

최 종

연구 보고서

작물 신품종 개량을 위한
cold stress 신호전달 관련 유전자 연구
Studies on the gene function of cold stress
signaling for developing new crop plants

내냉성 작물개발을 위한 저온 스트레스 반응관련 벼(rice)
유전자의 확보 및 기능 분석

Isolation and functional characterization of cold stressresponsive
rice gene for developing cold resistant crop plants

Cold 스트레스 관련 유전자의 내성 조절기능 규명 및 내
냉성 벼 모본 육성

Characterization of cold stress related gene and developing cold
resistant crop mother plants

벼 OsPK1 특이 호르몬 신호전달 유전자 이용 연구

Studies on the use of specific hormone signal transducing gene in
rice OsPK1

연구 기관

세종대학교 분자생물학과

고려대학교 생명과학과

농촌진흥청 농업생명공학연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “작물 신품종 개량을 위한 cold stress 신호전달 관련 유전자 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 9 월 11 일

주관연구기관명 : 세종대학교
총괄연구책임자 : 김 경 남
세부연구책임자 : 김 경 남
연 구 원 : 김 윤 경
연 구 원 : 박 수 진
협동연구기관명 : 고려대학교
협동연구책임자 : 옥 승 한
협동연구기관명 : 농촌진흥청
협동연구책임자 : 윤 인 선

요 약 문

I. 제 목

작물 신품종 개량을 위한 cold stress 신호전달 관련 유전자 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 식물의 저온 스트레스 저항성 작용기작을 연구하기 위하여, 그와 관련된 유전자들을 확인하고, 이들을 분리하여 그 기능을 밝혀내고 이들을 이용하여 저온저항성이 증대된 작물개발의 가능성을 탐구하는 것을 목적으로 한다.

식물이 저온에 노출되었을 때, 다양한 대사경로에 관련된 효소 활성의 변화, 유리 당 (sucrose, fructose), 아미노산 (proline) 또는 polyamine의 축적, 세포막 지질 구성 성분의 변화 등의 많은 생리·생화학적 변화가 발생한다. 또한, 저온 스트레스는 많은 식물에서 여러 가지 유전자들을 발현시키는 것으로 보고되었다. 하지만 저온 반응(cold response)에서 이들 유전자가 수행하는 명확한 기능이나 역할 등에 대해서는 아직 알려진 바가 미약하다. 또한 이들 유전자는 저온 스트레스 반응의 하위단계 (downstream)에 위치하는 유전자들로, 저온 스트레스 신호전달체계를 이해하기 위해서는 이들의 발현과 활성을 조절하는 상위단계 분자 구성원(upstream molecular components)을 밝히는 일이 필요하다. 이처럼 저온 신호 전달 과정에 대한 이해는 국내·외를 포함하여 매우 단편적이다. 현재 외국에서는 저온 스트레스 반응에 관련된 유전자에 대한 연구가 예기장대를 모델로 하여 활발하게 진행되고 있으나 벼를 비롯한 유용작물에 대한 심도 있는 연구는 아직은 미진한 편이다. 그러므로 본 연구를 통해 규명될 식물의 저온 스트레스 반응에 관여하는 유전자들은 그 자체로서 부가가치를 가진다. 뿐만 아니라, 이들 유전자는 냉해에 내성을 가지는 농산물 개발에 이용되어 우리나라 농업의 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 전망된다. 따라서 현재와 같은 세계화 시대에 유용 유전자의 선점은 21세기를 주도할 생명공학산업의 주요한 당면과제이며, 우리나라의 농업을 살리고 나아가 경제와 산업발달에 매우 중요한 관건이 될 것이다.

현재 미국을 포함한 선진국들은 유용 유전자의 탐색 발굴 및 기능분석에 많은 인적 그리고 물적인 투자를 하고 있다. 특히 Syngenta나 Monsanto와 같은 다국적 거대 농생명 기업들은 주요 작물의 유전체 연구에 집중 투자하고 있다. 만약 이러한 기업들이 작물의 생산성을 높이는 유용 유전자들의 대부분을 선점하게 된다면, 주요 작물의 공급을 통제할 수 있는 상황이 벌어질 가능성도 배제할 수 없다. 이것은 우리와 같이 취약한 농업구조를 가진 나라로서는 아주 위험한 일이 아닐 수 없다. 최악의 경우 우리 농업의 붕괴로 이어져 사회불안을 야기할 수 있을 뿐만 아니라, 식량작물의 대부분을 외국에 의존하는 일이 생길 수도 있는 것이다. 식량작물의 대외 의존도가 높아질수록 우리나라의 사회는 급변하는 세계정세에 더욱 민감하게 반응하게 될 것이며, 미국과 같은 주요 농산물 수출국의 입김으로부터 더욱 자유로울 수 없을 것이다. 이런 관점에서 볼 때, 작물의 생산성을 떨어뜨리는 냉해에 저항성을 가지는 작물체를 만드는 연구는 우리나라의 사회 안정과 자주적인 문화발전을 위해서도 반드시 필요한 일이라 사료된다. 또한, 소득증대를 통한 농촌 사회와 문화의 안정이 확립될 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발과제는 식물의 저온 스트레스 저항성 작용기작을 연구하기 위하여, 그와 관련된 유전자들을 확인하고, 이들을 분리하여 그 기능을 밝혀내고 이들을 이용하여 저온저항성이 증대된 작물개발의 가능성을 탐구하는 것이 목표이다. 따라서 이 목표를 이루기 위하여 Arabidopsis에서 저온신호전달에 관련된 것으로 알려진 유전자들의 벼에서의 orthologue를 확보하고, 저온 스트레스에 강한 것으로 알려진 보리에서 suppression subtractive hybridization (SSH) 방법과 Mirror Orientation Selection (MOS) 방법을 사용하여 저온 스트레스에 의해 발현이 증가되는 유전자를 분리한다. 그리고 분리된 유전자는 모델 식물체인 Arabidopsis에 형질전환을 시도, 분리된 유전자 중 어떠한 유전자가 작물의 저온 스트레스에 대한 저항성을 부여할 수 있는지 가능성 여부를 판단한다. 더불어 이들 저온 스트레스 저항성 유전자가 저온 스트레스 저항성을 가져오는 기작을 연구하고, 궁극적으로는 형질전환 모델 식물에서 저온 스트레스 저항성을 보이는 유전자는 실제 농업에 이용 가능한 작물인 벼의 형질 전환에 이용함으로써, 스트레스에 저항성이 증가된 유용한 작물생산을 위한 분자유종 모본을 개발할 수 있는 기틀을 마련하는 것을 범위로 삼아 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 정량적 성과표

성과물		년도	계	1년차 (2003-2004)	2년차 (2004-2005)	3년차 (2005-2006)
논문	국내	SCI				
		비SCI	2		1	1
	국외	SCI	3	1		2
		비SCI				
특허	국내	출원	2	1	1	
		등록	1			1
	국외	출원	4		2	2
		등록				
유용유전자			10	7	2	1
형질전환체			6		4	2
유전자원등록수			580	580		

- 전문학술지 논문 게재

1. Novel CIPK1-associated proteins in Arabidopsis contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization. **Sung Han Ok**, Hye Jin Jeong, Jung Myung Bae, Jeong-Sheop Shin, Sheng Luan, and **Kyung-Nam Kim**. *Plant Physiology* 139, 138-50,
2. Identification and characterization of protein kinases that interact with the CBL3 calcium sensor in Arabidopsis. Hye Jin Jeong, Nam-Soo Jwa, and **Kyung-Nam Kim**. *Plant Science* 169: 1125-1135
3. Isolation and characterization of a novel rice Ca²⁺-regulated protein kinase gene involved in response to diverse signals including cold, light, cytokinin, sugars and salts **Kyung-Nam Kim**, Jung-Sook Lee, Hee Han, Seung Ah Choi, Seung Joo Go and **In Sun Yoon** *Plant Molecular Biology* 52:1191-1202
4. Isolation of genes related to light and low temperature stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Ok SH**, Shin SH, Shin JS, **Kim KN**, Chun JU *Kor. J. Breed.* 36(1):38-46

5. Novel calcium-binding GTPase (AtCBG) involved in ABA-mediated salt stress signaling in Arabidopsis Kandakumar Jayasekaran, **Kyung-Nam Kim**, Munusamy Vivekanandan, Jeong Sheop Shin, **Sung Han Ok** *Plant Cell Reports*. in press

- 특허출원 및 등록

- 출원: 1. 환경스트레스 신호전달 인산화 효소와 유전자 (2004. 2. 4) 출원번호 10-2004-7202
2. 식물 노화에 특이적으로 발현되는 유전자 및 그 유전자의 프로모터 (2004. 9. 2)
출원번호: 10-2004-0069765
 3. 식물 노화에 특이적으로 발현되는 유전자 및 그 유전자의 프로모터 (2005. 5. 17)
출원번호: 2005-144189 (일본)
 4. 식물 노화에 특이적으로 발현되는 유전자 및 그 유전자의 프로모터 (2005. 6. 6) 출
원번호: 11/146362, (미국/P21-050331-US)
 5. A novel senescence-specific plant gene and its promoter. (2005. 8. 24) 출원번호:
11/146362 (PCT/KR2005/002778)
 6. A novel senescence-specific plant gene and its promoter (2005. 8. 30) 출원번호:
11/146362 (중국/200510093833.8)
- 등록: 1. 환경스트레스 신호전달 인산화 효소와 유전자 (2006. 7.)

- 학술발표

1. Ribosomal protein S10 associates with the CBL3 calcium sensors in Arabidopsis. Hye Jin Jeong, Kyung-Nam Kim. The 16th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 서울교육문화회관. 20041014 - 20041015
2. Identification and Characterization of the Calcineurin B-like Calcium Sensors in *Oryza sativa*. Seung Ah Choi, Kyung-Nam Kim. The 16th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 서울교육문화회관. 20041017 - 20051018
3. Identification and characterization of novel Arabidopsis genes that encode CIPK1-associated proteins. Hye Jin Jeong and Kyung-Nam Kim. The 2005 annual meeting of the American Society of Plant Biologists, Washington State Convention and Trade Center, Seattle, Washington USA. 20050716-20050720

4. Identification and characterization of protein kinases that interact with the CBL3 calcium sensors in Arabidopsis Hye Jin Jeong, Kyung-Nam Kim. 제60회 한국생물과학협회 학술발표대회. Integrative Biosciences Vol.9 Supplement. 대전대학교. 20050817 - 20050819
5. CIPK11 associates with CBL3 in a calcium-dependent manner. Hye Jin Jeong and Kyung-Nam Kim. The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 서울교육문화회관. 20051014- 20051015
6. CIPK1 interacts with a novel Arabidopsis protein similar to human activating signal cointegrator-1 Yoon Kyung Kim and Kyung-Nam Kim. 제13회 한국광과학회 학술대회 한국기초과학지원연구원(대덕) 20060601-20060602
7. Characterization of a rice protein kinase gene and in vitro phosphorylation of a bZIP factor by the encoded enzyme. Yoon In-sun, Hee Han, Jung-Sook Lee, Dool-Yi Kim, Sung-Han Sohn, Shin-Chul Bae and Seung-Joo Go 2003 7th International Conference on Plant Molecular Biology (Barcelona, Spain)
8. Two Rice CBL-Interacting Protein Kinases Are Differentially Regulated and Activated by a Calcium Binding Protein CBL. YOON In-Sun*, HAN Hee, Hwang In-Sun, KIM Dool-Yi, SOHN Seong-Han and GO Seung-Joo 2003 한국 분자.세포 생물학회 (The 14th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology)
9. Phosphorylation modulates the transcriptional activation function of a rice ABRE binding factor HONG Ji-Yeon, NAM Myung-Hee1, CHO Kun1, CHAE Min-Ju, Shin Kong-Sik, SUH Seok-Cheol and YOON In-Sun* 2004년 한국 분자세포생물학회 춘계학술대회 (The 15th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology)
10. Identification of a rice calreticulin homolog that is phosphorylated by a SnRK2 kinase CHAE Min-Ju, HONG Ji-Yeon, HWANG In-Sun, SUH Seok-Cheol and YOON In-Sun *2004년 한국 분자세포생물학회 춘계학술대회 (The 15th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology)
11. A rice calcium binding protein OsCBL1 activates two reversely-regulated protein kinases and affects stress-responsive gene expression in transgenic *Arabidopsis*

- Hee Han, Min-Ju Chae, Ji-Yeon Hong, In-Sun Hwang, Seok-Cheol Suh and In-Sun Yoon 15th International Conference on Arabidopsis Research (Berlin, Germany)
12. A dehydration-inducible SnRK2 kinase is associated with ABA signaling and phosphorylates a ABF family of bZIP transcription factor in rice Yoon In-Sun, Han Hee, Chae Min-Joo, Nam Myung-Hee and Suh Seok-Chul 한국식물생명공학회 2004년도 춘계학술대회(2004 Annual Meeting of Korean Society of Plant Biotechnology)
 13. Characterization of a rice SnRK2 protein kinase, a putative negative regulator in ABA signaling. In-Sun Yoon, Hee Han, In-Sun Hwang, Myung-Hee Nam and Seok-Chul Suh Crop Functional Genomics 2004
 14. Identification of phosphorylation sites of a rice ABF family of bZIP transcription factor by Mass Spectrometry and phosphopeptide mapping. Myung Hee Nam, In-Sun Yoon, Ji-Yeon Hong, Kun Cho, Jin Hee Lee, JongBok Seo, Joo Hee Chung, Ohoak Kwon HUPPO 3rd Annual World Congress (Beijing, China)
 15. A rice SnRK3 kinase, OsPK1 is involved in cold signaling pathway and interacts with a vacuolar-targeted calcium binding protein, Yoon In-Sun, Lee Jung-Sook, Lee Sang-Ah, Lee Yeon-Hee and Suh Seok-Cheol 2005 육종학회
 16. N-terminus of a Rice ABRE Binding Factor Controls Transcriptional Activation Function by Protein Phosphorylation, Chae Min-Ju, Hong Ji-Yeon, Suh Seok-Cheol and Yoon In-Sun, 2005 17Th International Botanical Congress (Vienna, Austria)
 17. Transcriptional and post-transcriptional regulation of a rice ABA-responsive element (ABRE) binding factor by hyperosmotic stress and ABA. CHAE Min-Ju, SUH Seok-Cheol and Yoon In-Sun, 2005 분자세포생물학회 (The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology)
 18. Biochemical characterization of the rice sucrose nonfermenting1 (SNF1)-related protein kinase 2 (SnRK2) family, YI Sang-Ah, CHAE Min-Ju, SUH Seok-Cheol and Yoon In-Sun, 2005 분자세포생물학회 (The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology)
 19. A rice SnRK3 kinase is associated with cold signaling pathway and interacts with a vacuolar-targeted calcium binding protein, Chae Min-Ju, Lee Jung-Sook, Lee

Sang-A, Lee Yeon-Hee, Park Hong-Jae, Suh Seok-Cheol and Yoon In-Sun, 2005
한국 식물생명공학회

20. Differential biochemical properties of the rice sucrose nonfermenting1 (SNF1)-related protein kinase 2 (SnRK2) family, Sang-A YI, Min-Ju CHAE, Seok-Cheol SUH and In-Sun YOON 2005 단백질 인산화와 식물신호전달 PPP2005 (Tsukuba, Japan)

2. 연구결과의 활용에 대한 건의

저온 스트레스는 작물의 생산성을 저하시키는 주요 환경요인 중에 하나이다. 따라서 선진국을 중심으로 많은 나라들이 환경재해에 저항성을 나타내는 품종을 개발하고자 저온 등 각종 스트레스에 관련된 유용 유전자의 발굴 및 분자육종에 많은 연구를 하고 있다. 최근에 완료된 애기장대(Arabidopsis)와 벼(rice)의 Genome Sequencing Project는 세계화 시대와 맞물려 이와 같은 연구추세를 더욱 가속화 하고 있다. 새로이 개발된 품종은 농작물 특허로 등록될 수 있으므로 이 분야의 국제경쟁은 앞으로 대단히 치열할 것으로 전망된다. 한편, 내냉성 작물의 개발은 미국 및 중국 등 으로부터 수입되는 값싼 농산물(특히 쌀)로부터 우리나라의 농업을 지키기 위해 필요한 농업의 생산성을 향상을 도모하게 될 것이다. 따라서 성공적으로 이루어진 본 과제의 수행결과는 저온을 포함하는 환경 스트레스 신호전달 연구의 선두에 있는 것으로서 외국으로부터 기술도입을 할 필요가 없다고 판단된다. 그러므로 본 연구팀에 의하여 새로이 발견된 식물의 저온 신호전달에 관여하는 유전자 특허 출원 및 licensing을 통해 royalty수입을 기대할 수 있을 것이다.

SUMMARY

It is well known that *Arabidopsis* calcineurine B-like (CBL) calcium sensors and their interacting partners serine/threonine protein kinases (CIPKs) are involved in response to a variety of environmental stresses including cold and salinity. Comparative genomic DNA analysis indicated that the rice genome contains genes similar to CBLs and CIPKs, suggesting that the CBL-CIPK signaling pathways in *Arabidopsis* may also present in the rice. In this study, we have isolated six rice cDNA clones; four clones (OCK1, 2, 3 and 4) coding for CIPK-like protein kinases and two (OBL1 and OBL3) for CBL-like calcium-binding proteins. We have investigated expression patterns of the isolated genes and found that expression of the OBL3 gene is down-regulated by cold stress. We have also determined that OBL1 and OBL3 actually possess the ability to bind calcium ions. Yeast two-hybrid assays revealed that OBL1 and OBL3 specifically interact with OCKs at different intensities. The OBL-OCK interaction was further supported by pull-down assays, which showed that OBL and OCK form a complex in a calcium-dependent manner. Overall, these findings suggest that OBL and OCK are rice orthologs of the CBL and CIPK proteins, respectively. To investigate whether OBL is involved in cold response as CBL in *Arabidopsis*, we have generated rice transgenic plants with reduced OBL expression using the RNAi technique.

To understand the general responses of plants to low temperature, winter barley cultivar "Dongbori" and *Arabidopsis thaliana* were subjected to cold treatment at 4°C and Suppression Subtractive Hybridization (SSH), Mirror Orientation Selection (MOS), and normalized library EST (nlEST) were used to screen large numbers of low temperature induced genes in barley (*Hordium vulgare* L. cv. Dongbori) and *Arabidopsis*. About 580 different clones were obtained. Expression analysis was performed with RNAs treated by low temperature, NaCl, dehydration and diverse ABA applications. Five clones, *alti1*, *bti3*, *AtCBG*, *AtNIG*, and *CYP97a* genes showed novel patterns of expression in barley and *Arabidopsis*, and full length sequences of these cDNAs were obtained by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). The possible

biological and physiological functions of those 5 genes were characterized by molecular biological and biochemical methods. Those 5 genes were transferred to *Oryza sativa* for investigating the functional roles of cold-induced gene and physiological mechanisms. The transgenic rice of introducing AtCBG gene were regenerated and now are growing in green house. This AtCBG gene containing transgenic rice would be a mother plant for breeding to produce cold stress resistant rice plant.

We have isolated a cold-inducible SnRK3 family of protein kinase gene (designated *OsPK1*) from *Oryza sativa* using a differential cDNA screening technique, and have investigated *OsPK1*-specific signaling pathway in relation to cold and ABA responses of rice. *In vitro* kinase assay showed that *OsPK1* phosphorylated C-terminus domain of an ABF (ABA-responsive element binding factor) family of rice bZIP transcription factor. This strongly implicates that *OsPK1* is likely to be associated with the ABA responses of rice by phosphorylation of the transcription factor, and thereby may mediate cross-talk between cold and ABA signaling pathway. Indeed, transgenic Arabidopsis over-expressing *OsPK1* showed different expression level of ABA-responsive genes in response to cold stress. Using yeast two-hybrid screening technique, we have identified interacting proteins with the regulatory domain of *OsPK1*. They may act as upstream regulators or down stream targets in the *OsPK1*-specific signaling pathway. Constitutive expression of *OsPK1* in transgenic Arabidopsis resulted in a weak, but significant increase in growth tolerance under the salt or cold stress condition. Finally, we have generated transgenic rice over-expressing *OsPK1*. At the molecular level, 5K cDNA chip analysis revealed that seven cold responsive genes were positively regulated in the transgenic rice. Expression level of an invertase gene was highly increased in the 35S-*OsPK1* transgenic rice. Furthermore, leaf of the transgenic rice showed enhanced resistance to oxidative stress (methyl viologen). Cold-resistance of the transgenic rice in the field condition is now under analysis.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	18
Section 1. The purpose of research	
Section 2. The need for research and research extent	
1. Technical aspects	
2. Economic and industrial aspects	
3. Social and cultural aspects	
Chapter 2. Current status and problems	22
Chapter 3. The contents of the research and results	24
Section 1. Isolation and functional characterization of cold stressresponsive rice gene for developing cold resistant crop plants	24
1. Theoretical and methodological strategy for obtaining research goal	
2. Research methods and Results	
A. Isolation of OCK full-length cDNA clone	
B. Interaction investigation between OCK and CBL by yeast two-hybrid	
C. Spatial expression of OCK by Northern blot analysis	
D. Isolation of full-length cDNA that interacts with OCK	
E. Confirmation of interaction between OCK3 and OBL1 by yeast-two hybrid	
F. Determination of interaction specificity between OCK and OBL members	
G. Determination of interacting region in OCK to OBL	
H. Characterization of the interaction between OBL and Arabidopsis CIPK1	
I. Spacial and temporal expression by stress of OBL	
J. Preparation of OBL and OCK protein by GST-fusion system	
K. Calcium binding of OBL1 and OBL3	
L. Making antibodies of OBL1 and OBL3	
M. Production of transgenic plants	
1) OBL1 and OBL3 producing Arabidopsis	
2) OBL1 and OBL3 suppressed plants by RNAi	
Section 2. Characterization of cold stress related gene and developing cold resistant crop mother plants	44
1. Theoretical and methodological strategy for obtaining research goal	
2. Research methods and Results	
A. Plant materials and extraction of RNA	
1) Plant preparation and total RNA extraction	
2) mRNA preparation	
B. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and Mirror Orientation Selection (MOS)	
C. Normalized library EST	
D. Reverse Northern analysis and sequencing	
E. Functional analysis of cold induced genes	
1) Characterization of at1l1	

- a) Nucleotide sequence
 - b) Expression pattern under stress condition
 - c) Putative function prediction by amino acid sequence analysis
 - d) Interacting protein browsing by yeast-2-hybrid
 - e) *In vitro* pull-down assay
 - f) Analysis of transgenic model plant
 - g) Discussion of *alt1* function
 - 2) Characterization of *blt3*
 - a) Nucleotide sequence
 - b) Expression pattern under stress condition
 - c) Putative function prediction by amino acid sequence analysis
 - d) Biochemical and biological function of *blt3*
 - e) Genomic structure
 - f) Subcellular localization of *blt3*
 - g) Interacting protein browsing by yeast-2-hybrid
 - h) Discussion of *blt3* function
 - F. Characterization of water stress related genes
 - 1) Characterization of *AtCBG*
 - a) Putative function prediction by amino acid sequence analysis
 - b) Expression pattern under stress condition
 - c) Calcium binding assay
 - d) Determination of GTPase activity
 - e) Assigning functional role in the signal transduction pathway by T-DNA knock-out mutant analysis
 - 2) Characterization of *AtNIG*
 - a) Putative function prediction by amino acid sequence analysis
 - b) Expression pattern under stress condition
 - c) Calcium binding assay
 - d) Determination of DNA-binding ability
 - e) Assigning functional role in the signal transduction pathway by T-DNA knock-out mutant analysis
 - 3) Characterization of *CYP97A*
 - G. Transformation of rice plant
- Section 3. Studies on the use of specific hormone signal transducing gene in rice
OsPK1 79
- 1. Theoretical and methodological strategy for obtaining research goal
 - 2. Research methods and Results
 - A. Contents of the research
 - B. Methods
 - 1) Gene isolation
 - 2) Construction of yeast two hybrid library
 - 3) Bait vector construction and yeast two hybrid screening
 - 4) Preparation of recombinant protein
 - 5) *In vitro* kinase assay
 - 6) Plant transformation
 - 7) Stress treatment to plants
 - 8) Expression analysis

9) In gel kinase assay	
3. Results	
가. c-terminal Phosphorylation of bZIP TF by OsPK1	
나. OsPK1 interacting protein browsing by yeast-2-hybrid	
다. In vitro kinase assay of OsPK1 interacting protein	
라. Production of 35S-OsPK1 transformants (Arabidopsis, rice)	
1) Construction of plant transformation vector	
2) Production of Arabidopsis transformants	
3) Production of rice transformants	
마. Analysis of 35S-OsPK1 Arabidopsis transformants	
1) Expression analysis of stress marker genes	
2) Stress resistance analysis of transgenic Arabidopsis plant	
바. Analysis of 35S-OsPK1 rice transformants	
1) Expression analysis of cold-responsive genes by RT-PCR	
2) Expression profiling of OsPK1 over-expressed plant by DNA chip	
3) Analysis of 35S-OsPK1 rice plant	
Chapter 4. Achievement and contribution of the research	105
Chapter 5. Application of the results	109
Chapter 6. Research information collected during research progressing	112
Chapter 7. References	113

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
I. 제목	
II. 연구개발의 목적 및 필요성	
III. 연구개발 내용 및 범위	
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	
SUMMARY	10
CONTENTS	12
목 차	15
제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 1 절 연구개발의 목적	
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위	
1. 기술적 측면	
2. 경제·산업적 측면	
3. 사회·문화적 측면	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절 내냉성 작물개발을 위한 저온 스트레스 반응관련 벼(rice) 유전자의 확보 및 기능 분석	24
1. 이론적, 실험적 접근방법	
2. 연구내용 및 결과	
가. OCK full-length cDNA 클론의 확보 및 염기서열 결정	
나. Yeast two-hybrid system을 이용한 OCK와 CBL의 상호작용 여부 조사	
다. Northern blot 분석에 의한 OCK 유전자의 발현 부위 조사	
라. OCK와 상호작용하는 단백질을 지정하는 full-length cDNA의 분리	
마. OCK3와 OBL1의 상호작용을 Yeast-two hybrid system에서 검증	
바. OCK 및 OBL family member 사이의 interaction specificity 결정	
사. OBL과의 상호작용에 필요한 OCK 부위의 결정	
아. OBL과의 애기장대 CIPK1과의 상호작용 검증	
자. OBL유전자의 기관별 및 외부 자극별 발현 양상 분석	
차. GST-fusion system을 이용한 OBL 및 OCK 단백질의 과량 생산 및 정제	
카. OBL1 및 OBL3 단백질의 칼슘결합 능력 검증	
타. OBL1 과 OBL3 단백질의 항체 생산	
파.형질전환체 생산	
1) OBL1 과 OBL3 단백질을 각각 과량 발현하는 애기장대 형질전환체 생산	

- 2) OBL1 또는 OBL3 단백질 발현이 저하된 RNAi 식물체 생산
- 제 2 절 Cold 스트레스 관련 유전자의 내성 조절기능 규명 및 내냉성 벼 모본 육성 · 44
1. 이론적, 실험적 접근방법
 2. 연구내용 및 결과
 - 가. 실험대상 식물 확보 및 RNA 추출
 - 1) 재료식물 확보 및 total RNA 추출
 - 2) mRNA 추출
 - 나. 새로운 저온유도 유전자 확보를 위한 SSH 와 MOS
 - 다. 새로운 저온유도 유전자 확보를 위한 nEST
 - 라. 저온유도 유전자 선별을 위한 reverse Northern analysis와 염기서열 분석
 - 마. 확보된 저온유도 유전자들의 기능분석
 - 1) *alt1* 유전자 분석
 - 가) DNA 염기서열의 확보
 - 나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석
 - 다) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추
 - 라) 기능 규명을 위한 상호작용 단백질의 탐색
 - 마) 상호작용 후보 단백질들의 *in vitro* pull-down assay
 - 바) 형질전환체들의 생장과 발육 분석
 - 사) *alt1* 유전자의 추정되는 기능에 대한 고찰
 - 2) *bti3* 유전자 분석
 - 가) DNA 염기서열의 확보
 - 나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석
 - 다) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추
 - 라) 생화학적 특성 연구
 - 마) Genomic structure
 - 바) 확보된 유전자 산물의 세포내 분포 조사
 - 사) 기능 규명을 위한 상호작용 단백질의 탐색
 - 아) *bti3* 유전자의 추정되는 기능
 - 바. 저온 스트레스와 연관된 수분 스트레스 신호전달 유전자들의 확보와 기능규명
 - 1) *AtCBG* 유전자 분석
 - 가) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추
 - 나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석
 - 다) 칼슘결합 능력 검정
 - 라) GTPase activity 검정
 - 마) 돌연변이체를 이용한 수분스트레스 신호전달체계에서의 역할검정
 - 2) *AtNIG* 유전자 분석
 - 가) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추
 - 나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석
 - 다) 칼슘결합 능력 검정
 - 라) DNA 결합능력 검정
 - 마) 돌연변이체를 이용한 수분스트레스 신호전달체계에서의 역할 검정
 - 3) *CYP97A* 유전자 분석
 - 사. 경제작물인 벼에 형질전환
- 제 3 절 벼 *OsPK1* 특이 호르몬 신호전달 유전자 이용 연구 · · · · · 79
1. 이론적, 실험적 접근방법
 2. 연구내용 및 연구방법
 - 가. 연구내용

나. 연구방법

- 1) 유전자 분리
- 2) Yeast two hybrid library 제작
- 3) Bait vector 제작 및 yeast two hybrid screening
- 4) 대장균 (E.coli.)에서 재조합 단백질 생산 및 분리
- 5) In vitro kinase assay
- 6) 식물 형질전환
- 7) 식물 성장 및 스트레스 처리
- 8) 유전자 발현 분석
- 9) In gel kinase assay

3. 연구결과

가. OsPK1에 의한 벼 ABF 계열 bZIP 전사인자 C 말단 부위의 인산화

나. Yeast two hybrid 탐색을 이용한 OsPK1 상호작용 유전자 분리

다. OsPK1 상호작용 단백질의 in vitro kinase 기질 여부 탐색

라. 35S-OsPK1 형질전환체 (애기장대, 벼) 생산

- 1) 식물형질전환 벡터 제작
- 2) 애기장대 형질전환체 생산
- 3) 형질전환 벼 생산

마. 35S-OsPK1 애기장대 형질전환체 분석

- 1) 스트레스 마커 유전자 발현분석
- 2) 애기장대 형질전환체의 스트레스 저항성 조사

바. 35S-OsPK1 형질전환 벼 분석

- 1) RT-PCR에 의한 cold-responsive 유전자의 발현 변이 조사
- 2) DNA chip 실험을 통한 OsPK1 과다발현 벼의 유전자 발현 프로파일 분석
- 3) 35S-OsPK1 형질전환 벼의 생리 생화학적 분석

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	104
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	109
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	111
제 7 장	참고문헌	112

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구에서는 식물의 저온 스트레스 저항성 작용기작을 연구하기 위하여, 그와 관련된 유전자들을 확인하고, 이들을 분리하여 그 기능을 밝혀내고 이들을 이용하여 저온저항성이 증대된 작물개발의 가능성을 탐구하는 것을 목적으로 한다. 이를 위하여 Arabidopsis에서 저온신호전달에 관련된 것으로 알려진 유전자들의 벼에서의 orthologue를 확보하고, 저온 스트레스에 강한 것으로 알려진 보리에서 suppression subtractive hybridization (SSH) 방법과 Mirror Orientation Selection (MOS) 방법을 사용하여 저온 스트레스에 의해 발현이 증가되는 유전자를 분리한다. 그리고 분리된 유전자는 모델 식물체인 Arabidopsis에 형질전환을 시도, 분리된 유전자 중 어떠한 유전자가 작물의 저온 스트레스에 대한 저항성을 부여할 수 있는지 가능성 여부를 판단한다. 더불어 이들 저온 스트레스 저항성 유전자가 저온 스트레스 저항성을 가져오는 기작을 연구하고, 궁극적으로는 형질전환 모델 식물에서 저온 스트레스 저항성을 보이는 유전자는 실제 농업에 이용 가능한 작물인 벼의 형질 전환에 이용함으로써, 스트레스에 저항성이 증가된 유용한 작물생산을 위한 분자유종개발의 모본을 개발할 수 있는 기틀을 마련하고자 하는 것이 본 과제의 목적이라 할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

저온 (cold)은 식물의 발육과 생장에 큰 장애를 유발함으로써 작물의 생산성을 저하시키는 주요 환경스트레스 중의 하나이다. 따라서 저온 스트레스에 저항성을 갖는 품종을 개발하는 것은 아주 중요한 당면과제라 하겠다. 근래에 주로 이용되고 있는 유전자재조합 기술을 이용한 품종개발은 원하는 특성을 지닌 유전자를 다른 생물체에 직접 삽입함으로써 목적하는 성질을 가지는 식물체를 비교적 짧은 시간에 바로 얻을 수 있을 수 있는 장점이 있다. 또한 삽입하고자 하는 유전자는 같은 생물 종에서 뿐만 아니라 서로 다른 생물 종에서 얻을 수 있어 품종개발의 폭이 넓은 것이 특징이다. 따라서 **유전자재조합 기술을 이용한 작물의 품종개발에 있어 그 성공 여부는 유용 유전자의 발견 및 기능 분석이 관건**이라 하겠다. 최근에 완료된 애기장대 (Arabidopsis)와 벼 (rice)의 Genome Sequencing Project는 작

물의 품종개량을 위한 유용 유전자의 발굴을 더욱 쉽고 빠르게 촉진하고 있다.

1. 기술적 측면

식물이 저온에 노출되었을 때, 다양한 대사경로에 관련된 효소 활성의 변화, 유리 당 (sucrose, fructose), 아미노산 (proline) 또는 polyamine의 축적, 세포막 지질 구성 성분의 변화 등의 많은 생리·생화학적 변화가 발생한다. 또한, 저온 스트레스는 많은 식물에서 여러 가지 유전자들을 발현시키는 것으로 보고되었다. 주요 저온 유도 유전자들로는 RD29A, Kin1, Kin2, DREB1A, *cas*(cold acclimation-specific), *cor*(cold-regulated), *blt*(barley low-temperature), *blti*(barley low-temperature induced) 유전자들이 보고되어 있다. 하지만 저온 반응(cold response)에서 이들 유전자가 수행하는 명확한 기능이나 역할 등에 대해서는 아직 알려진 바가 미약하다. 또한 이들 유전자는 저온 스트레스 반응의 하위단계 (downstream)에 위치하는 유전자들로, 저온 스트레스 신호전달체계를 이해하기 위해서는 이들의 발현과 활성을 조절하는 **상위단계 분자구성원(upstream molecular components)을 밝히는 일이 필요하다.** 이처럼 저온 신호 전달 과정에 대한 이해는 국내·외를 포함하여 매우 단편적이다. 현재 외국에서는 저온 스트레스 반응에 관련된 유전자에 대한 연구가 애기장대를 모델로 하여 활발하게 진행되고 있으나 **벼를 비롯한 유용작물에 대한 심도 있는 연구는 아직은 미진한 편이다.** 국내에서도 저온 스트레스에 관련된 연구가 산발적으로 진행되고는 있으나 대부분 저온 처리시 발현되는 유전자의 분리나, 분리된 유전자의 과다발현에 국한되고 있다. 즉 저온 스트레스 반응 유전자의 기능, 발현조절 또는 신호전달에 관한 체계적인 연구는 이루어지고 있지 않다. 따라서 벼와 같은 유용작물에 대한 저온 스트레스 신호전달체계 연구는 궁극적 목표인 내냉성 작물을 개발하는 데 있어서 반드시 선행되어야 한다. **본 총괄연구책임자는 지난 7년 동안 애기장대를 모델로 하여 저온, 가뭄 등의 각종 환경스트레스 신호전달체계에 대한 연구를 지속해 왔으며 그 결과를 3차례에 걸쳐 각각 유수 Journal인 Plant Cell (Kim et al., 1999 and 2003) 과 Plant Physiology (Kim et al., 2000)에 발표한 경험이 있다.**

2. 경제·산업적 측면

수출주도의 산업구조를 가진 우리나라는 WTO에 가입한 이후 국제합의에 따라 농산물

시장을 개방하였으며, 자국 농업에 대한 보조금도 더 이상 마음대로 지급할 수 없게 되었다. 한 국가의 산업발전은 안정적인 저렴한 농산물의 공급에 기인하므로, 미국을 비롯한 농업 선진국에서 무차별적으로 들어오는 각종 농산물로부터 우리나라의 농업을 보호하는 것은 우리나라의 경제안정과 산업발전에 아주 중요한 관건이다. 특히 요즘은 유전자조작기술에 의해 형질이 전환된 농산물의 유입이 꾸준히 증가하고 있다. 그 이유는 무엇보다도 유전자조작 농산물의 우수한 생산성에 기인한다고 할 수 있다. 최근에 완료된 애기장대 (Arabidopsis)와 벼(rice)의 Genome Project는 작물의 품종개량을 위한 유용 유전자의 발굴을 더욱 쉽고 빠르게 촉진하고 있어 이와 같은 추세는 앞으로 더욱 더 가속화 될 것이라고 판단된다. 한편, 기능을 밝힌 유전자에 대해서는 특허권을 주장할 수 있기 때문에 미국을 비롯한 선진국들은 genome sequence data를 바탕으로 각 유전자의 기능을 규명하는데 총력을 기울이고 있는 실정이다. 그러므로 본 연구를 통해 규명될 식물의 저온 스트레스 반응에 관여하는 유전자들은 그 자체로서 부가가치를 가진다. 뿐만 아니라, 이들 유전자는 냉해에 내성을 가지는 농산물 개발에 이용되어 우리나라 농업의 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 전망된다. 따라서 현재와 같은 세계화 시대에 **유용 유전자의 선점은 21세기를 주도할 생명공학산업의 주요한 당면과제이며, 우리나라의 농업을 살리고 나아가 경제와 산업발달에 매우 중요한 관건**이 될 것이다. 2001년도 우리나라의 주요 경제지표에 따르면, 국민총생산량은 증가하는데 반해서, 총생산량에 대한 농림어업생산량의 비율은 줄어들고 있다. 그리고, 총수출액에 대한 농축산물 수출액은 감소세가 뚜렷한데 이는 생명공학 기술을 이용한 환경적응성이 높고, 고부가가치인 작물의 생산을 통한 극복이 필요하다는 것을 시사한다. 현재 중국을 비롯한 제3세계 국가들의 저렴한 농산물이 밀려들어오고 있고, 현재 우리나라의 농가 형편상 이러한 저렴한 농산물에 가격경쟁력을 높이는 힘드나, 질적 향상을 통한 품질경쟁력을 높인다면 극복 가능하다고 생각되어진다.

3. 사회·문화적 측면

현재 미국을 포함한 선진국들은 유용 유전자의 탐색 발굴 및 기능분석에 많은 인적 그리고 물적인 투자를 하고 있다. 특히 Syngenta나 Monsanto와 같은 다국적 거대 농생명 기업들은 주요 작물의 유전체 연구에 집중 투자하고 있다. 만약 이러한 기업들이 작물의 생산성을 높이는 유용 유전자들의 대부분을 선점하게 된다면, 주요 작물의 공급을 통제할 수 있는 상황이 벌어질 가능성도 배제할 수 없다. 이것은 우리와 같이 취약한 농업구조를 가

진 나라로서는 아주 위험한 일이 아닐 수 없다. 최악의 경우 우리 농업의 붕괴로 이어져 사회 불안을 야기할 수 있을 뿐만 아니라, 식량작물의 대부분을 외국에 의존하는 일이 생길 수도 있는 것이다. 식량작물의 대외 의존도가 높아질수록 우리나라의 사회는 급변하는 세계 정세에 더욱 민감하게 반응하게 될 것이며, 미국과 같은 주요 농산물 수출국의 입김으로부터 더욱 자유로울 수 없을 것이다. 이런 관점에서 볼 때, 작물의 생산성을 떨어뜨리는 냉해에 저항성을 가지는 작물체를 만드는 연구는 우리나라의 사회 안정과 자주적인 문화발전을 위해서도 반드시 필요한 일이라 사료된다. 또한, 소득증대를 통한 농촌 사회와 문화의 안정이 확립될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

식물은 발달 단계 또는 생리적인 변화와 낮은 온도, 높은 염농도, 가뭄, 그리고 일장 등과 같은 환경의 변화를 인지하여 생체의 조절기작을 변화시키고 그에 따른 생리현상의 변화를 나타낸다 (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). 게다가 낮은 온도, 높은 염농도, 가뭄과 같은 환경스트레스는 작물의 생산성을 저하시키는 주요 요인 중의 하나이다. 전 세계적으로 작물에 따라 최대수확 가능량의 40-80% 정도가 이러한 환경스트레스에 의해 유실되고 있는 것으로 알려져 있다. 이는 병충해와 같은 생물학적 스트레스에 의한 손실의 5-10배 정도에 해당하는 극심한 피해이다. 이러한 외부환경의 변화 중에서도 식물의 발육과 생장은 특히 저온에 대하여 민감한데, 개화와 같은 생식기관의 발육단계의 경우에 이러한 냉해와 동해에 더욱 민감하다. 따라서 온도조건의 적절함이 작물생산에서 가장 중요한 요인으로 작용한다.

저온에 의한 식물의 상해 중 냉해에 대해서는 여러 가지 학설이 제시되고 있으나, 생장점, 생식기관, 유엽 등의 분열 기능의 저하와 양분, 수분, 식물호르몬 등의 원활한 이동의 지체에 의한 정상적인 생리작용 수행의 불능으로 식물체가 저온에 의한 해를 입게 된다고 알려져 있다. 또 다른 저온에 의한 상해인 동해의 경우는 식물체나 조직의 동사를 유발하는데 이 경우에는 냉해에서 나타는 저온에 의한 생리작용의 저해가 아니라 세포간극의 동결에 의한 세포내부의 수분상실이나 조직 내의 결빙에 의한 세포소기관이나 세포자체의 파괴가 동해의 주된 원인이 된다. 이처럼 저온은 많은 주요 작물들의 생합성 기작과 대사의 불균형을 초래하는 명백한 요소이며 저온에 대한 식물의 반응은 대단히 복잡한 기작을 가진다는 것이 알려져 있다 (Dunn et al., 1990; Goddard et al., 1993; Taiz and Zeiger, 1991).

이러한 저온에 의한 상해에 대한 식물체의 방어기작에 대한 연구가 최근까지 국내외에서 아래에 열거하고자 하는 바와 같이 다양하게 시도되어져 왔다. 저온 스트레스가 처리된 식물에서 abscisic acid (ABA)의 양이 증대되고 그 양에 따라 수용성 단백질, proline, 당, 유기산 등의 함량이 증대되어 저온 저항성이 증대된다는 연구결과가 보고되었다 (Dunn et al., 1994; Hughes and Dunn., 1996; Ishitani et al., 1998). 그리고 이 과정에 관련된 효소들이 발견되었고, 이들에 의해 세포막지질의 지방산 조성이 변한다는 연구결과도 발표되었다 (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994).

열대와 아열대 식물과 달리 온대 식물은 저온순화 (cold acclimation)라는 능력을 가지고 있는데 이는 동해를 받지 않을 정도의 낮은 온도에 일정기간 노출되면 저온, 특히 동해에

대한 저항성이 증가된다고 알려졌다 (Goddard et al., 1993). Cold acclimation에 대한 생화학적, 분자 생물학적 연구들이 최근까지 많이 수행되어 왔으나 cold acclimation 과정이 복잡하고 수많은 유전자가 관련되어 있기 때문에 저온 저항성을 증가시키는 요인 전부를 파악하지는 못하고 있는 상황이다. Cold acclimation과 관련된 연구에서도 대사경로에 관련된 효소 활성의 변화, 당(sucrose, fructose), 아미노산 (proline) 또는 polyamine의 축적, 세포막 지질 구성 성분의 변화 등은 마찬가지로 나타났다. 근래에 cold 스트레스에 의해 발현이 유도되는 cold-inducible 유전자들인 *cas* (cold acclimation-specific), *cor* (cold-regulated), *rab* (responsive to ABA), *blt* (barley low-temperature), *blti* (barley low-temperature induced) 라 명명된 유전자들이 새로이 발견되었다 (Thomashow et al., 1999). 하지만 이들 유전자들의 기능은 아직 분명하게 알려져 있지 않으며, 일부 그 기능이 알려졌으나 cold acclimation 과정에서의 직접적인 역할이나, cold 저항성에서 그 필요성이 명확히 증명되지는 않았다.

저온저항성과 엽록체 막의 높은 불포화산 함량 사이에 관련이 있음이 *Arabidopsis*의 돌연변이체에 대한 분자생물학적 연구에서 알려졌다. 지방산의 불포화 정도는 glycerol-3-phosphate acyltransferase라는 엽록체에서 작용하는 효소의 특이성에 의해 결정되는데, 미생물로부터 분리한 이 효소를 식물에 도입한 연구에서 저온 저항성이 증대됨을 발견함으로써 cold 저항성 정도가 엽록체막 지질의 불포화 정도와 관련이 있음이 밝혀졌다 (Thomashow et al., 1999). 지질의 불포화도의 변화처럼 당함량의 변화 역시 cold acclimation 과정과 관련됨이 규명되었다. 대장균의 pyrophosphatase와 효모의 invertase 유전자를 식물체에 도입한 경우 식물의 생장이 줄고 수용성 탄수화물의 농도가 증가하였는데, invertase 유전자가 도입된 식물은 저온 스트레스에 야생형보다 오히려 더 민감하였고, pyrophosphatase 유전자가 도입된 식물은 저온 저항성이 증대되었다.

이 밖에도 저온스트레스 신호전달과 관련된 많은 유전자들이 분리되고 있는데, 특히 전사인자 (transcription factor)들이 발견되어 이를 이용한 형질전환 식물체가 만들어지고 있다. 저온 신호전달 과정에 관한 현재의 이해는 매우 단편적인데, 저온 처리시 발현이 증가되는 *cor* 유전자의 promoter 연구에 따르면, *cor* 유전자 promoter의 저온 반응 염기서열 부위인 CRT(C-repeat)/DRE(drought responsive element)에 전사 조절인자인 CBF(CRT/DRE binding factor)가 붙어, CRT/DRE regulon을 구성하는 저온 반응 유전자들의 발현이 증가하게 되고 이에 의하여 저온에 대한 저항성이 부여될 것이라 생각되고 있다. 하지만 어떠한 신호 전달 요소를 통해 이들 CBF 유전자들의 발현이 증가되는지는 알려져 있지 않다. 그러나 CBF1의 경우 식물체의 내동성을 증가시킨다는 것이 보고되었다 (Thomashow et

al., 1999).

앞서 열거된 저온에 대한 생리적, 생화학적, 분자 생물학적 연구들은 주로 국외에서 많이 수행되었으나, cold acclimation 과정은 복잡하고 수많은 유전자가 관련되기 때문에 아직까지도 저항성을 증가시키는 요인 전부를 면밀히 파악하지는 못하고 있는 실정이다. 국내에서도 저온 스트레스에 관련된 연구가 산발적으로 진행되고 있으나 대부분 스트레스 하에서 발현되는 유전자의 분리나 분리된 유전자의 과다발현에 국한되고 있고 스트레스반응 유전자의 발현조절이나 스트레스신호전달에 관한 체계적인 연구는 이루어지고 있지 않다. 최근에 완료된 애기장대(Arabidopsis)와 벼(rice)의 Genome Sequencing Project는 작물의 품종개량을 위한 유용 유전자의 발굴을 더욱 쉽고 빠르게 촉진하고 있다. 하지만, 현재까지 벼를 비롯한 **주요작물의 저온 스트레스 신호전달에 관련된 유전자들에 대한 연구는 애기장대에 비해 현저히 미진한 상태**이다.

그러나 다행히도, 본 연구자들은 선행연구를 통하여 저온 스트레스 신호전달체계에 관여하는 것으로 밝혀진 애기장대 유전자들과 매우 유사한 유전자들이 벼와 보리를 비롯한 다른 유용 작물의 genome에 존재하는 것을 알 수 있었다. 이것은 **벼를 비롯한 유용작물들이 애기장대와 비슷한 저온 스트레스 신호전달체계를 가지고 있음**을 의미한다. 따라서 애기장대에서 밝혀진 많은 저온관련 유전자와 지식은 내냉성 또는 내한성 유용작물의 개발에 아주 귀중한 정보를 제공하리라 판단된다. 본 총괄연구책임자는 이미 애기장대에서 저온 스트레스 신호전달과정의 상위단계 분자구성원(upstream molecular components)에 해당하는 유전자를 확보하여 그 결과를 Plant Cell (2003. Vol. 15, 293) 에 발표한 경험이 있다. 애기장대를 모델로 하여 얻은 지식과 기술을 이제는 벼와 같은 유용작물에 적용해야하는 시기가 도래하였다고 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 내냉성 작물개발을 위한 저온 스트레스 반응관련 벼 (rice) 유전자의 확보 및 기능 분석

1. 이론적, 실험적 접근방법

본 연구에서는 우선 벼에 존재하는 CIPK3 유사 유전자들의 full-length cDNAs를 RT-PCR, RACE 또는 cDNA library screening 등의 기술을 이용하여 분리하고자 한다. 확보된 cDNA의 염기서열을 결정한 후 genomic Southern blotting을 수행하여 벼의 genome에 존재하는 copy number를 결정한다. 다음으로 northern blot 과 promoter-GUS 분석을 통해 이들 OCK 유전자가 발현 되는 부위(조직)를 조사할 것이다. 또한, 이들의 발현이 cold stress signal에 의해서 유도되는가의 여부도 살펴 볼 것이다. OCK들과 애기장대 CBL 단백질들과의 상호작용여부 및 특이성에 대한 체계적인 실험도 gal4 전사조절인자를 이용한 yeast-two hybrid system (Kim et al., 1997)을 이용하여 밝힐 것이다. OCK는 유추된 아미노산 서열에 의하면 serine-threonine protein kinase의 일종이다. 따라서 OCK 단백질의 생화학적인 특성을 조사하기 위해 먼저 GST-fusion system을 이용하여 E.coli(BL21)로부터 다량 생산 후 정제할 것이다. 그리고 정제된 OCK 단백질을 이용하여 MBP, casein, histone 등을 기질로 사용하여 kinase assay (Kim et al., 1999)를 수행할 것이다. Cold signaling에서 OCK의 역할을 밝히기 위해서 필요한 in vivo 기질이나 효소활성 조절인자 등을 yeast-two hybrid screening 방법을 이용하여 탐색할 것이다. 한편, CaMV 35S promoter를 가지는식물형질전환용 벡터(pBI 또는 pCAMBIA series)와 Agrobacterium GV3101 또는 LBA4404를 이용하여 OCK 단백질을 over-expression하는 애기장대와 벼의 형질전환체를 만들 것이다. 또한, genome상의 유전자 발현을 silencing 시키는 최신 기술인 RNAi 방법 (Chuang and Meyerowitz, 2000)을 이용하여 OCK 유전자의 기능이 상실된 형질전환체를 만든다. 이렇게 얻은 형질전환체와 정상적인 식물체에서 각각의 성장 및 생장 발달 상태의 변화, 그리고 cold stress에 대한 저항성을 관찰하여 비교한다. 이러한 결과는 OCK의 기능을 밝히는 데 중요한 단서를 제공할 것이다.

2. 연구내용 및 결과

가. OCK full-length cDNA 클론의 확보 및 염기서열 결정

본 연구자의 선행연구에 의하면 애기장대의 CIPK3 유전자는 저온신호에 의해서 CBF/DREB1 등의 발현을 조절함으로 저온 신호전달체계에서 상위에 위치한 분자구성원인 것으로 생각 된다 (Plant Cell, 2003). GenBank 검색 결과 벼의 genome에 CIPK3과 유사한 유전자들이 존재함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 저온 저항성 벼 개발을 위한 기초연구로서 우선 애기장대 CIPK3와 유사한 벼 유전자들을 분리하여 분석하고자 하였다. 벼 유전자의 분리는 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 벼의 각종 조직으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA library (Oryza sativa L. Dongjin)를 제작하였다. GenBank 검색 결과 CIPK3과 유사한 것으로 밝혀진 벼 유전자들의 염기서열을 기반으로 primer를 제작하여 PCR 방법으로 벼 cDNA library를 screening 하였다. 그 결과 총 4개의 OCK full-length cDNA 클론을 분리할 수 있었으며, 이들 클론의 염기서열을 결정하여 OCK1, OCK2, OCK3, 그리고 OCK4로 각각 명명하였다. 이들의 염기서열은 아래와 같다. 한편, 이들 full-length cDNA로부터 유추된 아미노산 서열을 이용하여 Alignment을 수행한 결과, Arabidopsis의 CIPK family 유전자들의 특징인 NAF domain이 보존된 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 3.1.1). 이것은 분리된 OCK들이 애기장대의 CIPK처럼 calcium sensor 인 CBL 그룹의 칼슘결합 단백질들과 상호작용하여 cold, high salt, drought 등의 스트레스 반응에 관여할 가능성이 아주 높다는 것을 암시한다.

OCK1 cDNA Sequence ORF: 1,320 bp)

```
ATGGAGAGTAAAGGGAAAATACTAATGAAAGGTATGAGTTGGGCAAATTGTTGGGAAAGGAACATTTGGCAAGGTGCACTATGCAGGGAATCTGGAGTCAAACC  
AGAGTGTGGCCATAAAGATGATGGACAACAGCAGGTGTTGAAGTTCGGGCTTTCGGAGCAGATCAGACGTGAGATCACAACCATGCGGTTGGTGGCTCATAAGAA  
CATTGTTGAGCTTTCATGAGGTCATGGCAACACGGAACAAGATCTACTTTGTGATGGAGTATGTGAAAGGTGGTGAAGTATTTGAAAAGGTTGCAAAGCGTGGAAAG  
CTTACAGAGGTTGTTGCCATAAGTACTTCCAGCAACTCATTAAAGTGCAGTGGATTACTGCCACAGTCGAGGTGTATCACCAGGACTTGAAGCCTGAAAACCTGC  
TGTGGATGAGAATGAGAACCTGAAAGTCTCAGACTTTGGACTGAGTGCCTTTCAGAGTCGAAGAGGCAAGATGGCTTACTCCATACCACCTGTGGAACACCTGC  
ATATGTAGCTCCAGAGGTGATCAGCAAGATAGGATATGATGGTGCAAAGTCAGATATTTGGTCTTGTGGTGTATCCTGTTTGTCTTGTGGTGGTTACCTTCCT  
TTCCAGGGCCAAACTTGATGAAAATGTATCGGAAGATACAACATGGTGAATTCAGGTGCCCGGTTGGTTTTTCACGCAAACTTCAGAATTTGTTGTACAAGATCA  
TGGACCCCAACCAAGCACAAGGATTTCAATCCAGAAGATAAAGGAGTCTACCTGGTTCGGAAAGGTCTGAGGAAAATCGTATTTTGAAGGAAAGAACTTTGAA  
TGAAAACCCCAAAAATGTTGCTCTGGTCTTGGTGTGAGACCAAGAAAAATGCTCATGAAGATGTGAAGCCCATGTGAGTGAACAACTTAAATGCCTTTGAA  
ATTATCTCTTTTCCAAGGGGTTTGTATCTCTGGCATGTTTATTGTAAGGAATGGAGAAATGAGGCAAGGTTCACTTCAAATAAATCTGCCTCAACCATAATCT  
CAAAGCTAGAAGATGTTGCAAAGCGCTAAATCTCAGGGTAAGGAAAAAGACAATGGTGTAGTGAATAATGCAAGGGAGGAAAGGAAGGAAGGAATGGTGTCTTCA  
GTTTGACATAAAAAATATTTGAGGTTACCACTTCTATCATATCATCGAGATGAAACAAACAGTGGCGGATTCATTGGAGTACCGACAGCTACTGGAGGAGGGGCATC  
CGGCCAGCTCTGAAGGACATTGTCTTGGCTGGCATGGAGATGAATAG
```

Ock2 cDNA Sequence ORF: 1,386 bp)

ATGGAGAAGAAGGCGTCCATCCTCATGAACCGGTATGAGCTCGGCCGCATGCTCGGCAAGGCACCTTCGCAAGGTGTACCATGCACGGAACTTGCATCCAACC
AGAGCGTCGCCATCAAGGTGATTGACAAGGAAAAGGTATTGCGTGTGGCATGATTGACCAGATCAAGCGAGAGATCTCCATCATGCGCCTCGTTCGCCACCCCAA
CATCGTCCAGCTGCACGAGGTGATGCCAGCAAGAGCAAGATATACTTTGCAATGGAGTATGTCGGGGTGGTGAAGCTTTCCAGCAGGTAGCCAGGGGGGACTC
AAGGAGGATGCTGCGAGGAAGTACTTCCAGCAGTTGATAGGGGCTGTGGACTTCTGTACAGCCGCGGTGTCTACCAGGACCTCAAGCCAGAGAACCTCCTCG
TCGACGAGAAATGGCAACCTCAAAGTGTGGACTTTGGGCTGAGCGCTTCAAGGAGTGTGAGAAGCAGGACGGGCTGCTCCACACGACGTGTGGCACACCTGCATA
TGTGACCCAGAGATAATCAATAAGAGGGGCTATGATGGAGCAAAAGCAGACATATGGTCTTGGGTTGTCATACTCTTTGTTCTGCTTGTGGTACCTCCATTTC
CATGACTCAAATCTAATGGAGATGTACCGGAAGATAAGCAAAGGTGATGTCAAGTCCCACAGTGGTTCACACTGATGTCCGAAGGCTTGTGTCAGGCTGCTTG
ATCAAATCAAACATTAGGATCACCGTTGAGAAGCTAGTTGAGCATCCATGGTCAAGAAGGGGTACAACCAGCAGTGTGATCATCACAGCCAAATGAATCAAA
CAACCTCAAGGATGTCCACTGCTTTCAGTGTGATCAAGGCAATGAAGGCAAGGCAAAAGAACCAGCAGCTTTGAAGCCAGTGAAGTGAATGCATTT
GACATCATCTCCCTCCTCAAAGGATTTGATCTGTGACGGCTGTTGAGAACGACAAAGAGCAGAAAGGACACTCACGGTTCATGACACAAAACCAGCATCAGCAA
TAGTGTCAAAGTGAAGCAGATTGCTGAGACAGAGCTTCAAGGTGAAGAAGCAGGATGGACTGGTGAAGCTCCAGGATCCAAAGAAGGGAGAAAAGGGCAGCT
CGCGATCGATGCAGAGATCTTTGAAGTGACACCATCTCTTTGTTGTTGAGGTGAAGAAGTGTGCAGGGGACAGCTTGAGTACGAAAAATTTCTGCACCAAGGGC
CTAAGACCTTCTCAGGGACATCTGCTGGGATGGTCAAGTGTGAGCATCCATCACTGGCACAGTCAACTCTGACTCAGTCTTAAGTCAATCTCGAGACATG
CCATTAA

Ock3 cDNA Sequence ORF: 1,509 bp)

ATGATGGATGGGAGGTCAATCTTGATGGGCGTATGAGGTTGGGAAGCAATTAGGACAAGGAACATTTGCAAAGGTGTATTATGCACGAAATCTTACTACCGGC
AAGCTGTTGCCATAAAGATGATCAACAAGGATAAAGGTGATGAAAGTTGGGCTAATGGAGCAATAAAGAGGGAGATTTCAATTATGAGATTGGTGAACATCCAAA
TGTTCTTCAGTATTTGAGGTTATGGCTAGCAAGAGCAAGATTAATTTGTTCTGGAGTATGCTAAAGGTGGTGAAGCTTTCAACAAAAATTGCTAAGGAGGGAAAG
CTCAGTGAAGGATCTGCGAGGAGATATTTCCACCAATTGATCAATGCAGTTGACTATTGCCATAGTGGAGGTGTTATCATCGTGACTTAAAGCCTGAAAAATCTGC
TCCTGGATGAGAATGAAAACCTTAAAGTCTCAGATTTGGTTAAGTGCCTGGTGTGAGTCCAAGAGGCAAGATGGTCTCCTGCATACTACATGTGAACTCCAGC
TTATGTTGCTCCTGAAGTCTTAGCAGGAAAGGCTATGATGGTGCAAAGGCAGATGATGGTCTTGTGGAGTAAATTTGTTGCTTGTGGCTGGTACCTTCCT
TTCCATGATCCAAATTTGATAGAGATGTACAGAAAGATTGAGAGCAGACTTCAGATGCCCTGTTACTTTTCTGCTGAGCTGAAGGATCTTATACATAAAATCC
TTGATTCAGATCCAAGTACTAGGATTTCTATCCCAAGGATAAAGAGAAGTACTTGGTACAGAAAACAGTGAATAAATGCTAAAACAGTGAAGGACCCACAAAC
AAACAGCATCTCTCAGGTGTAGTACAACCTCAGGTTCTGCAGAGTGCAGCACTTCTGAGGAAAAACAAGGGTCTTAAGCTCCCAAACCTGAATGCATTTGAC
ATAATTTCTCTCAACAGGGTTAATCTATCTGGGTTTTTGGAGTACGCATGGTACCAGGAAGAAGCGTTTACCAGGACGCTGTGACAACAGTACTTG
GAAAGTGAAGGAATTTGCCAAACGCTGAACTAAAAGTTAAGAAGAAGGATAATGGAGTTTTGAGATTGGCAGCACCAAGGAAGGAAAGAGGGCTTTCTTGA
ACTTGATGCAGAGATTTTGAAGTCAACCTTCACTCCTTATGTTGAGTTGAAAAAGACCAACGGGATACTATGGAGTATCGAAAGCTGGTCAAAGAAGATATA
AGGCCAGCACTCAAGGATATTGTTGGGTGTGGCAAGGTGATGAGCACCTGAACACATACTATCCTGCAAGGAGAGCAGCAGCAGTCCCATTTGCCACAGAGC
TACCACAGGATCAGTTGCAACCATCATGCCACAACAGGAGAAGCAGGACATGCCTGAACCACGTTGTTGCCACAAGTACCACAAGAAGAAGTGAACACATCTAT
CCCGCAGAACAAACAAAGAAATAG

Ock4 cDNA Sequence ORF: 1,431 bp)

ATGGCCATGGAGACGACGAGCCAAAGATTCGAGGTGATCATGGGGCGGTACAAGCTCGGCCGGCTCCTCGGCCGTGGCAGTTCGCAAGGTCTACAAGGCCTATA
AGTTGGCCACCGCGGAGGCGTCCCATCAAGGTGTTGACAAAGGAGGCGGTGACGCGTCCGGCACGGTGGAGCAGGTGAAGCGCGAGGTGGAGTATGCGCGG
TGTGCACACCACGACGATCCCGCTCCAGAGGTGATGGCTACGCGGTCCAGGATCTACTTCGTATGGAGTACGCGAGCGCGGGGAGCTTTCACCCGCTC
TCCCGGAGCCCGGTTCCCGGAGCCCGTCCGCGCCGCTACTTCCAGCAGTGTACCCCGGTGGAGTTCTGCCACAGCCGCGGCGTGTACCACCGCAGCTCA
AGCCGAGAACCTCCTCCTCGACGCCGCGGACCTCAAGGTACCGACTTCGGCTCAGCGCTAGACGGAGGCTCCGCGGCGAGGCGCTTTCGACACCCAC
GTGCGGACGCGCGGTACGTCGCTCCGAGGTGCTCCTGAAGCGTGGTACGACGCGCCAAAGGCGGACATCTGGTCTGCGCGCTGATCCTTTTCGTGCTCCTC
GCCGGTACTCCTTCAACGAAACCAACCTCGTATCCTGTACCGGAAATACAGGAGAGCAACTACAGGTGCCCGCGTGGTCTCCGTGAGGGCGCGCAAGC
TCCTTGCCAGGCTGCTCGACCCGAACCCAAAGCCGATCACCATCTCCAAGATCATGGACAGGCCATGGTCCAGCAGGCGAGTGCCTGCTCGGGCAGATGTC
CCTGTCGCGAGCGCCCTCGTGTGCTTGCAGAAAGGAAGCCAGCCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAGCAGTGGTTTTGCACGGGAGAGAAAGAGCGGTCC
AATGTGATCATGTCTGCGCGGTGATCGAGTGAAGCCCTCGAGCATGAACGCTTCCAGATCATCTCGCGGTGAGAGGGCTGGACCTGTCCAAGATGTTGAGC
CGGAGGAGCGAGGTGCGAGGCGCGTTCTCCACCAGGGAGACCAGCGCGATCGTCTCAAGCTGGAGGAGATCGCGGAGGCGGGGAGGTTCAAGCTTCAAGCT
GAAGGAGAAAGGAGGTCGAGCTGGAGGGGAGCCAGGACGGCGGAAGGGCGCTGGCCATCGAGGCGGAGATCTTCAAGGTGCGCGGAGGTGCACGTGGT
GAGGTGAGGAAGACCGCGGCTCAGCGGATTTCCGGGACTTCAAGCAGGAGCTTAAGCCGTGCTTGGCGACATGGTGTGGGCGTGGCAGGAGGTGAT
CGCCGCGCTGTCGCGGCGGCGGGAGGAGGCGGATCAGAAAGCGCTTGA

```

1 MNRRQGVKRR---VCKYEVGRITICEGTFKAVKFKARNSETGCEVVALKILDKKVKLKHKMAEQIRREITATMKLIKHPNVQLMEVMASKTKI CIPK3
1 ME----SKGKILMERVELKLLGKGTFGKVHYAGNLESNOSVAIKVMDKQOVLKFKGLSEQIRREITITMRLVAEKNIIVQLHEVMATRINKI OCK1
1 ME----KKASILMNRVELGRVLGGTFKAVYFARNLASNOSVAIKVIDKVKVLRVGMIIQIKREISIMRLVRFHPNIIVQLHEVMASKSKI OCK2
1 MM----DGRSILMGRYEVKQLGGTFKAVVYARNLITGOAVAIKVIKDKVVMKVLMEQIKREISIMRLVRFHPNIIVQLHEVMASKSKI OCK3
1 MAMEITTSQDSQVILMCRVKLGRLLGRGTFKAVYKAYKLATGEVAVAIKVFDKEAVQRSGVVEQVKREVDVMRRVHFRHVLRRLHEVMATRISRI OCK4

88 FIIIEYVTCGGELEDKIVNDGRMKEDBARRYFQQLIFAVDYCHSRGVYHRDLKPENLILLDSYGNLKISDFGLSALSQQVRDDGLLHTSCGTI CIPK3
86 YFVMEYVKCGELEFKVAKRCKLIFVVAISTSSNSLSAVDYCHSRGVYHRDLKPENLILLDENENLKVSDFGLSALSSESKRQDGLLHTTCGTI OCK1
86 YFAMEYVRCGELEFSRVAR-CRLKEDBARKYFQQLIGAVDFCHSRGVYHRDLKPENLILLDENENLKVSDFGLSALFCKQKQDGLLHTTCGTI OCK2
86 YFVIEYAKCGELENKIKAKECKLSEDSARRYFHQLINAVDYCHSRGVYHRDLKPENLILLDENENLKVSDFGLSALAESKRQDGLLHTTCGTI OCK3
91 YFVMEYASCGELEIRLSRSPRFPFVARRYFQQLIFAVDFCHSRGVYHRDLKPENLILLDARGDLKVIDFGLSALDGGGLRQDGLLHTTCGTI OCK4

178 ENYVAPEVLIINDRGYDGAIDMWSQGVILVLLVLLAGYLPEDDSNLMNLYKRISSGDFNCPPWLSLQAMKLIITRIIDPNENIRVIFQEVREDE CIPK3
176 PAYVAPEVLSKIGYDGAKSDIWSQGVILFVLLVGGYLPFCQENLMEMRYKIQHGFRCGWFGRKLNQLLYKIMDPNPNSTRISIQKIKESTI OCK1
175 PAYVAPELIIKRGYDGAKADIWSQGVILFVLLVAGYLPFHDSNLMEMRYKISKCDVKFPQWFITDVRRLLSRIILDPNENIRITVVKLVEHP OCK2
176 PAYVAPEVLSRKYDGAKADVWSCGVILFVLLVAGYLPFHDPENLIEMRYKICRADFRCPYFSAELKDLIHKILLSDPSTRISIPRIKRSI OCK3
181 PAYVAPEVLIKRGYDGAKADIWSQGVILFVLLVAGYLPFNETNLVILYKRIITENRYRCPWFWSVEARKLLARILLDPENKTRITTIISKIMDRP OCK4

268 WFKKDYKP-----PVFEEERDDSNM--DDIDAVF-----KDSBEHLVTEKREEQPAATINAREIISMSRGLNLENLFDPEQEFKR CIPK3
266 WFRKGP-----EENRIKERTLNENPPKVAIIVLCVVRPK-N---AHDDVKFMSVINLNAREIISFSKGFDSLGMFI-VKQWRN OCK1
265 WFKKGY-----KEAVMLSQPNESNLL-KDVHTAFSADHKD-NFGKAKEPASSLKEVSLNAFDIISLSKGFDSLGLFENDKCKA OCK2
266 WYRFPV-----EINAKNSEAATINSISSGVATTSGSAECS-T---SEENQCSLSLENLNAFDIISLSIGFNLSCGFEE-DIHGHQ OCK3
271 WFOQATCPLGDMSLVASAPSVLARKIASQHDDEEDGAREKKRNSWIMSSPVVIDVRPSSMNAFDIISRSRGLDLKMFDAE-RRRS OCK4

339 ETRITILEGCGNEIIEKLEDAAKPLIGDVKKNY-KMRLNVRKAGRKNINVATELHQVAPSLSHMVQVSKSGDITLFFKFKYKK-LSNSLE CIPK3
340 EARFTSNKASASTIISKLEDAKALNLRVRKKNVGVKMQCRKEGRNVLQFIIKIFEVITSMHITEMKQTSQDSLEYRQLLEEGIREALK OCK1
342 DSRFMTCKPASAIIVSKLEQLAETESFKV-KKQDGLVKLQSKBGRKCOLAIDAEIFEVTPSHFVVEVKKSAGDITLVEKFCNKGLRPSLR OCK2
340 BERFTTRQEVITVILGKIKELAKRIKLVKKNVGVLRLAAPKEGKGFELDAEIFEVTPSILLVELKKTNGDIMEYRKLVKEDIREALK OCK3
360 EARHSTRETTIATVSKLEETAEGRSFKIKERGRVELEGSQICRKGALATBAEIFKVAPEVHVVEVRKTCGDSPEDRDFYKQELKPSLG OCK4

427 QVV--WINNEV-----KKEIAK CIPK3
430 DIVLAWGDE OCK1
431 DI--CWDCQSE-----HPSIAC-----SSTLTCSSKISRHA OCK2
430 DIVVWQGDHEINQSILQGEQQQSPLPEELPQDLQPSLPEQEKQDMPEPPLIFQVPEEVQTSIPAEQIKN OCK3
450 DMVWAWQCDS-----PELVAAAGRRPI-----IKR OCK4

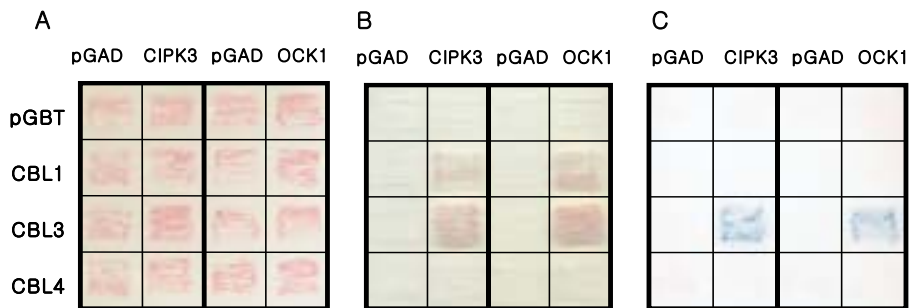
```

[Figure 3.1.1] Alignment of the deduced amino acid sequences of Arabidopsis CIPK1 and OCKs. Identical amino acid residues are black-boxed. The NAF domain, which is conserved among the CIPK family members and involved in the interaction with the CBL group, is also found in OCK and underlined.




나. Yeast two-hybrid system을 이용한 OCK와 CBL의 상호작용 여부 조사

앞의 연구결과는 OCK 유전자들이 실제로 애기장대 CIPK 그룹의 유전자들처럼 벼에서 작용할 가능성이 있음을 나타내고 있다. 즉 OCK가 애기장대 CIPK의 벼 ortholog일

가능성을 암시하고 있다. 따라서 이것을 검증해 보기위한 한 방법으로, 우선 OCK1가 CIPK3처럼 실제로 Arabidopsis의 CBL 단백질들과 상호작용을 할 수 있는가의 여부를 yeast two-hybrid system으로 조사하였다. Figure 3.1.2 에서 보는 바와 같이 OCK1은 CIPK3처럼 CBL 그룹의 단백질 (CBL1, 3, 4) 중에서 CBL3과만 상호작용을 하였다. 즉, OCK 단백질들은 CBL-CIPK 경우와 같이 interaction specificity를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, Figure 3.1.3에서처럼 OCK의 deletion mutant construct를 제작하여 CBL3과의 상호작용에 필요한 부위를 살펴보았다. 예상대로 kinase domain 만을 가진 mutant는 CBL3과 상호작용을 하지 않았으며 NAF domain만을 소유한 mutant는 오히려 CBL3와 더욱 강력하게 상호작용을 하였다. 이것은 애기장대에서 밝혀진 CBL-CIPK 신호전달체계가 벼에도 보존되어 있음을 강력히 시사한다. 즉, 애기장대 CIPK3의 저온신호전달 기능을 OCK 그룹에 속하는 유전자 중의 하나가 소유하고 있을 가능성이 충분히 있음을 보여주는 연구결과라고 할 수 있다. 실제로 제2 협동과제의 OsPK1 유전자는 OCK family에 속하는 유전자로서 저온 신호전달에 관여하고 있는 것으로 판명되었다. 따라서 본 세부과제에서는 OCK 유전자에 대한 연구는 제2 협동과제에 전담하고 OCK 단백질과 상호작용하는 새로운 단백질을 지정하는 유전자를 탐색 발굴하여 동정하고자 하였다.



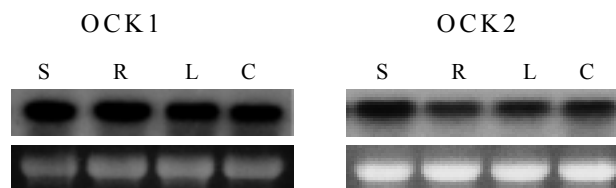
[Figure 3.1.2] OCK1 interacts with Arabidopsis CBL3 in a yeast-two hybrid system. Yeast strain Y190 was co-transformed with the indicated pGBT and pGAD plasmids. A, Yeast growth on the SC-Leu-Trp. B, Yeast growth on the SC-His-Leu-Trp. C, Filter-lift assay of β -galactosidase activity.

	pGAD	pGBT	CBL3
		- (<1)	- (<1)
1	 Kinase 439	- (<1)	+ (50.2)
1	 Kinase 309	- (<1)	- (<1)
	310  NAF 439	- (<1)	+ (80.4)

[Figure 3.1.3] The C-terminal region of OCK1 is required and sufficient for the interaction with CBL3. Different region of OCK1 were cloned into the pGAD vector and transformed into the Y190 yeast cells carrying the pGBT.CBL3 plasmid. Yeast growth was monitored on the selection medium and scored as growth (+) and no growth (-). Numbers in the parenthesis indicate the units of the β -galactosidase activity. The amino acid positions that flank each protein fragment are indicated.

다. Northern blot 분석에 의한 OCK 유전자의 발현 부위 조사

OCK1과 OCK2 유전자들의 발현 부위를 알아 보기 위하여 벼의 각 조직들로부터 total RNA를 분리하여 northern blot 분석을 수행하였다. Figure 3.1.4에 보는 것처럼 OCK1과 OCK2는 거의 모든 조직에서 비슷하게 발현되었다. 하지만 저온에 의한 유전자 발현양상의 변화는 거의 관찰할 수 없었다. 이와 같은 발견은 저온 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 애기장대 CIPK3 유전자와 달리 벼의 OCK1과 OCK2 유전자들은 저온 신호전달에 관여하고 있지 않을 가능성을 내포하는 결과라고 볼 수 있다.



[Figure 3.1.4] Northern blot analysis of the OCK1 and OCK2 genes. Total RNAs were isolated from the indicated rice tissues as follows; one week-old seedling (S), roots (R) and leaves (L) from four-week old plants, and callus 3 weeks

after induction on the 2N6 medium. The lower panels indicate ethidium bromide-stained rRNA bands showing equal loading among the lanes.

라. OCK와 상호작용하는 단백질을 지정하는 full-length cDNA의 분리

본 연구를 통해 총 4개의 OCK full-length cDNA를 분리하였다. OCK1, OCK2, OCK3, 그리고 OCK4로 각각 명명된 이들 full-length cDNA로부터 유추된 아미노산 서열의 분석은 OCK 단백질들이 Arabidopsis의 CIPK family 의 특징인 NAF domain을 가지고 있음을 보여주었다. 실제로 OCK1은 yeast two-hybrid assay에서 Arabidopsis의 CBL3 단백질과 상호작용을 하였다. 이것은 분리된 OCK들이 Arabidopsis의 CIPK family처럼 calcium sensor 인 CBL 그룹의 칼슘결합 단백질들과 상호작용하여 cold, high salt, drought 등의 스트레스 반응에 관여할 가능성이 아주 높다는 것을 암시한다고 볼 수 있다. 즉 OCK는 Arabidopsis CIPK의 벼 ortholog일 가능성이 있는 것이다. 따라서 본 연구에서는 이것을 실험적으로 살펴보고자 yeast two-hybrid system을 이용하여 OCK3의 in vivo interactor를 찾고자 하였다. 이를 위해서 OCK3의 full-length cDNA를 DNA binding-domain vector에 클로닝하여 bait로 사용하였다. 또한, 벼의 각종 조직으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA를 생산한 후 activation domain vector에 클로닝하여 cDNA expression library를 만들어 yeast two-hybrid screening에 prey로 이용하였다. Yeast two-hybrid screening을 통해 획득한 양성클론들을 분석한 결과 이들 cDNA 클론들 중에 Arabidopsis CBL family와 유사한 calcium-binding protein을 지정하는 유전자들이 속해있음을 알 수 있었다. OBL로 명명된 이들 벼 유전자의 확인은 전년도 연구결과와 더불어 애기장대에서 보고된 CBL-CIPK 칼슘신호전달기작이 벼에도 보존되어있음을 나타내는 의미 있는 발견이다. 현재까지 OBL그룹에 속하는 두 개의 full-length cDNA를 성공적으로 분리하여 각각 OBL1과 OBL3로 명명하였다.

염기서열 결정 및 분석을 통하여 OBL1은 642 bp의 open reading frame(ORF)으로 213 amino acid residues (분자량: 24.5 kDa)를 지정하고, OBL3는 678 bp의 ORF로 분자량이 25.8 kDa 인 225 amino acid residues를 지정함을 알았다. Figure 3.1.5과 3.1.6에 나타낸 바와 같이 유추된 아미노산 서열(deduced amino acid sequence)로부터 OBL1과 OBL3 단백질은 각각 AtCBL1 (91% identity)과 AtCBL3 (94% identity)와 아주 유사함을 확인할 수 있었다. 또한, 이들 두 단백질은 칼슘결합 부위로 알려진 전형적인 EF-hand motif를 AtCBL처

럼 3개 소유하고 있다. 실제로 OBL1은 Figure 3.1.3에 나타난 결과처럼 CBL1의 target인 CIPK1과 yeast two-hybrid system에서 상호작용을 유지하였다. 하지만, OBL3은 CIPK1의 kinase domain 부위가 결여된 C169 deletion mutant 와만 상호작용을 유지하였으며 full-length CIPK1과는 상호작용을 하지 못했다. 이러한 결과는 벼의 칼슘신호전달기작이 애기장대의 그것과 비슷하리란 것을 암시한다. 한편, 분리된 cDNA sequence 와 Genomic DNA sequence를 비교하여 OBL1과 OBL3 유전자는 각각 8개의 exon으로 구성되어 있음을 밝혔다. OBL1은 AtCBL1처럼 membrane에 targeting 되는 데 관여하는 것으로 알려진 myristoylation motif (MGXXXS/T)를 N-terminal 부위에 소유하고 있다.

```

CBL1 MGCFHSKAAKEFRGHEDPVKLASETAFSVSEVEALFELFKSISVDDGLI NKEEFQLALFKSRKR ENI F 71
OBL1 MGCFQSTARRRPRPGYEDPVGLASETAFSVSEVEALFELFKSISVDDGLI NKEEFQLALFKNRKR ENL F 71

CBL1 ANRI FDMF DVKRRKGV I DFGDFVRS LNVFHPNASLEDKI DFTFR LYDMDGTGYI ERQEVKQMLI ALLCESEM 142
OBL1 ANRI FDL F DVKRRKGV I DFGDFVRA LNVFHPNIPMEKIDFSFKLYDMDNTGFI ERKEVKQMLI ALLGESEM 142

CBL1 KLADETIETI LDKTFEDADVNQDGKIDKLEWSDFVNKNPSLLKIMTLPYLRDITTTFPSFVFHSEVDEIAT 213
OBL1 RLSDEI IETI LDKTFSDADTNQDGRIDRTEWENFVSRNP SLLKIMTLPYLRKDI TTTFPSFVFNSEVDDLVT 213

```

[Figure 3.1.5] Amino acid sequence alignment of AtCBL1 and OBL1. Residues with a black background indicate identical amino acids. Dashes indicate gaps introduced into the amino acid sequence to optimize the alignment. Solid lines below the sequence indicate position of EF-hand motifs.

```

CB3 MSQCIDGFKHVCSSFFRCFDI DI YKQSGGLGPELLARETVFSVSEI EALYELFKKI SSAVI DDGLI NKEE 71
CB3 MLQCLEGVKQLCGVLLKCCDLDL- KQPKGLEDEPEI LARETVFSVSEVEALYELFKKI SSAVI DDGLI NKEE 70

CB3 FQLALFKTNKESLFA DRVFDLFDTKHNGI LGFE EFARALS VFHPNAPI EDKI DFSFQLYDLKQQGFI ERQ 142
CB3 FQLALFKTNKESLFA DRVFDLFDTKHNGI LGFE EFARALS VFHPNAPLDEKI DFSFQLYDLKQQGFI ERQ 141

CB3 EVKQMVVATLAESGMNLSDEI IESI I DKTFFEEADTKHDGRI DKEEWRNLVLRHPSLLKNMFLQYLKDI TTT 213
CB3 EVKQMVVATLAESGMNLSDEVI ESI I DKTFFEEADTKHDGKI DKEEWRNLVLRHPSLLKNMFLQYLKDI TTT 212

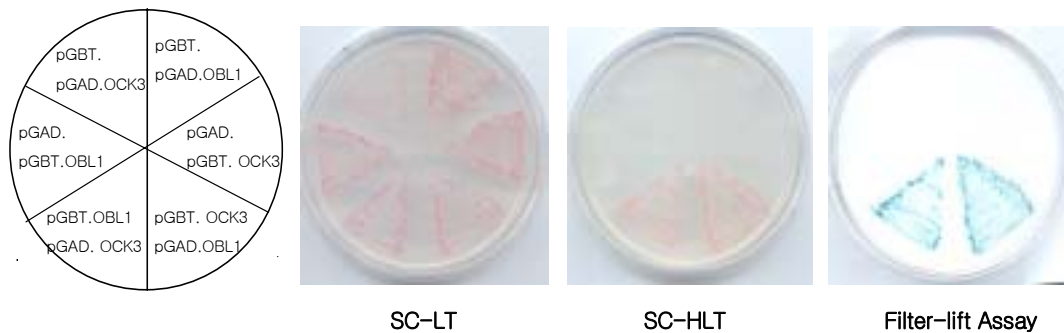
CB3 FPSFVFHSQVEDT. 227
CB3 FPSFVFHSQVDD- T 225

```


[Figure 3.1.6] Amino acid sequence alignment of AtCBL3 and OBL3. Residues with a black background indicate identical amino acids. Dashes indicate gaps introduced into the amino acid sequence to optimize the alignment. Solid lines below the sequence indicate position of EF-hand motifs.

마. OCK3와 OBL1의 상호작용을 Yeast-two hybrid system에서 검증

Yeast two-hybrid screening을 통해 분리한 OBL들이 우선 OCK3와 full-length 수준에서 정말로 상호작용을 유지하는가를 우선 OBL1을 이용하여 살펴보았다. Figure 3.1.7에서 알 수 있는 바와 같이 pGBT.OCK3와 pGAD.OBL1을 함께 소유한 yeast cell의 경우에만 Histidine, Leucine, 그리고 Tryptophan이 결여된 synthetic complete (SC-HLT) 배지에서 성장하였으며 filter-lift assay에서 β -galactosidase 활성을 보여주는 푸른색을 띠었다. 이러한 reporter gene의 발현 양상은 OCK3과 OBL1이 yeast cell에서 특이적으로 상호작용함을 나타낸다. 한편, pGBT.OBL1과 pGAD.OCK3을 포함하는 yeast cell도 위의 reporter gene의 발현을 보였다. 이와 같은 vector-swapping 실험의 결과는 OBL1과 OCK3가 클로닝된 vector에 상관없이 상호작용함을 보여준다.



[Figure 3.1.7] OBL1 interacts with OCK1 in a yeast two-hybrid system. The circle at left shows the arrangement of the Y190 yeast cells carrying the indicated pGBT and pGAD plasmids. The second and the third circles from the left indicate growth of the yeast cells on SC-Leu-Trp (SC-LT) and SC-His-Leu-Trp (SC-HLT) media, respectively. The last circle shows the filter-lift assay.

바. OCK 및 OBL family member 사이의 interaction specificity 결정







OCK3을 bait로 하여 획득한 OBL1과 OBL3 단백질들이 OCK family 의 다른 member들과도 상호작용을 하는가를 yeast two-hybrid assay를 통해 조사하였다. Table 3.1.1에 나타난 것처럼 OBL1과 OBL3은 비록 interaction strength는 다르지만 본 연구에 사용된 4개의 OCK family member (OCK1, OCK2, OCK3, 그리고 OCK4)들과 상호작용을 하였다. OBL1과 OBL3 단백질 모두 OCK3과 가장 강하게 interaction을 하였으며, OBL1은 OCK4와 OBL3은 OCK2와 가장 약하게 결합하였다. 따라서, Arabidopsis의 CBL-CIPK complex처럼 OBL family member 들은 하나 이상의 OCK target을 가질 수 있음을 알 수 있다. 하지만 이 결과는 이들 모두가 실제로 Arabidopsis의 세포내에서 complex를 형성함을 의미하지는 않는다. 실제로는 OBL 과 OCK family에 속하는 개개의 구성원들의 시간적 및 공간적 발현 부위, 세포내 위치 (subcellular localization), 그리고 interaction affinity 등의 여러 가지 요인에 의해서 최종적으로 결정될 것으로 판단된다.

Table 3.1.1. Interaction of OCKs with OBL1 and OBL3 in a yeast two-hybrid assay. The N-terminal domain (N) or C-terminal region (C) of OCKs were cloned into pGAD vectors. Combination of pGAD.OCKs and pGBT.OBL1 or OBL3 were co-transformed into the Y190 yeast cells. Yeast growth was scored as growth (+) no growth (-). Numbers in the parentheses indicate units of β -Galactosidase activity assayed.

	pGBT	OBL1	OBL3
pGAD	- (<1)	- (<1)	- (<1)
OCK1	- (<1)	+(6.12)	+(24.62)
OCK2	- (<1)	+(13.36)	+(4.84)
OCK3	- (<1)	+(56.49)	+(60.89)
OCK4	- (<1)	+(4.52)	+(5.69)

사. OBL과의 상호작용에 필요한 OCK 부위의 결정




OBL과의 상호작용에 관여하고 있는 OCK 부위를 결정하기 위하여 OCK1의 N-terminal (kinase domain) 과 C-terminal 부위를 각각 제거한 OCK1C 및 OCK1N deletion mutant를 pGAD vector에 클로닝하였다. 또한 OCK3로부터 pGAD.OCK3N 및 pGAD.OCK3C deletion mutant를 만들었다. Figure 3.1.8에서 알 수 있듯이 OBL family member인 OBL1과 OBL3은 OCK의 C-terminal region (OCK1C 및 OCK3C)과 강하게 상호작용함을 알 수 있다. 하지만 kinase domain 만을 소유한 OCK1N과 OCK3N deletion mutant와는 OBL들은 complex를 전혀 형성하지 못했다. 이것은 NAF motif를 포함하는 C-terminal region이 OBL과의 상호작용에 있어서 필요하고 충분한 부위라는 것을 보여준다. 흥미로운 것은 full-length OCK1 과 OCK3은 그들의 deletion mutant인 OCK1C와 OCK3C에 비해서 OBL과의 상호작용 강도가 약하다는 점이다. 즉, OCK의 kinase domain은 C-terminal region과 OBL의 상호작용을 방해하는 역할을 수행하고 있는 것이다. 이와 같은 OCK kinase domain의 상호작용 방해 역할은 그 아미노산 서열에 따라 그 정도가 다른 것으로 판단되며 궁극적으로 OBL과 OCK family members 간에 결합특이성 (interaction specificity)을 결정하는데 일정 역할을 수행할 것으로 추측된다.

		pGBT	OBL1	OBL3
pGAD		- (<1)	- (<1)	- (<1)
OCK1		- (<1)	+ (6.1)	+ (24.6)
OCK1N		- (<1)	- (<1)	- (<1)
OCK1C		- (<1)	+ (23.5)	+ (80.2)
OCK3		- (<1)	+ (56.5)	+ (60.9)
OCK3N		- (<1)	- (<1)	- (<1)
OCK3C		- (<1)	+ (90.1)	+ (90.7)

[Figure 3.1.8] The C-terminal region of OCKs is responsible for the interaction with OBLs. The kinase domain (N) or C-terminal region (C) were cloned into the pGAD vectors and transformed into the Y190 yeast cells carrying pGBT.OBL1 or pGBT.OBL3. Yeast growth was monitored on the selection medium (SC-HL) and scored as growth (+) and no growth (-). Numbers in the parentheses indicate units of β -Galactosidase activity assayed. The amino acid positions that flank each protein fragment are indicated.

아. OBL과의 애기장대 CIPK1과의 상호작용 검증

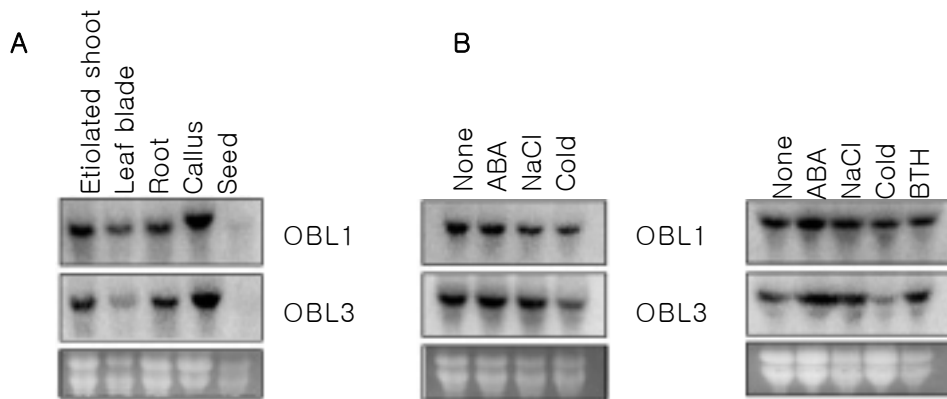
앞에서 우리는 벼 OCK 단백질들이 애기장대 CBL 단백질들과 상호작용할 수 있음을 실험적으로 밝혔다. 따라서 OCK와 상호작용하는 단백질로 분리된 벼 OBL들이 애기장대 CIPK 그룹의 단백질들과 결합할 수 있는 가도 조사하였다. Figure 3.1.9에서 알 수 있는 바와 같이 OBL1은 애기장대 CIPK1 단백질과 효모에서 상호작용하였다. 또한, CIPK1의 nonkinase 부위가 OBL1과의 결합에 관여하고 있음도 알 수 있었다. 흥미롭게도 OBL3은 full-length CIPK1과는 상호작용을 하지 못했으나 kinase domain이 결여된 C-terminal 부위와는 상호작용을 하였다. 즉 kinase domain이 CIPK1의 C-terminal과 OBL 단백질사이의 결합에 부정적인 역할을 수행하고 있으며 최종적으로 full-length CIPK1과 OBL 단백질의 상호작용 여부를 결정한다고 볼 수 있다. 이와 같은 연구결과는 애기장대 CBL-CIPK 복합체 형성에서도 발견되고 있는 사실로 벼의 OBL-OCK 복합체가 애기장대 CBL-CIPK 복합체와 아주 유사하다는 것을 반영하는 또 하나의 증거라고 볼 수 있다.

		pGAD	OBL1	OBL3
pGBT		-(<1)	-(<1)	-(<1)
CIPK1		-(<1)	+ (9.23)	-(<1)
K292		-(<1)	-(<1)	-(<1)
C169		-(<1)	+ (15.5)	+ (5.0)

[Figure 3.1.9] OBL1 and OBL3 interact with the C-terminal end of CIPK1. The kinase domain (K292) and the C-terminal domain (C169) of CIPK1 were cloned into the pGBT vector and transformed into the Y190 yeast cells carrying the pGAD. OBL1 and OBL3, respectively. The plus and minus signs indicate yeast growth and no growth on the SC-HLT media. The activity of β -galactosidase was measured and indicated inside the parenthesis. The amino acid positions that flank each protein fragment are indicated.

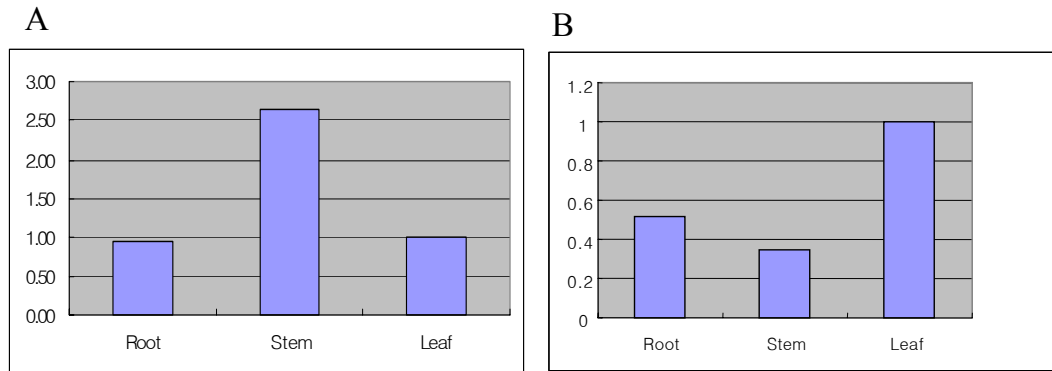
자. OBL유전자의 기관별 및 외부 자극별 발현 양상 분석

OBL1과 OBL3 유전자의 발현양상을 우선 northern blot을 통해 분석하였다. Figure 3.1.10A에서 보는 바와 같이 두 유전자 모두 씨앗을 제외한 거의 모든 기관에서 잘 발현되고 있었다. 또한, northern blot 보다 민감한 기술인 real-time RT-PCR을 통해 OBL1과 OBL3 유전자의 발현 양상을 분석한 결과, root, stem, leaf에서 두 유전자 모두 비교적 잘 발현되고 있었으며 OBL1의 경우 stem에서 발현양이 많았으며 OBL3의 경우에는 leaf에서 발현양이 많은 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 3.1.11). Housekeeping 유전자인 Actin2의 일부분도 증폭하여 internal control 로 사용하였다. 실험에 쓰인 primer 들은 intron-exon boundaries를 포함하게 design하여 genomic DNA로부터는 RT-PCR product가 생기지 않게 하였다. 한편, 여러 가지 외부 자극에 대한 유전자 발현양의 변화도 살펴보았다. Figure 10B에서 알 수 있는 것처럼 OBL1의 경우 그 발현 정도는 ABA, NaCl 그리고 저온과 같은 외부자극에 의해서 크게 영향 받지 않음을 알 수 있었다. 하지만 **OBL3의 경우 저온에 의해서 transcript 축적량이 감소함**을 발견하였다. 이와 같은 발현양상은 **OBL3 유전자가 벼의 저온 신호전달기작에 관여하고 있음을 보여주는 간접적인 증거**라고 할 수 있다.



[Figure 3.1.10] Northern blot analyses of OBL1 and OBL3 genes. (A) Organ-specific expression pattern of OBL genes. Total RNAs were isolated from the indicated tissues. (B) Expression patterns of OBL genes in response to diverse extracellular stimuli. Two-week-old, hydroponically-grown green seedlings (left panel) or four-week-old, soil-grown green plants (right panel) were treated for 24 h with 20 μ M ABA, 150 mM NaCl, 0.1% BTH (BioWP,

Novatis) or cold. Total RNA (20 µg) was separated by electrophoresis, blotted, and hybridized with 32P-labelled OBL1 or OBL3 cDNA. Ethidium bromide-stained rRNA bands in the RNA gel were shown as a RNA loading control.

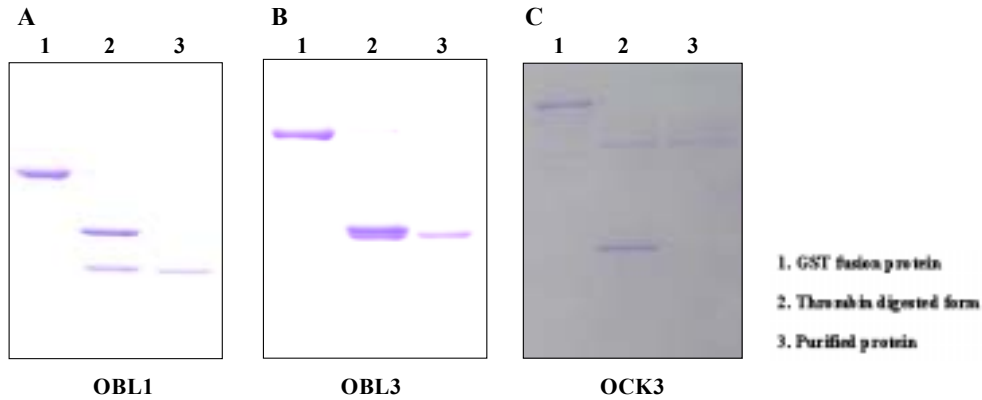


[Figure 3.1.11] Real-time RT-PCR analysis of OBL transcript levels in different organs of Arabidopsis plants. (A) OBL1. (B) OBL3. Total RNA was isolated from various tissues (root, stem, and leaf) of wild-type plants grown under long-day conditions. Real-time RT-PCR was performed with either OBL-specific primers or Actin2-specific primers (internal control). Bars indicate the relative ECT1 transcript levels normalized to the housekeeping gene Actin2 transcript levels. Data present means of triplicate samples.

차. GST-fusion system을 이용한 OBL 및 OCK 단백질의 과량 생산 및 정제

Yeast two-hybrid system에서 확인한 OBL-OCK 단백질간의 상호작용을 in vitro에서 확인하고 OCK의 phosphorylation activity 그리고 OBL 단백질의 Ca^{2+} 과 결합능력 등을 생화학적으로 확인하기 위해서는 정제된 이들 단백질의 획득이 반드시 선행되어야 한다. 따라서 본 연구자 등은 클로닝된 OBL1과 OBL3 그리고 이들과 가장 강하게 복합체를 형성하는 OCK3의 cDNA를 각각 pGEX-4T-3 vector에 PCR 기술을 이용하여 in-frame 으로 GST 단백질의 C-terminal 부위에 클로닝 하였다. 이들 construct가 생산하는 fusion 단백질

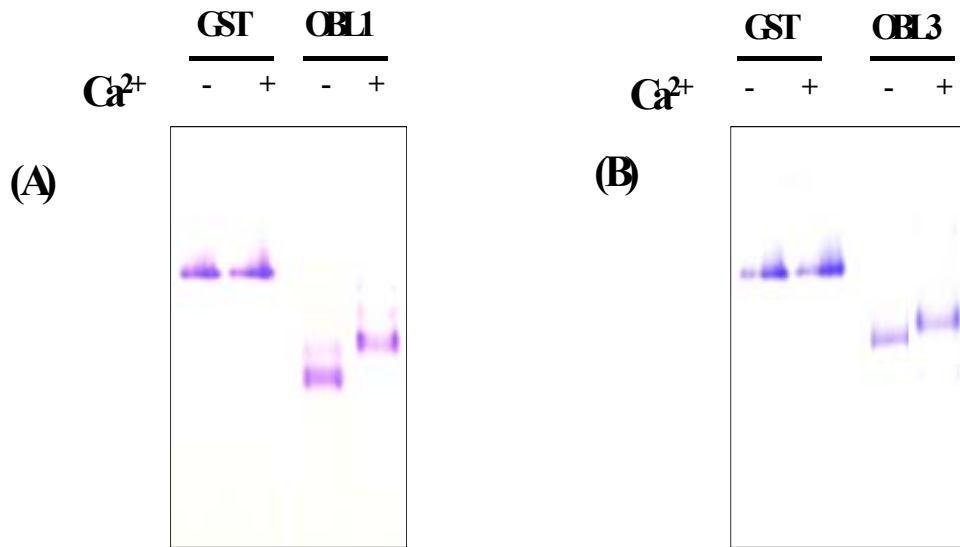
은 E.coli (BL21)에서 발현되어 glutathion Sepharose 4B bead에 의해 정제된 후 thrombin digestion에 의해 GST가 제거된 형태로 최종 분리되었다 (Figure 3.1.12).



[Figure 3.1.12] Expression and purification of recombinant OBL1, OBL3, and OCK3. (A) GST-OBL1. (B) GST-OBL3. (C) GST-OCK3. In A and B, lanes 1 to 3 contain the GST-fusion proteins, the cleaved forms, and the purified proteins, respectively. The proteins were analyzed by SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie blue.

카. OBL1 및 OBL3 단백질의 칼슘결합 능력 검증

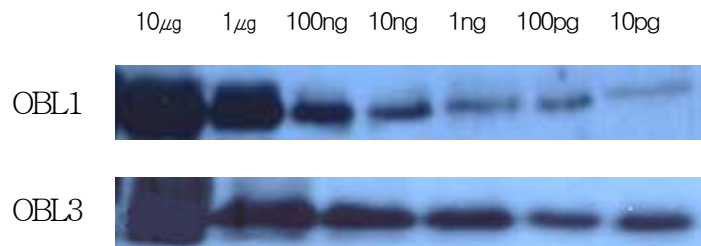
OBL은 애기장대의 CBL처럼 세 개의 EF-hand calcium-binding motif를 소유하고 있다. 따라서 OBL이 실제로 칼슘결합 능력이 있는가를 gel mobility shift assay를 통하여 조사하였다. E. coli에서 발현 정제된 OBL1과 OBL3 단백질을 이용하여 native polyacrylamide gel 상에서 조건에 따른 단백질의 이동 정도의 변화를 관찰하였다. Figure 3.1.13에서 나타난 바와 같이 OBL1과 OBL3 단백질은 Ca^{2+} 이 존재하는 lane에서 Ca^{2+} chelator 인 EGTA가 포함된 lane에서 보다 느리게 이동하였다. 하지만 GST 단백질의 경우에는 모든 lane에서 동일하게 이동하였다. 이 실험으로부터 OBL1과 OBL3 단백질은 실제로 Ca^{2+} 과 결합 할 수 있는 능력이 있는 단백질임을 확인 할 수 있었다.



[Figure 3.1.13] OBL1, 3 are functional Ca^{2+} - binding protein. (A) OBL1. (B) OBL3. Proteins were purified and incubated in EGTA or calcium-containing buffer before being analyzed by 12% native PAGE. The gels were stained with Coomassie blue. As a negative control, GST protein was used.

타. OBL1 과 OBL3 단백질의 항체 생산

GST가 제거된 형태로 E. coli에서 정제된 OBL1 및 OBL3 단백질은 토끼 (New Zealand white/male) 로부터 polyclonal antibody를 만드는데 사용되었다. 이들 항체의 titer를 결정하기 위하여 Figure 3.1.14에서 보는 바와 같이 다양한 농도의 항원을 이용하여 immunoblot assay를 수행하였다. 그 결과 생산된 OBL1 및 OBL3 항체가 매우 좋은 titer를 가지고 있음을 알 수 있었다.



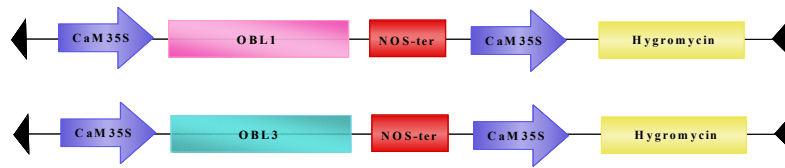
[Figure 3.1.14] Immunoblot analyses showing the activities of rabbit anti-OBL1 and anti-OBL3 antibodies, respectively. For immunization, the rabbit was

injected four times with 0.5 mg of the protein at an interval of 2 weeks. Following incubation at 37°C to inactivate complements, the rabbit whole blood collected from the celiac artery and heart was centrifuged to produce the blood serum. A series of different antigen concentrations were used to determine the efficiency the antibodies.

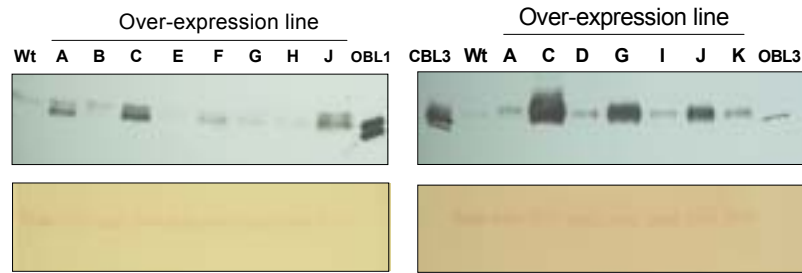
파. 형질전환체 생산

1) OBL1 과 OBL3 단백질을 각각 과량 발현하는 애기장대 형질전환체 생산

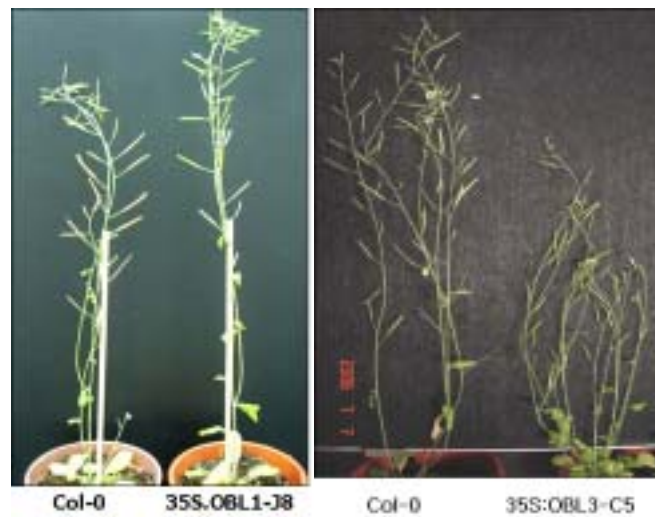
본 연구의 선행연구결과는 OBL이 애기장대 CBL의 ortholog로서 저온을 포함하는 다양한 환경 스트레스의 신호전달에 관여하고 있을 것으로 전망된다. 따라서 OBL 유전자 발현 정도의 변화는 Arabidopsis CBL의 경우처럼 저온을 포함하는 환경 스트레스에 대한 식물의 저항성에 영향을 줄 것으로 판단된다. 최근 본 연구자 등의 연구결과에 따르면 CBL1, CBL4, CBL9 등 유전자 발현 양상의 변화는 애기장대 식물체의 저온, 가뭄, 그리고 고염도 등의 환경 스트레스에 대한 저항성에 변화를 야기하였다. 따라서 OBL1 및 OBL3 들도 이와 비슷한 기능을 벼에서 수행하리라 예상된다. 이것을 조사하기 위해 OBL1 및 OBL3의 full-length cDNA를 각각 식물 형질전환용 벡터인 pCAMBIA에 클로닝하여 CaMV 35S promoter에 의해 발현되도록 하였다 (Figure 3.1.16). 이들 construct를 애기장대에 도입하였으며 그 발현양을 real-time RT-PCR과 western blot으로 확인하여 과발현 형질전환체를 분리하였다 (Figure 3.1.17). 흥미롭게도 OBL 항체가 애기장대 CBL과 cross-reactivity가 있음을 확인할 수 있었다. OBL1과 OBL3을 과량 발현하는 벼의 형질전환체는 현재 분리 중에 있다. Figure 3.1.17에서 보는 바와 같이 OBL1을 과량 발현하는 애기장대 형질전환체는 wild type (col-0)과 비교하여 식물 발달의 차이는 눈에 띄게 나타나지 않았다. 하지만 OBL3 과량 발현 애기장대 식물체는 wild type (col-0)과 비해 전체적으로 신장이 작았으며 생성된 stem의 숫자가 약 2배에 달하는 모습을 보였다. 이들 식물체의 각종 스트레스 저항성 여부는 앞으로 조사할 것이다.



[Figure 3.1.15] Schematic diagrams of OBL1 and OBL3 over-expression constructs.



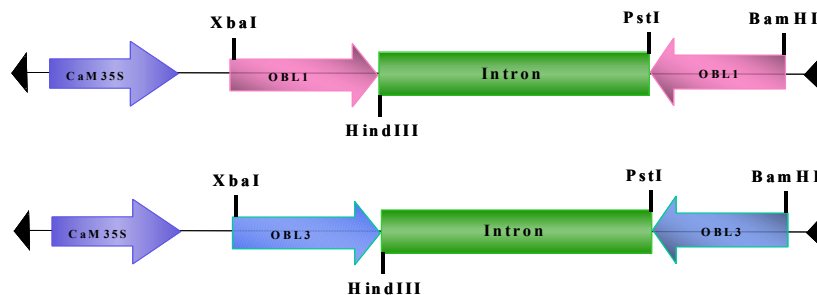
[Figure 3.1.16] Isolation of the Arabidopsis transgenic plants that over-express OBL1 and OBL3, respectively. Top panel shows an immunoblot using antibody as probe. E.coli-expressed and purified OBL proteins (1 ng) were loaded as control. Bottom panel is a membrane stained with Ponceau to show that each lane contains equal amount of total protein extract.



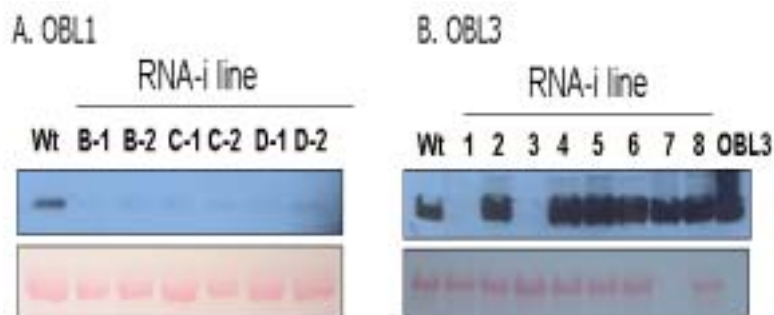
[Figure 3.1.17] Photos of Arabidopsis transgenic plants overexpressing OBL1 and OBL3, respectively.

2) OBL1 또는 OBL3 단백질 발현이 저하된 RNAi 식물체 생산

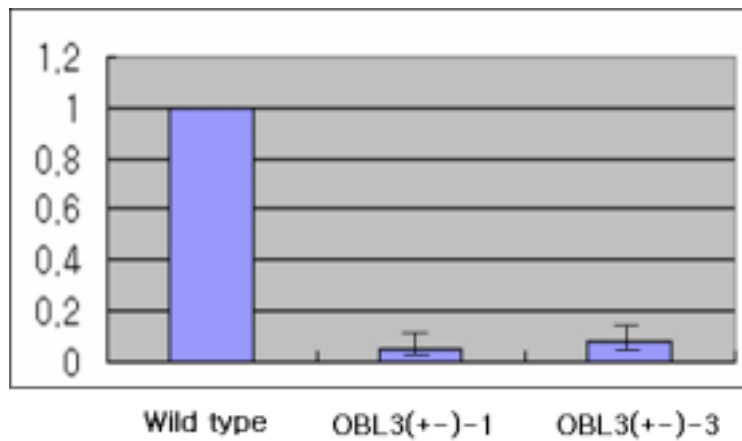
유전자의 기능을 알아보는 한 가지 방법 중의 하나는 loss-of-function mutant를 만들어 표현형을 관찰하는 것이다. 따라서 본 연구에서는 OBL1 또는 OBL3 유전자의 기능을 상실된 (또는 저하된) 돌연변이체를 만들기 위해 RNAi 기술을 이용하였다. 이를 위하여 OBL1 및 OBL3 유전자에 대한 RNAi construct (Figure 3.1.19) 를 만들어 Agrobacterium (LBA4404)를 이용하여 벼의 callus에 도입하여 형질전환체를 항생제 저항성을 이용하여 분리하였다. 분리한 개개의 형질전환체 line들로부터 total protein extract를 마련하여 OBL1 및 OBL3 단백질의 발현 정도를 western blot 분석을 이용하여 조사하였다. Figure 3.1.20에서 알 수 있는 것처럼 OBL1 및 OBL3 단백질의 발현이 각각 현저히 감소한 형질전환 벼를 최소한 두 line 씩 확보하였다. 이들 형질전환체로부터 total RNA를 분리하여 Real-time RT-PCR로 분석한 결과 OBL 유전자의 transcript level이 현저히 감소한 것을 알 수 있었다 (Figure 3.1.21). 현재 이들 식물체들을 키우고 있으며 종자를 많이 얻는 대로 발달 및 저온을 포함하는 각종 스트레스에 대한 저항성 등을 조사하고자 한다. Figure 3.1.22에는 이들 형질전환체 벼들의 사진이 있다. 현재까지 이들 RNAi line 들에서 wild type 벼와 다른 특별한 외형적 특징은 관찰할 수 없었다.



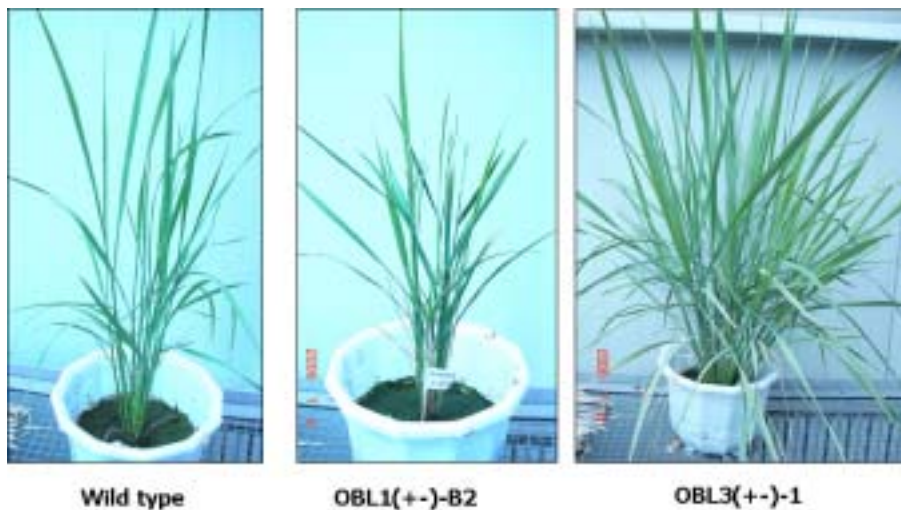
[Figure 3.1.18] Schematic diagrams of OBL1- and OBL3-RNAi constructs.



[Figure 3.1.19] Immunoblot analyses showing knock-down of OBL expression in rice. (A) OBL1. (B) OBL3. Upper panels are immunoblots detected by the indicated antibodies. Lower panels are membrane stained with Ponceau to show that each lane contains equal amount of total protein extract.



[Figure 3.1.201] Real-time RT-PCR analysis of OBL3 transcript levels in rice transgenic plants.



[Figure 3.1.21] Photos of transgenic rice plants with reduced expression of OBL1 and OBL3, respectively.

제 2 절 Cold 스트레스 관련 유전자의 내성 조절기능 규명 및 내냉성 벼 모본 육성

1. 이론적, 실험적 접근방법

식물은 발달 단계 또는 생리적인 변화와 낮은 온도, 높은 염농도, 가뭄, 그리고 일장 등과 같은 환경의 변화를 인지하여 생체의 조절기작을 변화시키고 그에 따른 생리현상의 변화를 나타낸다. 이러한 외부환경의 변화 중에서도 식물의 발육과 생장은 특히 저온에 대하여 민감한데, 개화와 같은 생식기관의 발육단계의 경우에 이러한 냉해와 동해에 더욱 민감하다. 따라서 온도조건의 적절함이 작물생산에서 가장 중요한 요인으로 작용한다. 저온에 의한 식물의 상해 중 냉해의 기작은 생장점, 생식기관 및 유엽 등의 활발한 분열이 저하되고, 양분, 수분, 식물호르몬 등이 생리활성 물질이 원활히 이동하지 못하고 지체됨으로써 정상적인 생리작용이 수행되지 못하는 것이 원인이라고 알려져 있다. 그리고 식물체의 저온에 의한 상해 중 동해의 경우는 저온에 의하여 발생한 조직의 결빙이 원인이 된다. 열대와 아열대 식물과 달리 온대 식물은 cold acclimation이라는 능력을 가지고 있기 때문에 조직이 결빙점 이하로 냉각하였을 때도 얼지 않았을 경우에는 다시 정상 상태로 회복될 수 있다. 하지만 조직이 저온에 의해 동결될 경우 처음에는 세포 간극에서 결빙이 일어나고, 그 후 동결이 세포 내부까지 진행된다. 동결온도나 시간에 상관없이 세포내결빙이 발생하는 경우에는 다시 회복될 수 없는 상태가 된다. 이는 원형질 구조의 기계적인 장애와 탈수에 의하여 원형질이 파괴됨으로써 그 기능을 완전히 상실하기 때문이다. 이처럼 저온은 많은 주요 작물들의 생합성 기작과 대사의 불균형을 초래하는 명백한 요소이며 저온에 대한 식물의 반응은 대단히 복잡한 기작을 가진다.

여러 가지 냉·동해에 대한 저항성을 일반적으로 내한성이라고 표현하고 있는데, 겨울밀, 겨울보리, 호밀 같은 작물들은 내한성의 정도가 매우 높다. 특히 겨울보리는 화본과로 벼와 근연관계에 있는 식물이기 때문에, 저온 저항성이 탁월하면서 벼와 유사한 보리의 저온저항성 유전자의 확보와 그 기능의 연구는 차후에 저온저항성 벼모본 육성을 위하여 필수적인 것이고, 연구결과를 적용함에 있어서도 마찬가지로 일 것으로 생각된다. 하지만 이러한 겨울을 나는 작물들의 내한성과 같은 생리적인 기작에 관여하는 분자생물학적인 연구는 충분하게 수행되어 있지 않으며, 특히 이들 작물들에서의 내한성에 관련되어 있는 유전자들에 대한 조사는 더욱 미진하다. 따라서 본 과제에서는 내한성의 정도가 매우 높은 겨울보리를 재료

로 하여 내한성에 관련된 유전자들에 대한 연구를 수행하였다. 그리고 유전체 연구가 완료된 Arabidopsis 또한 cold acclimation하는 식물체로 저온저항성 기작의 신호전달 체계를 연구하는데 훌륭한 모델시스템이 될 것으로 생각되어 함께 연구를 수행하였다.

겨울보리와 Arabidopsis에서 저온 스트레스 저항성에 관련된 유전자를 획득하기 위하여 저온처리로 저온 저항성 유전자들의 발현이 유도된 식물체를 이용하여 Suppression Subtractive Hybridization (SSH), Mirror Orientation Selection (ODD), Normalized Library Expressed Sequence Tag (nlEST) 기법들을 사용하여 저온저항성에 관여하리라고 추정되는 유전자들을 대량으로 획득하였다. 그리고 northern hybridization과 quantitative RT-PCR 기법으로 이들의 발현양상을 정확히 규명한 후, 저온스트레스에 의하여 유도되는 유전자라고 생각되는 것들을 Rapid Amplification of cDNA End (RACE) 기법으로 full-length의 cDNA를 확보하였다. 확보된 이들 유전자들의 정확한 생리·생화학적인 기능을 규명하기 위하여 담배와 Arabidopsis를 model plant로 이용하여 형질전환 한 후, 저온저항성 기작과 생체 내에서의 기능을 살펴보았으며, 저온저항성을 조절해 주는 유전자를 아열대 식물이자 우리나라의 주작물인 벼에 도입하여 저온저항성이 높은 벼품종 육성에 필요한 모본의 창성이 가능한지에 대한 가능성 검정 연구를 수행하였다.

2. 연구내용 및 결과

가. 실험대상 식물 확보 및 RNA 추출

1) 재료식물 확보 및 total RNA 추출

본 실험에서 사용한 보리 (*Hordeum vulgare* L.) 품종은 ‘동보리1호’로써 수원 농촌진흥청에서 재료를 분양받았으며, 내냉성에 관련된 유전자를 확인하고 분석하여 유용한 유전자원의 확보를 위하여 사용하였다. 그리고, Arabidopsis는 Columbia를 사용하였다. RNA를 추출하기 위하여 Chomczynski와 Sacchi방법을 변형하여 사용하였는데, protein detergent로 사용된 guanidium salt는 현재까지 알려진 가장 효율적인 RNase inhibitor로 많은 실험에서 RNA추출에 널리 이용되고 있다.

저온 처리를 하지 않은 wild type과 0.5, 1, 3, 12, 24, 48 시간 동안 4℃에서 저온 처리한 wild type을 준비한 후, total RNA 추출에 보리 잎을 각각 약 2g씩 사용하였다. 추

출된 RNA는 1X MOPS-formaldehyde 1% agarose gel에서 전기영동하여 rRNA band가 분명하고, OD_{260/280} 값이 1.8이상인 RNA시료만 선별하여 흡광계 260nm에서 농도를 산출한 후 -70°C에 보관하였다. 두 차례에 걸쳐 RNA를 추출하였는데, 2g의 시료로부터 약 500-700µg의 total RNA가 추출되었다. Total RNA로부터 mRNA를 Dynal UK사의 paramagnetic oligo dT Dynabeads를 이용하여 추출하였고, Total RNA 75µg을 증류수에 희석시켜 75µg/100µL의 농도로 조정하였다.

2) mRNA 추출

Total RNA로부터 mRNA를 Dynal UK사의 paramagnetic oligo dT Dynabeads를 이용하여 messenger RNA만을 total RNA sample로부터 분리하였다.

나. 새로운 저온유도 유전자 확보를 위한 SSH 와 MOS

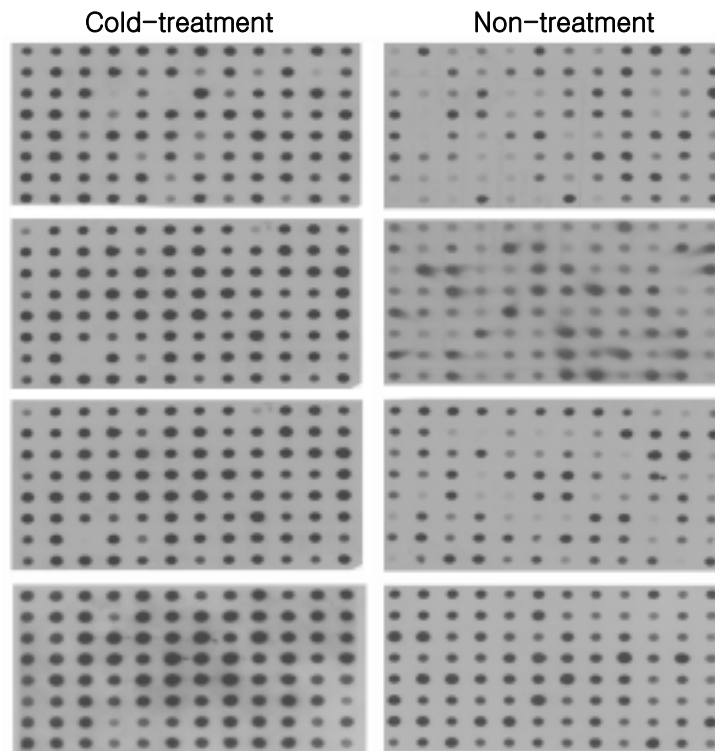
기존에 확보된 *alti1*과 *bti3* 두개의 유전자 이외에도 저온에 유도되는 유전자들을 보다 더 확보하기 위하여 SSH (Suppression subtractive hybridization) 와 MOS (Mirror orientation selection)를 수행하였다. Suppression subtractive hybridization법은 CLONTECH사에 의해 최근에 개발된 방법으로서 inducible gene의 분리에 아주 효율적인 방법으로 알려져 있다. 4°C에서 0.5, 1, 3, 12, 24, 48시간 저온처리된 동보리 (tester) 및 저온 처리되지 않은 동보리 (driver)의 mRNA로부터 각각의 ds cDNA를 합성한 다음 cDNA들 간에 hybridization을 유도하여 hybrid sequence를 제거하고 저온처리에 의해 유도된 unhybridized sequence만을 PCR에 의해 선별하였다. 이 과정 중에 적절한 adaptor와 primer를 이용하여 unhybridized sequence의 선별력을 높이고 크기가 작은 cDNA fragment는 제거되었다. Driver ds cDNA 2 µL를 2 µL의 adaptor 1과 adaptor 2에 ligation된 tester cDNA를 포함하는 2개 tube에 각각 첨가하였다. 그리고 98°C에서 2분간 denature시키고 68°C에서 8시간 동안 hybridization시켰다. 1st hybridization후에, 두 sample은 heat-denature된 driver와 함께 섞었고, overnight으로 68°C에서 hybridization 시켰다. Suppression PCR을 수행하기 위하여 서로 다른 두 개의 adaptor primer와 nested primer를 사용하였고, 증폭된 PCR product를 TOPO TA cloning kit (invitrogen)로 subcloning 시켰으며, E. coli에 transformation하여 clone을 확보하였다.

다. 새로운 저온유도 유전자 확보를 위한 nEST

대표적 내동성 품종인 동보리1호를 이용하여 저온 (4℃) 및 암기 처리된 cDNA library를 구축하여 저온저항성을 부여할 수 있는 유용한 유전자를 찾고, 저온 스트레스 조건에서 유전자 발현의 특성을 규명하기 위하여 cNDA clone을 무작위로 선택하여 염기서열을 결정하였다. 그리고 이 결정된 염기서열을 GenBank에 상동성 검사를 수행하여 그 기능을 추정하였다. 본 실험을 수행하기 위하여 만들어진 cDNA library는 1×10^7 의 primary titer를 보였는데 이는 발현되는 모든 유전자를 포함할 수 있는 것으로 생각되어진다. 또한, 적절한 cDNA library는 insert가 없거나 아주 짧은 insert를 가진 clone의 비율이 적어야 한다. 본 연구에 사용된 library에서 무작위로 선택된 200개의 clone들은 모두 insert를 가지고 있었는데, 0.5 - 3.0 kb 사이의 크기를 보였다. Insert의 평균적인 크기는 약 1.3 kb정도 였다. 200개의 염기서열이 결정된 cDNA clone이 EST (expressed sequence tag)로 NCBI dbEST에 등록되었다.

라. 저온유도 유전자 선발을 위한 reverse Northern analysis와 염기서열 분석

선발된 clone들이 저온 유도 유전자인지를 확인하기 위하여 reverse Northern analysis를 수행하였다. DECAprime II DNA labeling kit (Ambion, USA)를 이용하여 probe를 제작하였고, Nylon membrane으로 PCR후 정제된 clone들의 PCR product가 transfer되었다. Nylon membrane을 0.2M sodium phosphate buffer에서 10분간 처리한 후 80℃에서 30분간 baking시켰다. 만들어진 probe와 nylon membrane은 20시간 동안 hybridization을 실시하였다. SSH와 MOS방법을 이용하여 총 380개 clone을 무작위로 선발하였으며, 선발된 380개의 clone의 reverse Northern 분석을 통하여 (Figure 3.2.1), **저온에서 유도되는 것으로 보여 지는 192개의 clone을 잠정적으로 결정하여 염기서열 분석**을 수행하였다 (Table 3.2.1).



[Figure 3.2.1] Dot blot 분석

[Table 3.2.1] SSH와 MOS에서 선발된 clone의 염기서열 분석결과

Clone ID	Putative identity	Species	S(x) ^a	E-value	Category ^b
b1t-a13	Unnamed protein product	<i>O. sativa</i>	73	8E-25	05.10
b1t-a14	Putative 6-phosphogluconolactonase	<i>E. guineensis</i>	58	7E-29	02.02
b1t-a15	Cation diffusion facilitator 8	<i>S. hamata</i>	77	2E-25	08.19
b1t-a16	Hemeoxygenase 1	<i>S. bicolor</i>	83	4E-25	10.04
b1t-a20	Arabinoxylanarabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II	<i>H. vulgare</i>	86	2E-27	02.01
b1t-a21	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein family	<i>A. thaliana</i>	51	7E-14	07.01
b1t-a22	Putative aldehydeoxidase	<i>O. sativa</i>	65	1E-29	11.05
b1t-a23	Ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase activase	<i>H. vulgare</i>	63	6E-21	02.20
b1t-a24	Cold-regulated protein 2	<i>H. vulgare</i>	98	1E-38	11.01
b1t-b16	Lipid transfer protein 7a2b	<i>H. vulgare</i>	75	6E-30	07.13
b1t-b17	Ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	<i>T. aestivum</i>	98	6E-79	02.20
b1t-b20	Arabinoxylanarabinofuranohydrolase isoenzyme AXAH-II	<i>H. vulgare</i>	68	1E-56	02.01

blt-b22	80S ribosomal protein L31	<i>P. frutescens</i>	84	1E-48	05.01
blt-b23	2-oxoglutarate/malate translocator	<i>P. miliaceum</i>	73	3E-59	02.02
blt-c15	Non-specific lipid transfer protein	<i>H. vulgare</i>	77	6E-31	11.05
blt-c18	Hypothetical protein	<i>H. vulgare</i>	74	3E-63	13.00
blt-c20	Phosphoglucosmutase	<i>T. aestivum</i>	99	8E-52	02.20
blt-c21	Methyljasmonate-inducible lipoxygenase	<i>H. vulgare</i>	100	E-116	08.02
blt-c22	Unknown protein	<i>A. thaliana</i>	65	7E-25	12.00
blt-c23	ADP-ribosylation factor 1	<i>O. sativa</i>	66	9E-10	02.10
blt-c24	Photosystem I protein psaK precursor	<i>H. vulgare</i>	93	4E-45	02.30
blt-d13	Amino acid selective channel protein	<i>H. vulgare</i>	98	6E-64	10.01
blt-d15	Membrane-associated salt-inducible protein.	<i>O. sativa</i>	60	3E-12	07.13
blt-d16	Putative Rieske Fe-S precursor protein	<i>T. aestivum</i>	100	2E-54	07.01
blt-d19	Peroxisomal multifunctional protein	<i>O. sativa</i>	81	0.05	09.19
blt-d21	Putative N-acetylglucosamine-phosphate mutase	<i>O. sativa</i>	67	2E-75	04.19
blt-d24	Hypothetical protein	<i>S. cereale</i>	98	4E-98	13.00
blt-e13	Putative 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	<i>O. sativa</i>	91	6E-13	01.06
blt-e15	Putative FRIP-interacting protein, 5'-partial	<i>O. sativa</i>	54	2E-27	09.19
blt-e17	Photosystem I antenna protein	<i>H. vulgare</i>	100	2E-67	02.20
blt-e18	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	<i>H. vulgare</i>	79	3E-91	08.02
blt-e20	Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	53	7E-40	13.00
blt-e21	Plasma membrane intrinsic protein	<i>T. aestivum</i>	97	2E-45	10.01
blt-f13	Putative 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	<i>O. sativa</i>	92	7E-07	01.06
blt-f14	Putative CBL-interacting protein kinase 23	<i>O. sativa</i>	89	8E-41	10.04
blt-f15	Translation initiation factor	<i>T. aestivum</i>	88	9E-52	05.04
blt-f16	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	<i>T. aestivum</i>	77	2E-64	10.04
blt-f20	Chlorophyll A-B binding protein of LNCII type III protein	<i>H. vulgare</i>	100	2E-73	02.30
blt-f21	Ribulose-5-phosphate kinase	<i>T. aestivum</i>	91	3E-82	10.04
blt-f22	Triose phosphate translocator	<i>T. aestivum</i>	89	2E-93	07.07
blt-g15	Aminolevulinatodehydratase	<i>H. vulgare</i>	74	2E-46	08.02
blt-g16	Putative bHLH protein	<i>O. sativa</i>	56	7E-62	04.22
blt-g17	Copper homeostasis factor	<i>A. thaliana</i>	87	5E-14	08.04
blt-g18	Clastrin assembly protein AP17-like protein	<i>O. sativa</i>	97	6E-67	08.13
blt-g20	Chloroplast precursor	<i>O. sativa</i>	58	2E-19	02.30
blt-g22	Putative calreticulin	<i>O. sativa</i>	95	3E-91	11.05

blt-g23	Probable cinnamoyl-CoA reductase	<i>A. thaliana</i>	57	1E-56	01.06
blt-g24	Clathrin heavy chain	<i>G. max</i>	71	5E-24	08.13
blt-h13	Cytoplasmic ribosomal protein	<i>O. sativa</i>	53	5E-41	05.01
blt-h15	Unknown protein	<i>O. sativa</i>	82	1E-98	12.00
blt-h16	Autophagy	<i>T. aestivum</i>	100	2E-49	03.01
blt-h17	Putative delta 1 pyrroline-5-carboxylate synthetase	<i>O. sativa</i>	89	2E-81	02.20
blt-h18	Plastid-specific ribosomal protein 6 precursor	<i>S. oleracea</i>	63	2E-19	05.01
blt-h19	Similar to ribosomal protein L30	<i>R. norvegicus</i>	76	3E-23	05.01
blt-h20	Inducible phenylalanine ammonia-lyase	<i>T. aestivum</i>	98	2E-70	12.00
blt-h21	Ribulosebischosphatocarboxylase large chain precursor	<i>H. vulgare</i>	89	2E-98	02.20
blt-h22	Putative delta 1 pyrroline-5-carboxylate synthetase	<i>O. sativa</i>	79	5E-40	02.50
blt-h24	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	65	4E-64	13.00
blt-i13	BLT4 protein	<i>H. vulgare</i>	88	6E-08	07.13
blt-i14	Lipid transfer protein 7a2b	<i>H. vulgare</i>	58	3E-30	07.13
blt-i15	ATP-dependent Clp protease	<i>O. sativa</i>	80	9E-19	02.10
blt-i16	Asparagine synthase	<i>L. corniculatus</i>	85	4E-96	07.10
blt-i17	Putative chelatase subunit	<i>O. sativa</i>	87	1E-37	02.30
blt-i18	Putative chelatase subunit	<i>O. sativa</i>	73	1E-12	02.30
blt-i20	Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	76	2E-23	13.00
blt-i21	Unnamed protein product	<i>O. sativa</i>	70	5E-08	12.00
blt-i22	Ferredoxin	<i>T. aestivum</i>	70	3E-27	09.19
blt-i23	Metal transporter family	<i>A. thaliana</i>	58	4E-54	07.01
blt-i24	Bowman-Birk type trypsin inhibitor	<i>H. vulgare</i>	85	8E-16	10.99
blt-j13	Putative cytochrome P450-related protein	<i>O. sativa</i>	77	9E-25	02.20
blt-j14	Ribulosebischosphatocarboxylase/oxygenase small subunit	<i>H. vulgare</i>	100	2E-66	02.20
blt-j15	Putative Pyruvate Kinase isozyme A	<i>O. sativa</i>	84	9E-73	02.30
blt-j16	Putative calcium-binding protein	<i>O. sativa</i>	72	5E-42	11.05
blt-j17	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	64	1E-76	13.00
blt-j20	OSJNBa0088H09.5	<i>O. sativa</i>	60	4E-40	03.19
blt-j22	Putative glycine hydroxymethyltransferase	<i>O. sativa</i>	92	E-102	05.01
blt-j23	Unknown protein	<i>A. thaliana</i>	89	4E-55	12.00
blt-k15	Unknown protein	<i>A. thaliana</i>	73	2E-61	12.00
blt-k16	Ribosomal protein L3	<i>T. aestivum</i>	98	E-115	05.01

blt-k18	Putative cytochrome B5	<i>O. sativa</i>	97	2E-55	20.10
blt-k19	Unknown protein	<i>O. sativa</i>	79	2E-71	12.00
blt-k20	Ribulosebiphosphatocarboxylaseactivaseis oform 2	<i>H. vulgare</i>	83	6E-64	02.20
blt-k21	Legumin-like protein	<i>Z. mays</i>	76	2E-79	06.20
blt-k23	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	83	2E-83	13.00
blt-k24	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	72	3E-37	13.00
blt-l14	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	63	5E-22	13.00
blt-l16	Ribulosebisphosphatocarboxylase/oxygenase small subunit	<i>T. aestivum</i>	99	1E-86	02.20
blt-l18	Putative 40S ribosomal protein S15	<i>O. sativa</i>	85	2E-70	05.01
blt-l19	RNA recognition motif (RRM)-containing protein-like	<i>O. sativa</i>	94	1E-40	04.22
blt-l21	KH domain-like protein	<i>O. sativa</i>	71	6E-61	05.07
blt-l22	Acetohydroxyacid synthase	<i>H. vulgare</i>	99	2E-78	05.99
blt-l23	Putative ABC transporter 592	<i>O. sativa</i>	85	1E-106	07.25
blt-l24	Shaggy-related protein Kinase gamma	<i>O. sativa</i>	89	3E-61	10.04
blt-m14	Catalase isoenzyme 2	<i>H. vulgare</i>	100	2E-33	11.05
blt-m15	Cold acclimation protein	<i>T. aestivum</i>	82	1E-39	11.01
blt-m16	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	52	2E-13	13.00
blt-m17	Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	60	6E-39	13.00
blt-m18	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	82	7E-53	13.00
blt-m20	Chloroplast precursor	<i>H. vulgare</i>	65	1E-11	08.22
blt-m22	Putative microtubule-associated protein	<i>A. thaliana</i>	69	1E-40	09.04
blt-m24	Stress responsive protein	<i>H. vulgare</i>	75	1E-39	11.05
blt-n13	Cold acclimation protein	<i>H. vulgare</i>	100	5E-32	11.05
blt-n14	Acyl carrier protein	<i>A. thaliana</i>	60	5E-15	02.20
blt-n15	Wound inducive gene	<i>N. tabacum</i>	51	7E-45	11.05
blt-n17	Eukaryotic initiation factor 4A	<i>O. sativa</i>	96	3E-85	05.04
blt-n18	Putative CRT/DRE-binding factor	<i>T. aestivum</i>	57	2E-45	11.05
blt-n20	Fructose-bisphosphatealdolase	<i>O. sativa</i>	93	6E-76	08.02
blt-n21	Putative glyoxylate induced protein	<i>O. sativa</i>	70	3E-56	13.00
blt-n22	Unknown protein	<i>O. sativa</i>	94	5E-77	12.00
blt-n23	Photosystem I reaction center subunit XI	<i>H. vulgare</i>	91	2E-66	02.30
blt-n24	Ribulosebisphosphatocarboxylase/oxygenase small subunit	<i>T. aestivum</i>	98	5E-86	02.20
blt-o13	Chlorophyll a/b binding protein	<i>B. oleracea</i>	64	8E-11	02.30
blt-o15	Putative nifU-like protein	<i>O. sativa</i>	90	2E-59	02.23

blt-cl7	Hypothetical protein	<i>S. cereale</i>	94	6E-80	13.00
blt-cl8	Zinc-finger protein	<i>O. sativa</i>	71	4E-56	04.19
blt-c20	Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	59	3E-11	13.00
blt-c21	Chorismatesynthase 1	<i>L. esculentum</i>	73	4E-69	09.13
blt-c22	Leaf-specific protein Wcs19	<i>T. aestivum</i>	59	7E-45	11.05
blt-c23	Probable phospholipid transfer protein precursor	<i>H. vulgare</i>	71	2E-20	07.13
blt-c24	Phosphoethanolaminemethyltransferase	<i>T. aestivum</i>	69	4E-23	11.05
blt-p13	Expressed protein	<i>O. sativa</i>	65	6E-29	12.00
blt-p14	Cytochrome b5	<i>A. thaliana</i>	77	9E-33	02.30
blt-p15	Hypothetical protein	<i>H. vulgare</i>	97	5E-30	13.00
blt-p17	Putative transcription factor	<i>O. sativa</i>	97	1E-45	04.22
blt-p18	Chlorophyll A-B binding protein	<i>L. esculentum</i>	98	1E-101	02.30
blt-p20	COP alpha homolog	<i>T. aestivum</i>	84	5E-56	09.13
blt-p21	Glutathione S-transferase	<i>T. aestivum</i>	92	8E-32	11.04
blt-p22	RNA-binding protein ts	<i>T. aestivum</i>	100	1E-44	04.22
blt-p23	Calmodulin-binding protein	<i>O. sativa</i>	59	5E-33	10.01

^aSimilarity of isolated EST sequence with pre-determined gene sequence of GeneBank

^bFunctional categories based on MIPS

마. 확보된 저온유도 유전자들의 기능분석

1) *alti1* 유전자 분석

가) DNA 염기서열의 확보

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)기법으로 *alti1*으로 명명한 유전자의 putative full-sequence cDNA와 ORF(Open Reading Frame)를 확보하였고, database에 등록된 상동성이 높은 유전자들의 전체 염기서열과의 비교를 통하여 전체 염기서열을 획득하였음을 확인하였다 (Figure 3.2.2).

```

ATGGACTTGAAAAGCAACAACCCAGCAACAGCAACAAGTACTTGATGGCTCGGACATAGTTGAOCTOCTGGAAAACGAGAAAGTGTTC
GACAAGTTTGTGGAAACAAAAGTTTCAACAGTTAGACCAGATGAAGATGGTAAAGCTCTCCGTGACTGAGTTACAACCCGCGTGTCTGAT
ATGGCGCTGCTCTTGGTTTGGCTGCTCAAGGAACTTCTCCTGATTGCGATCACATCTACTCGGAGTCTAAAAGAAITCACTCATGGG
AGTCAAGAGAAGTGAGCAAGACAGAGTTCAAAGAACTGTGTCCGGACATTTTGTGGTATGGCTGCTGGTCTGAAAAGTGTATCTATC
GTCACTCTCAGGATGGACGGTGGAGATCTCTCGGAGTTTGTCCAGGCGCTGGATATGAATCGAGAGCAITTTCTGTTTTCTCAGAGCTC
TCCAGTAGCAAGGACCGCATOCTCCGTGATTGTATCGTCAAAGCTCTCCAGTCTCTTTCTGTGATCATGGAAATGCCCTCTTCCAAGAC
CCATGGGTGATGACCAACATCTAGAACCAATTGTTGACTCTTGTCTTGATGAAGAAGTAAAAGAGAGAAAAGCCCGTCTCAGGAGAGA
TTCTTGAAGCAITCAAGAGACTGTTGGAGTGTGGCTCAGGCTCTCAATGAACAGCCCGTATGTTGCTCACAGGAAAACACCTTT
GATGGAGCCGTATCAGGAGGCTCTTGTCCAATAAAATCGAATTCGATAAGGCCTAAACGTTGCCATGGAGAGATTCAAAAGACGGT
CAGGGTAAAGTGTCTAAGGATATCTACGAGCTGTGCTTGACACTGTTGCAOCCATGGCCACTTTACCAOCCATAGGGCTGTGTCCCGAG
ATGGATAATATGATAATGGAGCGTTGAGATGGTGAATGGAGATGATGGAATGTGGTGAAGGAGAAGAGTTTAAAGAAAACAATGGCA
GAGATATTGGGAGTATAATGTTGCAGCTGGAGGTAGTCCCATATCGGTTTCTCTAAGTCCGGTGTTCAGAGCCCGTCACTCGGCT
ACCTTTCTGCCGTCACTTGGACTGATACAGAGGACCTTCAAAC TAA

```

[Figure 3.2.2] *alti1*의 cDNA 염기서열

나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석

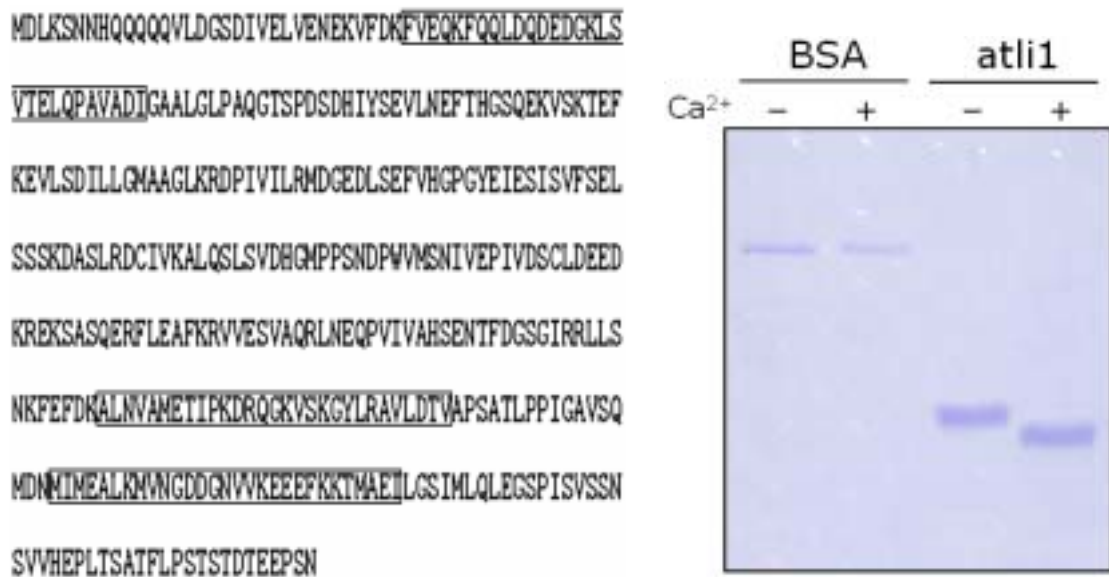
확보된 *alti1* 유전자를 probe로 이용하여 저온과 drought를 처리한 식물체에서 추출한 RNA로 Northern blot 분석을 수행하여 **확보된 유전자가 저온에 유도됨을 확인**하였다. 분석된 *alti1*은 저온처리 초기 (0.5, 1시간 후) 부터 유전자 발현이 증대되었고, drought처리에서는 발현량의 변화를 관찰할 수 없었다 (Figure 3.2.3). 18s RNA는 모두 동일한 양의 RNA가 loading 되었음을 나타내고 있다.

Cold	Drought
-------------	----------------

[Figure 3.2.3] 저온과 drought 처리에 의한 RNA 발현 양상

다) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추

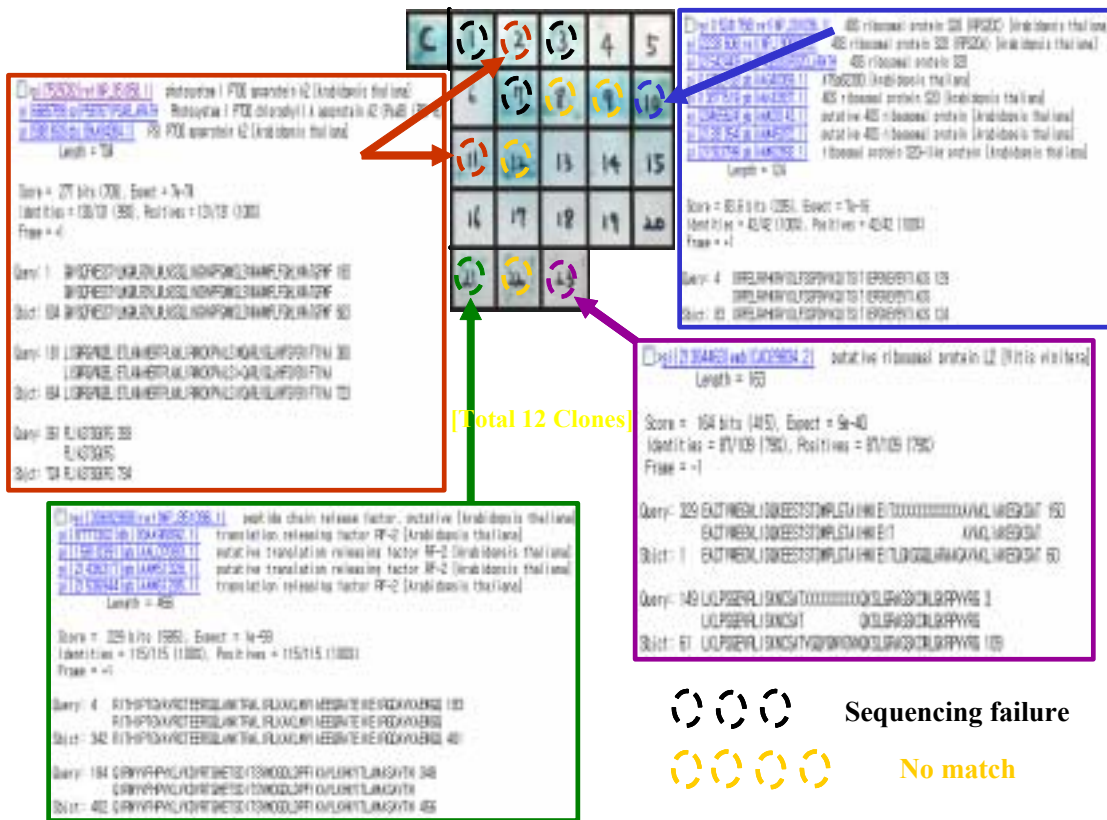
alti1 유전자의 염기서열로부터 확보된 단백질서열을 인터넷을 통한 단백질 도메인 분석을 수행한 결과 (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de>) 3개의 EF-hand domain을 가지는 putative calcium binding 단백질로 추정되었다. 따라서 이 단백질이 실제로 칼슘결합 능력이 있는가를 gel mobility shift assay를 통하여 조사하였다. 이 유전자로부터 발현되는 단백질의 칼슘결합특성을 연구하기 위하여 pGEX vector에 유전자를 클로닝하였고, 성공적으로 과다발현된 단백질을 정제하여 칼슘과 결합하는지를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. E. coli에서 발현 정제된 alti1 단백질을 이용하여 native polyacrylamide gel 상에서 조건에 따른 단백질의 이동정도의 변화를 관찰하였다. Figure 3.2.4에서 보는 바와 같이 alti1 단백질은 Ca^{2+} 이 존재하는 경우, Ca^{2+} chelator 인 EGTA가 포함된 처리구 보다 빠르게 이동하였다. 하지만 control로 사용된 BSA 단백질의 경우에는 모든 lane에서 동일하게 이동하였다. 이 실험으로부터 alti1 단백질은 Ca^{2+} 과 결합 할 수 있는 단백질임을 확인하였다.



[Figure 3.2.4] alti1의 단백질서열과 calcium-binding assay

라) 기능 규명을 위한 상호작용 단백질의 탐색

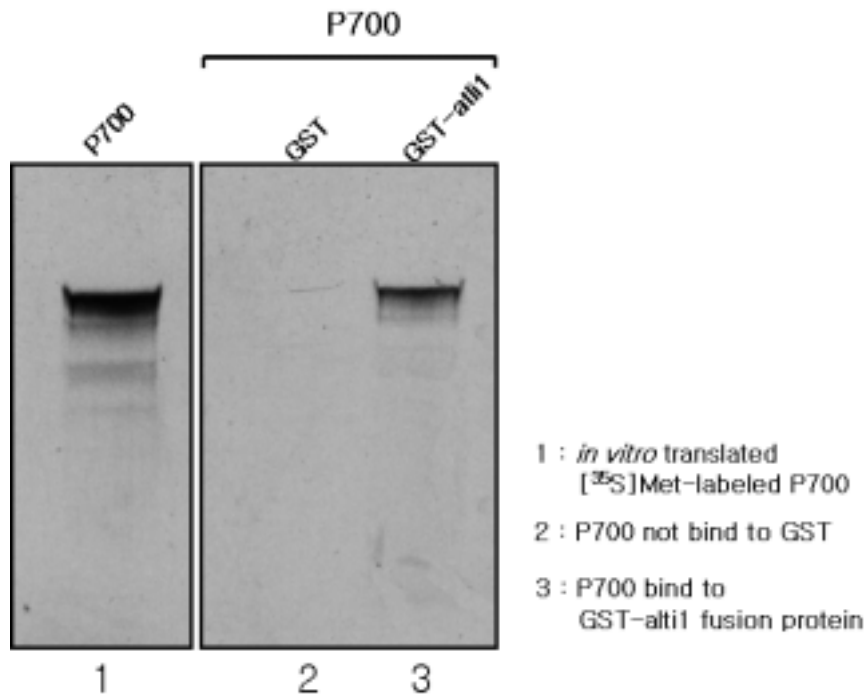
저온처리된 보리로부터 얻어지 RNA는 Stratagene사의 HybridZAP-2.1 yeast-2-hybrid library kit를 사용하여 cDNA library로 제작되었고, Arabidopsis의 Y2H용 cDNA library는 Clontech사의 Match Maker kit을 사용하여 제작하였다. Arabidopsis의 alti1 유전자를 bait로 screening을 수행한 결과 잠정적으로 12개의 interaction 할 것으로 생각되는 후보들을 beta-Gal assay를 통하여 발견하였다. 이들의 염기서열을 분석한 결과 단백질을 정확하게 생산해내는 2개의 후보 유전자를 확보하였다 (Figure 3.2.5). 후보 유전자중 하나는 P700 이었고, 다른 하나는 기능이 알려지지 않은 putative protein 이었다.



[Figure 3.2.5] Putative interactor of alti1 (yeast-two hybrid interaction assays)

마) 상호작용 후보 단백질들의 *in vitro* pull-down assay

alti1 유전자는 pGEX vector에 cloning하여 bacteria BL21에서 over-expression 시켜 단백질을 확보하였다. 이와 상호작용할 것으로 생각되는 P700 유전자는 pET vector에 cloning하여 Promega 회사의 TNT invitro transcription/translation system을 이용하여 ³⁵S-Met 으로 labeling된 단백질을 생산하였다. GST beads에 alti1 단백질과 GST 단백질을 각각 부착시킨 후, 방사성동위원소로 표지된 P700 단백질을 섞어 상호작용을 할 수 있도록 반응시켰다. 반응액을 SDS-PAGE에서 확인한 결과 alti1과 P700이 결합한다는 사실을 알 수 있었다 (Figure 3.2.6).

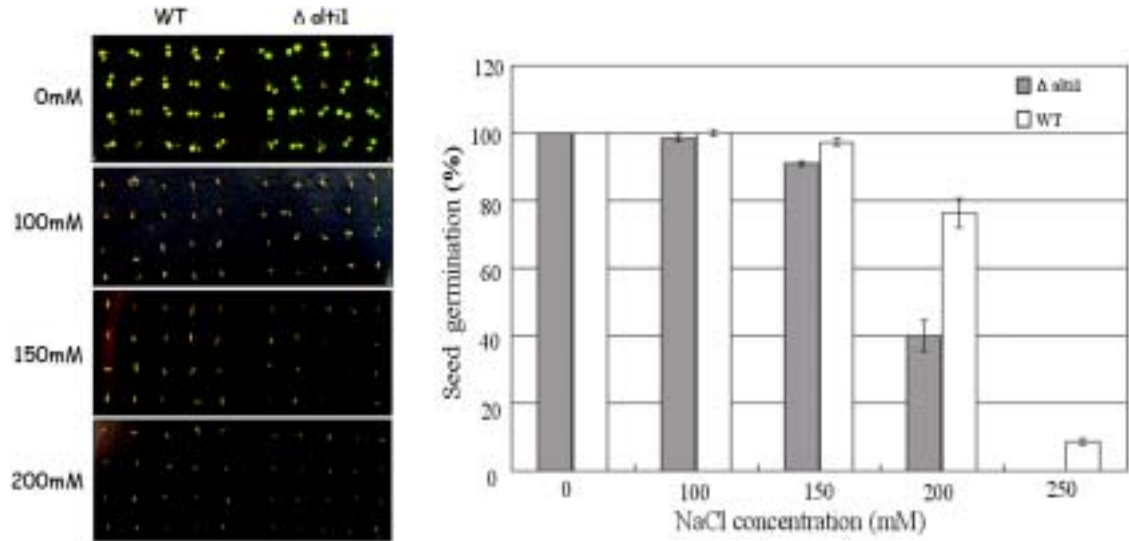


[Figure 3.2.6] In vitro pull-down assays of alti1 and P700

바) 형질전환체들의 성장과 발육 분석

alti1의 기능결실돌연변이체는 TAIR 데이터베이스 검색을 통하여 T-DNA가 삽입된 돌연변이체를 확보하였고, 이를 이용하여 우선 저온 스트레스시 발생하는 수분스트레스에의 반응을 조사하기 위하여 germination test를 수행하였다. 그 결과 NaCl 처리구에서 wild type보다 발아가 저해됨을 발견하였다 (Figure 3.2.7). 이는 이 유전자가 수분스트레스

와 밀접하게 연관되어 있음을 알려주는 결과라 할 수 있다. 그러나 *alti1* 유전자가 과다발현된 모델 식물체를 제작하여 성장과 발육을 분석하였으나 통계적으로 유의성을 가지는 저온에 대한 저항성을 관찰할 수는 없었다.



[Figure 3.2.7] *alti1* 기능결실 돌연변이체의 발아율 검정

사) *alti1* 유전자의 추정되는 기능에 대한 고찰

일반적으로 광은 식물의 발육에서 광합성을 통한 성장에너지, 녹화나 생식생장과 같이 형태적 변화를 조절하며, 여분의 광은 광합성 기작에 의해 제거되어 활성산소와 같은 위험성물질의 발생을 조절한다. 그러나 저온순화과정에서 광선은 식물체의 약화를 가속시키는 요인으로 작용한다고 알려져 있다 (Mustill *et al.*, 1997; Batschauer *et al.*, 1998). 따라서 *alti1*의 경우, 저온에 의하여 발현이 증대되고, 칼슘이온과 결합하며, 광합성에 중요한 역할을 하는 P700 단백질과 상호작용 한다는 사실로부터 저온에 의해 발생하는 칼슘의 fluctuation 신호를 인지하여 광합성이나 저온순화과정에서 역효과를 나타내는 필요이상의 광입자를 조절하는 기능을 수행하는 단백질이라고 추정할 수 있다. 이를 보다 더 명확히 증명하기 위해서는 칼슘이온의 유무에 의하여 *alti1*과 P700의 상호작용이나 *alti1*과의 결합에 의한 P700의 기능의 변화에 대한 실험적인 증거가 필요하다. 그러나 지금까지의 결과로도 저온 스트레스에 의한 칼슘신호전달과정에서 기능을 한다는 사실을 충분히 증명해 준다고 할 수 있다.

2) bti3 유전자 분석

가) DNA 염기서열의 확보

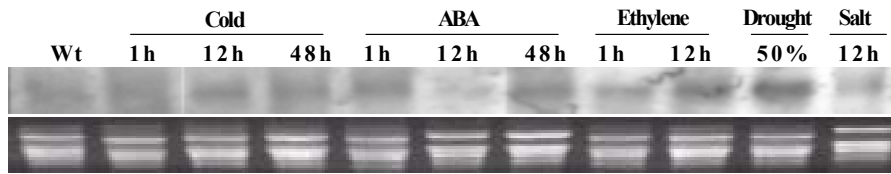
RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 기법으로 bti3으로 명명한 유전자의 putative full-sequence cDNA와 ORF(Open Reading Frame)를 확보하였고, database에 등록된 상동성이 높은 유전자들의 전체 염기서열과의 비교를 통하여 전체 염기서열을 획득하였음을 확인하였다 (Figure 3.2.8).

```
ATGGGATGATGTTGGATCTCCGAACGGCATCCGAAACCATGGCAAGCACTACTACACCATGTGGCAGACCATGTTGGAGATCG  
ACACCAAGTACGTGCCCATCAAGCCCATCGGGAGGGAGCCACGGGATAGTTTGGCTCTCCATCAACCAGGAGACCAATGAGAA  
GGTCGGCATCAAAAAGATAAACAAGCTCTTTGACCAACCGTGTGGATGCGTTAAGGAACCTGCGCGAGCTGAAGCTCTCCGGCAC  
CTCGGCCACGAGAATGTCAATTGCTTTGAAGGATATAATGATGCGGATACATAGGAGGAGCTTCAAGGATGCTCTACTTGGTCTCCG  
AGCTCATGGACACGGATCTGCATCAGATTGTCAAGTGTCTCAGCGCTGTCCAAATGACCACTGCCAGTATTTCTTTTTCACT  
GCTCCGAGGACTGAAGTACCTTCATTCAGCAGGGTACTCCATAGAGACTGAAGGCTGGGAACCTTCTGGTCAATGCAAACTGC  
GACCTGAAGATCTGTGACTTTGGTCTGGCTCCACAAATAACACTAAAAGTCACTTTATGACTGAATATGTTGTCACCCCCTGGT  
ATAGAGCTCCCGAGTTGCTGCTCTGCTGGGACACTATGGCACATCCATAGATGCTGGTCTGTGGCTGCATCTTTGTGAGCT  
ACTGGCCCGCAAGCCGATCTTTCCAGGACCGAGTGCCTTAATCAGCTTAAGCTTATAGTCAATGTTCTTGGCACCATGAGCGAA  
GCTGAOCTCGCATTCATTGACAACCTCAAAAGCACGCAAGTACATTAAATCCCTCCATACACCCAGGcATTCCOCTCAGTAGCA  
TGTACCCGCAAGCCATCCTCTTGGCAITGATCTGTTGCAGANGATGCTTGTCTTGGACCTTCCAAAAGGATCAGTGTCAOCCA  
GGCTCTGGAGCACCCCTACATGTCCOACTGTATGATCCAGGGCAAAOCTCCTGCTCAGGTGCCCATCGATCTTGACATAGAT  
GAAAACATTGGCACAGATATGATCCGGAAATCTTGTGCCAGGAGATGCTCCAGTATCACCCCGAGGCCOCCAGGATGTTGAATA  
TG TGA
```

[Figure 3.2.8] bti3의 cDNA 염기서열

나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석

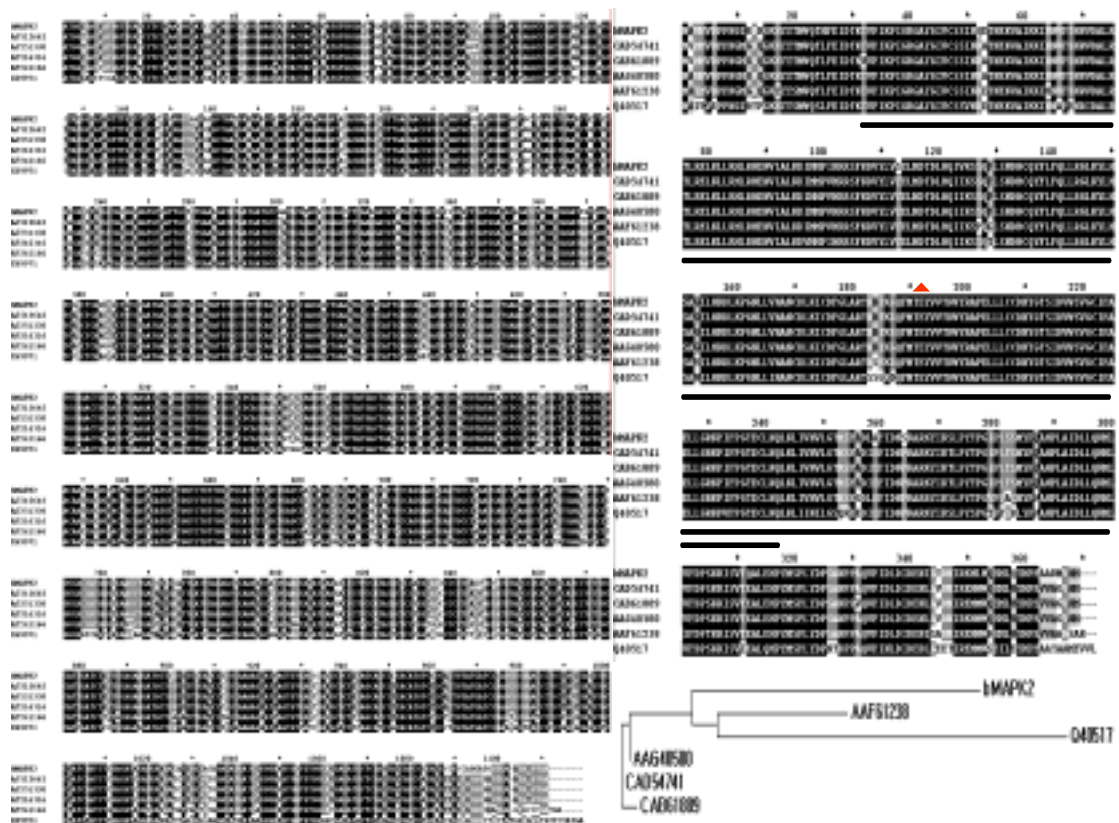
확보된 **bti3 유전자**를 probe로 이용하여 저온, ABA, ethylene, drought, salt를 처리한 식물체에서 추출한 RNA로 Northern blot 분석을 수행하여 확보된 유전자가 **저온에 유도됨을 확인**하였다. 분석된 bti3은 저온, ABA, ethylene, drought 모두에서 발현량이 증대됨을 관찰하였다 (Figure 3.2.9). 18s RNA는 모두 동일한 양의 RNA가 loading 되었음을 나타내고 있다.



[Figure 3.2.9] *bti3* 유전자의 발현 양상

다) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추

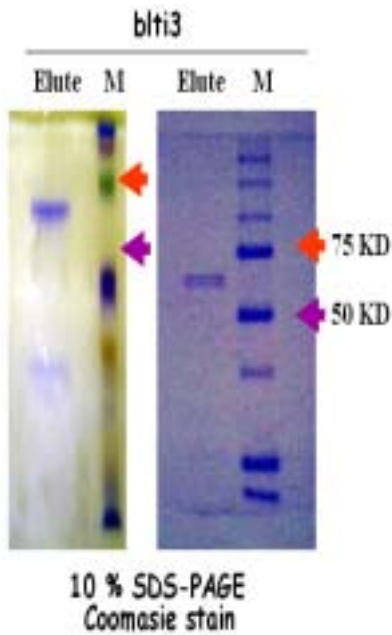
bti3 유전자는 염기서열의 분석결과 putative MAP kinase 유전자들과 높은 상동성을 보여 주었고, 인산화 효소가 가지는 보존된 단백질 서열을 가지고 있었다 (Figure 3.2.10).



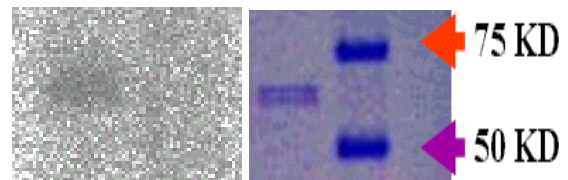
[Figure 3.2.10] Multiple alignment of DNA-binding proteins with *bti3*

라) 생화학적 특성 연구

bIti3 유전자는 염기서열의 분석결과 putative MAP kinase 유전자들과 높은 상동성을 보여 주었고, 인산화 효소가 가지는 보존된 단백질 서열을 가지고 있었다. 따라서 이 유전자가 인산화 효소를 발현하는 것이 사실인지를 규명하기 위하여 Gateway system을 이용하여 pDEST15라는 유전자 발현 vector에 클로닝하였다. 클로닝된 molecule은 외래 단백질을 과다발현 시켜 줄 수 있는 BL21(DE3) codon plus RIL이라는 대장균에 형질전환 시키고, IPTG를 처리하여 bIti3 유전자의 산물로 생각되는 인산화 효소를 과다발현 시켰다. pDEST15로부터 과다 발현된 단백질은 soluble한 상태로 존재하여 native한 조건으로 GST-beads를 이용하여 정제할 수 있었다 (Figure 3.2.11). 정제된 단백질이 인산화 효소의 특성을 가진다는 것을 in gel kinase assay 실험을 통하여 알 수 있었다 (Figure 3.2.12).



[Figure 3.2.11] 정제된 bIti3 단백질

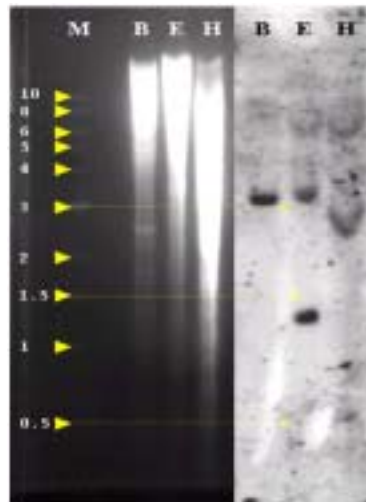


[Figure 3.2.12] In gel kinase assay

마) Genomic structure

bIti3 유전자의 copy수를 확인하기 위하여 genomic DNA로 Southern 분석을 수행하였다. *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 세종류의 제한효소로 genomic DNA를 절단한 후, 1.5%

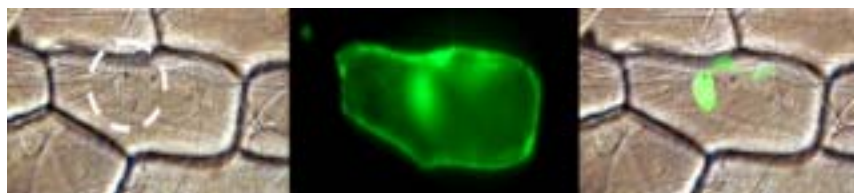
agarose gel에 100 volt로 18cm를 전기영동 하였다. 전기영동에 의하여 크기별로 분리된 DNA 절편들은 Nylon membrane에 transfer되었고, Bio101 (USA)의 Southern Light Chemiluminascent detection kit를 이용하여 절단된 bti-2 유전자의 절편들의 위치와 개수를 확인하였다. Genomic southern blot analysis 실험을 수행하여 본 결과 이 인산화 효소는 genome상에서 single copy로 존재하는 유전자임을 알 수 있었다 (Figure 3.2.13).



[Figure 3.2.13] Genomic southern blot analysis

바) 확보된 유전자 산물의 세포내 분포 조사

bti3와 GFP fusion protein을 합성하는 molecule을 제작하여 양파세포에 transient assay를 수행하여 세포내 단백질의 분포를 조사한 결과 핵과 세포질에 존재하는 단백질을 알 수 있다. 그러나 주로 핵으로 localization되는 단백질을 실험을 통하여 알 수 있었다 (Figure 3.2.14).



[Figure 3.2.14] Subcellular localization of bti3

사) 기능 규명을 위한 상호작용 단백질의 탐색

저온처리된 보리로부터 얻어지 RNA는 Stratagene사의 HybridZAP-2.1 yeast-2-hybrid library kit를 사용하여 cDNA library로 제작되었고, Arabidopsis의 Y2H용 cDNA library는 Clontech사의 Match Maker kit을 사용하여 제작하였다. 보리의 bti3 유전자를 bait로 yeast-2-hybrid screening을 수행하였다. 이 인산화효소의 기질 단백질을 찾기 위한 Y2H screening을 통하여 총 20개의 상호작용을 할 것으로 추정되는 yeast colony를 발견하였고, 이 중 β -galactosidase assay를 통하여 18개의 상호작용 후보를 선별할 수 있었다. 이들로부터 plasmid를 추출하여 대장균에 다시 형질전환한 후, 대장균으로부터 다시 추출한 plasmid의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 총 18개 중 9개가 sequencing 결과 Table 3.2.2에서 보듯이 inframe으로 존재하는 상호작용 후보 유전자임을 확인 할 수 있었다.

[Table 3.2.2] Putative interactors of bti3

Clone ID	Putative identity	Best match Species	S(%) ^a	E-value
bti3-i01	Rubisco large subunit	Barley	100	e-148
bti3-i03	Rubisco large subunit	Barley	100	e-148
bti3-i04	Rubisco activase isoform 2	Barley	97	e-120
bti3-i05	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Arabidopsis	83	e-105
bti3-i07	Putative cleavage and polyadenylation specificity factor	Rice	96	6e-66
bti3-i08	Unknown protein or Lectin	Rice	77	8e-84
bti3-i09	Rubisco large subunit	Barley	100	e-148
bti3-i10	Rubisco large subunit	Barley	100	e-148
bti3-i11	No match	-	-	-

^aSimilarity with pre-determined gene sequence of GeneBank

아) bti3 유전자의 추정되는 기능

bti1의 경우, 저온을 포함하는 환경스트레스에 의하여 발현이 증대되고, 신호전달과 관련된 인산화효소이며, 핵에 주로 존재한다는 것을 실험을 통하여 알 수 있었다. 따라

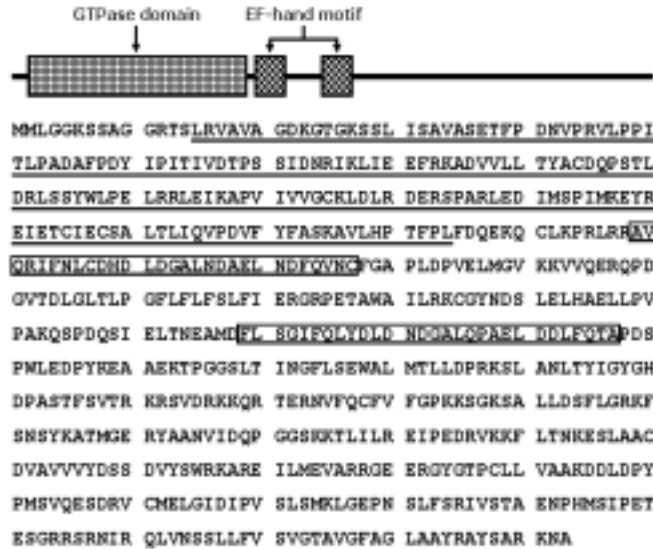
서 이 유전자는 저온을 비롯한 환경스트레스에서 발생하는 신호를 전달하여 주는 새로이 발견된 MAPK라고 할 수 있다. 이 효소와 상호작용하여 인산화가 전달되는 기질에 대한 연구가 더 수행된다면 이 인산화효소가 환경스트레스에서 전달하는 정확한 신호전달 체계를 이해할 수 있을 것이다. 그러나 지금까지의 결과로도 bti3 유전자가 저온 스트레스에 의한 신호전달과정에서 기능을 한다는 사실을 충분히 증명해 준다고 할 수 있다.

바. 저온 스트레스와 연관된 수분 스트레스 신호전달 유전자들의 확보와 기능규명

1) AtCBG 유전자 분석

가) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추

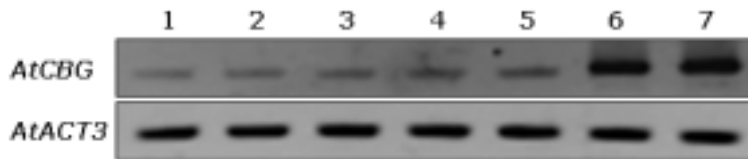
저온 스트레스 신호전달에 관련된 새로운 유전자를 발굴하기 위하여 genome 연구가 완성된 Arabidopsis genome database에서 프로모터 부분에 저온유도 전사인자가 결합하는 부위를 가지며, 환경스트레스 신호전달에 중요한 신호전달자인 칼슘이온에 결합할 수 있는 EF-hand motif를 가지는 유전자들을 연구대상으로 선발하였다. 칼슘결합 부위를 가지는 유전자를 찾기 위하여 MAtDB (http://mips.gsf.de/proj/thal/db/tables/tables_func_frame.htm)의 PROSITE, PFAM, and BLOCKS database를 검색하였다. 그 결과 2개의 EF-hand motif와 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 small GTPase domain을 가지는 유전자를 찾을 수 있었는데, 총 cDNA의 길이는 1,932 bp, 643 aa로 분자량은 약 79 kDa 이었다. AtCBG가 발현하는 amino acid 서열을 SMART program (<http://smart.embl-heidelberg.de>)을 이용하여 motif와 domain에 대한 정밀한 조사를 수행하였다. 그 결과 칼슘이온과 결합할 수 있는 2개의 EF-hand domain을 199-227 aa 와 319-347 aa 부위에 소유하고 있으며, 15-184 aa 부위에 RHO-type like GTPase domain을 가짐을 알 수 있었다 (Figure 3.2.15).



[Figure 3.2.15] AtCBG의 단백질 서열 및 구조

나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석

AtCBG 유전자의 스트레스에서의 발현양상을 알아보기 위하여 quantitative RT-PCR을 수행하였다. 분석된 **AtCBG는 대부분의 스트레스 처리에서 발현량이 증가**하였는데 특히 ABA와 NaCl 처리시 가장 많은 양의 발현의 증가가 나타났다. 이는 AtCBG 유전자가 ABA-dependent한 수분 스트레스 신호전달과정에 관련되어 있을 것이라는 사실을 알려준다. AtACT3는 모두 동일한 양의 RNA를 quantitative RT-PCR을 위하여 사용하였음을 보여주고 있다 (Figure 3.2.16).

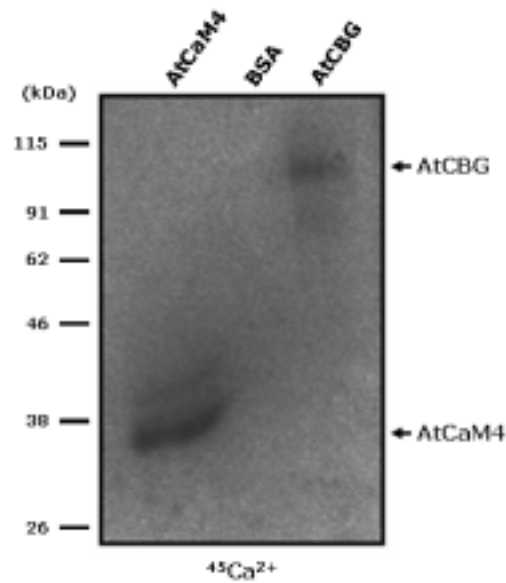


[Figure 3.2.16] AtCBG 유전자의 발현 양상

0.5 mM SA (lane 2), 1 mM ethephon (lane 3),
 0.1 mM MJA (lane 4), **cold (lane 5)**,
 0.1 mM ABA (lane 6), 200 mM NaCl (lane 7)
 Lane 1 was a control plant

다) 칼슘결합 능력 검증

AtCBG 유전자의 염기서열로부터 확보된 단백질서열을 인터넷을 통한 단백질 도메인 분석을 수행한 결과 (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de>) 2개의 EF-hand domain을 가지는 putative calcium binding 단백질로 추정되었다. 따라서 이 단백질이 실제로 칼슘결합 능력이 있는가를 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ blot binding method"를 사용하여 조사하였다. 이 유전자로부터 발현되는 단백질의 칼슘결합특성을 연구하기 위하여 pET vector에 유전자를 클로닝하였고, 성공적으로 과다발현된 단백질을 정제하여 칼슘과 결합하는지를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 실험결과 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 이온은 positive control로 사용된 칼슘결합단백질 calmodulin (AtCaM4)과 AtCBG에 결합하였으나, BSA 단백질에는 결합하지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Figure 3.2.17). 이 실험으로부터 AtCBG 단백질은 Ca^{2+} 과 결합 할 수 있는 단백질임을 확인하였다.

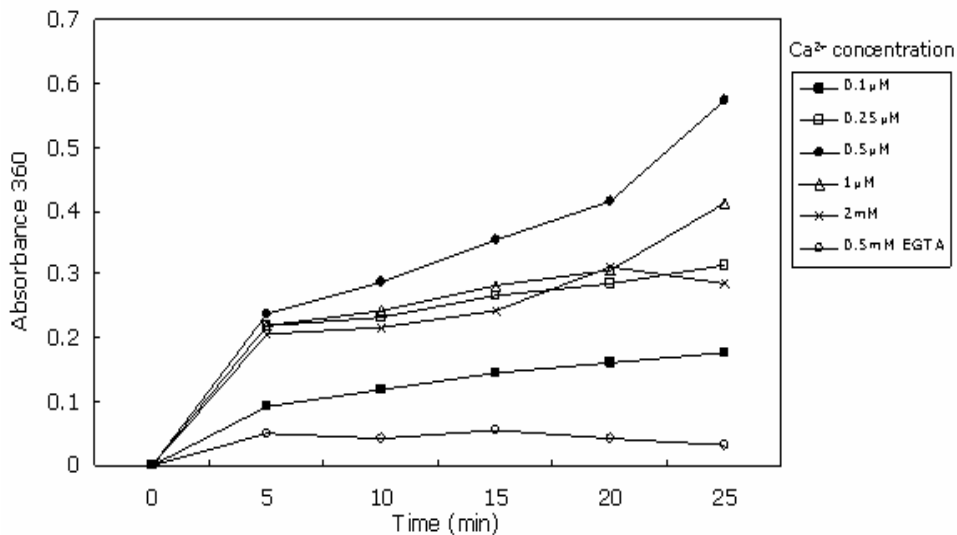


[Figure 3.2.17] Calcium binding assay of the recombinant AtCBG

라) GTPase activity 검증

AtCBG는 단백질서열 분석결과 N-terminal 15-184 aa 부위에 RHO-type like GTPase domain을 가지고 있다. 따라서 이 단백질이 GTP를 GDP로 hydrolysis하는

GTPase 능력을 가지는가를 검정하였다. 그리고 GTPase activity가 칼슘이온의 양에 영향을 받는지에 대하여도 동시에 검정을 수행하였다. 그 결과 AtCBG는 GTPase activity를 가지며, 칼슘의 양에 의하여 그 활성이 조절된다는 사실을 알 수 있었다 (Figure 3.2.18). 칼슘이온의 농도가 0.5 μM 에 도달할 때까지 효소활성이 증대되다가 그 이상의 농도에서는 다시 0.25 μM 수준에서의 효소활성 정도까지 활성이 감소된다는 사실을 알 수 있었다. In vitro에서 수행된 실험이므로 이러한 결과로 칼슘이 효소활성의 억제자인지 증가자인지에 대한 명확한 판단은 내릴 수 없으나, 칼슘의 농도변화에 의하여 효소활성이 조절된다는 결론을 내리기에는 충분하다고 생각된다. 그러므로 AtCBG는 칼슘에 의하여 효소활성이 조절되는 GTPase라고 할 수 있을 것이다.

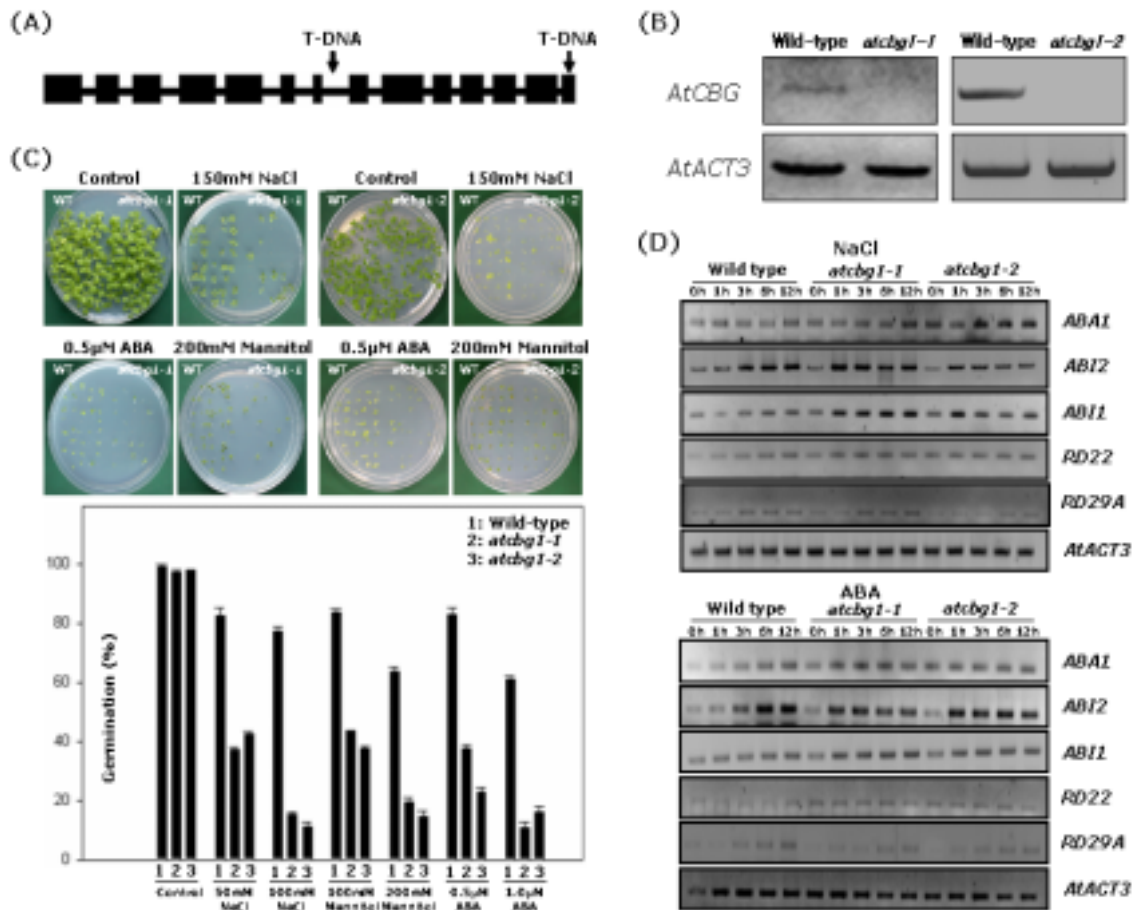


[Figure 3.2.18] Determination of kinetic parameters for the GTPase reactions

마) 돌연변이체를 이용한 수분스트레스 신호전달체계에서의 역할검정

AtCBG의 수분스트레스 신호전달과정에서의 기능을 명확히 규명하기위하여 이 유전자의 기능이 결실된 변이체를 SALK로부터 확보하였다. 두 종류의 기능결실 돌연변이체를 확보하였는데 한 종류는 14번째 exon 부위에 T-DNA가 삽입되었고, 다른 한 종류는 7번째 intron 부위에 T-DNA가 삽입되어 있었다. 이 두 종류의 기능결실 돌연변이체로부터 RNA를 추출하여

RT-PCR을 수행한 결과 AtCBG 유전자가 전혀 발현되지 않음을 알 수 있었다. 이 돌연변이체들은 정상조건에서는 생육이나 표현형의 이상이 발견되지 않았으나, 수분스트레스 조건 하에서 정상 식물체 보다 민감하게 반응하여 발아가 저해됨을 관찰할 수 있었다. NaCl, ABA, Mannitol 처리에 의하여 발아율이 현저히 떨어진다는 사실을 발아실험을 통하여 알 수 있었다 (Figure 3.2.19). 이들 돌연변이체의 ABA, 고염, 저온에서의 반응을 살펴본 결과 ABA와 고염농도 조건에서 민감한 반응을 보이는 것을 관찰하였다. 그러나 저온에서는 반응의 정도가 실험의 유의 수준을 벗어나는 결과를 보여 저온에 민감도를 보이는지를 확인 할 수는 없었다. 그러나 ABA와 고염 스트레스에 반응한다는 사실로부터 ABA에 의존적인 수분스트레스 신호전달 과정에서 저항성에 관련된 신호전달과정에서 작용할 것이라는 사실은 확실하다고 할 수 있다.



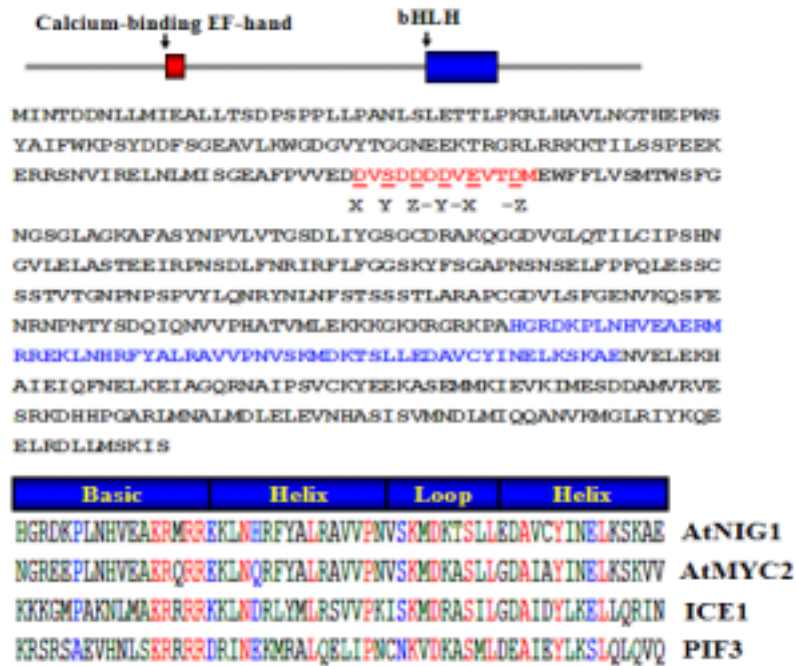
[Figure 3.2.19] Characterization of T-DNA insertional mutants of AtCBG

AtCBG 유전자의 수분스트레스 신호전달 과정에서의 보다 명확한 기능을 규명하기 위하여 기능결실 돌연변이체들에서 수분스트레스 신호전달과 관련된 기능이 밝혀진 유전자들의 발현양상을 확인하여 보았다. NaCl과 ABA 처리시 ABA 신호전달과 관련된 유전자인 ABI1과 ABI2의 발현이 야생형보다 빠르게 유도됨을 알 수 있었다 (Figure 3.2.19D). ABI1과 ABI2 유전자는 protein phosphatase 효소로 ABA에 의한 신호전달을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 유전자들의 기능이 결실되면 식물체에서 ABA에 의한 반응이 나타나지 않아 ABA의존적인 수분스트레스 조건에 대한 식물의 정확한 인지가 불가능하게 되어 나쁜 환경 조건에서도 종자발아의 억제가 이루어지지 못하게 되어 결국 식물이 치사에 이르게 된다. AtCBG의 기능이 결실된 돌연변이체에서 수분스트레스가 가해졌을 때 ABA에 대한 반응을 민감하게 하는 ABI1과 ABI2 유전자의 발현이 빠르게 유도된다는 것은 AtCBG가 ABA에 의존적인 수분스트레스 신호전달 과정에서 상위에 위치하여 그 신호전달을 조절하는 기능을 한다고 추정할 수 있다. 이러한 사실로부터 AtCBG는 ABA에 의존적인 수분스트레스 신호에 의하여 세포내 칼슘이온의 변화를 인지하여 수분스트레스 신호를 전달하는 기능을 하는 GTPase라는 결론을 내릴 수 있다. 저온에 대하여 식물체 전체에 저항성을 부여한다는 명확한 증거를 실험적으로 아직 발견하지는 못하였지만 저온스트레스가 ABA에 의존적인 수분스트레스 신호전달 과정과 밀접하게 연관되어 있다는 사실과 이 유전자가 저온에 대하여 발현이 어느 정도 조절된다는 사실로 세포수준에서 저온 스트레스 저항성 증대에는 관여할 수 있다는 추론을 할 수 있다.

2) AtNIG 유전자 분석

가) 확보된 단백질서열을 이용한 기능 유추

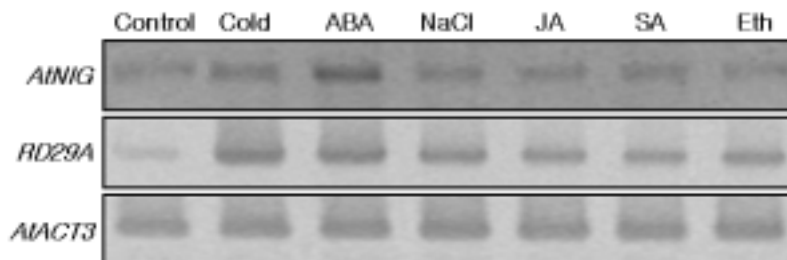
저온 스트레스 신호전달에 관련된 새로운 유전자를 발굴하기 위하여 genome 연구가 완성된 Arabidopsis genome database에서 프로모터 부분에 저온유도 전사인자가 결합하는 부위를 가지며, 환경스트레스 신호전달에 중요한 신호전달자인 칼슘이온에 결합할 수 있는 EF-hand motif를 가지는 유전자들을 연구대상으로 선발하였다. 칼슘결합 부위를 가지는 유전자를 찾기 위하여 MAtDB (http://mips.gsf.de/proj/thal/db/tables/tables_func_frame.htm)의 PROSITE, PFAM, and BLOCKS database를 검색하였다. 그 결과 1개의 EF-hand motif와 helix-loop-helix를 가지는 전사인자를 발굴하였다 (Figure 3.2.20)



[Figure 3.2.20] AtNIG의 단백질 서열 및 구조

나) 환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 및 활성의 변화 분석

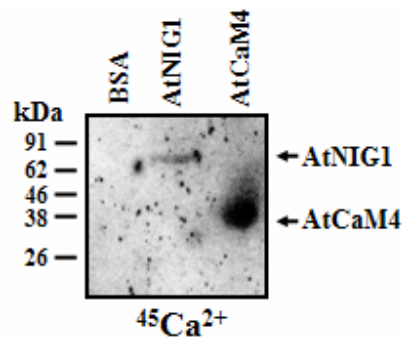
AtCBG 유전자의 스트레스에서의 발현양상을 알아보기 위하여 quantitative RT-PCR을 수행하였다. 분석된 AtCBG는 대부분의 스트레스 처리에서 발현량이 증가하였는데 특히 ABA와 cold, NaCl 처리시 발현의 증가가 두드러졌다. 이는 AtCBG 유전자가 ABA-dependent한 수분 스트레스 신호전달과정에 관련되어 있을 것이라는 사실을 알려준다. AtACT3는 모두 동일한 양의 RNA를 quantitative RT-PCR을 위하여 사용하였음을 보여주고 있다 (Figure 3.2.21).



[Figure 3.2.21] AtNIG 유전자의 발현 양상

다) 칼슘결합 능력 검증

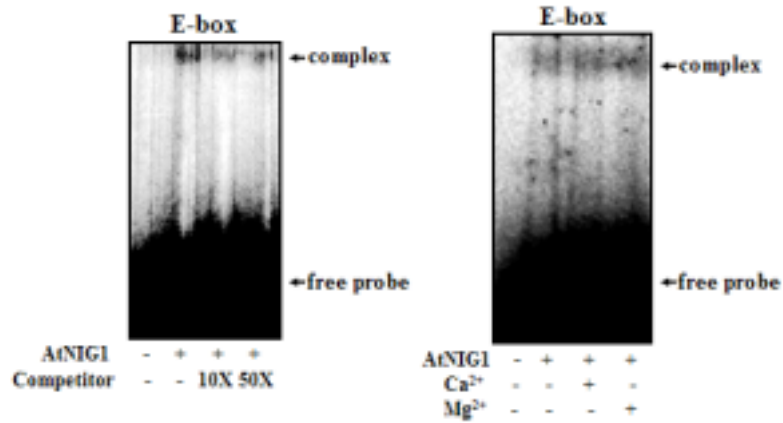
AtNIG 유전자의 염기서열로부터 확보된 단백질서열을 인터넷을 통한 단백질 도메인 분석을 수행한 결과 (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de>) 1개의 EF-hand domain을 가지는 putative calcium binding 단백질로 추정되었다. 따라서 이 단백질이 실제로 칼슘결합 능력이 있는가를 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ blot binding method"를 사용하여 조사하였다. 이 유전자로부터 발현되는 단백질의 칼슘결합특성을 연구하기 위하여 pET vector에 유전자를 클로닝하였고, 성공적으로 과다발현된 단백질을 정제하여 칼슘과 결합하는지를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 실험결과 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 이온은 positive control로 사용된 칼슘결합단백질 calmodulin (AtCaM4)과 AtNIG에 성공적으로 결합하였으나, BSA 단백질에는 결합하지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Figure 3.2.22). 이 실험으로부터 AtNIG 단백질은 Ca^{2+} 과 결합할 수 있는 단백질임을 확인하였다.



[Figure 3.2.22] Calcium binding assay of the recombinant AtNIG

라) DNA 결합능력 검증

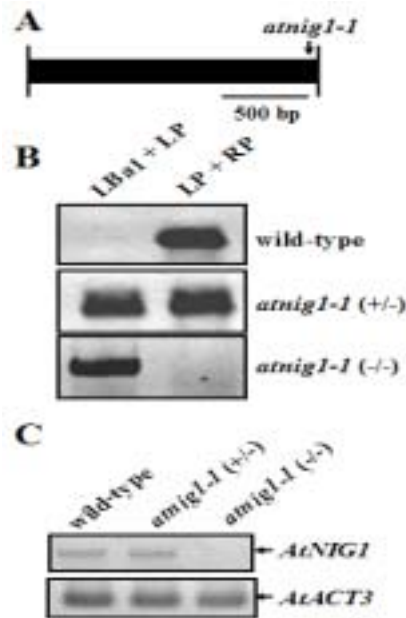
AtNIG는 단백질서열 분석결과 c-terminal 부위에 helix-loop-helix DNA-binding domain을 가지고 있다. 따라서 이 단백질이 DNA와 결합하는 능력을 가지는가를 검증하였다. 그리고 DNA와의 결합능력이 칼슘이온의 양에 영향을 받는지에 대하여도 동시에 검정을 수행하였다. 그 결과 AtNIG는 다른 helix-loop-helix를 가지는 전사인자와 마찬가지로 E-box라는 DNA element에 결합하였다. 그러나 칼슘이온의 양이나 유무에 의하여 그 결합이 조절되는지는 실험에 의하여 명확히 구별할 수 없었다 (Figure 3.2.23).



[Figure 3.2.23] DNA-binding property of AtNIG

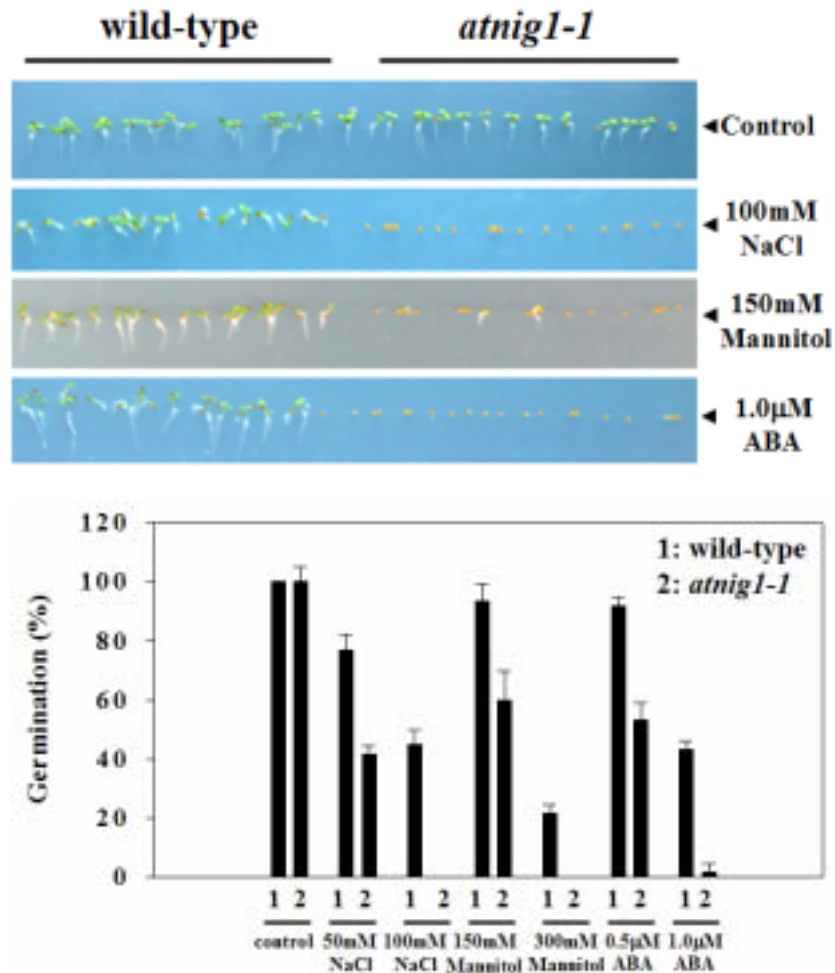
마) 돌연변이체를 이용한 수분스트레스 신호전달체계에서의 역할 검증

AtNIG의 수분스트레스 신호전달과정에서의 기능을 명확히 규명하기 위하여 이 유전자의 기능이 결실된 변이체를 SALK로부터 확보하였다. 이 기능결실 돌연변이체로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과 AtNIG 유전자가 전혀 발현되지 않음을 알 수 있었다 (Figure 3.2.24).



[Figure 3.2.24] Characterization of T-DNA insertional mutants of AtNIG

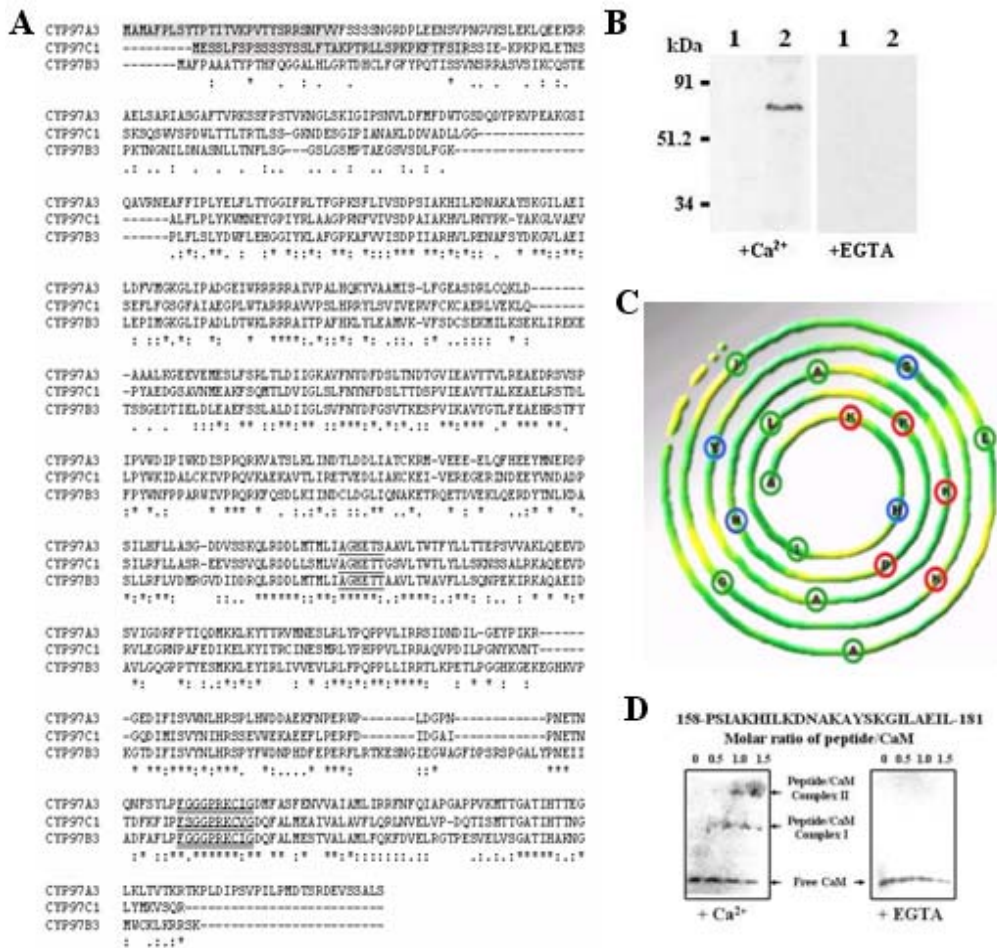
이 돌연변이체들은 정상조건에서는 생육이나 표현형의 이상이 발견되지 않았으나, 수분 스트레스 조건 하에서 정상 식물체 보다 민감하게 반응하여 발아가 저해됨을 관찰할 수 있었다. NaCl, ABA, Mannitol 처리에 의하여 발아율이 현저히 떨어진다는 사실을 발아실험을 통하여 알 수 있었다 (Figure 3.2.26). 이들 돌연변이체의 ABA, 고염, 저온에서의 반응을 살펴본 결과 ABA와 고염농도 조건에서 민감한 반응을 보이는 것을 관찰하였다. 그러나 저온에서는 반응의 정도가 실험의 유의 수준을 벗어나는 결과를 보여 저온에 민감도를 보이는지를 확인할 수는 없었다. 그러나 ABA와 고염 스트레스에 반응한다는 사실로부터 ABA에 의존적인 수분스트레스 신호전달 과정에서 저항성에 관련된 신호전달과정에서 작용할 것이라는 사실은 확실하다고 할 수 있다.



[Figure 3.2.25] Characterization of T-DNA insertional mutants of AtNIG

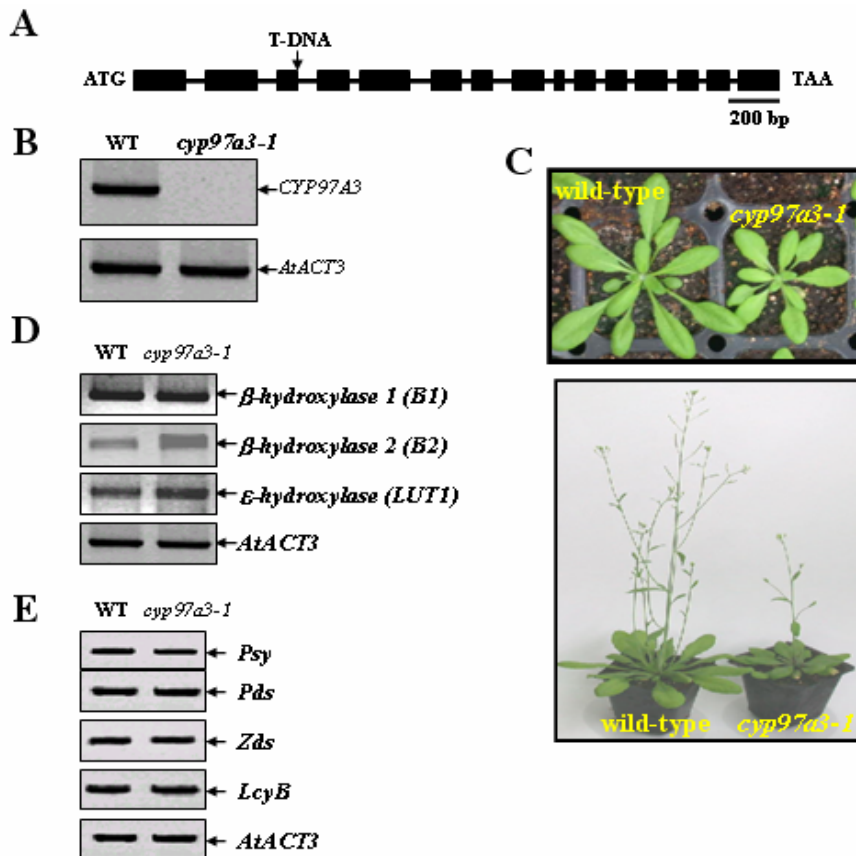
3) CYP97A 유전자 분석

식물체내에서 Ca^{2+}/CaM 중재된 signal transduction의 구성요소들을 연구하기 위해서, 먼저 ^{35}S -label된 CaM probe를 이용하여, 저온 처리된 *Arabidopsis* cDNA expression library를 screening하였다. 그리고, 현재까지 다수의 positive clone들을 획득 했으며, 현재 흥미로운 clone들을 순차적으로 선별하여 연구하고 있다. 첫 번째 clone (CYP97A3)은 carotenoid biosynthetic pathway에 관련된 CYP97C1과 상당한 homology를 보여주었다. CYP97A3 protein은 기존에 알려진 cytochrome P450 enzyme의 모든 특징을 포함하였다 (Figure 3.2.26).



[Figure 3.2.26] CYP97 family sequence alignment와 CYP97A3의 CaM-binding 분석

Ca²⁺/CaM-CYP97A3 interaction을 검증하기 위해서, *in vitro* CaM-binding assay가 실시되었다. Figure 3.2.28B, C, D에서 보는 것과 같이 Ca²⁺/CaM은 CYP97A3의 N-terminal region (amino acid 158-181)과 calcium-dependent 한 상호작용을 보였다. 식물체내에서 CYP97A3의 생물학적 기능을 평가하기 위하여 하나의 T-DNA knock-out mutant (*cyp97a3-1*)을 획득하고 분석하였다 (Figure 3.2.27A). Expression test 결과 이 mutant line이 하나의 null mutant라는 것을 알 수 있었고 (Figure 3.2.28B), 정상적인 생육 및 발달이 저해되는 표현형이 관찰되었다 (Figure 3.2.27C). *cyp97a3-1* 유전자의 mutation이 다른 carotenoid 생합성 유전자의 발현에 영향을 미치는지를 분석한 결과, carotenoid hydroxylase 2 유전자는 mutant line에서 up-regulation되는 것이 관찰되었다 (Figure 3.2.27D). 이것은 CYP97A3 knock-out시에 carotenoid hydroxylase 2의 overexpression을 통해 CYP97A3의 부족분을 채우는 것으로 사료된다.



[Figure 3.2.27] CYP97A3 knock-out mutant의 분석

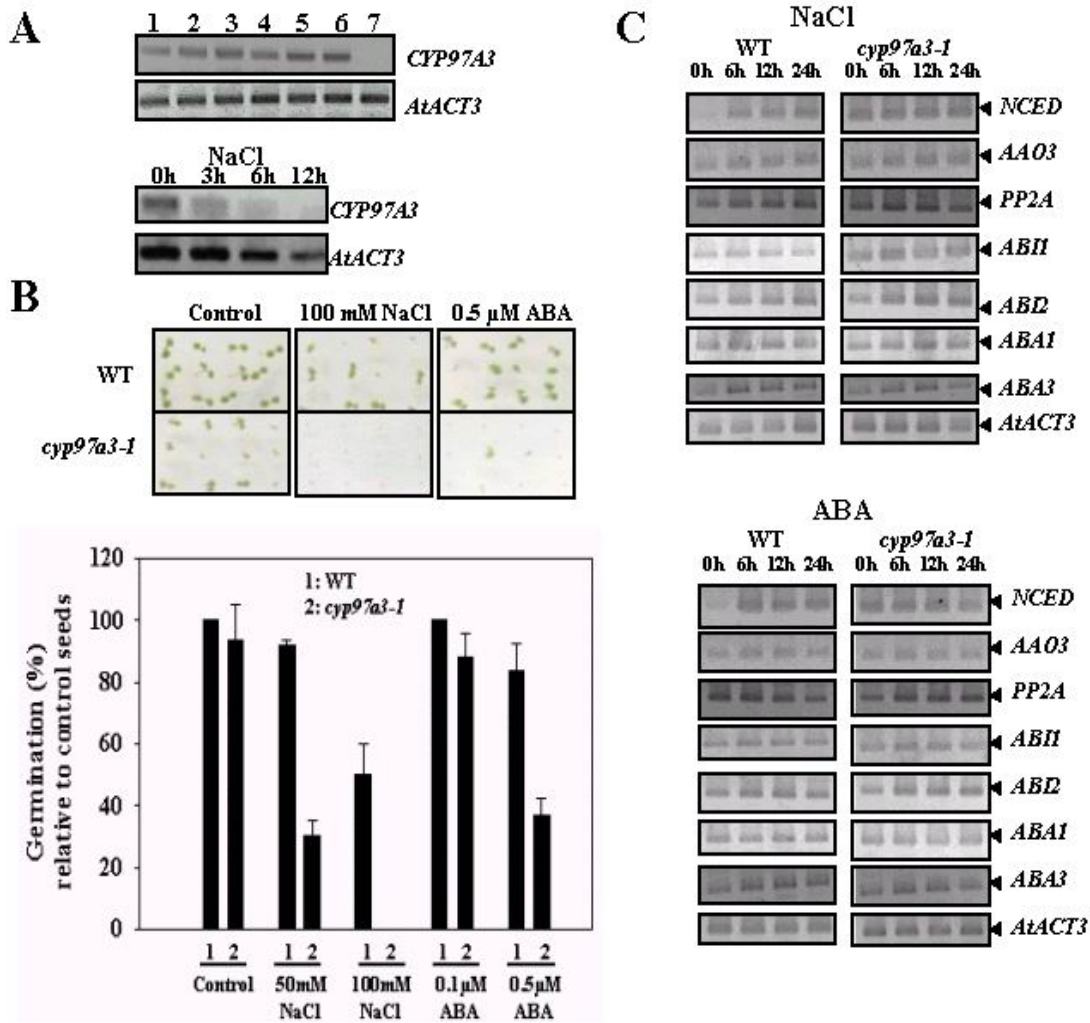
CYP97A3가 CYP97C1와 같이 carotenoid hydroxylase activity를 보이는지를 검증하기 위하여, mutant line과 wild-type에서 각각 carotenoid가 추출하였고 이를 HPLC을 통하여 각 carotenoid를 정량하였다 (Table 3.2.3). HPLC결과는 CYP97A3가 carotenoid hydroxylase activity를 *in vivo*에서 가진다는 것을 제시한다.

[Table 3.2.3] Carotenoids contents in wild-type and *cyp97a3-1*

Line	β -carotene ^a	carotenoids / β -carotene					
		lutein	β -crypto	anth	viola	neo	β -xanth
Wild-type	45 ± 2	1.8 ± 0.1	0.022 ± 0.001	0.067 ± 0.003	0.41 ± 0.03	0.52 ± 0.04	1.02 ± 0.08
<i>cyp97a3-1</i>	28 ± 1	1.7 ± 0.08	0.018 ± 0.007	0.072 ± 0.003	0.30 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.79 ± 0.02

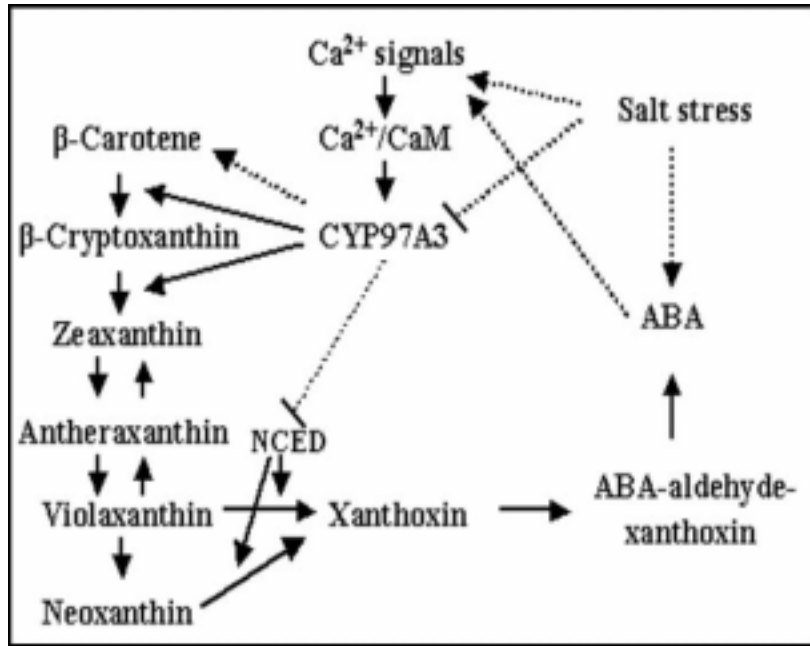
^a β -Carotene is expressed as micrograms per gram fresh weight of leaves. Values are the means ± SD of at least three 4-week-old plants. β -Xanthophylls (β -xanth) are sum of β -cryptoxanthin (β -crypto), antheraxanthin (anth), violaxanthin (viola), and neoxanthin (neo).

cyp97a3-1 mutant에서 xanthophyll (ABA 생합성의 전구물질) 함량이 줄어들었기 때문에, ABA에서 중재되는 여러 가지 stress에 CYP97A3가 관여되는지도 조사 하였다. 먼저 발현 양상을 분석한 결과 CYP97A3는 salt (NaCl) stress에 의해서 down-regulation 된다는 것이 확인되었다 (Figure 3.2.28A). *cyp97a3-1* mutant를 이용하여 수행한 기능 분석에서도 마찬가지로 CYP97A3가 ABA에 의해서 중재되는 salt stress에 관여 되어 있다는 것을 보여 주었다 (Figure 3.2.28B). 그리고 여러 가지 ABA 생합성 관련 유전자와 ABA signaling에 관련된 유전자의 expression 양상들도 mutant line에서 조사하였는데 (Figure 3.2.28C), NCED (ABA 생합성 유전자)는 mutant line에서 up-regulation되는 것으로 관찰되었다. 이 결과는 아마도 CYP97A3가 NCED 유전자의 expression에서 하나의 negative regulator로서 작용한다는 것을 보여 준다.



[Figure 3.2.28] ABA에 의해서 증재되는 salt stress에 관여하는 CYP97A3

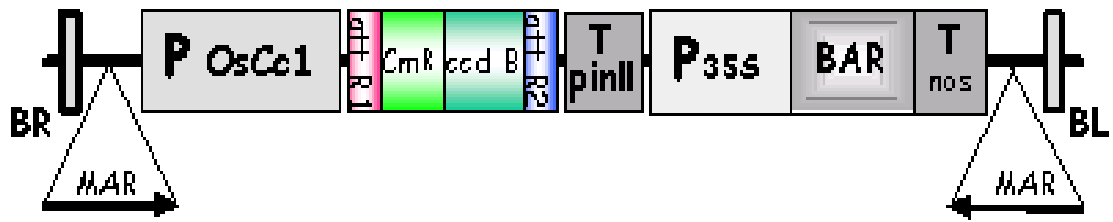
결론적으로, CYP97A3은 carotenoid 생합성 과정과 Ca^{2+}/CaM 이 증재된 signaling 뿐만 아니라 ABA에 의해서 증재되는 수분스트레스 signaling 사이의 molecular interaction을 증재하는 아주 중요한 유전자인 것으로 사료된다 (Figure 3.2.29).



[Figure 3.2.29] CYP97A3의 역할 추정 모델

사. 경제작물인 벼에 형질전환

Gateway system을 이용한 클로닝 방법을 사용하여 단자엽식물용 형질전환 벡터인 pMJ101 (Figure 3.2.30)에 *alti1*, *bti3*, *AtCBG*, *AtNIG* 유전자를 클로닝 하여 이 유전자들을 벼에 도입하는 실험을 수행하였다. 형질전환은 화성벼 종자에서 유도된 callus와 약배양으로부터 생성된 callus를 이용하는 두 가지 방법으로 수행하였다. 그 결과 현재 *alti1*, *bti3*, *AtNIG* 유전자는 도입된 callus를 selection 하는 과정 중에 있고, *AtCBG*의 경우에는 재분화가 이루어지고, 순화를 거쳐 현재 온실에서 재배중이다 (Figure 3.2.31). 이 도입 유전자를 정상적으로 발현하는 형질전환체를 Northern blot 과 Southern blot analysis를 통하여 선별할 것이다. 선별된 line들의 저온에 대한 반응을 살펴보고, 저온저항성 벼품종 제작에 이용할 수 있는 육종모본으로의 이용에 대한 가능성을 검정하여 볼 것이다.



[Figure 3.2.30] 벼 형질전환용 vector pMJ101



[Figure 3.2.31] AtCBG 과다발현 벼 형질전환체

제 3 절 벼 OsPK1 특이 호르몬 신호전달 유전자 이용 연구

1. 이론적, 실험적 접근방법

환경스트레스 신호전달기구에 대한 이해는 내재해성 작물 육종 및 형질전환 작물개발의 필수 기반이다. 특히 저온, 가뭄, 염분 등 서로 다른 스트레스 신호가 식물세포 내에서 어떻게 상호작용하면서 각기 특이적인 세포반응을 이끌어내는지가 최근 중점 연구 분야이다. 또한 하나의 스트레스가 다중적인 신호전달기구를 동시에 유도할 것으로 예측되고 있으므로, 스트레스 신호를 인지하는 센서 및 이를 특이적 세포반응으로 해독하는 각각의 신호전달분자를 규명하는 연구가 향후 환경저항성 작물개발 방향을 이끌어 나갈 것으로 예측된다.

ABA는 가뭄, 염분, 저온 등 다양한 환경스트레스 신호를 일부 매개하여 기공개폐, 세포내 삼투물질 생산 등 적절한 환경적응 생리반응을 유도하는 호르몬으로서 그 분자생물학적 기작이 잘 연구되어 있으나, ABA 신호전달 하위구조의 세분화된 특이성이나 각 세부신호전달기구간의 공통점 등 많은 연구분야가 아직 규명되지 않았다. 그러나 ABA가 환경스트레스 신호전달 기구뿐만 아니라 다른 식물호르몬, 빛, 당 (sugar) 신호전달기구와도 상호작용한다는 것이 알려지면서, 최근의 견해는 어떤 공통적인 신호전달 교차 (cross-talk) 작용분자가 있을 것으로 추측하고 있다.

최근 아기장대에서 알려진 칼슘센서 단백질 (CBL)과 결합하는 protein kinase (CIPK)는 다양한 식물의 환경스트레스를 매개하는 신호전달분자로서, 특히 ABA 신호전달 및 ABA 비의존성 환경 스트레스 신호전달에 공통적으로 관여한다는 점에서 CIPK가 신호전달 교차 작용분자의 하나일 가능성이 제안되었다.

식물의 저온 스트레스 신호전달 과정에 칼슘이 관여하는 것이 오래전부터 알려져왔으나, 관련 분자기구는 CDPK 등 극히 일부 연구만 되어있고, 특히 저온신호전달과 ABA가 어떻게 상호작용하는지는 거의 알려져 있지 않다. 본 연구의 목적은 벼에서 저온처리에 의해 강하게 발현이 유도되는 SnRK3 (SNF1 related protein kinase group III) 계열 신규 유전자인 OsPK1를 이용하여 (1) OsPK1이 스트레스 호르몬인 ABA 신호전달기구의 하위 전사인자를 조절하는 상위 kinase인지를 규명하고 (2) OsPK1과 상호작용하는 단백질 정보를 통해 지금까지 알려지지 않은 저온스트레스와 ABA 신호전달기구간의 상호작용을 탐구하며 (3) OsPK1 유전자 발현이 조절된 형질전환체에서는 어떤 스트레스 신호전달기구가 영향을 받는지를 조사함으로써, 벼의 저온스트레스와 관련된 OsPK1 특이 신규정보를 창출하는데

목적은 둔다. 또한 본 연구과제에서 생산된 형질전환 벼의 기초연구를 통해 OsPK1이 작물의 내냉성 또는 스트레스 저항성을 증진시키는데 유용 가치가 있는지를 조사할 것이다.

2. 연구내용 및 연구방법

가. 연구내용

본 협동과제는 벼에서 저온처리에 의해 강하게 발현이 유도되는 SnRK3 (SNF1 related protein kinase group III) 계열 인산화 효소 유전자인 OsPK1과 관련하여 (1) OsPK1이 스트레스 호르몬인 ABA 신호전달기구의 하위 전사인자를 조절하는 상위 kinase 인지를 규명하고 (2) OsPK1과 상호작용하는 단백질 정보를 통해 지금까지 알려지지 않은 저온스트레스와 ABA 신호전달기구간의 상호작용을 탐구하며 (3) OsPK1 유전자 발현이 조절된 형질전환체에서 어떤 스트레스 마커 유전자 발현이 영향을 받는지를 조사함으로써, OsPK1 특이 신호전달기구를 규명하는 것을 목표로 하였다. 또한 본 연구과제에서 생산된 형질전환 벼에 대한 기초연구를 통하여 OsPK1이 작물의 내냉성 또는 스트레스 저항성을 증진시키는데 유용 가치가 있는지를 확인하고자 하였다.

1차년도 연구를 통해 (1) OsPK1이 bZIP 계열 ABA 신호전달 관련 전사인자 단백질의 C 말단 부분을 특이적으로 인산화시킨다는 사실을 규명하였고 (2) Yeast two hybrid screening을 통해 OsPK1의 regulatory domain과 상호작용하는 후보유전자 73 클론을 선발, 분석하였으며 (3) 35S-OsPK1 형질전환체 (애기장대, 벼)를 각각 생산하였다.

2차년도 연구를 통해 (1) 35S-OsPK1 애기장대 homozygous line을 일차 선발하였으나 OsPK1 유전자 발현수준이 매우 낮았다. 그러나 저온스트레스 마커 유전자인 kin2의 발현이 증가한 반면, ABA 신호전달 마커 유전자인rd22 및 rd29의 발현이 감소하는 경향을 확인하였다. (2) OsPK1 발현수준이 높은 heterozygous line에서 종자발아에 대한 ABA 반응이 일부 감소하는 결과를 얻었으며, (3) 35S-OsPK1 형질전환 벼의 유전자 발현양상을 5K cDNA Chip을 이용하여 분석한 결과 최소한 7종의 저온관련 유전자발현이 OsPK1과 연관되어 있음을 알았다. 이처럼 형질전환 애기장대와 벼에서 공통적으로 얻은 결과는 OsPK1이 저온신호전달의 positive regulator로 작용할 가능성을 시사한다. (4) 또한 1차년도 Y2H 탐색에서 선발된 유전자가 OsPK1의 표적 단백질인지를 조사하기 위해 전사인자 등 일부 상호작용 유전자에 대한 GST-fusion recombinant 단백질을 생산하였고 (5) 35S-OsPK1 형

질 전환 벼의 유전자 발현 수준을 조사하고 OsPK1 발현수준이 높은 homozygous line 종자를 대량 증식하였다.

3차년도 중점 연구목표는 형질전환체 특성 검정에 있으므로 (1) 35S-OsPK1 애기장대 중에서 OsPK1 발현 수준이 높은 homozygous line을 재선발하여 스트레스 마커 유전자 발현을 조사한 결과 대조구에 비해 kin2 유전자 발현이 증가하는 것을 재확인하였고 저온 처리에 따른 ABF, ABI2 등 ABA 신호전달 관련 마커 유전자 발현양상이 차이가 있음을 규명하였다. (2) 애기장대 형질전환체의 스트레스 저항성 검정을 수행한 결과 저온 또는 염 스트레스 조건에서 종자 발아율은 차이가 없었으나 동일 스트레스 조건에서 발아 후 생장 저해 정도가 대조구에 비해 감소하였음을 확인하였다 (3) RT-PCR 방법을 통해 35S-OsPK1 형질전환 벼에서 invertase, HD-ZIP 등 일부 저온 관련 유전자들의 발현이 뚜렷이 증가하였음을 규명하였고, (4) in gel kinase assay를 통해 형질전환 벼에서 저온 스트레스에 의한 인산화 활성이 대조구에 비해 더 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 이런 결과는 OsPK1이 cold signal에 의해 활성화 될 가능성을 시사한다. (5) 형질전환 벼의 스트레스 저항성을 조사하기 위하여 먼저 paraquat (methyl viologen)에 의한 잎의 손상도를 측정하고 결과 형질전환 벼의 산화스트레스 저항성이 증가하였음을 확인하였다. 또한 포장 조건에서 형질전환 벼의 농업특성은 큰 차이를 보이지 않았으며, 현재 포장조건에서 내냉성 검정을 시행중에 있다.

이상 본 협동과제의 3년간 연구결과를 통해 저온 유도 인산화 효소인 OsPK1이 애기장대 및 벼에서 각각 저온 반응 유전자군의 발현을 일부 매개하는 신호전달기구의 positive regulator로서 작용함을 규명하였고, 특히 ABF 계열 전사인자를 인산화시키는 상위 인산화효소로서 저온과 ABA 신호전달기구를 연계하는 매개분자일 가능성을 제안 하였다. 그러나 35S-OsPK1 형질전환체의 유전자 발현양상 분석 결과는 OsPK1의 과발현이 복잡한 신호전달네트워크에 영향을 미친다는 것을 시사한다. 본 과제의 Y2H 탐색을 통해 얻어진 OsPK1 상호작용 유전자들은 이러한 OsPK1의 신호전달 네트워크를 향후 상세히 분석하는데 매우 유용할 것으로 생각된다.

OsPK1이 작물의 내냉성 또는 스트레스 저항성을 증진시키는데 유용한 유전자인지를 조사하는 하는 것이 본 과제의 중점 목표이다. 이를 위하여 본 과제에서는 OsPK1 발현 수준이 서로 다른 형질전환체 (애기장대 및 벼)를 각각 20 계통 이상 생산, 선발하였다. 애기장대 형질전환체의 생리 검정결과는 OsPK1이 vegetative tissue의 스트레스 저항성을 증진시키는 효과가 있음을 시사한다. 특히 일부 애기장대 형질전환 계통의 경우 대조구에 비

해 저온 (15 °C)에 의한 생육저해가 감소한것을 확인하였다. **형질전환 벼의 경우 실험실 수준에서 잎의 산화스트레스 저항성 증가를 확인하였고, 저온 유도 유전자 발현이 증가하는 것을 규명하였으므로 최소한 OsPK1이 벼의 스트레스 신호전달 기구를 조절할 수 있는 것으로 생각된다.** 현재 작물과학원 춘천시시험장에서 내냉성을 시험 중에 있으므로 8월 중순에 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

나. 연구방법

1) 유전자 분리

저온처리 (6 oC, 24 h)한 벼 유묘로부터 cDNA 유전자 은행을 제작하고 reverse Northern 방법에 의해 cold 처리에 의해 발현이 강하게 유도되는 유전자인 OsPK1을 선별하였다. 스트레스 처리한 벼 RNA로부터 RT-PCR 방법으로 specific primer를 이용하여 (Forward primer, 5'-ggatccatggcatcggagatgagcaagaac-3', Reverse primer, 5'-ctcgagttagtttcaccacatgcagctgcc-3') OsbZIP1 유전자를 분리하였다.

2) Yeast two hybrid library 제작

Library의 발현 유전자군을 최대화하기 위해 다양한 벼 조직 (shoots, roots, callus, seeds) 및 처리군 (호르몬, 스트레스)에서 각각 total RNA를 분리하여 RNA super pool을 만들고 이로부터 cDNA를 제작하여 hybrid-ZAP vector (Stratagene)에 cloning하였다. 제작된 primary lambda phase library (5 X 10⁶ pfu/ml)를 XL1-Blue MRF' (Stratagene)에 접종하여 amplified library (10¹⁰pfu/ml)를 생산하였다.

3) Bait vector 제작 및 yeast two hybrid screening

OsPK1의 C 말단부분 165 amino acids를 PCR 증폭하여 얻은 산물을 pBDGAL4 vector (Stratagene)의 EcoR I/Sma I site에 subcloning 하고 전 염기서열을 확인하였다. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다: sense primer, 5'-ACGGAATTTCGACGAGAAATATGAAACTAG-3' antisense primer,

5'-ATTCCCGGGTACGCCGCGGCCGTTGC-3' Yeast (YRG2, Stratagene 또는 AH109, Clontech)에 bait plasmid와 library plasmid를 함께 형질전환하고 SD-LTH 배지에서 1차 선발된 균주를 SD-LTH-AT(20 mM)에서 2차 선발하였다. 약 1.5×10^5 library를 screening하여 73개의 상호작용 후보클론을 선발하였다. 단백질 상호작용은 filter lift assay (YRG2) 또는 α -gal을 포함하는 SD-LTH 배지 배양 (AH109)을 통해 reporter gene (lac Z) 발현을 확인하였다. Y2H에서 선발된 yeast 균주로부터 plasmid를 분리하여 유전자 염기서열을 결정하였다.

4) 대장균 (E.coli.)에서 재조합 단백질 생산 및 분리

PCR로 증폭한 OsPK1과 OsbZIP1의 ORF, 또는 OsbZIP1의 각 deletion mutant를 pGEX 벡터 (Amersham)에 삽입하고 E. coli BL21(DE3) plysS (Novagen)에 형질전환하였다. 37 °C에서 배양 후 ($A_{600} = 0.5$), IPTG (0.1 mM)을 넣고 2시간동안 재조합단백질을 유도하였다. 배양액을 원심분리하여 대장균을 회수하고 차가운 TBS 완충액으로 씻은 후 freeze-thaw 방법을 이용하여 cell lysate을 얻은후 이를 10,000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 glutathione-agarose column (Peptron, Korea)에 통과시켰다. Column에 결합한 GST-fusion 단백질을 5 mM glutathione으로 용출하여 회수한 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였다. Y2H에서 선발된 클론의 경우 pAD 플라스미드를 EcoRI과 XhoI으로 절단하여 pGEX 벡터에 각각 클로닝한 후 동일한 방법으로 재조합 단백질을 분리하였다.

5) In vitro kinase assay

대장균에서 분리한 GST-OsPK1 과 GST-OsbZIP1 재조합 단백질을 각각 인산화 효소원과기질로 사용하였다. 단백질을 포함하는 인산화 반응액 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 μ Ci r-32P-ATP, 10 mM MnCl₂)을 30 °C에서 30분 반응후 SDS-PAGE로 단백질을 분리하고 phosphoimage를 분석하였다.

6) 식물 형질전환

가) 식물 발현 벡터 제작: OsPK1 full cDNA (1594 bp)를 35S promoter와 Nos

terminator의 조절을 받는 pCAMBIA 1300 유래 식물발현벡터 (pCAMYS01)의 Sma I 위치 에 subcloning하여 정방향 및 역방향으로 유전자가 삽입된 클론을 각각 선발하였다.

나) 애기장대 형질전환: OsPK1 과발현 벡터로 형질전환된 Agrobacterium (GV3101) 배양액을 4주간 키운 애기장대 (Colombia)의 화아에 vacuum infiltration하였다. 생성된 종자를 hygromycin (20 μ g/ml)과 cefatoxin (250 μ g/ml)을 포함하는 MS0 배지에서 발아시켜 선발된 유식물을 온실로 옮겨 재배하였다.

다) 벼 형질전환: OsPK1 과발현 또는 antisense 벡터를 포함하는 Agrobacterium (LBA4404) 낙동벼 scutellum 유래 캘루스를 3일간 공배양 후 hygromycin (30 μ g/ml)과 cefotaxim (250 μ g/ml)을 포함하는 2N6 배지에서 선발하였다. 선발된 callus는 항생제와 kinetin을 포함하는 재생배지에서 shoot와 root를 유도한 후 온실로 옮겨 재배하였다.

7) 식물 생장 및 스트레스 처리

Hygromycin (애기장대, 15 μ g/ml; 벼, 30 μ g/ml)을 포함하는 1/2 MS0 agar 배지에서 각 형질전환체의 homozygous T1 lines을 선발하였다. 소독후 저온 처리한 애기장대 종자를 1/2 MS0 agar 배지 또는 인공토양에서 발아시켜 2-4주간 키운 뒤 실험에 사용하였다. 종자 발아 시험의 경우 약 100개의 종자를 ABA (0.75 μ M) 또는 NaCl (125 mM)을 포함하는 1/2 MS0 agar 배지에 치상 후 23 oC 또는 15 oC에서 10일 쯤 발아율과 3주 쯤 생장 정도를 조사하였다. 저온 처리 시험의 경우 23 oC에서 4주간 1/2 MS0 agar 배지에서 키운 애기장대를 4 oC로 옮긴 후 각 시간별로 채취한 전체 유식물로부터 total RNA를 분리하였다. 형질전환 벼의 경우, homozygous T1 또는 T2 종자를 28 oC에서 2주간 1/2 MS0 agar 배지에서 키운 뒤 4 oC로 옮겨서 각 시간별로 전체 유식물을 채취하였다. 산화스트레스 저항성 시험의 경우 온실토양에서 4주간 키운 형질전환 벼의 잎 절편을 연속광 조건의 28 oC 배양실에서 6 μ M methyl viologen이 포함된 완충액에서 24시간동안 처리한 후 엽록소 함량을 정량하여 잎의 상대적인 손상도를 측정하였다. 혹은 동일한 잎 절편을 연속광 조건의 28 oC 또는 4 oC 배양실에서 24시간 처리후 total RNA를 분리하였다.

8) 유전자 발현 분석

가) Northern blot analysis: 애기장대 또는 벼 잎으로부터 total RNA를 Trizol (BRL)방법으로 분리하여, 나일론막 (Hybond XL, Amersham)에 전이후 32P로 방사선 표지한 probe를 이용하여 혼성화 반응을 수행하고 phosphoimage를 분석하였다.

나) RT-PCR analysis: 애기장대 또는 벼 잎으로부터 plant RNA kit (Quiagen) 방법으로 total RNA를 분리하고 oligo (dT) primer와 reverse transcriptase를 이용하여 first cDNA를 합성하였다. 각 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 20-25 cycle PCR을 수행하여 상대적인 유전자 발현을 측정하였다. RT-PCR의 internal control로서 actin 유전자 발현을 비교하였다.

다) DNA chip 분석: 온실에서 한달간 키운 35S-OsPK1 형질전환 벼 T1 계통과 대조구인 동진벼의 어린 잎으로부터 RNA extraction kit (Quagen)을 이용하여 total RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 RNA 순도를 확인하였다. Total RNA 40 μ g을 3DNA Array detection kit을 이용하여 각각 Cy5 Cy3로 형광표지한 후 Rice 5K cDNA Chip (농업생명공학연구원)에 혼성화 반응을 수행하고, Axon scanner와 GenePix program을 이용하여 Chip 스캔 및 이미지 분석을 수행하였고, microarray data는 TIGR MIDUS 프로그램으로 분석하였다.

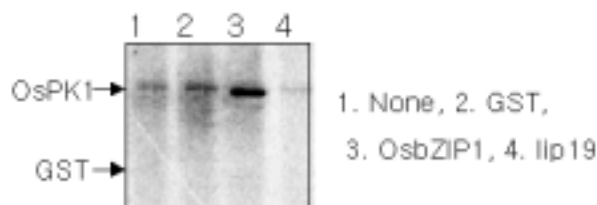
9) In gel kinase assay

2주간 1/2 MS0 agar 배지에서 키운 형질전환 벼를 4 oC로 옮긴 후 각 시간별로 채취한 shoot로터 total soluble protein을 분리하였다. Histone을 기질로 포함하는 10 % SDS-PAGE로 단백질을 분리한 후 4°C에서 16시간 renaturation 시켰다. 인산화 반응액 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 μ Ci r-32P-ATP, 10 mM MnCl₂)에서 1시간동안 반응시켰다. 5% TCA 와 1% sodium pyrophosphate로 반응을 중단시키고, 완전히 washing후 phosphoimage를 분석하였다.

3. 연구결과

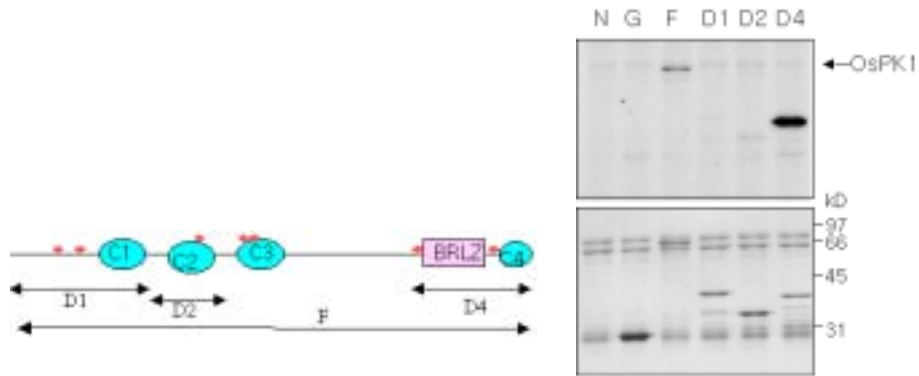
가. OsPK1에 의한 벼 ABF 계열 bZIP 전사인자 C 말단 부위의 인산화

ABF 계열 bZIP 전사인자는 ABA 또는 스트레스에 반응하는 유전자군의 발현을 조절하는 주요 전사인자이다. In vitro kinase assay 방법을 통해 벼에서 분리한 ABF 계열의 bZIP 전사인자인 OsbZIP1 단백질이 OsPK1 재조합 단백질에 의해 인산화된다는 것을 규명하였다 (Figure 3.3.1). 한편 ABF 계열이 아닌 다른 종류의 bZIP 단백질 (lip 19)의 경우 OsPK1에 의해 인산화되지 않았으므로 기질의 특이성을 확인할 수 있었다.



[Figure 3.3.1] In vitro phosphorylation of OsbZIP1 protein by OsPK1. Purified recombinant proteins of GST-OsbZIP1 and GST-lip19 were used as substrates for the recombinant GST-OsPK1 kinase. GST protein was used as negative control.

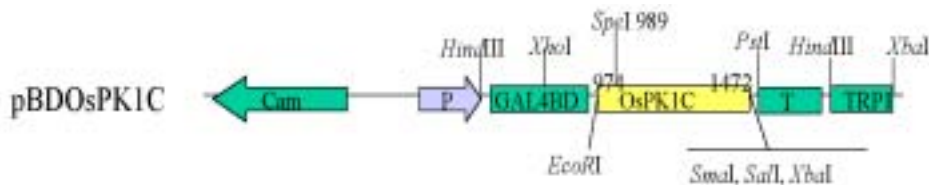
OsbZIP1 단백질은 N 말단부위에 3개의 conserved domain과 C 말단에 bZIP domain이 위치하고 있다. 각 부위에 대한 재조합 단백질은 기질로 사용하여 인산화 특성을 조사한 결과 BRLZ (basic region leucine zipper)을 포함하는 C 말단 부위가 특히 OsPK1에 의해 강하게 인산화되는 부위라는 사실을 규명하였다 (Figure 3.3.2). 이런 결과는 OsPK1이 스트레스 호르몬인 ABA 신호전달기구의 하위 전사인자를 조절하는 상위 kinase일 가능성을 시사한다. OsPK1에 의한 C 말단 부위의 인산화가 OsbZIP1의 기능에 어떤 영향을 주는지는 향후 규명해야할 과제일 것으로 생각된다.



[Figure 3.3.2] OsPK1 strongly phosphorylates the BRLZ domain of OsbZIP1 protein. GST-fused recombinant proteins for each subdomain of OsbZIP1 as shown in the schematic diagram were used as substrates for the kinase assay.

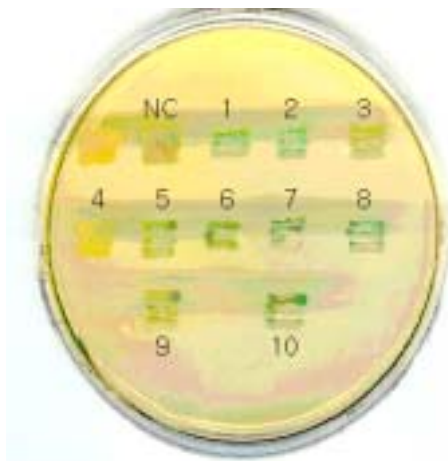
나. Yeast two hybrid 탐색을 이용한 OsPK1 상호작용 유전자 분리

OsPK1 단백질은 N 말단에 kinase catalytic domain과 C 말단에 regulatory domain이 있다. OsPK1의 C 말단 조절부위 216 amino acids를 yeast GAL4 binding domain (pBDGAL4)에 연결한 bait vector, pBDOsPK1C를 제작하였다 (Figure 3.3.3).



[Figure 3.3.3] Schematic diagram of pBDOsPK1C

OsPK1C를 bait로 LTH-AT(15 mM) 배지에서 선발된 OsPK1-상호작용 yeast 73 클론에서 유전자를 분리하여 염기서열을 결정하고, NCBI blast X 탐색을 통해 상동성을 분석하였다 (Table 3.3.1). 선발된 일부 클론 (yeast strain AH109)들을 X-alpha-gal을 포함하는 SD-LTH agar 배지에서 배양하여 alpha-galactosidase 활성이 있음을 확인하였으므로 (Figure 3.3.4), 선발된 유전자가 세포내에서 OsPK1과 상호작용할 가능성이 높다고 전망된다.



No	Clone ID	Homology Search Results
1	A1-3	HD-ZIP
2	A1-7	drought-induced protein
3	A2-2	B-1,4-glucanase
4	A2-3	AP2 domain protein
5	A2-6	LEA5
6	A2-20	hypothetical protein
7	A2-37	unknown
8	A2-58	PR 4b
9	A2-87	MADS
10	A2-91	SnRNP splicing factor

Figure 4. Alpha-galactosidase assay. Yeast (AH109) clones were streaked on SD-LT agar plates containing X-alpha-Gal and incubates at 30 oC for 2 days.

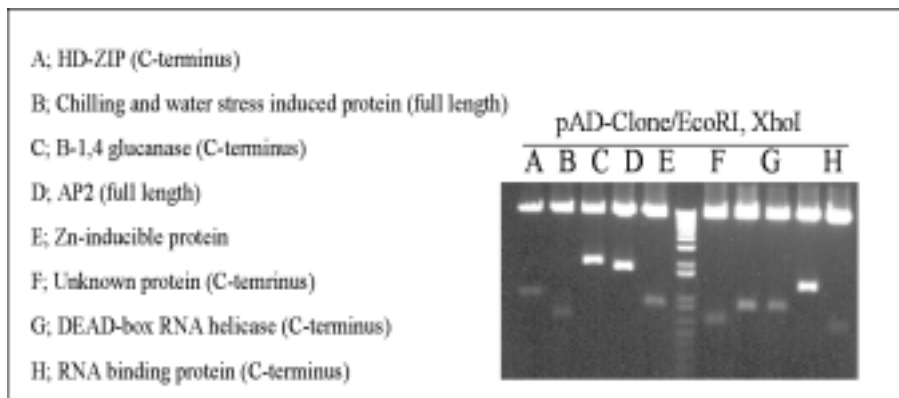
[Table 3.3.1] Y2H에서 선발된 OsPK1 상호작용 클론의 유전자 상동성 분석

	Clone ID	Homology search results
1	PK1C-Y1-1	maize 60S ribosomal protein
2	PK1C-Y1-4	putative ADP-ribosylation factor
3	PK1C-Y1-12	reversely glycosylated polypeptide
4	PK1C-Y1-18	putative lipid transfer protein
5	PK1C-Y1-20	putative 50S ribosomal protein
6	PK1C-Y1-21	putative photosystem II 10K protein
7	PK1C-Y1-25	anerobically inducible protein
8	PK1C-Y1-26	cadmium-induced metallothionein
9	PK1C-Y1-28	unknown protein
10	PK1C-Y1-37	ubiquitin/ribosomal protein S27a
11	PK1C-Y1-40	putative polygalacturonase
12	PK1C-Y1-46	putative RNA helicase
13	PK1C-Y2-1	RUBP carboxylase
14	PK1C-Y2-8A	hypothetical protein
15	PK1C-Y2-8B	PR protein 1a
16	PK1C-Y2-12	hypothetical protein wali 7
17	PK1C-Y2-20	putative RNA binding protein
18	PK1C-Y2-22	silencing group B protein

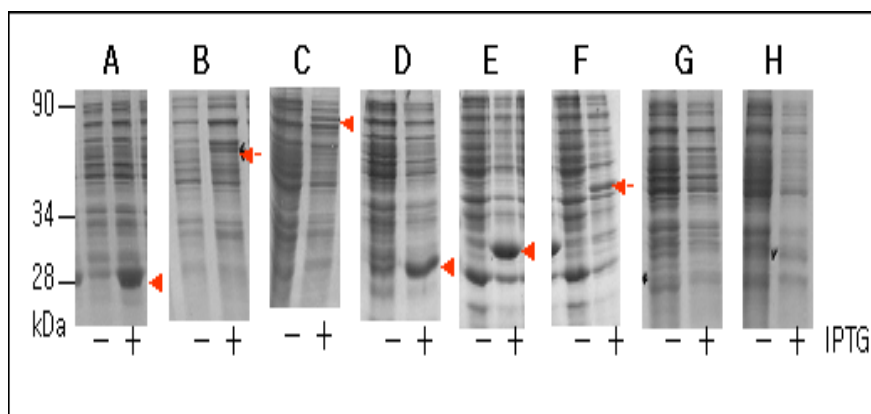
19	PK1C-Y2-41	N-acetyltransferase 5 isoform
20	PK1C-Y2-63	S-adenosylmethione decarboxylase
21	PK1C-Y2-66	MDR-like ABC transporter
22	PK1C-Y2-83	putative IAA amidohydrolase
23	PK1C-Y2-92	starch branching enzyme rbe4
24	PK1C-Y2-124	60S ribosomal protein L7A
25	PK1C-Y2-128	superoxide dismutase
26	PK1C-A1-3	homeodomain leucine zipper protein
27	PK1C-A1-6	oleosin 16 kD
28	PK1C-A1-7	early drought induced protein
29	PK1C-A1-9	ferredoxin
30	PK1C-A1-10	NADPH HC toxin reductase
31	PK1C-A2-2	putative endo-1,4-beta-glucanase
32	PK1C-A2-3	AP2 domain-containing protein
33	PK1C-A2-5	PSII oxygen-evolving complex protein
34	PK1C-A2-6	late-embryogenesis protein LEA5
35	PK1C-A2-8	ascorbate peroxidase
36	PK1C-A2-20	hypothetical protein
37	PK1C-A2-37	unkown protein
38	PK1C-A2-56	chlorophyll a/b binding protein
39	PK1C-A2-58	pathogenesis-related protein 4b
40	PK1C-A2-60	glycine-rich protein
41	PK1C-A2-62	alpha-tubulin
42	PK1C-A2-70	putative serine carboxypeptidase
43	PK1C-A2-79	unknown protein
44	PK1C-A2-87	MADS-box protein
45	PK1C-A2-91	SnRNP splicing factor-related protein
46	PK1C-A2-100	hypothetical protein
47	PK1C-A2-108	fructose-bisphosphate aldolase
48	PK1C-A3-1	translation initiation factor 5A
49	PK1C-A3-2	putative late-embryogenesis abundant protein
50	PK1C-A3-5	putative aminotransferase
51	PK1C-A3-6	Ramy1
52	PK1C-A3-8	heatshock protein 70
53	PK1C-A3-10	pyruvate kinase

다. OsPK1 상호작용 단백질의 in vitro kinase 기질 여부 탐색

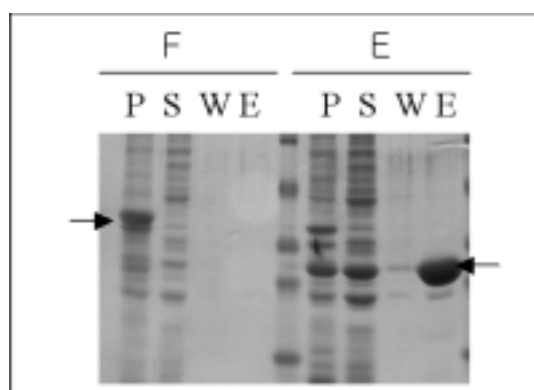
Yeast two hybrid 탐색을 통해 OsPK1의 C-terminal regulatory domain과 상호작용하는 것으로 선발된 유전자의 염기서열 분석 결과를 기반으로 전사 인자, 스트레스 신호 전달 관련 단백질 등 OsPK1의 down stream target 가능성이 있는 후보 유전자 10종을 선택하여 GST-fusion 단백질을 생산하고 in vitro kinase assay를 수행하여 이들 단백질이 OsPK1에 의해 인산화되는지를 일차적으로 조사하였다. 선발된 대부분의 클론들이 단백질의 C 말단 부위만을 포함하고 있으나 (Figure 3.3.5), CKII나 PKC에 대한 putative phosphorylation sites을 포함하고 있으므로 (결과 미제시), 일단 선발된 클론을 EcoRI/XhoI 으로 절단하여 얻은 유전자 절편을 GST-fusion vector (pGEX 4T-1, Amersham)에 in frame으로 cloning하고 E.coli (DH5 α)에 형질전환하여 IPTG에 의한 단백질 생성 유도를 조사하였다 (Figure 3.3.6). 그 결과 4종 (B,C,E,F) 의 단백질 생성이 유도되었고, 전사인자 2종 (A, D)에 대한 단백질은 대부분 분해되어 GST 크기의 단백질만 관찰되었으며, 나머지 2종 (G, H)의 단백질의 경우 발현양이 낮아 SDS-PAGE 상에서 관찰되지 않았다 (Figure 3.3.6). 단백질 발현이 확인된 클론 2종 (E, F)을 E.coli (BL21plysS)에서 생성하여 GST-agarose column을 이용하여 분리하였으나, F 클론의 경우 생성된 단백질이 대부분 불용성 분획에 있어서 단백질이 분리되지 않았고, E 클론에 대한 재조합 단백질만 순수분리할 수 있었다 (Figure 3.3.7). 불용성 분획에서 회수한 F 재조합 단백질과 E 클론에 대한 재조합 단백질을 기질로 in vitro kinase assay를 수행하였으나 OsPK1에 의해 인산화되지 않았다 (결과 미제시). 이들 단백질의 다른 부위가 인산화되는지 혹은 OsPK1의 활성과 관련된 다른 기능이 있는지, 저온 스트레스 신호전달과 어떤 연관성이 있는지는 향후 더 연구해야 할 것으로 생각된다.



[Figure 3.3.5] Identification of OsPK1-interacting clones isolated by yeast two hybrid screening Plasmids were isolated from yeast, transformed and cured in *E.coli* in the presence of carbenicilin (50µg/ml) and digested with EcoRI and XhoI.



[Figure 3.3.6] Expression of GST-fused proteins of OsPK1-interacting clones in *E.coli* (DH5α) The EcoRI/XhoI fragment of pAD clones were cloned in frame into the corresponding sites of pGEX 4T-1, respectively. Expression of the GST recombinant proteins were induced by 100 µM IPTG for 2 hr at 37 °C.

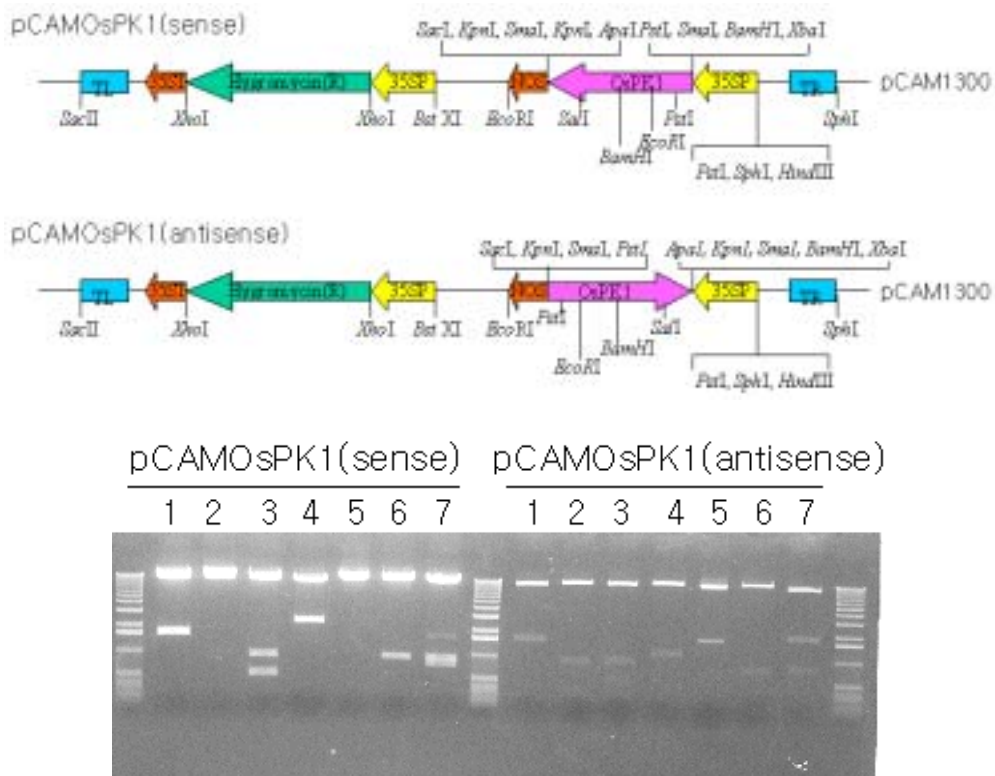


[Figure 3.3.7] Purification of GST-fused recombinant proteins expressed in *E.coli* (BL21plyS) Bacterial lysates were prepared by freeze-thaw method, centrifuged at 20,000g for 30 min at 4 °C and the supernatant was applied to glutathione-Agarose column. After washing the column with TBS buffer, GST-fusion proteins were eluted with 5 mM glutathione in TBS buffer. P, pellet; S, supernatant; W, washing fraction; E, eluent

라. 35S-OsPK1 형질전환체 (애기장대, 벼) 생산

1) 식물형질전환 벡터 제작

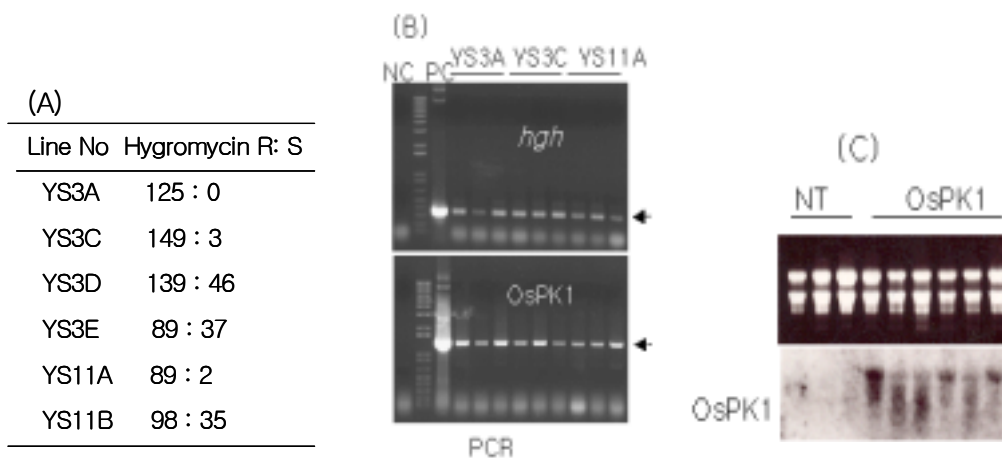
pCAMBIA1300 vector를 기본으로 35S promoter에 의해 OsPK1 유전자가 항시 과 발현될 수 있는 식물형질전환 벡터 pCAMOsPK1 (sense)과 OsPK1 유전자를 역방향으로 삽입하여 유전자 발현수준을 낮출 수 있는 antisense vector, pCAMOsPK1 (antisense)을 제작하였다 (Figure 3.3.8).



[Figure 3.3.8] Schematic diagram of plant expression vectors for OsPK1 and restriction enzyme-digestion patterns for the vector plasmids. 1, Sma I; 2, EcoR I; 3, Sal I/EcoR I; 4, Sal I/Hind III; 5, Kpn I; 6, BamH I; 7, Pst I

2) 애기장대 형질전환체 생산

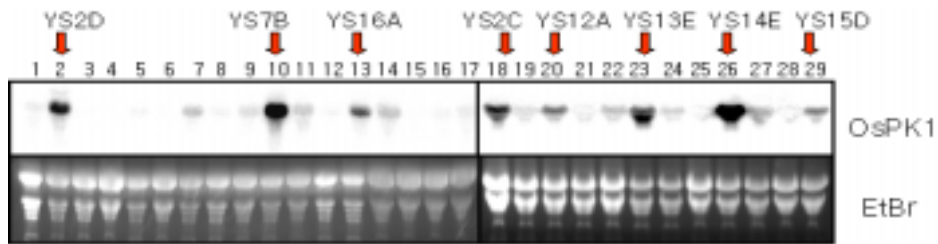
pCAMOSPK1 (sense) vector를 포함하는 *Agrobacterium* (GV3101)로 애기장대를 형질전환하고, hygromycin 배지에서 T1 세대 30 계통을 선발하였다. T2 세대의 hygromycin 저항성 비율에 근거하여 선발한 homozygous 계통 (Figure 3.3.9A)에서 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 수행한 결과 OsPK1 유전자와 선발마커 유전자 (*hpt*, hygromycin phosphotransferase)가 안정적으로 도입되었음을 확인하였다 (Figure 3.3.9B). 또한 Northern 분석을 통해 형질전환 애기장대에서 벼 OsPK1 유전자가 발현되고 있다는 사실을 확인하였으나, 발현수준이 예상보다 낮았다 (Figure 3.3.9C).



[Figure 3.3.9] Transgene analysis of homozygous OsPK1-transformed *Arabidopsis*. (A) T1 seeds were germinated on a MSO agar media containing hygromycin (20 $\mu\text{g/ml}$). (B) Genomic DNA was isolated from the transgenic *Arabidopsis* and PCR analysis was performed with primers specific to hygromycin phosphotransferase (*hpt*) or OsPK1. NC, nontransgenic control; PC, positive control (pCAMOsPK1 vector). (C) Total RNAs were isolated and Northern blot analysis was performed with ^{32}P -labelled OsPK1 as a hybridization probe.

따라서 1차년도에 선발한 애기장대 형질전환체 T1 세대 30 계통을 대상으로 다시 Northern 분석을 수행하여 도입한 OsPK1 유전자 발현수준을 조사하였다 (Figure 3.3.10).

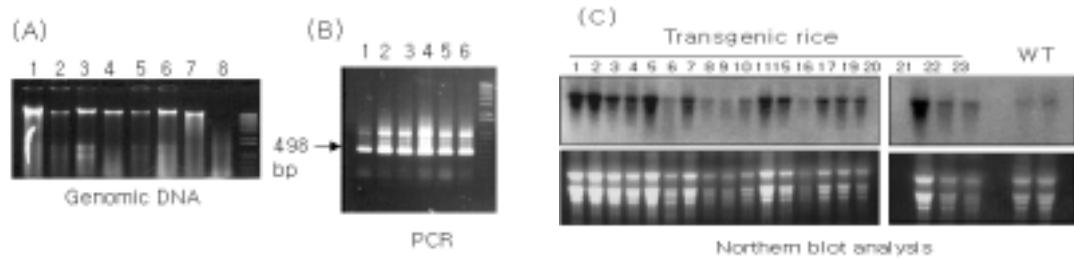
그 결과 OsPK1 과발현 형질전환체 5계통 (2D, 2C, 7B, 13E, 14E)과 중도발현 3계통 (12A, 15D, 16A) 이외에는 OsPK1 유전자 발현이 모두 낮은 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 이와 달리 선발마커 유전자 (hpt)의 경우 모든 형질전환계통에서 발현수준이 높았다 (결과 미제시).



[Figure 3.3.10] Transgene analysis of 35S-OsPK1 Arabidopsis. Total RNAs were isolated from whole T1 seedlings selected in the presence of hygromycin (15 μ g/ml) and Northern blot analysis was performed with 32 P-labelled OsPK1 as a hybridization probe

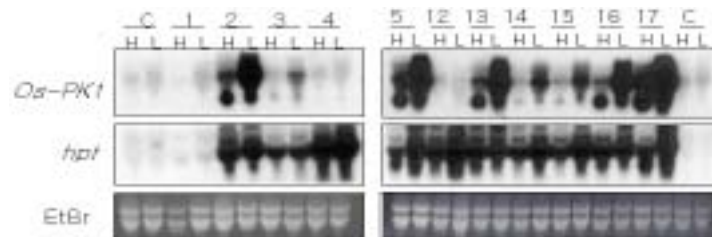
3) 형질전환 벼 생산

pCAMOsPK1 (sense) vector를 포함하는 Agrobacterium (LBA4404)로 낙동벼 캘루스를 형질전환하고, hygromycin 배지에서 T0 세대 19 계통을 온실조건에서 재생하였고 2차년도에 종자를 일부 획득하였다. T0 계통 벼의 잎에서 genomic DNA를 분리하고 intron 부분을 포함하는 PCR primer를 이용하여 실험에 사용한 OsPK1 cDNA가 도입되었음을 확인하였고 (Figure 3.3.11A, B), Northern 분석 결과를 통해 OsPK1 유전자가 과발현되고 있음을 확인하였다 (Figure 3.3.11C). 그 중 OsPK1 유전자 발현 수준이 높고 비교적 획득 종자수가 많은 4계통 (line 4, 8, 19, 23)을 선택하여, hygromycin (30 μ g/ml)을 포함하는 1/2 MSO agar 배지에서 선발한 T1 개체로부터 종자를 다량 수확하였다.



[Figure 3.3.10] Transgene analysis of OsPK1-transformed rice. (A, B) Genomic DNA was isolated from leaves of T0 rice and PCR was performed with OsPK1 specific primer. (C) Total RNAs were isolated and Northern blot analysis was performed with 32P-labelled OsPK1 as a hybridization probe.

또한 2차년도에 pCAMOsPK1 (antisense) 벡터로 벼 캘루스를 형질전환하여 hygromycin (30 µg/ml)에서 선발된 재생 벼 17 계통을 얻고 온실에서 생육하였다. 재생된 벼에서 도입 유전자 발현을 확인하기 위하여 잎 절편을 4 oC와 28 oC에서 24시간 처리 후 RNA를 분리하여 Northern 분석을 수행하였다. Figure 3.3.12에서 보는 것처럼 OsPK1 과 발현 형질전환체와는 달리 (Fig.10), OsPK1 특이적인 작은 크기의 RNA가 생성되는 line (2, 5, 13, 16, 17)이 관찰되었으며 (Fig. 11), 이들 계통에 대한 종자가 증식 단계에 있다.

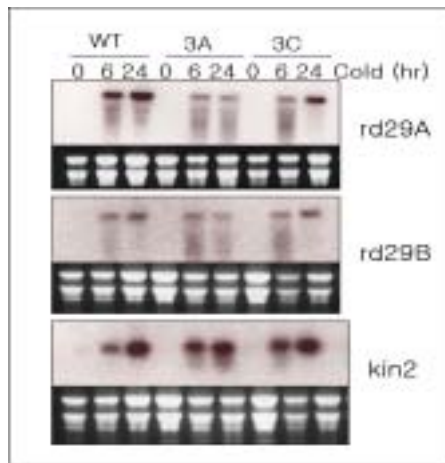


[Figure 3.3.12] Transgene expression in rice transformed with antisense vector for OsPK1 under the control of 35S promoter. Transformants were selected in the presence of hygromycin. Leaf segments from T0 transgenic plants were incubated at 4 oC (L) or 28 oC (H) for 24 h and total RNAs were isolated. RNA blots were hybridized with 32P-labelled double stranded OsPK1 or hpt gene probes, respectively.

마. 35S-OsPK1 애기장대 형질전환체 분석

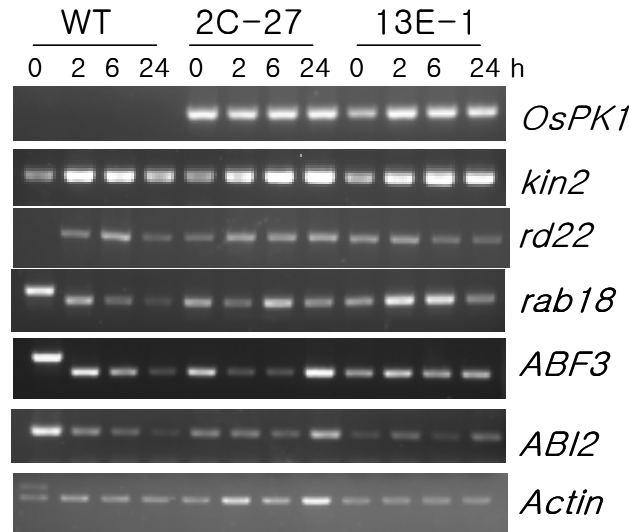
1) 스트레스 마커 유전자 발현분석

OsPK1 유전자가 과발현되었을 때 저온 또는 ABA 신호전달 기구가 어떤 영향을 받는지가 이 연구과제의 중점 탐색목표이다. 1차년도에 선발한 OsPK1 애기장대 형질전환체 homozygous line 2계통을 선택하여, 저온 (4 °C) 처리 후 시간에 따른 스트레스 마커 유전자 발현양상을 wild type과 비교 분석하였다 (Figure 3.3.13). 그 결과 ① 저온 자극을 주지 않은 상태에서 마커유전자 발현유도가 관찰되지 않았으며, ② ABA 신호전달 하위에 있는 것으로 알려진 rd29A와 rd29B 유전자의 발현이 대조구에 비해 약간 감소한 반면, 저온신호 전달 하위 유전자 마커인 kin2의 경우 대조구에 비해 약간 증가한 경향을 보였다. 따라서 OsPK1 유전자가 저온신호전달과 ABA 신호전달에서 상반되는 다중역할을 할 가능성이 추측되며, 다른 SNF1 kinase에서 알려진 것처럼 자극이 주어지지 않은 상태에서는 인산화 기능이 억제되어 있다가, 저온자극에 의해 활성화되어 작용을 나타내는 것이 아닌가 추측된다. 그러나 35S promoter를 사용했음에도 불구하고 본 실험에 사용한 3A와 3C 계통에서 OsPK1 유전자 발현수준이 매우 낮았기 때문에, 본 실험결과에서 뚜렷한 마커유전자 발현의 차이를 관찰하지 못했을 가능성을 배제할 수 없다.



[Figure 3.3.13] Expression of stress marker genes in wild type and transgenic Arabidopsis in response to cold treatment. Three-week old whole plants were transferred to a cold room (4 °C) for the indicated time periods and total RNAs were isolated for Northern blot analysis

따라서 2차년도에 OsPK1 고발현 애기장대 형질전환 계통 (13E, 2C)에 대한 homozygous line을 재선발하여 동일한 실험을 수행하였다. RT-PCR 방법을 이용한 유전자 발현 측정결과 Fig 12와 마찬가지로 형질전환체에서 저온처리에 의한 kin2 유전자 발현이 뚜렷이 증가하였음을 확인하였다 (Figure 3.3.14). 또한 저온처리한 35S-OsPK1 애기장대 형질전환체에서 ABA-inducible 유전자들의 발현이 어떻게 달라지는지를 조사하였다. RT-PCR 결과, 대조구에서는 이들 유전자들의 발현이 저온처리에 의해서 감소하지만 35S-OsPK1 형질전환체에서는 지속적으로 유지되고 있음을 보여준다. 이런 결과는 OsPK1이 ABA 신호전달에 영향을 준다는 것을 시사한다.

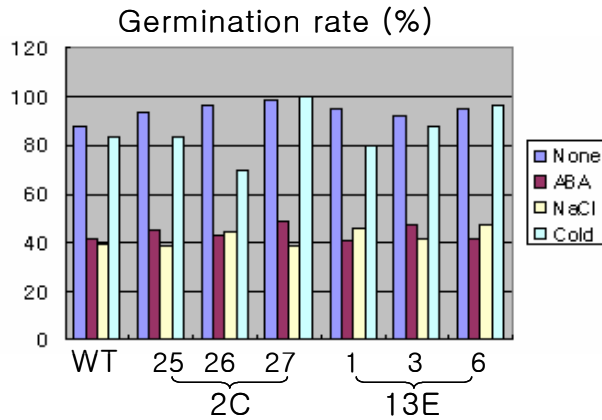


[Figure 3.3.14] RT-PCR analysis of expression pattern of stress and ABA responsive marker genes in wild type and transgenic Arabidopsis in response to cold treatment. Three-week old whole plants were transferred to a cold room (4 °C) for the indicated time periods and total RNAs were isolated for RT-PCR analysis

2) 애기장대 형질전환체의 스트레스 저항성 조사

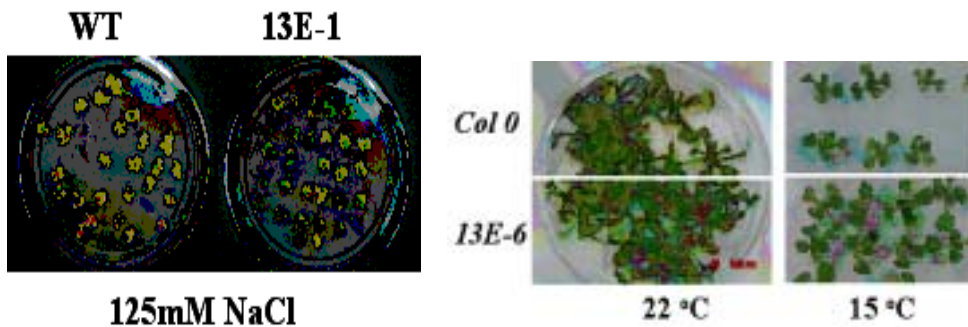
35S-OsPK1 고발현 형질전환계통에서 다양한 스트레스 마커 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였으므로 (Figure 3.3.14), 형질전환체의 스트레스 저항성 및 ABA 반응을 조사하였다. 먼저 저온 및 염스트레스, ABA 조건에서 발아율을 측정한 결과 대조구와 비교해서

큰 차이를 관찰할 수 없었다 (Figure 3.3.15).



[Figure 3.3.15] Effect of salt, cold stress and ABA on seed germination of 35S-OsPK1 transgenic Arabidopsis. Seeds of wild type and transgenic Arabidopsis T2 plants were cold-treated for 3 days after imbibition and germinated on the 1/2 MS0 agar media with 0.75 μ M ABA or 125 mM NaCl at 22 $^{\circ}$ C or 4 $^{\circ}$ C (cold treatment) under the constant light. Germination rate was assayed by the number of seedlings with radicles after ten days.

그러나 발아 후 동일 조건에서 애기장대를 지속적으로 키웠을 때 대조구에 비해 형질전환체의 성장저해 정도가 상대적으로 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 13E 계통의 경우 125 mM NaCl 조건에서 대조구에 비해 잎의 엽록소 분해 및 뿌리생장 저해 등 염스트레스 피해가 적었으며, 15 $^{\circ}$ C에서 성장속도가 빠른 것을 확인하였다 (Figure 3.3.16).



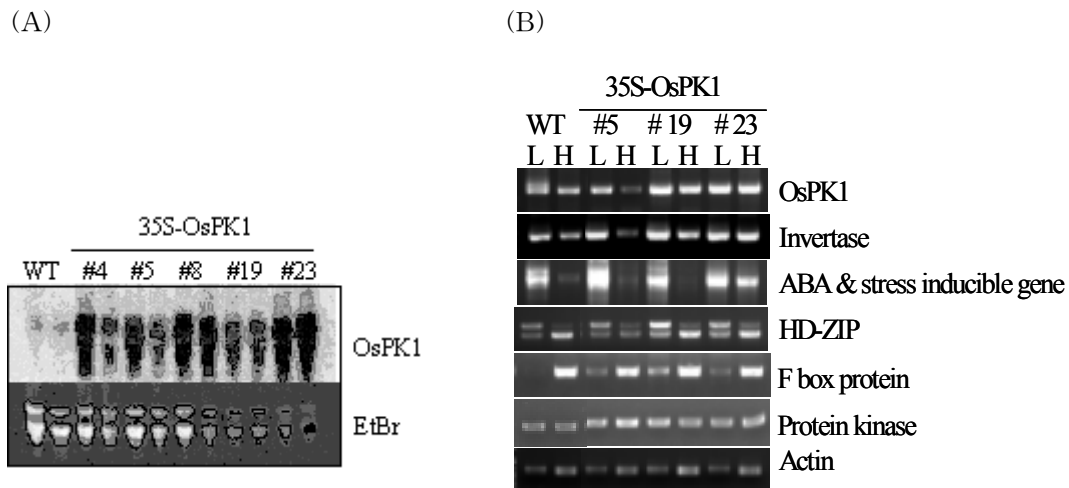
[Figure 3.3.16] Stress tolerance of 35S-OsPK1 transgenic Arabidopsis. Seeds of wild type and transgenic Arabidopsis T2 plants were cold-treated for 3 days after imbibition, germinated and grown on the 1/2 MS0 agar media in the

presence of 125 mM NaCl (A) at 22 oC or 4 oC (cold treatment; B) under the constant light. The photographs were taken on the 24th day.

바. 35S-OsPK1 형질전환 벼 분석

1) RT-PCR에 의한 cold-responsive 유전자의 발현 변이 조사

OsPK1이 안정적으로 과발현되고 있는 형질전환 벼의 T1 homozygous line을 선발하였다 (Figure 3.3.17A). OsPK1의 과발현이 저온스트레스 신호전달에 어떤 영향을 주는지를 규명하기 위하여 온실에서 4주간 키운 형질전환 벼의 잎 절편을 저온처리 (4 °C) 한 후 RNA를 분리하여 RT-PCR로 유전자 발현양상을 조사하였다. 그 결과 저온처리에 의해 발현이 유도되는 두 종류의 마커 유전자 (invertase and ABA/stress related protein) 발현 수준이 대조구에 비해 형질전환체에서 더 높은 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3.3.17B). 또한 DNA chip 분석에서 선발된 두 종류의 유전자 (F box protein, protein kinase)의 경우 역시 형질전환 벼에서 유전자 발현 수준이 높은 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3.3.17B). 이러한 결과는 OsPK1이 저온유도 유전자의 발현에 영향을 준다는 것을 시사한다.



[Figure 3.3.17] Analysis of 35S-OsPK1 transgenic rice. (A) Northern blot analysis of OsPK1 transcript level in transgenic lines of T1 generation. (B) RT-PCR analysis of expression of specific stress marker genes. Leaf

segments from 4-week old transgenic and nontransgenic rice were incubated at 4 °C (L) or 28 °C (H) for 24 h. RNA level was determined by RT-PCR with primer pairs specific to each gene. Rice actin gene was used as a negative control.

2) DNA chip 실험을 통한 OsPK1 과다발현 벼의 유전자 발현 프로파일 분석

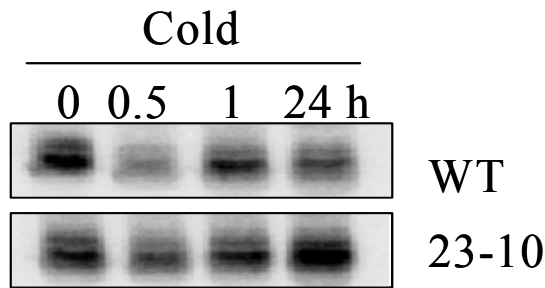
형질전환 벼의 유전자 발현 프로파일을 분석하기 위하여 온실에서 4주간 키운 형질 전환 벼 (# 23, T1)와 동진벼의 잎으로부터 total RNA를 분리하였고, 스트레스 유도발현 유전자가 집적되어 있는 벼 5K cDNA chip (농업생명공학연구원)에 2회 반복 hybridization 한 결과를 분석하여 공통적으로 유전자 발현수준이 2배 이상 차이가 나는 유전자 32 클론을 선별할 수 있었다. 그 중 21 클론은 대조구에 비해 유전자 발현이 증가하였으며, 9 클론은 반대로 유전자 발현이 억제되었다 (Table 3.3.2). 동일한 5K cDNA chip을 이용하여 저온 처리에 의해 변한 유전자 발현양상과 비교하였을 때, 32 클론의 22 %인 7클론의 유전자 발현변이 양상이 일치함을 알 수 있었다 (Table 3.3.2). 이처럼 DNA chip 및 RT-PCR에 의한 유전자 발현 분석은 OsPK1이 과발현된 형질전환 벼에서 저온 반응 유전자 발현 수준이 높다는 사실을 분명히 보여주며, 따라서 OsPK1이 벼에서 저온 신호전달의 positive regulator일 가능성을 강하게 시사해준다.

[Table 3.3.2] List of genes that were regulated in 35S-OsPK1 rice and classification of up- and down-regulated genes.. Rice 5K cDNA chip were hybridized with cy3- and cy5- labeled probe pairs of wild type and 35S-OsPK1 plants. The microarray data were compared with those for cold or salt-regulated genes in wild type plants.

	Gene name	Fold change		Cold-induced changes
		Exp.1	Exp.2	
<p>35S-OsPK1</p> <p>Up-regulated genes (75)</p> <p>35S-OsPK1</p> <p>Down-regulated genes (34)</p>	Putative transcription factor	+2.2	+2.2	up
	Hypothetical protein	+2.3	+2.5	up
	Unknown protein	+2.2	+2.3	
	ACC synthase	+2.8	+2.7	
	Universal stress protein	+2.0	+2.0	up
	Ring finger protein	+2.3	+2.1	
	Copper binding protein	+2.0	+1.9	
	Zinc finger family protein	+2.2	+2.0	
	PSII 10kD protein	+4.3	+5.3	up
	NKP20G04	+2.1	+2.1	
	K23P23G08	+3.4	+3.6	
	Chloroplast 16S	+2.2	+2.2	
	Putative CEO protein	+2.8	+3.1	
	Mitochondrial dicarboxylate carrier	+2.6	+2.8	
	Hypothetical protein	+2.0	+2.0	up
	Phospholipase	+2.3	+2.3	
	Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	-3.0	-2.9	
Xyloglucan endotransglycosylase (XEA)	-2.1	-2.0	down	
CDPK	-2.0	-2.0	down	
Hypothetical protein	-3.0	-2.6		
Proline-rich protein	-2.4	-2.4		
Hypothetical protein	-2.0	-2.0		
Proline-rich protein	-3.1	-3.0		
Kinase	-2.0	-2.1		

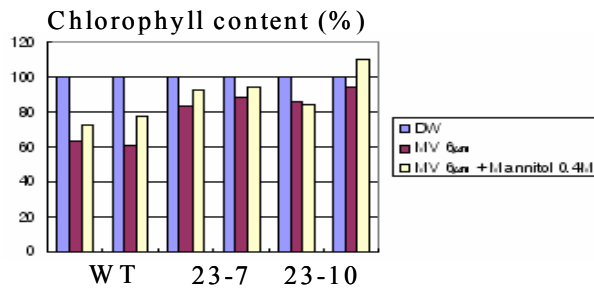
3) 35S-OsPK1 형질전환 벼의 생리 생화학적 분석

형질전환 벼 유묘에서 저온처리에 의한 인산화 활성변화를 in gel kinase assay 방법을 통해 측정하였다. 저온 (4 °C) 처리 후 시간별로 shoot로부터 단백질을 분리하여 histone을 기질로 인산화 활성을 조사한 결과 대조구에 비해 형질전환 벼에서 저온처리후 (24시간) 약 50kD 단백질의 인산화 활성이 더 강한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3.3.18). 이 단백질이 OsPK1인지, 또는 유사한 크기의 다른 인산화효소인지는 규명할 수 없었지만, 최소한 Figure 3.3.18의 결과는 형질전환 벼에서 과발현된 OsPK1이 저온처리에 의해 활성화될 가능성을 시사한다.



[Figure 3.3.18] The effect of cold treatment on the kinase activity in 35S-OsPK1 transgenic rice. Fifteen μg soluble protein extracted from whole rice seedlings of transgenic rice (23-10) were analyzed by in gel kinase assay of histone phosphorylation.

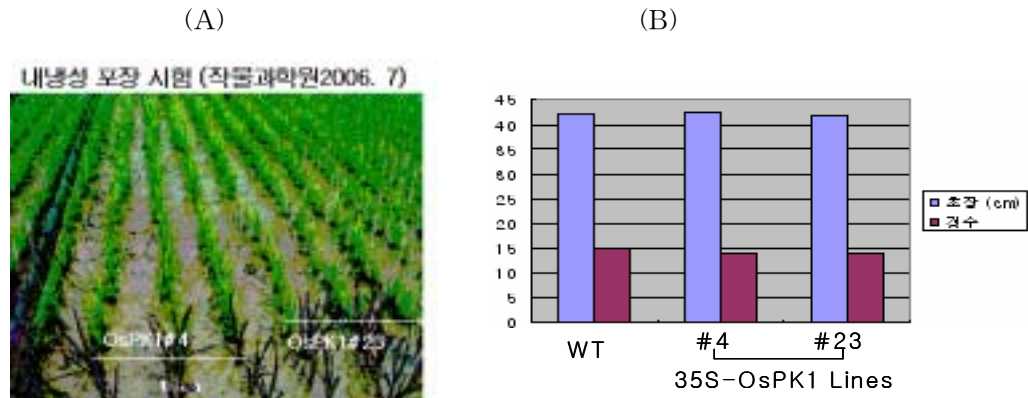
또한 대조구에 비해 형질전환 벼의 잎 절편에서 methyl viologen 처리에 의한 잎 손상이 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 3.3.19). 형질전환 벼의 산화스트레스 저항성 증진은 이 벼가 다른 환경스트레스에 대해서도 저항성을 나타낼 가능성을 제시해준다.



[Figure 3.3.19] Methyl viologen-induced photo oxidative stress tolerance of 35S-OsPK1 transgenic rice. Leaf segments from 4-week-old rice were incubated with 6 μM MV under the continuous light for 24 hr. Chlorophyll content was used as a indicator of photo oxidative damage of the leaf tissues.

최종적으로 OsPK1 과발현 형질전환 벼가 포장조건에서 내냉성을 나타내는지를 검증하기 위하여 2차년도에 증식한 종자를 3차년도 5월에 농촌진흥청 작물과학원 춘천시시험장에 이식하였고 6월 23일에 수온 17도에서 내냉성 검정을 시작하였으므로 (Figure 3.3.20A)

8월중에 영양생장에 대한 내냉성을 나타내는지를 확인할 수 있을 것으로 기대된다. 포장조건에서 형질전환 벼의 초장 및 경수는 대조구에 비해 큰 차이가 없었으므로 (Figure 3.3.20B) OsPK1의 과발현이 생육을 저해하지 않는 것으로 사료된다.



[Figure 3.3.20] (A) 35S-OsPK1 내냉성 포장시험 사진 (B) 저온처리 이전의 생장지표

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	제1세부과제 Genome database를 이용한 cold signaling 관련 벼 유전자 (OCKs)의 분리 및 발현양상 탐구	-애기장대의 CIPK3과 유사한 벼 유전자들의 cloning -벼 genome에 존재하는 OCK 유사 유전자 결정 -Northern과 Promoter 분석을 통한 OCK 유전자들의 발 현부위와 cold stress에 의한 유도 발현성 조사 -선별된 OCK 유전자를 포함하는 식물체 형질전환용 벡 터 개발(overexpression 과 RNAi)
	제1협동과제 확보된 저온 유기 유전자(blti1, blti2)의 호르몬 및 스트레스 특이적 발현 연구와 상호 작용하는 단백질 분리를 통한 기능의 규명	-저온 유도 유전자 조각(blti1, blti3)의 염기서열 확보 -환경요인 및 호르몬 처리에 따른 유전자 발현 변화 분석 -유전자 산물의 세포내 분포 조사 -blti1과 blti3의 상호작용 단백질 분리 -상호작용 후보 단백질들의 <i>in vitro</i> pull-down assay -blti1과 blti3의 bacterial system을 이용한 단백질 확보 -blti1과 blti3 유전자의 homologue를 애기장대로부터 확보
	제2협동과제 OsPK1 형질전환체 생산, Yeast two hybrid 재료 제작 및 ABA 신호전달 전사인자분리	-OsPK1 형질전환 벡터 제작 -애기장대 형질전환 및 형질전환체 선발 -벼 callus 유도, 형질전환 및 재생 -Yeast library 제작 -Library 탐색용 bait plasmid 제작 -DB 탐색 및 specific primer 제작 -RNA 분리 및 RT-PCR, 염기서열 확인
2차 년도 (2004)	제1세부과제 OCK 유전자의 생리·생화학적 특성 과약 및 식물 형질전환체 확보	-Y2H 이용한 OCK와 AtCBL의 상호작용 가능성 탐구 -OCK 단백질을 E.coli에서 과량생산 후 정제 -OCK 단백질의 효소활성 조사 -OCK를 과다 발현 또는 기능이 상실된 벼 또는 애기장 대의 형질전환체 생성
	제1협동과제 단백질 활성 연구 및 형질 전환체 제작·분석	-선별된 유전자의 <i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> 활성 연구 -blti1과 blti3 유전자의 과다발현 모델 식물체와 blti1과 blti2 orthologue의 knock-out 형질전환 모델 식물체 확보 -Arabidopsis 형질전환체들의 분석
	제2협동과제 형질전환체 분석, Yeast two hybrid 탐색, 전사인자 재조합 단백질 생산 및 기질 여부 확인	-도입유전자 발현 조사 및 애기장대 homozygous line 선발 -형질전환 벼 종자 증식 -Yeast 탐색 및 상호작용클론 선발 -전사인자 단백질 분리 및 kinase assay
3차 년도 (2005)	제1세부과제 OCK 단백질과 상호작용하는 단백질 동정과 형질전환체 분석	-OCK 단백질과 상호작용하는 새로운 단백질의 발굴 -형질전환체의 저온 신호전달 체계의 변화를 조사 -형질전환체의 성장 및 성장발달과정, 그리고 cold를 포 합하는 각종 환경스트레스에 대한 저항성을 wildtype과 비교
	제1협동과제 형질전환 식물체 분석과 저온 대사경로 최종 분석	-형질전환 식물체들의 성장과 발육 분석 -형질전환체들의 환경 및 호르몬에 의한 생리생화학적 변화 비교·분석 -벼에서의 발현시스템 및 경로 연구
	제2협동과제 OsPK1 형질전환체 표현형 및 분자생물학적 특성 조사, OsPK1 상호작용인자 분석	-분자생물학적 표지인자 분리 (RD22, RD29, KIN 등) -형질전환체 RNA 분리 및 표지유전자 발현 분석 -형질전환체의 환경저항성 조사 -Yeast plasmid 분리, 염기서열 분석 및 DB 조사

2. 평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도		
	착안사항	척도(점수)	
1차 년도 (2003)	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ full-length OCK cDNA의 확보 ○ Genomic Southern ○ OCK 유전자의 발현양상 확인 ○ 식물형질전환용 벡터 개발 	35
	협동1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 확보된 유전자들의 유전자 발현 및 활성의 변화 분석 ○ 선별 유전자들을 bait로 하는 yeast two-hybrid 수행 ○ 선별 유전자들의 발현산물 확보 및 세포내 분포 분석 	35
	협동2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 벡터 제작 및 형질전환체 생산 (아기장대, 벼) ○ Yeast two hybrid screen 재료제작 ○ ABA 신호전달 전사인자 유전자 분리 	30
2차 년도 (2004)	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ Yeast-two hybrid 분석 ○ OCK 단백질의 과량생산 및 생화학적 연구 ○ 아기장대 또는 벼의 형질전환체 획득 	35
	협동1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 단백질들의 <i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> 활성 연구 ○ Arabidopsis mutants 분리진행 ○ 형질전환체들의 성장과 발육 분석 	30
	협동2	<ul style="list-style-type: none"> ○ OsPK1 형질전환체 (아기장대, 벼) 분석 ○ Yeast Library 탐색에 의한 상호작용 유전자 분리 ○ 전사인자 재조합 단백질 생산 및 <i>in vitro</i> 인산화 조사 ○ 형질전환 벼 종자 증식 	35
3차 년도 (2005)	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ OCK의 기질 단백질의 동정 ○ OCK 형질전환체의 저온 신호전달 체계의 조사 ○ 형질전환체들의 성장발달과정, 내냉성 조사 	30
	협동1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환체들의 환경 및 호르몬에 의한 생리생화학적 변화 분석 ○ 벼에서의 발현시스템 및 경로 연구 	35
	협동2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환벼 유전분석 ○ OsPK1 상호작용 유전자 분석 ○ 형질전환벼 환경저항성 분석 	35
최종 평가	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ Full-length OCK cDNA의 확보 ○ OCK 유전자의 발현양상 조사 및 생화학적 특성 조사 ○ OCK와 상호작용하는 단백질의 동정 ○ 형질전환체 획득 ○ 형질전환체의 분석 (내냉성 등) 	34
	협동1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 확보된 저온 유기 유전자(blt1, blt3)의 기능규명 ○ 단백질 활성 연구 및 형질 전환체 제작·분석 ○ 형질전환 식물체 분석과 저온 대사경로 최종 분석 	33
	협동2	<ul style="list-style-type: none"> ○ OsPK1 형질전환체 생산 ○ OsPK1 상호작용 유전자 분리 ○ 형질전환체 분석 (내냉성, ABA 신호전달 유도성 등) ○ 전사인자 유전자 분리 및 OsPK1 기질 여부 확인 	33

3. 목표의 달성도

가. 저온 스트레스 신호전달과 관련된 유전자 확보 및 기능규명

애기장대에서 저온 스트레스 신호전달 유전자로 이미 알려진 CIPK3 유사 유전자들을 full-length cDNA들을 RT-PCR, RACE 그리고 cDNA library screening 등의 기술을 이용하여 벼로부터 분리하였고, 이 벼로부터 확보된 OCK 유전자들이 애기장대 CBL 단백질들과의 상호작용을 하며 상호작용에 특이성을 가진다는 사실을 yeast-two hybrid system을 이용하여 밝혀냈다. 정제된 OCK 단백질이 인산화효소임을 kinase assay를 수행하여 규명하였으며, 이 유전자들의 발현양상이 저온 스트레스 신호전달과 밀접하게 연관되어있음을 규명하였다.

저온에 강한 겨울보리와 저온순화 능력을 가지고 있는 Arabidopsis에 저온처리를 가하여 저온 스트레스 신호전달에 관련된 유전자들의 발현이 유도된 식물체에서 Suppression Subtractive Hybridization (SSH), Mirror Orientation Selection (ODD), Normalized Library Expressed Sequences Tag (nlEST) 기법들을 사용하여 저온 스트레스 신호전달에 관련될 것으로 생각되는 유전자들을 580개를 획득하였다. 확보된 유전자들은 모두 GenBank database에 유전자원으로 등록하였다. 그리고 이 확보된 유전자들 northern hybridization과 quantitative RT-PCR 기법으로 발현양상을 정확히 규명하였고, 저온스트레스에 의하여 유도되는 유전자들을 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 기법으로 full-length의 cDNA를 확보하였다. 확보된 이들 유전자들의 정확한 생리·생화학적인 기능을 규명하기 위하여 담배와 Arabidopsis를 model plant로 이용하여 형질전환 한 후, 저온저항성 기작과 생체 내에서의 기능을 살펴보았다.

OsPK1이 bZIP 계열 ABA 신호전달 관련 전사인자 단백질의 C 말단 부분을 특이적으로 인산화시킨다는 사실을 규명하였고, Yeast two hybrid screening을 통해 OsPK1의 regulatory domain과 상호작용하는 후보유전자 73 클론을 선발, 분석하였으며 35S-OsPK1 형질전환체 (애기장대, 벼)를 각각 생산하였다. 35S-OsPK1 애기장대 homozygous line을 일차 선발하였으나 OsPK1 유전자 발현수준이 매우 낮았다. 그러나 저온스트레스 마커 유전자인 kin2의 발현이 증가한 반면, ABA 신호전달 마커 유전자인rd22 및 rd29의 발현이 감소하는 경향을 확인하였다. OsPK1 발현수준이 높은 heterozygous line에서 종자발아에 대한 ABA 반응이 일부 감소하는 결과를 얻었으며, 35S-OsPK1 형질전환 벼의 유전자 발현양상을 5K cDNA Chip을 이용하여 분석한 결과 최소한 7종의 저온관련 유전자발현이 OsPK1과

연관되어 있음을 알았다. 이처럼 형질전환 애기장대와 벼에서 공통적으로 얻은 결과는 OsPK1이 저온신호전달의 positive regulator로 작용할 가능성을 시사한다. 또한 Y2H 탐색에서 선발된 유전자가 OsPK1의 표적 단백질인지를 조사하기 위해 전사인자 등 일부 상호작용 유전자에 대한 GST-fusion recombinant 단백질을 생산하였고 35S-OsPK1 형질전환 벼의 유전자 발현 수준을 조사하고 OsPK1 발현수준이 높은 homozygous line 종자를 대량 증식하였다. 35S-OsPK1 애기장대 중에서 OsPK1 발현 수준이 높은 homozygous line을 재 선발하여 스트레스 마커 유전자 발현을 조사한 결과 대조구에 비해 kin2 유전자 발현이 증가하는 것을 재확인하였고 저온 처리에 따른 ABF, ABI2 등 ABA 신호전달 관련 마커 유전자 발현양상이 차이가 있음을 규명하였다. 애기장대 형질전환체의 스트레스 저항성 검정을 수행한 결과 저온 또는 염 스트레스 조건에서 종자 발아율은 차이가 없었으나 동일 스트레스 조건에서 발아 후 생장 저해 정도가 대조구에 비해 감소하였음을 확인하였다. RT-PCR 방법을 통해 35S-OsPK1 형질전환 벼에서 invertase, HD-ZIP 등 일부 저온 관련 유전자들의 발현이 뚜렷이 증가하였음을 규명하였고, in gel kinase assay를 통해 형질전환 벼에서 저온 스트레스에 의한 인산화 활성이 대조구에 비해 더 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 이런 결과는 OsPK1이 cold signal에 의해 활성화 될 가능성을 시사한다. 형질전환 벼의 스트레스 저항성을 조사하기 위하여 먼저 paraquat (methyl viologen)에 의한 잎의 손상도를 측정한 결과 형질전환 벼의 산화스트레스 저항성이 증가하였음을 확인하였다.

따라서 앞서 설명한 바와 같이 결과적으로 대량의 저온 스트레스 신호전달 관련 유전자들을 성공적으로 확보하였고, 그 기능이 저온 스트레스 신호전달과 관련되어 있음을 분자생물학적·생화학적 방법을 이용하여 확실하게 증명하였다고 할 수 있다.

나. 형질전환을 통한 저온 스트레스 저항성 벼 개발을 위한 가능성 탐구

과제 수행에서 기능이 규명된 유전자들이 3년차에 모두 벼에 형질전환되어 현재 저온에서의 반응을 규명하기 위한 단계에 와있다. 제 1 세부과제에서는 OBL 유전자를, 제 1 협동과제에서는 AtCBG 유전자를, 제 2 협동과제에서는 OcPK1 유전자를 도입한 벼 형질전환체가 제작되었다. 따라서 저온저항성을 조절해 주는 유전자를 아열대 식물이자 우리나라의 주작물인 벼에 도입하여 저온저항성이 높은 벼품종 육성에 필요한 모본의 창성이 가능한지에 대한 가능성 검정 연구를 성공적으로 수행하였다고 할 수 있다.

4. 관련분야에의 기여도

저온 스트레스는 작물의 생산성을 저하시키는 주요 환경요인 중에 하나이다. 따라서 선진국을 중심으로 많은 나라들이 환경재해에 저항성을 나타내는 품종을 개발하고자 저온 등 각종 스트레스에 관련된 유용 유전자의 발굴 및 분자유종에 많은 연구를 하고 있다. 최근에 완료된 애기장대(Arabidopsis)와 벼(rice)의 Genome Sequencing Project는 세계화 시대와 맞물려 이와 같은 연구추세를 더욱 가속화 하고 있다. 새로이 개발된 품종은 농작물 특히로 등록될 수 있으므로 이 분야의 국제경쟁은 앞으로 대단히 치열할 것으로 전망된다. 한편, 내냉성 작물의 개발은 미국 및 중국 등 으로부터 수입되는 값싼 농산물(특히 쌀)로부터 우리나라의 농업을 지키기 위해 필요한 농업의 생산성을 향상을 도모하게 될 것이다. 따라서 성공적으로 이루어진 본 과제의 수행결과는 저온을 포함하는 환경 스트레스 신호전달 연구의 선두에 있는 것으로서 외국으로부터 기술도입을 할 필요가 없다고 판단된다. 그러므로 본 연구팀에 의하여 새로이 발견된 식물의 저온 신호전달에 관여하는 유전자 특히 출원 및 licensing을 통해 royalty수입도 기대할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기술적 측면

저온스트레스관련 유용유전자 분리 기술, 신호전달체계분석 기술 및 이를 이용한 환경스트레스내성 품종 실용화 기술 등 첨단 생명공학 기술이 확보되었다. 따라서 이러한 기술을 분자유종 적용하여 새로운 품종개발에 이용할 수 있을 것이다. 특히 이들 기술은 원천 기초 지식과 응용으로 이루어진 일련의 기술로 기초연구 결과가 산업적으로 실용화되는 전형적인 모형이 되어 국내 관련분야 학문연구에 이용이 가능하다.

유용유전자를 확보하기 위한 기술의 개발은 별다른 사회, 경제적인 부작용이 없는 생명과학의 기반기술이다. 특히 전사조절인자의 경우 기능이 서로 관련된 일군의 유전자를 일괄적으로 조절하는 기능을 갖고 있기 때문에 전사인자의 조작은 곧 다수 유전자의 조작과 같은 효과를 가진다. 이를 이용하여 하나의 유전자를 이용하여 여러 가지 유전자를 한 번에 조절하는 연구에 활용할 수 있다.

2. 경제 · 산업적 측면

생명공학 산업은 20세기의 노동과 자본 집약적 산업의 한계를 극복할 수 있는 새로운 지식 산업이다. 또한 기술 두뇌 집약적 산업이고, 환경 친화적이며 에너지 절약형 산업이며, 사회복지 욕구 증대에 따라 지속 성장이 가능한 신세기 산업이다. 따라서 Cold stress 신호 전달에 관련된 유전자를 분리하여 확보하였기 때문에 이들 유전자들은 국제적으로 특허가 인정되며, 이들 유전자를 활용하여 분자유종된 새로운 저항성 농작물 또한 국제특허가 가능하다. 형질전환에 의한 cold stress에 강한 벼모본 개발이 성공할 경우 이는 산업적으로 극히 열악한 환경에 있는 종묘 산업에 바로 활용할 수 있다.

자연재해의 경우 오랜 가뭄 또는 갑작스러운 냉해 등과 같이 미리 예측하기 어려운 경우가 대부분이고, 이에 의한 농산물 가격폭등으로 인한 전반적인 물가상승 등 경제적인 손실이 막대하다. 따라서 자연재해 내성 작물을 개발하는 것이 고품질의 농작물생산 뿐만 아니라 경제적인 측면에서도 상당히 중요하다. 그러므로 본 연구의 결과는 농업생산에 활용되어 농업이 고부가가치의 산업으로 육성될 수 있도록 하여 줄 것이다.

3. 그 밖의 활용방안

Cold 스트레스반응 기작에 관한 국제 논문 발표에 연구결과가 활용될 것이다. 그리고

cold 스트레스반응 관련 유전자 및 promoter는 특허출원에 활용될 것이다.

4. 추가연구의 필요성

본 연구에서 얻어진 저온 스트레스 신호전달 유전자는 3년간의 연구를 통하여 기능이 충분히 규명되었다. 이들은 생육연한이 짧은 모델식물체에서 저온 스트레스에서의 기능 관찰이 이루어 상태이다. 따라서 궁극적인 연구의 목표로 삼았던 저온 스트레스 저항성 작물의 모본 육성이 성공할지는 알 수가 없는 상황이다. 우리나라의 주작물인 벼의 저온저항성 품종개발을 위한 모본육성을 위해서는 2년 정도의 연구기간가 더 필요하다고 생각한다. 그 이유는 벼의 경우 형질전환체를 만들고 도입된 유전자를 확인하고, 그 유전자에 의한 표현형적 효과를 확인하기까지 생육연한이 짧은 모델 식물체들 보다 긴 연구기간이 필요하기 때문이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

식물의 환경스트레스 신호전달에서 칼슘은 주요 신호전달 물질로서 스트레스에 반응해서 세포내 농도가 올라가며 이 과정은 일부 스트레스 유도 유전자의 발현에 필수적이라 알려져 있다 (Knight et al., 1996; Sheen 1996). 그리고 칼슘은 다양한 칼슘센서단백질과 상호작용을 통해 스트레스 신호를 전달하여 생리반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 식물에서 지금까지 잘 알려져 있는 칼슘센서는 calmodulin, CDPK 등으로 칼슘과 결합하여 다양한 target protein의 활성을 조절한다 (Zielinski 1998). Calcineurin B like protein (CBL)은 최근 아기장대에서 분리된 칼슘센서단백질의 일종으로 small gene family를 구성하고 있으며 (Kudla et al., 1999), knock out mutant나 과다발현 형질전환체 연구를 통해 식물의 염 스트레스 저항성 (AtCBL4) 및 저온 스트레스 반응 (AtCBL1)을 매개하는 중요한 신호전달 분자임이 밝혀졌다 (Liu and Zhu, 1998; Albrecht et al., 2003). CBL 자체는 효소활성이 없으나 yeast two hybrid 탐색을 통해 CIPK (CBL-interacting protein kinase)/SIP (SOS3 interacting protein kinase)라는 SNF1 계열의 특정 protein kinase와 결합하며, 일부의 경우 kinase 활성을 촉진한다는 사실이 밝혀졌다 (Shi et al., 1999; Halfer et al., 2000). 특히 CBL과 마찬가지로 일부 CIPK 역시 염 및 저온스트레스 신호전달에 중요한 기능을 수행한다는 사실도 알려졌다 (Liu et al., 2000; Gong et al., 2002; Kim et al., 2003). 따라서 상기 연구보고들에 근거할 때, 아기장대에서 밝혀진 CBL/CIPK 칼슘 신호전달 기구의 주요 기능이 식물의 스트레스 반응과 관련되어 있으며, 이를 이용한 스트레스 저항성 식물 생산에 유용 가치가 큰 것으로 판단된다. 지금까지 환경저항성 작물개발은 주로 하위단계의 스트레스 반응 유전자 또는 이를 조절하는 전사인자 (CBF, ABF, EREBP)를 중심으로 시도되었으나 (Kang et al., 2002; Haake et al., 2002; Park et al., 2001) 최근에는 CaM이나 CDPK 등 상위 칼슘센서유전자 조작을 통해 광범위한 환경스트레스 조절이 가능하다는 사실이 밝혀졌다 (Saijo et al., 2000; Cheng et al., 2002). 따라서 각 칼슘센서 신호전달기구를 구성하는 중점 유전자의 분리 및 상호작용 연구가 진행중이며, 이 유전자들이 식물의 스트레스 저항성 조절에 유용가치가 있는지 연구되는 추세이다.

제 7 장 참고문헌

- Bartels D., Schneider K., Terstanppen G., Piatkowski, D. and Salamini, F. (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineium*. *Planta* 181, 27-34
- Bartels, D., and Nelson, D. (1994) Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics, *Plant, Cell and Environment* 17, 659-667
- Bohnert, H., Nelson, D., and Jensen, R. (1995) Adaptations to Environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111
- Bonetta, D., and P. McCourt, Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science*, 1998. 3(6). 231-235.
- Booth, J.R., Cairney, J., Sutherland, E., and Higgins, C.F. (1988) Enteric bacteria and osmotic stress : an integrated homeostatic system. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 355-495
- Boyer, J. S. (1982) Plant productivity and environment *Science* 218, 443-448
- Capel et al. (1998) Low temperature regulates Arabidopsis *Lhcb* gene expression in a light-independent manner, *The Plant Journal* 13, 411-418
- Covic, L., N.F. Silva, and R.R. Lew, Functional characterization of ARAKIN (ATMEKK1): a possible mediator in an osmotic stress response pathway in higher plants. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1999. 1451(2-3). 242-54
- Chuang, C.-F. and Meyerowitz E. M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4985-4990
- Ebinuma et al, (1998) Development of new transformation methods (MAT VECTORS SYSTEM) using oncogenes of *agrobacterium* (IPT, ROL ABC), The 12th Symposium on Plant Biotechnology 12, 27-37
- Gilmour S.J., Seboit AM., Salazar MP., Everard, J.D. and Thomashaw MF (2000) Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcription activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation *Plant Physiol.* 124, 1854-1865
- Graham, D., and Patterson, B. D. (1982) Response of plants to low, nonfreezing

- temperatures : proteins, metabolism, and acclimation.. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 347-372
- Hojoung Lee, Liming Xiong, Manabu Ishitani, Becky Stevenson and Jian-kang Zhu, (1999) Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* mutant, *The Plant Journal*, 17(3): 301-308
- Hong S.W.; Jon J.H.; Kwak J.M. and Nam H.G. (1997) Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113: 1203-12
- Ishitani, M., et al., Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, 1997. 9(11). 1935-49
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O. and Thomashaw (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhance freezing tolerance. *Science* 280, 104-106
- Juan Capel, Jose A.Jarillo, Francisco Madueno, Maria J.Jorquera, Jose M.Martinez-Zapater and Julio Salinas, (1998) Low temperature regulates *Arabidopsis* Lhcb gene expression in a light-independent manner, *The Plant Journal*, 13(3):411-418
- Kiegle, E., et al., Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant Journal*, 2000. 23(2). 267-278
- Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the AUX/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11786-11791
- Kim, K.-N., Cheong, Y.H., Gupta, R., and Luan, S. (2000). Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol.* 124, 1844-1853
- Kim, K.-N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., and Luan, S. (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(2).
- Kim, K.-N., Shi, J., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S., and Kudla, J. (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2393-2405

- Kodama, J., Hamada, T., Horiguchi, G., Vishimura, M., and Iba, K. (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast Δ^3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant physiol.* 105, 601-605
- Lee, H., Xiong, L., Gong, Z., Ishitani, M., Stevenson, B., and Zhu J.K. (2001) The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a ring finger protein that display cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.* 15, 912-924
- Lee JH, Van Montagu M, Verbruggen N. A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999, May 11 96:10 5873-5877
- Manabu Ishitani, Liming Xiong, Hojoung Lee, Becky stevenson, and Jian-kang Zhu, (1998) HOS1,a Genetic Locus involved in Cold-Responsive Gene Expression in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 10: 1151-1161
- Michael F.Thomashow (1998) Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance, *Plant physiol*, 118:1-7
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki,K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 765-769
- Naot, D., Ben-Hayyim, G., Eshdat, Y., and Holland, D. (1995) Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis *Lea5* gene. *Plant Molecular Biology* 27, 619-622
- Pardo JM, Reddy MP, Yang S, Maggio A, Huh GH, Matsumoto T, Coca MA, Paino-D'Urzo M, Koiwa H, Yun DJ, Watad AA, Bressan RA, Hasegawa PM. Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates saltadaptation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, Aug 4 95:16 9681-9686
- Qing L., Mie kasuga, Yoh S., Hiroshi A., Setsuko M., Kazuko Y-S., and Kazuo S. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA

- binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10, 1391-1406
- Savoure A.; Hua X. J.; Bertauche N.; Van Montagu M. and Verbruggen N. (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 254: 104-109
- Shinwari, Z.K., et al., An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. 250(1):161-170
- Straub, P. F., Shen, Q., and Ho, T. H. D., (1994) Structure and promoter analysis of ABA- and stress-regulated barley gene, *HVY1*. *Plant Molecular Biology* 26, 617-630
- Tamminen, I., et al., Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2001. 25(1), 1-8
- Thomashow, M.F., Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999. 50. 571-99
- Zhu, J.K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion Plant Biol.* 4, 401-406

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.