

Kunitz Trypsin Inhibitor 발현 억제에 의한 콩 뿌리혹 수의 감소

김선형 · 임채우 · 박지영 · 황철호[†]

단국대학교 식량생명공학과

Inhibition of SKTI Synthesis in *Agrobacterium rhizogenes*-induced Hairy Root Reduces the Number of Nodule in Soybean

Sun Hyung Kim, Chae woo Lim, Ji Young Park, and Cheol Ho Hwang[†]

Department of Crop Science & Biotechnology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

ABSTRACT In nitrogen-limited conditions, rhizobia lead to formation of nitrogen-fixing nodules on the roots of leguminous plants. The process of nodulation is autoregulated by pre-existing nodules in the same root system. The altered profile of sap proteins by inoculation with *B. japonicum* may indicate presence of a signal responsible for autoregulation transferred through stem. The 20 kDa protein enhanced by innoculation significantly decreased in intensity from 2.5 to 7 days after inoculation (DAI). However 6 kDa protein did increase during such a transition period. Western blot analysis showed that both 20 kDa and 6 kDa were cross-reacted with the SKTI antiserum. This suggests that SKTI may be involved in soybean nodulation by specific induction and degradation in stem sap during early stage of nodulation.

RNAi technique and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation were applied to investigate the function of SKTI in nodulation. We have found that the number of rhizobium-induced nodule was much less in SKTI-silenced hairy roots than the non-silenced. Indeed the quantitative RT-PCR showed that the expression level of SKTI gene was reduced over 40% in the transgenic hairy roots compared to the non-transgenic. It appears that the observed early induction of SKTI and degradation into small peptide in a specific time manner may be involved in autoregulation of nodulation in soybean and the specific mechanism of such regulation remains to be investigated.

Keywords : nodulation, Kunitz trypsin inhibitor, SKTI, Hairy root transformation, soybean

콩과식물은 *Rhizobiaceae* 토양 박테리아와 종 특이적 상호작용을 통해 형성한 뿌리혹에서 질소를 암모니아로 고정하여 식물체에게 공급한다(Crespi & Galvez, 2000; Rolfe *et al.*, 2003). 식물이 분비한 저분자 화합물인 flavonoid에 유인된 박테리아는 nod factor의 생성과 분비를 유도하고(Geurts *et al.*, 2005; Gresshoff & Delves., 1986), 이에 반응하여 식물의 뿌리털에 변형(curling)이 생긴다(Esseling *et al.*, 2003; Müller & Schmidt, 2004). 변형된 뿌리털에 갇힌 박테리아는 새로이 형성된 감염사를 통해 cortex에서 형성되고 있는 뿌리혹 원기로 이동하여 symbiosome을 생성하고 그 내부에서 질소고정을 위한 박테로이드로 분화된다(Day *et al.*, 1989; Vasse *et al.*, 1990; Brewin, 2004). 성숙되어 뿌리 밖으로 돌출한 뿌리혹 내의 박테로이드는 식물로부터 탄소원과 에너지를 공급받아 leghemoglobin과 nitrogenase를 활용하여 대기 질소를 고정하여 식물에 공급한다(Udvardi & Day, 1997).

뿌리혹은 식물영양에 사용할 질소원을 생성하나 동시에 광합성으로 생성한 탄소 및 에너지를 소모하는 기관이기 때문에 식물체에 부담이 적은 수의 뿌리혹 형성은 필수적이다. 이를 위해 미생물과의 상호작용 과정 중 식물은 지상부와 뿌리 사이에서 뿌리혹 형성 억제물질과 이의 생성 유도물질의 이동을 통해 뿌리혹 형성의 자가조절이 이루어진다(Crespi & Galvez, 2000; Caetano-Anolles & Gresshoff, 1991). 뿌리혹 박테리아의 접종 2.5일 전후로 뿌리로부터 확인되지 않은 물질 Q가 지상부로 이동하며 GmNARK가 이에 반응하여 뿌리혹 형성 억제물질(SDI)을 접종 7일 전후에 뿌리로 내려 보내 새로운 뿌리혹의 형성을 억제한다. 이러한 시공에 따른 조절방식은 *Glycine max* nodule autoregulation receptor-like protein kinase(GmNARK)유전자의 돌연변이로 나타나는 supernodulating 변이체와 일반식물체의 접목을 통해 증명하

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-550-3626
(E-mail) sfeho@dankook.ac.kr <Received August 4, 2009>

였으나, 이에 참여하는 장거리 신호물질은 아직 분리 및 동정되지 않았다(Caetano Anolles & Gresshoff, 1991; Nishimura *et al.*, 2002; Searle *et al.*, 2003). *GmNARK*가 *Arabidopsis thaliana*의 성장점 분화에 작용하는 *Clavata1*과 높은 구조적 상동성으로 미루어 *Clavata1*에 ligand 결합을 통해 기능 조절을 담당하는 *CLV3*과 유사한 작은 크기의 펩타이드가 뿌리혹 형성 자가조절을 위해 이동하는 신호물질로 예상된다(Searle *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Djordjevic *et al.*, 2007).

콩의 Kunitz trypsin inhibitor(KTI)는 열처리 후 활성을 잃는 소화 억제 성분으로 20 kD의 Soybean KTI(SKTI)와 9 kD의 Bowman Birk의 두 가지 형태가 존재한다(Westfall & Hauge, 1948; Birk, 1961; Frattali & Steiner, 1968; Kunitz, 1945). Winged bean의 Kunitz trypsin inhibitor(KTI)는 줄기 체관부에서 뿌리혹 형성 초기에서 뿌리혹이 성숙될 때까지 그 양이 증가한다(Manen *et al.*, 1991; Habu *et al.*, 1996). 콩의 KTI인 SKTI는 물관부에 존재하며 *B. japonicum*을 접종했을 때 특이적으로 그 양을 증가하여 자가조절의 장거리 수송과 관련된 신호물질과 연관됨을 제시하였다(Djordjevic *et al.*, 2007).

RNA interference(RNAi)는 전사된 RNA가 세포내에서 이중나선 RNA를 형성하게 한 후 Dicer에 의해 잘려진 siRNA가 target RNA에 붙어 이를 분해하여 유전자 발현을 전사수준에서 저해함으로써 특정 유전자의 기능을 탐색하는 방법이다. *Agrobacterium rhizogenes*을 이용한 모상근 형질전환법은 비교적 짧은 시간 안에 형질전환 뿌리를 얻을 수 있으므로 RNAi기술을 적용한 뿌리혹 발생관련 유전자 기능 연구에 적합하다. 다른 식물에 비해서 콩과식물은 *A. tumefaciens*에 의한 형질전환율이 매우 낮은 것에 비하여 *A. rhizogenes*는 60%이상의 모상근 형질전환율을 얻을 수 있었다(McManus & Sharp, 2002; Waterhouse & Helliwell, 2003). RNAi를 이용하여 콩과식물 뿌리혹에서 leghemoglobin 유전자의 발현을 억제하여 식물체의 생육의 저하를 확인하였고(Ott *et al.*, 2005), *Medicago tucaula*의 DMI2의 발현을 저하하여 symbiosome의 형성을 억제하였다(Limpens *et al.*, 2005).

본 연구에서는 콩에서 일정한 수의 뿌리혹을 형성하기 위한 자가조절을 위해 뿌리와 줄기 사이로 이동하는 신호물질의 탐색과정에서 SKTI 단백질은 접종 후 신호 Q 이동 시기에 그 양이 증가하고, 신호 SDI 이동시기에 20 KD에서 6 KD으로 그 크기가 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 SKTI의 양적 질적변화의 양상과 자가조절 과정과의 시간적 일치성을 근거로 하여 SKTI가 뿌리혹 형성 또는 뿌리혹 형성의

자가조절에 관여할 가능성을 확인하였기에 이를 보고한다.

재료 및 방법

실험 재료

대원콩(충남 농업기술원 제공)과 신팔달콩 2호 및 SS2-2(신팔달콩 2호에 30 mM EMS를 처리하여 유도된 초다뿌리혹 변이계통; 서울대학교 농업생명과학대 식물생산과학부 작물유전체연구실 제공)를 실험재료로 사용하였다. 종자를 1% NaOCl 용액에서 5분간 표면살균하고 8회 증류수로 씻었다. 121°C, 40분간 고압 살균한 버미큘라이트를 채운 포트에서 26°C/20°C(주/야, 16 hr / 8 hr), 습도 70%, 180 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 의 광조건에서 발아 및 재배하였다. 생육기간 동안 B&D 용액(2 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM K_2SO_4 , 4 mM H_3BO_3 , 4 mM CuSO_4 , 2 mM MnSO_4 , 0.2 mM Na_2MoO_4 , 0.2 mM CoSO_4 , 1 mM ZnSO_4 , 20 mM Fe-citrate; Broughton & Dilworth, 1971)을 포트 당 1 L씩 일주일에 3회 공급하였다.

줄기 수액 단백질 분석

파종 후 9일된 식물체 뿌리에 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110을 접종한 후 2.5일 또는 7일이 경과하였을 때 식물체의 줄기를 잘라 무게를 잰 후 apoplastic solution(20 mM CaCl_2 , 20 mM Ascorbic acid)에 넣어 1.5시간동안 진공으로 용액을 침투시킨다. 주사기에 줄기절편을 넣어 30분간 4°C에서 1500 g로 원심분리하여 추출된 용액에 4배의 아세톤을 넣어 -20°C에서 16시간 침전한 후 13200 g에서 20분간 원심분리하고 진공 건조한 단백질을 줄기 생체중당 10 μl 의 2×protein sample buffer(0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.0025 g Brilliant Blue R)에 녹여 -20°C에서 보관하였다.

추출된 식물의 수액 단백질을 15% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 Nitrocellulose membrane(Protran, S&S사)을 Towbin buffer(18.3 mM Tris-Cl, 150 mM Glycine, 20% Methanol)에서 70 V로 2.5시간 electro-blotting한 membrane은 TBST(100 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 10분간 씻고, TBST에 5% nonfat dry milk가 포함된 용액으로 45분간 blocking하였다. Blocking 후 TBST로 membrane을 2회 씻고 일차항체를 1:1000의 비율로 TBST에 희석하여 30분간 반응시킨 후 TBST로 15분씩 4회 씻었다. 이차항체는(Anti-rabbit IgG-Horse Radish Peroxidase linked; GE Healthcare사) 1:5000의 배율로 희석하여 30분간 반응시키고 TBST에 5분간 4회 씻어준 후 Western

Blotting Detection System(ECL plus Kit, cat# RPN2132, Amersham)을 사용하여 가시화 한 다음 Melanie III program (Genebio 사)을 이용하여 신호를 정량화하였다.

SKTI 유전자 분리 및 벡터 구축

식물조직을 액체질소와 함께 막자사발에 넣어 분쇄하여 Tri-reagent(MRC 사)를 사용하여 Kit와 공급된 방법으로 RNA를 추출하였다. 진공 건조한 RNA pellet을 50 µl의 diethylpyrocarbonate(DEPC) water(0.1%, v/v)에 완전히 녹인 후 UV Spectrometer(UNICAM사)를 이용하여 260 nm에서 RNA 양을 측정하고 1 µg을 5x AMV reaction buffer 5 µl, 25 mM MgCl₂ 5 µl, 10 mM Deoxynucleotide mixture(dNTP) 2.5 µl, oligo dT 2 µl, RNase inhibitor(RNasin) 1 µl, AMV reverse transcriptase 3 µl에 혼합하여 25°C 10분, 42°C 60분, 99°C 5분, 4°C 5분의 조건에서 cDNA로 합성하였다.

합성한 SKTI cDNA는 SKTI(Ti-b; X64448) 전체 coding 염기서열에 따라 SKTI primer(정방향 5'-CAC CAT GAA GAG CAC CAT CTT CTT TGC T-3' 역방향 5'-TCA CTC ACT GCG AGA AAG GC-3')와 두개의 다른 primer(V-sub, 정방향 5'-CAC CGC AGT TAT AAT GCT GTG TGT TGG-3' 역방향 5'-CAT CAG AAA CTC TCT CAA TTC TAA ACC-3' / C-sub, 정방향 5'-CAC CCA CAG CAA GCT GAG GAT GA-3' 역방향 5'-TCA CTC ACT GCG AGA AAG GC-3')를 제작하고, Promega사의 dNTP를 이용하여 (cDNA 1 µg, 10 × Pfu reaction buffer 5 µl, 0.2 mM dNTP mixture, 10 pmol 정방향과 역방향 primer, MgCl₂, Pfu DNA polymerase) 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초씩 30회 반복하여 PCR을 수행하였다. 1% TAE agarose gel 전기영동으로 분리한 후 회수한 PCR 산물은 pENTR/D-TOPO (Invitrogen 사)에 키트에 포함된 방법에 따라 크로닝한 후 One Shot TOP 10 cell(Invitrogen 사)로 형질전환하고 kanamycin (50 µg/ml) LB 배지에서 선발된 콜로니에서 DNA-spin(Intron 사)을 이용하여 DNA를 추출하여 NotI과 EcoRV 제한효소로 잘려진 크기를 확인하고 바이오닉스(<http://www.bionicsro.co.kr>)에 염기서열분석을 의뢰하여 Chromas ver 1.45(Australia, <http://www.technelysium.com.au>) 프로그램과 NCBI Blast (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), EMBL-EBI(European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)를 통해 염기배열을 확인하였다.

각각의 유전자가 재조합된 pENTR/D-TOPO에 RNA interference 유도용 벡터인 pB7GWIWG2(I)-GFP벡터를 LR clonase II (Invitrogen 사)를 넣어 recombination 시키고 25°C 배양

기에서 1시간 동안 배양한 뒤, Proteinase K(Invitrogen 사) 1 µl를 넣고 잘 섞어 37°C 배양기에서 10분간 두어 반응을 멈추었다. *E. coli* One Shot TOP 10 cell(Invitrogen 사)에 위와 같은 방법으로 형질전환하였으며, spectinomycin(100 µg/ml)을 포함한 LB 배지에서 도말하여 37°C 배양기에서 16시간 배양한 후 생존 콜로니를 선발하였다. 선발된 콜로니에서 추출한 DNA를 EcoRI과 Hind III로 절단한 후 크기를 비교하여 RNAi용 유전자의 구축 여부를 확인하였다.

모상근 형질전환과 뿌리혹 형성

RNAi유도용 벡터로 형질전환이 확인된 DNA를 freeze-thaw 방법(안 & 남, 1999)을 이용하여 *Agrobacterium rhizogenes* K599에 도입한 후 spectinomycin(100 µg/ml)이 포함된 LB 배지에서 28°C, 200 rpm 조건으로 1일간 배양하고 3000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 멸균 증류수를 넣어 2회 씻고 최종 pellet을 멸균 증류수로 농도가 2.0 OD_{600nm}가 되도록 희석하였다. Kereszt *et al.*(2007)의 형질전환법을 약간 변형하여 파종 후 5일이 된 식물체에 1 ml 주사기(25G×5/8 mm, STR 메디컬)를 이용하여 자엽 아래 1cm 범위 내에서 사방에서 총 12개의 상처를 내어 100 µl의 현탁액을 접종하고 5일간 humid chamber에서 가습하면서 접종부위를 포함하여 자엽 상단부까지 복토하였다.

A. rhizogenes 접종 후 6일이 경과하였을 때 YMB배지 (0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl, 1% mannitol, 0.04% yeast extract, pH 6.8)에 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110을 28°C 배양기에서 90 pm으로 3-5일간 배양하여 0.2-0.3 OD_{600nm}에 도달한 후 토양에 접종하여 형질전환 모상근에 뿌리혹 착생을 유도하였다. *B. japonicum* 접종 후 13일에 원뿌리와 모상근을 구별하여 각각의 길이와 이에 착생된 뿌리혹 수를 조사한 후 각각의 뿌리와 뿌리혹을 구분하여 수확하고 증류수로 세척한 후 액체질소에 급속 냉동하여 -70°C에서 보관하였다.

형질전환 모상근 분석

*A. rhizogenes*에 의해 유도된 모상근을 액체질소와 함께 1.5 ml tube에서 유리 grinder로 분쇄하여 400 µl의 Plant Extraction Buffer(200 mM Tris-Cl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS)를 넣고 4°C, 12000 rpm에서 8분간 원심분리한 후 300 µl의 상등액에 동량의 isopropanol을 넣고 13000 rpm에서 5분간 원심분리하여 genomic DNA(gDNA)를 추출하였다. pB7GWIWG2(I)-GFP의 Bar 유전자 primer와 internal control로 Ubiquitin(SUBI-3; D28123.1) 유전자 primer를 이용하여 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30

초씩 30회 반복한 유전자 증폭을 통해 형질전환 여부를 확인하였다.

Roche사 프로그램(www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp)을 이용하여 real-time PCR용 SKTI유전자의 UPL primer(정방향 5'-GGA CCT GCT GTC AAA ATT GG-3', 역방향 5'-CAT CAG AAA CTC TCT CAA TTC TAA ACC-3')를 제작하고 UPL(Universal Probe Library)을 사용하여 전사량을 분석하였다. Tri-reagent(MRC 사) 방법으로 모상근에서 추출한 RNA로 합성한 cDNA를 template로 사용하여, UPL(SKTI : *Arabidopsis* #86, Roche 사), 10 pmole SKTI UPL 정방향 primer 1 μ l, 10 pmole UPL 역방향 primer 1 μ l, 2x IQ super mix(Bio-Rad사) 10 μ l를 혼합한 후 95 $^{\circ}$ C 3분 반응 후, 95 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초씩 40반복을 통해 증폭하였다. 콩의 actin 유전자의 UPL(actin : *Arabidopsis* #110, Roche 사) 0.2 μ l, 10 pmole actin primers(정방향 5'-GAT GCC GAG GAT ATT GAA CC-3', 역방향 5'-GGT CAA GGC AGG ATT TGC T-3')를 내적대조로 사용하고, Rotor Gene 6 Program(Corbett 사)의 $\Delta\Delta$ Ct방법으로 유전자 발현분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

B. japonicum USDA110 접종 시 줄기 수액 단백질은 그 수와 양에서 증가하였다(Fig. 1-A). 이는 줄기의 물관으로부터 추출된 수액 단백질들 중의 일부가 뿌리혹 발현 과정에서 콩과식물의 조직들 간의 신호전달 기능을 할 가능성을 보여준다. 특별히 콩의 뿌리혹 수를 조절하는 자가조절의 신호물질이 이동하는 시기로 알려진 *B. japonicum* USDA110 접종 후 2.5일(DAI)과 7일의 줄기 수액 단백질을 분석한 결

과 20 kDa과 6 kDa의 단백질이 특이한 발현양의 변화를 보였다. 20 kDa의 단백질은 2.5 DAI에서 강하게 발현되다가 7 DAI에서 점차 감소되었으나, 이와 반대로 6 kDa의 단백질은 2.5 DAI에서 약하게 발현되다가 7 DAI에서는 크게 증가되었다(Fig. 1-A). 이러한 단백질 발현의 변화는 신탄달콩2호 및 신탄달콩 2호 유래의 다량 뿌리혹 형성 돌연변이인 SS2-2에서도 유사하였으며 특별히 대원콩에서 가장 두드러지게 보인다(Fig. 1-A, B, C). 이에 20 kDa과 6 kDa의 단백질이 뿌리혹 형성 초기에 감염 및 자가조절의 신호물질과 관련할 것으로 추정하였다. Bragg와 Nts1007에서 추출한 줄기 즙액단백질을 대상으로 한 펩타이드 질량분석을 통해 20 kDa 단백질은 SKTI로 확인되었으나, 6 kDa 단백질은 동정되지 않았다(Djordjevic *et al.*, 2007).

SKTI항체를 이용한 대원콩의 수액 단백질 western 분석에서 20 kDa의 단백질과 6 kDa의 단백질 모두에서 강하게 항체와 특이적 반응을 보였다(Fig. 2). 이는 7 DAI에 증가하는 6 kDa 단백질이 SKTI의 일부로서 20 kDa 단백질이 분해되어 만들어진 것으로 추측된다. 강한 western 신호와 이전의 질량분석에 의해서 밝혀지지 않은 점으로 미루어 20 kDa SKTI 단백질이 분해되어 형성된 여러 종의 펩타이드들의 집합으로 여겨진다. Western 분석에서도 20 kDa은 *B. japonicum*접종 후 2.5일에서 강하게 나타난 후 7 DAI에서는 약하게 반응하였고 비 접종구에서는 2.5 DAI에서는 반응이 없다가 7 DAI에서는 약하게 항체와 특이적 반응을 보였다. 반면 6 kDa의 단백질은 *B. japonicum*를 접종하였을 때 2.5 DAI보다 7 DAI에서 더 강한 반응을 보였고 비 접종구에서는 20 kDa과 다르게 2.5 DAI와 7 DAI 모두 계속적으로 동일하게 발현되었다. MelanieIII(Genebio사)로 정량화하였을 때에 2.5 DAI에서 20 kDa의 SKTI가 7 DAI

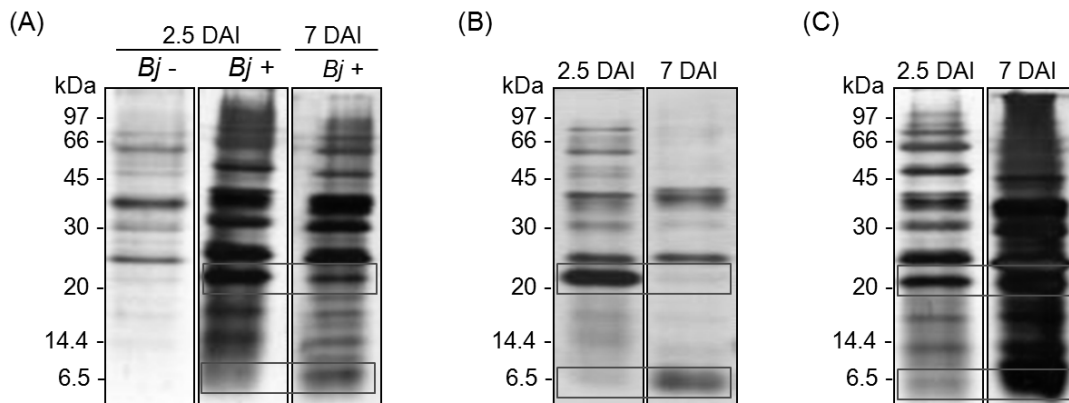


Fig. 1. SDS-PAGE gel image of sap protein extracted from soybean stem. Stem sap the proteins extracted from sinpaldalkong2ho (A), Daewonkong (B), and SS2-2 (C) at 2.5 days and 7 days after inoculation (DAI) with *B. japonicum*. 15% polyacrylamide gel was used and stained with silver nitrate.

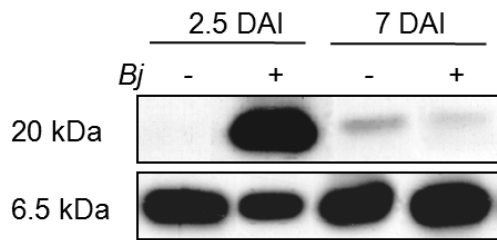


Fig. 2. Western analysis using a SKTI antiserum of stem sap protein from Daewonkong without(-)/with(+) inoculation of *B. japonicum* at 2.5 and 7 DAI.

보다 약 37.5배 이상의 단백질이 발현되고 작은 크기의 SKTI단백질은 2.5 DAI에서 7 DAI가 될 때 약 2배 정도 증가되었다. 이러한 결과를 통해 20 kDa의 SKTI단백질이 콩의 뿌리혹 착생 초기단계인 2.5 DAI에 그 양이 증가하였다가 7 DAI로 진행될 때 6 kDa의 작은 크기의 단백질로 분해되는 것으로 여겨진다.

감염초기인 2.5 DAI에서 강하게 발현된 SKTI도 뿌리혹 박테리아 감염초기에 protease 활성을 낮추는 조절물질로 작용하다가, 7 DAI에서는 SKTI 단백질 자체가 분해되어 protease의 활성회복을 통해 뿌리혹 형성 억제가 일어날 가능성이 있다. 이와는 별도로 물리적 상처에 반응하여 protease inhibitor 등의 발현을 유도하는 systemin, 식물세포 분열을 촉진하는 phyto-sulfokine(PSK), 성장점 발생에 관여하는 CLV3 등이 식물의 세포와 세포 또는 기관과 기관간의 이동하는 신호물질로 작용하는 것으로 알려져 있다(Matsubayashi et al., 2001). 이에 20 kDa SKTI의 분해산물인 6 kDa의 펩타이드가 그 자체로 7 DAI에서 뿌리혹의 발생을 억제하는 신호물질로 작용할 가능성도 생각할 수 있다.

2.5 DAI에 발현된 SKTI가 뿌리혹 형성 초기단계에 영향을 주거나 또는 7 DAI에 분해되어 다르게 영향을 줄 가능성을 확인하기 위하여 SKTI 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 방법을 적용하였다. 약 60%의 수준의 상동성 보이는 SKTI family에 속한 17개의 유전자들 중에서 상동하는 단백질이 가장 많이 축적되는 것으로 알려진 SKTI-b (Hymowitz & Kaisuma, 1981)의 cDNA를 콩에서 직접 분리하였다(Fig. 3). SKTI-b 전체 단백질 암호 염기배열(SKTI-b)과 모든 SKTI에서 공통적으로 존재하는 136bp(cDNA상의 315번 염기에서 451까지 포함)의 C-sub 그리고 SKTI-b 유전자의 특이부분의 170bp(cDNA상의 484염기에서 654까지)의 V-sub를 구별하여 증폭한 후 각각의 cDNA를 회수하고 Cloning 벡터(pENTR/D-TOPO)에 크로닝한 후 LR clonase II(Invitrogen 사)로 RNAi 유도용 벡터(pB7GWIWG2 (I)GFP)로 재조합한 SKTIi, C-subi, V-subi를 *A. rhizogenes* K599

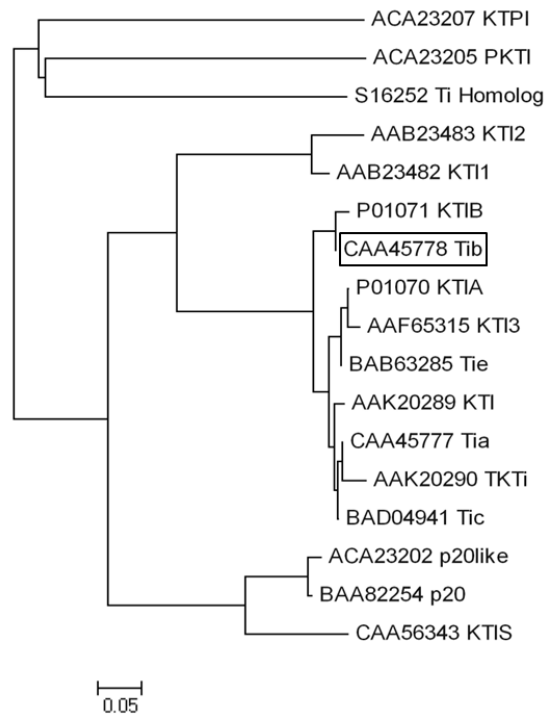


Fig. 3. Phylogenetic tree of coding sequences of soybean Kunitz trypsin inhibitors (SKTI). Each amino acid sequence encoding for *GmSKTI* gene family was obtained in NCBI database. Multiple alignment of all the sequences was performed by ClustalW. Based on these data, the tree was constructed using neighbor joining method in MEGA4.

로 형질전환하였다.

평균 증류수를 접종한 식물에 비해 *A. rhizogenes*를 접종한 식물에서만 모상근이 발생을 유도하여 *A. rhizogenes*에 의한 형질전환을 통해서 모상근이 유도되는 것을 확인하였다. 이에 특별한 재조합 벡터를 포함하지 않은 *A. rhizogenes*를 접종한 식물체와 SKTI RNAi 유전자를 형질전환한 *A. rhizogenes*을 접종한 식물의 모상근에 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110을 접종하여 뿌리혹 생성을 비교하였다(Fig. 4).

*A. rhizogenes*는 모상근을 유도하는 Ri plasmid와 RNAi를 유도를 위해 삽입시킨 plasmid 2개가 함께 있기 때문에 식물체로 형질전환될 때 2개의 plasmid가 같이 발현되어 유도된 각각의 모상근의 형질전환 여부의 확인이 필요하다. 따라서 모상근 및 뿌리혹을 구분하여 수확하고 10개씩 무작위로 선발하여 genomic DNA를 추출하였다. 콩의 internal control인 ubiquitin과 RNAi유도 벡터 내의 bar유전자를 목표로 PCR하여 약 80%의 형질전환율을 확인하였다. 실제 형질전환이 확인된 hairy root에 착생된 뿌리혹의 수는 *A. rhizogenes*만 접종하였을 때 16.3, SKTIi는 5.2, V-subi는 14.4,

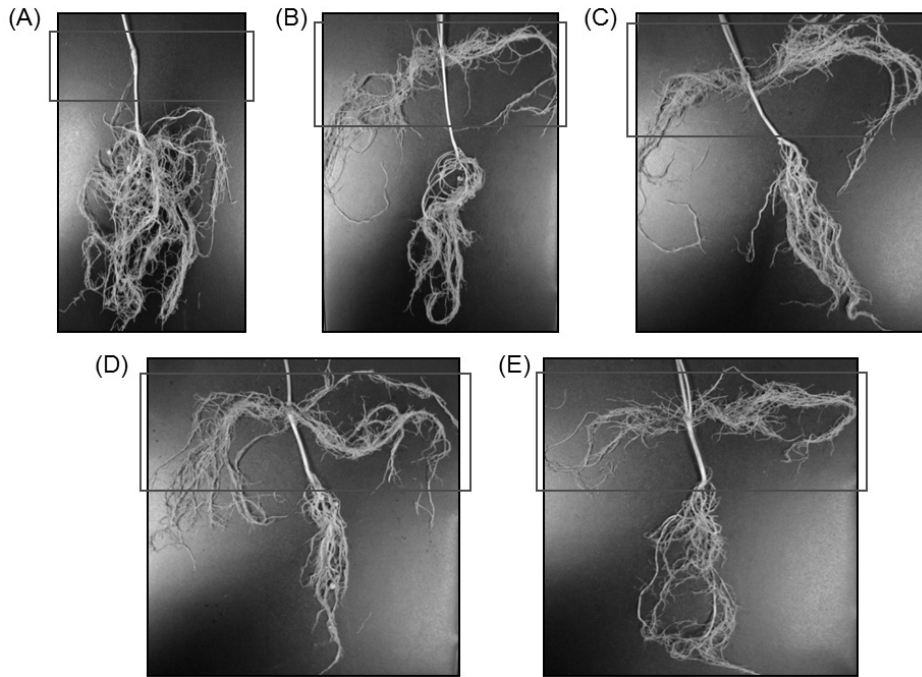


Fig. 4. Hairy roots and nodules formed after *A. rhizogenes*-mediated transformation at 13 DAI of *B. japonicum* USDA 110. (A) Mock; (B) *A. rhizogenes* K599; (C) ArK in pB7GWIWG2(I)GFP::SKTIi (D) ArK in pB7GWIWG2(I) GFP::V-subi (E) ArK in pB7GWIWG2(I)GFP::C-subi.

Table 1. The numbers of nodule formed per hairy root transformed with SKTI RNAi gene using whole (SKTIi) or parts (V-subi, C-subi) of the gene

Treatment	Daewon Kong
Nodule number per hairy root (EA)	
ArK	16.3
ArK in SKTIi	5.2
ArK in V-subi	14.4
ArK in C-subi	11.5

C-subi는 11.5로 전체 hairy root에 착생된 뿌리혹 수를 비교했을 때와 유사한 결과를 나타냈다(Table 1). 이는 SKTI 유전자 전체를 RNAi를 이용하여 억제시켰을 때 가장 크게 뿌리혹 수가 감소되고 SKTI의 공통부위로 RNAi 방법을 적용한 경우(C-subi)에서도 어느 정도 감소된 것으로 보이나 SKTI-b 특이 부위를 RNAi 유전자로 사용한 경우(V-subi)는 뿌리혹 생성의 억제가 나타나지 않았다. *B. japonicum* 접종시 모상근들 간의 성장정도의 차이가 커서 모상근들 간의 뿌리혹 착생정도가 큰 차이를 보이므로 모상근에서의 뿌리혹 형성 정도를 비교하기 위한 방법으로 유도된 모상근 단위 중량당 뿌리혹의 수 등을 사용하였는데(Hayashi *et al.*, 2008), 본 연구에서는 모상근의 단위수로 중량을 대신하는 지표로 사용

하였다. 뿌리혹 수가 감소한 것으로 나타난 SKTIi와 C-sub의 경우는 높은 염기배열 상동성으로 미루어 SKTI-b와 이외의 다른 SKTI 유전자들의 발현을 동시에 억제할 것으로 보인다. 이에 비해 SKTI-b에 특이적인 염기배열만을 이용하여 SKTI-b 유전자의 발현만을 억제할 것으로 예상되는 V-sub는 뿌리혹 수가 감소하지 않았다. 이를 통해 SKTI family의 다른 SKTI가 뿌리혹형성 초기의 감염을 조절할 것으로 여겨진다.

SKTI RNAi 유전자가 형질전환 모상근에서 SKTI유전자 발현의 감소를 확인하기 위하여 추출한 RNA를 대상으로 UPL(Universal Probe Library, Roche 사)을 이용한 실시간 PCR로 SKTI의 전사체 축적량을 비교하였다. SKTIi, C-subi와 V-subi를 형질전환한 모든 모상근에서 *A. rhizogenes* 형질전환 모상근과 비교하여 SKTI 전사체 양이 줄었다. 특히 SKTIi는 약 75%의 SKTI 전사체가 감소하였고 C-sub와 V-sub의 경우는 비슷하나 C-sub가 약간 더 낮았다(Fig. 5). 이는 형질전환 모상근당 뿌리혹 생성수의 감소 결과와 상응하는 것으로 뿌리혹의 감소가 SKTI-b와 유사한 다른 SKTI에 의해서 조절되는 것을 분자수준에서 확인하였다.

*Sesbania rostrata*의 protease inhibitor는 뿌리혹 발생과 관련하여 뿌리혹 내의 비감염세포에서 발현되어 박테리아를 감염세포만으로 제한하여 더 이상의 확산을 억제하는 것

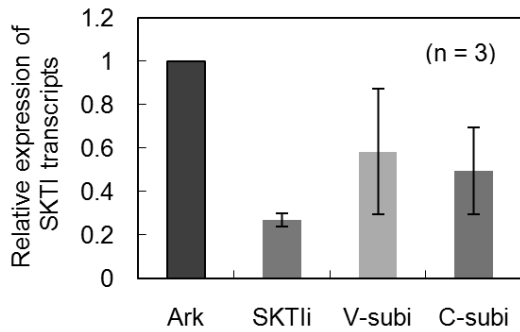


Fig. 5. SKTI mRNA levels in the hairy roots transformed with *A. rhizogenes* and three SKTI RNAi determined by real time-PCR. As an internal control, the ubiquitin (ubi) gene transcript was used for normalization.

으로 그 기능을 추정하였다(Lievens *et al.*, 2004). 이에 콩 뿌리혹 발생의 초기에 SKTI의 발현량의 증가와 작은 크기의 절단은 성장 및 분화하는 뿌리혹 내의 감염세포와 비감염세포의 적절한 비율 유지를 위해 SKTI의 양 및 활성을 조절하는 것으로 생각된다. SKTI 유전자 발현억제에 따른 뿌리혹의 생성억제는 이러한 감염세포 대 비감염세포 비율을 교란하여 일어나는 것으로 여겨진다.

적 요

콩과식물의 뿌리혹 형성을 조절하는 신호물질의 확인을 위해 신평달콩2호의 줄기 수액 단백질 중에서 *B. japonicum* USDA110의 접종 후 2.5일(DAI)에 20 kDa의 SKTI 단백질이 증가하였다가 7 DAI에는 감소되면서 6 kDa의 작은 크기의 단백질이 증가되었다. 이러한 단백질의 차등발현은 조사한 3종의 콩에서 모두 유사하게 나타났으며 특히 대원콩에서 가장 두드러졌다. Western 분석으로 7 DAI에서 증가하는 6 kDa 단백질이 SKTI 항체와 특이적 반응을 하는 것으로 확인하여 SKTI가 절단되어 생긴 펩타이드로 추정되었다. 이러한 결과를 통해 20 kDa의 SKTI 단백질이 콩의 뿌리혹 착생 초기단계인 2.5 DAI에 영향을 주고, 7 DAI로 진행되면서 6 kDa의 작은 크기의 단백질로 분해되어 그 양이 감소하는 것으로 생각된다.

RNAi를 이용하여 유전자 기능이 억제된 형질전환된 모상근의 뿌리혹을 실제 형질전환이 확인된 모상근에 착생된 뿌리혹의 수를 비교한 결과 비재조합 *A. rhizogenes*을 접종시킨 대조구에 비해 SKTI RNAi 유전자를 형질전환한 모상근에서 모상근 당 착생된 뿌리혹 수가 감소되었다. 실시간 PCR 방법으로 형질전환된 모상근의 SKTI 전사체 수준에서도 상응하는 차이를 확인하였다. 이에 정확한 기작을 알

수 없지만 SKTI 유전자가 뿌리혹 형성 초기에 뿌리혹 형성과정에 직간접적으로 관련하고 있음을 확인하였다. *Sesbania rostrata*의 뿌리혹 발생과정의 Protease 저해제와 같이 뿌리혹 내의 감염세포 대 비감염세포의 비율을 조절하는 SKTI 발현 억제는 이러한 균형을 교란하여 뿌리혹의 생성을 억제하는 것으로 추정된다.

사 사

이 연구는 단국대학교 2008년 일반연구비 지원(과제번호: 58819)으로 수행되었음.

인용문헌

- Birk, Y. 1961. Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and alpha-chymotrypsin from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta*, 54, 378-381.
- Brewin, N. J. 2004. Plant cell wall remodelling in the Rhizobium-legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23 : 293-316.
- Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P. M. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45 : 345-382.
- Crespi, M. and Galvez, S. 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *J. Plant Growth Reg.* 19 : 155-166.
- Day, D. A., Price, G. D., and Udvardi, M. K. 1989. Membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum-Glycine max* symbiosis: peribacteroid membrane unit from soybean nodules. *Aust J Plant Physiol.* 16 : 69-84.
- Djordjevic, M. A., Oakes, M., Li, D. X., Hwang, C. H., Hocart, C. H., Gresshoff, P. M. 2007. The *Glycine max* xylem sap and apoplast proteome. *J. Proteome Res.* 6(9) : 3771-3779.
- Esseling, J. J. Lhuissier, F., Emons, A. M. C. 2003. Nod factor induced root hair curling: continuous polar growth toward the point of Nod factor application. *Plant Physiol.* 132 : 1982-1988.
- Frattali, V. and Steiner, R. F. 1968. Soybean inhibitors. I. Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry.* 7(2) : 521-530.
- Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 : 346-352.
- Gresshoff, P. M. and A. C. Delvels. 1986. Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Plant Gene Research* 3 : 159-206.
- Habu, Y., Fukushima, H., Sakata, Y., Abe, H., Funada, and R. 1996. A gene encoding a major Kunitz proteinase inhibitor of storage organs of winged bean is also expressed in the phloem of stems. *Plant Mol. Biol.* 32(6) : 1209-1213.

- Hayashi, S., Gresshoff, P. M., and Kinkema, M. 2008. Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(6) : 843-53.
- Hymowitz, T. and N. Kaizuma. 1981. Soybean seed proteins electrophoresis profiles from 15 Asian countries or regions: hypotheses on paths of dissemination of soybeans from China. *Economic Botany* 35(1) : 10-23.
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Mnguyen G. DT, Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., and Gresshoff, P. M. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols* 2(4) : 948-952.
- Kim, M. Y., Van, K., Lestari, P., Moon, J. K., and Lee, S. H. 2005. SNP identification and SNAP marker development for a GmNARK gene controlling supernodulation in soybean. *Theor Appl Genet.* 110 : 1003-1010.
- Kunitz, M. 1945. Crystallization of a soybean trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101 : 668-669.
- Lievens, S., Goormachtig, S., and Holsters, M. 2004. Nodule-enhanced protease inhibitor gene: emerging patterns of gene expression in nodule development on *Sesbania rostrata*. *J. Exp. Bot.* 55(394) : 89-97.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., and Geurts, R. 2005. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 : 10375-10380.
- Manen, J. -F., Simon, P., Van Slooten, J. -C., Osteras, M., Frutiger, S., and Hughes, G. J. 1991. A nodulin expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor. *Plant Cell* 3 : 259-270.
- Matsubayashi, Y., Yang, H., and Sakagami, Y. 2001. Peptide signals and their receptors in higher plants. *Trends in Plant Sci.* 6(12) : 573-7.
- McManus, M. T. and Sharp, P. A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3 : 737-747
- Müller, M. and Schmidt, W. 2004. Environmentally Induced Plasticity of Root Hair Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134 : 409-419.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G. J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., and Kawaguchi, M. 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature.* 420 : 426-429.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M. K. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15 : 531-535.
- Rolfé, B. G., Mathesius, U., Djordjevic, M., Weinman, J., Hocart, C., Weiller, G., and Bauer, W. D. 2003. Proteomic analysis of legume-microbe interactions. *Comparative and Functional Genomics* 4 : 225-228.
- Searle, I. R., Men, A. E., Laniya, T. S., Buzas, D. M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B. J., and Gresshoff, P. M. 2003. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299 : 109-112.
- Udvardi, M. K. and Day, D. A. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 : 493-523.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol.* 172(8) : 4295-4306.
- Waterhouse, P. M. and Helliwell, C. A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature.* 4 : 29-38.
- Westfall, R. J. and Hauge, S. M. 1948. The Nutritive Quality and the Trypsin Inhibitor Content of Soybean Flour Heated at Various Temperatures: Two Figures. *J. Nutr.* 35 : 379-389.
- 안진홍, 남홍길. 1999. 식물분자생물학연구법. 아카데미서적. pp. 97-114.