발간등록번호
11-1541000-001429-01

보안과제( ), 일반과제(V) 과제번호 109098-3

최종보고서

세포사멸 억제단백질 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 작물 개발 기술

(Programmed Cell Death-Inhibitor Gene That Endows Multi Stress Tolerance in Crops)

서울대학교

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “세포사멸 억제 단백질 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 작물 개발 기술” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012년 7월 5일

주관연구기관명 : 서울대학교
주관연구책임자 : 홍 주 봉
세부연구책임자 : 홍 주 봉
연 구 원 : 이 미 옥, 이 갑 임
김 동 균, 마 히 팔
오 지 연, 김 윤 경
타 오 링, 이 계 순
이 미 진, 문 오 순
임 형 섭

요 약 문

Ⅰ. 제 목

세포사멸 억제 단백질 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 작물 개발 기술

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

한발, 고온, 저온, 침수 등의 비생물적 환경스트레스와 세균, 곰팡이, 바이러스 등의 감염에 의한 작물 생산량의 손실은 지대함. 영농의 기법과 경작지의 환경에 따라 많은 차이가 있으나 작물의 가능한 생산량의 80% 가까운 손실이 이들 스트레스 요인에 의해 발생하는 것으로 판단됨. 이러한 스트레스 요인들은 대개가 직·간접적으로 세포사멸을 유발하며, 따라서 세포사멸의 억제는 광범위한 스트레스 요인들로부터 작물의 생산성을 향상시킬 수 있는 좋은 접근법이 될 수 있음. 본 과제는 고추에서 본 연구팀이 분리한 세포사멸 억제 관련 단백질 유전자를 이용하여 다양한 작물에 광범위 스트레스 내성을 부여할 수 있는 기술을 개발하는 것이었음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

-세포사멸 억제 단백질 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 담배 개발

-세포사멸을 억제하는 것으로 판단되는 molecular chaperone 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 담배 개발

-세포사멸 억제 단백질 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 상추 개발

-세포사멸을 억제하는 것으로 판단되는 molecular chaperone 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 상추 개발

-세포사멸 억제 단백질 유전자들을 이용하여 작물에 광범위 스트레스 내성 부여 기반 기술 개발

Ⅳ. 연구개발결과

-고추의 세포사멸억제인자 1종(*CaBI-1*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 대한 내성이 증가한 담배 형질전환체 개발.

-세포사멸을 억제하는 것으로 판단되는 molecular chaperone 유전자 1종(*LHS18.9*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 내성이 증가한 담배 형질전환체 개발.

-CaBI-1이 과발현되어 고염도 내성이 증가한 상추 형질전환체 개발.

-세포사멸을 억제하는 것으로 판단되는 molecular chaperone 유전자 1종

(*NtHSP18.2*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 내성이 증가한 상추 형질전환체 개발.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

-실적: SCI 논문 3편 발표/국내특허 2건 출원/유전자 1건 등록

-활용계획: 연구종료일 2년 내에 SCI 논문 2편 발표/국제특허 2건 출원/유전자 1건 등록

:*NtHSP18.2*는 십자화과 작물에 스트레스 내성 증가를 목적으로 널리 사용이 가능할 것으로 판단됨.

:*LHS18.9*는 가지과 작물과 십자화과 작물에 스트레스 내성 증가를 목적으로 널리 사용이 가능할 것으로 판단됨.

:*CaBI-1*의 경우는 *NtHSP18.2*와 *LHS18.9*에 비해 효과가 약함으로 작물에 내성 부여를 목적으로 사용하기 위해서는 적절한 조건의 분석이 추가되어야할 것으로 판단함.

:현재 진행 중인 제3세대 형질전환체의 육종 및 분석이 완료되는 데로 품종 등록 3건.

:담배와 상추의 육종 모본 line으로 종묘회사에 매매.

:출원된 특허의 산업화.

SUMMARY

This project was planned to develop a technology for the improvement of abiotic stress tolerance in crops. The technology should be applicable to various crops and should provide to the crop broad spectrum of tolerance against various abiotic stresses. The basic approach was differed from commonly employed, i.e. using transcription factor, and based on an inhibitor of programmed cell death, namely BAX inhibitor-1. Since programmed cell death is one fundamental aspect of organisms for the developmental processes and response to abiotic stresses, we thought that an inhibitor of programmed cell death can be a reasonable material to endow broad range of tolerance against various abiotic stresses to crops.

The inhibitor used was an BAX inhibitor-1 from hot pepper that was isolated from a high temperature-stressed hot pepper, and named *CaBI-1*. *CaBI-1* transcript was induced upon various abiotic stresses in hot pepper, and the open reading frame of *CaBI-1* was constitutively expressed in tobacco for a gain-of-function type analysis. Transgenic tobacco plants confirmed by RNA blot hybridization for the ectopically expressed *CaBI-1* gene were self-pollinated to get T_2 generation seeds.

Using these T_2 generation seeds, bioassay was performed for the analysis of tolerance in tobacco plants against various abiotic stresses. The transgenic tobacco plants showed a broad spectrum of tolerance against abiotic stresses including cold, heat, flooding and drought.

When the same processes were applied to lettuce plants, expression of *CaBI-1* did not result in meaningful tolerances against abiotic stresses in lettuce plants.

To have an understanding for the positive effect of *CaBI-1* expression in tobacco plants in abiotic stress tolerance at the molecular level, transcriptome analysis was performed for the transgenic plants. Using an empty vector transformant as a negative control, transcript profile different from the control in the transgenic plant was analyzed by microarrays.

Among the significantly upregulated genes in the transgenic plants, small heat shock protein (small molecular chaperone) was chosen to identify its possible function in improving abiotic stress tolerances in tobacco and lettuce. Two small heat shock protein genes were separated over expressed in tobacco

and lettuce plants basically following the protocols used for *CaBI-1*.

The transgenic tobacco plants overexpressing the small heat shock protein genes showed much strenghtened tolerance against various abiotic stresses, even higher than the case of *CaBI-1*. Especially its effect was promising in lettuce plants. When one of the tobacco small heat shock protein gene was overexpressed in lettuce, its tolerance to the abiotic stresses was significantly improved.

These results support a possibility of using *CaBI-1* and small heat shock protein genes in this study for the development of various crops having improved tolerance against various abiotic stresses.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Summary in Korean 2
Summary in English 4
Introduction 8
State of Arts Report 10
Methodologies and Results 17
Contributions to the Field 47
Prospects 48
Technological Informations 49
References 49

목 차

국문 요약 2
영문 요약 4
연구개발과제의 개요 8
국내외 기술개발 현황 10
연구개발 수행 내용 및 결과 17
목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 47
연구개발 성과 및 성과활용 계획 48
연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 49
참고문헌 49

제 1 장　연구개발과제의 개요

식물체는 지구 생태계의 대부분을 형성하며 지구 상에 생물체가 생존할 수 있는 환경을 제공하는 본체이기도 하다. 태양 에너지를 비롯한 다양한 환경요인을 생물체가 사용할 수 있는 형태의 화합물로 변환시키는 과정은 근본적으로 식물체에 의해 이루어지며, 아울러 식물체는 종종 심한 환경스트레스에 일차적으로 노출되는 생물체이기도 하다. 이러한 사실은 주요 작물의 생산성 손실의 대부분이 비생물적 환경스트레스에 의함이 확인하여 주고 있다(Boyer, 1982).

비생물적 환경요인들에는 공기의 질, 공기의 흐름, 빛의 세기와 질, 온도, 건조와 지나친 수분, 무기 영양분의 농도, 염도, 토양의 질(예, 산성도)들을 일컬을 수 있겠다(Fig. 1). 이들 환경조건은 수시로 변하며, 변하는 정도가 클 시는 종종 식물체의 성장에 저해 내지는 커다란 손상을 가져온다.

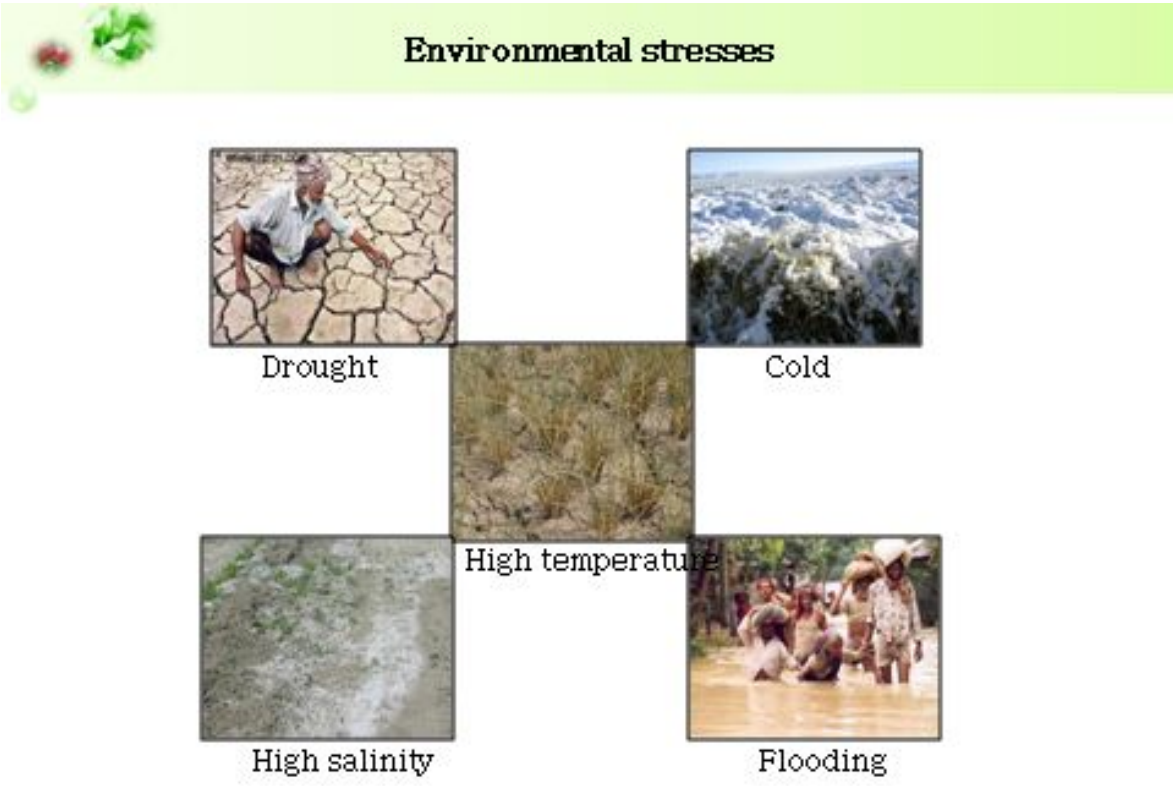

Figure 1. There are various environmental stresses that can severally affect life of living organisms, and due to the human activity the environmental stresses are considered getting worse.

따라서 인류는 이들 비생물적 환경스트레스에 대해 내성이 뛰어난 작물의 개발에 많은 노력을 기울여왔으나 통계결과는 아직 이들 환경스트레스에 의한 작물의 생산성 저하는 가능한 생산량의 50%에 이름을 보여주고 있다. 즉, 교잡육종에 의한 작물의 환경내성의 증가는 한계에 도달하여 있음을 알 수 있다(Bray 등, 2000).

고온, 저온, 건조 등의 환경스트레스에 대한 작물의 내성 증가는 작물의 생산성 향상을 위해서는 필수적이므로 1990년대에 들어서면서부터는 유전공학적 접근으로 그 생산성 향상을 도모하기 시작하였다. 현재까지는 산업적으로 활용 가능한 환경스트레스 내(耐)성 작물이 실용화되지는 않았으나 환경스트레스에 대한 분자수준에서의 연구가 급격히 활성화 되고 있음은 유전공학적 접근의 결실이 가까운 장래에 가능함을 제시하고 있다 하겠다(Garg et al., 2002). 최근 DNA microarray, transposon/T-DNA tagging, proteomics approach, bioinformatics등의 분자생물학적 접근법은 많은 중요한 연구결과를 산출하고 있다.

분자생물학과 유전학에 기초를 둔 연구는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 반응과 적응 메커니즘에 관련되었을 것으로 판단되는 다수의 단백질과 그리고 더욱 많은 수의 유전자 클론들을 확보하게 하였다. 그러나 전술한 바와 같이 비생물적 스트레스로부터 작물을 충분히 보호할 수 있는 재료나 기법은 아직 실용화 단계에는 이르고 있지 못하다고 판단된다.

이와 같은 제한적인 연구의 성과는 근본적으로 식물체의 복잡한 비생물적 스트레스 반응과 적응 메커니즘에 기인한다 하겠다.

본 연구는 매우 복잡할 것으로 판단되는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 반응과 적응 메커니즘을 활용하여 광범위 스트레스 내성 작물 개발 기술의 확보에 목표를 두었으며, 다음과 같은 두 가지 기본적인 틀에 기초하여 수행되었다: 1)비생물적 스트레스는 식물체에서도 세포사멸과 대개의 경우 연계되어 있을 것이라는 실험 결과와 2)세포사멸 억제 인자를 활용할 시 목표를 달성할 수 있을 것이라는 전제하에 수행되었다.

즉, 이러한 스트레스 요인들은 대개가 직·간접적으로 세포사멸을 유발하며, 따라서 세포사멸의 억제는 광범위한 스트레스 요인들로부터 작물의 생산성을 향상시킬 수 있는 좋은 접근법이 될 수 있다. **본 과제는 고추에서 본 연구팀이 분리한 세포사멸 억제 단백질 유전자와 관련 유전자를 이용하여 다양한 작물에 광범위 스트레스 내성을 부여할 수 있는 기술을 개발하는 것이다.**

제 2 장　국내외 기술개발 현황

환경스트레스 하에서 특징적으로 발현되는 유전자를 다량 규명하기 위한 노력은 애기장대를 대상으로한 연구가 선도하고 있다. 예로, 건조스트레스와 관련하여 7000개의 full length cDNA array가 제작되었으며 이는 건조스트레스 관련 유전자의 expression profiling을 포괄할 수 있는 DNA chip의 존재를 의미한다. DNA microarray 분석은 환경스트레스에 의한 유전자 발현 양상에 대한 총체적인 이해를 용이하게 할 수 있으며, 이를 기초로 한 transcription factor나 signal transduction pathway의 규명도 가능하게 되었다.

지금까지의 연구는 환경스트레스에 대한 내성을 작물에 증진시키기 위해서 환경에 대한 식물체의 반응에 직접적인 역할을 할 것으로 예상되는 단백질의 유전자를 활용해 왔다. 하지만 최근 연구는 환경스트레스에 대한 식물의 생리현상이 복잡하게 연결되어 있다는데 착안하여 여러 유전자의 발현을 이끌 수 있는 transcription factor의 유전자를 대상으로 이루어지고 있다. 이는 한 종의 유전자를 대상으로한 연구에서 중요한 결과를 얻기도 했지만 그 효과면에서 충분하지 못했기 때문이다. 유전자 그룹 중 transcription factor나 signal transduction pathway component는 환경스트레스에 반응해서 일어나는 식물체의 생리현상을 직접 담당하는 유전자 또는 유전자군의 발현이나 유전자 산물들의 기능을 조절한다. 그러므로, 환경스트레스에 대한 내성을 작물에 증진 시킨다는 면에서 뛰어날 것으로 보인다. 실제로 이러한 연구는 애기장대를 대상으로 이루어지고 있으며 그 연구결과 또한 비교적 성공적이라 할 수 있다. 즉, transcription factor의 발현조절에 의해 이루어진 저온에 대한 내성이나 건조스트레스에 대한 내성이 증가한 애기장대가 보고되었다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

비생물적 환경스트레스에 항상 처해있는 작물에 있어 비생물적 환경스트레스의 인지와 적응 또는 내성은 생존을 위해 필수적인 메커니즘이며 이들 비생물적 환경스트레스가 종종 복합적으로 작물에 영향을 미치는 바 비생물적 환경스트레스의 인지와 적응 그리고 내성을 이끄는 signal reception과 signal transduction pathway와 response는 서로 복잡하게 얽혀져 있음이 확인되고 있다(Apel and Hirt, 2004; Bailey-Serres and Voesenenk, 2008; Chinnusamy et al., 2007; Hasegawa et al., 2000; Survila et al., 2009; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Zhu et al., 2007).

중요한 비생물적 환경스트레스 요인인 건조스트레스 만을 살펴보더라도 매우 다양하고 복잡한 메커니즘이 관여하고 있음을 쉽게 감지할 수 있다.

건조스트레스 하의 식물은 다양한 생화학적 그리고 생리학적 반응과 적응 과정을 나타낸다. 식물체가 건조스트레스에 얼마나 효율적으로 반응하고 적응할 수 있

느냐 하는 것은 식물체가 건조스트레스를 얼마나 잘 이겨낼 수 있는 가를 결정하는 기본이라 하겠다. 스트레스 호르몬으로 잘 알려진 abscisic acid(ABA)는 건조한 상태에 놓이는 식물체에서 생성되어 식물체의 내건성에 관여함이 확인된 (Lang *et al.*, 1994) 이래 ABA와 연관된 식물체의 건조스트레스에 대한 반응과 적응 과정에 대한 연구가 많은 진척을 이루었다. 이 과정에서 건조스트레스에 의해 특징적으로 발현이 유도되는 다수의 유전자들이 애기장대를 위시하여 여러 식물체로부터 클로닝되어 보고 되었다(Ingram and Bartels, 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2006). 이들 유전자에 의해 기록되어 있는 단백질들은 다음과 같이 두개의 그룹으로 구분되어 지기도 한다. 하나의 그룹은 건조스트레스와 관련하여 직접 기능을 하는 단백질군들로서 ①osmoprotectant(sugar, proline, betaine 등)의 합성 pathway의 효소들, ②다른 화합물을 보호하거나 생체막을 보호하는 단백질군(LEA, osmotin, chaperone 등), ③단백질의 재활용을 촉진하는 단백질 분해효소군(thio protease, Clp protease, ubiquitin), ④건조스트레스 하의 식물체에서 생성되는 활성산소를 제거하는 단백질군(glutathione S-transferase, soluble epoxide hydrolase, catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase 등), ⑤물의 이동을 조절하는 porin 등의 water channel 단백질들이 포함된다. 또 하나의 그룹은 직접 건조스트레스와의 반응과 적응에 관여하지 않으나 유전자 발현조절이나 신호전달을 주관함으로써 건조스트레스에 대한 반응과 적응을 주도하는 단백질군이 있다.

(1) 건조스트레스와 관련하여 직접 기능을 하는 단백질군들: 건조스트레스 하의 식물체는 많은 양의 물을 잃게 되고, 그 결과로 세포질 내의 밀도를 대폭 증가시키는 결과를 가져온다. 그 결과로 단백질 간의 접촉과 세포막 간의 접촉 빈도가 증가하게 되며, 따라서 단백질과 세포막의 변성을 유발하게 된다. 식물체는 이에 대한 적응메커니즘을 진화의 결과로 가지게 되었으며, 그 하나가 proline, glutamate, glycine-betaine, carnitine, mannitol, sorbitol, fructan, polyol, trehalose, sucrose, oligosaccharide 등을 건조스트레스에 반응하여 다량 생성함으로써 세포질 내의 water potential을 조정한 것이다(LeRudulier and Bouillard, 1983; Delauney and Verma, 1993; Pilson-Smits *et al.*, 1995; Holmstrom and Welin, 1996; Anami et al., 2009). 또한 대부분의 식물체는 건조스트레스를 장기간 겪게 되면 일군의 단백질들(LEA, heat-shock protein 등)을 새로이 생성하며 이들 단백질은 세포의 구조와 기능을 보호하는 역할을 할 것으로 판단되고 있다(Arakawa, *et al.*, 1991; Close, 1996; Wang *et al.*, 2004).

건조스트레스 하에서 식물체 내에는 활성산소(ROS)의 생성양이 대폭 증가함이 확인되었으며 활성산소는 매우 활성이 강함으로 세포의 많은 고분자물질과 세포막의 파괴를 가져온다. 식물체는 활성산소를 제거하는 기능을 하는 ascorbate peroxidase, catalase, glutathione reductase, superoxide dismutase 등을 가지고 있으

며 이들이 건조스트레스 내성과 간접적으로 커다란 영향을 미침이 제시되고 있다(Galinski, 1993; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

다양한 세포막에 존재하며 세포막을 통한 물의 이동을 조절하는 water channel protein에 대한 연구도 내건성과 관련하여 관심을 끌고 있다. *Arabidopsis thaliana*의 유전체 염기서열 분석 결과, 30여 개의 water channel protein의 유전자가 애기장대에 있는 것으로 분석되고 있다. 이들 중, 일부는 건조스트레스에 의해 발현이 증가하는 등 건조스트레스의 내성과의 연관성을 나타내는 지표는 여러 가지 확인되고 있다(Guerrero *et al.*, 1990; Johansson, *et al.*, 1998; Kjellbom, *et al.*, 1999). 그러나 water channel protein을 overexpression시킨 담배의 경우 내건성의 증진이 확인되지 않고 있어 보다 다양한 water channel protein에 대한 분석이 요구되고 있다(Aharon *et al.*, 2003).

(2) 건조스트레스와 관련하여 기능하는 전사조절자와 signal transduction pathway component: *A. thaliana*를 재료로 한 연구의 결과 건조스트레스와 관련하여 적어도 4개의 signal transduction pathway의 존재 가능성이 언급되고 있다: 이 중, 두개는 ABA-dependent한 것으로 분석되고 있으며, 두개는 ABA-independent한 것으로 분석되고 있다(Shinozaki *et al.*, 1997; Shinozaki *et al.*, 2003). 건조스트레스에 의해 발현이 시작되거나 증가하는 유전자의 promoter 부위를 분석한 결과, 여러 개의 cis-acting 또는 trans-acting element들이 확인되었다. 이들 중, ABA-depedent signal transduction pathway의 경우에는 대개의 promoter 부위에서 ABRE (ABA-responsive element, PyACGTGGC)가 확인되고 있다. 그리고 ABRE에 결합하는 transcription factor가 분석되어 basic domain/leucine zipper (bZIP) 단백질임이 확인되었다(Abe *et al.*, 1997; Immink and Angenent, 2002).

ABA-independent signal transduction pathway의 경우에는 9-bp의 잘 보존된 DRE (dehydration-response element, TACCGACAT)가 확인되고 있으며, EREBP/AP2 DNA-binding domain을 가지고 있는 DREB 결합 단백질이 확인되었다(Liu *et al.*, 1998; Shinozaki *et al.,* 2003).

(3) 건조스트레스와 관련한 signal transduction pathway의 component: 잘 알려진 signal transduction pathway의 구성요소들이 건조스트레스에 의해 발현이 시작되거나 상승됨이 확인되었다. Calmodulin, G-protein, protein kinase, phospholipase C 등이 건조스트레스에 의해 발현이 시작되거나 증가함이 여러 경우에서 확인되고 있다(Urao, 1994; Frank *et al.*, 2000; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). 그러나 signal transduction pathway component의 건조스트레스에서의 역할에 대해서는 직접적인 연구결과는 미비한 상태라 하겠다.

(4) Transgenic approach를 이용한 건조스트레스에 대한 연구: 건조스트레스에 대한 분자생물학적 접근은 자연적으로 내건성 작물의 개발 가능성을 확인하는 방향으로

연구가 진행하게 하였다. 건조스트레스에 특징적으로 발현되는 유전자가 35S cauliflower mosaic virus promoter 또는 cis-acting element (DRE, ABRE)에 접합되어 애기장대나 담배, 벼 등에 도입되었다. 그 결과, 대개의 경우는 내건성 증진이 뚜렷하게 관찰되지 않아 transcription factor가 제대로 기능을 하지 않거나 transcription factor에 의해 turn on 되는 downstream gene이 너무 많은 관계로 내건성의 증진이 뚜렷이 나타나지 않는 것으로 해석되고 있다.

고온스트레스의 경우도 오랜 기간 heat-shock protein과 heat-shock factor가 연구를 이끌고 왔으나 다른 비생물적 환경스트레스의 경우와 같이 활성산소와 redox potential의 변화가 직간접적으로 관여하고 있음이 확인되었고 예상보다 훨씬 많은 cellular protein들이 고온스트레스에 의해 영향을 받고 이에 따른 매우 복잡한 변화가 예견되고 있다(Rizhsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

전술한 바와 같이 비생물적 스트레스 요인들의 signal transduction pathway는 복잡하게 얽혀져 있으며, 따라서 signal reception이나 signal transduction pathway의 단일 유전자의 변화에 의해 비생물적 스트레스에 대한 내성의 변화가 있을 가능성은 매우 낮다고 판단된다. 이에 본 연구는 비생물적 스트레스에 놓인 생물체에서 광범위하게 공통적으로 발생하는 세포사멸에 초점을 맞추었다.

세포사멸은 진핵세포 생물체에서 널리 확인되는 발달과정의 일부이며 또한 생물체가 상해를 입었을 때 발생하는 생리적인 현상이기도 하다. 세포사멸은 세포괴사와는 달리 유전적으로 program되어 있음이 확인되고 있으며 따라서 programmed cell death(PCD)라고 일컬어진다. PCD는 동물체의 신경조직의 발달 등 광범위하게 확인되고 있으며, 식물체에서도 일부의 발달과정에서 확인되고 있다. Xylem vessel의 발달과정, aerenchyma의 발달, endosperm의 도태나 노화과정에서 식물체에서도 PCD가 널리 나타난다(Nagano *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2010)

식물세포는 생물적 스트레스와 비생물적 스트레스를 포함한 다양한 외부요인에 반응하여 PCD를 나타낸다. 비록 식물체의 PCD는 동물체의 PCD에 비해 보고된 바가 많이 적으나, 미세구조 분석과 생리적 그리고 생화학적 분석 결과들은 식물체의 PCD가 동물체의 PCD와 많은 공통점들을 가지고 있음을 보여준다. 보고된 공통점들로는 염색질의 condensation, nuclear DNA fragmentation, 활성산소와의 연관성 그리고 caspase류에 포함될 수 있는 단백질 분해효소들을 들 수 있다(Lam et al., 2001; Bolduc et al., 2003; Huchelhoven, 2004).

PCD의 조절자들 중에서는 PCD를 유발하는 인자로서 BAX(Koremer, 1997)가 많은 연구의 대상이 되어 왔으며, BAX의 기능 억제인자인 BI-1(BAX inhibitor-1; Scorrano and Korsmeyer, 2003)이 따라서 PCD를 억제하는 인자로 연구의 대상이 되어 왔다. 현재까지 식물체에서 BAX와 유사한 단백질 또는 그의 유전자는 확인되지 않은 반면에 BI-1은 식물체에서도 잘 보존되어 있는 단백질임이 확인되었고, 이에 BI-1와 연관된 식물체에서의 세포사멸 억제 기능에 대한 연구가 이루어져 왔다. 식

물체의 BI-1을 효모에 과발현시켰을 때 효모에서 세포사멸의 억제효과가 확인되었으며(Sanchez et al., 2000), 유사한 효과가 애기장대 세포(Duan *et al.*, 2010), 담배 세포(Lacomme and Cruz, 1999), 보리 세포(Eichman *et al.*, 2010)와 벼 세포(Ishikawa *et al.*, 2010)에서 보고되었다.

작물의 생산성이 생물적 스트레스 요인들 보다는 비생물적 스트레스 요인들에 의해 훨씬 크게 손실됨은 세계적으로 널리 관찰되고 있는 상황이다(Bray *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). 그리고 현재 많은 우려를 낳고 있는 지구의 급격한 환경변화에 의해 이와 같은 상황은 더욱 심해질 것이라는 판단이다(Lane and Jarvis, 2007). 따라서 작물의 생산성 유지 또는 향상을 위해 전술한 바와 같이 비생물적 스트레스에 대한 내성을 작물에 부여하기 위한 노력이 유전공학적으로 많이 시도되고 있다.

비생물적 환경스트레스에 의한 작물의 손실 감소를 위한 노력에 PCD의 억제에 따른 기술 개발의 유의성은 전술한 바와 같이 PCD의 억제인자로 확인된 BI-1이 식물체에서 비생물적 스트레스에 의해 발현이 강력히 유도됨(Watanabe and Lam, 2006; 본 사업의 초기 연구결과)이 확인됨으로써 증명되었었다고 판단된다.

본 사업을 수행 중, 1차년도의 연구결과로 PCD의 억제인자로서 molecular chaperone의 작용 가능성이 제기되었다. 즉, *BI-1*이 과발현된 transgenic 담배식물체의 transcript 분석 결과 small heat shock protein(sHSP)의 유전자들이 *BI-1*의 과발현 결과로 강하게 발현이 유도됨이 확인되었다. 아울러 1차년도의 연구결과는 본 과제에서 사용한 고추의 *BI-1* 유전자의 담배에서 과발현은 transgneic 담배에 비생물적 스트레스에 대한 내성 증진을 가져왔으나 상추의 경우에는 유의성있는 효과가 없음을 보여 주었다. 이에 고추의 *BI-1*이 과발현된 transgenic 담배에서 발현이 강하게 유도된 sHSP의 유전자를 담배와 상추에 과발현시키는 작업을 수행하였다. 따라서 small heat shock protein의 국내외 기술개발 현황도 요약하고자 한다.

sHSP들은 다양한 종류로 구성되어 있으나 공통적으로 α-crystalline domain을 N-말단 부위 방향으로 크게 가지고 있다(MacRae, 2000). N-말단과 C-말단 부위는 sHSP들 간에 상당한 차이를 보이며 이와 같은 다양성이 sHSP의 다양한 기능과 다양한 발현 양상과 연관되어 있는 것으로 판단되고 있다(Kriehuber *et al.*, 2010). sHSP 단위체는 12 kD에서 42 kD의 크기를 가지며, 많은 경우에 9개에서 24개의 oligomer complex를 형성한다(van Montfort et al., 2002). 효모와 동물체와 식물체를 막론하고 sHSP의 기능에 관한 많은 연구가 수행되었으며 종합적인 결론은 sHSP을 ATP-비의존성 molecular chaperone으로 규정하고 있다. 즉, sHSP는 다른 heat shock protein들과는 달리 세포 내에서 다른 단백질들의 비가역적 변성과 aggregation을 방지해주는 역할을 ATP가 없는 조건에서도 수행한다는 것이다(van Montfort *et al.*, 2002). 예로, 고온에 의해 변성된 단백질들(clinet protein로 명명)의 노출된 hydrophobic 표면과 sHSP들의 고온 상태에서 노출되는 hydrophobic 표면과의 interaction으로 sHSP과 client protein들과 복합체가 형성되어 client protein들의 회복 불가능한 상태로의 변

성을 방지해 주는 것으로 기능이 제시되고 있다. sHSP들과 복합체로 형성된 일부 변성된 단백질들은 스트레스 조건이 완화되면 sHSP들로부터 이탈되어 스스로 renaturation form으로 돌아가거나 ATP를 사용하는 HSP70/DnaK와 cochaperone들의 기능에 의해 renaturation된다 (Fig. 2).

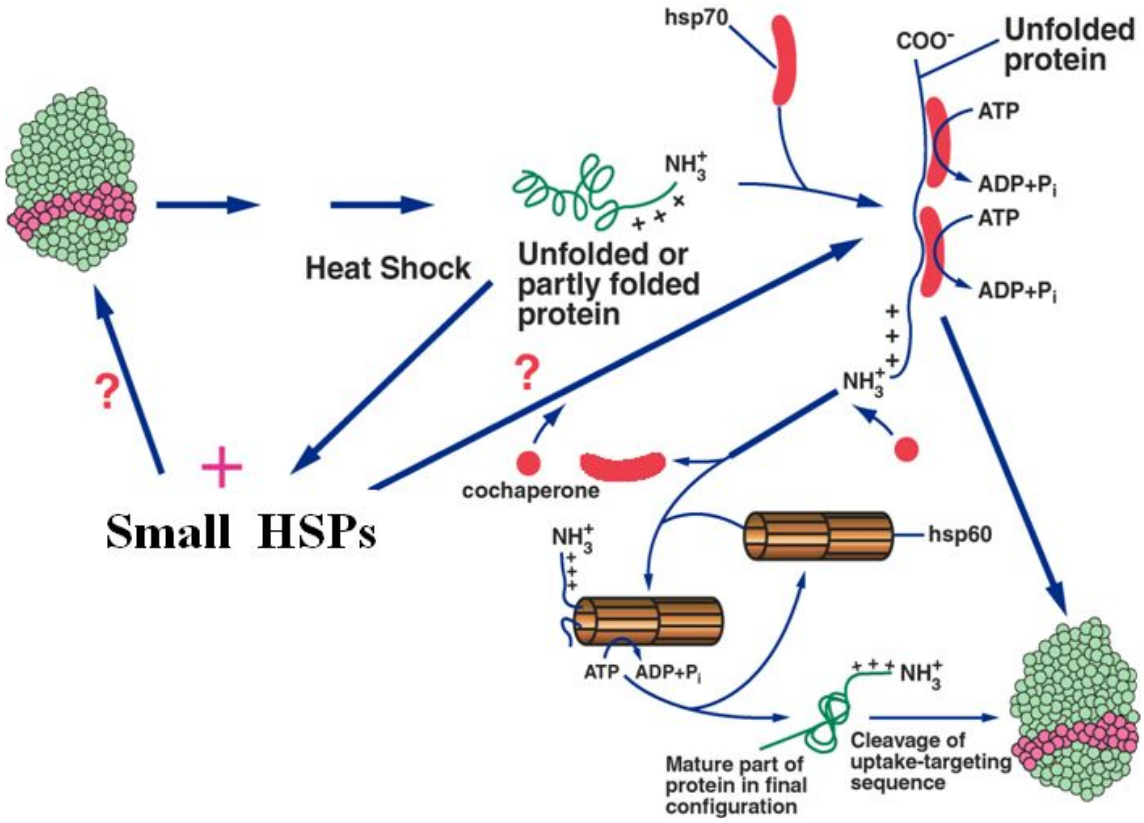

Figure 2. Hypothetical working model for small heat shock proteins. Abiotic stresses induce denaturation of proteins that usually result in severe deconformation and often aggregation of the proteins. Small HSPs can make hydrophobic interaction with the newly exposed hydrophobic surface of the denaturing proteins and prevent them from severe denaturation. Once the proteins are saved from severe denaturation, they often resume renaturation by themselves or with the help from ATP-dependent molecular chaperones, such as hsp70 and hsp60 as shown here.

sHSP들의 확인된 기능만도 이미 매우 다양하여 세포의 많은 생리 현상과 생물체 전체로서의 많은 생리 현상에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 유전자의 번역과 전사 과정의 보호, 세포의 신호 전달과정의 보호, 세포 분열과정의 보호, 이차대사산물 생성과정의 보호 등에 널리 관여함이 확인되고 있으며 따라서 본 연구사업의 기본틀인 세포사멸 과정과도 연계되어 있다(Basha *et al.*, 2004; Nakamoto and Vigh, 2007).

식물체에는 주로 여섯 group의 sHSP들이 보고되어 있으며, 그들은 존재하는 세포 내의 위치와 구조적인 유사성에 의해 CI, CII, CIII, plastid, endoplasmic reticulum, 그리고 mitochondria형으로 구분하고 있다. 이들 중, CI, CII와 CIII는 cytoplasm에 존재하는 것으로 보고 되었으나 최근의 연구결과는 이들이 cytoplasm과 nucleus를 shuttling하는 것으로 확인되었다(Waters *et al.*, 2008).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구팀은 본 사업에 선행한 연구의 결과로 고추(*Capsicum annuum* cv. Bu Gang)로부터 BAX inhibitor-1(BI-1) gene을 클로닝하였다(*CaBI-1*으로 명명).

과정을 요약하면 다음과 같다: 고추 종자를 온실 내에서 발아시킨 후 5주 경과된 유묘에 90%의 습도가 유지되는 배양기에서 42℃로 2시간 동안 고온 처리를 하고 poly(A)+RNA를 추출하여 cDNA library를 제조하였다. 제조한 cDNA library를 one path nucleotide sequencing을 하여 각 cDNA에 대해 약 300-500 nucleotide의 염기서열을 확인하고 이들 염기서열을 public database를 검색하여 기존에 보고된 BI-1과 유사성이 높은 cDNA 클론을 선별하였다. 선별된 BI-1의 putative cDNA 클론의 전 염기서열을 결정하였고(Fig. 3) 보고된 BI-1 유전자들과의 상동성이 매우 높음을 확인하였다(아미노산 서열에서 토마토의 BI-1과는 92.8%의 상동성, 담배의 BI-1과는 88.1%의 상동성, 배추의 BI-1과는 81.6%의 상동성).

```
1                                                                ggc
4    acgaggttcgtttcggtcgtttcactgttccaaaaaatactcgaagagaagaaaatggag
                                                          M     E  2
64   ggtttcacgtcgttcttcgaatcgcaatcggcttctcgcagtcgctggaattatgatgct
     G  F  T  S  F  F  E  S  Q  S  A  S  R  S  R  W  N  Y  D  A  22
124  ctcaaaaacttccatcagatctctcctcgtgttcaaactcatctcaaacaggtctacctc
     L  K  N  F  H  Q  I  S  P  R  V  Q  T  H  L  K  Q  V  Y  L  42
184  acactatgctgtgctttagtcgcatcagctgctggggcttaccttcacattctttggaac
     T  L  C  C  A  L  V  A  S  A  A  G  A  Y  L  H  I  L  W  N  62
244  atcggtggcttcctcacaacactggcttgcattggaagcatggtgtggcttctggcaact
     I  G  G  F  L  T  T  L  A  C  I  G  S  M  V  W  L  L  A  T  82
304  cctccttatcaagagcaaaaaagggtggcacttctgatggcagctgcactctttgaaggc
     P  P  Y  Q  E  Q  K  R  V  A  L  L  M  A  A  A  L  F  E  G  102
364  gcttcaattggtcctctgattgaactgggcatcaacttcgacccaagcattgtgcttggt
     A  S  I  G  P  L  I  E  L  G  I  N  F  D  P  S  I  V  L  G  122
424  gcttttgtaggttgtggtgtggtttttggttgcttctcagctgctgccatgttggcaagg
     A  F  V  G  C  G  V  V  F  G  C  F  S  A  A  A  M  L  A  R  142
484  cgcagggagtacttgtaccttggaggccttctttcatctggtgtctccctcctcatgtgg
     R  R  E  Y  L  Y  L  G  G  L  L  S  S  G  V  S  L  L  M  W  162
544  ttgcactttgcatcctccatttttggtggtgccatggccctttttcaagtttgaggtgtat
      L  H  F  A  S  S  I  F  G  G  A  M  A  L  F  K  F  E  V  Y  182
604  tttggtttcttggtgtttgtgggctacatagtttttgacacccaagaaatcattgagaag
      F  G  F  L  V  F  V  G  Y  I  V  F  D  T  Q  E  I  I  E  K  202
664  gctcacttgggtgatatggattacgtcaagcatgcactcaccctcttcacagattttgtt
     A  H  L  G  D  M  D  Y  V  K  H  A  L  T  L  F  T  D  F  V  222
724  gcagtctttgtgcggattttgatcatcatgttgaagaatgcatttgagaaggaagagaag
     A  V  F  V  R  I  L  I  I  M  L  K  N  A  F  E  K  E  E  K  242
784  aagaagaagaggagaaactagatttgttttataggctactactgaaactcaacctgtgta
      K  K  K  R  R  N  *                                         248
844  atttttgtaacagttctgttcacctaaagcaagcatgttaatagttcgacactagtttag
904  gcataggttgtgatacattgttgtgtgacaatgccattatggctgctgattgatcatgtg
964  tagcctttctatcttttgaagctttttaacatttgataagaaagttgcttgtgggatatt
1024 caaagtggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Figure 3. Sequence analysis of *CaBI-1*. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CaBI-1*. The protein-coding regions are in uppercase letters and the 5- and 3- flanking regions are in lower letters. Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one-letter symbols of amino acids. Nucleotide members are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. The putative termination codon is marked by an asterisk (*). The start codon and termination codon are underlined.

Genomic DNA blot 분석 결과는 고추의 genome에 BI-1이 single copy로 존재할 가능성을 제시하였다(Fig. 4).

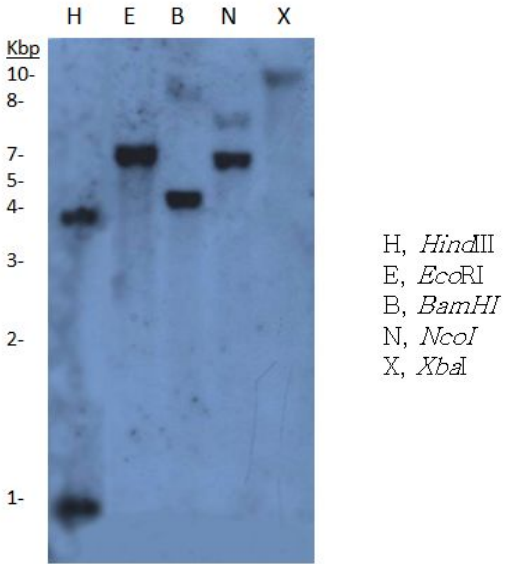

Figure 4. *CaBI-1* gene copy number in the hot pepper genome. Genomic DNA (10 μg) was digested with *Hin*dIII (H), *Eco*RI (E), *Bam*HI (B), *Nco*I (N) and *Xba*I (X), and run on a 0.7% agarose gel. The blot was probed with α-^{32}P-dCTP-labeled probe for *CaBI-1*. DNA size marker is indicated in kilobase pairs at the left.

*CaBI-1*의 고추에서의 발현 양상을 다양한 스트레스 조건에서 분석한 결과, *CaBI-1*이 다양한 비생물적 환경 스트레스에 의해서 고추에서 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다. 5주간 자란 고추 유묘를 42℃에서 1시간, 2시간, 3시간 그리고 4시간 동안 고온처리를 한 후에 *CaBI-1* transcript의 양을 RNA blot 분석으로 확인하였다. 그 결과, 고온처리 1시간 후에 이미 다량의 *CaBI-1* transcript가 생성됨을 확인할 수 있었다. 이러한 *CaBI-1* transcript의 발현은 모든 조직에서 확인되었으나 발현속도와

양적인 차이가 조직에 따라 관찰되었다. 줄기와 뿌리에서는 4시간의 고온처리 시까지 지속적으로 *CaBI-1* transcript의 양이 증가하였으나, 잎의 경우에는 고온처리 3시간에서 가장 많은 *CaBI-1* transcript의 양이 확인되었고 그 이후에는 감소하였다(Fig. 5).

CaBI-1 유전자의 발현양상을 건조스트레스 조건에 분석하였다. 파종 후 5주가 경과한 고추 유묘를 배양토에서 뿌리가 상하지 않게 조심하여 뽑고 마른 paper towel 위에 상온에 방치하였다. 줄기와 뿌리에서는 *CaBI-1* transcript의 양이 건조스트레스 초기에 가장 크게 증가하였고 시간이 경과할수록 차츰 감소하였다. 잎의 경우에는 *CaBI-1* transcript의 양이 8시간까지 유지되었으며 그 후에 감소하는 양상이 관찰되었다(Fig. 5).

고염도 처리는 250mM NaCl 조건에서 수행하였으며 줄기에서 *CaBI-1* transcript의 양이 가장 많이 확인되었다(Fig. 5). 저온처리는 4℃로 하였으며 줄기에서 *CaBI-1* transcript의 양이 가장 많이 induction 되었으며 뿌리에서 발현양이 가장 낮았다(Fig. 5).

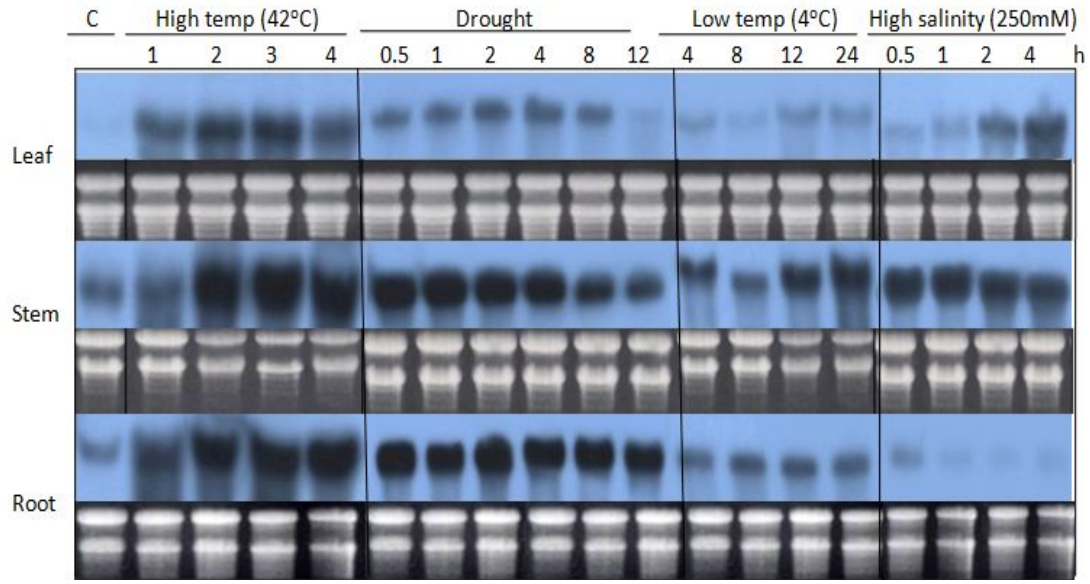

Figure 5. Effects of various stresses on the level of *CaBI-1* transcripts on different tissues of hot pepper plants. The treated tissues were harvested at the indicated time points and total RNAs were isolated. Total RNAs (20 μg) were separated by electrophoresis on a 1.2%-formaldehyde-agarose gel and blotted to a Hybond N nylon membrane. To confirm complete transfer of RNA to the membrane filter, both gel and membrane were viewed under UV light after transfer. The filter was hybridized with ^{32}P-labeled probe under normal stringent hybridization and washing conditions.

중금속 스트레스에 대한 반응은 $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$와 LiCl를 각 100mM 처리 하였다. 이들 다섯 종류의 중극속들은 공통적으로 CaBI-1 transcript의 발현을 강하게 유도하였으나 발현유도 kinetics는 중금속 간에 차이를 보였다. Ca과 Mg은 처리 3시간에 강한 발현유도 효과를 나타내었고 그 이후에는 차츰 감소하였다. Mn는 24시간대까지 지속적으로 발현유도 효과가 증가하였으며, Co와 Li은 3시간대에서 강한 발현을 유도하였고 그 이후 6시간대까지는 감소 그리고는 다시 24시간대까지 상승하는 양상을 나타내었다(Fig. 6).

고추 유묘를 완전히 침수시키고 이에 따른 *CaBI-1* transcript의 생성을 분석하였다. 침수 1시간대에서 강한 발현이 관찰되었고 이후 48시간대까지는 감소를 하다 다시 72시간대까지 생성량이 증가하였다(Fig. 6).

고추 유묘에 ABA(100μM)를 처리하였을 시, 3시간 이후에 *CaBI-1* transcript의 생성량이 뚜렷이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

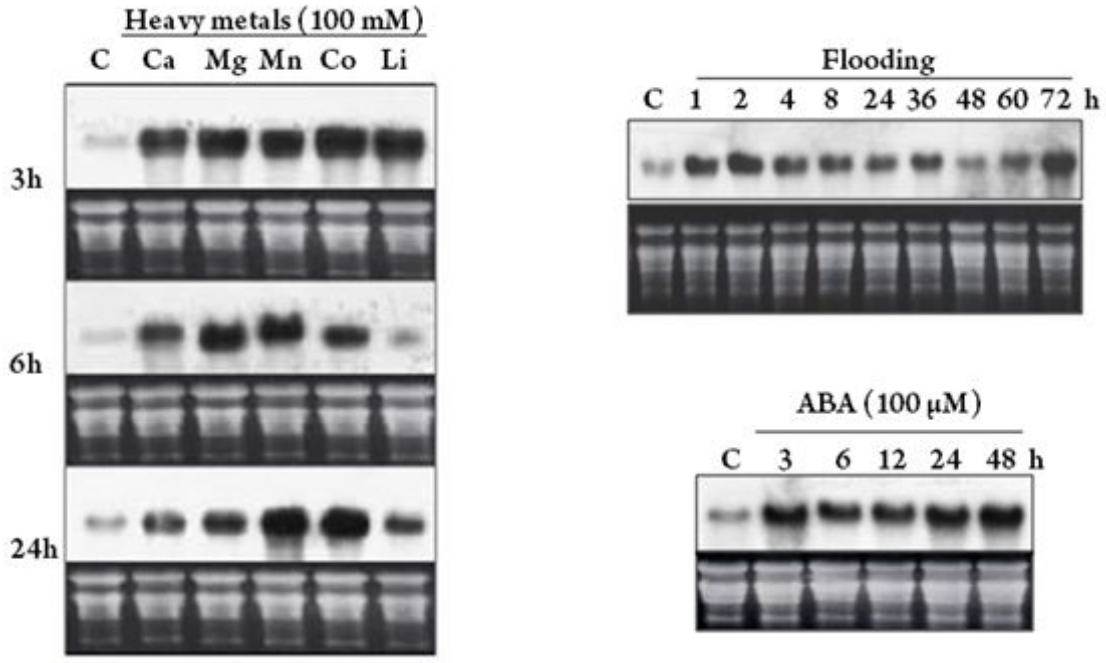

Figure 6. Effects of heavy metal, flooding and ABA treatment on the level of *CaBI-1* transcripts. Total RNA was isolated from hot pepper plants that had been incubated by heavy metal, flooding, and ABA treatment. Total RNAs (20 μg) were separated by electrophoresis on a 1.2%-formaldehyde-agarose gel and blotted to a Hybond N nylon membrane. To confirm complete transfer of RNA to the membrane filter, both gel and membrane were viewed under UV light

after transfer. The filter was hybridized with ^{32}P-labeled probe under normal stringent hybridization and washing conditions.

CaBI-1의 식물체 내에서의 기능을 분석하기 위해 *CaBI-1*의 전체 open reading frame이 상시 발현되는 형질전환체 담배를 제조하고자 하였다. *CaBI-1*의 전체 open reading frame을 식물체에서 상시 발현을 이끄는 promoter인 cauliflower mosaic virus의 35S transcript의 promoter에 붙여서 sense 또는 antisense 방향으로 plant binary expression vector에 삽입하였다(Fig. 7). 조립된 expression vector는 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 도입되었고, 담배 잎 절편에 형질전환되었다. Binary vector가 가지고 있는 형질전환된 세포의 선별을 위한 selection marker에 따라 kanamycin이 들어있는 MS배지에서 선별되고 *in vitro* regeneration 되었다. 분화된 putatuve transgenic 식물체들 중 무작위로 각 12개씩 sense(*CaBI-1* ORF가 promoter에 sense 방향으로 연결됨) 식물체와 antisense(*CaBI-1* ORF가 promoter에 antisense 방향으로 연결됨) 식물체에 대해 *CaBI-1* transcript의 생성 여부를 RNA blot 분석으로 확인하였다. Wild type 담배로부터는 확인되지 않는 *CaBI-1* transcript의 생성이 양적인 차이는 있으나 분석된 모든 sense 식물체들과 antisene 식물체들로부터 확인되었고 이는 목표한 *CaBI-1*의 형질전환이 매우 효율적으로 담배식물체를 대상으로 하여 이루어졌음을 확인하여 주고 있다(Fig. 7)

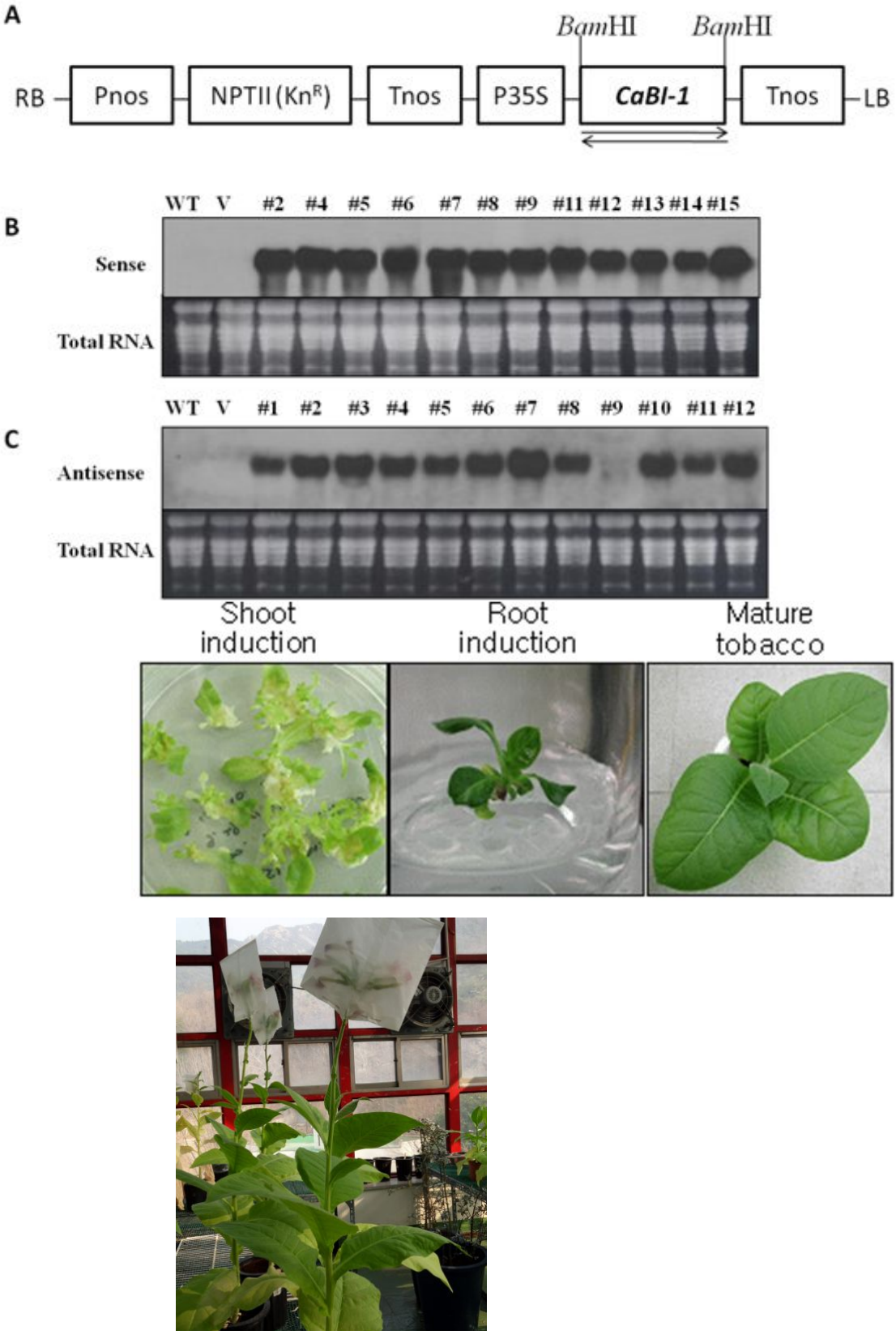
A
BamHI
BamHI
RB
Pnos
NPTII (KnR)
Tnos
P35S
CaBI-1
Tnos
LB
B
WT V #2 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #11 #12 #13 #14 #15
Sense
Total RNA
C
WT V #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11 #12
Antisense
Total RNA
Shoot induction
Root induction
Mature tobacco

Figure 7. Generation of *CaBI-1* overexpressed transgenic tobacco plants. **A**, Diagrammatic representation of pBKS1-1-*CaBI-1* construct employed for tobacco transformation. *CaBI-1*, 747 bp *C. annuum* Bax inhibitor-1 gene; Pnos, promoter of nopaline synthase gene; NPT, neomycin phosphotransferase gene; P35S, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; Tnos, terminator of nopaline synthase gene; Kn^R, kanamycin resistance gene; RB, right border sequence of T-DNA; LB, left border sequence of T-DNA. RNA blot hybridization results for wild type, vector only and putative T transgenic plant line (kanamycin selected) carrying ORF of *CaBI-1* in sense **B,** and antisense **C,** orientation. Total RNAs (20 μg) were separated by electrophoresis on a 1.2%-formaldehyde-agarose gel and blotted to a Hybond -N nylon membrane. To confirm complete transfer of RNA to the membrane filter, both gel and membrane were viewed under UV light after transfer. Blots were hybridized to ^{32}P-labelled *CaBI-1* ribo-probe under normal stringent hybridization and washing conditions. Photographs showing plantles in the *in vitro* regeneration processes and the transgenic tobacco plants in the process of seed harvesting after self-fertilization are also provided.

*CaBI-1*의 형질전환체 담배식물체들에 대해 비생물적 스트레스에 대한 내성 분석을 수행하였다.

고온 스트레스를 48℃에서 2시간 준 후, 정상 배양 조건에서 7일간 배양하고 엽록소의 함량을 sense 형질전환체를 wild type과 empty vector 형질전환체와 그리고 antisense 형질전환체들과 비교 하였다. 그 결과, *CaBI-1* sense 형질전환체가 대조구들에 비해 엽록소의 함량이 훨씬 높음을 확인할 수 있음으로써 *CaBI-1* 형질전환이 고온스트레스 내성을 증진시킴을 확인할 수 있었다. Wild type과 empty vector 형질전환체와 antisense 형질전환체의 경우, 고온 스트레스 처리와 recovery 처리 후의 엽록소의 함량이 각각 평균치와 standard deviation(괄호 안에 표기)이 1.46mg/g (0.075mg/g), 1.57mg/g (0.078mg/g)와 1.64mg/g (0.067mg/g)인 반면, *CaBI-1* sense 형질전환체들의 경우에는 평균치와 standard deviation이 2.09-2.36mg/g과 0.115-0.067mg/g이었다(Fig. 8).

고온 스트레스에 따른 단백질의 함량변화도 *CaBI-1* sense 형질전환체와 대조구들을 비교하였다. 위의 경우와 동일하게 고온 처리를 하고 recovery 배양을 한 후에 단백질 함량을 측정해 본 결과, sense 형질전환체에서 대조구에 비해 훨씬 높은 단백질 함량이 확인되었다. Wild type과 empty vector 형질전환체와 antisense 형질전환체의 경우, 고온 스트레스 처리와 recovery 처리 후의 엽록소의 함량이 각각 평균치와 standard deviation(괄호 안에 표기)이 3.28mg/g (1.151mg/g), 3.58mg/g

(0.128mg/g)와 3.68mg/g (0.167mg/g)인 반면, CaBI-1 sense 형질전환체들의 경우에는 평균치와 standard deviation이 4.11-5.79mg/g과 0.448-0.244mg/g이었다(Fig. 8).

이들의 결과들은 CaBI-1이 담배식물체에서 고온내성을 증진시킬 수 있으며 이의

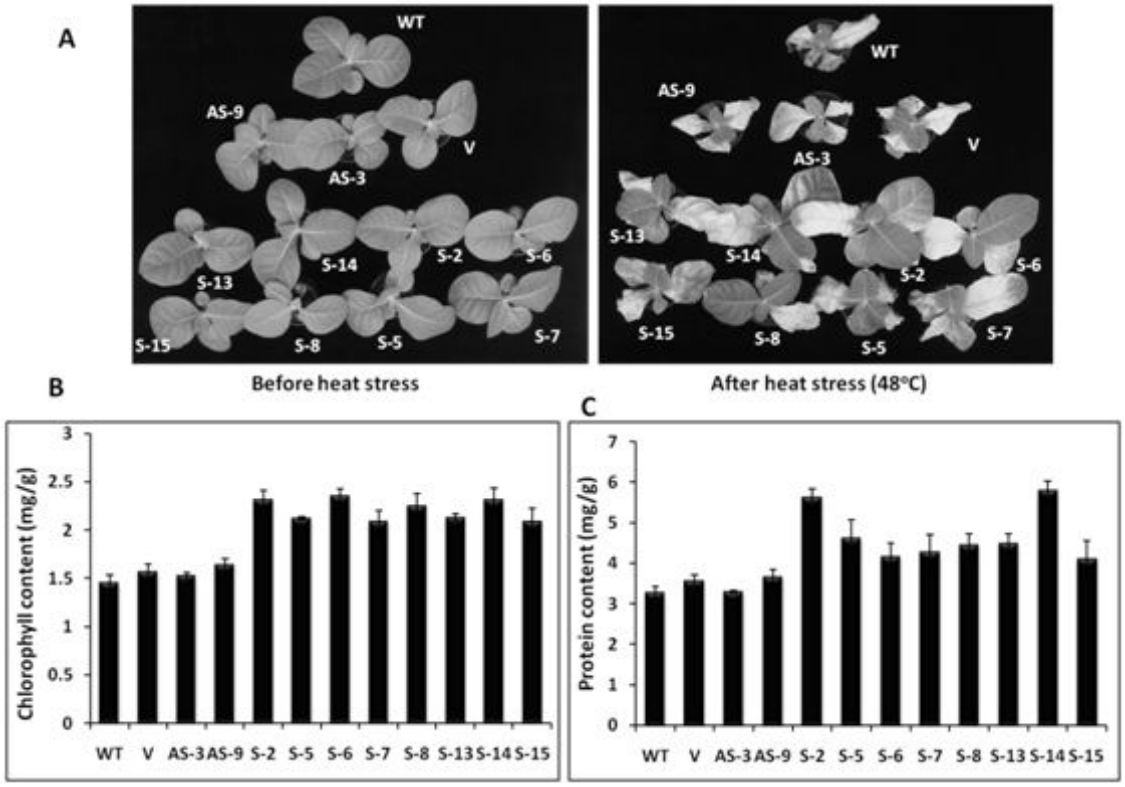

Figure 8. Enhanced thermotolerance of P_{35S}:*CaBI-1* plants. **A**, Comparison of wild type, vector and P_{35S}:*CaBI-1* plants after heat shock. Young plants of about 8 leaves of transgenic (sense and antisense) as well as wild type and vector plants were exposed to high temperature at 48°C for 2hours and returned to the normal temperature (25°C) for recovery. After 7 days photographs were taken. **B**, Comparison of chlorophyll content in the wild type, vector and transgenic (sense and antisense) plants after heat-stress. All plants were heat stressed at 48°C for 2 hours and returned to the normal condition for recovery. After 7 days, total chlorophyll was extracted. **C**, Comparison of protein content in wild type, vector and P_{35S}:*CaBI-1* (sense and antisense) plants after heat stress at 48°C for 2 hours. Data are mean values ± SD of three measurements.

분자적 메커니즘은 엽록소의 함량 증진과 단백질의 보호 기능과 연관되어 있음을 제시한다 하겠다.

P35S:*CaBI-1* 형질전환 담배식물체의 건조스트레스에 대한 내성을 분석하였다. 건조스트레스에 대한 내성은 35일간 물주기를 멈추어 건조스트레스를 가하고 정상적

인 배양 조건으로 옮긴 후 성장 정도를 대조구와 비교하여 분석하였다. *CaBI-1* 과발현 식물체들은 대조구들이 황화되고 종종 건조스트레스로부터 회복하지 못하고 죽는 반면 정상적인 성장을 재개함이 확인되었다(Fig. 9). 건조스트레스 처리와 회복기를 거친 후의 wild type 식물체와 empty vector 형질전환체들의 생체량은 평균치와 standard deviation이 각각 1.87g과 0.036g 그리고 2.09g과 0.053g인 반면, sense 형질전환체들의 생체량은 평균치와 standard deviation이 3.25-5.01g과 0.167-0.200g 이었다 (Fig. 9). Relative water content의 측정치도 P35S:*CaBI-1* sense 식물체들에서 내건성의 증진을 확인하여 주었다. Relative water content는 wild type과 empty vector 형질전환체들에서 평균치와 standard deviation이 각각 63.04%와 0.67% 그리고 64.22%와 2%인 반면, sense 형질전환체 line들은 평균치와 standard deviation이 67.62-80.95%와 4.00-5.33%이었다 (Fig. 9). 이들 결과들은 P35S:*CaBI-1* 형질전환체 담배식물체들의 내건성 증진을 증명한다고 하겠다.

고염도에 대한 내성 분석은 다른 농도(0, 50, 100와 200 mM)의 NaCl를 함유한 MS 배지에 종자를 파종하고 생체량과 뿌리의 길이를 측정함으로써 분석하였다. 50mM NaCl 조건에서 empty vector와 antisense 형질전환체들의 뿌리는 약17%의 길이 생장의 억제가 관찰된 반면에 sense 형질전환체는 길이 생장의 감소가 관찰되지 않았다(Fig. 10B). NaCl 100mM 조건에서는 대조구들의 뿌리 성장의 감소가 더 뚜렷이 나타난 반면에 sense 형질전환체는 여전히 길이 생장의 감소를 나타내지 않았다. NaCl 200mM의 조건에서는 sense 형질전환체 line #2(S-2 line)을 제외하고는 대조구와 sense 형질전환체 모두에서 심각한 피해가 발생하여 sense 형질전환체도 200mM NaCl의 스트레스에서는 내성을 나타내지 못함을 관찰하였다. 그러나 S-2 line의 경우는 특이하게 200mM NaCl의 강한 염분스트레스에서도 내성을 나타내었다(Fig. 10B).

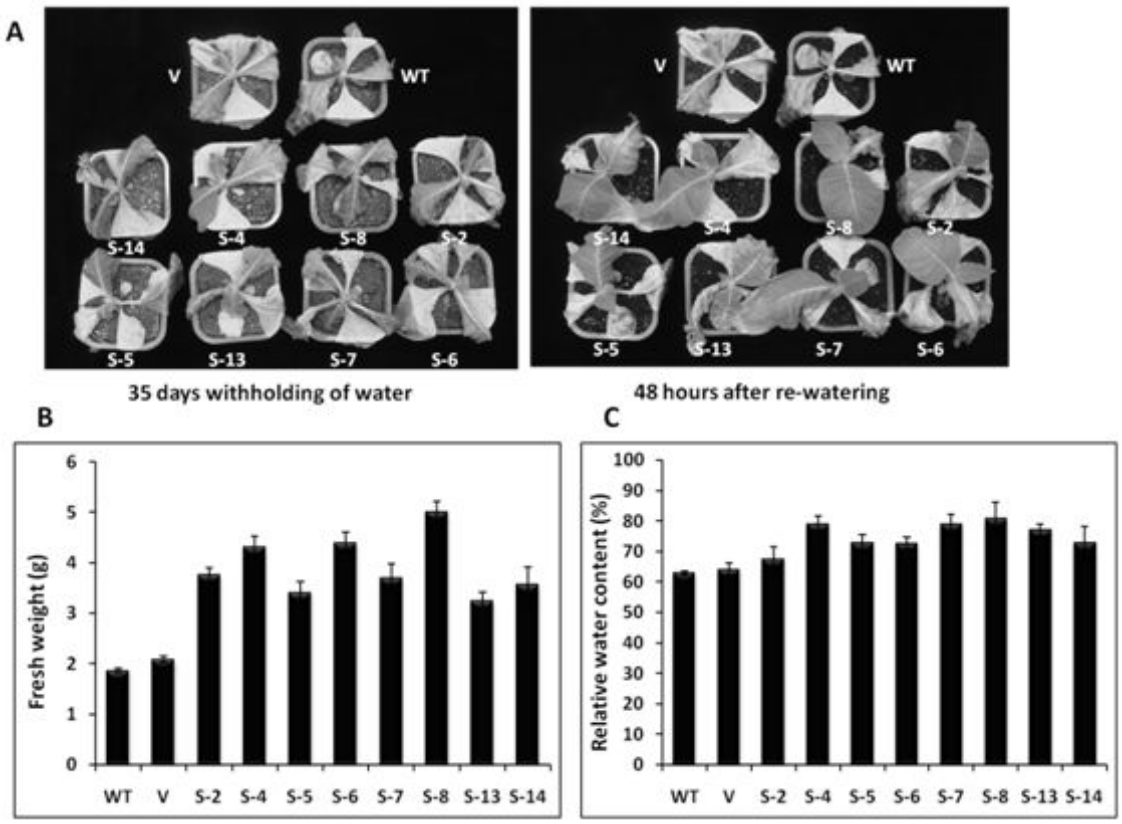

Figure 9. The tobacco plants expressing *CaBI-1* exhibited drought tolerance under water deficit. **A,** Phenotype of tobacco plants at 35 days after the cessation of water and their recovery after 48 hrs of re-watering. **B**, Fresh weight of the wild type, vector and the transgenic lines after 48 hrs of re-watering. **C**, Relative water content of wild type vector and transgenic lines after 48 hrs of re-watering. Data are mean values ± SD of three measurements.

반면, *CaBI-1*의 형질전환에 따른 담배식물체의 고염도에 대한 내성의 증가효과는 생체량을 비교하였을 시에는 sense 형질전환체 line들에서 공통적으로 나타나지 않았다. 즉, 특이하게 생체량의 증가가 관찰되는 sense line(S-2 line)을 제외하고는 sense 형질전환체 line들과 대조구 식물체들에서 50mM NaCl의 조건에서 약 23%의 생체량 감소가 같이 확인되었으며 100mM NaCl 조건에서는 약 45%의 생체량 감소가 공히 확인되었다(Fig. 10C).

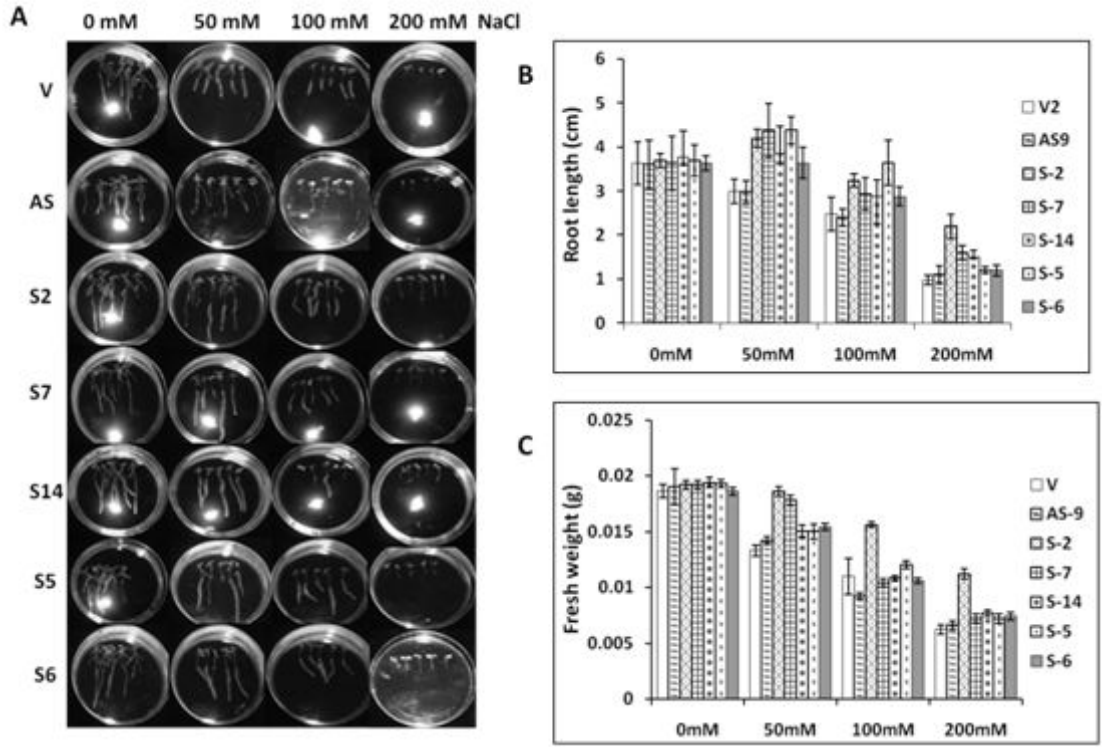

Figure 10. Enhanced tolerance to salt in P_{35S}:*CaBI-1* plants. **A**, Phenotype of transgenic tobacco plants (sense) and control plants (vector only and antisense) with or without salt stress. Kanamycin selected plantlets were transferred to MS medium containing different concentrations of NaCl and grown in vertical position for 10 days. Comparison of root length **B,** and fresh weight **C** in transgenic lines (sense) and control plants (vector and antisense plants) with or without salt stress. Data are mean values ± SD of three measurements.

침수스트레스는 잎이 8장 정도난 식물체를 4일간 물 속에 완전히 잠기게 한 후 4일간 정상적인 조건에서 배양함으로써 스트레스로부터의 회복기간을 주었다. 엽록소의 함량을 측정한 결과, wild type과 empty vector 형질전환체와 antisense 형질전환체로부터 평균치 2.6-3.1mg/g fresh weight가 측정된 반면에 sense 형질전환체로부터 5.2-7.1mg/g fresh weight의 엽록소가 측정되었다(Fig. 11). 단백질 함량의 측정결과는 대조구 line들로부터는 4.03-6.23mg/g fresh weight가 측정되었고 sense 형질전환체로부터는 8.23-12.77mg/g fresh weight가 측정되었다(Fig. 11). 이들 결과들은 *CaBI-1*의 도입과 발현에 의해 담배식물체가 침수스트레스에 대한 내성을 가지게 되었음을 보여준다.

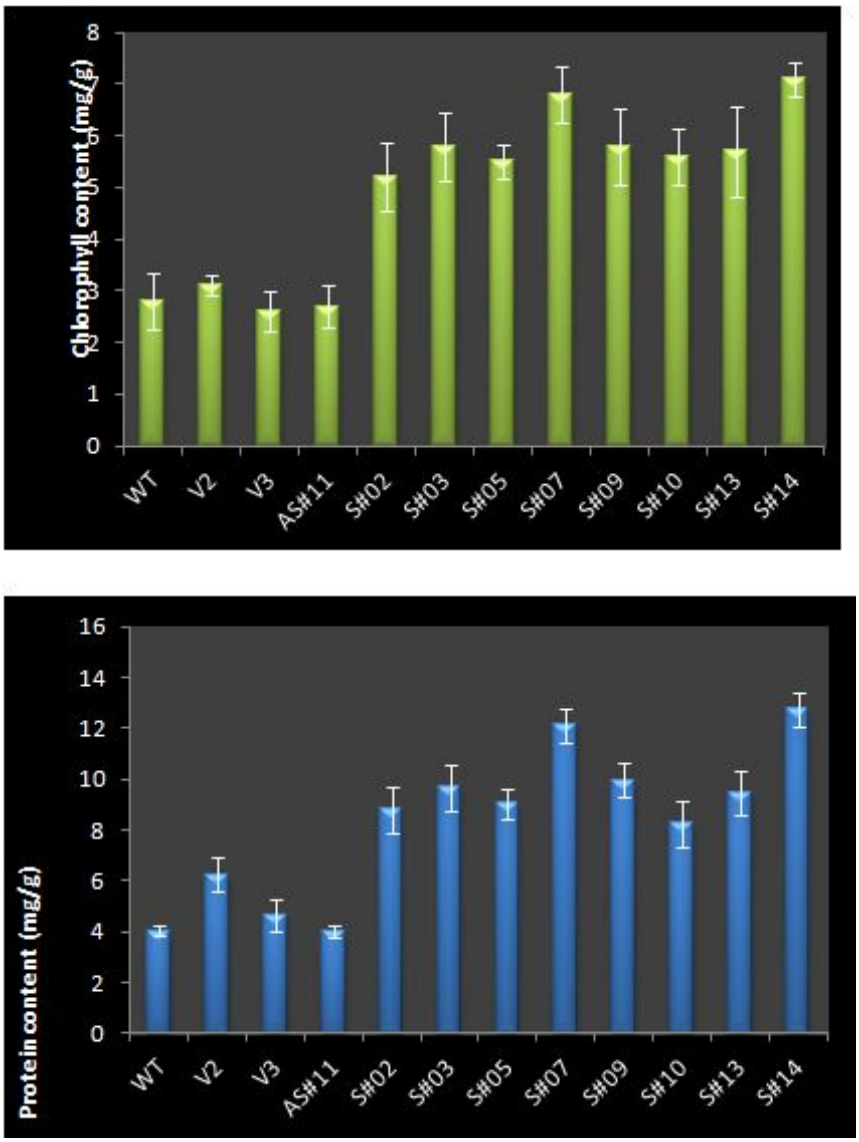

Figure 11. Enhanced flooding stress tolerance of P_{35S}:*CaBI-1* plants. Comparison of chlorophyll content in the wild type, vector and transgenic (sense and antisense) plants after flooding stress. All plants were fully submerged in water for 4 days and returned to the normal condition for recovery. After 4 days, total chlorophyll was extracted. Comparison of protein content in wild type, vector and P_{35S}:*CaBI-1* (sense and antisense) plants after the flooding stress and recovery. Data are mean values ± SD of three measurements.

저온스트레스에 대한 내성을 분석하였다. 대조구 식물체들과 *CaBI-1* sense 식물체들을 광주기 16시간이 유지되는 4℃ 저온실에서 4일간 배양하고 정상적인 배양조

건에서 5일간 배양하고 생체량과 relative water content를 측정하여 비교하였다. 그 결과, 생체량은 대조구 line들에서 1.59-2.62g이 측정되었고 sense 형질전환체 line들에서는 3.42-4.92g이 측정되었다. Relative water content는 대조구 line들에서 63.9-67.2%가 측정되었고 sense 형질전환체 line들에서는 71.6-80.1%가 측정되었다 (Fig. 12).

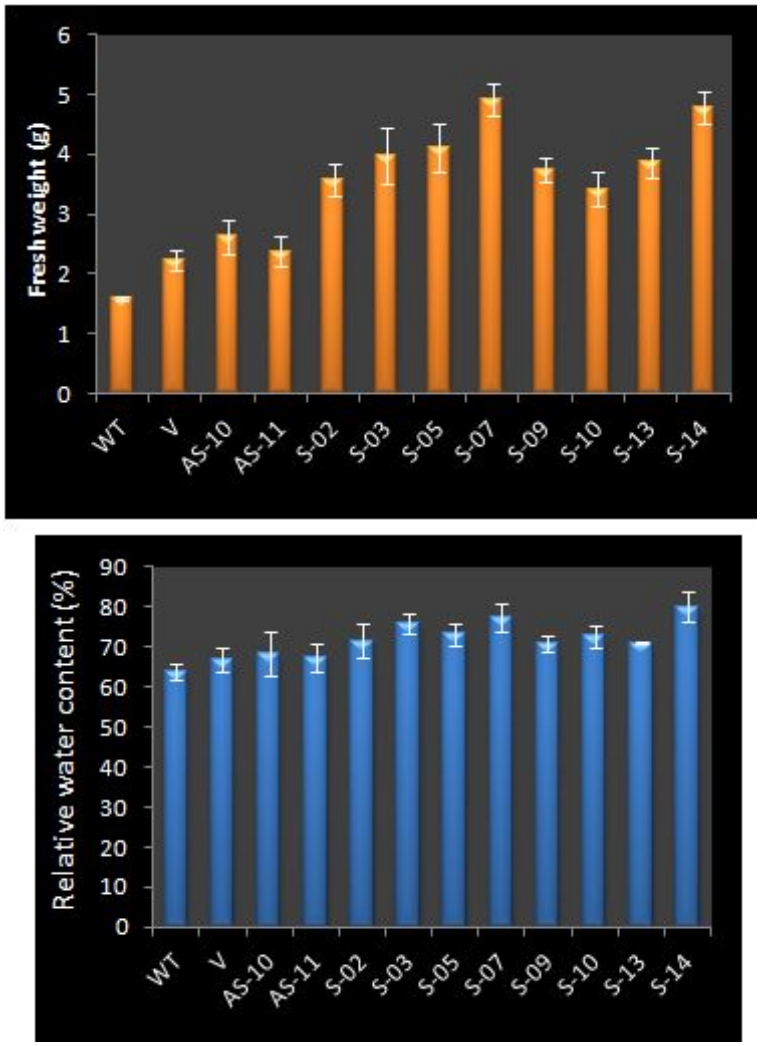

Figure 12. The tobacco plants expressing *CaBI-1* exhibited cold tolerance. Fresh weight of the wild type, vector and the transgenic lines after a cold treatment for 4 days and recovery for 5 days. Relative water content of wild type vector and transgenic lines after the cold treatment and recovery. Data are mean values ± SD of three measurements.

동해스트레스에 대한 내성을 분석하였다. 역시 *CaBI-1* sense 형질전환 담배식물체 line들과 empty vector 형질전환 담배식물체 line들을 잎이 5장 되게끔 키운 후 -

4℃와 -8℃ 냉동고에서 1시간 또는 2시간 처리하였다. 그리고 5일간 정상 생육조건에서 배양한 후 생체량을 비교하였다. 그 결과 CaBI-1 sense 형질전환체에서 대조구에 비해 유의성 있는 동해내성을 증가가 관찰되지 않았다(표 1).

CaBI-1 형질전환체 담배를 대상으로 1차년도에 비생물적 스트레스들에 대한 내성을 분석하는 과정에서 본 연구팀이 확인한 바에 따라 이후의 모든 분석은 우선적으로 생체량의 증가 여부의 확인에 초점을 맞추었고 1회의 분석에 가능한 많은 개체들을 같이 분석함이 긴요함을 확인하였다. 이에 이후의 분석에는 모두 Fig. 13과 Fig. 14에 보여진 배양판을 사용하였다.

아울러 각 스트레스의 조건은 다음과 같이 하였다:

-침수스트레스의 조건은 6일간 식물체 전체를 침수된 상태로 유지하고 꺼낸 후 4일간 배양실에서 키우고 생체량 측정 및 대조구와 비교.

-건조스트레스의 조건은 물주기를 18일간 중단하고 물을 준 후 8일간 배양실에서 키우고 생체량 측정 및 대조구와 비교.

-고온스트레스의 조건은 45℃에서 1시간 또는 2시간 처리하고 배양실에서 5일간 키우고 생체량 측정 및 대조구와 비교.

-저온스트레스의 조건은 4℃에서 4일간 16시간의 광주기가 유지된 상태로 처리하고 3일간 배양실에서 키우고 생체량 측정 및 대조구와 비교.

-동해스트레스의 조건은 -4℃ 또는 -8℃에서 1시간 또는 2시간 방치하고 배양실에서 5일간 배양한 후 생체량 측정 및 대조구와 비교.

-고염도스트레스는 kanamycin이 함유된 MS배지에 NaCl을 50mM, 100mM 또는 200mM을 첨가하여 만든 Petri dish 내의 agar 배지에 종자를 파종한 후 21일 후에 생체량을 측정하고 대조구와 비교.

**이상의 조건에서 일부 변경이 있었으면 변경된 내용은 표2, 표3과 표4의 비고란에 기재하였다.

Figure 13. Aluminium plate was covered with potting soil and lettuce seeds were sown. After one month of culture in the culture room, the full plate was subjected to abiotic stress treatments. The bottom photograph is one example of the lettuce plants after heat stress treatments and recovery period.

Figure 14. Aluminium plate was covered with potting soil and tobacco seeds were sown. After five weeks culture in the culture room, the full plate was subjected to abiotic stress treatments. The bottom photograph is one example of the tobacco plants after heat stress treatments and recovery period.

위에 적은 조건에서 이루어진 *CaBI-1* 유전자의 담배식물체에 도입과 발현에 따른 비생물적 스트레스에 대한 분석 결과를 생체량 측정결과를 중심으로 종합하면 표 1과 같다. 이전의 방법에 따라 수행된 연구결과들(Fig. 8-12)과 유사한 경향을 보임을 확인할 수 있었다. 생체량에 근거한 CaBI-1의 담배에서의 효과는 침수와 건조와 고온과 저온 스트레스에 대해서는 뚜렷한 내성의 증가가 관찰된 반면, 고염도와 동해 스트레스의 경우에는 효과의 유의성이 없었다.

표1. *CaBI-1* 형질전환체 담배와 empty vector 형질전환체 대조구 간의 비생물적 스트레스 처리 후의 생체량 비교.

스트레스 요인	처리 조건	대조구 비 생체량 증가율(%)	비고
침수	6일간	4.5 ± 0.9	침수 처리 후, 4일간 배양실에서 배양
건조	18일간 물주기 중단	5.1 ± 2.2	건조 처리 후, 8일간 배양실에서 배양
고온	45℃, 1시간	4.9 ± 1.3	고온 처리 후, 5일간 배양실에 배양
	45℃, 2시간	8.6 ± 7.4	
저온	4℃, 4일간	8.4 ± 2.9	저온 처리 후, 3일간 배양실에서 배양
고염도	21일간	-0.6 ± 1.8	50, 100, 200mM에 따른 차이가 미미하여 함께 계산하였음.
동해	-4℃, 1시간	3.2 ± 1.4	동해 처리 후, 5일간 배양실에서 배양
	-4℃, 2시간	3.8 ± 1.7	동해 처리 후, 5일간 배양실에서 배양
	-8℃, 1시간	2.1 ± 1.3	동해 처리 후, 5일간 배양실에서 배양
	-8℃, 2시간	-5.6 ± 2.1	동해 처리 후, 5일간 배양실에서 배양

*수치는 한번의 측정에 8개체를 사용하였으며, 모두 세 번의 측정을 한 후 평균치와 표준오차를 계산한 것임.

*CaBI-1*의 도입 및 발현이 십자화과 작물에서는 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기 위해 상추에 담배에서 사용한 *CaBI-1* expression vector를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 도입하고 *in vitro* regeneration 하였다(Fig. 15).

In vitro regeneration되어 배양토로 옮겨진 putative transgenic 상추 식물체에 대해서는 형질전환 담배식물체의 감별의 경우와 같이 *CaBI-1* transcript의 생성 여부를 RNA blot 분석을 수행하여 확인하였다. 그 결과, 90% 이상의 형질전환 과정과 재분화 과정을 거친 상추 식물체들이 도입된 *CaBI-1*의 transcript를 생성함이 확인되었다(Fig. 16).

<3 weeks after inoculation>

<4 weeks after inoculation>

<6 weeks after inoculation>

<12 weeks after inoculation>

Figure 15. *In vitro* regeneration of the lettuce plants after transformation of the *CaBI-1* expression vector.

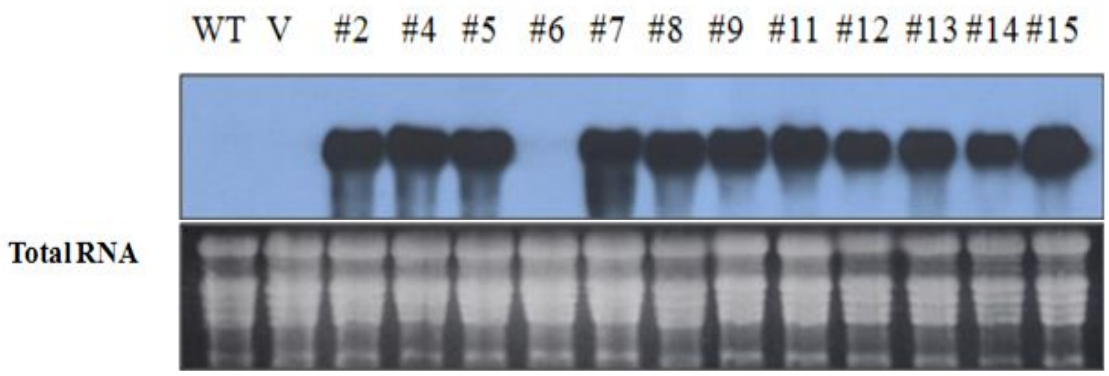

Figure 16. Confirmation of *CaBI-1* overexpressed transgenic lettuce plants by RNA blot hybridization. Total RNAs (20 μg) were separated by electrophoresis on a 1.2%-formaldehyde-agarose gel and blotted to a Hybond -N nylon membrane. To confirm complete transfer of RNA to the membrane filter, both gel and membrane were viewed under UV light after transfer. Blots were hybridized to ^{32}P-labelled *CaBI-1* ribo-probe under normal stringent hybridization and washing conditions.

형질전환체임이 확인된 상추 식물체는 키워서 자가수분시켜 T_2 generation의 종자를 확보하여 생체량의 변화를 중심으로 비생물적 스트레스들에 대한 내성을 분석하였다. 생체량의 변화에 근거한 결과는 표2에 종합되어 있으며, 분석 모든 비생물적 스트레스 처리에서 도입된 *CaBI-1*에 의한 내성 증진 효과가 관찰되지 않았다. 비생물적 스트레스 처리 조건은 20쪽에 정리된 조건들과 같게 유지하였으나 고온의 경우는 처리 온도를 42℃로 낮추었다.

표 2. *CaBI-1* 형질전환체 상추와 empty vector 형질전환체 상추(대조구) 간의 비생물적 스트레스 처리 후의 생체량 비교.

스트레스 요인	처리 조건	대조구 비 생체량 증가율(%)	비고
침수	4일간	1.8 ±1.2	침수 처리 후, 배양실에서 5일간 배양
건조	7일간 물주기 중단	-1.2 ±0.8	건조 처리 후, 물 주고 4일간 배양실에서 배양
고온	42℃, 1시간	-4.8 ±3.2	고온 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	42℃, 2시간	-1.4 ±4.7	

저온	4℃, 4일간	-0.2 ±1.8	저온 처리 후, 배양실에서 2일간 배양
고염도	14일간	1.8 ± 8.9	처리구에 따라 생체량 변화에 많은 차이가 있음.
동해	-4℃, 1시간	-1.2 ±6.8	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-4℃, 2시간	1.1 ±0.3	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-8℃, 1시간	-1.9 ±5.2	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-8℃, 2시간	모두 죽음	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양

*수치는 한번의 측정에 8개체를 사용하였으며, 모두 세 번의 측정을 한 후 평균치와 표준오차를 계산한 것임.

CaBI-1 형질전환체 담배와 *CaBI-1* 형질전환체 상추의 비생물적 스트레스에 대한 내성 분석이 진행되는 동안에 CaBI-1의 식물체 내에서의 가능한 기능을 분자 수준에서 해명하기 위해 *CaBI-1* sense 형질전환 담배 식물체에서 대조구 식물체와는 다르게 발현되는 transcript들의 분석을 수행하였다. 즉, *CaBI-1* 형질전환 식물체에서 CaBI-1에 의해 조절되는 유전자군을 transcriptome 분석을 하고자 하였다.

담배의 gene chip이 존재하지 않음으로 애기장대의 27K gene chip(ATH1 genome array)을 사용하였으며, 정상적인 생육조건에서 배양 중인 *CaBI-1* sense 형질전환체 담배 line 2개(S-2와 S-14)에서 추출한 poly(A)$^+$RNA군과 empty vector 형질전환체 담배 line 1개에서 추출한 poly(A)+RNA군을 비교하였다. 식물체 line과 대조구와의 비교는 각 2회씩 반복하여 이루어졌으며 probe는 Cy3 또는 Cy5로 표지하여 사용하였다. 그리고 대조구에 비해 1.6배 이상의 증가가 4번의 분석에서 공통적으로 확인되는 유전자들을 CaBI-1에 의해 조절되는 유전자들로 추정하였다. 모두 73개의 유전자들이 P35S:*CaBI-1* 담배식물체들에서 대조구 식물체들에 비해 뚜렷하게 발현이 증가하는 유전자들로 나타났다(표 3).

이들 73개의 유전자들은 보고된 가능한 기능에 따라 7개의 그룹으로 구분하였다. 15개의 유전자들은 기존에 스트레스와 연관된 단백질들의 유전자들임이 보고되었으며 이들은 공히 식물세포가 여러 가지 비생물적 스트레스로부터 보호받는 역할을 함이 제안되었다(García-Gómez et al., 2000; Ueda et al., 2007; Larkindale and Vierling, 2008). 이들 중에는 small heat shock protein들이 포함되며, 이들은 공통적으로 P35S:*CaBI-1* 식물체에서 대조구에 비해 5배 이상의 발현양 증가가 확인되었다.

이들 이외에도 P35S:CaBI-1 형질전환 담배 식물체에서는 다양한 유전자들의 발현이 증가하였다. 콩에서 건조스트레스 내성과 연관되어 보고된 proline-rich protein

유전자(He et al., 2002; Battaglia et al. 2007), 벼에서 건조스트레스 내성과 연관되어 보고된 plasma membrane intrinsic protein (PIP) (Guo et al. 2006), 내염성과 관

표 3. P35S-*CaBI-1* 담배 식물체에서 대조구에 비해 발현양(transcript의 생성량)이 대폭 증가한 유전자들에 대한 microarray 분석 결과.

AGI codea	Gene Descriptionb	AffymetrixIDc	Fold changed	P-Value
Stress related Protein				
At3g12580	heat shock protein 70	256245_at	2.7705	9.57E-01
At5g02500	heat shock protein 18.2	250995_at	16.774	2.15E-02
At3g09440	heat shock protein 17.4	258979_at	5.5215	7.50E-01
At4g35100	plasma membrane intrinsic protein (simip)	266533_s_at	4.667	9.64E-01
At4g19200	proline-rich family protein	254559_at	2.992	1.66E-01
At5g61150	leo1-like family protein	247565_at	2.1255	5.59E-03
At5g35630	glutamine synthetase (gs2)	249710_at	22.032	4.93E-01
At4g09320	nucleoside diphosphatekinase 1 (ndk1)	255089_at	2.15	4.58E-01
At3g47650	bundle-sheath defective protein 2 family (bsd2)	252409_at	3.0465	7.65E-01
At5g38350	disease resistance protein (nbs-lrr class)	249562_at	1.6685	1.84E-01
At4g14960	tubulin alpha-6 chain (tua6)	245270_at	4.401	1.12E-01
At4g38970	fructose-bisphosphatealdolase	252929_at	11.1215	3.75E-01
At3g18780	actin 2 (act2)	257749_at	5.7135	2.55E-01
At1g50010	tubulin alpha-2 chain (tua2)	261639_at	6.3645	4.58E-01
At5g08290	yellow-leaf-specific protein 8 (yls8) / mitosis protein dim1	246006_at	3.0115	2.99E-01
At5g17170	rubredoxin family protein	250073_at	13.343	1.51E-01
At1g54500	rubredoxin family protein	262954_at	6.789	8.51E-01
Metabolism				
At5g38430	ribulosebisphosphatecarboxylase small chain 1b	264474_s_at	10.952	1.61E-02
At3g63440	fad-binding domain-containing protein / cytokinin oxidase family protein	251178_at	2.4595	4.55E-01
At4g13940	adenosylhomocysteinase / s-adenosyl-l-homocysteine hydrolase / adohcyase (sahh)	245356_at	3.005	2.96E-01
At4g33080	protein kinase	253359_at	1.6975	4.78E-01

At5g10170	inositol-3-phosphate synthase/ myo-inositol-1-phosphate synthase/ mi-1-p synthase	250471_at	4.124	4.06E-01

AGI codea	Gene Descriptionb	AffymetrixIDc	Fold changed	P-Value
Transcription factor				
At5g39690	no apical meristem (nam) protein-related	249463_s_at	1.939	1.61E-01
At5g37800	basic helix-loop-helix (bhlh) family protein		2.48	1.49E-01
At5g22260	male sterility 1 protein		1.9715	2.05E-01
At2g37470	histone h2b	265960_at	3.177	8.34E-01
At3g27360	histone h3	257714_at	5.215	4.19E-01
At5g10400	histone h3	250433_at	3.104	3.45E-01
Signal transduction				
At5g65430	14-3-3 protein gf14 kappa (grf8)	247188_at	3.1775	7.11E-01
At5g45810	cbl-interacting protein kinase 19 (cipk19)	248909_at	3.8725	1.14E-01
At5g63870	serine/threonine protein phosphatase (pp7)	247306_at	10.3505	3.83E-01
At1g70490	adp-ribosylation factor	260305_at	16.2095	2.50E-02
Protein fate (folding, modification, destination)				
At1g16890	ubiquitin-conjugating enzyme	264303_s_at	1.946	4.38E-01
At5g58590	ran-binding protein 1(ranbp1)	247771_at	1.816	1.82E-01
At2g36170	ubiquitin extension protein 2 (ubq2) / 60s ribosomal protein l40 (rpl40a)	263289_at	4.7775	4.17E-01
At1g29070	ribosomal protein l34 family protein	260898_at	3.903	6.44E-01
At3g52590	ubiquitin extension protein 1 (ubq1) / 60s ribosomal protein l40 (rpl40b)	252056_at	3.7	4.16E-01
At1g09070	c2 domain-containing protein / src2-like protein	264655_at	2.2945	5.93E-03
At4g05050	polyubiquitin (ubq11)	AFFX-Athal-Ubq_5_f_at 255257_at	19.22	4.44E-01
At1g31340	ubiquitin family protein		1.949	5.21E-01

AGI codea	Gene Descriptionb	AffymetrixIDc	Fold changed	P-Value
Energy				
At1g61520	chlorophyll a-b binding protein / lhci type iii (lhca3.1)	265033_at	18.4685	4.54E-01
At1g31330	photosystem i reaction center subunit iii family protein	262557_at	4.084	2.65E-01
At3g56940	dicarboxylate diiron protein (crd1)	251664_at	4.0525	3.22E-01
At4g28660	photosystem ii reaction centre w (psbw) family protein	253790_at	2.283	5.24E-01
At3g54890	chlorophyll a-b binding protein / lhci type i (cab) i	251814_at	4.6965	9.87E-01
At1g29910	chlorophyll a-b binding protein 2/ lhcii type i cab-2 / cab-140 (cab2a)	255997_s_at	7.7275	6.79E-01
At3g58510	dead box rna helicase/ putative (rh11)	251534_at	2.258	6.99E-01
At2g20260	photosystem i reaction center subunit iv/ chloroplast/ psi-e/ (psae2)	265287_at	9.836	7.33E-01
Protein synthesis				
At2g20450	60s ribosomal protein l14 (rpl14a)	263372_at	6.2775	8.41E-01
At4g31985	60s ribosomal protein l39 (rpl39c)	253482_at	5.0165	4.30E-01
At3g53740	60s ribosomal protein l36 (rpl36b)	251926_at	2.524	9.03E-02
At3g53890	40s ribosomal protein s21 (rps21b)	251921_at	8.838	9.85E-01
At3g53740	60s ribosomal protein l36 (rpl36b)	251926_at	3.3935	3.04E-01
At3g47370	40s ribosomal protein s20 (rps20b)	252413_at	7.2755	8.08E-01
At4g36130	60s ribosomal protein l8 (rpl8c)	265805_s_at	2.4535	8.41E-01
At1g04480	60s ribosomal protein l23 (rpl23a)	263665_at	6.4615	8.07E-01
At3g05560	60s ribosomal protein l22-2 (rpl22b)	259112_at	4.7395	7.04E-01
At3g08520	60s ribosomal protein l41 (rpl41d)	256438_s_at	2.3335	2.15E-01
At2g40205	60s ribosomal protein l41 (rpl41c)	256438_s_at	2.8045	3.31E-01
At2g36160	40s ribosomal protein s14 (rps14a)	263286_at	2.845	1.98E-01
At5g18380	40s ribosomal protein s16 (rps16c)	263821_s_at	3.783	9.33E-01

AGI codea	Gene Descriptionb	AffymetrixIDc	Fold changedd	P-Value
Unclassified protein				
At1g78915	expressed protein		3.684	6.42E-01
At5g54440	expressed protein	248158_at	1.973	1.87E-01
At1g65295	expressed protein	264164_at	3.7205	8.50E-01
At4g28100	expressed protein	253856_at	1.771	1.82E-01
At4g10220	hypothetical protein ib1c3-1 protein	255804_at	1.962	1.27E-01
At4g00950	expressed protein	255652_at	1.7895	1.08E-01
At3g46480	oxidoreductase/ 2og-fe(ii) oxygenase family protein	252526_at	1.86	2.20E-01
At4g21850	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / seir domain-containing protein	254387_at	4.2195	7.45E-01
At3g11560	expressed protein	259292_at	5.2525	5.38E-01
At1g08380	expressed protein	261746_at	5.115	9.61E-01
At5g35753	expressed protein		5.218	4.15E-01
At1g64150	expressed protein	262342_at	33.032	1.75E-02

[a]Arabidopsis gene index number.
[b]AccordingtotheArabidopsisinformationresource.
[c]Identification number of Affymetrix Arabidopsis Gene Chip (ATH1). Genome Mapping Date: 5/29/2008, TAIR8 release.
[d]Fold change indicates the average of results from four arrays.
Highlighted genes were confirmed by specific oligomer northern.

련되어 보고된 glutamin synthetase (GS2), nucleoside diphosphate kinase 1 (ndk1), tubulin alpha-6 chain (tua6)과 tubulin alpha-2/alpha-4 chain (tua2) (Hoshida et al., 2000; Huo et al., 2004; Verslues et al., 2007) 등은 CaBI-1이 담배에서 비생물적 스트레스에 내성을 증진하는 효과에 관련된 단백질들일 가능성이 높다 하겠다.

Microarray에 사용된 gene chip이 담배의 것이 아니고 애기장대의 것이기 때문에 microarray 결과를 RNA blot hybridization을 수행하여 검증하였다. 무작위로 발현양이 증가하는 유전자를 나타내는 70mer oligomer(ATH1 array에 spot된 oligomer)를 합성하고 terminal transferase reaction으로 ^{32}P end labeling한 후, sense 형질전환체 담배와 wild type 담배에서 추출한 RNA를 대상으로 RNA blot hybridization을 수행하였다. 그 결과, microarray의 결과에 근접하는 RNA blot hybridization 결과(Fig. 17)를 확인할 수 있어 microarray 결과가 검증되었다.

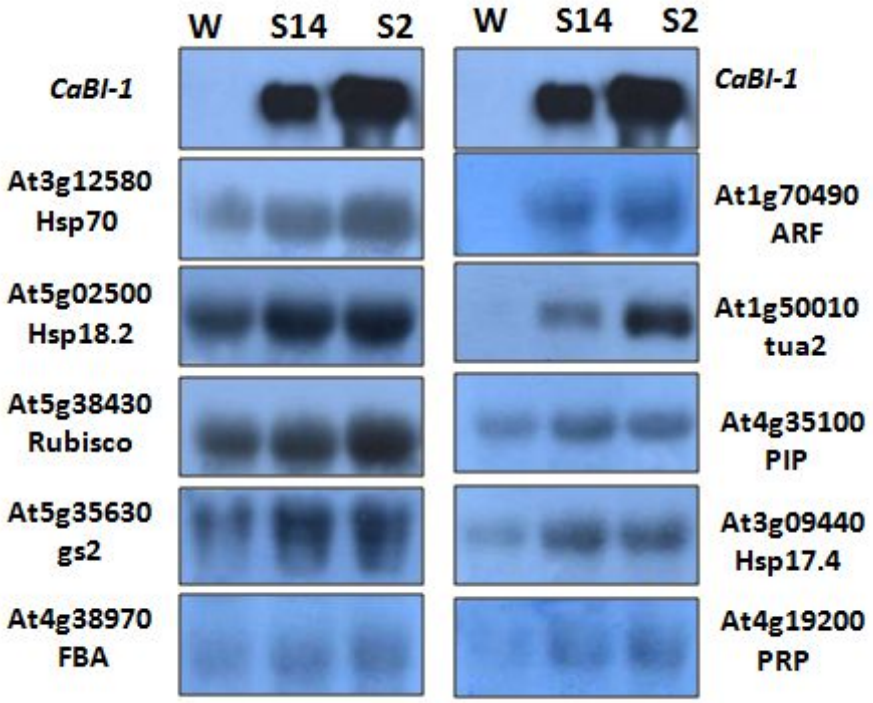

Figure 17. Expression of putative *CaBI-1* target genes in wild-type tobacco and *CaBI-1* over-expressing tobacco plants. Total RNAs (20 μg) from wild type and two transgenic lines were separated by electrophoresis on a 1.2%-formaldehyde-agarose gel and blotted to a Hybond - N nylon membrane. The filter was hybridized with γ^{32}P-labeled oligonucleotide probe under normal stringent hybridization and washing conditions.

CaBI-1 sense 형질전환체 담배에 대한 microarray 분석 결과로 small heat shock protein들의 유전자가 대폭 발현양이 증가함을 확인하였다. 이에 small heat shock protein의 과발현에 따른 작물의 비생물적 스트레스 내성 증진 여부를 확인하고자 연구를 수행하였다. Heat shock protin들 중, 본 연구실에서 기존에 확보하고 있던 두 개의 small heat shock protein의 유전자를 사용하기로 결정하였으며, 이들은 공히 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin38)에서 분리된 cDNA 클론들에 의해 기록되어 있는 유전자들이었다. 그 중 특허출원이 완료된 유전자(*TLHS1* 또는 *NtLHS1*으로 명명; Kim et al., 2004, Plant Science 167, 1017-1025)의 염기서열과 이로부터 번역된 아미노산 서열은 Fig. 18과 같다. 번역된 아미노산 서열은 small heat shock protein의 특징적인 구조인 alpha crystalline domain의 conserved region I과 II를 가

지고 있다(Fig. 19).

```
TGCATCCAATCACCTTGCTTACTCGTGATCGTGTTGACGAGCTACGCAATCAAGTACCTT    60
ATAATTCCAGCCTTAAGCATCATCCGATTATCATCATTTCAAGTCCCTCCGTTCAGATAA   120
AAAAATGTCTCTGATTCCAAGCTTCTTTGATGGCCGCAGGAGCAACATCTTCGATCCATT   180
     M  S  L  I  P  S  F  F  D  G  R  R  S  N  I  F  D  P  F     19
CTCCCTCAACATATGGGATCCTTTCGAGGGCTTCCCTTTCTCCGGCACGGTCGCCAACAT   240
 S  L  N  I  W  D  P  F  E  G  F  P  F  S  G  T  V  A  N  I     39
TCCAACCTCTACTCGTGAAACCGCTGCTTTCTCGAGTGCTCGAATTGATTGGAAAGAGAC   300
 P  T  S  S  T  R  E  T  A  A  F  S  S  A  R  I  D  W  K  E  T     59
CCCAGAATCCCATGTCTTTAAGGTGGATCTTCCTGGAATTAAGAAAGAGGAGGTGAAGGT   360
 P  E  S  H  V  F  K  V  D  L  P  G  I  K  K  E  E  V  K  V     79
GGAGGTAGAAGAAGGAAGAGTTCTACAAATTAGTGGCGAGAGAAGCAGAGAGCAAGAGGA   420
 E  V  E  E  G  R  V  L  Q  I  S  G  E  R  S  R  E  Q  E  E     99
GAAGAACGATAAATGGCACAGCATGGAGAGGAGCAGCGGAAAGTTCCTTAGGAGGTTTAG   480
 K  N  D  K  W  H  S  M  E  R  S  S  G  K  F  L  R  R  F  R    119
GTTGCCGGAGAATATCAAAATGGAAGAGATTAAGGCAACTATGGAGAATGGGGTGCTCAC   540
 L  P  E  N  I  K  M  E  E  I  K  A  T  M  E  N  G  V  L  T    139
TGTGACTGTCCCAAAAATGGAGGAAAAGAAACCTGAGGTGAAGGCCATTGACATCTCTGG   600
 V  T  V  P  K  M  E  E  K  K  P  E  V  K  A  I  D  I  S  G    159
TTAAATAACAGAGGGGGGCGCTCGGTGGTTGCTGATCTACTTGTACCTTTCGGAAGTGAT   660
 ***
CAGTGTCTTGTTTCTAGAAGTCTTGTTTTTAGGAGCTTTTAGCTCAAAAATGTGTCCTGT   720
ATCATCATATTTGATGCTTTGTGGGTGTTTTACATATACACTTCTACTCTATGAATGTAG   780
TAATTTGTGTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                             816
```

Figure 18. Nucleotide sequence and a deduced amino acid sequence of TLHS1. Amino acid sequence is represented in one letter symbols. A putative termination codon, TAA, is in ***.

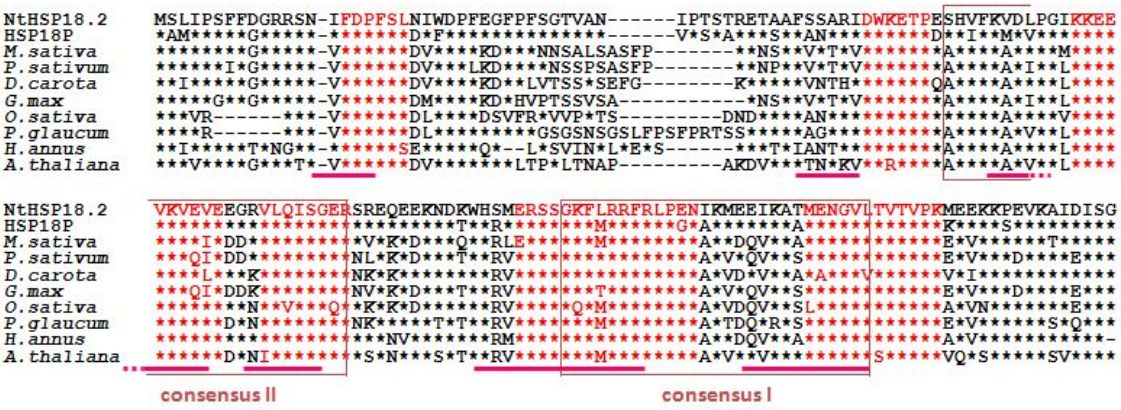

Figure 19. Comparison of the deduced amino sequences of *NtLHS-1* (NtHSP18.2) and other small heat-shock proteins. ** represent conserved amino acids. Hyphen was inserted between the amino acid sequence to not the gaps. Boxes with solid line represent the conserved domains suggested (Waters, 1995). Solid underlines indicate the conserved domains proposed. Accession number of each gene: HSP18P, X70688; *M. sativa*, P27880; *P. sativum*, P19243; *D. carota*,

CYPZ77; *G. max*, P05478; *O. sativa*, T04171; *P. glaucum*, S72544; *H. annus*, S71566; *A. thaliana*, P13853.

이들 small heat shock protein들의 open reading frame도 앞에서 사용한 P35S를 가지고 있는 plant expression vector에 삽입하였고(Fig. 20), *A. tumefaciens*를 사용하여 담배와 상추에 도입하였다. 형질전환된 담배 세포와 상추 세포의 kanamycin 함유 MS 배지에서의 선별과 *in vitro* regeneration, RNA blot 분석에 의한 target gene의 발현 여부 확인 그리고 자가수분을 수행하여 T_2 generation 종자의 확보와 이들 종자를 사용한 비생물적 스트레스 내성 분석은 앞에서 기술한 바에 따랐으며 전술한 바와 같이 약간의 변형은 표에 기재하였다.

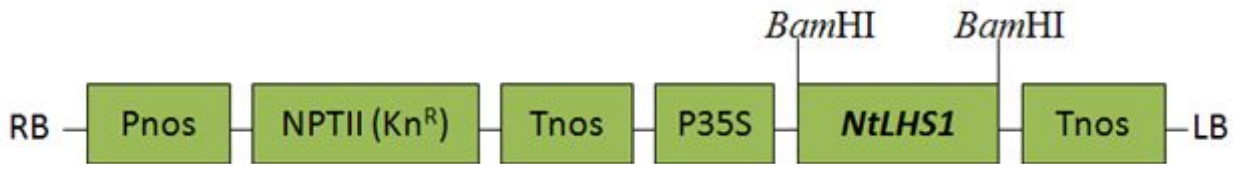

Figure 20. Diagrammatic representation of pBKS1-*NtLHS1* construct employed for tobacco and lettuce transformation. *NtLHS1*, 480 bp *Nicotiana tabacum* cytosolic small heat shock protein gene; Pnos, promoter of nopaline synthase gene; NPT, neomycin phosphotransferase gene; P35S, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; Tnos, terminator of nopaline synthase gene; Kn^R, kanamycin resistance gene; RB, right border sequence of T-DNA; LB, left border sequence of T-DNA.

형질전환체임이 확인된 담배 식물체는 키워서 자가수분시켜 T_2 generation의 종자를 확보하여 생체량의 변화를 중심으로 비생물적 스트레스들에 대한 내성을 분석하였다. 생체량의 변화에 근거한 결과는 표4에 종합되어 있다. 비생물적 스트레스 처리 조건은 20쪽에 정리된 조건들과 같게 유지하였다. 건조 스트레스와 고온 스트레스에 대해 뚜렷한 내성 증진 효과가 확인되었고, 특히 저온과 동해 스트레스에 대한 내성 증진 효과는 탁월하였다.

표 4. *TLHS1*(*NtLHS1*) 형질전환체 담배와 empty vector 형질전환체 대조구 간의 비생물적 스트레스 처리 후의 생체량 비교.

스트레스 요인	처리 조건	대조구 비 생체량 증가율(%)	비고
침수	4일간	-6.5 ±3.2	침수 처리 후, 배양실에서 5일간 배양

건조	7일간 물주기 중단	10.4 ±1.9	건조 처리 후, 물 주고 배양실에서 4일간 배양
고온	45℃, 1시간	-0.1 ±2.7	고온 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	45℃, 2시간	17.1 ±2.2	
저온	4℃, 4일간	24.1 ±3.9	배양실에서 생육한 *TLHS1* 형질전환체와 vector 형질전환체를 4℃ 저온실에서 16시간 광주기를 유지하며 5일간 배양하고 shoot 생체량 비교치
고염도	14일간	4.2 ±0.4	50, 100, 200mM에 따른 차이가 미미하여 함께 계산하였음.
동해	-4℃, 1시간	20.5 ±15.6	배양실에서 생육한 *TLHS1* 형질전환체와 vector 형질전환체를 -4℃ 또는 -8℃ 냉동고에서 1시간 또는 2시간 동해 처리를 하고 배양실로 옮겨 5일간 배양한 후 측정한 생체량 비교치
	-4℃, 2시간	94.9 ±19.8	
	-8℃, 1시간	110.6 ±20.4	
	-8℃, 2시간	112.1 ±25.6	

*수치는 한 번의 측정에 8개체를 사용하였으며, 모두 세 번의 측정을 한 후 평균치와 standard deviation을 계산한 것임.

동일한 *TLHS1* 발현벡터를 상추에 전술한 방법에 따라 도입하여 발현시켰다. 형질전환체임이 확인된 상추 식물체는 키워서 자가수분시켜 T_2 generation의 종자를 확보하여 생체량의 변화를 중심으로 비생물적 스트레스들에 대한 내성을 분석하였다. 생체량의 변화에 근거한 결과는 표5에 종합되어 있으며, 비생물적 스트레스 처리 조건은 20쪽에 정리된 조건들과 같게 유지하였으나 고온의 경우는 처리 온도를 42℃로 낮추었다. 저온 스트레스와 고염도 스트레스의 경우는 유의성 있는 내성 증진 효과가 관찰되지 않은 반면, 침수 스트레스와 건조 스트레스와 고온 스트레스와 동해 스트레스에 대해서는 뚜렷한 내성 증진 효과가 확인되었다.

표 5. *TLHS1*(*NtLHS1*) 형질전환체 상추와 empty vector 형질전환체 대조구 간의 비생물적 스트레스 처리 후의 생체량 비교.

스트레스 요인	처리 조건	대조구 비 생체량 증가율(%)	비고
침수	4일간	36.0 ±2.5	침수 처리 후, 배양실에서 5일간 배양
건조	7일간 물주기 중단	36.3 ±5.7	건조 처리 후, 물 주고 배양실에서

			4일간 배양
고온	42℃, 1시간	15.0 ±3.2	고온 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	42℃, 2시간	19.4 ±4.5	
저온	4℃, 5일간	0.3 ±4.1	저온 처리 후, 배양실에서 2일간 배양
고염도	14일간	10.92 ±6.8	50, 100, 200mM 차이가 미미하여 데이터 같이 처리되었음.
동해	-4℃, 1시간	53.4 ±10.8	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-4℃, 2시간	55.7 ±12.3	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-8℃, 1시간	158.8 ±25.9	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-8℃, 2시간	112.1 ±24.5	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양

*수치는 한 번의 측정에 8개체를 사용하였으며, 모두 세 번의 측정을 한 후 평균치와 standard deviation을 계산한 것임.

본 연구실에서는 TLHS1과 같은 family에 속하는 담배의 cytosolic small heat shock protein 유전자를 하나 더 확보하고 있었으며(*LHS18.9*로 명명됨), 이를 이용한 형질전환체의 제조 및 비생물적 스트레스 내성 증진 효과를 분석하였다. 전술한 방법에 따라 담배에 도입 및 발현시키고, 형질전환체임이 확인된 담배 개체는 키워서 자가수분시켜 T_2 generation의 종자를 확보하여 생체량의 변화를 중심으로 비생물적 스트레스들에 대한 내성을 분석하였다. 생체량의 변화에 근거한 결과는 표6에 종합되어 있으며, 비생물적 스트레스 처리 조건은 20쪽에 정리된 조건들과 같게 유지하였다. 고염도 스트레스의 경우는 내성의 증진 정도가 유의성을 나타내지 않았으나 다른 스트레스에 대해서는 공통적으로 폭넓게 유의성 있는 내성의 증가가 확인되었다.

표 6. *LHS18.9* 형질전환체 담배와 empty vector 형질전환체 대조구 간의 비생물적 스트레스 처리 후의 생체량 비교.

스트레스 요인	처리 조건	대조구 비 생체량 증가율(%)	비고
침수	4일간	10.0 ± 1.7	침수 처리 후, 배양실에서 5일간 배양
건조	7일간 물주기 중단	10.4 ± 1.9	건조 처리 후, 물 주고 배양실에서 4일간 배양
고온	45℃, 1시간	-0.1 ± 2.7	고온 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	45℃, 2시간	17.1 ± 2.2	
저온	4℃, 4일간	10.7 ± 2.4	저온 처리 후, 배양실에서 2일간 배양

고염도	14일간	4.2 ± 0.4	50, 100, 200mM 차이가 미미하여 데이터 같이 처리되었음.
동해	-4℃, 1시간	5.2 ± 1.8	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-4℃, 2시간	11.2 ± 4.3	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-8℃, 1시간	24.1 ± 6.5	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양
	-8℃, 2시간	28.2 ± 5.8	동해 처리 후, 배양실에서 4일간 배양

*수치는 한번의 측정에 8개체를 사용하였으며, 모두 세 번의 측정을 한 후 평균치와 standard deviation을 계산한 것임.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구의 목표였던 고추의 세포사멸억제인자 1종(*CaBI-1*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 대한 내성이 증가한 담배 형질전환체를 개발한 것은 연구의 목표 달성을 이룬 연구결과라 판단된다. 반면 *CaBI-1*의 상추 형질전환체가 유의성 있는 비생물적 스트레스에 대한 내성 증가를 보이지 않았음은 연구의 시작 단계에서는 예측하지 못했던 바이었다.

*CaBI-1*의 담배에서의 기능을 분자수준에서 분석하기 위해 수행한 *CaBI-1* 형질전환 담배 식물체에 대한 transcriptome 분석은 *CaBI-1*의 기능과 연관된 small molecular chaperone의 활용 가능성을 제시하였다. 이에 따라 small heat shock protein의 유전자들을 사용하여 이들 단백질을 과발현하는 형질전환 담배 식물체와 상추 식물체를 제조하여 이들이 뚜렷하고 폭넓게 비생물적 스트레스들에 대한 내성을 나타냄을 확인한 연구 수행은 매우 바람직하다고 판단된다.

이들 새로운 기술들은 다양한 작물들에 적용이 가능할 것으로 판단되어 활용에 커다란 기대를 하고 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

-고추의 세포사멸억제인자 1종(*CaBI-1*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 대한 내성이 증가한 담배 형질전환체 개발.
-세포사멸을 억제하는 것으로 판단되는 molecular chaperone 유전자 1종(*LHS18.9*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 내성이 증가한 담배 형질전환체 개발.
-CaBI-1이 과발현되어 고염도 내성이 증가한 상추 형질전환체 개발.
-세포사멸을 억제하는 것으로 판단되는 molecular chaperone 유전자 1종(*NtHSP18.2*)이 과발현되어 다양한 비생물적 스트레스에 내성이 증가한 상추 형질전환체 개발.

성과활용 계획

-*NtHSP18.2*는 십자화과 작물에 스트레스 내성 증가를 목적으로 널리 사용이 가능할 것으로 판단됨.
-*LHS18.9*는 가지과 작물과 십자화과 작물에 스트레스 내성 증가를 목적으로 널리 사용이 가능할 것으로 판단됨.
-*CaBI-1*의 경우는 *NtHSP18.2*와 *LHS18.9*에 비해 효과가 약함으로 작물에 내성 부여를 목적으로 사용하기 위해서는 적절한 조건의 분석이 추가되어야할 것으로 판단함.
-영농에 사용을 위해서는 현재 영농에 사용되고 있거나 사용 예정인 품종과의 여교배를 통한 형질의 이전이 필수이며, 이를 위해서 종묘회사 또는 관련 연구기관에 본 과제의 수행으로 확보된 담배와 상추 line들을 소개하고 제공하여 기술 및 재료의 이전을 추구함.
-현재 진행 중인 제3세대 형질전환체의 육종 및 분석이 완료되는 데로 품종 등록 3건. 제3세대 형질전환체의 분석 시에는 종묘회사 또는 관련 기관의 협조를 얻어 보나 나은 시설을 사용하여 그 간의 연구결과에서 실험시설의 미비로 발생한 것으로 판단되는 data 간의 차이를 줄이도록 노력함.
-담배와 상추의 육종 모본 line으로 종묘회사에 매매.
-출원된 특허의 산업화.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구의 주제인 세포사멸 억제 단백질 유전자와 세포사멸과 깊은 관련성이 있는 것으로 보고된 small molecular chaperone 유전자를 활용하여 작물에 비생물적 스트레스 내성을 폭넓게 도입한 보고는 없다. 세포사멸 억제 단백질과 small molecular chaperone의 구조와 기능에 대한 기초연구는 세계적으로 매우 활발히 진행되고 있으며 개략적인 내용은 제2장에 정리하였다.

제 7 장 참고문헌

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K. (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-related gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.

Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y., and Galili, G. (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought and salt stresses. *Plant Cell* 15: 439-447.

Anami, S., De Block, M., Machuka, J., and Van Lijsebettens, M. (2009) Molecular improvement of tropical corn for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. Crit. Rev. Plant Sci. 28: 16-35.

Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.

Arakawa, T., Kita, Y., and Carpenter, J. F. (1991) Protein-solvent interaction in pharmaceutical formulations. *Pharm. Res.* 8: 285-291.

Bailer-Serres, J. and Voesenek, L.A. (2008) Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 313-339.

Basha, E., Lee, G.J., Breci, L.A., Hausrath, A.C., Buan, N.R., Giese, K.C., and Vierling, E. (2004) The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular proteins. J. Biol. Chem. 279: 7566-7575.

Battaglia, M., Solorzano, R.M., Hernandez, M., Cuellar-Oritz, S., Garcia-Gomez, B.,

Marquez, J., and Corvarrubias, A.A. (2007) Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. Planta 225: 1121-1133.

Bolduc, N. Ouellet, M., Pitre, F., and Brisson, L.F. (2003) Molecular characterization of two plant BI-1 homologoues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. Planta 216: 377-386.

Bray, E.A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. (2000) Responses tp abiotic stress. *In* Biochemistry & Molecular Biology of Plants, BB Buchanan, W, Gruissem and RL. Jones ed. American Society of Plant Biologists: Rockville

Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci. 12: 444-451.

Close, T. J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97: 795-803.

Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993) Proline biosynthesis and osmoreguation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.

Duan Y, Zhang W, Li B, Wang Y, Li K, Han C, Zhang Y, Li X (2010) An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in Arabidopsis. New Phytol 186: 681-695.

Eichmann R, Bischof M, Weis C, Shaw J, Lacomme C, Schweizer P, Duchkov D, Hensel G, Kumlech J, Huckelhoven R (2010) Bax Inhibitor-1 is required for full susceptibility of barley to powdery mildew. Mol Plant Microbe. Interact 23: 1217-1227.

Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F., and Barkels, D. (2000) Water deficit trigger phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111-123.

Galinski, E. A. (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487-496.

Garcia-Gomez, B.I., Campos, F., Hernandez, M., and Covarrubias, A.A. (2000) Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. Plant J. 22: 277-288.

Garg, A.K., Kim, J.-K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., and Wu, R.J. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abioitc stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 15898-15903.

Guerrero, F. D., Jones, J. T., and Mullet, J. E. (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted: sequence and expression of three inducible genes, *Plant Mol. Biol.* 15, 11-26.

Gou, L., Wang, Z.Y., Lin, J., Cui, W.E., Chen, J., Liu, M., Chen, Z.L., Qu, L.J., and Gu, H. (2006) Expression and functional analysis of the rice plasma membrane intrinsic protein gene family. Cell Res. 16: 277-286.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and

molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 463-499.

He, C.Y., Zhang, J.S., and Chen, S.Y. (2002) A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicyclic acid, an endogenous circadian rhythm and by vairous stresses. Theor. Appl. Genet. 104: 1125-1131.

Holmstrom, K. and Welin, B. (1996) Drought tolerance in tabacco. *Nature* 379: 683-684.

Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., and Takabe, T. (2000) Enhanced tolerance to salt stress in trnasgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. Plant Mol. Biol. 43: 103-111.

Huckelhoven, R. (2004) BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. Kluwer Academic Publishers 9: 299-307.

Huo, C.M., Zhao, B.C., Ge, R.C., Shen, Y.Z., and Huang, Z.J. (2004) Proteomic analysis of the salt tolerance mutant of wheat under salt stress. Yi Chuan Xue Bao. 31: 1408-1414.

Immink, R.G.H. and Angenent G.C. (2002) Transcription factors do it together: the hows and whys of studying protein-protein interactions. *Trends Plant Sci.* 7: 531-534.

Ingram, J. and Bartels, D. (1996) The molcular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.

Ishikawa T, Takahara K, Hirabayashi T, Matsumura H, Fujisawa S, Terauchi R, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2010) Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1. Plant Cell Physiol 51: 9-20.

Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Crispeels, M. J., Larsson, C., and Kjellbom, P. (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10, 451-459.

Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karisson, M., and Johanson, U. (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 308-314.

Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. FASEB J. 24: 3633-3642.

Kroemer, G. (1997) The proto-oncogene of Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nat. Med. 3: 614-620.

Lam, E., Kato, N., and Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature 411: 848-853.

Lane, A. and Javis, A. (2007) Changes in climate will modify the geography of crop suitability: agricultural biodiversity can help with adaptation. EJournal 4: 1-12.

Larkindale, J. and Vierling, E. (2008) Core genome responses involved in acclimation to high temperature. Plant Physiol. 146: 748-761.

LeRudulier, D. and Bouillard, L. (1983) Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella*

pneumoniae and other members of the *Enterobacteriaceae. Appl. Environ. Microbiol.* 46: 137-161.

Liu, Q., Kasuga, M., Sskuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 andDREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate tow cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.

MacRae, T.H. (2000) Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging idea. Cell. Mol. Life Sci. 57: 899-913.

Nagano M, Ihara-Ohori Y, Imai H, Inada N, Fujimoto M, Tsutsumi N, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2009) Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome *b5*. Plant J 58: 122-134.

Nakamoto, H. and Vigh, L. (2007) The small heat shock proteins and their clients. Cell. Mol. Life Sci. 64: 294-306.

Pilson-Smits, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J. Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J., and Smeekens, S. C. M. (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drouhgt stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.

Rizhsky, L., Liang, H., and Mittler, R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130: 1143-1151.

Sanchez, P., de Torres-Zabala, M., and Grant, M. (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly up regulated during wounding and pathogen challenge. Plant J. 21: 393-399.

Scorrano, L. and Korsmeyer, S.J. (2003) Mechanism of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochem. Biophys. Res. Comm. 304: 437-444.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 781-803.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.

Survila, M., Heino, P., and Palva, E.T. (2009) Genes and gene regulation for low temperature tolerance: In *Genes for Plant Abiotic Stress*, M.A. Jenks and A.J. Wood, eds., Blackwell Publishing, pp. 185-219.

Ueda, A., Yamane, Y.Y., and Takabe, T. (2007) Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. Biochem. Biophy. Res. Comm. 355: 61-66.

Urao, T. (1994) Two genes that encode Ca2+dependent protein kinase are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 244:

331-340.

van Montfort, R.L.M., Slingsby, C., and Vierling, E. (2002) Structure and function of the small heat shock protein/α-crystallin family of molecular chaperones. Adv. Prot. Chem. 59: 105-156.

Verslues, P.E., Batelli, G., Grillo, S., Agius, F., Kim, Y.S., Zhu, J., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., and Zhu, J.K. (2007) Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H_2O_2 signaling in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Cell Biol. 27: 7771-7780.

Wang, W. Vinocur, B., and Altman, A. (2007) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.

Watanabe, N. and Lam, E. (2006) Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. Plant J. 45: 884-894.

Waters, E.R., Aevermann, B.D., and Sanders-Reed, Z. (2008) Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. Cell Stress Chaperones 13: 127-142.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 781-803.

Zhu, J., Dong, C.H., and Zhu, J.-K. (2007) Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. Curr. Opin. Plant Biol. 10: 290-295.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.