

대두 β -conglycinin 유전자 발현의 전사 조절에 관한 연구 (I) 대두 β -conglycinin 유전자의 upstream 영역에 결합하는 대두 배 인자의 동정

이정연* · 정동효* · 김우연

중앙대학교 산업대학 생물공학과, *식품가공학과

초록 : 대두 종자 저장 단백질의 일종인 β -conglycinin α' subunit 유전자의 upstream 지역에 결합하여 전사 조절에 관여하리라 추정되는 대두 핵의 DNA 결합 단백질을 조사하기 위하여 대두 핵 추출물과 S-100을 조제하였다. 염기서열이 AACCCA—27 bp—AACCCA인 합성 DNA를 pUC19에 클로닝한 플라스미드 pSE3를 *EcoRI*와 *HindIII*로 절단하여 절편을 분리하고 ^{32}P 로 표지하여 이를 gel mobility shift assay 탐침으로 이용한 결과, 대두 핵의 DNA 결합 단백질의 일종인 SEF3(soybean embryo factor 3)의 역가가 핵 추출물과 S-100에서 검출되었다. 각각 CATGCAT, AACACA 염기 서열을 가지는 DNA를 탐침으로 이용하여 SEF3 이외의 DNA 결합 단백질의 역가를 조사한 결과 대두 핵 추출물과 S-100에서 각기의 염기 서열에 결합하는 수종의 DNA 결합 단백질이 확인되었으나 두 시료에서 공통된 양상을 보여주는 DNA 결합 단백질의 역가는 확인되지 않았다. 또한 대두 S-100의 경우에는 개화 후 32일 부근에 SEF3 역가가 검출되는 데에 비하여, 핵 추출물에는 20일 전후에 SEF3 역가가 나타나서 32일 부근에 역가가 현저히 증가하였다.(1993년 12월 1일 접수, 1993년 12월 13일 수리).

대두는 중량의 약 40%가 단백질이며 11S 단백질인 glycinin과 7S 단백질인 β -conglycinin이 전체 단백질의 약 70%를 차지하고 있다.¹⁾ 그 중 β -conglycinin은 3개의 주요 subunit인 α' (76 kDa), α (72 kDa) 및 β (53 kDa)로 구성되어 있다.²⁻³⁾ β -Conglycinin의 유전자는 배 발생 과정 중기에서 말기에 오로지 종자에서만 발현되고³⁾ 주로 transcription 단계에서 발현 조절된다고 밝혀졌다.⁴⁻⁵⁾ 이러한 이유로 β -conglycinin은 식물 유전자 발현 조절 메카니즘 연구 모델로 일찍부터 유전자 수준에서 연구되어 왔다. Haploid genome 당 α 또는 α' subunit 유전자는 3개, β subunit 유전자는 8~13개인 반면에 대두 종자에 축적되는 각각 subunit의 양은 비슷하다.^{3,5-8)} 이러한 사실은 각각의 β subunit 유전자는 α' 또는 α subunit 유전자보다 발현되는 정도가 낮은 것을 의미한다. 실제로 α' subunit과 β subunit 유전자를 1개씩 가진 transgenic plant에서 발현되는 β subunit의 양은 α' subunit의 약 10% 정도이었다.⁷⁾ 따라서 α , α' 및 β 의 3 subunit 중 발현이 강한 α 와 α' subunit 유전자의 발현에 관심이 모아졌고 그 중에서 α' subunit 유전자의 전사

조절 메카니즘에 대한 연구가 *cis*-acting element와 *trans*-acting factor의 관점에서 활발하게 연구되었다.

β -Conglycinin α' subunit의 유전자 발현에 관여하는 주요한 *cis*-acting element를 조사하기 위하여 α' subunit 유전자의 upstream역을 부분적으로 제거한 DNA를 넣은 transgenic petunia에서 α' subunit 생성을 조사한 결과, -208 bp와 -257 bp 사이와 -159 bp와 -208 bp 사이에 유전자 발현에 관여하는 주요한 *cis*-acting element가 있는 것이 발견되었다.⁹⁾ 그리고 CAT(chloramphenicol acetyl transferase) 유전자의 upstream에 결합시킨 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S promoter의 중간에 α' subunit 유전자의 -78 bp와 -257 bp 사이 DNA를 집어 넣은 transgenic tobacco 종자에서 CAT 역가가 대조구에 비하여 40~50배 높게 나타나 이 지역이 유전자 발현에 중요하다는 것이 확인되었다.¹⁰⁾ 한편 이러한 *cis*-acting element에 결합하는 *trans*-acting factor인 DNA binding protein으로는 SEF3(soybean embryo factor 3)가 발견되었다.¹¹⁾ Allen 등¹¹⁾은 SEF3의 결합에는 -180 bp 부근의 AACCCA 및 -152 bp 부근의 AAC-

Key words : β -Conglycinin α' subunit gene, soybean embryo factor, DNA binding protein
Corresponding author : W.-Y. Kim

CCA의 2개 AACCCA가 필요할 것이라 추정하였다.

본 실험에서는 2개 AACCCA를 가지는 DNA를 합성한 후 대두 핵 추출물에서의 SEF3 역가를 측정하였다. 그리고 -208 bp와 -257 bp 사이에 발견되는 CATG-CACA가 두과 식물의 종자 단백질 유전자의 upstream 영역에서 발견되는 RY repeat¹²⁾로 칭하는 CATGCAT와 유사하고 β-conglycinin의 α', β subunit 유전자 및 glycinin 유전자의 upstream 영역에 발견되는 CACA box¹³⁾인 AACACA가 AACCCA와 비슷하므로, 각각 RY repeat와 CACA box를 탐침으로 이용하여 대두 핵 추출물 중의 다른 종류의 결합 단백질을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

제한효소와 DNA polymerase의 Klenow fragment는 KOSCO Biotech에서 구입하였다. Leupeptin hemisulfate, poly[d(I-C)]:poly[d(I-C)]와 기타 시약은 Sigma 제품을 사용하였다. [α-³²P]dATP는 Amersham에서 구입하였다. pUC19 계열 플라스미드를 대량 생산하기 위하여 *E. coli* DH5αF' 균주를 사용하였다.

대두 핵 추출물의 조제

대두 핵 추출물은 Walling 등⁹⁾과 Allen 등¹¹⁾의 방법에 따라 조제하였다. 특별히 명시하지 않는 한 모든 실험은 4°C의 저온실에서 수행하였다. 꽃이 핀 후 30일 전후에 해당하는 Provar 품종 대두 종자 25g을 액체 질소에 얼린 후 스테인레스스틸 용기에 넣고 Waring blender로 분쇄하였다. 소량의 대두의 경우는 액체 질소에 얼린 대두를 막자 사발에서 분쇄하였다. 분말형태의 대두 종자를 150 ml의 buffer A(2.5% Ficoll, 5% dextran, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 0.44 M sucrose, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.2 mM EDTA, 2 mM spermine-HCl, 10 μg/ml leupeptin hemisulfate)에 넣고 Polytron PTA 20 TS homogenizer(Brinkman Instruments)를 이용하여 속도 3으로 30초씩 3회 균질화시키면서 세포벽을 파괴시켰다. 현탁액을 2겹의 70-μm mesh Nytex로 여과하여 대두 종자 찌거기를 제거하고 Sorvall GSA rotor를 이용하여 여과액을 5,500 rpm으로 15분간 원심분리한 후 침전물을 spermine이 첨가되지 않은 30 ml의 buffer A에 재현탁하고 7,000 rpm으로 15분 원심분리하였으며 침전물을 crude nucleio 정의하였다. 이 침전물을 30 ml의 buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 M KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 10

μg/ml leupeptin hemisulfate)에 재현탁시킨 후 Dounce homogenizer로 10회 추출하였다. 추출액을 Sorvall SS-34 rotor에서 18,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상정액을 1,000 ml의 buffer D (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 20% glycerol, 100 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)에서 5시간 투석하였다. 투석한 용액을 SS-34 rotor에서 15,000 rpm으로 원심분리한 후 상정액을 대두 핵 추출물로서 -70°C에 보존하였다. 대두의 S-100은 Dahmus와 Keding¹⁴⁾의 방법을 이용하여 조제하였다.

SE3 절편, RY repeat 및 CACA box의 subcloning

SEF3 결합지역을 포함하는 DNA를 클론하기 위해 (+)가닥의 5'-GATCTCACCAACTCAACCCATCATGAGCCACACATTTGTTGTTTCTAACCCAACCTCAAACG-3'와, 함께 annealing하면 5' 말단과 3' 말단에 각각 *Bgl* II site와 *Bam*HI site를 가지는 상보적인 (-)가닥의 oligonucleotide를 각각 합성하였다. 상기의 두 oligonucleotide를 annealing한 후 *Bam*HI으로 자른 pUC19과 ligation반응을 시켰다. 이 반응액을 DH5αF'에 형질전환한 후 ampicillin이 포함된 MacConkey배지에서 진한 적색을 나타내지 않고 흰색 또는 옅은 분홍색을 가지는 콜로니를 선별하였다. 조제한 플라스미드를 각각 *Eco*RI과 *Hind*III로 분해시킨 후 6% polyacrylamide gel에서 전개시켜 상기의 DNA가 클론되었는지를 확인하였으며 이 플라스미드를 pSE3로 명명하였다. 대두의 β-conglycinin 유전자, glycinin 유전자 및 기타 식물의 종자 저장 단백질의 유전자에서 발견되는 RY repeat, 즉 legumin box를 pUC19에 클론하였다. (+)가닥의 5'-GATCTCCATAGCCATGCATACTGAAGAATGTCCG-3'와, 함께 annealing하면 5' 말단과 3' 말단에 각각 *Bgl* II site와 *Bam*HI site를 가지는 상보적인 (-)가닥의 oligonucleotide를 이용하여 상기의 방법으로 pUC19에 클론하였으며 이 플라스미드를 pRY로 명명하였다. β-Conglycinin의 α', β subunit 유전자와 glycinin의 A₂B_{1a} 유전자에서 발견되는 CACA box 부분을 pUC19에 클론하였다. (+)가닥의 5'-GATCTCTAACACACAAGGCG와, 함께 annealing하면 5' 말단과 3' 말단에 각각 *Bgl* II site와 *Bam*HI site를 가지는 상보적인 (-)가닥의 oligonucleotide를 이용하여 상기의 방법으로 pUC19에 클론하였으며 이 플라스미드를 pCA로 명명하였다.

Gel mobility shift assay

Gel mobility shift assay를 위하여 사용된 DNA 절편은 HPLC를 이용하여 분리하였다. Waters회사의 Gen-Pak

Fax 칼럼을 이용하여 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer에서 NaCl gradient로 DNA 절편을 분리하였다. pSE3, pRY 및 pCA를 *EcoRI*과 *HindIII*로 분해하고 이 반응액을 각각 칼럼에 통과시킨 후 0.3M의 NaCl이 함유된 buffer로 세척하고 NaCl gradient를 걸어 주었다. 세척기간 중에 단백질 등이 용리되고 0.59~0.7 M NaCl gradient에서 처음에 짧은 DNA 절편이 용리되며 그 후 선형의 pUC19 플라스미드가 분리되는 것이 6% polyacrylamide gel에서 확인되었다. 이렇게 분리된 DNA 절편 중 탐침으로 사용할 DNA를 Klenow fragment와 [α - 32 P]dATP를 이용하여 32 P로 표지하고 Sephadex G-25 또는 G-50를 이용하여 표지된 탐침을 [α - 32 P]dATP로부터 분리하였다. Gel mobility shift assay는 Allen 등¹¹⁾에 의한 방법에 준하였으며 0.5×TBE buffer를 이용하여 4% polyacrylamide gel에 시료를 전개하였다. 반응 용액은 20 μ l로 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 μ g/ml poly[d(I-C)] : poly[d(I-C)] 및 5 μ l 대두 핵 추출물을 함유하고 있다. 혼합한 후 상온에서 10분간 반응시키고 1 μ l의 32 P로 표지된 DNA 절편(~5000 cpm)을 첨가한 후 상온에서 다시 10분간 방치한 시료를 상기의 gel에서 전개하였다. 여과지 위에서 건조한 gel을 X선 필름과 -70°C에서 적당한 시간 접촉시킨 후 X선 필름을 현상하여 autoradiogram을

얻었다.

결과 및 고찰

SE3 DNA와 결합하는 DNA binding protein과 SEF3와의 비교

대두 배의 핵 추출물 중에 존재하는 SEF3의 역할을 측정하는 데에는 대두의 β -conglycinin α' subunit 유전자의 upstream DNA 중 2개 AACCCA를 포함하는 부분이 이용되어 왔다. 비록 SEF3가 결합하는 데에 AACCCA가 관여하리라 추정되지만 foot printing 실험으로 확인된 것은 아니다.¹¹⁾ SEF3가 결합하는 것으로 확인된 β -conglycinin α' subunit 유전자의 upstream DNA처럼, '연구방법'에서 기술된 2개 AACCCA를 포함하는 (+)와 (-)가닥의 합성된 oligonucleotide를 클론하여 얻은 SE3 절편에 동일한 DNA binding protein이 결합되는지를 확인하여야 한다. Fig. 1의 gel mobility shift assay에서 보는 바와 같이, lane 1의 α' subunit 유전자의 -208 bp에서 -139 bp까지의 DNA 절편에 의해 형성된 결합체 (B) band와 이동도가 유사한 결합체 band가 pSE3를 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단한 후 분리한 SE3절편을 사용한 lane 2에서도 발견되었다. 따라서 2개 AACCCA를 포함

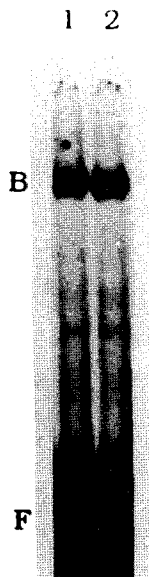


Fig. 1. SEF3 activity probed with the upstream DNA fragment of α' subunit gene and SE3. Lane 1, α' subunit DNA fragment from -208 bp to -139 bp; lane 2, SE3; B, binding complex; F, free probe.

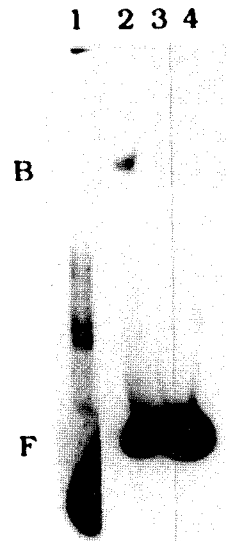


Fig. 2. Titration of SEF3 binding to SE3 by competition. Lane 1, radioactive pUC19 polylinker probe; lane 2, radioactive SE3 probe; lane 3, radioactive SE3 probe and 50-fold molar excess of unlabeled SE3; lane 4, radioactive SE3 probe and 100-fold molar excess of unlabeled SE3.

하는 합성된 SE3 DNA를 SEF3의 정량에 사용하였다.

Fig. 1의 lane 2의 DNA-protein 결합체가 특이적인가를 조사하기 위하여 경쟁 실험을 수행하였다. Fig. 2의 lane 1은 pUC19을 EcoRI과 HindIII로 절단한 후 분리한 pUC 19 polylinker 지역의 DNA를 탐침으로 사용하여 DNA-protein 결합체를 조사한 결과를 보여준다. Lane 2, 3 및 4는 SE3 DNA와 SEF3와의 결합체 특이성을 보여 준다. Lane 2는 특이적 경쟁제가 없는 경우이고 lane 3는 50배, lane 4는 100배의 방사선 동위원소로 표지하지 않은 SE3 DNA를 경쟁제로 첨가한 결과이다. Lane 3과 4에서 lane 2에서 보이는 결합체가 사라지는 것은 lane 2에서의 SEF3에 의한 결합체의 형성이 특이적이라는 것을 나타낸다. SE3와 DNA 탐침과의 결합체 band의 이동도가 DNA의 크기에 크게 좌우되지 않는 데 반하여¹³⁾ lane 1의 pUC19 polylinker에 의한 결합체는 SE3에 의한 것 보다 현저하게 빨리 움직이므로 SEF3가 아닌 단백질에 의해 형성된 결합체인 것으로 추정된다.

대두 배의 DNA binding protein 역가 조사

SEF3 이외의 대두 배의 다른 DNA binding protein의 역가를 측정하기 위하여 '연구방법'에서 기술한 RY repeat, CACA box를 ³²P로 표지한 후 시료와 반응시켜 DNA-DNA binding protein의 결합체를 조사하였다. Da-

hmus와 Kedinger¹⁴⁾의 방법에 따라 조제한 S-100은, 액체 질소로 동결시키고 분쇄한 대두분을 0.1 M KCl이 함유된 buffer에서 Dounce homogenizer로 균질화시킨 후 원심 분리하여 얻은 침전물을 0.32 M의 KCl 농도의 buffer에서 방치 추출한 후 100,000×g로 원심분리하여 얻은 상정액을 의미한다. Fig. 3에서 S-100(lane 1, 4 및 6)와 핵 추출물(lane 3, 5 및 7)에서 검출되는 DNA binding protein에 의한 결합체(화살표)는 공통성이 적다는 것을 알 수 있다. SE3 절편에 의한 lane 3(핵 추출물)의 결합체는 SEF3를 보여주고 있다. Lane 1(S-100)의 경우는 SEF3-like 결합체 이외에 빠른 이동도의 결합체가 형성되었다. RY repeat의 경우 S-100(lane 4)에는 2개의 결합체 band가 보이나 핵 추출물(lane 5)에는 이동도가 다른 1개의 결합체 band가 보였다. CACA box의 경우 S-100(lane 6)에는 결합체 band가 없으나 핵 추출물(lane 7)에서 1개의 결합체 band가 보였다. 즉 DNA binding protein을 추출하는 방법에 따라서 결합체의 형성 양상이 달라졌다. 이러한 결합체들의 형성이 특이적인지를 알아보기 위해서는 앞으로 결합지역을 가지고 있는 DNA와 결합지역을 가지지 않는 DNA로 경쟁을 시켜 보아야 할 것이다. 동물세포와는 달리 식물세포는 세포벽을 가져 충분한 양의 손상되지 않은 핵을 얻기가 용이하지 않아 어떤 DNA binding protein은 검출되지 않을 수 있다. 최근에 Chamberland 등¹⁵⁾은 α' subunit 유전자의 upst-

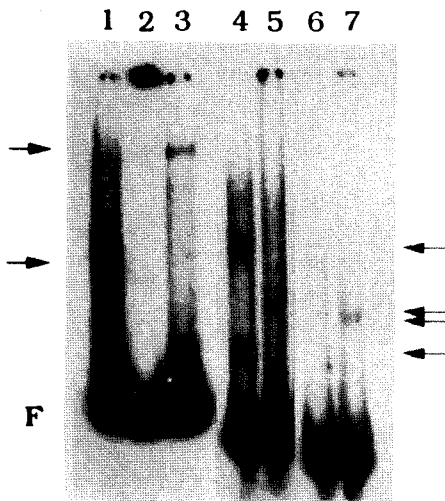


Fig. 3. Detection of soybean embryo DNA binding proteins interacting with SE3 fragment, RY repeat, and CACA box, respectively. SE3, RY reapeat, and CACA box were used for lanes 1~3, lanes 4 and 5, and lanes 6 and 7, respectively. Lanes 1, 4 and 6, S-100; lane 2, PEI nuclear extract; lanes 3, 5, and 7, nuclear extracts. Arrows indicate the DNA-protein complexes.

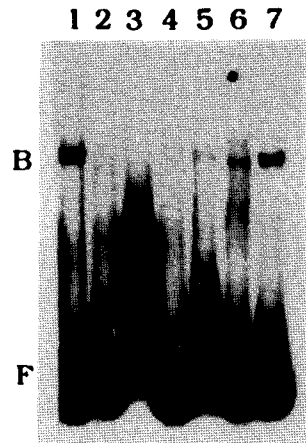


Fig. 4. Relative levels of SEF3 binding activity in soybean nuclear extracts and S-100. Lane 1, nuclear extract (standard); lanes 2, 4, and 6, S-100; lanes 3, 5, and 7, nuclear extracts; lanes 2 and 3, sample prepared from soybean seeds around 12 days after pollination; lanes 4 and 5, sample prepared from soybean seeds around 20 days after pollination; lanes 6 and 7, sample prepared from soybean seeds around 32 days after pollination.

ream 영역 중 RY repeat인 -240 bp 부근의 CATGCA와 -55 bp 부근의 CATGCATG가 α' subunit 유전자 발현에 주요한 역할을 한다고 보고하였다. 하지만 현재까지 이 지역에 결합되는 DNA binding protein에 대한 보고는 없다. Lane 2의 PEI 핵 추출물은 핵 추출물법의 buffer C 추출과정 전에 PEI(polyethylenimine)를 첨가하여 DNA를 포함하는 고분자의 물질을 침전시킨 후 침전물로부터 buffer C에 의해 추출된 단백질을 나타내는데, 추출물에 잔존하는 PEI와 탐침 DNA가 결합되어 gel의 상단부분에 고착되어서 DNA binding protein의 역가를 볼 수 없었다.

대두 발달 과정 중의 추출 방법에 따른 SEF3 역가 변화

DNA binding protein 추출 방법에 따른 대두 발달 과정 중의 SEF3 역가가 변화되는 양상을 조사하였다. Fig. 4의 lane 2, 4 및 6과 lane 3, 5 및 7은 각각 S-100와 핵 추출물을 사용한 결과를 보여준다. 개화한 지 12일 정도의 대두 종자(lane 2, 3)에서는 어느 추출 방법으로도 SEF3의 역가를 나타내주지 않았다. S-100는 개화 후 32일 정도부터 SEF3의 역가를 보이지만 핵 추출물은 개화 후 20일부터 역가를 보여 32일 정도에는 강한 SEF3 역가를 보여 주었다. 따라서 비록 추출 수율이 다르지만 S-100나 핵 추출물에서 동일한 DNA binding protein인 SEF3의 역가가 나타났다.

앞으로 α' subunit 유전자의 upstream 영역에 명확히 결합하는 SEF3의 특징을 조사하고 AACCCA를 변이시킨 DNA를 가지는 transgenic plant에서 α' subunit의 생성을 조사하여야 SEF3의 생리적 중요성을 알 수 있을 것이다. 그리고 SEF3가 정제되고 SEF3의 유전자가 클로닝되어 DNA 염기 서열이 조사되면 대두 단백질 유전자의 전사 조절 메카니즘에 대한 이해가 깊어질 것이다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부 유전공학 연구비 지원과

한국과학재단 연구비(90-0500-10)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Nielsen, N. C. : Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 304 : 287(1984)
2. Thanh, V. H. and Shibasaki, K.: Biochem. et. Biophys. Acta., 439 : 326(1976)
3. Meinke, D. W., Chen, J. and Beachy, R. N.: Planta, 153 : 139(1981)
4. Harada, J. J., Barker, S. J. and Goldberg, R. B. : Plant Cell, 1 : 415(1989)
5. Walling, L., Drews, G. N. and Goldberg, R. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 : 2123(1986)
6. Tierney, M. L., Bray, E. A., Allen, R. D., Ma, Y., Drong, R. F., Slightom, J. and Beachy, R. N.: Planta; 172 : 356(1987)
7. Naito, S., Dube, P. H. and Beachy, R. N.: Plant Mol. Biol., 11 : 109(1988)
8. Chen, Z. -L., Naito, S., Nakamura, I. and Beachy, R. N.: Dev. Genet., 10 : 112(1988)
9. Chen, Z. -L., Schuler, M. A. and Beachy, R. N.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 : 8560(1986)
10. Chen, Z. -L., Pan, N. -S. and Beachy, R. N.: EMBO J., 7 : 297(1988)
11. Allen, R. D., Bernier, F., Lessard, P. A. and Beachy, R. N.: Plant Cell, 1 : 623(1989)
12. Dickinson, C. D., Evans, R. P. and Nielsen, N. C.: Nucleic Acids Res., 16 : 371(1988)
13. Goldberg, R. G.: Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 314 : 343(1986)
14. Dahmus, M. E. and Keding, C.: J. Biol. Chem., 258 : 2303(1983)
15. Chamberland, S., Daigle, N. and Bernier, F.: Plant Mol. Biol., 19 : 937(1992)

Transcriptional regulation of soybean β -conglycinin gene expression.**(I) Identification of a soybean embryo factor interacting with upstream region of soybean β -conglycinin gene**

Jeong-Yeon Lee*, Dong-Hyo Chung* and Woo-Yeon Kim (Department of Biotechnology, and *Department of Food Science and Technology, College of Industrial Studies, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea)

Abstract: Soybean nuclear extracts and S-100 were prepared to examine the soybean embryo factors which bind to the upstream region of soybean β -conglycinin α' subunit gene. SEF3(soybean embryo factor 3), which is presumed to be a *trans*-acting factor for the expression of the gene, was detected in gel mobility shift assay using the DNA probe containing two AACCCA hexanucleotides. DNA probe containing CATGCAT or AACACA was used to find any other soybean embryo factor interacting with the upstream region of β -conglycinin α' subunit gene. It was found that there was no common DNA binding protein detected both in nuclear extracts and S-100. The relative levels of SEF3 binding activity both in nuclear extracts and S-100 of maturing soybean seeds were determined. SEF3 activity of nuclear extracts was first detected around 20 days after pollination and significantly increased around 32 days after pollination.