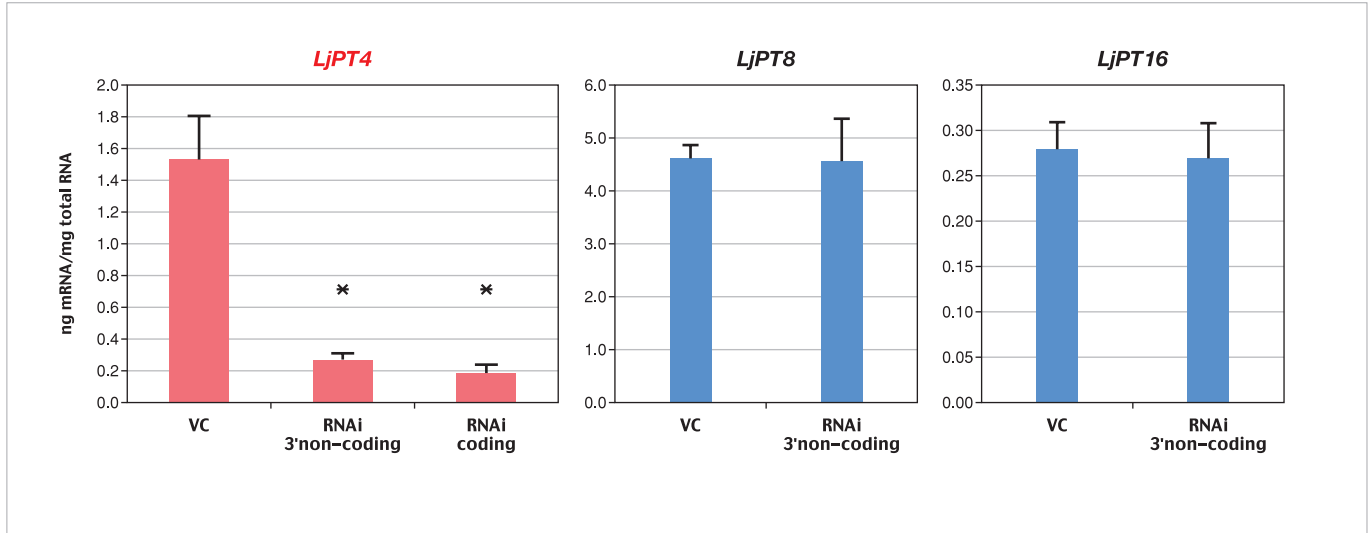


그림 5 Real Time 정량 RT-PCR에 의한 *LjPT4* knock down의 확인
 균근(*G. mosseae*) 접종 4주 후의 뿌리에서 각 유전자별 mRNA 발현량을 나타내었다.

* : VC에 비하여 $p < 0.001$ 로 유의성 있음

LjPT4 knock down 형질 전환체 제작

*LjPT4*의 생리적 역할을 밝히기 위해 모상근 형질 전환으로 RNAi construct를 *Lotus japonicus*에 도입하였다. 또한 *Lotus japonicus*는 실험의 재현성을 확인하기 위해 3'-non translation region(268 bp)과 translation region에서 *LjPT4*에 특이 영역(148 bp)으로 생각되는 부위에서 double strand RNA를 형성시키도록 설계하였다. 그림 5에 *LjPT4* knock down 형질 전환체 뿌리에서 인산 transporter mRNA 수준을 나타낸다. Vector만을 도입한 대조군(VC)에 비해 3'-non translation region, translation region 내 어느 것을 사용하더라도, knock down 형질 전환체의 *LjPT4* mRNA 수준은 20% 이하로 저하되었다. 한편 그 밖의 인산 transporter mRNA 수준은 변화를 나타내지 않았다(그림 5). 현재 이렇게 하여 작성한 *LjPT4* knock down 형질 전환체의 해석을 진행하고 있다.

[참고문헌]

- 1) Kouchi, H., Shimomura, K., Hata, S. et al.: Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. (2004) *DNA Res.*, **11**, 263-274.
- 2) Karandashov, V. and Bucher, M.: Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. (2005) *Trends Plant Sci.*, **10**, 22-29.

Smart Cycler® /Smart Cycler® II System을 사용한 연구논문을
 Life Science & Biotechnology 36호 12 페이지에 소개하였습니다.