

최 중  
연구보고서

생물성 스트레스 관련 단백질-10(PR-10 proteins)  
의 기능 연구 및 저항성 벼 개발에 관한 연구

Functional study and development transgenic  
plants for stress related protein-10

주관연구기관 : 경상대학교

세부(협동)연구기관 : 명지대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생물성 스트레스 관련 단백질-10(PR-10 proteins)의 기능 연구 및 저항성 벼 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 강 규 영

세부연구책임자 :

연 구 원 : 김선태

연 구 원 : 김상곤

연 구 원 : 왕일명

협동연구기관명 : 명지대학교

협동연구책임자 : 김 주 곤

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

# 요 약 문

## I. 제 목

생물성 스트레스 관련 단백질-10(PR-10 proteins)의 기능 연구 및 저항성 벼 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목적

- 1) PBZ isoforms/인산화 각 단백질의 생산과 활성 차이 규명
- 2) PR-10 유전자 및 단백질과 상호 반응 하는 단백질 분리 및 특성 연구
- 3) 형질 전환체 작물의 세포 사멸을 방지하는 유전자 분리
- 4) 생물성 스트레스 관련 유전자(PR-10 family) 벼 프로모터 개발 및 분석
- 5) 생물성 스트레스 관련 유전자 대량 발현 및 RNAi 형질 전환체 개발 및 분석
- 6) 생물성 스트레스 관련 유전자 와 *in planta* 결합 유전자 상호 작용 분석

### 2. 필요성

생체는 주위환경과 끊임없이 물질을 교환하며 환경에 반응하여 적응함으로써 생체를 유지하고 있다. 특히 병충해와 같은 생물적 스트레스에 노출되었을 때 생체의 항상성을 유지하기 위하여 여러 가지 기작을 가지고 있다. 이러한 다양한 환경스트레스에 반응하기 위해서는 스트레스를 인지할 수 있는 시스템 즉 특정 수용체, 신호전달시스템이 존재하여야 하며, 전달된 신호에 의해 특정 유전자의 전사를 조절하는 전사조절시스템이 작용하여야 한다. 이러한 요소들이 전체적인 상호작용 network에 의해서 연결되어 작용하고 있다. 따라서 생체가 어떻게 외부의 환경스트레스를 인식하고, 이렇게 인식된 신호를 전달하여 스트레스 관련 유전자들을 발현시키는가, 그리고 더 나아가서 이렇게 발현된 스트레스 방어/극복 관련 단백질들이 어떻게 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는가 하는 일련의 관련 기작에 대한 연구는 환경스트레스에 대한 생체의 방어/극복 기작을 통괄적으로 이해하게하고 또한 더 나아가 스트레스 반응을 조절할 수 있는 신물질 개발 연구에 기초가 될 수 있다. 그러므로 이러한 환경스트레스에 대한 반응기작의 이해를 위해 통괄적인 분자수준에서의 연구가 필요하며 이를 위한 가장 효과적이고 직접적인 방법은 이들 관련 단백질과 단백질 간의 상호작용을 생화학적, 생물리학적 연구 방법을 통하여 분자수준에서 밝힘으로써 병 저항성 연구에 초석을 다지고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서 PBZ1 과 OsPR-10 단백질에 대하여 더 깊이 있는 연구를 수행하였다. PBZ1 과 OsPR-10 단백질은 병원성 관련 단백질 10 (pathogenesis-related PR-10)의 일종인 단백질로써 지금까지 많은 종류의 PR-10들이 보고 되어지고 있고, 일부 식물에서 예로 RNA 분해효소(RNase) 활성이 있는 것으로 보고되어졌으며, 이들 단백질은 주로 외부의 자극에 대한 방어 작용뿐만이 아니라 식물의 분화발달에도 상당히 관여하는 것으로 알려지고 있다. 하지만 구체적으로 그 정확한 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. 재조합 단백질로 실제로 PR-10 단백질인 PBZ1 와 OsPR-10이 RNase 활성이 있는지를 생화학적 방법으로 확인하였다. 발현 양상은 programmed cell death (PCD)된 조직에서 단백질의 위치를 보였고, 대부분의 경우 PBZ1의 발현은 식물의 세포사멸과 연결되어서 발현된다는 사실을 웨스턴 분석과 immunolocalization을 통해서 알 수 있었는데 그 발현의 양상이 식물의 programmed cell death (PCD) 와 상당히 일치된다는 사실을 알 수 있었다. 그 결과 정확히 PBZ1의 발현이 노화된 잎과 mutants에서 동시에 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

PBZ1 이 실제로 세포 사멸을 일으키는지 알아보기 위해서 정제된 PBZ1 isoforms들을 분리하여 담배 잎과 벼 현탁 배양 세포에 처리 했을 때도 세포 사멸을 유도하는 사실을 알 수 있었으며 PBZ1이 처리된 세포는 뚜렷한 과민 반응을 보였다. Arabidopsis에 DEX inducible PBZ1 형질전환체와 벼 PBZ1 promoter 형질전환체 개발을 통하여 PBZ1이 세포사멸과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. 지금까지의 PCD을 일으키는 단백질은 주로 단백질분해 효소와 DNA 분해효소 등이었는데, 최근에 RNase도 세포사멸을 일으키는 인자로 밝혀졌다. 그렇지만 실제로 PBZ1가 RNase 의 활성을 가진다고 해서 직접적으로 세포사멸을 일으킨다는 뚜렷한 증거를 생체실험에서 조사하지 못했다. PBZ1의 세포 사멸이 RNase 에 의한 것인지 더 연구가 필요하다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

PR-10, PBZ단백질의 기능의 일부를 밝혔으나 아직 differential하게 발현되는 isoform 각각의 역할, phosphorylation 여부와 활성의 차이, 발현위치와 시기의 차이, RNase 활성의 차이, 이들 단백질과 상호작용 할 수 있는 단백질 존재여부 및 기능, 유전자의 발현 조절 인자에 관한 연구, 형질 전환체 식물의 세포사멸을 회복시키는 인자 연구 등 풀어야할 숙제가 아주 많아 체계적인 연구의 수행이 절실하다고 본다.

## SUMMARY

In rice, it was reported that transcription of PBZ1 and OsPR-10 is induced after treatment with probenazole (3-allyloxy-1, 2-benzisothiazole-1,1-dioxide) or jasmonic acid (JA) in rice leaf, implying that PBZ1 and OsPR-10 may be involved in the defense response to rice blast fungus attack. Although the rice PR-10 protein family has been well characterized to possess ribonuclease (RNase) activity in other plants, in essence its biological function(s) remains unknown. In this project, we investigated detailed experiments on PBZ1 and OsPR-10 to determine their precise cellular localization and biological function.

PBZ1 is induced in plant tissues under the hypersensitive response (HR) that are present in lesion mimic mutants (Spl1 and 2). To verify whether PBZ1 is highly expressed in the tissues undergoing programmed cell death in rice, we used both transgenic promoter fused with GFP lines and immunolocalization.

The localization of PBZ1 was closely correlated with several developmental events associated with programmed cell death (PCD) such as HR, senescence, root aerenchyma cell, root cap, and seed aleurone layer.

To elucidate more PBZ1 expression pattern, we generated transgenic plant harboring PBZ1 promoter (1500 bp) fused with sGFP report gene in rice using *Agrobacterium* mediated transformation and characterized its promoter. T2 transgenic plants harboring PBZ promoter demonstrated that the promoter was elicited in leaves by rice blast fungus. This result was in agreement with previous immunolocalization data of PBZ1.

TUNEL that is typical hallmarks of PCD was employed to establish whether nuclear DNA fragmentation occurs in seed aleurone layer. DNA fragmentation was detected in seed aleurone layer after germination at both 2 and 3 days, as indicated by incorporation of digoxigenin-labeled dUTP. There was no evidence of digoxigenin incorporation in imbibition seeds.

To verify whether PBZ1 indeed induces cell death, we generated *Arabidopsis* transgenic plants harboring PBZ1 under the control of the glucocorticoid promoter (Kawai-Yamada et al., 2001) that is induced by DEX solution (20  $\mu$ M). Cell death after treatment of DEX was measured by staining with trypan blue, which is an indicator for cell death. Dex was infiltrated in *Arabidopsis* leaf at concentrations with 25  $\mu$ M. The RNA and protein level of PBZ1 in the transgenic lines following induction with DEX was investigated. We also determined, using recombinant proteins, that PBZ1 possess ribonuclease (RNase) activity *in vitro*. These results strongly suggest that PBZ play an important role in rice cell death carrying a biochemical function of RNase activity during PCD.

We previously reported that rice blast fungus or jasmonic acid induced the expression of rice pathogenesis-related class 10 (OsPR-10) proteins. However, no further

studies have been done to examine the expression, localization, and enzymatic activity of this protein in either developmental tissues or in tissues under abiotic stress conditions. In this study, rice OsPR-10 was examined by Western blot analysis, immunolocalization, and biochemical assays.

Western blots revealed that the OsPR-10 protein was expressed in developmental tissues, including the flower and root, and was induced by biotic stresses in the lesion mimic mutants, *sp11* and *2*. The protein was also expressed during abiotic stresses, such as during leaf senescence, leaf wounding, cold, and drought. Using immunochemical techniques, we determined that OsPR-10 was localized to the palea of flower and in the exodermis and inner part of the endodermis of the root. Furthermore, using recombinant and native proteins, we demonstrated that OsPR-10 exhibits RNase activity. The RNase activity was abolished after treatment with DTT in an in-gel assay. To test this we created OsPR-10 mutant proteins containing serine substitutions of amino acids C81S, C83S, or both and examined their RNase activities. The activity of the C83S mutant was decreased in the in-gel assay compared to the wild type. Taken together, we hypothesize that the OsPR-10 protein possesses RNase activity that is dependent on intramolecular disulfide bonds or dimer formation, and that it might play a role in constitutive self-defense mechanisms in plants against biotic and abiotic stresses.

Taken together, Western blot, immunohistochemistry, and promoter analyses clearly show that the PBZ1 protein is tightly associated with several plant cell death processes. These include rice leaf inoculated with rice blast fungus, lesion mimic mutants, and all the developmental tissues in which PCD is pronounced. However, further investigations will be required to elucidate the timing and mechanisms by which these proteins are involved in pathogen interactions and PCD events. Also, evidence for the role of PBZ1 as RNase activities and its functional relevance for plant cell death or defense responses remain to be elucidated.

# CONTENTS

Part 1 Outline of Research Program-----	7
Part 2 Current Status of This Research Program-----	8
Part 3 Results and Contents-----	10
Part 4 Accomplishment and Major Contribution-----	47
Part 5 Utility of This Research-----	50
Part 6 Information Obtained Oversea during Research-----	53
Part 7 References-----	54

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	8
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과-----	10
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	47
제 5 장	연구개발결과의 활용계획-----	50
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	53
제 7 장	참고문헌-----	54

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

식물은 동물과 달리 서식처로부터 이동이 불가능으로 생물학적(biotic) 자극이나 스트레스 (예: 병, 해충, 바이러스)나 비 생물학적(abiotic) 자극이나 스트레스 (예; 열, UV, 저온, 염)에 적극적으로 대처하는 다양한 반응들의 network의 구성이 필수적이다. 오랜 기간의 진화 과정을 거쳐 이러한 재해에 대한 대처 방안이 꾸준히 강구되어 오고 있다. 21C 기하급수적인 인구증가에 대한 해결방안으로 안정적인 식량생산과 환경보전이란 두 큰 과제가 대두되고 있다. 이러한 식량증산에 걸림돌이 되고 있는 주요 요인으로는 생물학적 스트레스 즉 병, 해충으로 인한 큰 손실이다. 이러한 손실은 매년 그 생산량의 30%를 상회하고 있다. 이에 따른 손실 방제는 주로 화학 농약에 의존하고 있다. 그러나 환경보전과 안전한 식량공급을 위해서 농약사용에 대한 규제가 날로 강화되고 있으며 수년 내에 농약 재등록 제도를 실시하여 현재 사용되고 있는 농약들의 상당부분이 사용되지 못한다. 이러한 독성, 환경오염, 생태계 교란 등의 부작용을 경감시키면서 병해충으로 인한 생산량 감소를 막을 수 있는 대안으로는 수 천년의 진화과정을 거쳐 진화되고 있는 자가 생체방어, 신호전달체계의 이해, 유전자 분리 및 발현조절, 이들의 능력을 제고시키는 저항성 작물 개발을 들 수 있다. 작물의 생체 방어 능력을 높여 생물적 저항성을 향상시키기 위해서는 이들 생체 방어 관련 유전자를 확보하고 이들 반응 기작과 발현 조절, 그 기능을 밝히는 일이 선결과제이다. 이런 숙제들이 달성되면 식량의 안정적 공급은 물론이고 저 투입 친환경 지속농업이 가능해 진다고 본다.

최근 관심과 연구의 대상으로 부각되고 있는 분야로 병 저항성 관련 단백질 (Pathogenesis related protein : PR-protein)을 꼽을 수 있다. 이들은 오랜 진화과정을 통해 식물이 생물학적(biotics) 및 비생물학적 (abiotics) stress를 받으면 발현하는 단백질로 현재 17종이 밝혀지고 (Table 1) 있고 앞으로 계속 추가 발견될 것으로 예상되며 이들의 기능과 network이 여러 stress 조건에서 어떻게 상호작용하는 지에 관한 연구가 절실하다. 이는 식물 내재적인 기능을 이해하고 이를 극대화 할 수 있다면 미래의 첨단기술 산업으로 발전시킬 수 있는 훌륭한 소재가 되기 때문이다. 그들 중 일부 (예로 Chitinase,  $\beta$ -glucanase등)는 그 생화학적 기능이 밝혀졌으나 대부분의 경우에는 아직 명확하지 않다. 벼는 전 세계인구 절반의 주요 식량 자원이며 최근 착수된 genome 전체의 유전자 염기 서열 분석이 완료되어 있어 (Goff 등 2002, Yu 등 2002) 차후 DNAchip, proteomics, metabolomics 와 일련의 체계적 연구가 이루어지면 더 많은 유전 정보와 그 기능을 이해 할 수 있는 좋은 model system 이다.

본 연구에서는 벼 도열병 저항성 관련 유전자 연구 결과로 여러 PR-protein 중의 하나인 PR-10 protein을 중심으로 식물 분자 생물학 및 형질전환전공 두 연구자들이 팀을 이루어 이들 유전자의 기능을 밝혀내고 이들을 이용한 형질 전환 벼를 분자 육종함으로써 병 저항성 및 벼의 생육, 분화, 발달에 관한 기구를 이해하고 생물 스트레스 저항성 품종 육성에 기여하며 환경 친화적인 생물학적 스트레스 방제 연구의 기반을 다지고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

식물은 생물성 자극이나 스트레스를 인식하자마자 다양한 종류의 생체방어체계를 활성화시키는데 예로 ion flux, 활성산소생성, 세포사멸, 세포벽 강화, 방어관련 단백질의 생산, phytoalexin 생산, systemic 신호 전달에 의한 생체 방어 체계의 가동 등을 들 수 있다 (McDowell, 2001). 그러나 대부분 이들의 기능에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다. 이들 중 PR-protein의 발견과 그에 관한 연구가 현재 진행 중이다. PR-protein의 정의는 “식물이 병원균의 침입에 대항해서 유기되는 다양한 식물 유전자들의 발현 단백질”을 의미한다. Van Loon (1994) 에 의해 11종류로 분류되었다가 최근 그 종류가 차츰 늘어나고 있다 (Christensen 등 2002) (Table 1).

Table 1. Classification of pathogenesis-related proteins (PRs)

PR-1	tobacco PR-1a	antifungal?, 14-17kD
PR-2	tobacco PR-2	class I, II, and III endo-beta-1,3-glucanases, 25-35kD
PR-3	tobacco P, Q	class I, II, IV, V, VI, and VII endochitinases, about 30kD
PR-4	tobacco R	antifungal, <i>win</i> -like proteins, endochitinase activity, similar to prohevein C-terminal domain, 13-19kD
PR-5	tobacco S	antifungal, thaumatin-like proteins, osmotins, zeamatin, permeatins, similar to alpha-amylase/trypsin inhibitors
PR-6	tomato inhibitor I	protease inhibitors, 6-13kD
PR-7	tomato P	endoproteases
PR-8	cucumber chitinase	class III chitinases, chitinase/lysozyme
PR-9	lignin-forming peroxidase	peroxidases, peroxidase-like proteins
PR-10	parsley PR-1	ribonucleases, Bet v 1-related proteins
PR-11	tobacco class V chitinase	endochitinase activity
PR-12	radish Ps-AFP3	plant defensins
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	thionins
PR-14	barley LTP4	nonspecific lipid transfer proteins (ns-LTPs)
PR-15	barley OxOa (germin)	oxalate oxidase
PR-16	barley OxOLP	oxalate-oxidase-like proteins
PR-17	tobacco PRp27	unknown

그중 직접적으로 생물, 생화학적 항균 활성이 확인된 것으로는 chitinase(PR-10),  $\beta$  1,3-glucanase (PR-2)등이고 형질 전환체 식물을 제작하여 유전자 발현을 유도한 것들로 병의 발생을 억제하는 유전자들로는 PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5등이 있다 (Broglie 등, 1991; Zhu 등, 1994) 그러나 대부분의 PR-protein에 대한 직접적인 항균활성기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 그중 PR-10단백질은 처음 자작나무 꽃가루 allergen으로 알려 졌으나 이들은 병원균의 침입시 수종의 식물에서 유기되는 단백질로 알려져 있다. 지금까지 PR-10 단백질 발현이 확인된 식물로는 parsley, 완두, 감자, 대두, 아스파라가스, 고추, 사탕수수, 벼 등이 보고 된 바 있다. PR-10 단백질들은 RNase 활성을 갖는 인삼 단백질과 homology가

있어 RNase 활성이 있을 것으로 추정하고 있다.

벼의 PR-10 단백질 유전자는 맨 처음 일본에서 살균제 probenazole 처리에 의해 발현되는 probenazole induced protein (PBZ)으로 보고 (Midoh, N. and Iwata, M. 1996) 된 이후 McGee 등 (2001) 에 의해 세 개의 PR-10 유전자가 cloning 되었고 그중 2개는 발현되고 (PR-10a, PR-10b) 하나는 pseudogene으로 밝혀졌다. PR-10a는 PBZ 유전자와 99% 동일하고 (854/860bp) PR-10a와 PR-10b 간에는 DNA 염기서열로는 81% 상동성이 있다.

도열병균 접종 후 PR-10a 유전자의 발현 (mRNA)은 일찍 유기되나(12hpi) PR-10b는 늦게 (48hpi) 유기되며 또 JA와 SA에 의해 유기되었다. 이들의 발현은 nonsystemic 함이 보고되었다. 최근 PBZ와 단백질 수준에서 28% 상동성을 가지나 RNase의 conserved sequence를 갖는 PR-10이 다시 cloning 되었다. 그러나 아직 PR-10 단백질들에 대한 생물/생화학적 작용과 생물적 스트레스 내성 활성, RNase 활성에 관한 기능연구는 아직 없는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 생물성 스트레스 관련 PR-10 단백질의 기능연구

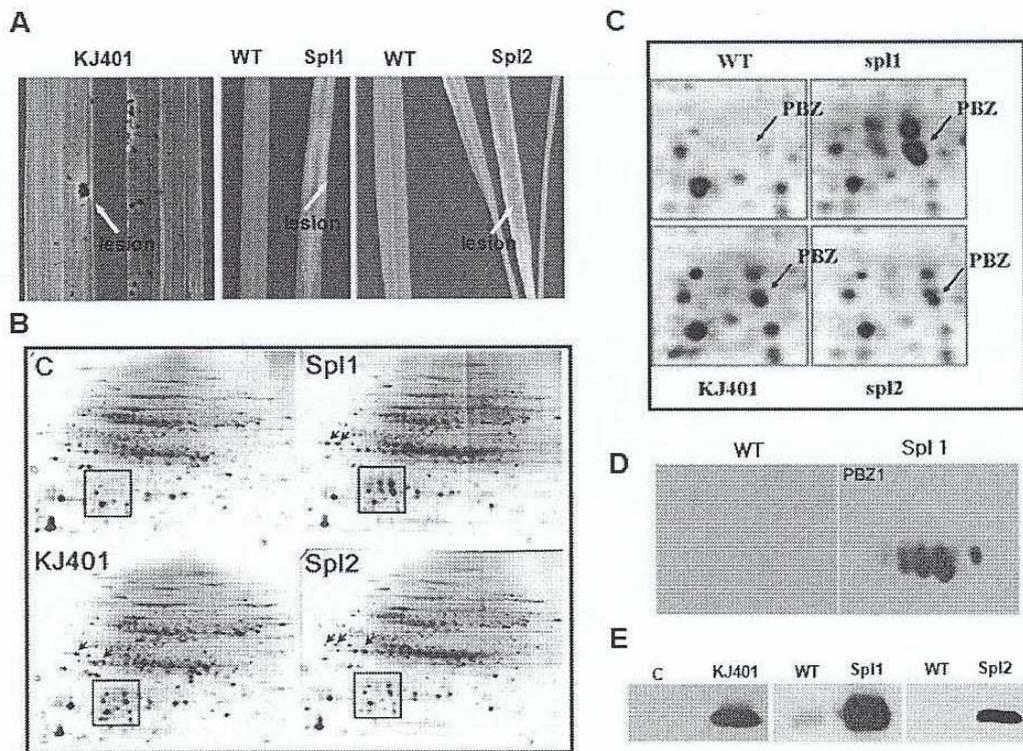
#### 1. 단자엽 식물의 노화 및 세포사멸에 관여하는 PBZ1 단백질

도열병균 접종 후 PR-10a 유전자의 발현 (mRNA)은 일찍 유기되나 (12hpi), PR-10b는 늦게 (48hpi) 유기되어지며 자스몬산과 살리실산에 의해 유기되며 이들의 발현은 비체계적이라고 알려져 있다. 최근 PBZ1와 단백질 수준에서 28% 상동성을 가지고 리보뉴클레아제의 보존된 서열을 갖는 PR-10이 다시 클로닝 되었다. 그러나 아직 PR-10 단백질들에 대한 생물/생화학적 작용과 생물적 스트레스 내성 활성, 리보뉴클레아제 활성에 관한 기능연구는 현재까지 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 지금까지 PR-10 단백질 발현이 확인된 식물로는 파아슬리, 완두, 감자, 대두, 아스파라가스, 고추, 사탕수수, 벼 등이 보고되어져 있으며, 리보뉴클레아제 활성을 갖는 인삼 단백질과 상동성이 있어 리보뉴클레아제 활성이 있을 것으로 예상되어진다.

이에 벼 유래의 병저항성 관련 단백질 (PR-10)을 연구하던 중, 식물의 노화 및 세포사멸에 관여하는 PBZ1 단백질의 기능을 밝혔다. 한편, 식물의 세포 예정사 (programmed cell death)는 병원균에 대한 방어 수단으로써 과민성 반응에만 국한되는 것은 아니다. 지금까지 식물에서의 세포 예정사에 관여하는 대표적인 조직으로는 노화 (잎, 초엽)조직을 들 수 있다. 또한, 뿌리의 통기조직 세포형성, 뿌리골무, 종자 호분세포 등이 포함되어진다.

식물의 노화 및 세포사멸에 관여하는 PBZ1 단백질의 식물체 내에서 발현을 확인하기 위해, 기존의 lesion mimic mutant로 알려진 *spl1*과 *spl2* mutant line을 획득하여 이들에서 PBZ1 protein이 발현 되는지를 2-DE 분석을 하였다 (Fig 1). Figure 1에서 보는 것처럼 부분적인 돌연변이체 (*Spl1* 및 *Spl2*)에서 벼 도열병 감염에 의해 유도된 PEG-분획화된 단백질의 2차원 전기영동 분석결과를 나타낸 것으로, Fig. 1-1A는 *spl1* 및 2 돌연변이체의 표현형을 보여 주고 있다. Figure 1-1B는 *spl1* 및 2 돌연변이체로부터 추출된 단백질의 2-DE 분석하였다. WT에 비하여 PBZ가 elicitor를 처리 했을 때 만큼 *spl1*, 2 mutant line에서 발현됨을 Western 을 통하여 (Fig. 1-1 C, D) 확인 할 수 있었다.

벼 식물의 잎과 돌연변이체에서 PBZ1 단백질의 발현을 확인한 결과 Figure 1-1과 지난 연구과제에서 에서 알 수 있듯이, 정확히 PBZ1의 발현이 잎의 노화 및 돌연변이체에서 동시에 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 노화 마커로써 가장 많이 사용되는 엽록소 양의 측정으로부터 엽록소 양이 감소함에 따라 PBZ1의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-2). 또한 자발적인 잎의 노화에서도 PBZ1의 축적이 일어나는 현상을 관찰할 수 있었다. 잎의 노화뿐만 아니라 초엽에서 발현양상을 확인할 결과, 초엽의 노화는 최근 *annals botany*에 보고된 바와 같이 일반적으로 벼의 초엽은 종자 발아단계에서 초엽을 보호하는 기구로, 발아 후 초엽은 클레오프타일(coleoptile)에서 나오고 그런 다음 급격하게 세포 사멸을 일으키는데, 그것을 보다 더 자세히 보기위해서 초엽을 혐기적 조건에서, 즉 침수된 상태에서 발아시켰을 때 초엽만이 성장하는 것으로부터 PBZ1 단백질이 식물의 노화에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-3).



**Figure 1-1.** 2-DE analysis of PEG-fractionated proteins induced by rice blast fungus inoculation and in lesion mimic mutants, *Spl1* and *Spl2*. In *spl1* plants, a large number of mimic lesion were formed from young seedling stage, Protein samples (150  $\mu$ g) in 15% PEG supernatant fractions were separated on 2D-gels (pI 4-7), followed by silver staining. Pathogen-induced proteins showing the most significant differences were arrowed in the gels. A total of 7 proteins were induced by rice blast fungus (KJ401). Leaves inoculated with incompatible pathogen, KJ401 showed HR-like phenotype.

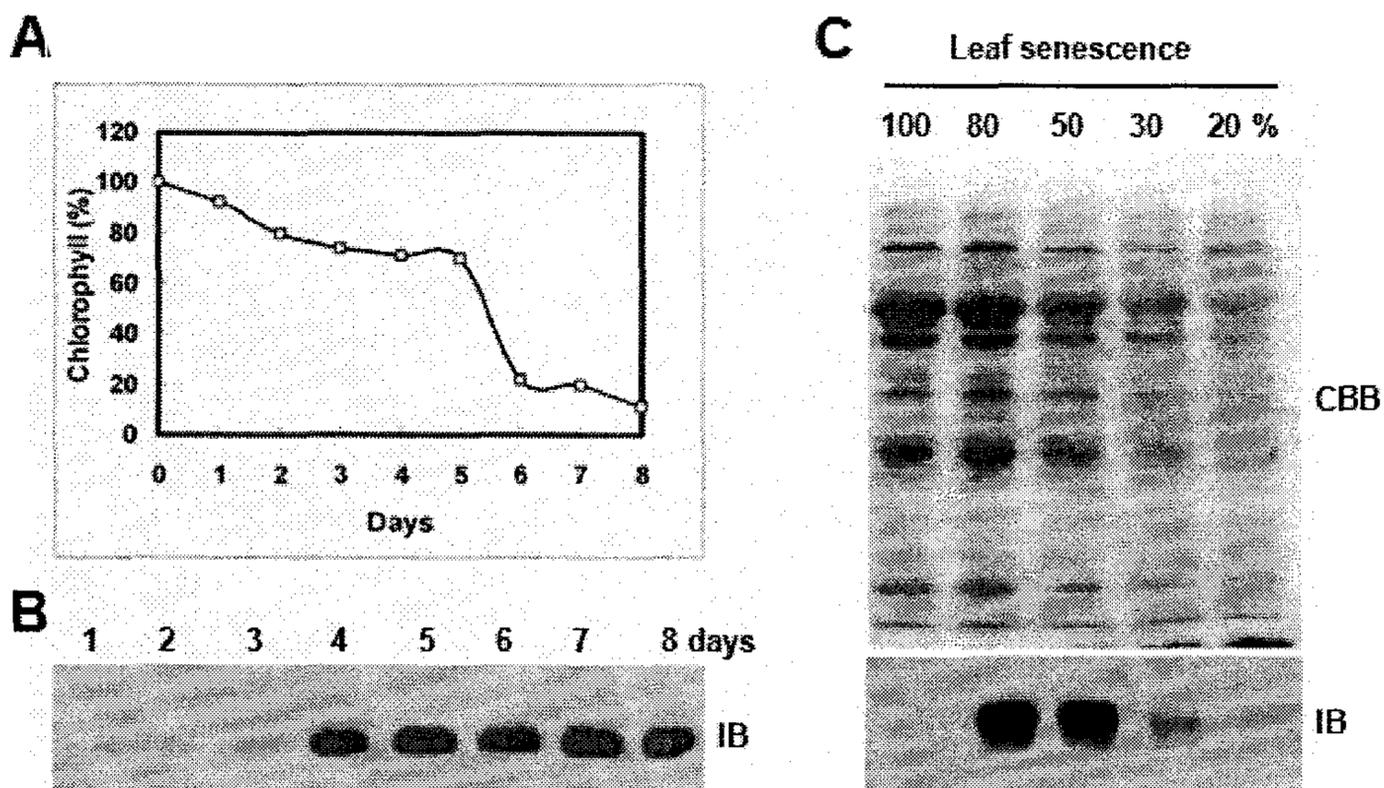
A, Phenotype of *spl1* and 2 mutants

B, 2-DE profiles of proteins extracted from *spl1* and 2 mutants

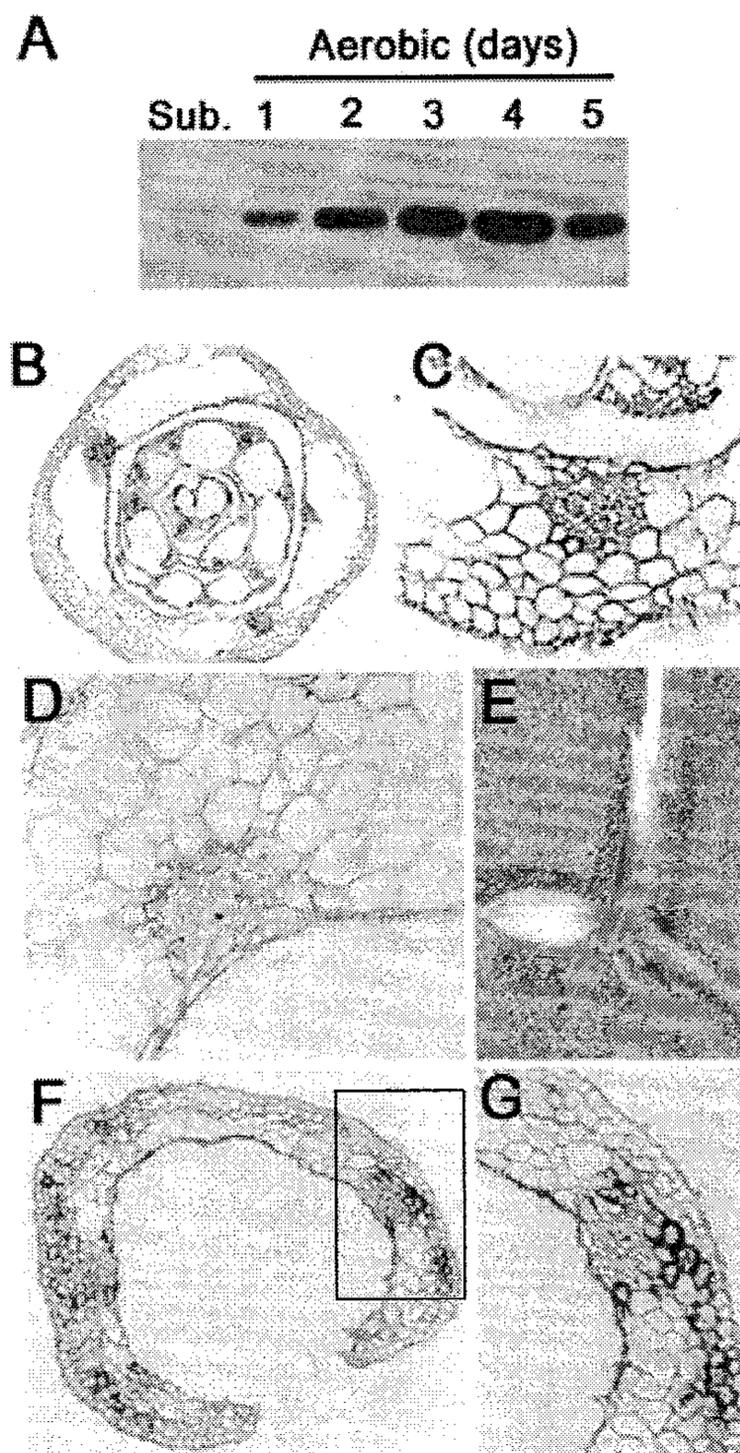
C, Enlarged images of PBZ1 proteins in rectangles of figure B

D, 2-DE western blot

E, Western blot on SDS-PAGE



**Figure 1-2.** Accumulation of PBZ1 protein during senescence. A, Chlorophyll content at various time points as an indicator of senescence of detached leaves and Western blot analysis of PBZ1 protein with proteins extracted from samples collected at the same time points (B). C, Chlorophyll content and accumulation of PBZ1 protein during natural senescence of rice whole plants. 100 refers to fully expanded green leaf (100 % Chl); 80 refers to senescencing leaves (70-95 % Chl); 50 refers to senescing leaves (50-70 % Chl); 30 refers to senescing leaves (30-50 % Chl); 20 refers to fully senescing leaves (<30 %). CBB, Coomassie blue. IB, immuno blot. Each protein sample (20  $\mu$ g) was loaded onto a 12.5% SDS-PAGE gel. Equal loading of protein was confirmed by Ponceau S staining of the membrane.



**Figure 1-3.** Accumulation and immunolocalization of PBZ1 protein in coleoptiles obtained from seedling grown under aerobic or submerged conditions.

A, Induction of PBZ1 protein in the rice coleoptiles obtained from seedlings that had been transferred from submergence (5 day) to aerobic conditions. Proteins were extracted at 0, 1, 2, 3, 4, and 5 day after exposure to air. Cross-sections of young coleoptile obtained from 4 day old seedlings grown under aerated conditions (B and C), and senescent coleoptile of 4 day old seedlings grown under aerobic conditions (D, F, G). Each cross-section was treated with purified specific anti-PBZ1 for immunohistochemical analysis and detected by NBT/BCIP (F, G). Blue-colored signals indicate accumulation of PBZ. Most of PBZ1 was accumulated in aerenchyma cell (arrow). ae, Aerenchyma. E, Cell death in coleoptiles was stained with Evans blue to stain dead cells. D, Tissue treated with free antibodies: negative control.

## 2. PBZ1 프로모터 개발 및 분석

생물성 스트레스 관련 유전자 PBZ1의 프로모터 개발 및 분석하고 지금까지의 Immunolocalization, Western blot의 결과를 재확인 하기위해서 위해서 벼 게놈 염기 서열정보를 이용하여 생물성 스트레스 관련 유전자의 ATG 위치에서부터 약 2kb 위쪽으로 프로모터 지역으로 예측하여 이를 상기 Fig. 1-4의 방법으로 cloning 하였다. 구체적으로 PBZ1 프로모터의 상류 큰 부분은 (1403 bps)은 유전자 특이적인 프라이머 세트로 증폭시켰다. 프라이머 세트 중 정방향 프라이머로 : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCG GTGCATGGTTGCGACCATT-3'(서열번호 3), 역방향 프라이머로 5'-GGGGACCACTTTG TACAAGAAAGCTGGGTCAGCTAGTTGCAACTGATCAC-3'를 사용하였다.

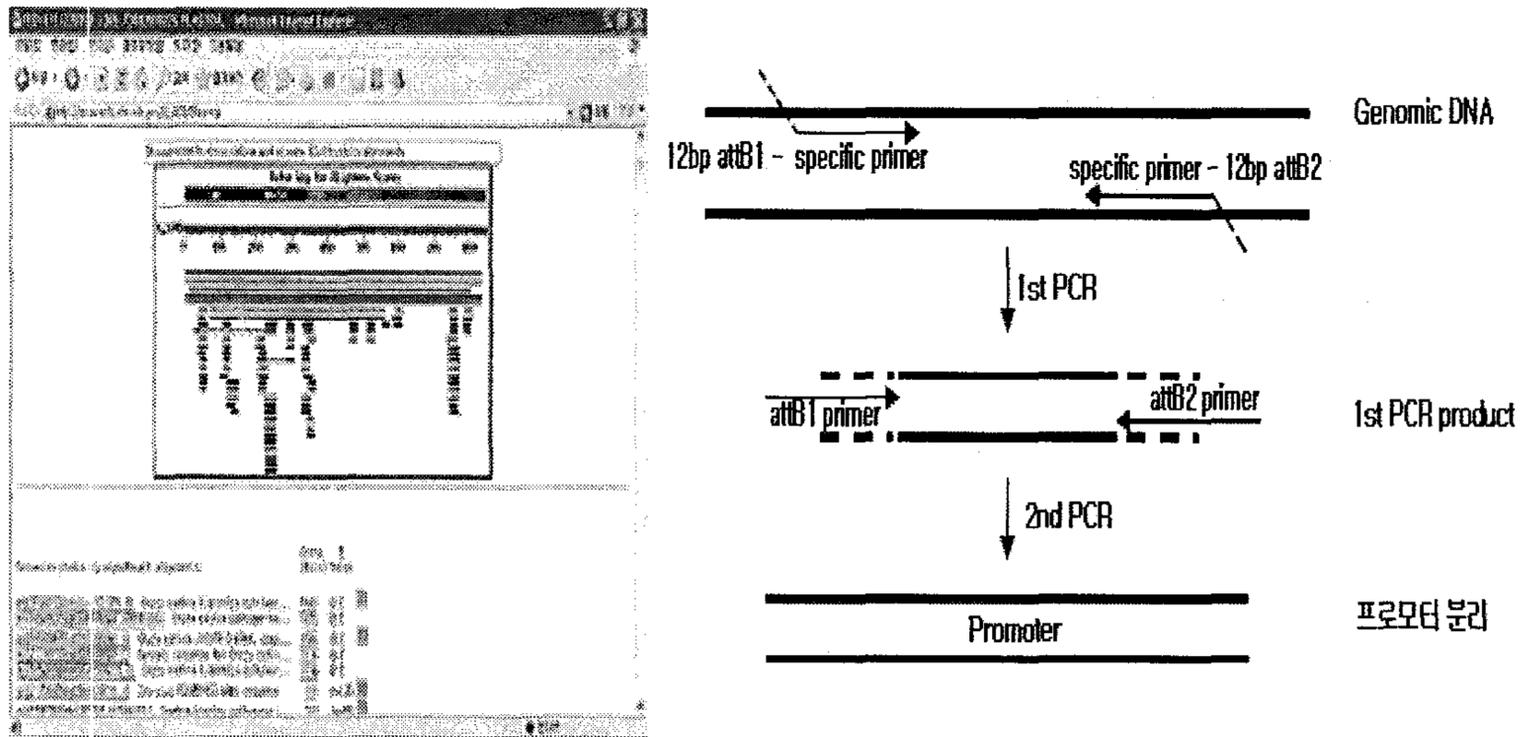
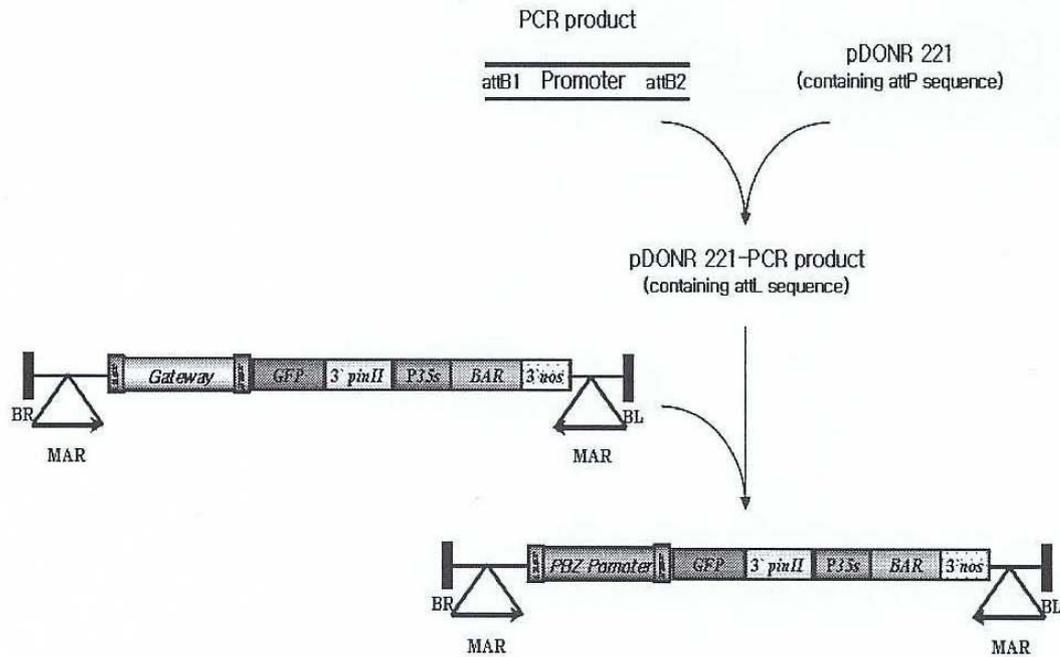


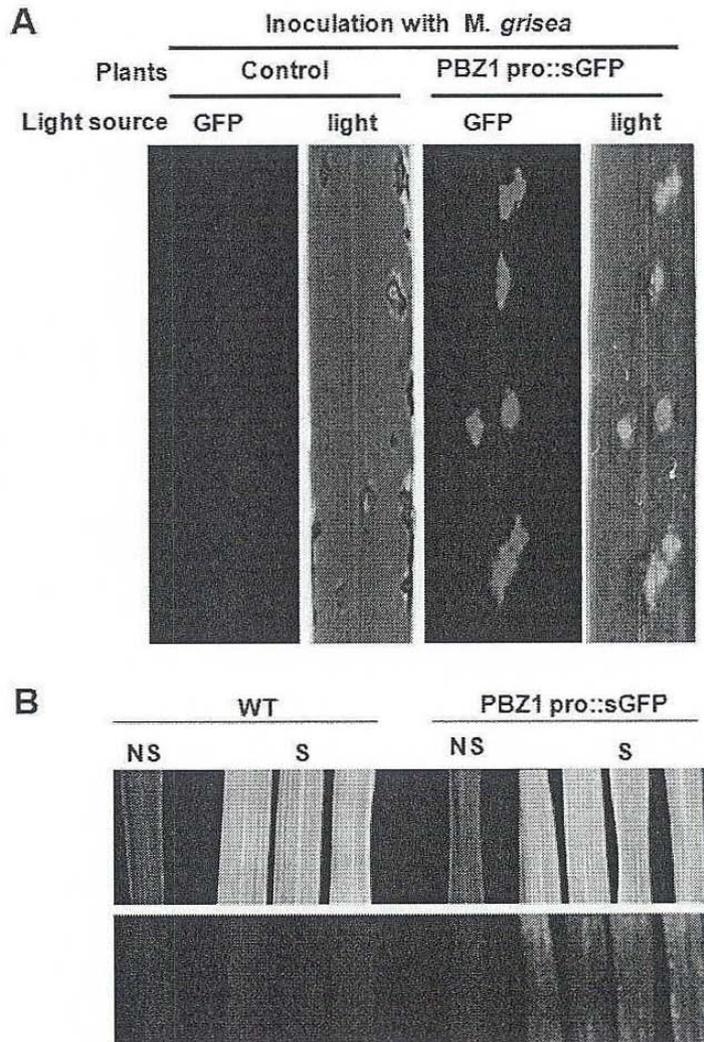
Figure 1-4. Strategy for cloning of PBZ1 promoter

플라스미드는 성숙된 벼(Oryza sativa cv Nakdong) 종자로부터 triparental mating 및 배 발생 calli에 의해 agrobacterium tumefaciens 도입시켜 형질 전환시켰다. 대략 200개의 성숙된 벼 종자를 이용하여 형질 전환된 아그로박테리움 형질 전환체는 gentle shaking으로 1분 동안 70% (v/v) 에탄올로 멸균하였다. 에탄올을 제거하고 종자는 시판되는 표백제 (20% (v/v)) 100 ml로 1시간 동안 더 멸균시켰다. 그리고 본 연구진에 의해 자체 개발된 Gateway system을 포함하며 초록형광단백질(GFP) reporter를 가지는 운반체를 사용하여 recombination을 통해 형질전환체를 위한 운반체를 완성하였다(Fig. 1-5).



**Figure 1-5.** Construction of vector harboring PBZ1 promoter

벼 종자에서 callus를 유도하여 이중 embryogenic한 callus를 고른 후 Agrobacterium을 이용하여 형질전환을 실시하였다. phosphinotricin을 이용하여 형질전환체만을 선별하였고, 그 결과 6 line의 형질전환체를 개발하여 종자와 Germination 동안 PBZ1 promoter 형광 이미지를 관찰하였으며 개발된 형질전환체의 R2 종자를 확보하기 위해 포장과 온실에서 각각의 line을 전개 하였다. PBZ1 promoter line과 OsCc1 line을 함께 도열병을 처리시 promoter가 반응하는 지를 관찰 한 결과 PBZ1 promoter가 강하게 발현 한다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1-6). 또한 잎 노화에서도 강한 신호를 보이는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-6B ). 이러한 결과는 PBZ1 유전자가 세포사멸을 유도한다는 것을 *In vivo* 상태에서도 확인시켜 주는 것으로 PBZ1 프로모터 발현이 종자 자체에서는 발아되지 않았으나, 발아 과정에서는 강하게 발현된다는 것을 입증해주는 결과이다. 따라서 PBZ1 유전자를 포함하는 프로모터로 형질전환 시킴으로써 식물의 노화 및 세포사멸에 직접적인 영향을 주어 병 방제 효과가 탁월한 식물체를 개발할 수 있을 것으로 예상된다.



**Figure 1-6.** Fluorescence image of PBZ1 promoter after *M. grisea* treatment and leaf senescence.

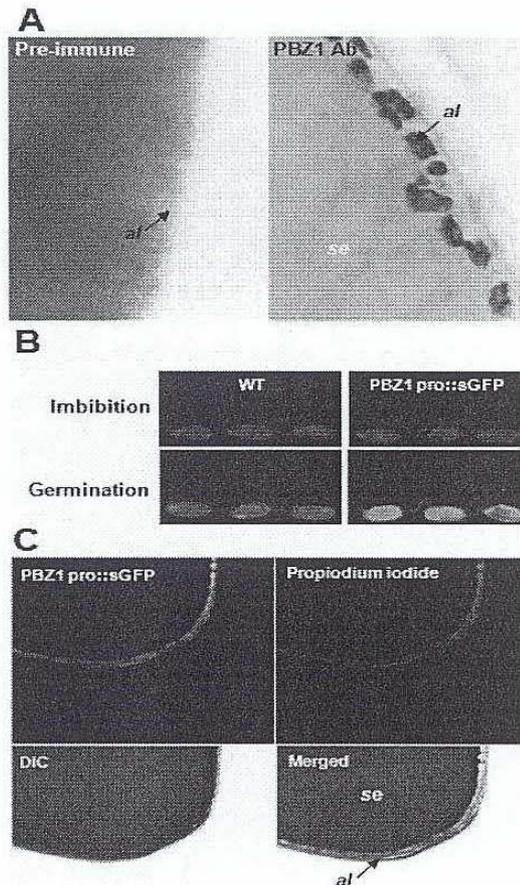
A) Transgenic leaves harboring PBZ1 promoter::sGFP (PBZ1 pro::sGFP) chimeric gene were inoculated with compatible race, KJ101 for 3 days. GFP signal specifically appeared (green) in the lesion invaded by rice blast fungus.

B) PBZ1 pro::sGFP detached leaves were used to examine leaf senescence under light conditions.

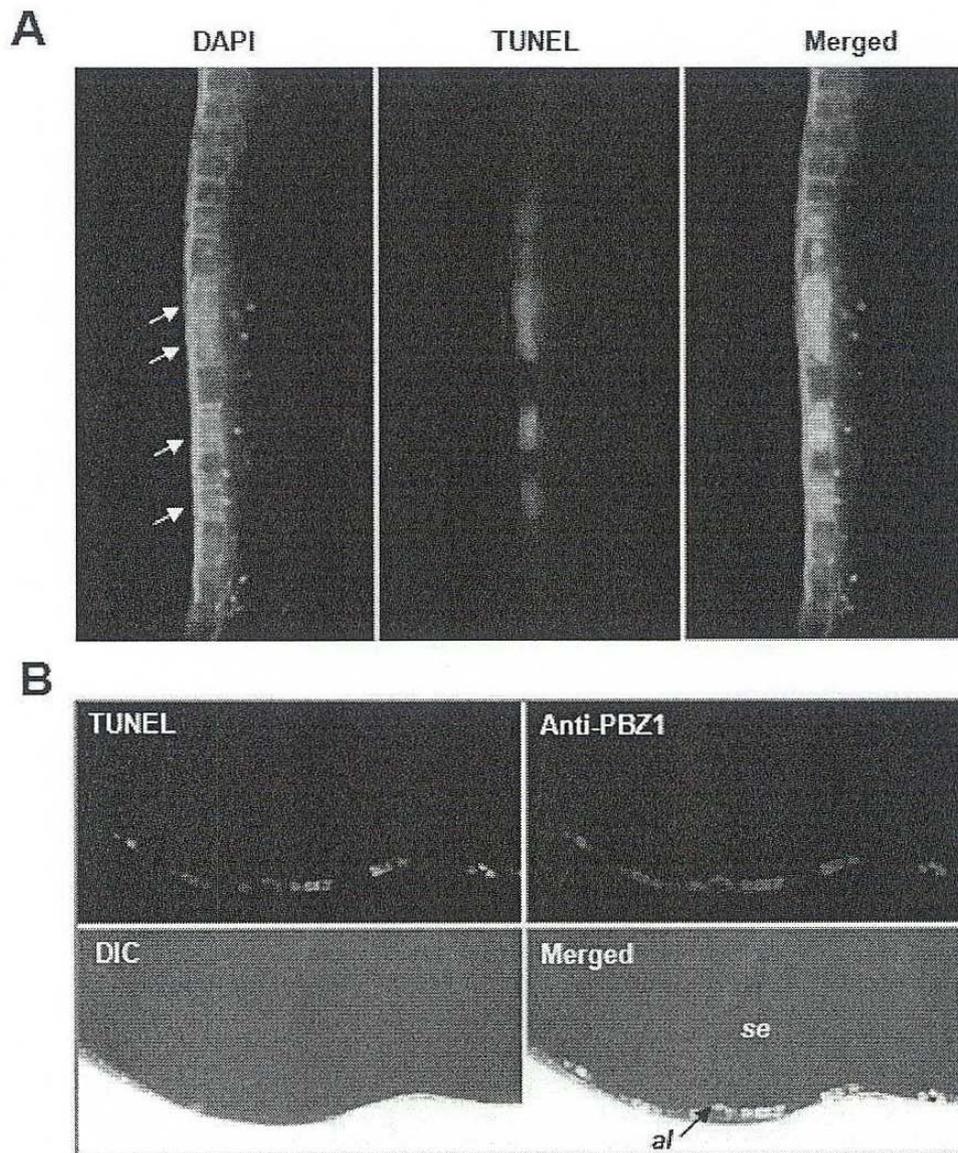
### 3. PBZ1 promoter 형질전환체의 노화 및 세포사멸 연구

Figure 1-7은 세포예정사와 관련된 종자 호분 층에서 PBZ1 단백질의 발현을 나타낸 것으로, 종자 호분 층에서 PBZ1 단백질을 면역염색으로 위치를 정확하게 확인하였고 (Fig. 1-7A) 또한 발아된 지 3일된 종자의 PBZ1 프로모터의 활성화도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1-7B). Cell death indicator인 Propidium iodide로 염색된 조직인 호분층에서 PBZ1 signal이 강하게 동시에 발현되는 것을 공 초점 (confocal) 현미경을 이용하여 관찰하였

다 (Fig. 1-7C). Figure 1-8은 발아가 진행되는 동안 종자 호분세포에서 TUNEL을 사용하여 DNA 분열을 측정된 결과를 나타낸 것으로, 48시간 동안 발아시킨 다음 종자 호분세포에서 DNA 분열을 측정된 것으로 세포사멸 형광감지 키트 및 조개진 DNA 가닥의 3' 말단기에 형광 (FITC)-라벨링된 그룹을 첨가하여 DNA 분열을 감지한 결과 종자 호분층이 cell death 조직임을 증명했다 (Fig. 1-8A). 또한 발아 동안 종자 호분세포에서 DNA 분열 및 PBZ1 단백질의 Colocalization되는 것을 확인했는데 (Fig. 1-8B) 이는 실제로 PBZ1 단백질이 세포 사멸 부위에 정확히 발현되는 것을 재차 확인하는 결과이다.

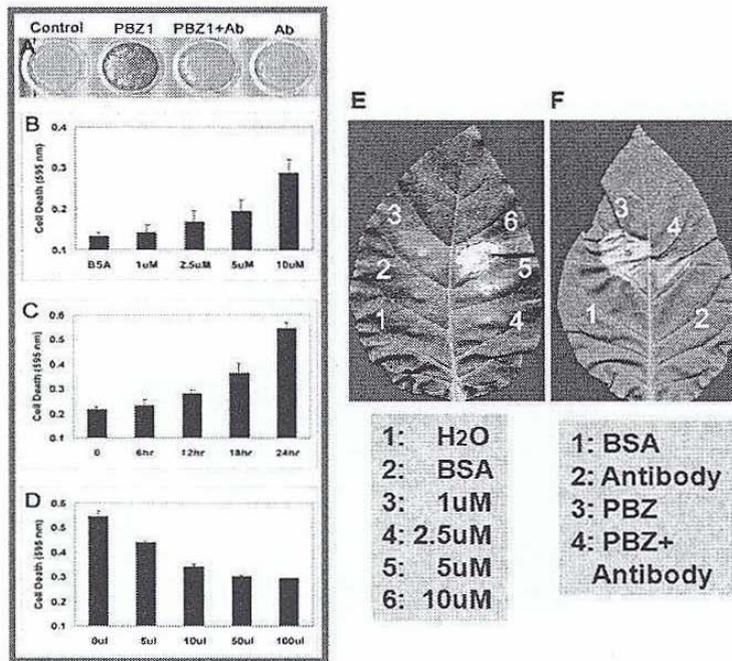


**Figure 1-7.** Expression of PBZ1 protein in seed aleurone layer associated with PCD. A; Immunolocalization of PBZ1 in seed aleurone layer. For immunohistochemical analysis, seeds at 72 h after germination were used, cross-sectioned with hand, and analyzed with antibody (dilution; 1/100) against PBZ1 protein. Tissue treated with pre-immune serum was used for negative control (pre-immune). Sections of seed endosperm were reacted with anti-PBZ1. The specimens were incubated with the alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:300) for 1 h and detected with NBT/BCIP solution for 20 min for visualization. *al*, aleurone layer. *se*, seed endosperm. B; Activation of PBZ promoter in seed and hand cut seed germinated for 3 days. C; Observation of sGFP fluorescence in transgenic rice plants expressing PBZ promoter::sgfp (PBZ1 pro::sGFP) chimeric gene using confocal microscopy. Propidium iodide was used as an indicator of cell death.



**Figure1-8.** Detection of DNA fragmentation using TUNEL in seed aleurone cell during germination. A; DNA fragmentation in seed aleurone cell after germination for 48 hr was detected with an in situ cell death fluorescent detection kit (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) and detected DNA fragmentation by adding a fluorescent (FITC)-labeled group to the 3'-ends of broken DNA strands. For nuclear staining, the fluorescent dye DAPI which stains DNA was used. B; Colocalization both of DNA fragmentation and PBZ protein in seed aleurone cell during germination. Rhodamin conjugated secondary antibody (dilution 1:200) was used to detect PBZ1 protein.

또한, 본 연구에서는 PBZ1 유전자를 포함하는 프로모터로 형질전환시킨 형질전환체의 PBZ1 단백질이 Immunolocalization 및 Western blot의 결과와 일치하게도 세포사멸 부위에서 강한 GFP signal을 보여 실제로 세포사멸을 일으키는지 알아보기 위해서, PBZ1 overexpression 된 형질전환체를 가지고 실험을 실시했다. 먼저 실험에 앞서 우리는 지난 연구에서 정제된 PBZ1 단백질을 담배 잎에 침투시키고 세포사멸을 확인하였다. 그 결과, PBZ1 단백질 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 효과적으로 세포사멸이 진행되어지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 그리고 음성 대조구는 PBZ1 항체를 이용하여 PBZ1 단백질과 함께 침투시켰을 때 세포사멸의 정도가 현저히 감소되는 것으로 보아 PBZ1 단백질에 의해 세포사멸이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포사멸이 벼 부유 세포에서도 관찰되었는데 마찬가지로 담배에서와 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1-9). PBZ1이 처리된 세포는 뚜렷한 민감성 감응을 보였으며, 또한 Evans blue 염색 분석한 결과 조사량 또는 시간의 의존적으로 세포사멸이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.



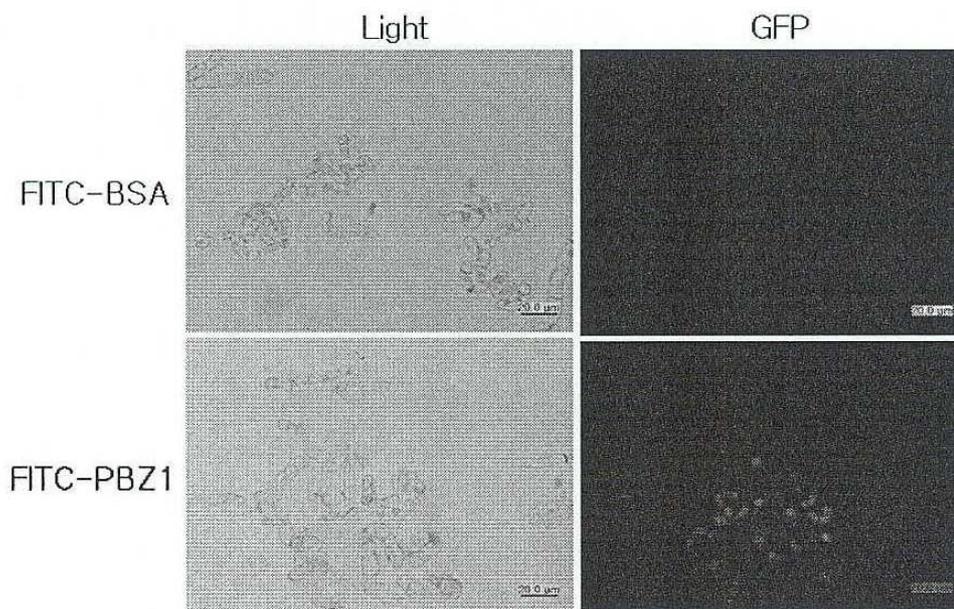
**Figure 1-9.** Induction of cell death in cultured rice cells by PBZ1 purified from *E. coli*. Cell death induced by PBZ1 proteins after treatment is shown. Degree of the cell death was estimated by Evans blue staining of individual cells at  $A_{595}$ . Each bar represents S.E. of three independent experiments. After a 24 hr incubation, the number of dead cells in cultured rice cells was determined. A, Morphology of rice callus treated with PBZ1 protein showing HR. B, and C were showing the dosage (1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) and time-course (6, 12, 18, 24 hr) dependent cell death assay, respectively. D, Cell death blocking assay was used with anti-PBZ1 antibody. effect of anti-PBZ1 antibody on cell death induced by purified PBZ1 (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Each amount of anti-PBZ1 antibody (0, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{l}$ ) was added into the medium of cultured rice cells together with purified PBZ1 proteins (100  $\mu\text{g/ml}$ ). E, Tobacco leaves five days after infiltration with PBZ1 proteins. Left leaves: 1, 10 mM HEPES buffer pH 7.0; 2, acetylated bovine serum albumin (BSA; 100  $\mu\text{g/ml}$ ); 3, purified PBZ1 protein (10  $\mu\text{g/ml}$ ); 4, purified PBZ1 protein

(25 ug/ml); 5, purified PBZ1 protein (50 ug/ml); 6, purified PBZ1 protein (100 ug/ml). F, 1, acetylated bovine serum albumin (BSA ; 100 ug/ml); 2, purified specific PBZ1 antibody (10 ul); 3, purified PBZ1 protein (100 ug/ml); 4, purified PBZ1 protein (100 ug/ml) + purified specific PBZ1 antibody (10 ul). Negative control was used with anti-PBZ1 antibody.

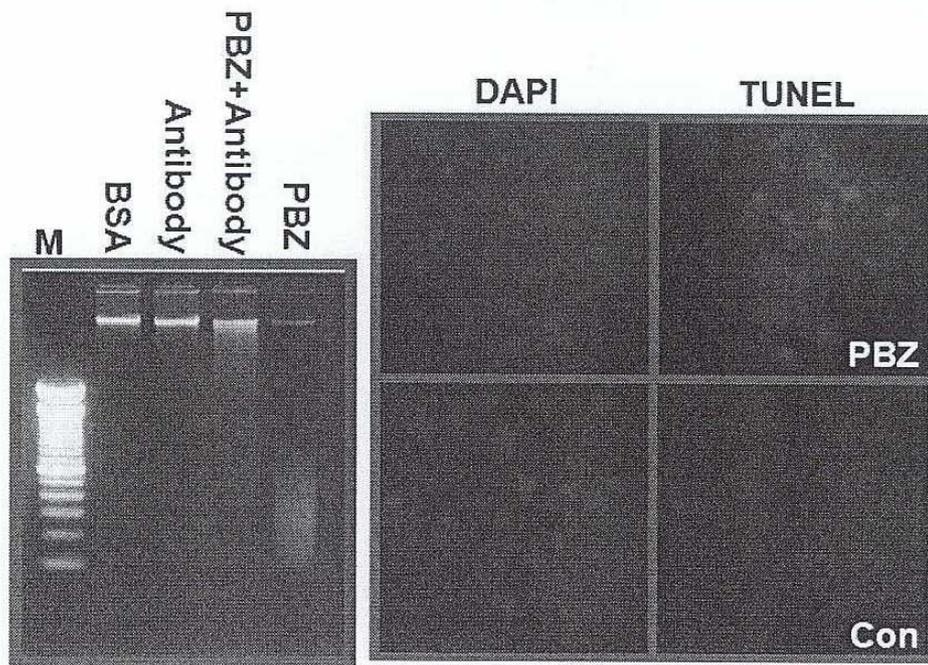
#### 4. 노화 및 세포사멸 연구

##### 1) BY2 cell과 TUNEL을 이용한 세포사멸

Exogenous PBZ1이 실제로 세포 안으로 들어가는지 확인하기 위하여 BY2 세포를 이용한 internalization 실험을 실시하였다. PBZ1 단백질을 FITC로 표시한 다음 BY2 cell에 처리하여 형광현미경으로 관찰하였다. Figure 1-10에서처럼 negative control로 사용한 FITC-BSA에 대해서는 어떠한 signal을 세포 안에서 관찰 할 수 없었지만 FITC-PBZ1은 강한 signal을 보였다. 이는 외부에 처리된 PBZ1이 세포 안으로 들어가는 것을 증명해주고 있다. 하지만 어떻게 세포 안으로 들어가는지는 좀 더 구체적인 실험이 요구 된다. 또한 PBZ1 단백질을 처리한 세포에서 DNA 분열을 확인한 결과, PBZ1이 처리된 세포에서 DNA 분열이 발생되어졌으며, TUNEL 분석에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1-11). 따라서 PBZ1 단백질의 항체는 세포사멸을 확인하는 마이오마커로써 사용되어질 수 있다.



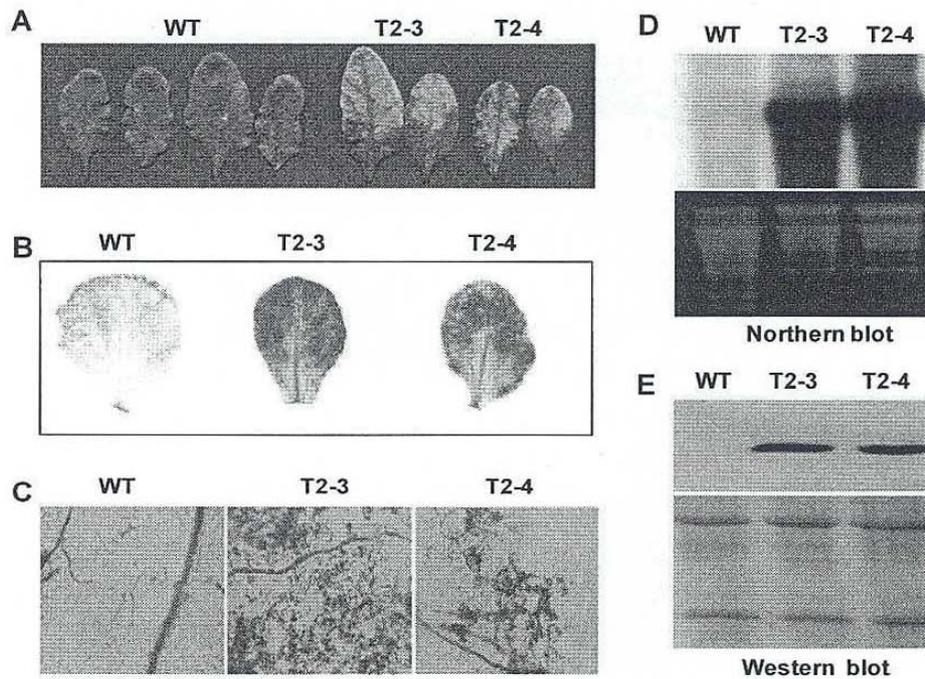
**Figure 1-10.** Fluorescence microscopy observation of BY2 cell incubated with FITC-labeled PBZ1. As a control, BY2 cells were incubated with FITC-labeled BSA.



**Figure 1-11.** Agarose gel analysis of rice callus DNA fragmentation after 24-hr of treatment (10  $\mu$ M of purified PBZ1 protein). A, Callus treated with PBZ1 proteins; negative control ( BSA or antibody of PBZ1), and PBZ1 + antibody Lane M: the DNA marker of 1.5 kb DNA ladder. B, TUNEL detection of DNA fragmentation in callus after 48 hr of treatments. For TUNEL staining (B, right), Callus treated with PBZ1 proteins, negative control (antibody of PBZ1), and PBZ1 + antibody were incubated with an *in situ* cell death fluorescent detection kit ( Boehringer Mannheim GmbH, Germany) and detected DNA fragmentation by adding a fluorescent (FITC)-labeled group to the 3'-ends of broken DNA strands. For nuclear staining (B left), the fluorescent dye DAPI which stains DNA, was used.

2) Inducible promoter (DEX)을 이용한 세포사멸

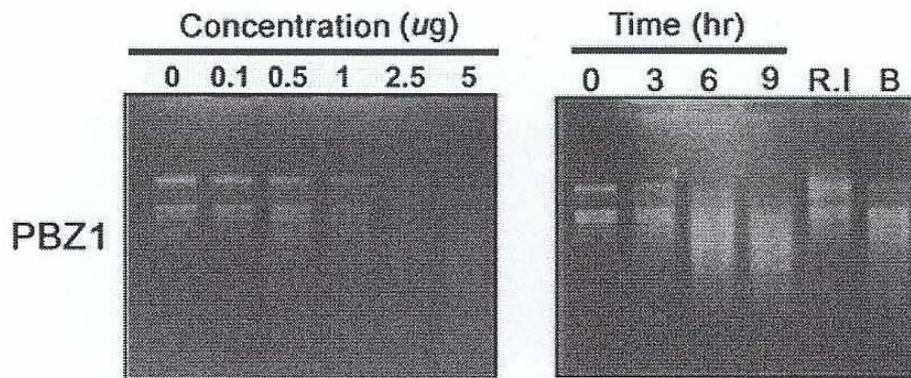
PBZ1 이 *in vivo*에서 세포사멸을 유도하는지 증명하기 위해서 먼저 PBZ1 유전자를 DEX 유도성 벡터에 클로닝하여 형질전환 식물체를 제조하고 세포사멸이 유도되는지를 확인하였다. 애기장대에 형질전환 식물체를 만들어 각각 line에 대하여 20  $\mu$ M DEX를 처리한 다음 세포사멸 유무를 관찰하였다. DEX inducible promoter transgenic plant에 Dex를 처리한 후 48시간째 각 line 별로 Lacto-phenol tryphan blue staining을 통하여 cell death 를 확인하였다. 그 결과 그림에서 보는 것과 같이 WT 에서는 cell death 현상이 관찰 되지 않았으나 여러 T2 line 중에서 각각의 T2-3, T2-4 transgenic line 에서는 cell death 가 일어나는 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 1-12). PBZ1의 발현되는지는 Dex 처리 후 RNA와 단백질을 추출하여 Northern 및 Western으로 증명하였다 (Fig. 1-12D, E). 이와 같이 Dexamethasone inducible PBZ - Arabidopsis clone을 확보 했으며 이들 T2~T3 세대로부터 Dexamethasone을 처리하면 사멸되는 T2-3, T2-4 line을 선발하고 고정 시켰다.



**Figure 1-12.** PBZ1-induced cell death of Arabidopsis. A, glucocorticoid hormone dexamethasone (DEX) inducible PBZ1 overexpression lines (T2-3 and T2-4) in Arabidopsis were treated with DEX (20  $\mu$ M) for 72 hr, followed by leading to the cell death. Lower leaves of 4-week-old Arabidopsis plants were infiltrated with DEX. B, Leaves stained with lactophenol-trypan blue, revealing cell death. C, Observation of leaves stained with lactophenol-trypan blue under microscopy. D and E, Total RNA and proteins from leaves harvested at 72 hr after DEX were prepared and subjected to Northern and Western blot analysis.

## 5. PBZ1 단백질의 RNase activity 측정

PBZ1이 세포사멸을 어떻게 일으키는지 알아보기 위해, PBZ1 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 측정하였다. 그 결과 PBZ1은 Figure 1-13에서 보는 바와 같이, 리보뉴클레아제 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. PBZ1 단백질의 리보뉴클레아제 활성 및 세포사멸과의 상호관계는 명확하게 밝혀지지 않았지만, 최근에 리보뉴클레아제도 세포사멸에 관여한다는 것이 알려졌다. 하지만 PBZ1이 리보뉴클레아제 활성을 가진다고 해서 세포사멸을 일으킨다는 정확한 증거는 *in vivo*에서 보고된 바가 없다.



**Figure1-13.** Ribonuclease activity of the purified PBZ1 proteins. The assay was tested against rice leaf total RNA (5 µg). RNase activity of PBZ1 was assayed in agarose gel. In the RNA degradation assay, RNase activity of PBZ1 was assayed in agarose gel. R.I indicates RNase inhibitor (50 unit) B indicates boiled PBZ1 proteins (100°C for 10 min) for negative control.

## 6. PBZ1 유전자의 과발현 형질전환체 개발

최종적으로 PBZ1의 세포사멸 기능 및 병 저항성에 영향을 미치는 지을 알아보기 위해서 PBZ1 유전자를 벼에 형질전환하여 그 phenotype을 조사하였다. cell death 및 도열병 저항성이 있는지 확인하기 위해 명지대학교 김주곤 박사님 실험실에서 개발된 pMJ101 overexpression vector에 형질전환체를 10개 line을 만들었으나 Figure 14에서 보는 것과 같이 elicitor처리구보다도 형질전환체의 발현이 더 적다는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 Arabidopsis 과 발현 mutant line과는 달리 우리가 얻은 rice PBZ1 형질 전환체는 cell death에 관련된 phenotype을 확인 할 수 없었으며 PBZ1 과 발현시 식물체가 살아남기 위한 수단으로 PBZ1 과 발현을 억제하거나 또한 endogenous PBZ1의 발현량보다 cytochrom C의 promoter의 발현량이 적어서 뚜렷한 phenotype을 볼 수가 없었다.

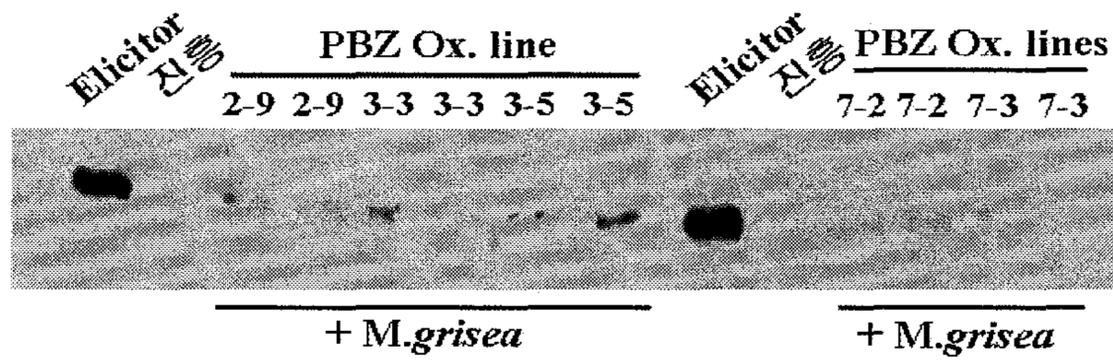


Figure 1-14. Transgenic plant pMJ101 expression vector fused with PBZ1 gene.

## 제 2 절 PBZ1 isoform 분리 및 활성 측정

PBZ1의 isoform 별로 발현양이 제일 많은 Callus-elicitor 조합에서 단백질을 추출하여 2-DE 분리한 다음 western analysis 로 PBZ의 발현되는 위치를 확인하고 발현 되는 주위의 gel를 회수, 재 추출하여 해상력 높은 8 PBZ isoform spot를 분리 회수 하였다 (Fig. 2-1). 8개의 PBZ의 isoforms를 2-DE로 분리하고 각각의 단백질을 elution-renaturation 시킨 후 담배 잎에서 cell death assay 한 결과 2, 5, 6번 isoform 들이 가장 많은 cell death를 유도함을 확인할 수 있었다.

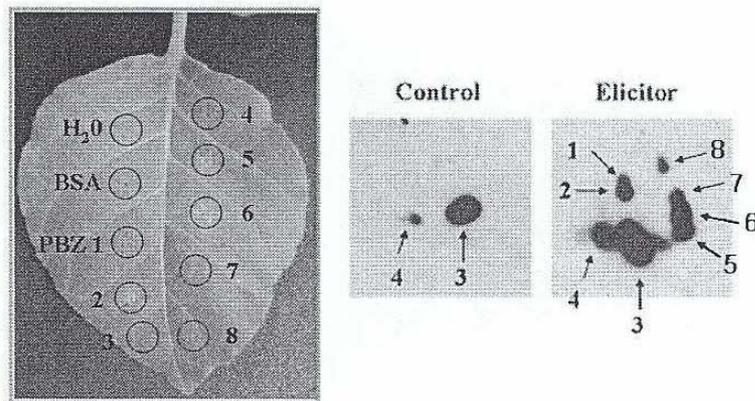


Figure 2-1. Cell death assay of 8 PBZ isoforms isolated from 2-DE.

PBZ1 isoform의 세포사멸에 대한 활성을 차이를 생화학적 방법으로 증명하기 위해서 각 isoform 단백질을 enzyme digestion, LC-MS(Thermo Electron LCQ-Deca XP) 방법으로 아미노산 서열 분석과 인산화된 위치가 있는지 동정을 확인 하였다. Capillary column 에 C18 column matrix(Ø 5u)을 충전후 gradient profile (Fig. 2-2)에 따라 60분간 peptide elution 시키면서 LC-MS(LC MS/MS) 분석을 실시하였다. 아미노산 서열 분석은 광주 과학 기술원 박지용 교수님의 도움을 받아 LC-Mass를 통하여 분석하였다.

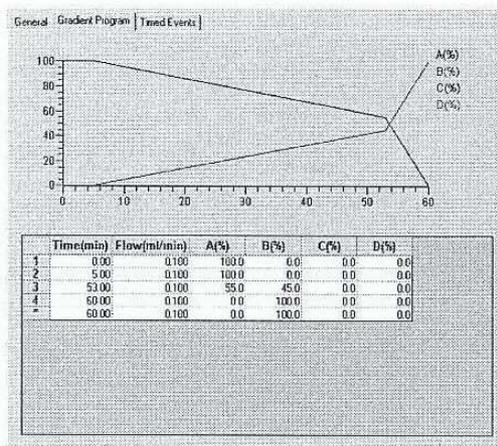


Figure 2-2. Gradient profile of peptide elution of PBZ digested with trypsin.

Buffer A: 5% acetonitril pH=1.9

Buffer B: 80% acetonitril pH=1.9

Elicitor 처리로 유기된 총 4개의 PBZ isoform(1~4번 spot)을 분리하여 LC-MS를 한 결과 2-DE상의 PBZ 1번은 다음과 같은 peak (Fig. 2-3)를 얻을 수 있었으며 이를 바탕으로 NCBI의 rice protein database 100,000여개의 protein sequence 중 Sequest<sup>R</sup> program으로

search를 하였다. 그 결과 sequence coverage 51.3%의 PBZ 1 와 sequence coverage 가 30% 인 root specific pathogenesis-related protein 10 이 동정되어 졌다 (Fig. 2-4)

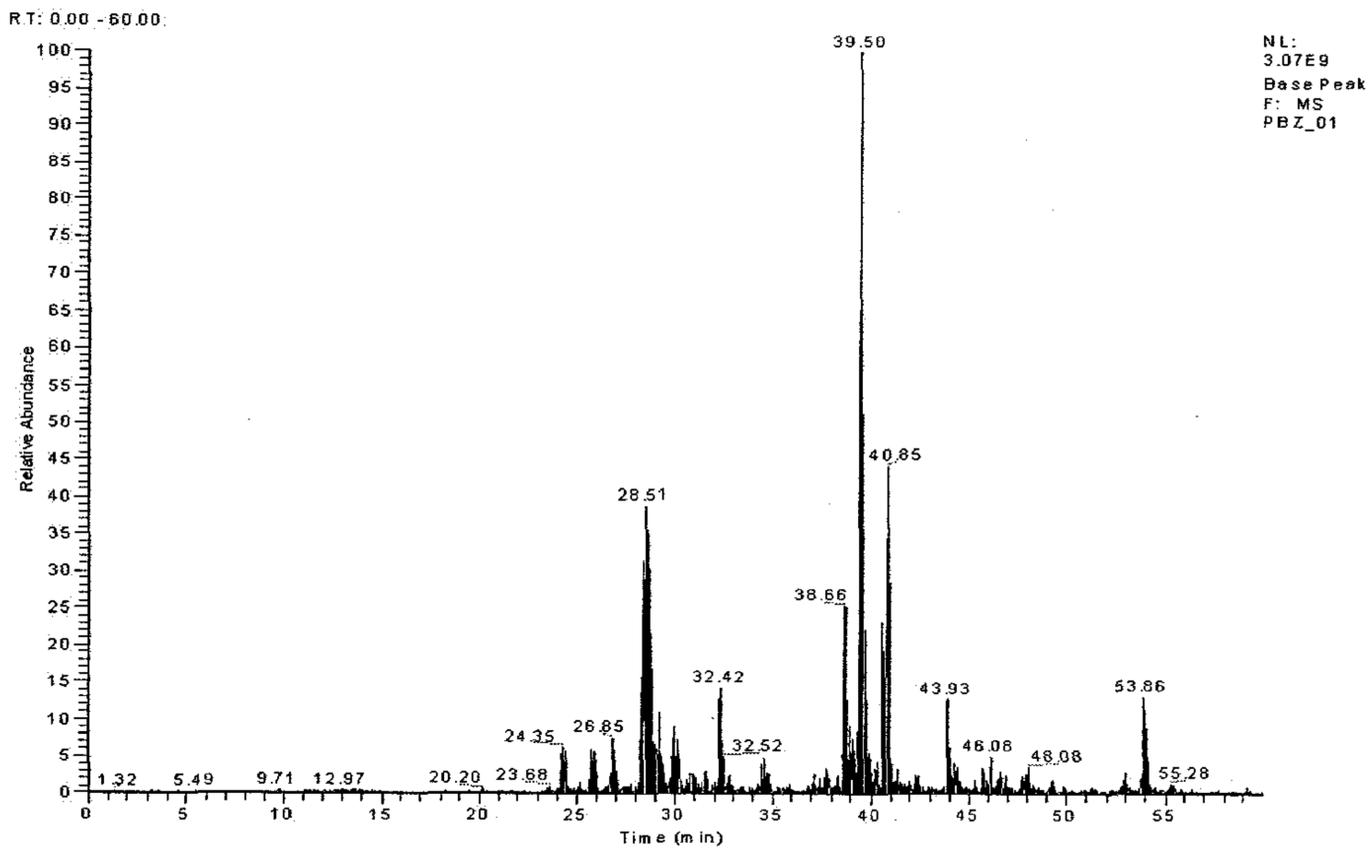


Figure 2-3. Collective peptide ions of PBZ 1(spot 1) separated by capillary HPLC.

gi 7442204 pir  T0297	8	9	51.3%	158	16688	5.0	probenazole-induced protein - rice				
Filename	XCorr	DeltCN	ObsM+H+	CalcM+H+	SpR	SpScore	Ion%	#	Sequence		
PBZ_01_1234_1234_2	2.2654	0.2437	1081.17	0.0	1	449.0	66.7%	1	K_AFMDASTLPK_A		
PBZ_01_1460_1460_2	2.7965	0.2417	2051.02	0.0	2	682.5	52.6%	1	G_IVDDIAVEGNGGPGTIYTMK_I		
PBZ_01_968_968_2	2.0343	0.089	1179.4	0.0	7	371.2	63.6%	1	K_INPAAGVGSTYK_T		
PBZ_01_402_402_2	2.5144	0.1359	978.46	0.0	8	914.9	87.5%	2	K_SDVLEAESK_V		
PBZ_01_1238_1238_3	3.4739	0.2756	2181.57	0.0	1	577.8	41.7%	1	K_IKVEYELEDGSSLSPEPEK_D		
PBZ_01_1402_1402_2	2.9464	0.2665	1532.59	0.0	1	935.7	70.8%	1	K_EKDIVDGYGMLK_M		
PBZ_01_1500_1500_1	2.2525	0.1822	1274.5	0.0	6	388.1	60.0%	1	K_DIVDGYGMLK_M		
PBZ_01_1499_1499_2	2.9273	0.2369	1275.55	0.0	1	808.0	75.0%	1	K_DIVDGYGMLK_M		

gi 38678114 dbj BAD03	4	4	30.0%	160	16900	5.0	root specific pathogenesis-related protein 10 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]				
Filename	XCorr	DeltCN	ObsM+H+	CalcM+H+	SpR	SpScore	Ion%	#	Sequence		
PBZ_01_790_790_2	2.5056	0.3134	974.07	0.0	1	976.5	87.5%	1	M_APVSIIDER_A		
* PBZ_01_975_975_2	2.1288	0.0619	1102.88	0.0	199	503.8	55.0%	1	K_SEVLDVPAGSK_V		
* PBZ_01_1422_1422_2	2.7417	0.1771	1879.52	0.0	1	1234.6	65.6%	1	K_INVEYELEDGSSLSPEK_E		
* PBZ_01_1876_1876_2	3.2502	0.3359	1271.15	0.0	4	570.7	80.0%	1	K_LILDGYFGMLK_M		

Figure 2-4. Homology search of Mass finger print of spot 1 from rice proteins.

동정 결과가 PBZ1와 Root specific pathogen-related protein 10이 함께 나오는 것은 두 유전자 간에 homology가 상당한 유사성으로 trypsin digestion에 의해 단편이 된 PBZ1 fragment들이 rice database에 모두 search됨으로 인하여 동시에 search가 되지만 PBZ1 의 sequence coverage 가 51%임으로 PBZ1임에 확실하다 (Fig. 2-4). Homology가 높은 peptide mass finger print에 대한 sequence alignment는 아래의 그림과 같다 (Fig. 2-5). 지금까지 등록된 PBZ1 단백질과 유사한 sequence search에 의하면 PBZ1, PR-10a, PR-10b,

root specific PR-10 4개의 단백질의 sequence homology를 찾을 수 있는데 PBZ1 와 PR-10a는 동일한 것이어서 현재까지 3개의 단백질 유전자가 있는 것으로 알려지고 있다.

**PBZ (D38170)**

```
MAPACVSDEH AVAVSAERLW KAFMDASTLP KACAGLVDDI AVEGNGGPGT
                    AFMDASTLP K    LVDDI AVEGNGGPGT
IYTMKLNPAAG VVGSTYKTRV AVCDAAASHVL KSDVLEAESK VGKCLKSHSTE
IYTMKLNPAAG VVGSTYK
TKLEATGDGS CVAKLKVEYE LEDGSSLSPE KEKDIVDGY GMLKMIEDYL
                    LKVEYE LEDGSSLSPE KEKDIVDGY GMLK
VAHPAEYA
```

**Root specific pathogenesis-related protein 10 (BAD03969)**

```
MAPVSISDER AVSVSAERLW KVFSDAPAMP KVCAGFIDAI EVEGDGGAGT
APVSISDER
VTMKNLPAV DDGGSEKTRV VARDNAAHII KSEVLDVPAG SKVGGKLSHV
                    SEVLDVPAG SK
TETKIEAAGA GSCLAKINVE YELEDGSSLS PEKEKLILDG YFGMLKMIED
                    INVE YELEDGSSLS PEK LILDG YFGMLK
YLVAHPTTEYA
```

Figure 2-5. Peptide(spot1) sequence alignment with PBZ1 and PR-10

2-DE 상에서 PBZ 2번 spot은 LC-Mass에 의해 다음과 같은 peak를 얻을 수 있었다 (Fig. 2-6)

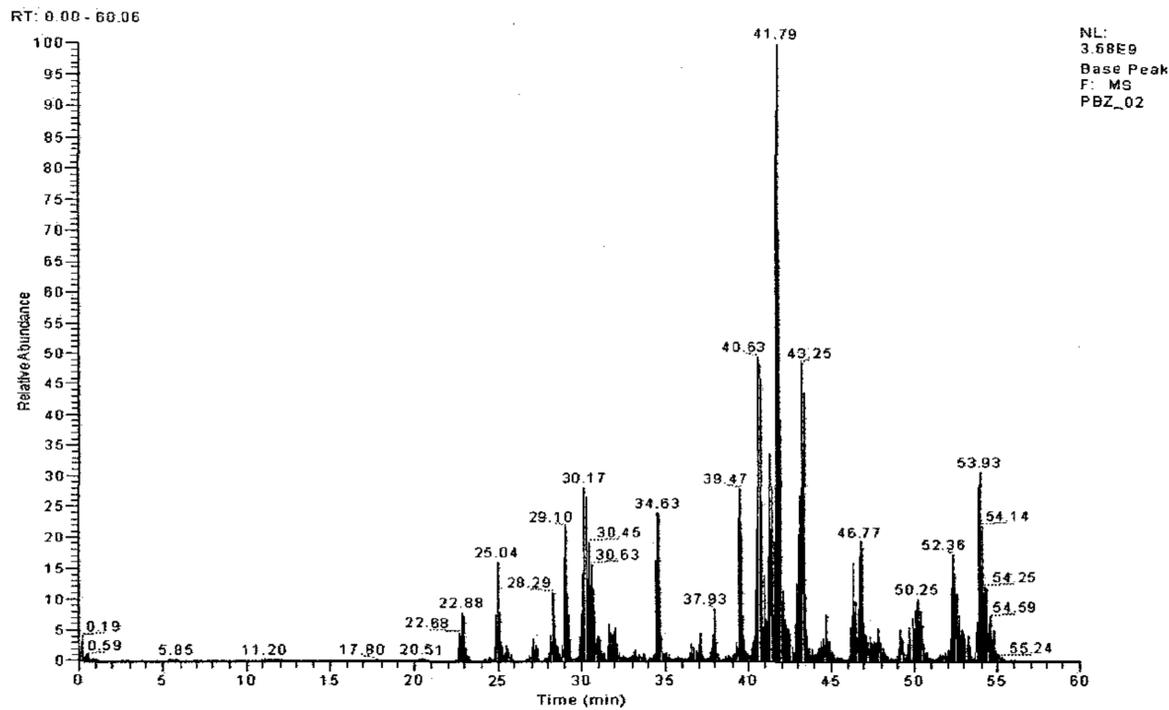


Figure 2-6. Collective peptide ions of PBZ 1 (spot 2) separated by capillary HPLC

이 peak를 통하여 rice database에 search 한 결과는 sequence coverage가 39.9%의 PBZ 동정되어 졌다. 또한 Root specific pathogen-related protein 10 도 sequence coverage가 38.1% homology가 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 2-7, 8). PBZ1와 root specific PR-10은 Japonica type에서 유래된 단백질이다.

II gi 7442204 pir  T0297 6 7 39.9% 158 16688 5.0 probenazole-induced protein - rice										
Filename	XCorr	DeltCN	ObsM+H+	CalcM+H+	SpR	SpScore	Ion%	#	Sequence	
PBZ_02.1303.1303.2	2.4686	0.2863	1082.74	0.0	1	606.6	77.8%	1	K.AFMDASTLPK.A 2	
PBZ_02.570.570.2	2.2353	0.0999	978.66	0.0	5	833.6	87.5%	2	K.SDVLEAESK.V 2	
PBZ_02.1358.1358.2	5.1476	0.4407	1923.57	0.0	1	2237.6	71.9%	1	K.LKVEYELEDGSSLSPEK.E 2	
PBZ_02.1300.1300.3	3.4298	0.2888	2182.53	0.0	1	586.5	41.7%	1	K.LKVEYELEDGSSLSPEKEK.D 3	
PBZ_02.1460.1460.2	3.1433	0.2223	1531.93	0.0	2	951.1	70.8%	1	K.EKDIVDGYGMLK.M 2	
PBZ_02.1574.1574.2	4.4055	0.3807	1622.61	0.0	1	1219.6	65.4%	1	K.MIEDYLVAHPAEYA.- 2	

II gi 38678114 dbj BAD03 7 9 38.1% 160 16900 5.0 root specific pathogenesis-related protein 10 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]										
Filename	XCorr	DeltCN	ObsM+H+	CalcM+H+	SpR	SpScore	Ion%	#	Sequence	
* PBZ_02.1055.1055.1	2.272	0.1863	1220.63	0.0	2	690.5	68.2%	1	K.LNPAVDDGGSFK.T 1	
* PBZ_02.38.38.2	2.4156	0.1693	882.64	0.0	1	1228.9	92.9%	2	R.DNAAHIK.S 2	
* PBZ_02.1022.1022.2	2.5047	0.0587	1102.9	0.0	109	654.1	65.0%	1	K.SEVLDVPAGSK.V 2	
* PBZ_02.1471.1471.2	5.2171	0.3842	1881.06	0.0	1	2143.5	68.8%	1	K.INVEYELEDGSSLSPEK.E 2	
* PBZ_02.1415.1415.2	4.0743	0.2632	2137.18	0.0	1	737.6	52.8%	1	K.INVEYELEDGSSLSPEKEK.I 2	
* PBZ_02.1414.1414.3	3.0317	0.1976	2137.47	0.0	532	289.2	30.6%	1	K.INVEYELEDGSSLSPEKEK.I 3	
* PBZ_02.2058.2058.2	2.941	0.2556	1271.41	0.0	1	795.6	90.0%	2	K.LILDGYFGMLK.M 2	

Figure 2-7. Homology search of Mass finger print of spot 2 from rice proteins

```

PBZ (D38170)
MAPACVSDER AVAVSAERLW KAFMDASTLP KACAGLVDDI AVEGNNGGPGT
AFMDASTLP
IYTMKLNPAAG VVGSTYKTRV AVCDAASHVL KSDVLEAESK VGKCLKSHSTE
SDVLEAESK
TKLEATGDGS CVAKLKVEYE LEDGSSLSPE KEKDIVDGYG GMLKMIEDYL
LKVEYE LEDGSSLSPE KEKDIVDGYG GMLKMIEDYL
VAHPAEYA
VAHPAEYA

Root specific pathogenesis-related protein 10 (BAD03969)
MAPVSISDER AVSVSAERVW KVFSDAPAMP KVCAGFIDAI EVEGDGGAGT
VTTMKNLPAV DDGGSFKTRV VARDNAAHII KSEVLDVPAG SKVGKCLKSHV
LNPAV DDGGSFK DNAAHII KSEVLDVPAG SK
TETKIEAGA GSCLAKINVE YELEDGSSLS PEKEKLILDG YFGMLKMIED
INVE YELEDGSSLS PEK LLLDG YFGMLK
YLVAHPTEYA

```

Figure 2-8. Peptide(spot2) sequence alignment with PBZ1 and PR-10

2-DE 상에서 PBZ1 3번 spot를 동정한 결과 다음과 같은 peak값을 얻을 수가 있었으며 앞 PBZ 1, 2번과 같이 sequence coverage가 높지 않았으며 그중 7.6%의 sequence coverage 값을 가지는 PBZ1를 확인 할 수 있었다(Figure 2-9, 10, 11).

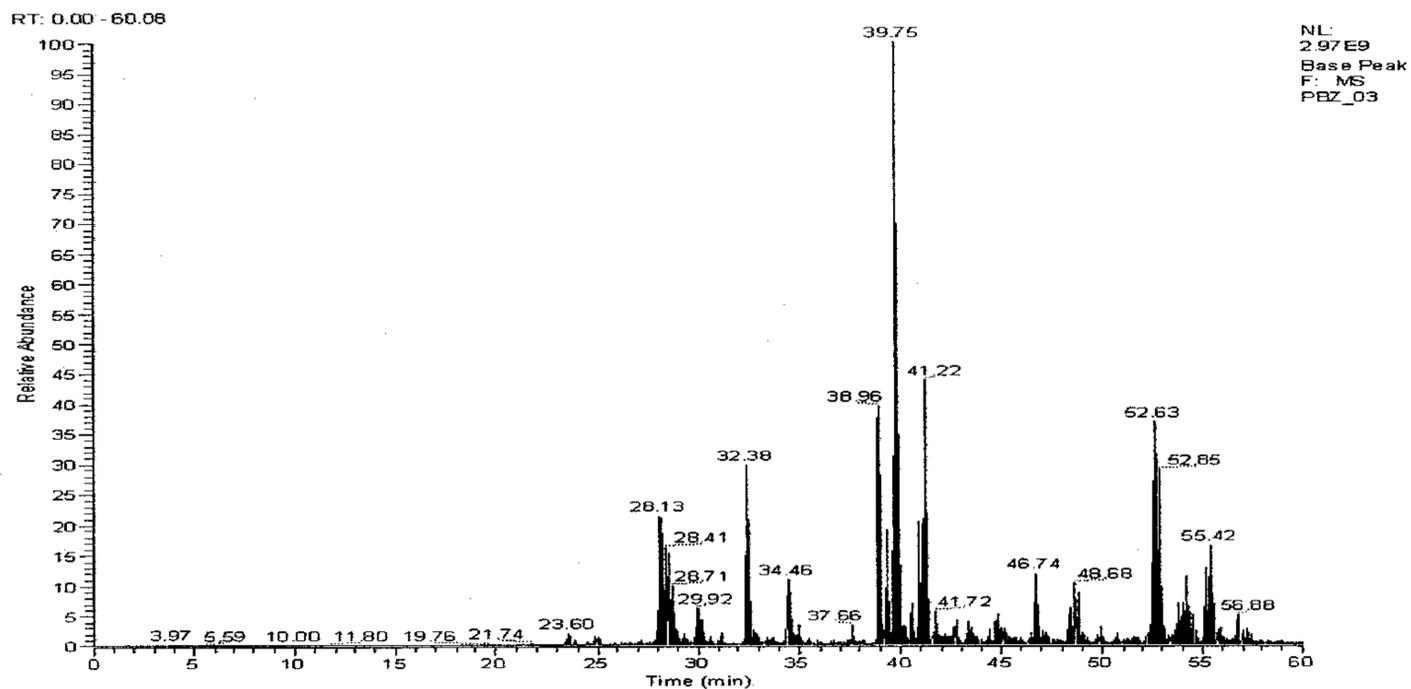


Figure 2-9. Collective peptide ions of PBZ 1 (spot 3) separated by capillary HPLC.

gi 7442204 pir  T0297	1	1	7.6%	158	16688	5.0	probenazole-induced protein - rice		
Filename	XCorr	DeltCN	ObsM+H+	CalcM+H+	SpR	SpScore	Ion%	#	Sequence
PBZ_03.1208.1208.2	2.2955	0.1281	1178.37	0.0	2	641.6	77.3%	1	K <sub>1</sub> LNPAAGVGSTYK <sub>1</sub>

Figure 2-10. Homology search of Mass finger print of spot 3 from rice proteins.

**PBZ (D38170)**

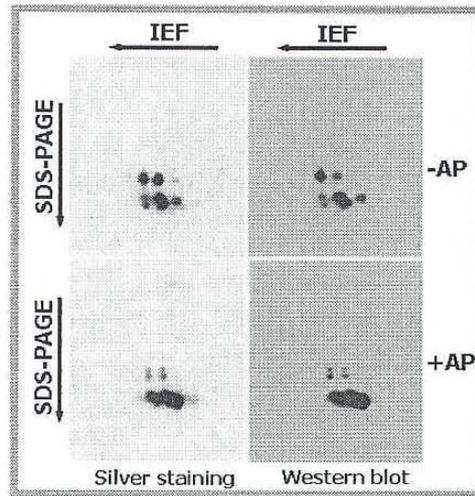
MAPACVSD~~EH~~ AVAVSAERLW KAFMDASTLP KACAGLVDDI AVEGNGGPGT  
 IYTMKLNPAAGVGSTYKTRV AVCDAAASHVL KSDVLEAESK VGKCLKSHSTE  
 LNPAAGVGSTYK  
 TKLEATGDGS CVAKLKVEYE LEDGSSLSPE KEKDIVDGYG GMLKMIEDYL  
 VAHPAEYA

Figure 2-11. Peptide (spot3) sequence alignment with PBZ1 and PR-10.

PBZ isoforms의 RNase 활성 검사 미흡했다. 8개의 PBZ isoforms는 phosphorylation 과정을 거쳐 생성되는 것으로 보여 지지만 아직까지 정확한 mechanism를 밝히지는 못하고 있다. 8개의 isoforms는 fractionation 과정을 거쳐 2-DE gel에서 단백질을 회수 하여 담배 잎에 1차적으로 RNase활성을 가지므로 해서 cell death가 일어남을 확인 하였고 보충적으로 rice callus에서도 이러한 현상 유무를 확인하고 있다. 본 과제에서 하나의 PBZ1 유전자에서 4~6개의 isoform이 생성됨을 2-DE 와 western 분석을 통하여 확인 할 수 있었다. 그러나 이들 isoform이 어떻게 modification되어 있는지 확인 하려 하였으나 위의 LC-MS/MS분석을 통하여 확인한바 아직까지 rice database에 PBZ1에 대한 유전자 정보가 상기 설명 한 것 외에는 아직은 없어서 LC-MS 으 로 가 isoform 별 단백질 sequence를 찾을 수 없는 애로점이 있다. 모든 isoform의 peptide sequence를 얻기 위해서는 각 peptide 별 internal sequencing을 해야 하는데 이는 현실적으

로 아주 어려운 실정이다. 이에 대한 보완실험으로 Invitrogen에서 최근 새로 개발한 GeneMiner라는 Gateway system을 이용한 cDNA library를 구축하고 있으며 이 library로부터 PBZ1의 isoform들을 분리하는 alternative 방법이 고안되어야 할 것이다.

그래서 우리는 PBZ1 중 가장 많이 발현되는 spot 3을 회수하여 alkaline phosphatase 처리하여 인산화 되는지를 2-DE gel 상에서 조사하였다. Figure 2-12에서 보는 것처럼 spot 3은 인산화 되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Figure 2-1에서 Spot 3의 세포사멸 활성이 거의 없었다. 이는 아마도 PBZ1 spot3에 인산화 됨으로써 세포사멸의 negative regulation된 것으로 추정된다.



**Figure 2-12.** Identification of phosphorylated PBZ protein after alkaline phosphatase treatment.

최근 고추 PR-10단백질이 인산화 되어서 RNase의 활성을 activation하는 것으로 발표되었는데, 우리의 결과와 상반된 결과를 보였다. 그래서 PBZ1의 RNase 활성이 벼에서는 인산화에 의해서 불활성화되고 그 결과 세포사멸이 억제된 것으로 예상된다. 이에 대한 자세한 실험은 차 후 계속 진행될 필요가 있을 것 같다.

### 제 3 절 형질 전환체 (DEX:PBZ1)작물의 세포 사멸 방지 유전자 분리

세포 사멸 방지 인자를 분리하기 위하여 DEX inducible vector에 cloning된 Arabidopsis 종자에 EMS chemical를 처리하여 DEX에 의하여 cell death가 유도 되지 않는 Plant screening을 실시하였다 (Figure 1). 이는 EMS chemical을 통한 screening 과정이 잘 진행 되어 졌으며 이를 통한 세포 사멸 방지 유전자를 찾기 위한 다양한 연구들이 수행 중에 있기 때문이다. 각각 DEX inducible vector에 cloning된 세포 사멸이 일어나는 5개 line에 대하여 0.25% EMS 처리 시 mutant 획득이 가장 좋았으며 각각 line에 대하여 EMS 처리 후 DEX에 의하여 죽지 않은 Arabidopsis를 확보 하였다 (Fig 3-1A). Screening을 통해 살아남은 Arabidopsis와 죽은 plant와의 Northern blot 분석을 하여본 결과 살아남은 plant 들은 죽은 식물체와 비교하여 PBZ 발현이 매우 감소 또는 발현 되지 않음을 확인하였다 (Fig. 3-1B). 현재 이들 5종의 line을 고정하여 계속 연구 수행 중에 있다. EMS mutant을 이용한 실험은 오랜 시간이 요구되는 만큼 차 후 연구의 연속성이 요구된다.

특히 세포 사멸 방지 유전자를 획득하기 위하여 Seegene 회사에서 개발된 ACP™ (Annealing Control Primer) 기술을 이용하여 분리하고자 하였다. ACP™는 신개념의 primer 디자인 기술로 10 mer의 짧은 target sequence를 가진 primer를 사용하더라도 오히려 일반 conventional primer 보다 specificity를 향상 시켜 정확한 PCR product를 얻을 수 있으며, ACP 의 장점은 regulator 부위를 가지는 ACP 구조에서 찾을 수 있는데, Regulator 부위를 구성하는 Inosine은 G, A, T, C에 비해 낮은 Tm 값을 가지는 universal base이므로 특정 온도에서 "bubble like structure"를 형성하여 primer가 template와 비 특이적으로 결합되는 것을 차단하고 3'-target core sequence 부위만이 template의 원하는 부위와 결합할 수 있게 하여 PCR의 specificity를 극대화 시키는 역할을 하기에 세포 사멸 방지 유전자를 Screen하기에 좋은 방법이라 생각 되어진다.

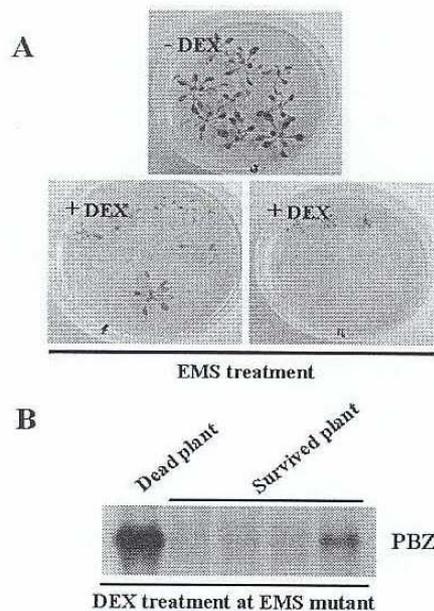


Figure 3-1. EMS mutant screen for finding cell death regulation gene and Northern blot analysis from EMS mutant.

## 제 4 절 PR-10 유전자 및 단백질 상호 결합 단백질 분리 및 특성 연구

본 대학 홍종찬 교수가 제작한 B-box ZINC-finger protein family, b-ZIP transcription factor family, AP2/EREBP transcription factor family, MYB transcription factor family 그리고 WRKY transcription factor 등 flower 모아 leaf development, defense response, GA 합성 조절에 관여하는 1000여종의 전사조절인자 (TF) clone을 이용하여 PBZ1과 PR-10유전자관에 환경스트레스 신호전달 관련 핵심 유전자 규명 하고자 Yeast two hybrid(Y2H)를 실시하였다 (Fig. 4-1). 본 연구진은 Gateway system를 이용하여 pDEST32 bait vector에 PBZ1과 PR-10유전자를 cloning하고 pDEST22 prey vector에 애기 장대의 TF library를 cloning한 다음 Bait DNA와 Prey DNA를 pJ694A cell에 transformation 시킨 후 His, Ade가 들어간 agar plate에서 형질전환 된 정도를 확인하고, His, Ade이 포함 되지 않은 agar selection plate와 DEST32::HY5 - pDEST22::STO을 positive control로 사용하고 pDEST32 - pDEST22를 negative control로 사용하여  $\beta$ -galactosidase assay에서 두 개의 DNA가 상호 결합을 하는지 확인 하였으나 PBZ1, OsPR-10과 interaction 하는 TF을 찾지 못하였다 (Fig 4-2). 이러한 결과는 본 연구진이 확보한 전사조절인자가 애기장대의 TF clone으로서 실제로 비의 TF와는 많은 차이가 나며, 특히나 PBZ1 유전자는 애기장대에서 유사 유전자의 존재가 없는 것으로 밝혀짐으로 해서 전사 조절인자를 찾는데 많은 어려움이 있으며, 이러한 문제점을 보완하기 위해서는 비 전사조절인자 library 구축이 시급하다.

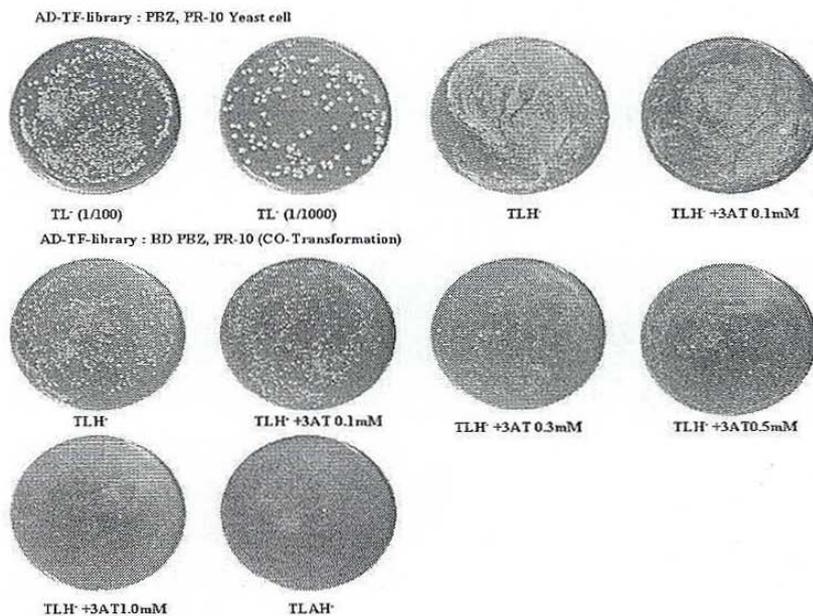
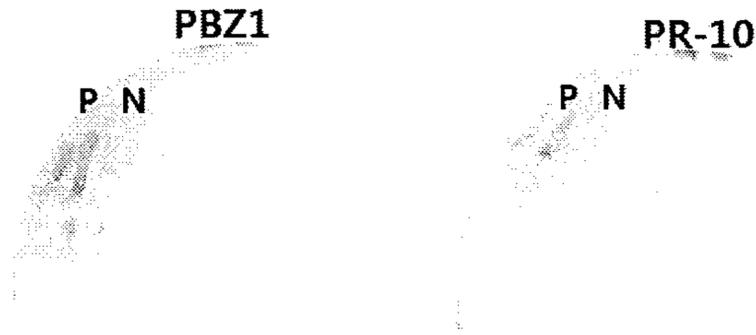


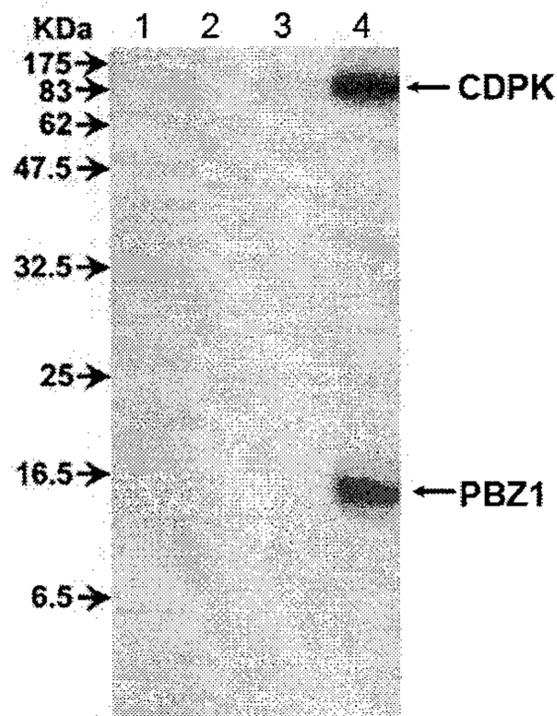
Figure 4-1. Yeast two hybrid screen between PBZ1, PR-10 and transcription factor.

$\beta$ -galactosidase assay



**Figure 4-2.** Interaction screen between PBZ1, PR-10 and arabidopsis transcription factor by yeast two hybrid. (P; positive control, N; negative control)

최근 PBZ1 단백질의 인산화에 의해서 조절된다는 보고가 있어, 우리는 다양한 kinase 단백질들과 PBZ1 단백질과의 interaction 연구를 수행하였다. 그 중 calcium dependent protein kinase 와 Ca 의존적으로 interaction 하는 것을 발견 할 수있었다 (Fig. 4-3). 하지만 PBZ1과 CDPK간의 in vivo interaction은 아직 규명되지 못했다. 아마도 CDPK가 PBZ1가 interaction 함으로써 PBZ1의 활성을 불활성화하고 차후 RNase 활성및 세포사멸을 억제하는 것으로 예상된다. 이들 interaction간에 연구가 계속 CDPK 및 PBZ1 RNAi 및 mutant을 이용한 더 많은 연구가 필요하다.



**Figure 4-3.** Interaction of PBZ1 with rice CDPK.

1. BSA control, 2. PBZ1 +CDPK, 3. PBZ1+CDPK+EGTA, 4. PBZ1+CDPK+CaCl<sub>2</sub>

## 제 5 절 병저항성 유전자 분리를 위한 Microarray 분석

본 연구진은 Y2H를 통하여 전사조절인자를 찾기 위한 시도를 하였으나 실제로는 찾지를 못하였다. 그럼 실제로 도열병에 의해서 발현되어지는 유전자들의 패턴을 알아보기 위해 새추청 품종을 이용한 시간별 도열병에 의해서 유도되어지는 유전자 발현 정도를 확인하였다. 유전자 발현 양상을 알아보기 위하여 일본 Kikuchi 박사에 의해 개발된 22K microarray chip을 통한 저항성과 이병성 간에 12, 24, 60시간으로 microarray 분석을 실시하였다(그림 5-1). 저항성과 이병성 반응을 일으키는 샘플에 Cy3 와 Cy5를 labeling하여 유전자의 발현 pattern을 확인하여 유전자들의 발현패턴이 전체 2배 이상 증감 하는 유전자들을 확보할 수 있었다(Table 5-1). 그러나 아래 표에서 보는 것과 같이 22000개의 유전자를 통한 microarray 분석에서 많은 유전자들이 발현의 증가 또는 감소를 나타내고 있지만 아직까지 annotation이 잘 이루어 지지 않아 많은 유전자들의 정보를 얻지 못하였으며, 전사조절인자가 발현 될 것임에도 불구하고 그 발현의 변화가 적어 실질적으로 찾아내기 힘든 어려움이 있어 전사 조절인자와 관계를 확인하기 위한 새로운 접근 방법의 개발이 절실하다.



**Figure 5-1.** Differential expression patterns of transcripts of rice leaves inoculated by rice blast fungus using Rice 22K 60-mer oligonucleotide chip.

**Table 5-1.** 도열병 처리 후 공통적으로 2배 이상 증감한 유전자

2배 증가 유전자

AK063117	Triticum durum mRNA for lipid transfer protein
AK107688	Nicotiana plumbaginifolia mRNA for ABC1 protein.
AK064229	Arabidopsis thaliana unknown protein (At4g24350) mRNA, complete cds.
AK062520	Oryza sativa lectin-like protein mRNA, complete cds.
AK058583	Arabidopsis thaliana clone 15081 mRNA, complete sequence.
AK071173	Arabidopsis thaliana unknown protein (At1g14870) mRNA, complete cds.

AK058313	<i>Oryza sativa</i> metallothionein-like protein mRNA, complete cds.
AK107926	<i>Triticum aestivum</i> pathogenesis-related protein 1 mRNA, complete cds.
AK105387	Unknown expressed protein
AK103162	<i>Oryza sativa</i> metallothionein-like type 1 (OsMT-1) mRNA, complete cds.
AK060247	<i>Anthoceros formosae</i> chloroplast rps7 mRNA for ribosomal protein S7, complete cds.
AK072461	<i>Oryza sativa</i> OsDTC1 mRNA for putative diterpene cyclase, complete cds.
AK109673	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative reticuline oxidase-like protein (At1g30700) mRNA, complete cds.
AK061327	<i>Ipomoea batatas</i> hcbt mRNA for N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, complete cds. PLN
AK071103	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica acidic PR-1 type pathogenesis-related protein PR-1a (PR-1a) mRNA, complete cds.
AK065971	<i>Triticum aestivum</i> N-1 mRNA for cytochrome P450, complete cds.
AK104985	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative UDP-glucose glucosyltransferase (At1g22360) mRNA, complete cds.
AK107161	<i>Linum usitatissimum</i> allene oxide synthase mRNA complete cds.
AK071613	Rice mRNA for probenazole-inducible protein PBZ1, complete cds.
AK062563	Unknown expressed protein
AK058516	<i>Oryza sativa</i> chloroplast rubisco large subunit (rbcL) mRNA, complete cds.
AK100135	<i>Nicotiana tabacum</i> NtPDR1 mRNA for pleiotropic drug resistance like protein, complete cds.
AK069182	<i>O.sativa</i> mRNA for thaumatin-like protein.
AK069392	<i>Zea mays</i> mRNA for flavin containing polyamine oxidase (PAO).
AK109058	<i>Arabidopsis thaliana</i> clone 12638 mRNA, complete sequence.
AK110682	<i>Glycine max</i> isoflavone reductase homolog 1 (IFR1) mRNA, complete cds.
AK072928	<i>Scoparia dulcis</i> cps mRNA for copalyl diphosphate, complete cds.
AK104139	<i>Oryza sativa</i> endo-1,3-beta-glucanase mRNA, complete cds.
AK102970	<i>Oryza sativa</i> pathogenesis-related thaumatin-like protein mRNA, complete cds.
AK073273	Rice mRNA for RAB24 protein, complete cds.
AK110725	<i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (At3g22060) mRNA, complete cds.
AK108264	Unknown expressed protein
AK062495	<i>H.vulgare</i> mRNA for subtilisin-chymotrypsin inhibitor 2.
AK099157	Rice mRNA for probenazole-inducible protein PBZ1, complete cds.
AK073249	Unknown expressed protein
AK058333	<i>Pinus contorta</i> beta-glucosidase mRNA, complete cds.
AK071913	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA for oryzain alpha, complete cds.
AK107136	<i>Arabidopsis thaliana</i> At5g06570 mRNA for unknown protein, complete cds,
AK108084	<i>Arabidopsis thaliana</i> clone 21639 mRNA, complete sequence. PLN
AK061337	<i>Arabidopsis thaliana</i> flavanone 3-hydroxylase-like protein (At5g24530) mRNA, complete cds.

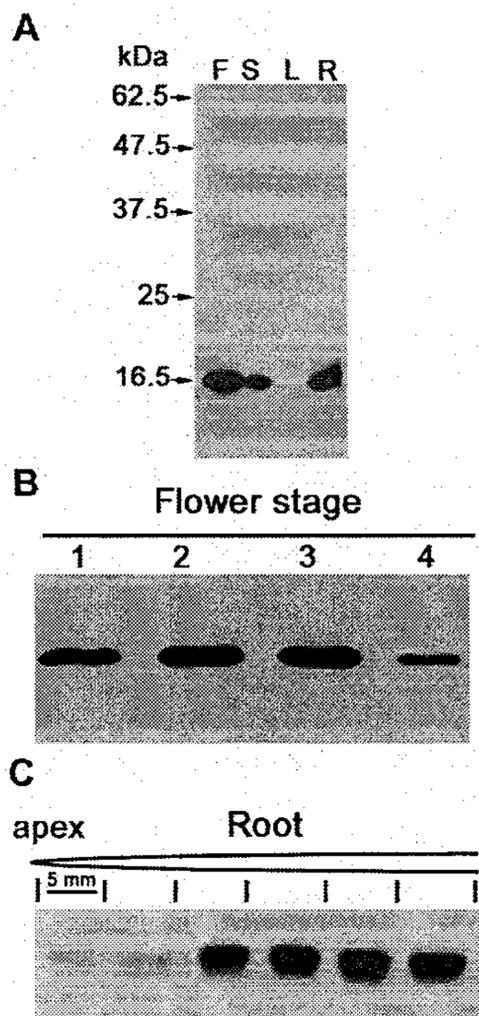
2배 감소 유전자

AK073119	Unknown expressed protein
AK073689	Arabidopsis thaliana unknown protein (At2g26770) mRNA, complete cds. PLN
AK066005	Arabidopsis thaliana clone 37855 mRNA, complete sequence. PLN
AK111859	Oryza sativa (japonica cultivar-group) mRNA for MADS box-like protein, complete cds, clone:C50086. PLN
AK066053	Hordeum vulgare NBS-LRR type resistance protein (b8) mRNA, partial cds. PLN
AK068602	Zea mays transposon Doppia transposase DOPD and transposase DOPA mRNA, complete cds. PLN
AK071032	Unknown expressed protein

## 제 6 절 벼 유래의 리보뉴클레아제 활성을 가지는 OsPR-10 단백질의 기능연구

PR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성은 몇몇 작물에서만 보고되어져 있으며 벼에서는 PR-10 단백질의 기능 및 세포내 발현위치, 리보뉴클레아제 활성에 대해 거의 보고되어져 있지 않다. 이에 우리는 벼 유래 OsPR-10 단백질의 기능을 연구하던 중, 세포내 발현위치를 웨스턴 블릿과 면역조직화학염색 분석을 통해 확인하고, 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 발현패턴 및 스트레스 저항성을 증가시키는 방법과 이황화결합이나 이합체 형성에 의존하는 리보뉴클레아제 활성을 가지는 항바이러스 단백질로 식물의 구조상의 자가 방어 메카니즘으로 작용할 수 있다는 것을 밝혔다.

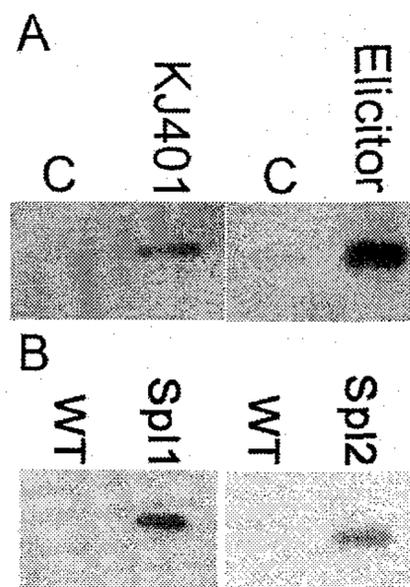
벼 식물의 잎, 꽃, 줄기, 뿌리를 포함한 성숙한 조직에서 OsPR-10의 구성적 발현은 웨스턴 bolt 분석을 이용하여 분석하였다. 그 결과 OsPR-10이 성숙된 식물의 뿌리 및 꽃에서 비 특이적 밴드의 생성 없이 현저하게 발현량이 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 줄기에서는 발현되어지는 것을 관찰할 수 있었지만 잎에서는 관찰되어지지 않았다 (Fig. 6-1A). 각각의 조직에서 OsPR-10의 축적은 다른 개화단계에서 샘플을 채취하고 웨스턴 블릿 분석을 실시하여 발현량을 관찰하였다 (Fig. 6-2B). 그 결과 OsPR-10 단백질은 모든 발달 단계에서 확인되었지만 종자 발달단계에서는 거의 확인되지 않았다. 뿌리에서 단백질의 분포를 측정하기 위해, 본 연구에서는 3일 경과된 뿌리조직을 잘라서 사용하였다. 측정결과 OsPR-10 단백질의 수준은 분리부, 줄기성장부, 발달부를 통해 뿌리로부터 위로 갈수록 점점 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6-1C).



**Figure 6-1.** Accumulation of OsPR-10 protein in the developmental tissues.

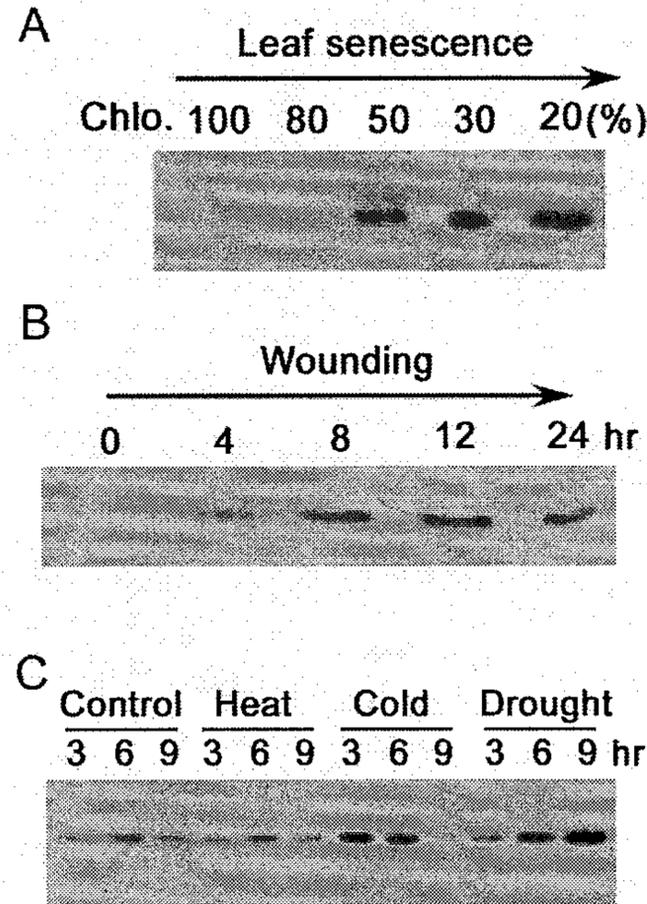
A) Expression of OsPR-10 in mature rice plants (F: flower, S: stem, L: leaf, R: root). B) Expression of OsPR-10 according to flowering stage (lane 1; close stage, 2; open stage, 3; heading stage, 4; seed developing stage). C) Distribution of the expression of OsPR-10 in the root.

OsPR-10 단백질(Kim et al. 2003 and 2004)이 벼 도열병에서 중요한 역할을 수행한다는 것을 이미 규명하였다. 본 과제에서는 OsPR-10 단백질이 자스몬산, 살리실산, 벼도열병 뿐만 아니라 lesion mimic mutant (*spl1* 및 *spl2*), 노화, 상처, 저온, 건조 스트레스에 의해서도 발현이 유도되어지는 것을 확인하였다. 전체 단백질은 *spl1* 및 *spl2*로부터 추출하고 SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 본 연구에서는 벼 잎은 도열병(KJ401)에 감염시켜서 사용하였고, 현탁 배양세포는 양성대조구로서 곰팡이 유인제로 처리하였다 (Fig. 6-2A). 웨스턴 블롯 분석결과 야생형 식물과 비교했을 때 OsPR-10 단백질은 *spl1* 및 *spl2*에서 축적되어 나타났다(Fig. 6-2B). 잎의 노화는 광 또는 암 조건에 의해 유도된 세포사의 발달과정이다. 본 연구에서는 분리된 벼 잎의 노화를 관찰하는 동안 OsPR-10 단백질의 축적을 확인하였다. 잎 노화성분은 전체 엽록소 함량의 변화를 측정하여 확인하고, 그림 6-3A에서 알 수 있듯이, OsPR-10 단백질의 발현은 엽록소 함량이 80%로 떨어졌을 때 시작되어 점점 노화된 잎에서 엽록소 함량이 감소되어지는 기능이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 식물에서 상처는 생물학적 스트레스에 의해 야기되는 것으로 병원균에 의해 유도되는 것과 유사한 반응을 보인다. 본 과제에서는 도구를 이용하여 상처를 낸 다음 4, 8, 12, 24시간이 경과했을 때 OsPR-10 단백질의 발현을 관찰하였다. 웨스턴 블롯 분석을 통해 상처 후 4시간에서 OsPR-10 단백질의 발현이 증가되어지며, 12시간이 경과했을 때 가장 높은 수준으로 발현이 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6-3B). 또한 비생물학적 스트레스 조건에 따른 OsPR-10 단백질의 발현을 확인하기 위해, 본 연구에서는 벼 잎 및 줄기를 건조, 열(42°C) 및 저온 (4°C)상태로 노출시켰다. Figure 6-3C에서 알 수 있듯이, 웨스턴 블롯 분석결과 저온 및 건조처리로 인해 줄기에서만 OsPR-10 단백질의 발현량이 급속도로 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 저온처리 후 3시간 이내에 OsPR-10 단백질의 발현이 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 OsPR-10 단백질은 열 스트레스 처리에 의해서는 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다.



**Figure6-2.** Induction of OsPR-10 following biotic stresses, such as pathogen infection, treatment with fungal elicitor, and in lesion mimic mutants (*spl1* and *spl2*) in rice. Extracted proteins (10  $\mu$ g/lane) were separated by SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and probed with anti-OsPR-10 antibody (dilution 1:1000).

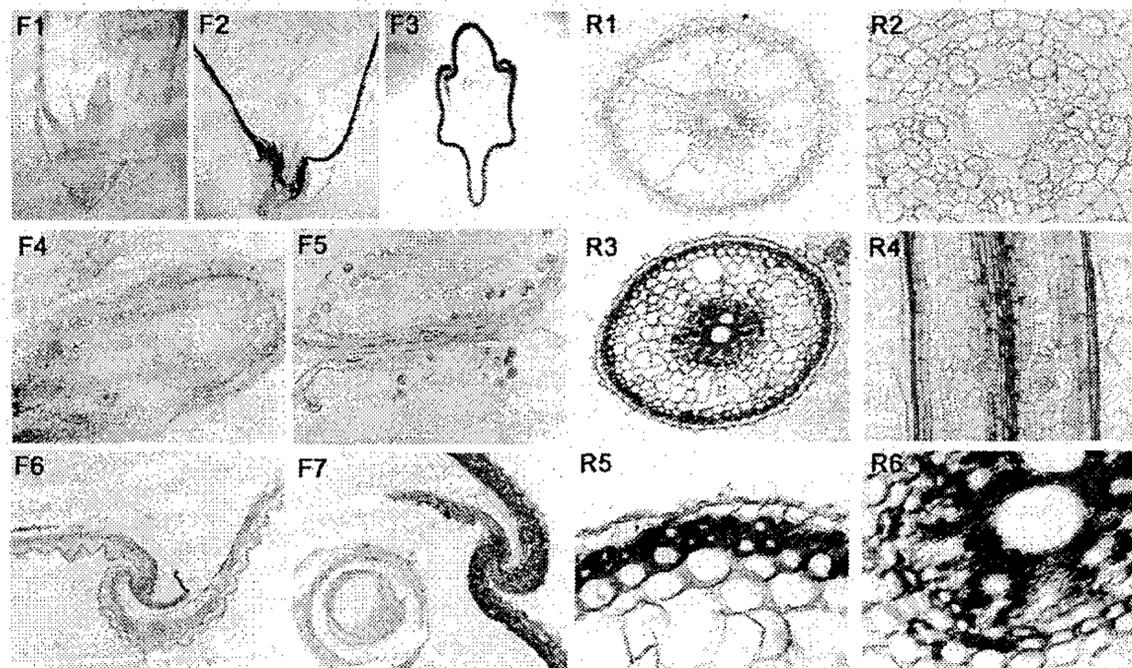
OsPR-10의 발달, 조직-특이적인 발현양상을 확인하기 위해, 우리는 출수기의 꽃과 뿌리에서 면역조직화학적 염색분석을 실시하였다 (Fig. 6-4). 면역위치 확인시험결과 OsPR-10은 특이적으로 꽃의 안껍질과 바깥껍질에서 발현되어지지만 (Fig. 6-4 F2, F3, F7) 화분과 씨방 조직에서는 관찰할 수 없었다 (Fig. 6-4 F4, F5). OsPR-10은 목질생성조직/세포외층을 포함한 뿌리의 세포외층 및 내피의 안부분에서 확인되어졌다 (Fig. 6-4 R3-6 ). 비 생물학적 스트레스에 노출된 잎과 자엽초에서 OsPR-10은 관다발조직에서 발견되어졌다. 이러한 결과는 벼 도열병에 감염된 잎에서 단백질의 위치패턴을 설명해준다 (Kim et al. 2004).



**Figure6-3.** Induction of OsPR-10 by abiotic stresses during leaf senescence, wounding, cold, and drought in rice. Detached leaves were used to examine leaf senescence under various light conditions. The level of senescence was estimated by measuring the relative chlorophyll (Chlo) content. Rice plants grown at 28 °C were subjected to environmental stresses, such as wounding, heat (42 °C), cold (5 °C), or drought for various times (hrs) as indicated in the figure. The extracted proteins (10 µg/lane) were separated by SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and probed with anti-OsPR-10 antibody (dilution 1:1000).

재조합 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 확인하기 위해 벼 잎에서 분리된 RNA에 OsPR-10 단백질을 농도별, 시간별로 처리하여 RNase activity가 있다는 것을 agarose gel 을 통해 확인 하였으며 (그림 6-5), in-gel RNase activity 측정을 통하여 OsPR-10 단백질 은 비환원성 (DTT가 없는) 겔에서는 리보뉴클레아제 활성을 나타내었지만, 환원성 겔에서 는 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 6-6A). 이러한 결과는 이합체화물 또는 분자내 이황화결합의 형성과 유지에 따른다는 것을 나타내면서 베타-머르캅토에탄올과 DTT같은 환원성 물질로부터 무효화되는 것을 의미한다 (Fig. 6-6B). Figure 6-6C에서 보면 밴드들 사이에서

크기가 작을수록 더 강한 활성을 나타내며 이합체 형성이 실질적으로 OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다. OsPR-10 단백질 단량체는 가장 약한 리보뉴클레아제 활성을 나타내었다. 따라서, 본 연구에서는 OsPR-10의 리보뉴클레아제 활성이 단백질 구조 결정에 중요한 역할을 담당한다는 것을 확인할 수 있었다. 이것을 증명하기 우리는 두개의 시스테인 잔기를 세린으로 교환한 돌연변이체를 제조하였다 (OsPR-10 C81S, C83S 및 C81S/C83S). 돌연변이체의 서열은 pQE 30 발현벡터로 클론하고 재조합 단백질을 발현하기 위해 사용하였다. 리보뉴클레아제 활성을 가지는 것으로 확인된 밴드에서는 확인되지 않았으며 돌연변이체 추출물은 웨스턴 블릿을 통해 분석하였다 (Fig. 6-6C). 리보뉴클레아제 활성을 비교하기 위해, 본 연구에서는 *E. coli*에서 발현된 재조합 돌연변이 단백질로부터 돌연변이 단백질을 정제하였다. Figure 6-6 C, D에서 보면 C83S 돌연변이는 아크릴아미드 및 아가로스 겔에서 거의 활성을 나타내지 않았으며 이러한 결과는 두개의 시스테인 잔기 사이의 이황화결합이 PR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 나타내는 것을 의미한다.

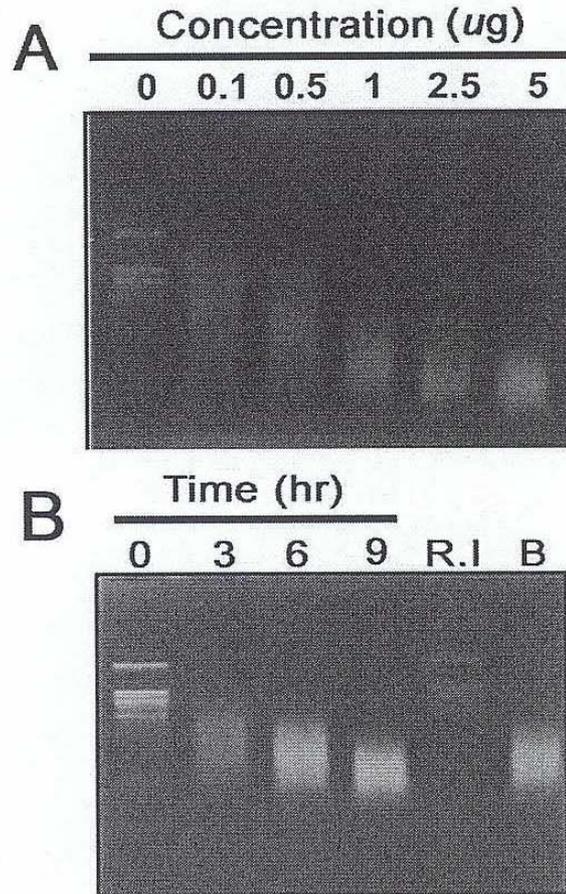


**Figure6-4.** Immunolocalization of OsPR-10 proteins in flower and root.

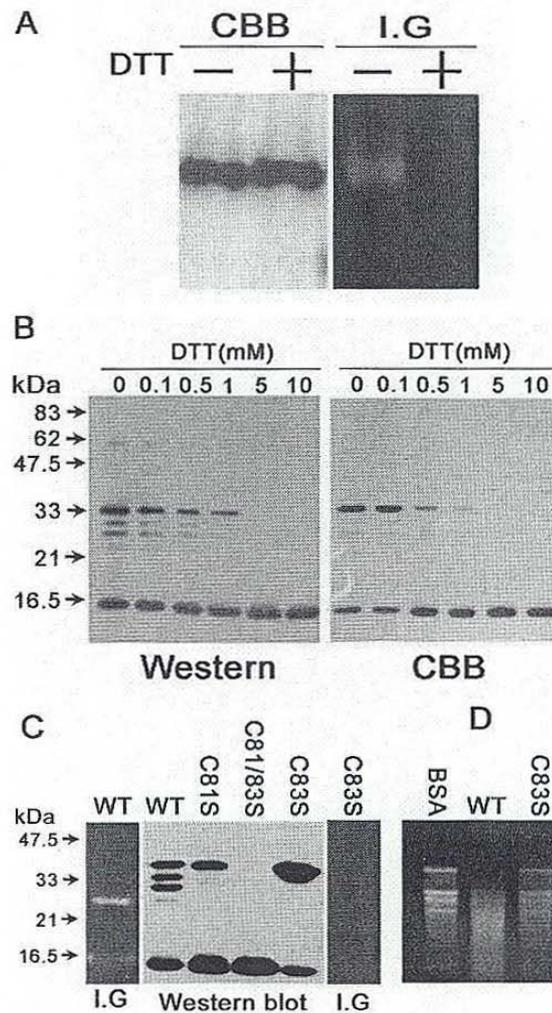
For immunohistochemical analysis, sections from developmental tissues (flowers and roots) obtained with a microtome were incubated with purified OsPR-10 antibody (dilution 1:100). Transverse (F1-F3) and longitudinal (F4-F7) sections of the panicle (heading stage) and transverse (R1, 2, 3, 5, and R6) and longitudinal (R4) sections of the root from the elongation zone were incubated with anti-OsPR-10. Tissues (F1, F4, F6, R1, R2) were treated with anti-OsPR-10-free serum as a negative control. Blue-colored signals indicate the accumulation of OsPR-10 protein. The sections were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (dilution 1:300) for 1 hour and visualized after the addition of BNT/BCIP solution for 20 minutes.

우리는 벼 자체의 OsPR-10 단백질이 리보뉴클레아제 활성을 가진다는 것을 확인하기 위해, 벼 도열병이 감염된 벼 잎에서 비환원성 2-DE 겔을 실시하였다. RNase 활성을 측정하기 위해 60-85% 분획을 사용하였으며 OsPR-10 항체를 사용하여 확인하였다. 겔은 SDS-PAGE 분석에서 보여준 것과 유사한 리보뉴클레아제 활성을 보여주었다 (Fig. 6-7A,

B, C 참조). 2-DE 겔에서 스팟 1, 2, 3, 4는 벼 도열병에 감염된 후 72시간이 경과했을 때 리보뉴클레아제 활성을 나타내었다 (Fig. 6-7D ). 효소 활성 스팟을 확인하기 위해, 본 연구에서는 네 개의 스팟을 용리시켰다. 스팟 1은 OsPR-10 항체와 반응한 것이다 (Fig. 6-7E, 7F).

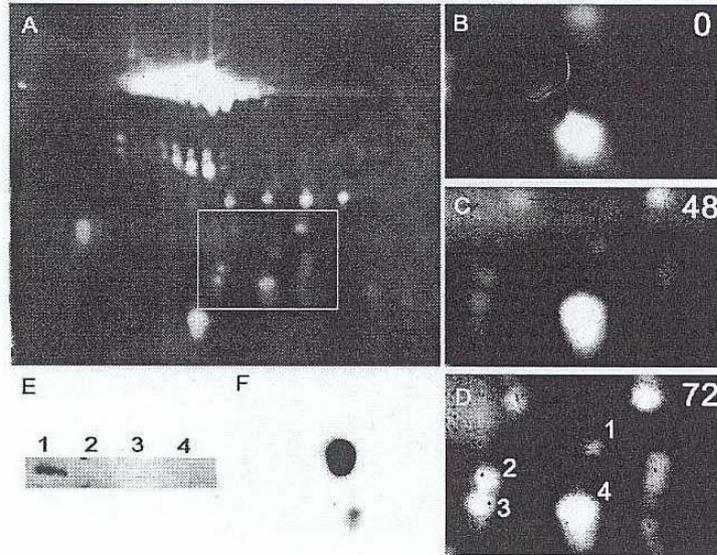


**Figure6-5.** RNase activity of recombinant OsPR-10 protein purified from *E. coli*. RNase activity was determined using total RNA ( $5 \mu\text{g}$ ) from rice leaves. RNase activity of OsPR-10 was assayed in agarose gels. The amounts of RNA ( $0.1, 0.5, 1, 2.5,$  and  $5 \mu\text{g}$ ) and the incubation times (3, 6, and 9 hours) were varied depending on the experiment. R.I indicates RNase inhibitor (50 units). B indicates OsPR-10 protein boiled at  $100^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes.



**Figure 6-6.** Dimerization of OsPR-10 protein and RNase activity.

**A)** In-gel RNase activity of OsPR-10 in the presence (+) and absence (-) of DTT using non-denaturing gels. **B)** Conformational changes of the OsPR-10 protein in reducing and non-reducing SDS-PAGE. Purified OsPR-10 protein was incubated with the indicated concentration of DTT at room temperature for 30 minutes and then mixed with an equal volume of non-reducing buffer. The sample was separated on a 12.5% SDS-PAGE gel and visualized by Coomassie blue staining (right). Protein identity was confirmed by Western blot analysis (left). **C)** SDS-PAGE and in-gel RNase activity of the wild type and OsPR-10 mutants in non-reducing gels. I.G. indicates the in-gel RNase assay. Separation pattern of the proteins (WT, C81S, C83S, C81/83S) was confirmed by Western blot analysis. **D)** RNase activities of the WT and the C83S mutant were assayed in agarose gels. BSA (10 ug/ml) was used as a negative control.



**Figure6-7.** Ribonuclease activity of native OsPR-10.

Protein (150  $\mu$ g) extracted under non-reducing conditions from leaves exposed to pathogens was run on a RNase activity gel using 2-DE. A) Uninoculated samples and B) samples taken 48 and 72 hours after inoculation are on indicated on the left (C and D, respectively). Numbers indicate putative OsPR-10 proteins. To evaluate the OsPR-10 protein, we performed Western blot analysis using the specific OsPR-10 antibody. SDS-PAGE of electro-eluted samples from each spot (E) and 2-DE (F). Spot 1 cross-reacted with the OsPR-10 antibody.

OsPR-10의 기능 분석을 위하여 OsPR-10은 400ug의 양에서 가장 많이 cell death가 형성됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 6-8). PR-10은 81번과 83번 amino acid 잔기에 두 Cys를 함유하여 각각 이들을 Serine으로 site directed mutant를 제조하여 recombinant 단백질을 제조 하였다. 이들 중 83번 aa 잔기를 C83S로 바꾼 것은 soluble 하게 얻을 수 있었으나 C81S, C81S+C83S(double mutant)는 inclusion body로 생산되어 native protein을 얻지 못했다. WT과 C83S mutant의 담배 잎에 대한 cell death 효과는 각각의 단백질을 담배 잎에 infiltration 시킨 후 측정하였다(Fig. 6-8 1A, B). 상기 결과는 완전한 dimer를 형성하는 OsPR-10조건에서 세포사멸의 활성화에 영향을 주는 것 같다. OsPR-10 단백질의 RNase 활성이 PBZ1의 활성보다 현저의 떨어짐에도 불구하고 세포 사멸에 대한 활성화는 PBZ1이 우세한 것을 알 수 있었다. 이는 아마도 OsPR-10 단백질은 Vascular 조직에 specific하게 발현되고 PBZ1는 세포질에 발현되기 때문으로 추정된다. 비록 OsPR-10의 활성이 현저히 높다 해도 발현위치에 따라서 그 effect에 많은 영향을 미칠 것으로 생각된다.

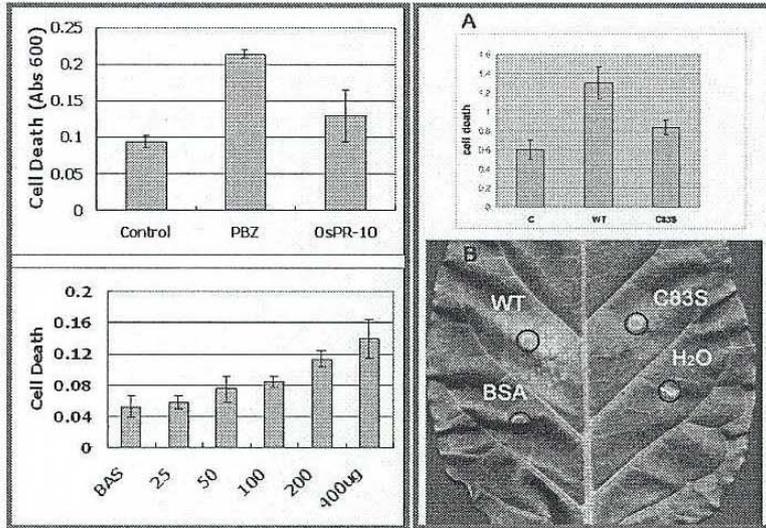


Figure 6-8. Cell death assay of PR-10 in tobacco.

벼에서 OsPR-10 유전자의 기능분석을 위하여 PR-10 overexpression line은 14개 라인을 상기 PBZ1에서와 동일하게 구축되었으며 이를 Western blot 분석한 결과 1, 2, 5, 8, 9, 13, 14번 라인에서 PR-10이 강하게 발현됨을 확인함으로써 형질전환체가 제대로 construction되었음을 확인 하였다. 이 PR-10 Ox. 라인은 PBZ antibody detection에 의해서도 발현 되는 line들이 존재 하는 것으로 밝혀졌 으며 이들 중 2 번라인은 PR-10과 PBZ1가 동시에 강하게 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 6-9). 또한 PR-10과 PBZ1이 동시에 강하게 발현되는 line을 이용해 2-DE 분석을 해본 결과 western 결과와 같 이 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 6-10). 이들 overexpression 라인들에 대한 오갈병 저항성 을 검증중에 있다.

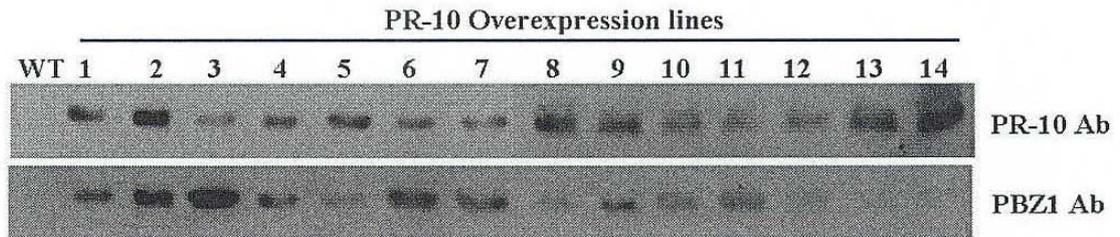


Figure 6-9. PR-10 and PBZ1 western blot analysis of OsPR-10 overexpression lines.

하지만 이들 line도 PBZ1 처럼 functional redundancy 때문에 뚜렷한 병 저항성에 효과가 없었다. 따라서 세포에 스트레스를 줄 수 있는 PR 유전자를 이용한 형질 전환체의 제작은 많은 위험성이 있 다는 것을 이번 과제로부터 배울 수 있었다. 따라서 차후 안정적 벼 도열병 및 병저항성 벼 품종 생 산을 위해서는 병원균에 의해서 특이적으로 유도 또는 발현되는 promoter를 이용한 형질 전환체의 제 작이 하나의 해결책이 될 것으로 생각된다. 한 예로 우리가 이번 과제로부터 확보한 PBZ1 단백질의 promoter는 벼 도열병에 의해서 발현되고 무엇보다도 도열병 병반 주변으로 특이적으로 발현되는 것 으로 볼 때 그 이용가능성을 높이 평가 받을만하다.

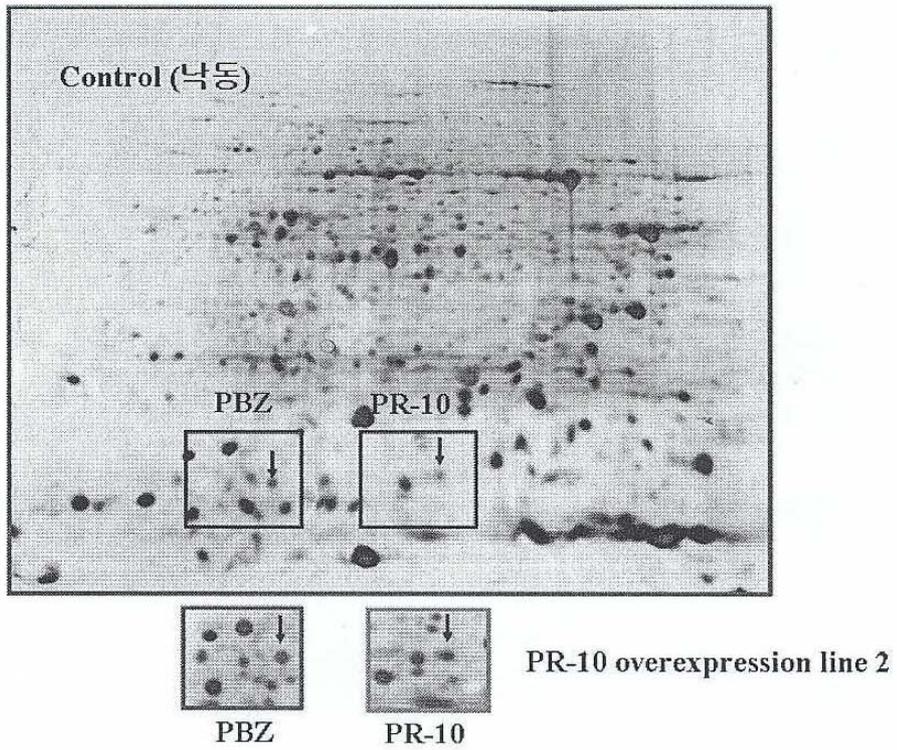


Figure 6-10. 2-DE analysis of PR-10 overexpression line 2.

최종 연구 성과

구분	연구성과
	<p>-lesion mimic mutant인 <i>spl1</i> 과 <i>spl2</i> mutant, leaf senescence 및 coleoptile에서 PBZ1 단백질의 발현을 2-DE, Western분석, immunolocalization, TUNEL을 통하여 PBZ1 단백질이 노화 및 세포사멸에 직접적인 연관이 있다는 것을 벼에서 처음으로 밝힘.</p> <p>-PBZ1 promoter 형질전환체 개발을 통하여 벼 도열병 처리, leaf senescence 과정 및 seed aleurone layer같은 세포사멸 부위에서 PBZ1 단백질이 발현됨을 검정함으로써 PBZ1 promoter를 이용한 stress 저항성 품종개발의 기틀을 마련.</p> <p>-DEX inducible PBZ1 Arabidopsis 형질전환체 개발을 통하여 DEX 처리 시 세포사멸이 일어남을 lactophenol-trypan blue staining과 Northern/Western 분석으로 증명함.</p> <p>-8개의 PBZ isoform을 분리 후 담배 잎을 이용한 세포사멸 활성 측정 시 2, 5, 6번 isoform이 가장 많은 cell death를 유도함을 검정.</p> <p>-DEX inducible PBZ1 형질전환체 작물의 세포 사멸 방지 유전자 분리를 위해 EMS 처리를 통한 세포 사멸 억제 5 mutants 확보.</p> <p>-PBZ1 단백질과 in vitro interaction 연구 수행을 통하여 calcium dependent protein kinase와 Ca 의존적으로 interaction 함을 증명함.</p> <p>-병저항성 유전자 분리를 위한 microarray 분석을 통하여 2배 이상 증가하는 유전자 40종과 2배 이상 감소하는 7 유전자를 확보.</p> <p>-OsPR-10 단백질은 꽃, 줄기, 뿌리 및 잎의 노화, wounding, cold, drought, 과 벼 도열병 처리시 많이 발현됨을 Western 분석으로 검정.</p> <p>-OsPR-10은 꽃의 안껍질과 바깥껍질 그리고 목질생성조직/세포외층 및 내피 안 부분에서 발현됨을 Immunolocalization을 통해 검정.</p> <p>-OsPR-10 유전자의 두 개의 시스테인 잔기를 site directed mutagenesis을 통한 돌연변이체 개발과 2-DE 분석을 통하여 native OsPR-10 RNase activity 검증.</p> <p>-PBZ1, OsPR-10의 기능 검증을 통한 특허출원 (3건).</p>

## 제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구개발 목표	달성도	관련 분야의 기여도	
1 차 년 도 2 0 0 4	제1 세부과제	<p>PBZ1 각 isoform 단백질 순수분리 및 아미노산 서열분석</p> <p>PBZ1 각 isoform 유전자 cloning 및 재조합 단백질 생산</p> <p>PR-10 유전자 및 단백질 상호 결합 단백질 분리, 분석</p> <p>형질 전환체(T<sub>3</sub>)작물의 세포사멸 방지 유전자 분리 분석</p>	<p>2-DE 분석을 통한 PBZ1 isoform의 분리 (100%).</p> <p>PBZ1 isoform들의 LC-MS 분석 (100%).</p> <p>PR-10 유전자의 promoter 유전자의 cloning 및 분석 (100%).</p> <p>DEX inducible PBZ1 형질전환체 작물에 EMS 처리 (100%).</p>	<p>벼에서 생체방어 유전자의 isoform 및 promoter 분리와 개발 기여.</p> <p>EMS를 이용한 arabidopsis mutant 개발.</p>
	제2 세부과제	<p>생물성 스트레스 관련 유전자 (PR10 family) 벼 프로모터 개발 및 분석.</p> <p>생물성 스트레스 관련 유전자 대량발현 및 RNAi 형질 전환체 개발 및 분석</p> <p>생물성 스트레스 관련 유전자와 벼내 관련 유전자 간의 상호 작용 분석.</p>	<p>Gatway system을 이용한 PBZ1 promoter 유전자와 GFP tagging 유전자를 동시에 binary vector에 cloning (100%).</p> <p>PBZ1, PR-10 유전자를 RNAi vector에 cloning 및 agrobacterium transformation (100%).</p> <p>Flag, Myc tag을 이용한 transient expression assay (100%).</p>	<p>Gateway system을 통한 벼 유전자의 protein 발현 및 형질전환체용 promoter, RNAi vector cloning의 편리성 확보에 기여.</p>

구분	연구개발 목표	달성도	관련 분야의 기여도
2 차 년 도 2 0 0 5	<p>제1 세부과제</p> <p>PBZ 각 isoform 유전자 cloning 및 재조합 단백질 생산</p> <p>PR-10 유전자 및 단백질 상호 결합 단백질의 분리 및 특성 연구</p> <p>형질 전환체 (DEX:PBZ)작물의 세포 사멸 방지 유전자 분리</p>	<p>8개의 PBZ1 protein isoform 분리, LC-MS (Thermo Electron LCQ-Deca XP) 방법을 통한 아미노산 서열 및 인산화 분석 (100%)</p> <p>LC-MS/MS분석을 통한 PBZ1 isoform별 유전정보 미약으로 인한 유전자 확보의 어려움 (50%)</p> <p>Y2H 통한 애기장대의 TF와의 상호 결합 여부를 분석(90%).</p> <p>DEX inducible PBZ1 형질전환체 작물의 세포 사멸 방지 유전자 분리를 위한 EMS 처리를 통한 세포사멸 억제 5 mutants 확보 (100%).</p>	<p>PBZ1 isoform들 중 2, 5, 6번이 cell death을 많이 유도함을 검정함으로써 이들 isoform들의 생리/생화학적 기능차이 검정에 기여.</p> <p>며 cell death 연구에 marker protein으로 사용 될 거라 예상됨.</p>
	<p>제2 세부과제</p> <p>생물성 스트레스 관련 유전자 (PR10 family)의 프로모터 개발 및 분석.</p> <p>생물성 스트레스 관련 유전자 대량발현 및 RNAi 형질 전환체 개발 및 분석</p> <p>생물성 스트레스 관련 유전자와 벼내 관련 유전자 간의 상호 작용 분석.</p>	<p>PBZ1 promoter 형질전환체 개발을 통한 cell death 조직에서 GFP 발현 검증 (100%).</p> <p>RNAi 형질전환체 개발을 시도하였으나 T0세대에서 대부분의 transformant가 lethal 하게 죽음 (100%).</p> <p>Flag, Myc Tag을 이용한 재조합 생물성 스트레스 관련 단백질분리 (80%)</p>	<p>새로운 stress inducible promoter를 개발.</p>

구분	연구개발 목표	달성도	관련 분야의 기여도
3 차 년 도 2 0 0 6	제1 세부과제 PR-10 유전자 및 단백질 상호 결합 단백질 분리 및 특성 연구 형질 전환체 작물의 세포 사멸 방지 유전자 분리	PBZ1은 in vitro에서 CDPK와 Ca 의존적으로 interaction 확인(100%). 5 mutant line 확보를 통한 DEX 처리후 cell death 유무를 Northern/Western 분석을 통한 검정 (90%). 도열병 처리후 Microarray 방법을 통한 유전자 발현 양상 분석(100%).	PR-10 단백질의 특성 연구에서 RNase activity 검정을 통하여 벼에서는 처음으로 특허 출원.
	제2 세부과제 생물성 스트레스 관련 유전자 (PR10 family) 벼 프로모터 개발 및 분석. 생물성 스트레스 관련 유전자 대량발현 및 RNAi 형질 전환체 개발 및 분석 생물성 스트레스 관련 유전자와 벼 내재해성 관련 유전자 간의 상호 작용 분석	PBZ1 promoter의 localization은 cell death가 유도되어지는 부분과 일치함을 Propidium iodide와 TUNEL 을 통하여 검정 (100%).	PBZ1 promoter 개발을 통하여 형질전환체에서 광범위 stress 저항성 식물체 개발의 초석을 다짐.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1절 기대 효과

#### 1) 기술적 측면

본 연구진은 PR-10 단백질의 기능을 생화학적, 분자생물학적 방법적 연구와 promoter 분석 RNAi, 이들의 형질 전환체를 통해 벼의 *in planta*에서 기능연구를 함으로써 상호 시너지 효과를 얻고자 하였다. 저항성 반응의 signal pathway에서 final step에서 생산된 산물로서 PR-10 단백질은 elicitor/병원균/hormone 처리 후 2-DE 분석을 통하여 차별되게 발현되는 4-6종의 isoform을 분리 하였으며, 인산화가 일어나는 것을 확인하였다. ESI-MS/MS (tandem mass)로 amino 산 서열을 각각 isoform/인산화 단백질 별로 동정하고, 외부 환경 스트레스에 의해 유도되어지는 Transcription factor나 Kinase와 같은 중간 매개체가 어떻게 PR-10 단백질을 activation 시키는지를 EMS mutant screen, yeast two hybrid와 promoter 개발을 통하여 연구하여 단백질들의 기능을 연구 방법의 기초를 다졌다. 그러나 아직까지 이들 isoform 단백질들에 대한 database의 부재로 인해 실제로 정확한 메카니즘에 대한 연구 수행이 적지 않은 문제점에 놓여있다.

PBZ1 단백질이 여러 Programed Cell Death (PCD) 과정에서 직접적으로 관여함을 확인하기 위하여 immunolocalization, TUNEL 분석 방법을 체계화시키므로 해서 차후 PCD 관련 marker로서 사용할 수 있으며, 이 유전자의 기능을 밝힘으로 이들이 벼의 생육, 분화, 발달 및 생물성 스트레스/저항성 반응인 HR에 관여하는 작용 기구 연구로 생명현상의 일부를 이해하는데 크게 공헌 할 수 있을 것이다.

세포 사멸 방지 인자를 분리하기 위하여 DEX inducible vector에 cloning된 Arabidopsis 종자에 EMS chemical를 처리하여 DEX에 의하여 cell death가 유도 되지 않는 Plant screening을 실시하였다. 이는 EMS chemical을 통한 screening 과정이 잘 진행 되어 졌으며, 각각 DEX inducible vector에 cloning된 세포 사멸이 일어나는 5개 line에 대하여 0.25% EMS 처리 시 mutant 획득이 가장 좋았으며 각각 line에 대하여 EMS 처리 후 DEX에 의하여 죽지 않은 Arabidopsis를 확보 하였다. Screening을 통해 살아남은 Arabidopsis와 죽은 plant와의 Northern blot 분석을 하여본 결과 살아남은 plant 들은 죽은 식물체와 비교하여 PBZ 발현이 매우 감소 또는 발현 되지 않음을 확인하였다. 현재 이들 5종의 line을 고정하여 계속 연구 수행 중에 있다. 이를 통해 EMS mutant pool을 확보할 수 있는 기술을 체계화 시켰으나 EMS mutant를 이용한 실험은 오랜 시간이 요구되는 만큼 차 후 연구의 연속성이 요구되며, 전사 조절인자를 찾기 위하여 다양한 방법으로 시도 되어 지고 있고 final product인 PBZ1이나 PR-10을 조절하는 미묘한 유전자 발현 및 신호전달의 차이를 찾기란 쉽지 않은 연구 분야이다.

PBZ1 promoter를 개발로 인한 발현 위치, 양 및 시기 등에 따라 특정 유전자의 발현조절을 연구함으로써 과발현된 형질전환체를 효과적으로 생산 할 수 있는 좋은 재료가 될 것으로 예상되고 있다. 따라서 많은 연구자들은 특정 조건에 유도되는 promoter 개발에 많은 연구를 수행해 왔다. 본 연구에서는 지금까지 연구 수행된 세포사멸(leaf senescence, HR cell, root cap, seed aleurone layer) 특이적으로 발현되는 PBZ promoter를 이용하여 형질전환체를 개발함으로써 병저항성 관련 유전자의 발굴과 함께 이 promoter 이용한다면 더 새로운 병저항성에 탁월한 형질전환체를 구축할 수 있을 것이며. PBZ promoter는 벼 senescence에

의해서 유도되므로 이 시기에 또한 sink source 관련 유전자의 발현이 시작되는 단계이므로 PBZ promoter에 의해서 유도된 다수확 관련 유전자 도입으로 인한 더 효과적인 작물개발이 예상되며, PBZ 유전자는 기존의 살균제로 많이 사용되고 있는 probenazole에 의해서도 유도되기 때문에 그 약효에 대한 synergy 효과도 예상된다.

## 2) 경제, 산업적 측면

인구의 폭발적인 증가로 인해 향후 2050년에는 세계 인구는 100억에 이를 것으로 추정되며, 그로 인한 식량의 안정적 공급은 전략적 산업으로 대두되고 있다. 벼는 전 세계 인구의 반 이상이 주식으로 이용하는 중요한 작물 중에 하나에도 불구하고, 우리나라의 경우 농촌 인구의 노령화로 인한 영농인력의 감소, 개발에 따른 경작지의 감소, 병원균과 환경적 재해로 인한 작물의 안정적 공급의 실패, 서구화에 식단에 의한 쌀 소비의 감소 등 이러한 이유로 최근 벼 생산량의 감소 추세에 있다. 특히 통일을 대비하여 최근 북한의 식량 위기를 극복하기 위해서는 무엇보다도 내병성 품종 개발은 시급히 해결해야 할 당면 문제로 급부상하고 있다. 최근 유전공학적인 방법에 의한 신품종 개발 연구가 활발히 이루어지고 있으며 이러한 기술을 이용하여 내병성 품종의 개발과 신 기능성 작물개발은 세계적 추세에 있다. 분화 발달 및 여러 환경요인에서의 발현 조절 연구와 그를 이용한 유용유전자에 대한 형질전환체 개발연구는 식물생명공학 분야의 경제 산업적 부가 가치 창출에 크게 기여 할 것이다.

## 3) 사회, 문화적 측면

21C 기하급수적인 인구증가에 대한 해결방안으로 안정적인 식량생산과 환경보전이란 두 큰 과제가 대두되고 있다. 이러한 식량증산에 걸림돌이 되고 있는 주요 요인으로는 생물학적 스트레스 즉 병, 해충으로 인한 큰 손실이다. 이러한 손실은 매년 그 생산량의 30%를 상회하고 있다. 이에 따른 손실 방제는 주로 화학 농약에 의존하고 있다. 그러나 환경보전과 안전한 식량공급을 위해서 농약사용에 대한 규제가 날로 강화되고 있으며 수년 내에 농약 재등록 제도를 실시하여 현재 사용되고 있는 농약들의 상당부분이 사용되지 못한다. 이러한 독성, 환경오염, 생태계 교란 등의 부작용을 경감시키면서 병해충으로 인한 생산량 감소를 막을 수 있는 대안으로는 수천년의 진화과정을 거쳐 진화되고 있는 자가 생체방어, 신호전달체계의 이해, 유전자 분리 및 발현조절, 이들의 능력을 제고 시키는 저항성 작물 개발을 들 수 있다. 작물의 생체 방어 능력을 높여 생물적 저항성을 향상시키기 위해서는 이들 생체 방어 관련 유전자원을 확보하고 이들 반응 기작과 발현 조절, 그 기능을 밝히는 일이 선결과제이다. 이런 숙제들이 달성되면 식량의 안정적 공급은 물론이고 저 투입 친 환경 지속 농업이 가능해 진다고 본다.

## 2절 활용방안

### -추가연구의 필요성

지금까지 본 연구진에 의해 개발했던 OsPR-10, PBZ1 유전자는 도열병 처리 시 발현 정도가 많아 인위적인 과발현 형질전환체는 오히려 스트레스에 의한 lethal 하게 작용하여 식물체가 제대로 살지 못하는 경우가 많았다. 또한 형질전환체가 만들어진 후 재배를 거치면서 대부분 형질을 잃게 되는 경우가 많다. 이에 과 발현에 의한 형질전환체의 개발보다는 오히려 특정 조직 특이적이거나 또는 병원균에 특이적으로 유도 되는 promoter의 개발과 그것

을 이용한 형질전환체의 개발의 필요성이 요구되고 있다. 이렇게 구축 되어진 system을 종합적으로 연결하고 in vivo 기능을 알아 보기위한 형질전환체는 연구기간이 다소 짧아 일부 계속되고 있지만 종합적이고 체계적인 연구가 추후 절실히 필요하다고 생각된다.

- 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

종합적인 proteome 연구, 세포사멸 관련 연구, 형질전환체 (DEX inducible PBZ1 line, PBZ1 promoter line) 연구등 일련의 상호 연관된 체계적 연구는 다른 연구 분야에서, 특히 functional genomics 연구에서 좋은 model이 된다고 생각되며, 유전학-식물 병학-분자 생물학의 학제간 연구의 좋은 본보기가 된다고 본다.

본 연구에서는 PBZ1 유전자의 생체내 PCD에 관련 연구는 처음으로 PCD 관련 marker enzyme으로 특허 출원을 하였으며, PR-10 유전자는 RNase activity의 기능을 가지고 있음을 특허 출원을 하였으며, 오갈병에 대한 저항성 검정을 진행중에 있다.. 또한 PBZ1 promoter 형질전환체를 개발함으로써 병저항성과 내재해성 연구등 광범위한 작물 개발의 가능성을 가늠해 볼 수 있고 병 저항성 기작의 연구는 물론이고 이를 이용한 산업 개발의 기초가 된다고 생각된다.

- 원천 기술의 확보

Proteome/형질전환체 병행 연구로 병 저항성 유전자의 기능 연구를 통한 기능 유전체학의 기초를 수립.

EMS 처리를 통한 mutant 개발.

저항성 또는 환경 내재해성 inducible promoter 개발.

핵심기술	국내의 기술현황 (국외 기술에 대한 국내 기술 %)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환 식물체 제작 기술</li> <li>- RNase activity 활성 측정 기술 확보.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 벼 형질전환 식물체 제작 기술은 국제적임(100%)</li> <li>- Site directed mutagenesis을 통한 돌연변이체 개발과 2-DE 분석을 통하여 native RNase activity 활성 검정은 벼에서는 처음임.</li> </ul>

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1994년 Kumashiro group에서 처음으로 agrobacterium을 이용하여 벼 형질전환체를 만들기 시작하였다. 비록 이 기술이 재현성이 있고 벼의 분자생물학적 연구 발전을 증진 시켰다는 점은 있지만 tissue culture로부터 시작하여 형질전환체가 만들어 지기까지는 적어도 4개월의 시간이 걸린다는 문제점이 있다. 이런 점을 보완하기 위하여 1997년 Toki group에서 벼 형질전환을 위한 agrobacterium-mediated transformation 효율을 증진을 위한 culture medium을 개발 하였으며, 이 방법을 기본으로 하여 벼 형질전환체를 만드는데 직간접 적으로 이용 되어 왔으며, 이와 유사한 형질전환체를 isolation하는 방법 역시 적어도 3달이라는 시간이 걸리는 단점이 있다. 이렇게 오랜 기간의 식물 재 분화 과정을 거치는 동안 유전적 변화 (somaclonal variation)가 야기 되어지며, 이는 transformation을 통한 벼의 형질의 특성과 T-DNA tagging 을 통한 벼의 유전적 기능 분석을 하는데 많은 어려움을 안겨 주고 있다. 그러므로 somaclonal variation을 최소화 하기위하여 가능한 한 tissue culture기간을 줄이는 것이 필요로 하다.

최근 일본의 Tanaka group에서 1day seedling에서 agrobacterium infection을 시도하여 high-speed transformation을 성공시켰으며, 농촌진흥청 김울호 박사님께서서는 고효율 형질전환체 방법을 성공 시켰다.

## 제 7 장   참고문헌

1. McDowell, J. M., and Dangl, J. L., (2000) Signal transduction in the plant immune response. *TIBS* 25:79-82.
2. Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., and Conjero, V., (1994) *Plant Mol. Biol.* 12:245-265.
3. Broglie, K., et al. (1991) *Science*, 254: 1194-1197
4. Zhu, Q., Maher, E. A., Masoud, S., Dixon, R. A., and Lamb, C. J., (1994) *Bio/Technology* 12:807-812.
5. Christensen, A. B. et al (2002) *Mol. Plant Pathol.* 3: 135-144.
6. Jang, I. C., Choi, W. B., Lee, K. H., Song, S. I., Nahm, B. H., and Kim, J. K. (2002) High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome c gene *OsCcl* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant physiol.* 129:1473-1481.
7. Kim ST, Cho KS, Yu S, Kim SG, Hong JC, Han C, Bae DW, Nam MH, Kang KY (2003) Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3: 2368-2378.
8. Kim ST, Kim SG, Hwang DH, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY (2004) Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4: 3569-35786.
9. Midoh N, Iwata M (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol* 37: 9-18.
10. McGee JD, Hamer JE, Hodges TK (2001) Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 877-886.
11. Goff, S. A., et al (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296:92-100.
12. Yu, J. et al (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296:79-92.

13. Riguat G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, and Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotech.* 17: 1030-1032.
14. van Loon LC, van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Path* 55: 85-97.
15. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, and Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956.
16. Zhou XJ, Lu S, Xu YH, Wang JW, Chen XY (2002) A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity. *Plant Sci* 162: 629-636.
17. Zuo J, Niu Q-W, and Chua N-H. Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 2000 24:265-273.
18. Hiei Y, Komari T, and Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 1994 6, 271-282.
19. Hiei Y, Komari T, and Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 1997 35, 205-218.
20. Komari T, Hiei Y, Ishida Y, Kumashiro T, and Kubo T. Advances in cereal gene transfer. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998 1, 161-165.
21. Toki S. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997 15, 16-21.
22. Labra M, Vannini C, Grassi F, Bracale M, Balsemin M, Basso B, and Sala F. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theor. Appl. Genet.* 2004 109, 1512-1518.