

카드뮴과 구리에 노출된 *Rhizophora stylosa*의 phytochelatin synthase 1 유전자 클로닝 및 발현

이건섭¹, 황진익¹, 박미례¹, 정영재², 이택권^{1*}

¹한국해양과학기술원 남해특성연구부, ²신경대학교 생명공학과

Cloning and Expression of Phytochelatin Synthase 1 Gene from *Rhizophora stylosa* Exposed to Cadmium and Copper

Gunsup Lee¹, Jinik Hwang¹, Mirye Park¹, Youngjae Chung² and Taek-Kyun Lee^{1*}

¹South Sea Environment Research Department, Korea Institute of Ocean Science and Technology

²Department of Life Science and Biotechnology, Shin Gyeong University

요약 망그로브 생태계는 수생태계로 유입되는 중금속을 받아들이는 기능을 가지고 있다. 중금속에 오염된 퇴적물에 노출됨에도 불구하고 망그로브는 중금속에 내성을 가지고 있다. 이 연구에서 우리는 망그로브로부터 중금속 저항성 관련 유전자를 클로닝하고, 중금속 노출에 유전자 발현 변화를 분석하였다. 미크로네시아 측라군의 웨노섬에서 채취한 *Rhizophora stylosa*의 잎과 뿌리조직으로부터 CTAB 방법을 이용하여 RNA를 분리하였고, gene specific primers를 이용하여 phytochelatin synthase 1(PCS1) 유전자를 클로닝하였다. *R. stylosa* 태생종자를 100 ppb의 Cd과 10 ppb의 Cu에 노출하였을 때 각각 1.91배 및 2.72배 발현이 증가하였다. 이러한 결과는 PCS1 유전자의 발현분석이 망그로브 생태계의 건강성을 평가하기 위한 좋은 도구가 될 수 있음을 나타낸다.

Abstract The mangrove ecosystems have the capacity to act as a sink of heavy metals entering aquatic ecosystems. Despite their potential exposure to metal contaminated sediments, mangroves appear to be highly tolerant to heavy metals. In this study, we cloned metal tolerance gene from mangrove plant. Using CTAB method, RNA were isolated from leaves and root tissue of *Rhizophora stylosa* habitated at Weno island in Micronesia Chuuk lagoon using CTAB method and phytochelatin synthase 1 (PCS1) gene was cloned using gene specific primers. Expression of PCS1 gene was increased 1.91 fold and 2.72 fold in mangrove propagules exposed to 100 ppb Cd and 10 ppb Cu, respectively. These results indicate that expression of PCS1 gene are promising tools for health assessment of mangrove ecosystem.

Key Words : Biomarker, Cadmium, Copper, PCS1, *Rhizophora stylosa*

1. 서론

망그로브 생태계는 도시개발과 밀접히 관련되어 있기 때문에 심각한 오염에 직접적으로 노출되어 있다. 다른 습지처럼 망그로브 생태계는 인간활동의 결과 발생한 다양한 생활하수 및 산업폐수가 배출되는 지역이며, 중금속이 포함된 고체 쓰레기를 버리는 지역으로 널리 이용되어 왔다[1,2].

망그로브 생태계는 중금속과 영양성분의 확산을 저지하는 탁월한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3,4]. 망그로브 생태계는 식물에게 오염원이 될 수 있는 중금속의 sink로써 작용한다. 망그로브 식물은 고농도의 중금속 오염에 대한 높은 내성을 가지고 있지만[2], 중금속 오염이 심각해지면 망그로브 식물체 내에 세포수준에서의 손상을 유발하거나 더 넓은 범위의 식물 독성반응을 일으키는 물질대사 반응이 일어난다[5].

본 논문은 한국해양과학기술원(PE99161)의 연구과제로 수행되었음.

*Corresponding Author : Taek-Kyun Lee(KIOST)

Tel: +82-55-639-8630 email: tklee@kiost.ac

Received March 29, 2013

Revised May 6, 2013

Accepted June 7, 2013

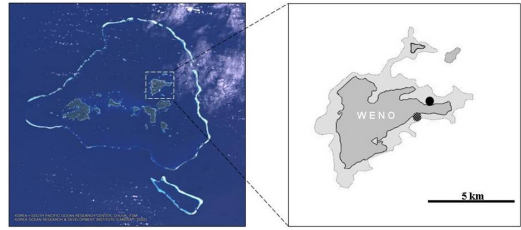
생리적으로 요구되는 농도 이내로 필수 금속의 농도를 유지하고 불필요한 금속의 악영향을 최소화시키기 위하여 식물은 복잡한 항상성 기작을 개발하였다. 이러한 기작에는 수송, chelation, 구획화, 배출 및 격리 배출 등이 있으며[6], 이들을 통해 금속이온의 흡수, 축적, 이동 및 해독작용을 조절하게 된다. 식물의 항상성 조절 기작 중 chelation은 주요 해독작용 중 하나이며, 식물세포에는 phytochelatins(PCs)이나 metallothioneins(MTs) 같은 high-affinity ligands가 가장 잘 알려져 있다[7]. PCs는 (-Glu-Cys)_n-Gly 구조(n=2-11)를 가진 폴리펩티드이며, phytochelatin synthase 유전자(PCS)에 의해 glutathione (GSH)으로부터 합성된다. PCs는 카드뭴, 구리, 아연 등 중금속을 킬레이트시키는 것으로 알려져 있으며, 식물 뿐만 아니라 일부 미생물에서도 존재가 확인되었다[8,9]. 또한 PCs는 중금속을 액포로 이동시킴으로써 중금속 해독 작용을 하는 것으로 알려져 있다[9]. Phytochelatin synthase(PCS) 유전자가 여러 식물에서 클로닝되고 특성이 연구되었지만, 중금속으로 오염된 퇴적 연안환경에서 자라는 식물에서의 PCS 유전자 발현에 관해서는 거의 연구된 바 없다.

카드뭴과 구리같은 중금속은 막투과성, 광합성 관련 효소 저해작용 등을 통해 세포수준에서 독성영향 및 항산화 과정을 유도한다[10]. 그러나 여러 세포기관에서의 필수 금속이온의 농도를 유지하고 불필요한 금속이온에 대한 손상을 최소화하기 위한 분자 기작은 아직까지 잘 이해되지 않고 있다. 본 연구에서는 미크로네시아 축주의 웨노섬에 서식하고 있는 *Rhizophora stylosa*로부터 중금속 관련 유전자인 PCS1 유전자를 클로닝하였으며, 카드뭴과 구리에 노출된 *R. stylosa*의 PCS 유전자 발현 변화를 분석하였다. PCS 발현의 변화는 망그로브의 건강성 평가를 위한 분자바이오마커로서 적용될 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1 태생종자 채집 및 배양

미크로네시아 축 라군[Fig. 1]에 서식하고 있는 *R. stylosa*의 태생종자를 채집하여 항온 실험실(25 °C)에서 해수를 이용하여 뿌리가 내릴 때까지 8주 동안 배양한 후 중금속 노출 실험을 수행하였다.



[Fig. 1] Chuuk lagoon image and station for mangrove sampling

2.2 PCS1 유전자 클로닝

Total RNA는 CTAB을 사용한 Pine Tree 법을 사용하여 *R. stylosa* 잎과 뿌리조직으로부터 추출하였다. 첫 번째 cDNA 사슬은 1.5 pM의 oligo(dT) primers와 5 mg의 total RNA와 SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen)를 사용하여 합성하였다. PCS1에 대하여 고안된 GSP primer (forward 5'-GCCTGGAGATGGTTTGATG-3' 및 reverse 5'-GCCACCAATAGGTGAAAAATG-3')를 사용하여 유전자를 클로닝하였다. PCR은 DNA thermocycler PT-100 (MJ Research)를 사용하였으며, 94°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C 45초, 60°C 45초, 72°C 90초를 40회 반복하고 72°C에서 10분간 반응시키는 조건으로 PCR한 후, TA 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

2.3 중금속 노출 및 PCS1 발현 분석

R. stylosa 태생종자를 항온실험실에서 배양한 소식물체에 100 ppb 농도의 카드뭴과 10 ppb 농도의 구리를 6, 12, 24, 48시간 동안 처리한 후 total RNA를 추출하여 카드뭴과 구리 처리 시간에 따른 PCS1 유전자 발현 정도를 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 비교하였다.

2.4 통계분석

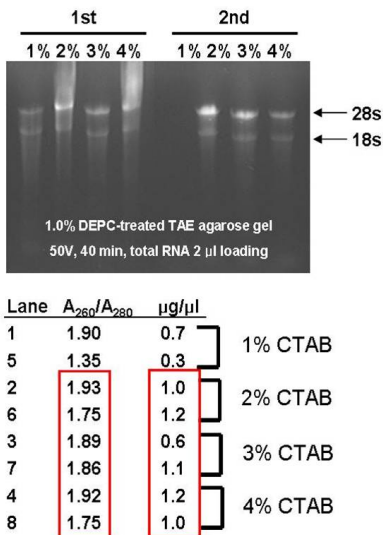
통계분석은 SPSS 통계 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 데이터의 normality와 homogeneity는 ANOVA로 확인하였고, 실험구 간의 차이는 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test로 평가하였다.

3. 결과

3.1 mRNA 추출 및 PCS1 유전자 분리

망그로브는 폴리페놀, 다당류 및 다른 이차대사산물을 다량 함유하고 있기 때문에 양질의 RNA를 추출하는 것이 매우 어려운 것으로 알려져 있다[11]. 페놀성 화합물

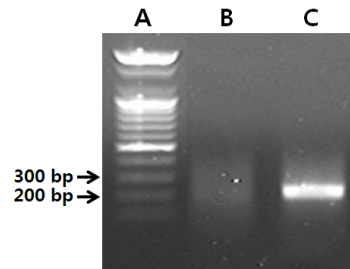
이 쉽게 산화되고 quinones과 공유결합을 형성하여 핵산에 결합하고[12], 다당류는 이온 강도가 낮은 완충용액에서 RNA와 함께 침전되는 특성을 갖는다. 여러 가지 상용화된 RNA 분리 방법이 있지만 CTAB 방법이 가장 바람직한 것으로 보고되고 있다[11]. 본 연구에서도 CTAB 방법을 사용하여 *R. stylosa*의 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출을 위한 최적의 조건을 확립하기 위하여 다양한 농도의 CTAB 용액을 이용하여 *R. stylosa* 잎과 뿌리 조직으로부터 total RNA를 추출하였다. 추출조건을 정립하기 위한 실험 결과, 2-4% CTAB 농도에서 잎보다는 뿌리조직을 사용하였을 때 최적의 total RNA가 추출되었다[Fig. 2].



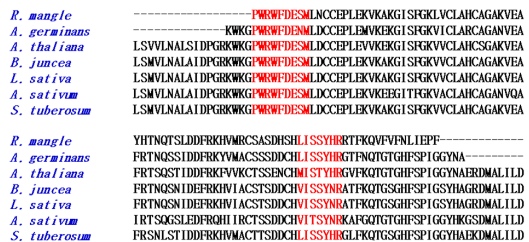
[Fig. 2] Total RNA extraction from *R. stylosa* root by variable concentrations of CTAB.

PCS1 유전자의 클로닝을 위해 Oligo-dT primer와 gene specific primer(GSP)를 이용하였다. PCS1 유전자의 GSP primer는 *Avicennia germinans* PCS1 유전자 클로닝에 사용된 GSP primer[13]를 사용하였다. 연구 결과 Oligo-dT로 RT-PCR을 수행하였을 때 PCS1 유전자의 PCR 산물을 확인할 수 없었지만, GSP primer를 이용한 경우 270 bp 크기의 PCR 산물을 얻을 수 있었다[Fig. 3].

PCS1 PCR 산물을 TA 벡터에 클로닝하여 유전자 염기서열을 분석한 후, 아미노산 서열을 *Avicennia germinans*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *Lactuca sativa*, *Allium sativum*, *Solanum tuberosum*과 비교 분석해 본 결과, 보고되어 있는 각 종의 PCS1 아미노산 서열과 97%의 높은 상동성이 있음을 확인하였다[Fig. 4].



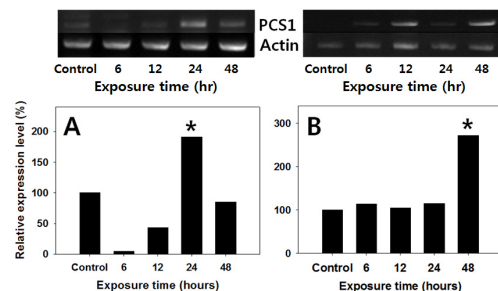
[Fig. 3] RT-PCR for PCS1 gene from *R. stylosa*. A, 100 bp ladder; B, Oligo-dT primer; C, GSP primer.



[Fig. 4] Amino acid alignment of PCS1 sequence

3.2 중금속 처리 및 PCS1 유전자 발현 분석

Preliminary 실험을 통해서 Cd 100 ppb 및 Cu 10 ppb를 중금속 노출시간에 따른 PCS1 유전자 발현실험의 농도로 결정하였다. 6, 12, 24, 48시간 동안 100 ppb 농도의 카드뮴과 10 ppb 농도의 구리에 노출된 *R. stylosa* 뿌리 조직에서 total RNA를 추출한 후, GSP primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 카드뮴과 구리에 노출된 *R. stylosa*의 PCS1 유전자 발현을 분석해 본 결과, 100 ppb 농도의 카드뮴에 노출된 경우 24시간 후 PCS1 유전자의 발현이 대조군에 비해 1.91배 증가했으며, 10 ppb 농도의 구리에 노출된 경우 48시간 후 PCS1 유전자의 발현이 2.72배 증가하였다($p < 0.05$).



[Fig. 5] PCS1 gene expression in *R. stylosa* exposed to heavy metal

4. 고찰

망그로브 생태계는 다양한 조건에 습지이며, 주로 열대 및 아열대 연안에 위치하고 있다. 망그로브 생태계는 생산성이 매우 높으며, 연안역에서의 주요 일차생산자의 역할을 담당하고 있다. 망그로브 생태계는 많은 유생 어류 및 갑각류의 서식환경 및 양육지를 제공하기 때문에 직·간접적으로 사회-경제에 미치는 영향이 매우 크다. 망그로브 생태계는 또한 연안 육지의 침식억제 및 안정화에 기여한다[14]. 망그로브의 중요성에도 불구하고 망그로브 생태계는 육지 개간 및 지속가능하지 않은 삼림 관리 뿐만 아니라 농업이나 양식 등을 위해 개발되어 왔고 부적절한 관리하에 놓여져 왔다[15,16].

인간활동의 결과 배출된 주요 오염원 중 하나는 중금속이다[10]. 중금속은 분해되지 않기 때문에 식물은 중금속 독성을 감소시키기 위한 효과적인 전략이 만들어져야 한다. 최근에 오염된 흙이나 물을 정화하기 위한 생물정화제로써 식물을 사용하는 생물정화기술이 활발하게 연구되고 있다[17-19]. 생물체는 중금속독성에 대해 자신을 보호하기 위해 2가지 주요한 전략 즉 회피(avoidance)와 내성(tolerance)을 진화시켜 왔다. 회피는 중금속 흡수를 감소시키거나 금속이온의 배출을 증가시킴으로써 세포질 내로의 중금속의 진입을 억제하는 것이며, 내성은 높은 세포내 금속농도에서 살아가는 생물의 특징으로 MTs와 PCs에 의한 세포내 chelation 또는 액포내로의 격리[7] 및 산화스트레스에 대한 방어기작의 증가 등을 통하여 독성에 저항하게 된다[19].

이제까지 망그로브 유래 중금속 관련 유전자 발현 분석연구가 주로 *A. germinans*를 중심으로 연구되어 왔던 것과는 달리 본 연구에서는 미크로네시아 축 라군의 웨노섬에 서식하고 있는 *R. stylosa*의 중금속에 대한 건강성 평가를 목적으로 중금속 관련 유전자 바이오마커를 개발하고자 하였다. 본 연구를 통하여 망그로브 조직으로부터 RNA와 PCR을 위한 조건을 정립하였으며, GSP primer를 이용하여 *R. stylosa*의 PCS1 유전자를 클로닝하였다. 카드뮴과 구리에 노출된 망그로브 식물체에서 클로닝된 PCS1 유전자의 발현이 변화하였다. 본 연구의 결과로 개발된 분자바이오마커는 향후 축라군의 망그로브의 건강성 평가를 위한 좋은 연구방법을 제공하게 될 것이며, 망그로브 보존 및 관리를 위한 정책적 자료의 축적을 위한 기반자료로 사용될 수 있을 것이다

References

- [1] P. Saenger, D. McConchie, M. W. Clark, "Mangrove forests as a buffer zone between anthropologically polluted areas and the sea". In: Saenger, P. (Ed.), Proceedings of the 1990 CZM Workshop, Yeppoon, Qld, pp 280-297, 1990.
- [2] E. C. Peters, N. J. Gassman, J. C. Firman, R. H. Richmond, E. A. Power, "Ecotoxicology of tropical marine ecosystems". Environ. Toxicol. Chem. vol. 16, no. 1, pp. 12-20, 1997.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620160103>
- [3] A. I. Roberson, M. J. Phillips, "Mangroves as filter of shrimp pond effluent: prediction and biogeochemical research needs". Hydrobiologia. vol. 295, no. 1-3, pp. 311-321, 1995.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00029138>
- [4] N. F. Y. Tam, Y. S. Wong, "Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater". Environ. Pollut. vol. 94, no. 3, pp. 283-291, 1996.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00115-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00115-7)
- [5] J. Vangronsveld, H. Clijsters, "Toxic effects of metals". In: Farago, M.E. (Ed.), Plants and The Chemical Elements-Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity. VCH, Weinheim, pp. 149-177, 1994.
- [6] S. Clemens, "Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis". Planta vol. 212, no. 4, pp. 475-486, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004250000458>
- [7] J. L. Hall, "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance". J. Exp. Bot. vol. 53, no. 366, pp. 1-11, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>
- [8] W. E. Rauser, "Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and function". Plant Physiol. vol. 109, no. 4, pp. 1141-1149, 1995.
- [9] C. Cobbett, P. Goldsbrough, "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis". Annu. Rev. Plant Biol. vol. 53, pp. 159-182, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- [10] G. R. MacFarlane, "Leaf biochemical parameters in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh as potential biomarkers of heavy metal stress in estuarine ecosystems". Mar. Pollut. Bull. vol. 44, no. 3, pp. 244-256, 2002.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00255-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00255-7),
- [11] X. Fu, S. Deng, G. Su, Q. Zeng, S. Shi, "Isolating

high-quality RNA from mangrove without liquid nitrogen". *Plant Mol. Biol. Reporter*, vol. 22, no. 2, pp. 197a-197e, 2004.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02772728>

[12] W. D. Loomis, "Overcoming problems of phenolic and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. *Meth. Enzymol.* vol. 31, pp. 528-545, 1974.

[13] D. Gonzalez-Mendoza, A. Q. Moreno, O. Zapata-Perez, "Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper". *Aquatic Toxicol.* vol. 83, no. 4, pp. 306-314, 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.05.005>

[14] C. Harty, "Mangroves in New South Wales and Victoria". Vista Publications, Melbourne, pp. 47, 1997.

[15] R. J. West, C. A. Thorogood, R. J. Williams, "Environmental stress causing mangrove 'dieback' in NSW". *Aust. Fisheries*, vol. 42, no. 8, 16-20, 1983.

[16] O. J. Eong. "The ecology of mangrove conservation and management". *Hydrobiologia* vol. 295, no, 1-3. pp. 343-351, 1995.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00029141>

[17] D. E. Salt, R. D. Smith, I. Raskin, "Phytoremediation". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* vol. 49, no. 1, pp. 643-668, 1998.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>

[18] D. Gleba, N. Y. Borisjuk, L. G. Borisjuk, R. Kneer, A. Poulev, M. Skarzhinskaya, S. Dushenkov, S. Logendra, Y. Y. Gleba, I. Raskin, "Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 96, no. 11, pp. 5973-5977, 1999.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.11.5973>

[19] F. Navari-Izzo, M. F. Quartacci, "Phytoremediation of metals. Tolerance mechanisms against oxidative stress". *Minerva Biotec.* vol. 13, pp. 73-13, 2001

이 건 섭(Gunsup Lee)

[정회원]



- 2003년 2월 : 성균관대학교 생명공학과 (이학석사)
- 2010년 2월 : 성균관대학교 생명공학과 (이학박사)
- 2011년 1월 ~ 현재 : 한국 해양연구원 연수연구원

<관심분야>
분자생물학, 해양 독성학

황 진 익(Jinik Hwang)

[정회원]

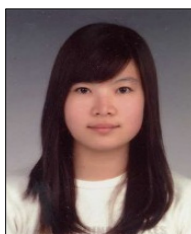


- 2008년 2월 : 신라대학교 생물학과 (이학학사)
- 2007년 9월 ~ 2011년 2월 : 한국해양연구원 남해특성연구부 인턴연구원
- 2011년 3월 ~ 현재 : 한국과학기술연합대학원 대학교 석·박사 통합과정 재학

<관심분야>
해양환경독성학, 해양분자생물학

박 미 례(Mirye Park)

[정회원]



- 2010년 2월 : 동아대학교 생명과학전공 (이학학사)
- 2011년 10월 ~ 2012년 8월 : 한국해양연구원 남해특성연구부 인턴연구원
- 2012년 9월 ~ 현재 : 한국과학기술연합대학원 대학교 석·박사 통합과정 재학

<관심분야>
해양환경독성학, 해양분자생물학

정 영 재(Youngjae Chung)

[정회원]



- 1988년 2월 : 성균관대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1993년 2월 : 성균관대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 1997년 3월 ~ 2007년 2월 : 서남대학교 생명과학과 교수
- 2007년 3월 ~ 현재 : 신경대학교 생명공학과 교수

<관심분야>

식물형태 및 계통분류학, 식물유전자원학

이 택 건(Taek-Kyun Lee)

[정회원]



- 1991년 2월 : 성균관대학교 생물학 (이학석사)
- 1998년 2월 : 성균관대학교 식물분자생리학 (이학박사)
- 1998년 9월 ~ 2000년 8월 : 한국해양연구원 연수연구원
- 2000년 9월 ~ 현재 : 해양과학기술원 남해특성연구부 책임연구원

<관심분야>

환경분자생리학, 해양환경독성학