

Megasort[®]를 사용한 식물 소포체 stress response 유전자 탐색

교토(京都)대학대학원

다양한 생물의 genome 프로젝트가 진행됨에 따라 유전자 발현을 위한 종합적인 해석 기술도 급속한 진전을 이루고 있다. 특히 oligonucleotide array 또는 cDNA array를 사용한 해석이 주류를 이루고 있지만, 일반화된 microarray는 일부 생물에만 국한된 array가 많다. 또한 genome에 대한 정보가 적은 생물의 유전자와 발현량이 낮은 유전자의 경우, 해석된 자료의 신뢰도에도 문제가 있다. 이에 비해 Megasort[®] 해석은 시료 간 발현량에 차이가 있는 mRNA 유래의 cDNA cloning과 염기서열 해석을 동시에 하기 때문에 유전자 정보가 적은 생물의 포괄적 유전자 발현해석에 매우 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

본 고에서는 Megasort[®]로 아기장대(*arabidopsis thaliana*)의 소포체 stress response 후보 유전자를 추출하여 spot한 custom array를 제작하고, 이를 이용한 결과에 대해 소개하고자 한다.

서론

소포체 stress란 유전자 변이, 전이 후 변형이상, subunit 회합부전 등이 원인이 되어 unfold 상태의 단백질이 소포체에 축적하는 것을 말한다. 소포체 stress로 다양한 유전자의 발현이 유도되며, 단백질 folding, 단백질 분해, 소포체 운송, 지질대사, apoptosis 등 다양한 생리기능과 관련된 유전자의 전사가 활성화된다. 진핵생물에서는 소포체 stress response가 보편적인 생체 기능이고, yeast 및 mammalian response 유전자와 response 기구에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 식물의 소포체 stress response는 최근 연구가 시작되었으나 아직까지 밝혀지지 않은 부분이 많은 분야이다.

Megasort[®]로 소포체 stress response 후보 유전자 추출

【재료】

N형 당쇄 부가를 억제하는 tunicamycin을 처리하여 인위적으로 소포체 stress를 유도하고, 발현되는 소포체 stress response 유전자를 확인하였다. 액체 배지(0.5× Murashige&Skoog)에서 2 주일동안 배양한 아기장대 (*arabidopsis thaliana*)를 tunicamycin 첨가 또는 첨가하지 않은 배지에서 6 시간 배양하고, 소포체 stress response 유전자를 동정하였다.

【세포에서 mRNA 추출과 정제】

아기장대에서 total RNA를 추출하고 *Oligotex[™]-dT30(Super)* mRNA

purification Kit을 사용하여, mRNA를 정제하였다.

【Megaclone[®] microbeads 제작】

Tunicamycin 처리 및 미처리 식물에서 유래한 mRNA로 double strand cDNA를 합성하고 *DpnII**로 cDNA를 단편화한 후, Tag vector에 cloning 하였다. cDNA 말단에 결합한 Tag와 beads의 anti-Tag와의 hybridization 후, Cap을 합성하고, ligation하여 Megaclone[®] microbeads를 제작하였다. Library의 평균 DNA 길이는 약 230 bp였다.

* : 이 방법에서는 *DpnII* 인식서열을 갖지 않는 유전자는 library에서 제외되기 때문에, 현재는 초음파처리로 Uni-Length를 개량한 Megaclone[®] microbeads를 제작하고 있다.

【형광 표식 probe 제작】

Megaclone[®] microbeads 제작에 사용한 mRNA와 동일한 mRNA로 형광 표식 probe를 제작하였다. Tunicamycin 처리 probe는 Cy[™]5, control probe는 fluorescein으로 표식하였다.

【Megasort[®]】

Tunicamycin 처리 및 미처리 시료에서 제작한 Megaclone[®] microbeads 각 400,000개 혼합한 후, Cy[™]5 표식 probe와 fluorescein 표식 probe를 사용하여 competitive hybridization을 하였다. Hybridization 후의 Megaclone[®] microbeads를 Cell sorter(MoFlo[™], DakoCytomation사)로 해석하였다.

【Cloning · sequence】

Megasort[®] 결과에서 tunicamycin을 처리하여 발현이 유도된 유전자 beads가 분류된 gate(U1, U2)와 발현이 억제된 유전자 beads가 분류된 gate(D)를 설정한 후(그림 1), 각각의 gate로 나눈 beads 상의 유전자 단편을 PCR로 증폭하고 염기서열을 결정하였다. 염기서열 자료는 paracel filtering package로 filtering하고 vector trimming 후, paracel clustering package로 clustering하여 contig(cluster)를 작성하였다. Cluster에 포함되지 않은 서열은 singlet으로 처리하였다. Cluster와 singlet의 염기서열은 The Arabidopsis Information Resource 상의 BLAST homology search로 유전자를 동정하였다.

【결과】

Megasort[®]의 U1, U2, D gate로 1473, 1703, 3550개의 beads를 선별하였고, 각각의 염기서열을 결정한 후, U1과 U2 beads에서 cluster 유전자 215개, singlet 유전자 412개, D beads에서는 cluster 유전자 17개, singlet 유전자 34개가 동정되었다.

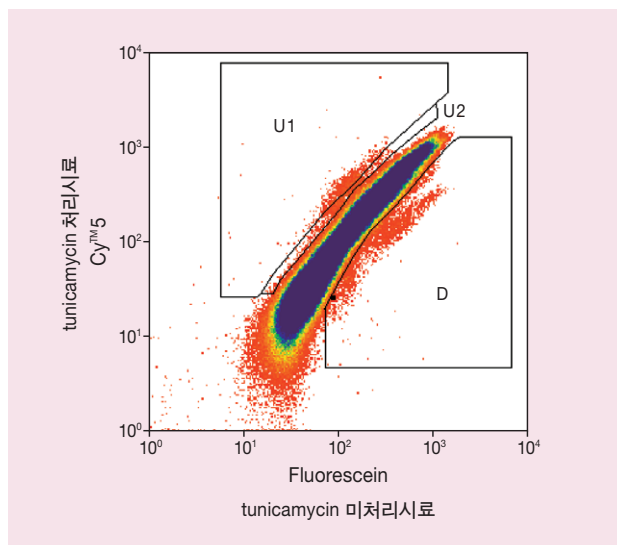


그림 1 아기장대의 tunicamycin 처리 시료 및 미처리 시료의 Megasort[®] 해석

표 1 아기장대의 소포체 stress response 유전자

AGI Gene	Description	발현유도된 유전자				
		Fluid Microarray (Number of Beads)		Fuctional DNA Microarray (Fold Variations)		
		U1	U2	Tm [*]	DTT [*]	AZC [*]
PROTEIN FOLDING						
At5g28540	BiP	302	91	3.81	4.06	36.22
At5g42420	BiP	140	26	4.12	4.09	53.67
At1g09080	BiP-like	0	2	38.24	38.35	508.73
At5g61790	calnexin 1	82	12	3.42	2.63	25.26
At5g07340	calnexin 2	0	7	2.37	2.34	10.48
At1g56340	calreticulin 1	0	22	2.16	2.07	1.94
At1g09210	calreticulin 2	16	44	2.43	2.02	1.51
At4g24190	AtHsp90-7	34	3	3.86	2.65	6.88
At2g47470	Similar to protein disulfide isomerase	5	54	2.11	2.28	3.53
At1g77510	Similar to protein disulfide isomerase	30	2	3.82	2.68	11.98
At2g32920	Similar to protein disulfide isomerase	2	0	2.46	2.5	10.3
At1g04980	Similar to protein disulfide isomerase	1	1	3.22	3	10.46
At5g58710	AtCYP20-1 (cyclophilin ROC7)	0	3	1.43	1.34	2.13
GLYCOSYLATION/MODIFOCATION						
At2g02810	UDP-glucose/UDP-galactose transporter	2	3	3.53	2.08	21.95
At2g41490	UDP-GlcNac:dolichol phosphate N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase	0	2	1.55	1.53	6.67
TRANSLOCATION						
At5g50460	SEC61 gamma subunit	2	22	1.94	1.66	5.54
At1g29310	Similar to SEC61 alpha subunit	0	4	1.5	1.61	11.89
At2g34250	Similar to SEC61 alpha subunit	0	2	1.27	1.38	2.11
At1g27330	Similar to SERP1/RAMP4	203	120	2.42	1.82	13.48
At1g27350	Similar to SERP1/RAMP4	0	13	2.05	1.72	10.61
At3g51980	Similar to ER chaperone SIL 1	2	34	2.39	3	52.88
PROTEIN DEGRADATION						
At1g65040	Similar to HRD1	7	11	3.36	2.33	6.48
At4g21810	Similar to DER1	0	7	1.67	1.59	4.23
At1g18260	Similar to HRD3/SEL-1,çk	0	3	1.54	1.54	9.16
TRANSLATION						
At5g03160	P58 ^{PK}	2	14	2.06	1.76	10.76
VESICLE TRAFFICKING						
At3g07680	Similar to Emp24p	0	4	1.47	1.29	2.73
At4g21730	Similar to NEM sensitive fusion protein	0	3	7.52	9.68	688.38
ANTI-APOPTOSIS						
At5g47120	Bax inhibitor 1	0	2	2.3	1.73	86.7
UNCLASSIFIED						
At2g25110	Similar to Stromal cell-derived factor 2-like protein	0	3	2.14	2.08	9.17
At5g09410	Similar to anther ethylene-upregulated calmodulin-binding protein ER1	1	1	1.2	1.2	3.59
UNKNOWN						
At5g18090		2	3	1.2	1.25	14.31
At1g56580		5	70	1.95	1.98	9.66
At5g64510		8	3	12.74	5.87	181.56
At5g14890		1	7	3.6	5.6	46.17
At3g22235		0	4	1.51	2.49	1.28
At1g29060		0	3	1.79	1.78	33.69
발현억제된 유전자						
AGI Gene	Description	Fluid Microarray (Number of Beads)		Fuctional DNA Microarray (Fold Variations)		
		D		Tm [*]	DTT [*]	AZC [*]
At5g24770	vegetative storage protein Vsp2	182		0.2	0.78	0.38
At5g24780	vegetative storage protein Vsp1	12		0.19	0.79	0.12

* Values were means of six experiments

Spot된 custom array로 소포체 stress response 후보 유전자 선택

Megasort[®] 해석으로 cloning한 유전자 중에서 cluster 유전자에서 spot된 custom array를 제작하고 소포체 stress response 유전자를 선택하였다. Tunicamycin, DTT(단백질 disulfide 결합 형성 억제) 또는 L-azetidine-2-carboxylic acid(AZC : proline analogue)를 처리하여 소포체 stress를 유도한 아가장대 유래의 mRNA로 역전사반응하고 target DNA를 Cy[™]5-dUTP로 형광표식하였다. 마찬가지로 약제가 처리되지 않은 control target DNA는 Cy[™]3-dUTP로 표식한 후, competitive hybridization하고 Affymetrix[®] 428[™] array scanner(Affymetrix사)로 해석하고, ImaGene[®] Ver.4.2(BioDiscovery사)를 사용하여 분석하였다.

Tunicamycin을 처리한 target DNA를 사용하여 spot된 array를 해석한 결과, Megasort[®]로 동정된 발현유도 cluster 유전자 215개 중, 63개 clone은 발현이 유도되었고 DTT 처리에서는 46개, AZC 처리에서는 83개 유전자의 발현이 유도되는 것을 확인하였다. Megasort[®] 해석과 세 종류의 array 해석에서 발현이 유도되는 유전자는 36개였다. 발현이 억제된 cluster 유전자 17개 중 2개가 모두 array해석에서 억제 signal을 나타내고 있다(표 1). 발현이 유도된 유전자에는 단백질 folding과 관련된 분자 chaperone, 당쇄 부가·변형효소, 소포체 polypeptide사슬의 전좌(translocation) 관련 단백질, 단백질 분해, 소포체 운송 등 yeast와 mammalian에서 소포체 stress response 유전자인 것으로 밝혀진 유전자가 포함되어 있었다. 그리고 지금까지 어느 생물에서도 보고 된 바 없는 anti-apoptosis 유전자 bax inhibitor-1과 식물에만 존재하는 6개 유전자의 발현이 유도됨을 밝혔다.

Real Time RT-PCR로 소포체 stress response 유전자 확인

Megasort[®] 해석과 array 해석을 조합하여 발현이 유도된 유전자를 검증하기 위해 6개의 유전자에 대해 real time RT-PCR로 mRNA를 정량한 결과를 그림 2에 나타내었다. 이 분석에서 모든 소포체 stress 조건에서 유전자의 발현량이 검토한 전체 mRNA의 증가됨을 확인하였다.

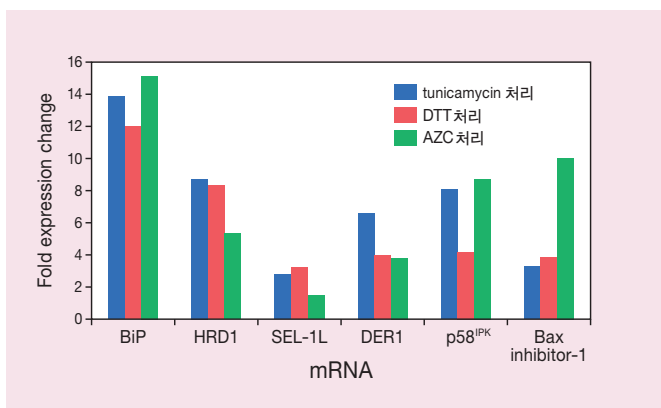


그림 2 Real Time RT-PCR로 소포체 stress response 유전자로 발현량의 상대정량 미처리 시료에서 각 유전자 발현량을 기준으로 소포체 stress 처리 시료에서의 발현등급을 산출하였다.

결론

본 연구에서는 Megasort[®]로 cloning한 유전자 단편을 사용하여 array를 제작·해석한 후 신뢰도가 높은 소포체 stress response 유전자를 제작하였다. 본 해석에서는 전체 발현이 유도된 유전자를 목록에 올리기 위해 시료 간에서 발현량에 차이가 없는 유전자가 분포하는 대각선에 가까운 gate U2와, 보다 발현량 차이가 큰 유전자가 분포하는 gate U1을 설정하였다. 이 중 U2로 회수된 cDNA clone의 38%가 spot된 array에서 양성이었다. 다시 말해 U2로 선별한 시료간 발현량에 차이가 없는 유전자 clone이 높은 빈도로 혼합된 것으로 추정된다. 반면 U1으로 회수된 cDNA clone은 89%가 array 해석에서도 양성이었다. 이와 같은 결과는 Megasort[®] 실험 시 대각선에서의 거리가 다른 복수 gate를 설정하는 것의 중요성을 시사하고 있다. 다시 말해 대각선에 가까운 gate 설정은 보다 완전한 후보 유전자를 선별하고자 할 때 목록에 필요하지만, 여기에서 회수된 유전자는 다른 발현 확인법으로 검증이 필요하다. Megasort[®] clone으로 제작하여 spot된 custom array는 probe의 길이가 길기 때문에 signal 강도가 높고 발현량의 차가 작은 것까지 검출할 수 것으로 확인되어 본 검증 목적에 적합하다. 반면 대각선에서의 거리가 먼 gate일수록 시료 간에 발현량에 차이가 있는 유전자일 확률이 높아진다. 따라서 gate를 복수 설정함으로써 신뢰도가 높은 자료와 낮은 자료의 분류가 가능하다.

이와 함께 Megasort[®]에서는 전사량이 많은 유전자일수록 회수되는 beads가 많아진다. 다시 말해 전사량이 많은 유전자의 경우, 시료간 발현량 차이가 상당히 커도 검출 beads수가 높아지기 때문에 자료를 신뢰할 수 있다는 장점이 있다. 이것은 spot된 array 해석에서는 신뢰성이 의심되는 낮은 발현유도도 확실하게 검출할 가능성을 의미한다.

또한 본 방법으로 얻은 cloning 유전자 단편과 그 염기서열 정보에서는 데이터베이스 상의 homology search로 annotation 할 수 있고, 목적 유전자의 array 제작과 5' RACE법으로 cloning을 위한 primer 설계가 가능하다. 따라서 Megasort[®]는 genome 정보가 아직까지 밝혀지지 않은 생물 종에 적용하였을 경우, 매우 효과적이다.

[참고문헌]

- 1) Brenner, S. et al.: In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads : Physical separation of differentially expressed cDNAs.(2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1665-1670
- 2) Kamauchi, S. et al.: Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in arabidopsis thaliana.(2005) *FEBS J.*, **272**, 3461-3476.