

쌀 Glutelin 유전자군의 구조 및 발현조절

황 영 수
(농촌진흥청 농업기술연구소 유전공학과)

Structure of the Rice Glutelin Multigene Family and Its Expression

Hwang, Young-Soo
(Agrobiotech. Div., Agri. Sci., Inst. R.D.A.)

Abstract

Plants store a significant amount of their nitrogen, sulfur and carbon reserves as storage proteins in seed tissues. The major proteins present in rice seeds are the glutelins. Glutelins are initially synthesized at 4-6 days postanthesis and deposited into protein bodies via Golgi apparatus. Based on nucleic acid sequences and Southern blot analysis, the three isolated glutelin genomic clones were representative members of three gene subfamilies each containing 5 to 8 copies. A comparison of DNA sequences displayed by relevant regions of these genomic clones showed that two subfamilies, represented by clones, Gt1 and Gt2, were closely related and probably evolved by more recent gene duplication events. The 5' flanking and coding sequences of Gt1 and Gt2 displayed at least 87% homology. In contrast, Gt3 showed little or no homology in the 5' flanking sequences upstream of the putative CAAT boxes and exhibited significant divergence in all other portions of the gene. Conserved sequences in the 5' flanking regions of these genes were identified and discussed in light of their potential regulatory role. The derived primary sequences of all three glutelin genomic clones showed significant homology to the legume 11S storage proteins indicating a common gene origin. A comparison of the derived glutelin primary sequences showed that mutations were clustered in three peptide regions. One peptide region corresponded to the highly L-lysine rich hypervariable region of legume 11S storage proteins, a potential target area for protein modification. Expression studies indicated that glutelin mRNA transcripts are differentially

accumulated during endosperm development. Promoters of Gt2 and Gt3 were functional as they direct transient expression of chloramphenicol acetyltransferase in cultured plant cell.

서 론

인류가 연간 소비하는 단백질은 약 1억 ton으로 추정되고 있고 이 중 70%는 식물체로부터 얻고 있다(Tanaka 1983). 동물 단백질이 질적인 면에서는 식물 단백질 보다 우수하나 식물로부터의 동물 단백질 전환 효율이 낮아 가까운 장내에 동물질 단백질 생산량을 획기적으로 높일 방법을 기대하기는 어려운 실정이다. 식물 단백질 원으로 대두 등 두류가 주종을 이루나(Derbyshire 1976) 쌀, 밀, 옥수수등 곡류에 있는 종실 단백질도 중요한 단백질 원으로 인정되고 있다(Okita 1982, 1985). 쌀은 우리나라의 주식 작물로 탄수화물의 공급원으로서만 인식되고 있으나, 쌀에도 적지 않은 양의 단백질이 존재하고 있어 단백질원으로서의 가치도 간과 할 수 없다. 비록 쌀의 단백질 함량이 대략 9%로 소맥의 12%에 비해 함량은 낮으나 질에 있어서는 어느 곡실류의 단백질 보다 우수한 것으로 알려져 있다. 이러한 이유 때문에 우수한 단백질을 얻기 위한 수단으로 단백질 함량 증가 및 필수아미노산 개선에 육종적인 방법이나 식물 생리학적 측면에서 많은 연구가 수행되어 왔다(Tanaka 1983). 그러나 현재까지 40여년간의 노력에도 불구하고 수량감소 없이 단백질 함량이나 질을 개선시키는 극적인 방법이 제시되지 못하고 있다(Ann. Rep. IRRI 1968). 식물체 종자는 많은양의 질소, 유황 및 탄소를 저장조직에 단백질 형태로 보존하고 있으며 이들 성분은 종자가 발아할때 필요로 하는 양분으로 이용되어 진다. 종자 단백질(seed protein)은 용해되는 방식에 따라 수용성 albumin, 희석염에 용해되는 globulin, 알콜 용해성 prolamine, 약 alkali 용해성 glutelin 등 4가지로 구분된다(Osborne 1924). 이들중 albumin을 제외 나머지 3종의 단백질을 특히 종실 단백질(storage

protein)로 구분하여 부르며 이들은 종자 발아시에 양분원으로 이용되는 단백질이다. 다른 곡실류(옥수수, 밀 보리등)는 prolamine이 주종의 단백질이나 쌀의 경우는 glutelin이 전 단백질 함량의 80%를 차지하는 대표적 종실 단백질이고 prolamine은 5% 미만으로 존재한다(Kim 1988). 본고에서는 이들 쌀 종실 단백질 중에 특히 glutelin에 대해 중점적으로 논의하고자 한다.

본 론

1. 쌀 glutelin 생합성

쌀 glutelin은 수도 생육기간 후기 즉 개화후(post-anthesis) 4-6일경 부터 탄수화물이 종자내에 집적을 시작하고난뒤 비로소 생합성 되기 시작한다 (Yamagata 1982, Luthe 1983). 일단 ribosome에서 생합성된 glutelin은 단백질체(protein body)로 직접되는데 그 동안 집적되기까지 경로가 분명치 않았으나 최근야 Krishnan 등에 의해 밝혀지기 시작 했다(그림1-5). 정제된 glutelin과 prolamin의 항체를 이용하여 전자현미경으로 관찰한 결과는 glutelin은 ribosome에서 생성되어 일단 Golgi체에 결합된 후 다시 불규칙 모양의 단백질체(protein body)로 집적하는 것이 알려졌다. 이와는 대조적으로 prolamine은 Golgi체를 이용하지 않고 바로 큰 구형(large spherical) 단백질체 에 집적하는 것으로 보여진다. glutelin 단백질의 구조 특성을 이해하기 위한 SDS-PAGE 전기영동 결과를 보면 glutelin은 51kD, 34-37kD 및 21-22kD 등 3개의 band로 구분되어지는데 51kD는 glutelin precursor이며 34-37kD는 α subunit로 그리고 21-22kD는 β subunit로 알려졌다(Krishnan 1986, Wen 1986). 쌀 glutelin

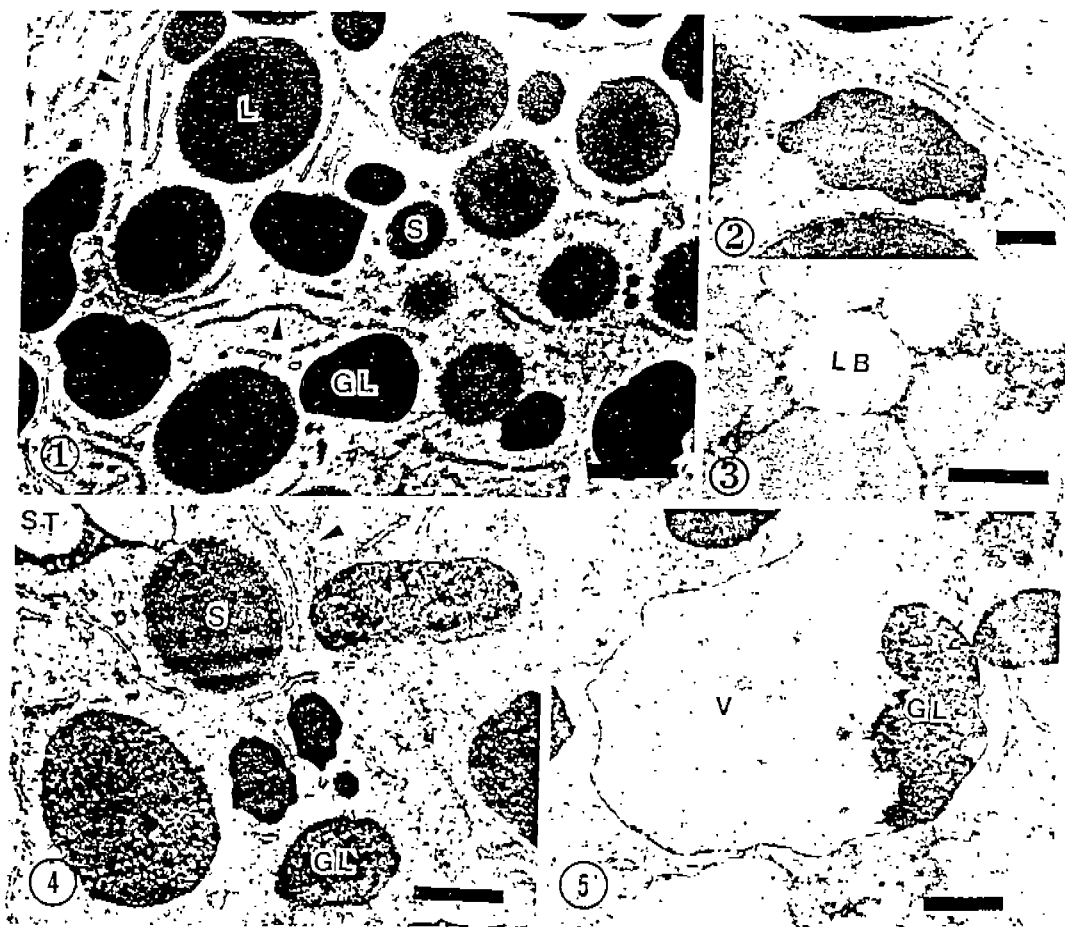


Fig. 1. Low-magnification view of 14-DAF rice endosperm showing the presence of three types of protein bodies. Extensive rough ER was routinely observed (arrows). *L*, large spherical protein body; *S*, small spherical protein body; *GL*, irregularly-shaped protein body. Bar=1 μ m; x14,000.

Fig. 2. Crenulate body in rice endosperm cell. Note lack of a distinct membrane. Bar=0.5 μ m; x22,000.

Fig. 3. Densely packed lipid bodies (*L:B*) present in the aleurone layers of rice endosperm. Bar=0.5 μ m; x28,000.

Fig. 4. Micrograph showing the specificity of the glutelin antibody employed in this study. Protein-A gold particles specifically bind to the irregularly-shaped protein bodies but not the spherical protein bodies in rice endosperm. Note the presence of crenulate bodies. The arrows point to rough ER. Bar=1 μ m; x15,000.

Fig. 5. Subaleurone layer of rice endosperm showing gold-labeled glutelin protein deposited in the vacuoles. Bar=1 μ m; x13,000.

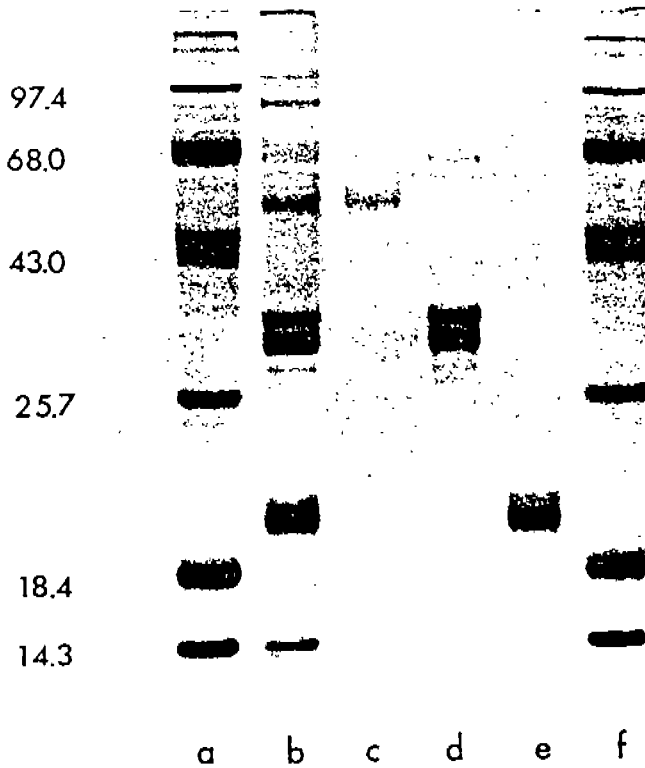


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of rice glutelins. Lanes a and f are mol wt markers. Lane b is a crude glutelin fraction. Lane c, d and e are 51 kD, 34-36 kD, and 21-22 kD, respectively (Krishnan and Okita, 1986).

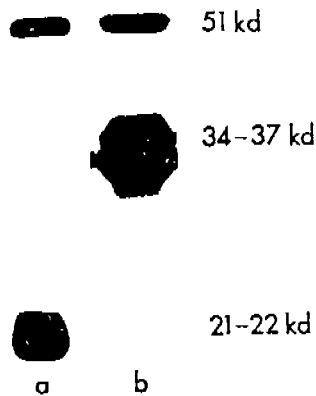


Fig. 7. Western blot showing the specificity of the α - and β -glutelin subunit antibodies. The nitrocellulose paper was incubated with antisera raised against either the purified α subunits (lane b) or β subunits polypeptides (lane a) (Krishnan and Okita, 1986).

polypeptide의 구조를 밝히기 위해 glutelin precursor 및 2개의 subunit로 각각 항체를 만들어 시험한 결과 (그림 7) α 및 β subunit는 각각의 subunit뿐만 아니라 precursor와도 강하게 결합하였고, 또 precursor의 항체는 α 및 β subunit와도 결합되어 이들 α , β subunit가 glutelin precursor로 부터 유래됨을 확인하였다(Krishnan 1986). 한편 precursor로 부터 α 및 1 β subunit가 분리되는 과정은 후번역(posttranslation) 과정에 의해 2개의 subunit로 단백질 분해과정이 일어나며 이들 2개의 subunit는 cysteine의 disulfide bond로 결합되어 진다. 흥미있는 것은 glutelin β subunit는 귀리 globulin이나 두과 11S protein과 amino산 구성이 매우 유사하며 공통 amino산 sequence도 가지고 있는 것으로 알려졌다(Higuchi 1987).

2. Glutelin 유전자 선발

1) cDNA clone 선발

쌀 glutelin 유전자는 다른 유전자와 달리 단백질 생성이 종자에서만 일어나므로 유전자 발현은 조직 특이성을 가지고 있다. 한편 식물 분자 생물학 연구에서 종자단백질이 저장조직에 특이적으로 발현되는데 착안하여 각 작물에서 많은 연구가 이루어져 왔다. 그러나 쌀은 다른 작물에 비해 매우 늦게 연구에 착수 되었지만, 기존 연구를 바탕으로 비교적 연구가 잘 진척이 되고 있다. glutelin cDNA는 Takaiwa 등이 (그림 8) 수정후 4-10일 경의 종자에서 얻은 mRNA로 부터 cDNA를 합성하여 cloning 하였으며 cDNA 염기서열을 2개의 type I과 II로 구분 할 수 있다고 발표하였다(Takaiwa 1987, Wang 1987). 그러나 필자등의 연구에서는 2개 group 이외에도 또 다른 cDNA 염기서열이 존재함을 확인하였다(그림 11).

2) Genomic clone 선발

필자들은 glutelin 유전자의 cDNA를 분리하기 위해 수정후 20-25일 경의 수도 종자 25g으로 부터 mRNA를 분리하여 AMV reverse transcriptase 및 DNA polymerase I등을 이용 하여 cDNA를 만든 후 λ gt11에 삽입 cDNA library를 작성 하였다. 이 library 로 부터 glutelin acidic subunit로 만든 항체를 이용 glutelin cDNA clone pG22를 얻었다. 이 pG22 clone은 Takaiwa등이 발표한 2개 type과는 달리 또하나의 cDNA type인 것이 확인되었다. 수도 엽초에서 뽑은 DNA를 EcoR I이나 BamH I으로 절단하여 genomic library를 만든 후 앞서 제작된 cDNA probe를 이용하여 3종의 glutelin genomic clone(Gt1, Gt2, Gt3)을 얻었으며 Southern blot 방법으로 확인한 결과 Gt1과 Gt2의 제한 효소 부위는 Sp I, Stu I, 및 Sph I 등은 공통적으로 보유하고 있어 비교적 유사 유사하였으나 Gt3는 Gt1 및 Gt2와는 구별

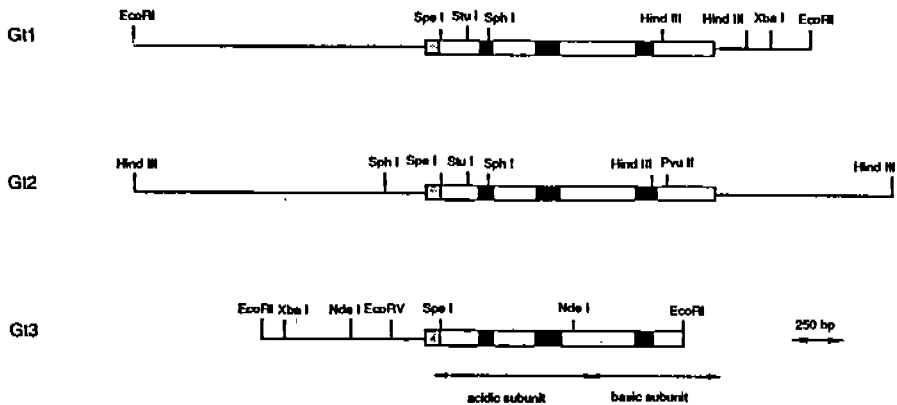


Fig. 9. Physical maps of restriction endonuclease sites in subclones of glutelin genes. A 4.2 kb Eco RI fragment from a λ genomic clone containing Gt1 and a 2.7 kb genomic DNA Eco RI fragment containing Gt3 were subcloned into the Bluescript M13-vector. The rectangular boxes indicate the approximate position of the coding sequences. Dotted boxes indicate the signal peptide sequences while shaded boxes depict the three introns observed in these genes.

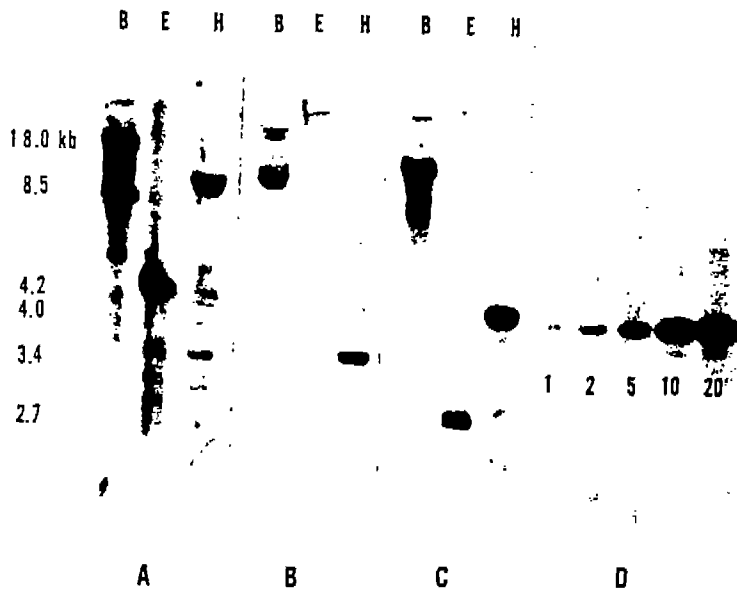


Fig. 10. Reconstruction Southern blot analysis of glutelin genes. About 5 μ g of rice DNA was digested with either BamH I (B), Eco RI (E), or Hind III (H). The gel was hybridized to 32 P-labeled 4.2 kb Eco RI fragment of Gt1 (panel A), 3.4 kb Hind III fragment of Gt2 (panel B), or 2.7 kb Eco RI fragment of Gt3 (panel C). Panel D depicts the copy number standards of representing 1, 2, 5, 10 and 20 gene copies per haploid genome.

되었다(그림 9). 이들 3개의 genomic DNA를 probe로 하여 얻은 Southern blot를 보면 (그림 10) 유전자에 따라 band의 위치가 각각 달랐으며 Gt1은 4.2kb, Gt2는 3.4kb 그리고 Gt3는 2.7kb에서 band가 확인 되었다. 이러한 결과를 토대로 하여 이들 3개 유전자는 그 구조가 약간씩 상이한 glutelin 유전자군(mutigene family)임이 밝혀졌다. band 농도는 세 유전자 모두 비슷하였으며 각 유전자의 gene copy number는 표준 gene copy number 농도와 비교한 결과 5-8개로 추정 되어졌다. 이들 결과로 미루어 보아 쌀에는 적어도 3조 이상의 glutelin 유전자군으로 구성되어 있을 것으로 판단 되어진다.

3. 쌀 glutelin 유전자 구조

1) Glutelin 유전자의 DNA 염기서열 분석

Glutelin cDNA 및 genomic DNA 염기서열은 Sanger 방법인 dideoxy chain termination법으로 분석하여 그림 11에 나타 내었다. glutelin genomic DNA 크기는 전사개시점(translational initiation site)로 부터 위쪽으로 대략 -900bbp에서 시작하여 단백질 coding 부분 및 polyadenylation signal 및 poly α 부위까지 약 2920bp 크기였으며 genomic clone중 Gt3는 carboxyl 말단 부위 및 3' flanking 부분이 잘려진 상태로 선발되었으나 cDNA pG22와는 98%의 동질성(homology)를 보이는 것으로 보아 같은 유전자임을 보여 주었고 이들 유전자 들은 각 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있었다. glutelin의 intron은 다른 유전자와 달리 크기가 비교적 짧아 84-95bp로 이것은 다른 식물유전자들의 intron이 짧은 것과는 일치하였다. 각

Fig. 11. The DNA sequences of glutelin genomic clones Gt1, Gt2, and Gt3 and a cDNA clones, pG22. The complete 5'- and 3'-flanking and coding sequences are shown for Gt1 and Gt2, whereas Gt3 is missing a portion of the coding sequence and accompanying 3'-flanking region. Numbering is based on the translational initiation codon for Gt1 which is *shaded*. Nucleotide replacements are depicted, whereas as *asterik* denotes conservation. Gaps have been introduced to achieve the best alignment of the glutelin genes and its cDNA. The transcriptional initiation site is indicated by an *arrow* beginning with nucleotide -39. Conserved sequences around the putative TATA and CAAT boxes are *shaded*. The *bold single-headed arrows* represent repeat units that are shared in the 5'-flanking sequences of Gt1 and Gt2. *Small double-headed arrows* depict the RY repeat elements present in the promoter regions of all three genes. *Small single-headed arrows* indicate the small border repeats evident in the DNA insertions in the Gt2 promoter region. The three introns and their respective borders are labeled below the DNA sequences. The termination codon is located at nucleotide 1798. Consensus polyadenylation signal sequences are indicated with *overhead lines*. The polyadenylation addition sites for Gt1 and Gt2 are indicated with *arrow heads*. GT-rich regions immediately downstream of the polyadenylation sites are shown with *wavy lines*.

Table 1. Divergence of glutelin genes of *O. sativa*. Assignments of the relevant regions of the glutelin genes and nucleotide positions are from Fig. 4. Gaps, irrespective of length, were considered as a single substitution. As Gt3 was missing the 3' end of the gene, exon 4 and the 5' untranslated regions of pG22, a Gt3 class cDNA, were compared to Gt1 and Gt2

Structural Region	Nucleotide Positions	# of gaps	Gt1 vs Gt2		# of gaps	Gt1 vs Gt3		# of gaps	Gt2 vs Gt3	
			matches	(% divergence)		matches	(% divergence)		matches	(% divergence)
5' Flanking	-900 to -651	7	201/228	(11%)	-	No Homology	-	5	78/125	(38%)
5' Flanking	-650 to -400	5	216/251	(14%)	-	No Homology	-	3	90/125	(28%)
5' Flanking	-267 to -399	3	26/41	(37%)	-	No Homology	-	1	276/331	(17%)
5' Flanking	-266 to -126	3	127/140	(9%)	2	79/141	(44%)	5	78/125	(38%)
5' Flanking	-125 to -1	0	109/124	(12%)	3	98/125	(23%)	3	90/125	(28%)
Exon 1	1 to 331	0	319/331	(4%)	1	276/331	(17%)	1	276/331	(17%)
Intron 1	332 to 420	0	78/89	(12%)	2	65/89	(18%)	2	65/89	(16%)
Exon 2	421 to 698	0	259/275	(6%)	0	224/275	(19%)	2	227/275	(17%)
Intron 2	699 to 812	3	84/105	(20%)	5	62/114	(46%)	3	66/114	(42%)
Exon 3	813 to 1298	0	451/480	(6%)	2	376/483	(22%)	2	373/483	(23%)
Intron 3	1299 to 1383	3	75/84	(11%)	4	49/85	(42%)	4	47/85	(45%)
Exon 4	1384 to 1797	0	391/411	(5%)	2	341/414	(18%)	2	342/414	(17%)
3' Untranslated	1798 to 1860	2	58/63	(8%)	0	17/63	(73%)	2	18/63	(71%)

유전자 들의 동질성 (표 1)을 비교해보면 Gt1 유전자와 Gt2 유전자는 매우 유사성이 높았으나 -267 -399bp에서는 Gt1에 없는 sequence가 있어 동질성이 낮았으나 특히 이 두 유전자의 단백질 coding 부위는 95% 이상의 균일성을 보여 주었고 Gt1 유전자와 Gt3 유전자는 5'flanking 및 intron 부위와 3' flanking 부위에서는 상당한 변이를 보여 주었으나 5' flanking중 -1 -180bp까지는 상당한 homology를 보여 주었고 단백질 coding 부분도 부위에 따라 86-89%의 동질성을 보여주었다.

2) 5' 및 3' flanking 유전자 발현조절

유전자 발현 조절 부위로 알려진 5' flanking 부위에서는 3종의 유전자 모두 translational initiation codon 부근에서는 아주 높은 동질성을 보여주나 distal 부위에서는 동질성이 없었다. S1 nuclease mapping 연구(그림 12)에서 -39bp에 가장

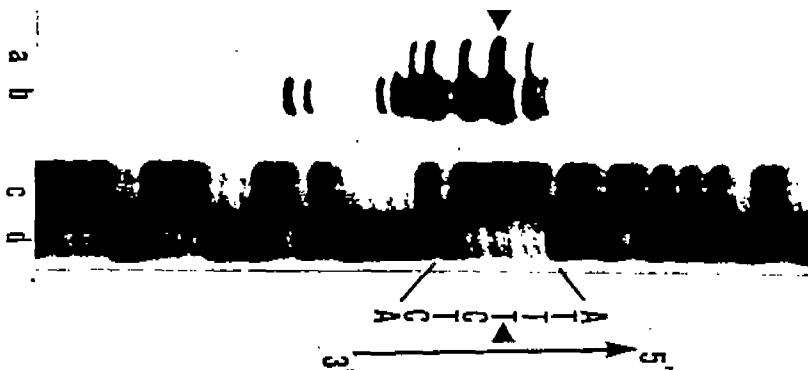


Fig. 12. Mung bean nuclease analysis of the glutelin transcriptional initiation site. Lanes a and b depict the mobility of the mung bean nuclease resistant fragments, lane b containing 3 times as much sample as lane a. Lane c and d contain products of the ^{32}P -labeled Eco RI-Spe I fragment which have been subjected to the purine and pyrimidine reactions of Maxam and Gilbert. The arrow head indicates the predominant sized fragment protected by nuclease treatment. The nucleotide sequence around the transcriptional initiation site is depicted on the right.

강한 band를 보여주어 이곳이 transcriptional initiation site로 밝혀졌으며 몇개의 약한 band가 존재하는 것으로 보아 glutelin 유전자는 multiple transcriptional initiation site로 되어 있는 것으로 생각되었다. RNA polymerase 결합에 관계하는 TATA box는 transcriptional initiation site로 부터 -28bp 위쪽에서 발견되었으며 유사 CAAT box는 존재하였으나 다른 종실 단백질 유전자에서 볼 수 있는 바와 같이 쌀에서도 CAAT box의 존재는 확인 되지 않았다. Gt1 유전자와 Gt2 유전자간의 5' flanking 부위에서의 근본적인 차이는 Gt2 유전자에 Gt1 유전자에는 없는 DNA 염기서열이 삽입된 때문인데 이 삽입 염기 양단에 inverted sequence가 있어 이것은 아마도 transposable element에 의한 DNA 삽입 흔적으로 여겨졌다. 잠재 전자 조절 염기서열(potential transcriptional regulatory sequences)은 다른 작물(옥수수, 보리 및 밀) 등과 비교했을때 SV40 enhancer core 역할을 하는 것으로 추정되는 '-300bp element'의 consensus sequence [TG(T/A/C)AAA(G/A)(G/T)]도 각 유전자에 존재하는 것이 밝혀졌다(표 2). 뿐만아니라 '-300bp element' 부근에 존재하는 RY sequence repeat도 볼수 있었다. 이 RY repeat sequence는 종자 단백질에서만 특징적으로 존재하는 것이 알려졌으나 그 기능은 아직 밝혀진바 없다. 3' flanking

Table 2. Conserved repetitive sequence elements in the 5' flanking region of the Gt genes

Gt1/Gt2	-695	TGCAAAGT
Gt1	-674	TGACATAATGCAAAAATAAGA
Gt	-674	CGACATAATGCAAAAAGAAGA
Gt1/Gt2	-645	TGACATAG
Gt1	-482	AGCAAAT
Gt2	-482	AGCAAAG
Gt1	-486	TGTCATATTGCAAAAAG
Gt2	-486	TGTCATGTTGCGAAAAG
Gt2	-293	AGCAAAAG
Gt1	-253	TGTCATATTGCAAAAAGAG
Gt2	-253	TGTCATATTGCAAAAAGAG
Gt3	-249	TGAAAAT

부위에서는 다중 polyadenylation signal 부위가 Gt1 및 Gt2 유전자에서 확인 되었다. 그리고 poly(A) 부가부위 바로 다음에 전사종결 신호 (transcription termination signal)로 추정되는 G/T cluster도 확인 되었다. 특기 할 것은 glutelin 유전자 군에서는 polyademylation signal이 중첩해서 3-5 copy가 연속적으로 존재하고 있다.

3) Glutelin polypeptide의 1차 구조 추정

DNA sequence를 이용하여 Gt 유전자들의 amino산 서열을 Wisconsin 전산 program으로 추정한 후 그림 13에 표시하였다. glutelin 유전자는 24개의 signal peptide를 가지고 있는 것이 von Heijne 법칙으로 밝혀졌고 acidic subunit와 basic subunit 절단 부위는 basic subunit의 amino산 염기서열 등과 비교 검토한바(Zhao 1983) 308번(Asn)과 309번(Gly) 사이로 밝혀졌다. 두과의 11S globulin과는 30-35% 정도의 homology를 보여주었고 특히 β subunit와는 homology가 매우 높아 두

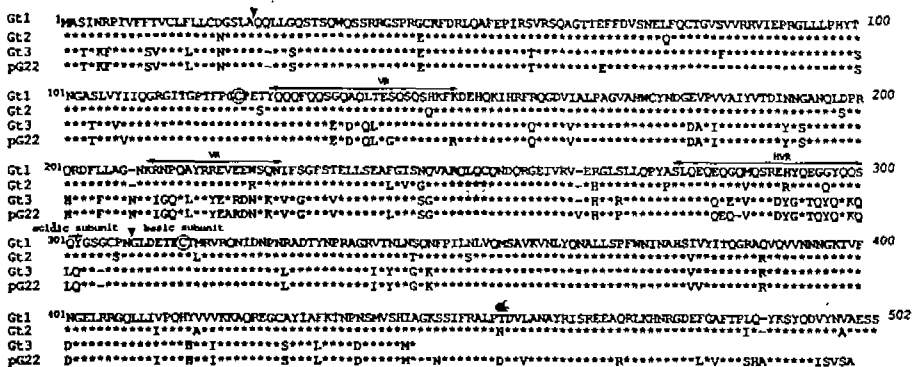


Fig. 13. Derived primary sequences of the polypeptides encoded by Gt1, Gt2, Gt3 and pG22. The two arrow heads indicate the proteolytic cleavage site for the signal peptide (between residues 24 and 25) and post-translational cleavage sites (between residues 308 and 309) which results in the formation of acidic and basic subunits. The hybervariable (HVR) and variable (VR) regions, segments prone to mutation among the legume 11S storage protein genes, are indicated with overhead lines. The two cysteine residues responsible for interchain-linkage are circled.

단백질의 용해성과는 달리 polypeptide의 homology를 보이는 것은 흥미 있는 사실이었다. 특히 globulin과의 homology 비교에서 수도 glutelin과는 그 아미노산 서열이 매우 다른 variable region이 2 부분, 그리고 hypervariable region인 부분이 1개소에 분포하는데 이 부분은 아미노산 개조의 돌연변이 유발 부위로 이용 가능성이 큰 부분일 것으로 판단 되었다.

4. Glutelin 유전자의 발현

1) 종자 발달중의 유전자 발현

Glutelin 유전자는 종자에서만 특이적으로 발현되는 유전자이다. 이 유전자의 기능을 파악하려면 종자내 mRNA 생성을 추구하여야 할 것이다. 수정후 시간이 경과함에 따라 glutelin 유전자의 mRNA 발현 정도를 보기위해 그림 14에서 보인바와 같이 종자 발달 시기별로 총 RNA를 분리하여 Gt1 및 Gt3 DNA를 probe로 하여 Northern blotting을 했을때 2개 유전자 모두 수정후 5일 경부터 mRNA가 생성됨을 보여주었다.

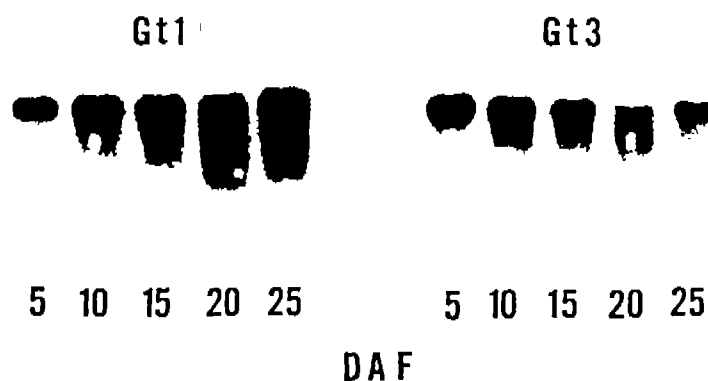


Fig. 14. Temporal accumulation patterns of Gt1 and Gt3 mRNA transcripts during seed development. Poly(A⁺)-RNA samples were obtained from developing rice seeds at 5, 10, 15, 20 and 25 days post-anthesis.

Gt1 유전자의 경우 성숙후기까지 생성량이 계속 증가 하였 으나 Gt3 유전자는 5-10일 사이에서 mRNA 생성량이 최대에 도달후 점차 감소되어 두 유전자는 발현양상이 서로 상이함을 알 수 있었다. 즉 Gt3 유전자가 Gt1 보다 먼저 활발히 발현된 후 Gt1이나 Gt2 유전자가 발현됨을 알 수 있다. 그림에는 표시하지 않았으나 Gt2 유전자도 Gt1 유전자와 같이 그 발현 정도가 매우 유사하였다. 성숙 종자내에서의 glutelin mRNA 생성량은 Gt1 group과 Gt3 group으로 대별할 수가 있고 Gt1과 Gt2 glutelin 유전자는 기능면으로는 유사하였다.

2) Glutelin 유전자의 일시 발현 연구(transient expression)

유전자 발현은 coding sequence뿐만 아니라 이 coding sequence를 조절하는 기능을 가진 5' flanking 및 3' flanking 부위의 역할이 크게 주목을 받고있다. 이들 기능을 확인하려면, 이들 부위가 변환된 유전자를 삽입하여 그 기능을 검토하여야 하는데 식물의 경우 또 glutelin과 같이 생육후기에야 검정이 가능한 것은 검토기간이 매우 길어 promotor 기능 여부를 찾는 데 어려움이 많다. 이를 극복하기 위해 promotor에 외래 reporter 유전자를 융합해서 알고져하는 promoter가 외래 reporter 유전자를 발현하게 하여 그 기능을 신속히 판정하는 일과성 발현(transient expression) 방법이 개발 되었다. 본고에서도 Cloning된 glutelin 유전자가 발현 가능한 유전자인지 여부를 조사하기 위해 5' flanking 조절 부위 및 signal 펩타이드만 있는 단편과 조절 부위 및 단백질 coding 부위를 포함한 유전자 단편에 chloramphenicol acetyltransferase(CAT) reporter 유전자를 융합하여 담배 원형질체에 electroporation 법으로 유전자를 삽입 하였다. 2개의 유전자는 CAT 유전자에다 Gt3 유전자의 5'flanking 부위 및 단백질 합성부위의 1332bp와 72bp를 각각 융합하여 CAT 유전자 활성도를 측정하는 과정으로 glutelin promotor 기능을 조사하였다. NT-1 담배

Glutelin - CAT Fusions

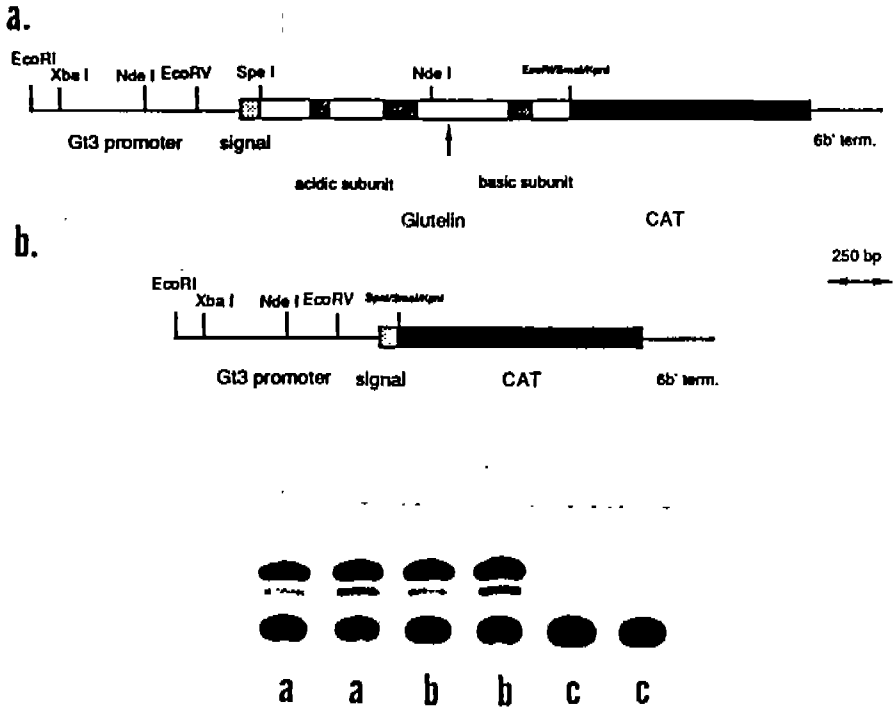


Fig. 15. Transient expression of glutelin promoter-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) fusion in tobacco cells. Two translational fusions to CAT were constructed containing the 5' flanking region of Gt3 and either 1332 bp (a) or 72 bp (b) of the coding sequences of Gt3. Physical restriction enzyme maps are depicted. Lanes a and b are duplicate CAT activity reactions of construct a and b, respectively. Lane c is the result obtained for extracts obtained from protoplasts subject to electroporation conditions without any DNA.

원형질체에 2개의 조합 유전자를 각각 삽입한 후 24시간 뒤에 CAT 활성도를 조사한 결과 2개의 융합 유전자 모두 CAT 활성도가 있는 것으로 나타나 glutelin promoter가 기능을 발휘하고 있음이 확인 되었다. 따라서 이들 Gt1, Gt2, Gt3 glutelin 유전자들은 모두가 정상적으로 기능을 하는 유전자 들임이 확인 되었다.

결 론

이상의 결과를 종합하면 쌀 glutelin은 적어도 3종 이상의 유전자 군으로 되어 있음이 확인 되었다. DNA염기서열 분석에서 Gt1과 Gt2 유전자 간에는 5' flanking 에서 적어도 900bp가 상당한 유사성을 보이며 또 단백질 coding 부위도 매우 유사 하여 이 두 유전자는 Gt3 유전자 보다 더 늦게 유전자 분화가 된 것으로 추정 되어진다. 이 쌀 glutelin 유전자는 그 용해성과는 달리 두과의 11S 종실 단백질 및 귀리 globulin과 매우 유사성을 보였다. 다만 promoter 부위에서는 유사성을 보이지 않으며 단백질 집적도 globulin은 배유에 집적하나 glutelin은 endosperm에 집적하였다. 뿐만아니라 gene copy 수도 두 유전자들간에는 유사성을 보이고 있다. 즉 쌀 glutelin 유전자와 같이 두과 11S 단백질 및 귀리 globulin도 작은 multigene family들이다. 이와 반대로 대부분 곡실류 작물의 주종 단백질인 prolamine 유전자들과 비교하면 이들은 아주 많은 gene copy 수를 가지며 단백질 생성량도 많으나 쌀의 경우는 prolamine의 gene copy 수가 많다고 단백질 생성량도 많이 된다고 할 수 없다. 오히려 glutelin이 prolamine 보다 8-15배 생성량이 더 많은 것은 매우 의미가 깊다. 쌀 prolamin과 glutelin간의 signal peptide 구조도 차이가 있다. glutelin은 두개의 cystein을 가지고 있어 signal peptide의 interchain linkage를 형성할 능력이 있으나 prolamin은 다른 작물의 signal peptide와 유사하였다. 쌀 glutelin 유전자 발현은 Gt1/Gt2와 Gt3 간에는 양상이 달라 Gt3 유전자 mRNA는 수정후 10일경 최고에 도달후 다시 떨어졌고 Gt1/Gt2 유전자는 15일경에 최고에 도달하여 계속 그 수준이 유지 되었으며 이들 유전자의 promoter부분도 Gt1/Gt2는 유사하나 Gt3와는 -186bp 까지는 homology를 보이다가 그 이상에서는 유사성이 없어 gene expression 결과와도 일치하는 구조를 보였다.

유전자 발현 연구에서 glutelin promoter의 transient expression이 잘 되는 것으로 보아 담배 원형질체가 glutelin promoter 연구에 좋은 system으로 간주 되었다.

참 고 문 헌

1. Ann. Rep. Int. Rice. Res. Inst. 1968. Improvement of the protein of rice.
2. Derbyshire, E., Wright, D. J. and Boulter, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15:3 - 24.
3. Dickinson, C. D., Evans, R. P. and Nielsen, N. 1988. RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucl. Acids Res.* 16:371.
4. Heijne, G. V. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids. Res.* 14:4683 - 4690.
5. Higuchi, W. and Fukazawa, C. 1987. A rice glutelin and a soybean glycinin have evolved from a common ancestral gene. *Gene* 55:245 - 253.
6. Huynh, T. V., Young, R. A. and Davis, R. W. 1985. Constructing and screening cDNA libraries in gt10 and gt11. "In DNA cloning Vol I" ed. D. M. Glover. IRL press. P49 - 78.
7. Kim, W. T. and Okita, T. W. 1988. Structure, expression, and heterogeneity of the rice seed prolamines. *Plant Physiol* 88:649 - 655.
8. Krishnan, H. B., Franceschi, V. R. and Okita, T.W. 1986. Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein-body formation in rice seeds. *Planta* 169:471 - 480.
9. Krishnan, H. B. and Okita, T. W. 1986. Structural relationship among the rice glutelin polypeptides. *Plant Physiol.* 81:748- 753.
10. Lorz, H., Baker, B. and Schell, J. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* 199:178 - 182.
11. Luthe, D. S. 1983. Storage protein accumulation in developing rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Plant Sci. Letters* 32:147 - 158.
12. Mandac, B. E., and Juliano, B. O. 1978. Properties of prolamine in mature and developing rice grain. *Phytochemistry* 17:611 - 614.
13. Maniatis, T., Fritsch E. F. and Sambrook, J. 1983. In *Molecular cloning; A*

- laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories. Coldspring Harbor. N. Y.
14. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473 - 497.
 15. Okita, T. W., Cheeshrough, V. and Reeves, C. 1985. Evolution and heterogeneity of the α -/ β -type and -type gliadin DNA sequence. *J. Biol. Chem.* 260:8203 - 8213.
 16. Okita, T. W. and Greene, F. 1982. Wheat storage proteins : isolation and characterization of the gliadin messenger RNAs. *Plant Physiol.* 69:834 - 839.
 17. Osborne, T. B. 1924. *The vegetable proteins* Longmans, Green. London. Reeves, C. D., Krishnan, H. B. and Okita, T. W. 1986. Gene expression in developing wheat endosperm. *Plant Physiol.* 82:34 - 40.
 18. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463 - 5467.
 19. Takaiwa, F., Ebinuma, H., Kikuchi, S. and Oono, K. 1987a Nucleotide sequence of a rice glutelin gene. *FEBS Lett.* 221:43 -47.
 20. Takaiwa, F., Kikuchi, S. and Oono, K. 1987b A rice glutelin gene family- A major type of glutelin mRNAs can be divided into two classes. *Mol. Gen. Genet.* 208:15 - 22.
 21. Takaiwa, F., Kikuchi, S. and Oono, K. 1986. The structure of rice storage protein glutelin precursor deduced from cDNA. *FEBS Lett.* 206:33 - 35.
 22. Tanaka, S. 1983. Seed protein of rice and possibilities of its improvement through mutant genes. In *Seed proteins : Biochemistry, Genetics, Nutritive value.* ed. Gschalk, W. and Muller, H. P. P225-244. Martinus Nijhoff, The Hague.
 23. Tanaka, K., Sugimoto T., Ogawa, M. and Kasai, Z. 1980. Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.* 44:1633 - 1639.
 24. Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H. and Hinata, K. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Biothechnology.* 6:1072 - 1074.
 25. Wang, C-S., Shastri, K., Wen, L., Huang, J-K., Sonthayanon, B., Muthukrishnan, S., and Reeck, G. R. 1987. Heterogeneity in cDNA clones encoding rice glutelin. *FEBS Lett.* 222:135 - 138.
 26. Wen, T-N. and Luthe, D. S. 1986. Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physiol.* 78:172 - 177.
 27. Yamagata, H., Sugimoto, T., Tanaka, K. and Kasai, Z. 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.* 70:1094- 1100.

28. Zhao, W-M., Gatehouse, J. A. and Boulter, D. 1983. The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains ; homology to pea legumin. FEBS. Lett. 162:96 - 102.

저 자 약 력

황 영 수 (黃 永 洙) 박사

1942. 12. 6. 생
1966 경북대학교 농학과 (농학사)
1977 화란 Wageningen대학교 토양화학과 (농학석사)
1989 서울대학교 농화학과 (농학박사)
1986 - 88 미국 Washington주립대학교 생화학 연구소 연구원
(식물 분자 유전학 분야)
1970 - 현재 농촌진흥청 농업기술연구소 근무중 (유전공학과)