

대두 β -conglycinin 유전자 발현의 전사 조절에 관한 연구 (II) 대두 발달과정 중의 대두 배 인자 3의 역가 변화

이경훈* · 정동호* · 김우연

중앙대학교 산업대학 생물공학과 및 *식품가공학과

초록 : 대두 종자 저장 단백질의 일종인 β -conglycinin의 α' subunit 유전자 upstream 영역에 결합하여 전사 조절에 관여하리라 추정되는 SEF3(soybean embryo factor 3)의 발현을 조사하기 위하여 대두 핵 추출물을 조제하였다. 두개의 AACCCA를 포함하는 SE3 DNA를 ^{32}P 로 표지한 후 gel mobility shift assay 탐침으로 이용하여 대두 발달 과정 중의 SEF3의 역가를 조사하여 본 결과, 개화 후 16일부터 32일까지의 역가는 증가하나 SE3-SEF3 결합체 이동도는 감소하였다. 핵 추출물을 alkaline phosphatase 처리하면 결합체의 이동도가 다시 증가하였으나 이 현상은 phosphate에 의해 저해되었다. 그리고 결합체의 형성은 반응 pH 6.8과 8.5사이에서는 큰 영향을 받지 않았다(1993년 12월 1일 접수, 1993년 12월 13일 수리).

서 론

대두 7S 단백질인 β -conglycinin은 3개의 주요 subunit인 α' , α 및 β 로 구성되어 있다.¹⁻²⁾ α' 과 β subunit 유전자의 경우 주로 transcription 단계에서 발현이 조절되며 이들 발현의 정도와 시기에 차이가 있음이 발견되었다.³⁻⁶⁾ α' Subunit 유전자는 β subunit 유전자보다 일찍 발현되며 각각의 유전자를 1개씩 가진 transgenic plant에서 발현되는 β subunit의 양은 α' subunit의 약 10% 정도이었다.⁷⁻⁸⁾ 따라서 α , α' 및 β 의 3 subunit 중 발현이 강한 것으로 밝혀진 α' subunit 유전자의 전사 조절 메커니즘에 관여하는 cis-acting element와 trans-acting factor에 관하여 활발하게 연구되어졌다.

Chen 등⁹⁻¹⁰⁾에 의하여 α' subunit 유전자의 upstream 영역인 -78 bp와 -257 bp 사이에 주요한 cis-acting element가 존재하는 것이 밝혀졌다. 이러한 cis-acting element가 확인되면 여기에 결합하는 DNA binding protein에 대한 탐색이 이어진다. DNA binding protein은 RNA polymerase II와 다른 단백질 인자와 더불어 transcription 속도를 증가시키거나 감소시킨다. 일반적으로 DNA binding protein은 두 영역의 기능부위를 가지는데, DNA 결합부위는 cis-acting element를 인지하여 결합하고 활성부위는 RNA polymerase II와 다른 단백질 인자의 결합체와 아직 밝혀지지 않은 메커니즘으로 접촉

하여 transcription 속도를 조절한다.¹¹⁾ α' Subunit 유전자의 upstream 부위에는 β subunit 유전자의 upstream 영역에는 발견되지 않는 AACCCA가 2회 반복되는 염기서열이 존재하며 여기에 SEF3(soybean embryo factor 3)가 결합됨이 알려졌다.¹²⁻¹⁴⁾

전보¹⁴⁾에서 염기 서열이 AACCCA-27 bp-AACCCA인 합성 DNA를 pUC19에 클로닝한 플라스미드 pSE3를 *EcoR* I과 *Hind* III로 절단하여 얻은 SE3 절편에 SEF3가 결합하는 것을 보여주었다. 본 실험에서는 대두 발달 과정 중에 SEF3의 역가와 SE3-SEF3 결합체 이동도의 변화를 살펴보고 변화에 대한 잠정적인 원인을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

제한효소와 DNA polymerase의 Klenow fragment는 KOSCO Biotech에서 구입하였다. Leupeptin hemisulfate와 poly[d(I-C)]:poly[d(I-C)] 그리고 기타 시약은 Sigma 제품을 사용하였다. Calf alkaline phosphatase는 Boehringer Mannheim에서 구입하였다. [α - ^{32}P] dATP는 Amersham에서 구입하였다. pUC19 계열 플라스미드를 대량 생산하기 위하여 *E. coli* DH5 α F' 균주를 사용하였다.

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

대두 핵 추출물의 조제

대두 핵 추출물은 전보¹⁴⁾와 같이 Walling 등⁵⁾과 Allen 등¹¹⁾의 방법에 따라 조제하였다. 특별히 명시하지 않는 한 모든 실험은 4°C 의 저온실에서 수행하였다. 개화 후 16일부터 32일까지 며칠 간격으로 얻은 각각의 Provar 품종 대두 종자 5 g을 액체 질소에 얼린 후 막자 사발에서 분쇄하였다. 분말 형태의 대두 종자를 30 ml의 buffer A (2.5% Ficoll, 5% dextran, 25mM 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)로 30 초씩 3회 균질화시키면서 세포벽을 파괴시켰고 전보에서 기술한 방법으로 crude nuclei를 분리하였다. 이 crude nuclei를 6 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 재현탁시키고 Dounce homogenizer로 10회 추출한 후 추출액을 Sorvall SS-34 rotor에서 18,000 rpm 으로 30분간 원심분리한 후 상정액을 300 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°C 에 보존하였다.

Gel mobility shift assay

Gel mobility shift assay를 위하여 사용된 DNA 절편 SE3(5'-GATCTCACAACTCAACCCATCATGAGCCCA-CACATTTGTTGTTTCTAACCCAACCTCAAACG-3')은 전보¹⁴⁾와 같이 HPLC를 이용하여 분리하고 Klenow fragment와 [α -³²P]dATP를 이용하여 표지하였다. Alkaline phosphatase에 의한 SEF3의 변화 실험에는 5 unit의 alkaline phosphatase를 첨가한 후 37°C 에서 30분간 처리한 대두 핵 추출물을 사용하였다. SE3-SEF3 결합에 영향을 미치는 반응 buffer pH의 영향을 조사하기 위하여 표준 방법의 pH 7.5 buffer 외에 pH 6.8, pH 8.5의 buffer를 사용하였다.

결과 및 고찰

대두 배의 핵 추출물에 존재하는 SEF3가 β-conglycinin α' subunit 유전자의 발현에 관여하는 인자라면 대두 종자 발달 과정 중 SEF3 역가도 변할 가능성이 있다. 대두 발달 과정 중의 SEF3 단백질 발현과 β-conglycinin

단백질 발현과의 상관 관계를 알아보기 위하여, 개화 후 발달되고 있는 Provar 품종 대두 종자를 이용하여 조제한 핵 추출물과 SE3 DNA를 사용하여 수행한 gel mobility shift assay 결과는 Fig. 1과 같다. Lane 1에서 6은 각각 개화 후 약 16, 20, 23, 26, 29, 32일 된 대두 종자로부터 조제한 핵 추출물의 SEF3 역가를 보여주고 있다. Provar 품종 대두의 경우 개화 후 약 20일 전후에서 SEF3 역가가 나타나며 종자 성숙에 가까운 30일 전후에 최대 역가를 보여주었다. Allen 등¹²⁾은 Provar 품종의 경우 32일 전후에 최대 SEF3 역가를 가지며 그 후에는 종자가 건조되면서 역가가 사라짐을 보여주었다. 그들의 실험에서 26일과 32일 사이에 급격한 SEF3 역가 증가를 보여주는 것에 반하여, 본 실험에서는 20일 경에 역가가 뚜렷이 나타나며 30일 전후에서 최대치를 보였다. Chen 등¹²⁾에 의하면 α' subunit 유전자 mRNA는 개화 후 15일 전후에 나타나서 20일 경에 뚜렷하게 양이 증가하였으며 30에서 35일 사이에 최대치를 보였다. 이러한 mRNA 축적과정은 Fig. 1의 발달 과정 중의 대두 종자의 SEF3 역가 증가 양상과 유사하였다.

또 SE3-SEF3 결합체의 이동도가 개화 후 20일에서부터 32일까지 느려지는 것을 Fig. 1이 보여준다. 이러한 현상이 DNA binding protein의 공유결합적 변화에 의해 나타날 수 있다. 특히 DNA binding protein이 인산화되는 경우가 보고되었으므로¹⁵⁻¹⁷⁾ 그 가능성을 조사하였다. Fig. 2의 lane 1은 SE3-SEF3 결합체를 보여주며 lane

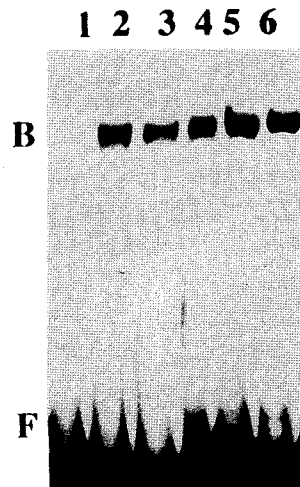


Fig. 1. SEF3 binding activity in the nuclear extracts of maturing soybean seeds. Lanes 1~6, nuclear extracts from the soybean embryos 16, 20, 23, 26, 29, and 32 days after pollination, respectively; B, binding complex; F, free probe.

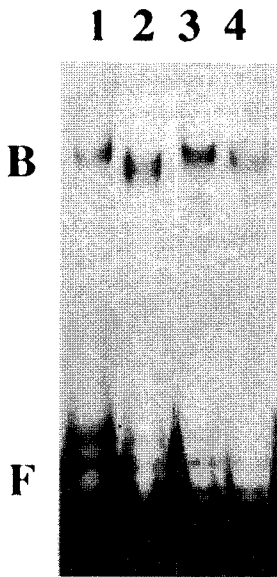


Fig. 2. Effect of alkaline phosphatase treatment on the mobility of SE3-SEF3 complex.

Lane 1, no treatment; Nuclear extracts from the soybean embryos 32 days after pollination were incubated at 37°C for 30 min in the presence of 5 units of alkaline phosphatase (lane 2), 100 mM potassium phosphate (lane 3), and 5 units of alkaline phosphatase and 100 mM potassium phosphate (lane 4), respectively.

2는 calf alkaline phosphatase를 처리한 대두 핵 추출물을 사용한 경우의 결합체를 나타낸다. Alkaline phosphatase를 처리하면 결합체의 이동도가 약간 증가하는 것을 알 수 있다. Lane 3는 potassium phosphate를 첨가한 대두 핵 추출물의 경우이고 lane 4는 alkaline phosphatase 처리시 저해제인 potassium phosphate를 동시 첨가한 경우를 보여준다. Lane 3의 결합체의 이동도는 lane 1과 비슷하고 lane 4의 결합체의 이동도는 lane 2에 비해 약간 느리게 나타났다. 따라서 SE3-SEF3의 결합체의 이동도는 alkaline phosphatase에 의해 빨라지지만 이 효소 저해제인 potassium phosphate를 첨가하면 다시 느려지는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 성숙과정에 있는 대두 배에서 SEF3의 역가와 인산화가 증가되고 있음을 제시한다. 대두 핵을 분리할 시 pH 8.5 buffer를 사용하며 추출 buffer pH가 7.9인데 반하여, gel mobility shift assay의 결합체 형성 pH는 7.5이다. 발달 과정 중의 대두 종자로부터 추출된 SEF3의 역가와 이동도의 차이에 이러한 pH 변화가 영향을 주었는지를 알아보기 위하여, 개화 후 32일 전후의 종자로부터 추출하여 가장 역가가 높고 이동도가 낮은 SEF3의 gel mobility shift

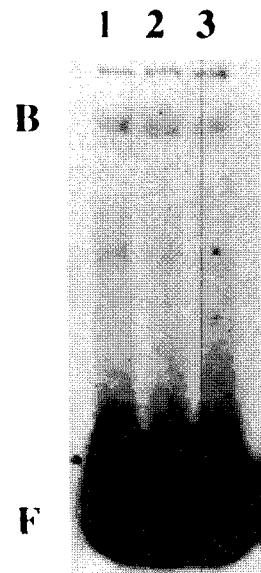


Fig. 3. Effect of binding buffer pH on the SEF3 binding activity.

Lane 1, Tris-HCl, pH 6.8; lane 2, Tris-HCl, pH 7.5; lane 3, Tris-HCl, pH 8.5.

assay에서 반응 buffer pH로 각각 pH 6.8, pH 7.5, pH 8.5를 사용한 결과는 Fig. 3과 같다. Lane 1, 2 및 3을 비교해보면 역가와 이동도에 큰 차이가 없어 상기 범위의 pH는 SEF3의 변화에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

앞으로 발달 과정 중의 대두로부터 조제한 핵 추출물을 정제된 SEF3에 첨가하여 인산화 가능성을 보다 자세히 알아보아야 하며 인산화가 된다면 이것이 transcription에 미치는 영향을 조사해 보아야 할 것이다.

감사의 말

본 연구는 1991년도 교육부 유전공학 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Nielsen, N. C.: Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 304 : 287(1984)
- Thanh, V. H. and Shibasaki, K.: Biochem. et. Biophys. Acta., 439 : 326(1976)
- Hill, J. E. and Breidenbach, R. W.: Plant Physiol., 53 : 747(1974)
- Meinke, D. W., Chen, J. and Beachy, R. N.: Planta, 153 : 139(1981)

5. Harada, J. J., Barker, S. J. and Goldberg, R. B.: Plant Cell, 1 : 415(1989)
6. Walling, L., Drews, G. N. and Goldberg, R. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 : 2123(1986)
7. Chen, Z.-L., Naito, S., Nakamura, I. and Beachy, R. N.: Dev. Genet., 10 : 112(1988)
8. Naito, S., Dube, P. H. and Beachy, R. N.: Plant Mol. Biol., 11 : 109(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. Ptashne, M.: Nature, 335 : 683(1988)
12. Allen, R. D., Bernier, F., Lessard, P. A. and Beachy, R. N.: Plant Cell, 1 : 623(1989)
13. Lessard, P. A., Allen, R. D., Bernier, F., Crispino, J. D., Fujiwara, T. and Beachy, R. N.: Plant Mol. Biol., 16 : 397(1991)
14. 이정연, 정동효, 김우연: 한국 농화학회지, 36 : 547 (1993)
15. Sorger, P. K. and Pelham, H.R.B.: Cell, 54 : 855 (1988)
16. Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs III, W. H., and Montminy, M. R.: Nature, 334 : 494(1988)
17. Cherry, J. R., Johnson, T. R., Dollard, C., Shuster, J. R. and Denis, C. L.: Cell, 56 : 409(1989)

Transcriptional regulation of soybean β -conglycinin gene expression:

(II) Developmental change of soybean embryo factor 3 activity

Kyung-Hoon 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 were prepared to examine the expression of SEF3 (soybean embryo factors 3), which binds to the upstream region of soybean β -conglycinin α' subunit gene and is presumed to be a *trans*-acting factor for the expression of the gene. The relative levels of SEF3 binding activity in nuclear extracts of maturing soybean embryos were determined using the SE3 DNA probe containing two AACCCA hexanucleotides for gel mobility shift assay. The SEF3 activity increased in developing embryos from 16 to 32 days after pollination, whereas the mobility of the SE3-SEF3 complex decreased. The mobility of the complex was increased by the treatment of nuclear extracts with alkaline phosphatase, which could be inhibited by phosphate. Formation of the SE3-SEF3 complex was not affected by the binding buffer pH between 6.8 and 8.5.