

최 중
연구보고서

벼 도열병 저항성 관련 유전자 분리, 발현 조절 및 형질전환
작물의 분자육종

Molecular cloning, regulation of expression, and
development of transgenic plants of rice blast fungus
resistance related genes.

경상대학교 대학원 응용생명과학부

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “벼 도열병 저항성 관련 유전자 분리, 발현 조절 및 형질전환 작물의 분자유종
의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 24 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 강규영

세부연구책임자 : 홍종찬,
한창덕

요 약 문

I. 제 목

벼 도열병 저항성 관련 유전자 분리, 발현 조절 및 형질전환 작물의 분자유종

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1 목적

- 1) DSC, DD, SAGE, 2-DE 방법을 통한 저항성 유전자 동정
- 2) 동정된 유전자의 기능 연구
- 3) 생체 방어관련 조절 단백질의 단백질 상호작용을 통한 분리
- 4) 생체방어 관련 전사조절인자 역할 연구
- 5) 식물생체 방어 관련 유전자의 형질전환에 적합한 promotor 및 vector의 개발
- 6) 병저항성 유전자 R genes의 'knock-out' 선발

2 필요성

벼에서 벼 도열병에 대한 방어관련 유전자를 DSC, DD, SAGE, microarray, 2-DE 등 다양한 방법으로 screening 하여 systemic한 결과를 얻고자 본 실험을 수행했다. 애기장대에서 NIM1 이 SA에 의한 SAR 과정에 핵심 조절유전자로 알려져 있고 이에 결합하는 bZIP 단백질이 보고되어 있었다. 따라서 벼에서 생체방어 관련 기작을 이해하고 내병성 작물 개발의 전략으로 삼기 위해서 NIM1/NPR1 결합 단백질들을 분리하고 이를 규명하는 일이 필요하다. 이에 더해 병균(혹은 이병성)에 의해 특이적으로 벼의 유전자를 발현시키기 위해서는 병원균 침입에 따라 유도될 수 있는 inducible promoter가 필요하다. 국내 연구실에 이용하는 많은 promoter 들 (예, CaMV35S or Ubiquitin)이 국제 특허가 외국에 소속되어 있기 때문에 국내에서 PROMOTER를 개발하는 것이 필요하다. 벼에는 약 600개의 NB-ARC homology을 가진 유전자가 있으며 이들의 대부분의 병 저항성에 관련이 있을 것으로 예상된다. 본 연구에서는 이들 중에 전이인자 Ds에 의해 'knock-out'된 변이를 선발하여 병 저항성 연구에 유전적 자료로 사용하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 식물생체 방어 관련 유전자의 대량 발굴(DSC, DD, SAGE, microarray, 2-DE)
- 2) 수도에서 NIM1/NPR1 interacting protein 분리 및 기능 규명
- 3) 식물생체 방어 관련 유전자의 형질전환에 적합한 promotor의 개발.
 - 가) constitutive expression cassette T-DNA vector 구축 및 이를 통한 형질전환체 개발
 - 나) inducible promoter 분리 및 형질전환체 생산
- 4) 병 저항성 유전자 R genes의 'knock-out' 선발/육성

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1) 도열병에 의해서 유도된 유전자 1200여종을 DD, SAGE, DSC 방법으로 screening하여 microarray로 확인해서 서로 다른 16종류의 유전자를 확인 했다. 2-DE을 통해서 방어 관련 단백질을 14종류 확인해서 그중 4종류 (PBZ1, OsPR-10, OsIRL, SalT)의 antibody을 생산 그 기능 연구에 사용했으며, 그 중 PBZ1의 기능이 cell death와 관련이 있다고 결과를 얻었다.

2) NIM1-interacting protein 으로서 2 종의 bZIP protein을 분리 하였고, 천연적으로 아미노 말단 부위가 일부 제거된 7종의 bZIP factor를 얻게 되었고 이들의 결합부위 규명, 프로모터 인식 규명, 발현 분석으로 형질 전환체에서 광범위 병저항성 개발의 기초를 놓았다.

3) 식물생체 방어 관련 유전자의 형질전환에 적합한 promotor의 개발.

가) constitutive expression cassette T-DNA vector 구축 및 이를 통한 형질전환체 개발
원하는 유전자가 ectopic 그리고 constitutive expression되는 형질전환체를 만들기 위한 T-DNA vector 구축되었고 wounding에 반응하는 유전자인 OsSNF1 cDNA를 삽입하여 형질전환체를 생산하였다.

나) inducible promoter 분리 및 형질전환체 생산

wounding 에 반응하는 OsSNF1을 동정하고 promoter를 분리하여 GFP/GUS가 wounding과 도관에 특이적으로 발현하는 형질전환체를 생산하였다.

4) 병저항성 유전자 R genes의 'knock-out' 선발/육성

1,000 개 이상의 Ds flanking DNA의 염기서열 분석을 통하여 Ds가 R 유전자에 들어가 유도된 knock-out 변이 선발하고 병 저항성 연구에 사용될 유전 자료 확보

활용

- 방어관련 유전자 또는 단백질의 도열병에 대한 저항성 marker로 사용가능, 도열병 연구의 기본적 재료 제공.
- 병저항성 조절기작 이해 및 응용
- protein-protein interaction을 통한 다양한 유용 유전자 발굴
- 선발된 wounding inducible promoter expression cassette 와 12 개의 R 유전자 'knock-out' 계통을 병 저항성 연구에 활용될 수 있음

SUMMARY

(영문 요약문)

To identify rice genes involved in defense responses against infection by the blast fungus *Magnaporthe grisea*, we have devised and exploited differential screening techniques such as DSC, and differential hybridization and microarray. We isolated 768 genes and determined expression levels of their genes. Among these genes, β -1,3-glucanase, PBZ, PR-10, SalT(defense-stressresponses), sucrose-UDP glucosyltransferase, L-allo-threonine aldolase(metabolism), OsGAI (hormonal response), and mitogen activated protein kinase(MAPK) (signal transduction) gene expression levels were increased after blast inoculation. Northern blot analysis also confirmed that the expression of these genes were induced by treatment of fungal elicitor.

Serial analysis of gene expression(SAGE) offers the cataloging of the identity and relative frequencies of mRNA transcripts. Through SAGE analysis, we screened differential transcripts of incompatible and compatible interaction between rice - rice blast fungus. Total of 2,745 tags were isolated, 910(33%) tags were identified but 1,850(67%) could not be identified from GenBank database at this moment. Among identified tags, 13.5% , 4.1% tags showed stress/pathogen and signal transduction related gene, respectively.

We used two-dimensional electrophoresis (2-DE) and other proteomic approaches to identify proteins expressed in suspension-cultured rice cells in response to the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Proteins were extracted from suspension-cultured cells at 24 and 48 h after rice blast fungus inoculation or treatment with elicitor or other signal molecules such as jasmonic acid (JA), salicylic acid, and H₂O₂. The proteins were then PEG fractionated before separation by 2-DE. Fourteen protein spots were induced or increased by the treatments, which we analyzed by N-terminal or internal amino acid sequencing. Twelve proteins from six different genes were identified. Rice pathogen-related protein class 10 (OsPR-10), isoflavone reductase like protein, glucosidase, and putative receptor-like protein kinase were

among those induced by rice blast fungus; these have not previously been reported in suspension-cultured rice cells. Six isoforms of probenazole-inducible protein (PBZ1) and two isoforms of salt-induced protein (SalT) that responded to blast fungus, elicitor, and JA were also resolved on a 2-DE gel and identified by proteome analysis. The expression level of these induced proteins both in suspension-cultured cells and in leaves of whole plants was analyzed by Western blot. PBZ1, OsPR-10, and SalT proteins from incompatible reactions were induced earlier and to a greater extent than those in compatible reactions. Proteome analysis can thus distinguish differences in the timing and amount of protein expression induced by pathogens and other signal molecules in incompatible and compatible interactions.

The temporal expression of a probenazole-induced protein (PBZ) was paralleled with several developmental events associated with programmed cell death (PCD) occurred in leaf senescence, root aerenchyma formation, coleoptile, root cap, seed aleurone layer, and hypersensitive-response. The expression levels and localizations of PBZ in tissue of PCD were identified by Western blot and immunohistochemistry analysis. Purified recombinant PBZ was also induced hypersensitive cell death in rice suspension cells and tobacco leaves in dosage dependent manner. Pretreatment of antibody raised against PBZ blocked cell death caused by PBZ. These results demonstrated that PBZ was involved in plant cell death.

NIM1/NPR1 is a critical component of the salicylic acid (SA)-mediated signal transduction pathway. From fungal infected rice leaf tissues, we have isolated two rice NIM1 interacting proteins (OsNIPs) using a well defined screening system, yeast two-hybrid screen. These two OsNIPs are members of the TGA family of basic leucine zipper (bZIP) transcription factor. As reported elsewhere, the amino-termini of these factors were found to decrease binding stability in yeast and differentially affect their apparent affinity toward NIM1. The effect of NIM1 binding to OsNIPs was studied in view of protein-DNA interaction. The presence of NIM1 enhanced binding of OsNIP1 to *as-1* and *nos-1*, cis-elements containing TGACG-motifs found in PR

promoters.

The rapid induction of OsNIP1 messages by elicitor and jasmonic acid is interesting in view of the fact that NIM1 gene was not induced by salicylic acid and other defence signals. This raise the possibility that the rapid induction of OsNIPs is a first event that occur after elicitor treatment, which is required for PR gene expression. The role of NIM1-OsNIP interaction on gene expression will require further investigation.

Development of inducible promoter and construction of T-DNA vectors for constitutive and inducible expression of genes related to pathogen resistance and selection and breeding of knock-outs of disease resistance genes (R) via Ds insertion were carried out to develop transgenic plants. . To achieve the goals, we identified a rice gene, OsSNF1, that is wounding responsive and vascular tissue-specific. Using the promoter of this gene, wounding-inducible expression cassette of T-DNA vector was constructed.

Rice genome has around 600 NB-ARC homologous genes that might be related to pathogen resistance in one way or another. Therefore, understanding the functions of these genes is very important to molecularly dissect pathogen-resistance in rice. After characterizing more than 1,000 Ds loci, we found 12 NB-ARC genes and established them as stable lines. For future study, these lines will be important materials in analyzing pathogen-resistance.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Part 1 Outline of Research Program.....	1
Part 2 Current Status of This Research Program.....	14
Part 3 Results and Contents.....	15
Part 4 Accomplishment and Major Contribution.....	86
Part 5 Utility of This Research.....	89
Part 6 Information Obtained Oversea during Research.....	91
Part 7 References.....	92

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	1
제 2 장	국내외 기술 개발 현황.....	14
제3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	15
제4 장	목표달성도 및 관련 분야에의 기여도.....	86
제5장	연구 개발 결과의 활용계획.....	89
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술의정보.....	91
제7장	참고문헌.....	92

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 필요성

21C 기하급수적인 인구증가에 따른 해결해야하는 대 명제는 안정적인 식량공급과 환경 보전이라고 할 수 있다. 현재 병해충 및 잡초에 의한 농산물의 손실은 매년 그 생산량의 30%를 상회하고 있고 이에 따른 병해충에 의한 손실방지는 주로 화학농약에 의존하고 있다. 전세계적으로 농작물 보호를 위해 투여하는 농약 매출액은 약 313억불(Wood Mackenzie社 통계)에 달하고 있으며 우리 나라 농약 소비량만도 연간 8700억원(1998년 통계¹⁾)에 이르며 농약 소비량은 연간 11.6kg(a·i)/ha로 세계 2위이다. 추후 화학농약시장규모는 정체상태나 감소할 것으로 예상되며 대신 생물농약이나 형질전환 식물체(genetically modified crop :GMC)의 시장규모는 크게 신장할 것으로 내다보고 있다. 이는 화학적 농약으로 인한 독성문제, 환경오염 및 파괴, 생태계 교란등 심각한 문제를 유발하고 있거나 그 가능성 때문이다. 이러한 부작용을 경감시키면서 병해충으로 인한 생산량 감소를 막을 수 있는 중요한 대안은 작물자체가 가지고 있는 내재적인 생체 방어, 신호전달체계의 이해, 유전자의 분리 및 발현 조절, 이들 능력을 제고시키는 저항성 작물개발을 꼽을 수 있다. 작물의 생체방어 능력을 높여 병해충 저항성을 향상시키기 위해서는 생체 방어 관련 유전자들을 확보하고 이들 반응 기작을 밝히는 일이 급선무이다. 병 저항성 작물의 개발은 주요 전략적 식량자원의 안정적 확보는 물론이고 농약의 저 투입 친환경적 지속농업의 중요성을 크게 제고시킬 것이다. 현재 주요작물에 대한 병 저항성 유전자가 확인되고 있으며 이를 기초로 한 주요 병에 대한 효과적인 저항성 작물개발로 경제적, 사회적 기여의 기틀을 마련해 주고 있다. 본 연구의 주요한 목적은 작물 생체방어유전자들을 분리하고 이들이 어떻게 작용하는지의 저항성 기작의 분자 mechanism을 이해함으로써 방어능력을 향상시키는 저항성 작물을 개발하는 것이다.

벼는 전세계인구 절반의 주요식량 자원이며 우리 나라의 경우 주요 식량 자원뿐만 아니라 미래 통일을 대비한 전략적 식량작물임에 의심의 여지가 없다. 이러한 쌀 생산증산에 오랜 걸림돌이 되어오고 있는 것 중 주요한 요인은 도열병에 의한 생산량 감소 및 품질의 저하현상이다. 전세계적으로 도열병에 의한 손실은 약 50억불²⁾에 달하며 우리 나라의 경우 매년 665억 원이 도열병 방제비로 사용되고 있다.¹⁾

병 방제방법들 중 저항성 품종의 사용이 가장 경제적이고 효율적인 방법으로 알려져 오고 있다. 그러나 도열병 저항성 작물의 육종의 난제는 병원균(*Pyricularia grisea*)의 갖은 병원성의 변이(pathogenic variability)로 수백 종의 서로 다른 포장 strains이 수집되는 등 이로 인한 저항성 유전 형질의 불안정성에 기인한다.³⁾ 다수의 벼 품종은 지속적 저항성(durable resistance)을 가지고 있으며 이들 저항성은 부분적 저항성(partial resistance)을 갖는 minor gene에 의해 이루어지고 있다고 간주되고 있다. 이러한 품종의 유전적 구성요인은 지속적인 저항성 품종을 개발을 어렵게 하고 있다. 이는 아직 어떠한 유전적 구성요

인이 지속적 저항성을 가져오는지에 대한 연구가 부족하기 때문이다. 최근 전통적인 유전학과 분자생물학의 접목으로 molecular marker 에 대한 개발이 확립되어 유전분석 및 유전자 지도 작성이 가능해 졌으며 이를 근거로 한 저항성유전자의 cloning등 이 분야 연구에 가속화가 이루어지고 있다. 따라서 본연구진은 식물병리학, 분자생물학, 유전학 및 형질전환 전공 연구자들이 팀을 이루어 도열병 저항성 관련 유전자를 최근 발암관련 유전자 분리에 널리 이용되고 있는 serial analysis gene expression(SAGE) technique과 differential subtraction chain(DSC), tissue culture-도열병 상호작용에 의한 functional genomic등의 종합적이며 상호보완적인 연구 접근방법을 통한 유전자원의 확보와 이들 유전자들의 신호전달 및 발현조절에 어떻게 연관되는지를 yeast two-hybrid technique 과 transcription factor 연구로 분리된 유전자의 upstream과 down steam쪽의 상호 연관 작용 및 유전자를 분리하여 그 발현조절을 연구하며 이를 토대로 저항성 작물 개발을 위한 형질전환 식물체를 개발하는데 목표를 두고 구성했다. 상호 유기적이고도 보완적인 연구로 우수 유전자원의 확보, 이들 분자생물학적 기작 및 발현조절연구, 저항성 형질 전환 작물을 개발코자 한다.

Disease resistance genes (*R* genes) 은 크게 두개의 종류로 나눌 수 있는데 그중 가장 큰 종류는 nucleotide binding (NB) sites 와 leucine-rich repeats (LRRs)를 가지고 있는 유전자들이다 (Jones 2001; Meyers et al., 2003). Arabidopsis, 담배, 그리고 토마도 와 같은 쌍떡잎식물에서는 NH₂-termini에서는 TIR (Toll-interleukin 1 receptor resistance) motifs를 가지고 있는 TIR-NB-LRR subclass가 가장 많다. 가령 Arabidopsis의 경우, 128 NB-LRR 유전자 중에 85개가 TIR-NB-LRR subclass 에 속한다. 이에 반해서 벼의 계통에 TIR-encoding genes 가 없는 것으로 밝혀졌고 대신 벼의 NB-LRR genes에는 an apoptosis-resistance-conserved (ARC) domain를 가지고 있다. 약 600개의 유전자가 NB-ARC와 유사한 것으로 밝혀졌다. 다음으로 많은 종류는 extracellular LRRs를 가지고 있고 C-termini 쪽으로 short cytoplasmic tails 이나 serine-threonine protein kinase domains을 가지고 있는 것들이다. 벼에는 약 450개의 extracellular LRR genes 가 있고 그 중 반이 C-terminal에 protein kinase domains을 가지고 있다 (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002). 본 연구에서 이러한 R 유전자들이 벼의 도열병 저항성/이병성에 관련되는 지를 알기 위해서 이들의 knock-out을 선발하여 유전적 자료로 이용하고자 한다.

그러나 이와 같은 유전자의 cloning으로 인해 최근 NBS/LRR 유전자의 경우 degenerate primer design에 의한 PCR cloning방법등으로 conserve된 유전자(부분적)를 중심으로 그들의 기능이 밝혀질수록 더욱 분자생물학적 연구의 접근이 확대될 것이다. 불행스럽게도 국내에서는 아직 도열병 저항성에 관련 연구가 아주 극미한 실정으로 농촌진흥청에서 저항성품종 RI line을 구축하고 있는 것으로 알고 있다.

벼에는 약 600개의 NB-ARC homology을 가진 유전자가 있다. 본 연구에서는 Ds

population 중에서 NBS (nucleotide binding site)-ARC (apoptosis resistance conserved) domain 이나 LRRs (leucine-rich repeats)를 가진 전형적인 R 유전자 중에 Ds의 삽입에 의한 knock-out 변이체를 선발한다. 선발된 계통은 도열병 저항성에 대한 역할을 구명에 중요한 유전자자료로 사용될 수 있다.

(연구범위)

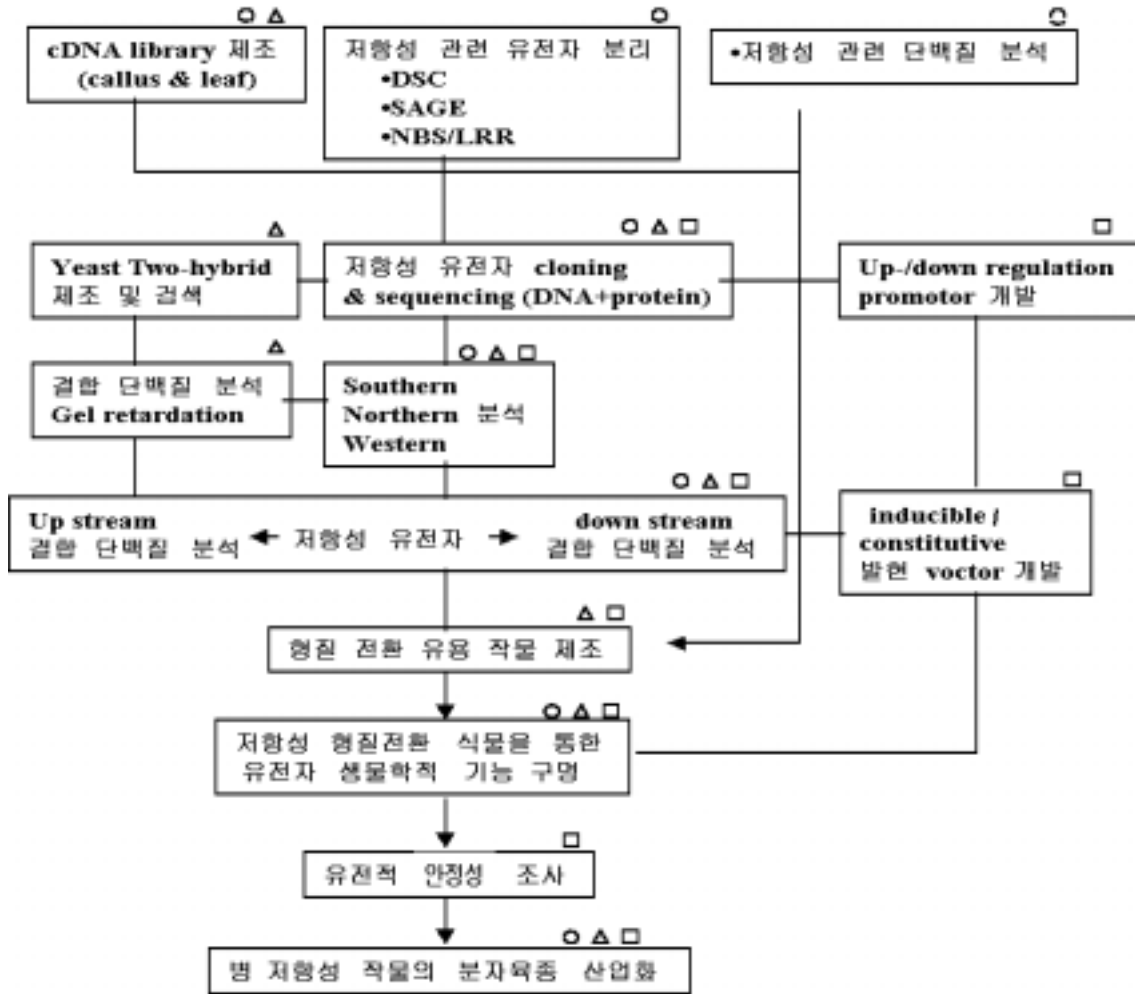
구분	연구개발 목표	연구개발내용및 범위	
제 1 0 0	제 1 세 부과제	1.저항성 유전자 분리 2.단백질 2D-PAGE	a. DSC 방법에 의한 rare message분리. b. SAGE방법에 의한 발현시기별, 양적차이 있는 유전자 분리. c. NBS/LRR degenerate primer PCR
	제 2 세 부과제	1. NIMI/NPRI, SN1 결합단백질 분리.	a. R/S specific 단백질 분리. b. 분리한 단백질 sequencing
	제 3 세 부과제	Promotor 개발	a. NIMI/NPRI, SN1 probe를 이용한 cDNA library screening으로 벼의 관련 유전자 cloning b. Yeast two-hybrid screening을 통한 도열병에서 NIMI/NPRI 또 SN1결합 생체방어 유전자 전사 조절 단백질 분리.
			a. 저항성 반응에 up-regulation되는 promotor 개발 b. down-regulation되는 promotor 개발 c. 새로운 내병/내충성 작물에 이용될 expression vector 개발

제 1 0 1	제 1 세 부과제	1. 단백질 2D-PAGE 분석 2. 저항성 유전자 기능연구	a. elicitor 처리에 의해 생성된 단백질 분석 b. chemical 처리에 의해 생성된 단백질분석 및 sequencing a. Northern blot b. Fusion 단백질 생산 c. Ab 생산, Western blot.
	제 2 세 부과제	도열병 저항성 유전 자 발현 관련 조절단 백질 분리, 기능연구	a.도열병 저항성 유전자의 Two-hybrid system에 의한 단백질 분리. b. 분리된 bZIP protein 의 역할 분석
	제 3 세 부과제	형질 전환체 개발	a. inducible promotor 이용한 저항성 유전자 cloning b. constitutive promotor 이용한 저항성 유전자 cloning

제 1 0 2	제 1 세 부과제	1. 저항성 유전자 기능연구	a. transgenic plant에서의 발현 조절 b. 서로다른 저항성 관련 유전자의 상호 연계작용 연구.
	제 2 세 부과제	형질 전환체 분석 통한 병 저항성 분석	a. 발현 분석을 통한 SA, JA 및 기타 방어 신호와 OsNIP의 연관 관계분석. b.분리된 조절단백질을 constitutive overexpression inducible expression 에 따른 병원내성 분석. c. 유전자 칩에 의한 광범위 발현 분석
	제 3 세 부과제	생체방어 유전자 생물학적 기능 구명	a. ectopic/constitutive expression검증 b. 저항성 검증. c. 유전자 간 상호 발현 연구 기존의 생체 방어 유전자들과 상호발현 연구.

2절. 추진전략

벼 도열병 저항성 관련 유전자의 분리, 발현 조절과 형질전환 작물의 분자 육종의 성공적 연구를 위해 3분야 소과제로 나누어 수행한다. 즉 제1과제에서는 high throughput screening 방법에 의한 유전자의 분리 및 특성을 연구하고 제2과제에서는 기존의 저항성 관련 cascade에 알려진 system이나 도열병 저항성 관련 유전자 발현과 직접 연관된 up-/downstream 쪽의 상호작용 단백질을 yeast **two-hybrid** screening으로 분리하고 그



발현양상을 구명하고 제3과제에서는 분리된 저항성 유전자 및 이들의 up-/downstream에서 상호 작용하는 단백질 유전자를 이용하여 inducible, constitutive 또는 over expression/suppression 시키는 형질 전환 작물을 분자 육종하여 그 기능과 상호 연계적 작용을 구명한다.

3절 연구방법

제1세부과제 : 벼 도열병 저항성 관련 유전자 cloning 및 특성연구.

1. 저항성 유전자 cloning

a) cDNA library의 구축

본연구실에서는 현재 진흥, 다산 벼 품종의 저항성 반응을 일으키는 조합(진흥-KJ401, 다산-KJ101)으로부터 접종 후 R/S반응이 결정되는 24hr 후 sample에서 mRNA를 분리 Zap cDNA library를 구축했다(primary titer는 각각 3.8×10^6 (진흥), 2.1×10^6 (다산)). 그러나 아래의 selection 방법인 DSC와 SAGE technique을 이용하면 chromosomal mapping이 되지 않은 multiple genes이나 QTLs로부터도 저항성 관련 유전자분리가 가능할 것으로 보아 포장저항성이 우수한 Moroberekan(*Pi5(t)*, *Pi7(t)*, *Pi10(t)*, *Pi12(t)*, *Pi157(t)*), BL122(*Pi1(t)*, *Pi2(t)*) line으로 부터도 cDNA library를 구축하고 아직은 본실험실에서 indica type의 벼로 부터는 callus 유기와 보존이 쉽지는 않지만 Japonica type을 중심으로 callus-도열병 system에서 저항성 반응을 보이는 조합에서 cDNA library를 구축하고자 한다.

b) 저항성 관련 유전자의 screening.

지난 몇 년간의 실험에 근거하여 R-specific 유전자분리가 쉽지 않다는 전제아래 최근 동물 system에서 성공한 DSC²⁶⁾와 SAGE²⁷⁾ technique을 이용해서 high throughput screening방법을 도입해서 분리하고자 한다.

지금까지 얻은 data에 의하면 도열병 저항성 유전자의 경우 1) specific 해서 rare message를 갖는 low copy number 유전자이거나 또는 2)TLP처럼 C 또는 S 와 R 반응 공히 모두 발현이 되는 기존의 유전자들의 associated interaction에 의해 발현시기, 발현양의 subtle change에 의한 저항성, 이병성 반응 차이가 크게 증폭되는 표현형을 보이는 경우를 설정할 수 있다.

첫째로 저항성 유전자 copy 수가 아주 낮은 경우에 적용한 differential subtraction chain의 원리와 모식도는 그림 3과 같다.

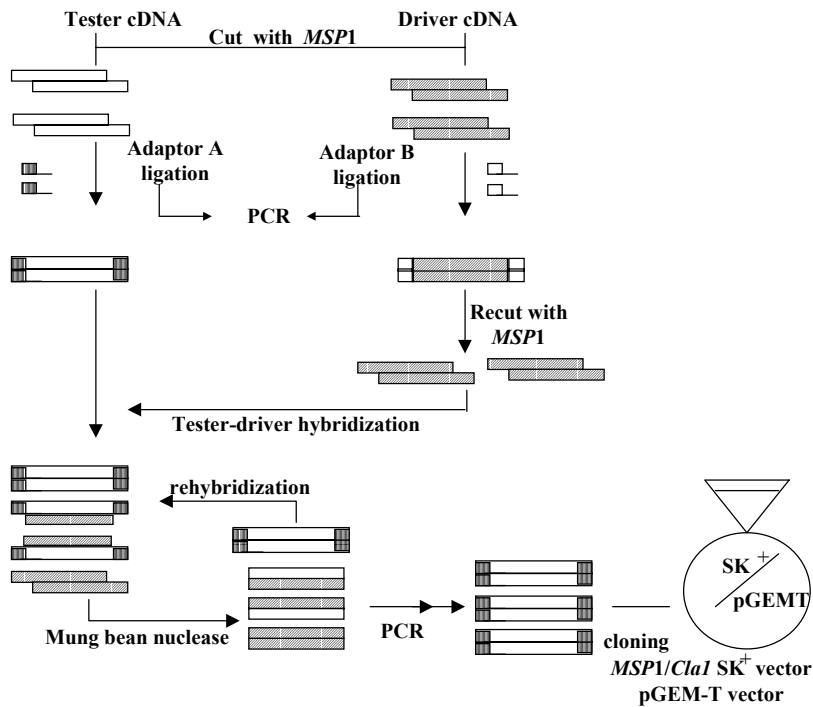


그림3. Schematic flow chart of DSC(adopted from ref.26)

R, C/S 반응으로부터 cDNA를 합성 후 4 base cut 제한효소(예 *Msp1*)로 절단하고 R(tester cDNA)와 C/S(driver cDNA)에 각각 서로 다른 adaptor로 ligation 시킨 후 PCR 증폭을 한다. 다시 driver cDNA(C/S)는 동일한 제한효소로 재 절단한 후 tester DNA보다 10× 또는 그 이상(예 100×)농도 되게 첨가한 후 hybridization하고 그 후 mungbean nuclease로 처리하면 heteroduplex 나 sticky end는 절단됨으로써 rehybridization cycle 이 증가할수록 $Y=y(1-A^{2n})$ (Y:copy number after n round subtraction, y: total copy number, A:초기 tester DNA의 self anneal 될 확률)에 의해 3-4 round chain hybridization 한 후면 거의 모든 종류의 homology를 갖는 tester-driver DNA는 제거가 가능하다. 그러나 A adaptor가 연결된 R-specific homoduplex는 A primer를 이용 PCR 증폭에 의해 subtractive cloning이 가능하다. 이 원리는 driver DNA 또는 이와 hybridization된 후 blunt end를 갖는 tester DNA모두 n+1 round subtraction cycle에서는 대수적(A^{2n})으로 증가하는 driver DNA로 변하는 “negative amplification”을 갖기 때문에 기존의 SSH 방법보다 훨씬 우수한 subtraction screening 될 수 있다. 이 방법은 수차에 걸친 probe screening 횟수를 줄일 수 있고 성공 확률도 높을 것으로 기대된다.

둘째로 R 반응 C/S 반응의 저항 발현정도의 차이나 발현시기의 미소한 차이만 있을 경우

에는 상기 DSC 방법으로는 분리가 불가능하므로 serial analysis of gene expression(SAGE)방법으로 접근할 수 있다.

SAGE의 개략적인 원리와 모식도는 그림 4와 같다.

먼저 R, C/S 반응의 sample에서 biotinylated cDNA를 합성하고 C-terminal 부근을 4 base cut enzyme(AE;anchor enzyme)으로 절단한 후 이를 streptavidin bead로 회수하고 각각 반으로 나눈후 각각 서로 다른 linker/adaptor를 ligation 시킨 후 anchoring enzyme 맨끝 base 와 recognition sequence가 일치되는 typeII restriction enzyme으로 절단한 후 blunt end를 만들고 회수해서 blunt end ligation을 시킨다. 이때 13개의 unknown sequence tag 가 생성되게 된다.

여기에 biotinylated primer A와 B로 PCR 증폭시키고 다시 anchoring enzyme으로 절단하면 26bp의 ditag를 얻을 수 있다. 이를 PAGE로 순수 분리하고 tandem ligation 시킨 후 vector cloning한다. 이들을 sequencing함으로써 기존의 data base로부터 그 유전자를 동정하고 R, C/S 유전자를 sequence population에서 통계적 data값을 얻을 수 있도록 함으로써 그 frequency가 R이 C/S 보다 5배 이상인 sequence tag은 cDNA library phage selection, Northern blot으로 찾아낼 수 있다.

셋째로 표1에 보는 바와같이 cloning된 대부분의 저항성 관련 유전자는 protein kinase, NBS/LRR, LRR domain을 가지고 있으며 이들 중 일부는 상당히 식물 종간에도 conserve 되어 있는 것이 있는가 하면 일부는 식물의 species 간에도 상이한 부분이 있다. 따라서 이미 알려진 아미노산조성에 근거한 degenerate primer들을 합성하여 여러 조합별로 PCR 증폭하고 cloning 한 후 sequencing하고 이로부터 Northern blot으로 확인하고 genomic Southern blot으로 관련 유전자를 cloning한다. 이들을 다시 sequencing하고 그 특성을 조사한다.

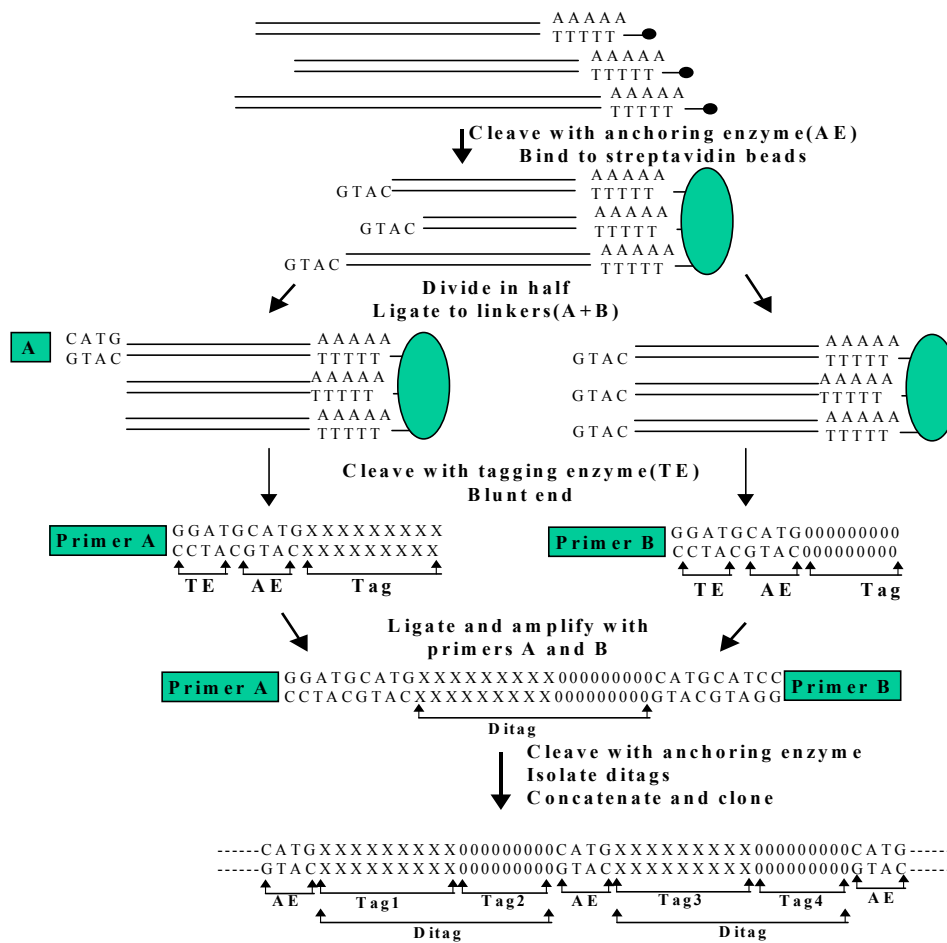


Fig4. Schematic diagram of SAGE(adopted from ref. 27)

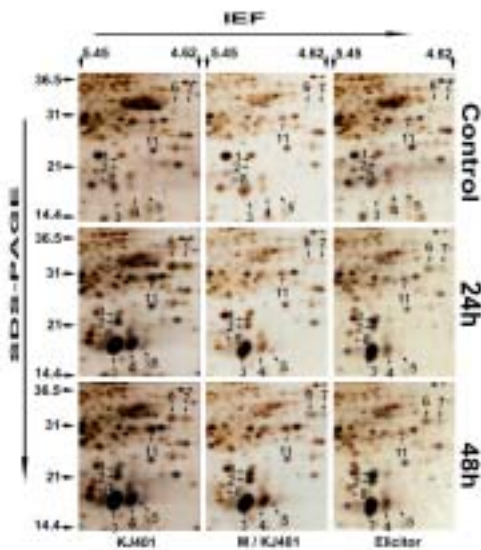
2 저항성 유전자의 특성연구

상기 3가지 방법에 의해 찾아진 probe를 time sequence 별 Northern blot으로 재차 R-specific 인지 확인하고 cDNA library부터 clone을 찾아내고 이를 sequencing하여 database에서 확인하고 이를 pET vector에 cloning하여 발현되는 recombinant protein을 affinity matrix로 순수 분리하고 이를 antigen으로 antibody를 제작한 후 다시 R, C/S 반응 작물의 단백질로부터 Western blot으로 발현시기, 발현량등을 Northern blot과 동시에 비교함으로써 저항성 관련 기능을 밝힌다.

아울러 제2과제의 yeast two-hybrid로 up-/down stream의 연계된 단백질 상호작용을 밝히고 제3과제의 벼에 형질전환시켜 그들 host에서의 기능을 다시 검증한다.

3 단백질 2D-PAGE 분석을 통한 유전자 기능연구

Callus suspension cell에 직.간접으로 균(R/S반응)을 처리하거나 여러 elicitor, PR 관련 chemical 처리등이 가능함으로 해서 각각 처리 후 time sequence별로 유기된 단백질을 2D-PAGE로 분리, 분석한다. 그리고 그림2에서 보는 바와같이 여러 처리 후 유기된 단백질을 PVDF membrane에 blotting한 후 N-terminal sequencing을 하거나 N-terminal이 blocking된경우가 많으므로 2D-PAGE 분석 후 specific 한 spot을 도려낸 후 in gel tryptic digestion하고 다시 SDS-PAGE로 polypeptide의 fragment를 분리 후 다시 membrane blotting하여 sequencing한다. 이들을 database에서 homology 조사하고 만약 동일한 유전자를 cDNA library에서 찾는다면 이들 clone과 그 기능을 비교한다.



이들 polypeptide를 다시 antigen으로 antibody를 제작하여 time sequence 별 Western blot으로 발현 양상과 그 양을 측정하여 그 역할을 구명한다.

제2과제: 병 저항성 관련 유전자의 발현체계 분석 및 조절연구

1 mRNA 분리 및 cDNA library 제조

Total RNA를 도열병 내성 벼 또는 감수성 벼, 그리고 Arabidopsis조직으로부터 phenol/LiCl 방법을 이용하여 추출하고 이로부터 mRNA를 분리하고자 할 때에는 oligo(dT) bead chromatography를 통하여 poly(A) mRNA를 확보하며 Stratagene의 pAD-GAL4-2.1 XR library construction kit을 사용하여 여러개의 yeast two hybrid library를 제작한다.

2) yeast two hybrid screening

먼저 **pGBT9** (Amp 저항성 bait vector: CloneTech) 또는 **pBD-GAL4 Cam** (chloramphenicol 저항성 bait vector: Stratagene Co.) vector 에 rice NIM1/NPR1, WRKY1, EREBP1, 등의 defence 관련 전사조절인자들을 삽입하여 Yeast strain인 PJ69-4A에 형질 전환 시켜 His drop out 배지에서 자체적으로 전사활성 능력이 없는지 조사한다.

이때 현재 분리되어 있는 bait 유전자의 coding region을 PCR로 증폭한후 EcoR/PstI으로 절단하여 bait에 삽입한다. Bait vector가 효모 기주세포에서 basal activity 없음을 확인 후 이 host cell에 AD-cDNA library 즉 prey DNA를 대량으로 형질전환 시켜 Leucine, Histidine, Tryptophan, Adenine dropout media (Leu⁻, His⁻, Trp⁻, Ade⁻)에서 성장하는 yeast를 선발한다.

선발된 yeast 가 정말로 bait protein에 결합하는 단백질을 가지고 있는지를 분석하기 위해 colony를 액체 질소에 급냉시키고 beta-galactosidase의 발현을 조사한다. 이러한 true positive yeast가 판명되면 이 효모를 액체 배양하여 plasmid DNA를 추출하고 이를 다시 bait vector를 갖는 yeast에 재 형질전환 시켜 true protein interaction을 조사한다.

단백질-단백질 interaction의 강도는 액체 배양을 한 효모를 Z-buffer (60 mM NaHPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄)에서 침전후 녹인후 급속동결 방법으로 파괴하고 O-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG)로 β-galactosidase의 활성을 분석함으로 결정한다.

3) 분리된 결합단백질의 분석법

분리된 clone들의 coding 부위를 GST-fusion vector 인 pGEX-2T, 또는 His-tag vector 인 pRSET-A vector, 그리고 Glutathione S-transferase fusion protein vector인 pET32a등에 삽입하여 BL21 (plysS) cell 에 도입하고, 이 세포의 대량 배양을 통해 단백질을 대량 생산한다. 또한 여기서부터 GSH-agarose와 Ni-NTA column을 사용하여 단백질을 정제한다.

4) Gel-retardation assay

22 bp로된 SA-responsive element, 또는(T)TGAC(C) motif³²⁾를 갖는 WRKY1 binding site, AGCCGCC 를 갖는 EREBP1 binding site를 probe DNA로 사용하여 interaction protein (즉 분리된 단백질)이 존재시 또는 비 존재시 결합에 어떠한 영향을 주는 가를 in vitro에서 반응시켜 5% Acrylamide-TBE gel에서 전기영동하여 분석한다. 이때 20 mM

HEPES, 50 mM KCl, 0.5mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 2 ug poly(dI-dC), 0.5 ng ³²P-labeled probe를 사용한다.

5) 유전자발현 분석법

Transient assay 방법으로는 Arabidopsis 잎에서 protoplast를 분리하여 reporter-GUS, 및 Luciferase reporter를 사용하고 GAL4BD에 결합된 단백질을 CaMV 35S-promoter에 삽입하여 동시에 effector DNA와 reporter DNA를 형질전환하고 GUS/Luciferase ratio를 측정하여 유전자 발현 양을 분석한다.

6) 형질전환 식물체에서 분리된 조절단백질의 기능분석

현재 3.5 kb로 제작된 mini-Ti plasmid(pCB302)에 분리된 조절 유전자 및 저항성 유전자를 삽입하여 *Agrobacterium*에 형질 전환한 후 이를 식물에 현재 확립된 inducible-promoter의 경우 glucocorticoid system 과 estrogen receptor의 사용법이 있다. 여기서 현재 가지고 있는 glucocorticoid system을 이용하여 새로운 vector를 제작한다. 여기에 GAL4BD-VP16(AD)-GR을 35S promoter하에 삽입하고, UASg-(-46)-minimal promoter-TMV-leader를 갖는 vector에 분리된 생체방어 관련 단백질을 in-frame fusion하여 한 개의 vector에 삽입한다. 이를 Ti-plasmid transgenic plant로 형질전환하여 dexamethazone으로 유도 하거나, protoplast에서 DEX로 일시적으로 유도 발현시켜 생체방어유전자를 어떻게 발현시키는 가를 분석한다.

제3 과제: 형질전환 체계를 이용한 기능구명 및 분자 육종

1 식물생체 방어 관련 유전자의 형질발현에 적합한 promoter 개발

a. 벼에서의 genomic library 구축

진흥벼에서 genomic DNA를 추출하여 4 base cutter 효소인 *Sau3A*를 이용하여 partial digestion한 후 sucrose gradient를 통하여 fraction 한 후 lambda vector의 BamHI site에 크로닝하여 genomic library를 구축한다.

b. 관련 유전자의 promoter 분리

cDNA를 probe으로 하여 genomic library로부터 restriction enzyme mapping 그리고 sequencing를 통하여 promoter 부위를 확인하여 plasmid vector에 크로닝한다³³⁾.

2) 저항성 병원균에 특이하게 발현되는 유전자의 형질전환체 개발

벼의 형질 전환 실험 방법은 본 연구실에서 확립한 *bar* 유전자를 이용한 PPT 저항성을 이용하여 선발한다. 실험방법은 다음과 같이 요약했다. 실험에 사용되는 구체적인 배양 조성은 생략했다.

T-DNA vector는 pCAMBIA 혹은 pSB를 이용하며 *Agrobacteria* cell line으로는 EHA105 혹은 LBA4404를 각각 사용한다^{34,35,36)}.

i) pSB인 경우 LBA4404 *agrobacteria* strain안에서 pSB11에 의해 구축된 vector를 vir C, G, B인자를 가진 pSB1 plasmid에 co-integration 시킨 Ti-plasmid vector를 선발한다.

ii) 벼의 배육에서 유기한 callus에 Ti-plasmid vector을 가진 *Agrobacteria* 를 접종해 같이 3 일동안 배양한다.

iii) BAR 인자를 가진 Agrobacteria 는 PPT와 cefotaxime를 넣은 MS 배지에서 그리고 HPT인자를 가진 Agrobacteria 는 hygromycin과 cefotaxime를 넣은 N6 배지에서 형질 전환 되어 생성되는 callus을 유기하기 위해 2 주동안 배양한다.

iv) 첫번째 선발에서 유기된 callus를 PPT나 Hygromycin의 농도를 높은 배지에서 14 일간 배양하여 2차선발을한다.

v) 선발된 callus는 preregeneration 배지로 옮겨 선발된 calli를 배양한다.

vi) 10-14일 간의 배양후, 소식물체 분화를 유도하기 위해 조성이 다른 배지에 옮겨 4 주간배양한다.

vii) 형질 전환된 소식물체를 rooting media로 옮겨 2-3 주 배양하여 뿌리 발생을 유도한다.

3) 형질전환체를 통한 도열병 저항성 관련 유전자의 생물학적 기능 구명

a. ectopic 그리고 constitutive expression를 통한 내병성 정도 검증

i) Southern hybridization을 통한 형질전환체 구명

Suppression을 최소화하기 위하여 형질 전환 식물체중 계놈에 T-DNA가 single copy 들어 있는 것을 선발하여 증식시킨다. Single copy insertion 확인 방법은 T-DNA vector를 적당한 제한 효소를 사용하여 형질 전환 식물체 DNA를 자른 후, T-DNA에 구축된 DNA를 probe으로 genomic Southern blot 실행하여 선발한다.

ii) 형질전환체의 발현양상 검증

a. 식물체로부터 total cellular RNA를 추출하고 Northern hybridization을 실시하여 식물체나 suspension culture에서 형질전환된 유전자의 발현양상을 검증한다.

b. 이병성 및 저항성 도열병에 대한 반응을 관찰하여 내병성의 형질과의 연계 관계 구명.

c. 선발유전자와 기존의 pathogen related genes과의 상호관계 구명

형질전환체에서 얻은 RNA나 단백질을 이용하여 기존의 pathogen related genes에 대해 Northern blot이나 Western blot을 실시한다. 같은 실험을 본 연구에서 얻은 다른 유전자에 대해서도 실시한다. 축적되는 RNA나 단백질의 양의 변화를 조사하여 형질전환된 유전자와 상호관계를 추정한다.

4) 형질전환체의 도열병 반응 검증

본 연구에서 구명된 유전자를 ectopic 그리고 constitutive expression되는 형질전환체가 도열병 저항성에 어떠한 반응을 보이는 지 검증한다. 벼 도열병 저항성 관련 유전자의 분리, 발현 조절과 형질전환 작물의 분자 육종의 성공적 연구를 위해 3분야 소과제로 나누어 수행한다. 즉 제1과제에서는 high throughput screening 방법에 의한 유전자의 분리 및 특성을 연구하고 제2과제에서는 기존의 저항성 관련 cascade에 알려진 system이나 도열병 저항성 관련 유전자 발현과 직접 연관된 up-/downstream 쪽의 상호작용 단백질을 yeast two-hybrid screening으로 분리하고 그 발현양상을 구명하고 제3과제에서는 분리된 저항성 유전자 및 이들의 up-/downstream에서 상호 작용하는 단백질을 이용하여 inducible, constitutive 또는 over expression/suppression 시키는 형질 전환 작물을 분자 육종하여 그 기능과 상호 연계적 작용을 구명한다.

5) 병 저항성 유전자의 knock-out 선발 및 연구

벼에는 약 600개의 NB-ARC homology을 가진 유전자가 있다. 본 연구에서는 Ds population 중에서 NBS (nucleotide binding site)-ARC (apoptosis resistance conserved) domain 이나 LRRs (leucine-rich repeats)를 가진 전형적인 R 유전자 중에 Ds의 삽입에 의한 knock-out 변이체를 선발한다. 선발된 계통은 도열병 저항성에 대한 역할을 구명에 중요한 유전자자료로 사용될 수 있다.

제 2 장 국내 · 외 관련 기술의 현황

현재까지 알려진 식물의 주요 bacteria, fungi, 및 virus에 저항성을 갖는 유전자의 cloning 및 알려진 기능은 크게 5가지로 분류하며 이는 표1과 같다.

Table 1. 클로닝된 식물 병저항성 유전자의 분류 및 예상되는 유전산물

Class/group	Host/R-gene	Predicted function	Cloning technique	Pathogen	Reference
1.Detoxifying enzymes	maize/ <i>Hml</i>	NADPH-dependent HC toxin reductase	transposon tagging	<i>Cochliobolus carbonum</i>	4
2.Kinases	tomato/ <i>Pto</i>	Serine/threonine kinases -cellular signalling?	map-based cloning	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	5
3.NBS/LRR	Arabidopsis/ <i>Rps2</i> <i>Rpm</i>	LZ-NBS/LRR	"	<i>P.syringae</i> pv. <i>tomato</i> / <i>maculicola</i>	6,7
	tomato/ <i>Prf</i>	LZ-NBS/LRR	"	<i>P.syringae</i> pv. <i>tomato</i>	8
	tobacco/ <i>N</i>	TIR-NBS/LRR	transposon tagging	Tobacco mosaic virus	9,10
	flax/ <i>L6.M</i>	TIR-NBS/LRR	map-based cloning	<i>Melampsora lini</i>	11,12
	rice/ <i>Pi-b</i>	NBS/LRR	"	<i>Pyricularia grisea</i>	13
	rice/ <i>Pi-ta</i>	NBS/LRR	"	<i>Pyricularia grisea</i> (Bvalent)	
	rice/ <i>Xa-1</i>	NBS/LRR	"	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (<i>Xoo</i>)	14
	rice/ <i>RPR1</i>	NBS/LRR (probenazole responsive gene)		<i>Pyricularia grisea</i>	15
4.Extracellular receptors	Barley/ <i>Mla</i>	NBS/LRR	map-based cloning	<i>Erysiphe graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	16
	Tomato/ <i>Cf2</i> , <i>Cf4</i> , <i>Cf9</i>	membrane anchored -receptor like protein kinases	transposon tagging	<i>Cladosporium fulvum</i>	17,18,19
5.Receptor kinases	rice/ <i>Xa21</i>	putative receptor kinases	map-based cloning	<i>Xoo</i>	20

표1에서 보는바와 같이 20여종의 저항성 관련 유전자가 cloning되었거나 HC toxin 분해효

소 유전자를 제외하고는 protein kinases, NBS/LRR, LRR 등 최종 저항성 유전산물이라기 보다는 대부분 Signal pathway casacade의 일부분으로 이해되고 있으며 그중 gene-for-gene 이론에 의한 병원균의 *avr* 유전자와 숙주의 저항성(R)유전자의 직접적인 interaction은 *avrPita-Pi-ta*(B.Valent group)가 membane blotting된 system에서 직접 결합하는 것을 밝혔을 뿐 아직은 대부분 indirectly mediated interaction인 것으로 추정되고 있다.^(21,22,23,24) 특히 도열병의 경우 20여종의 major저항성 유전자가 mapping되어 있거나 10개의 putative QTLs가 확인되고 있으나 그중 cloning된 도열병 저항성 유전자의 경우(예 *Pi-b*, *RPR1*) 모두 병저항성 관련 response 외에도 온도, 암조건등에서도 동시 발현되는 것으로 아직 그 specificity가 명확하지 못하다.1.

식물생체 방어 관련 유전자의 형질전환에 적합한 promotor의 개발. 국내 연구실에 이용하는 많은 promoter 들 (예, CaMV35S or Ubiquitin)이 국제 특허가 외국에 소속되어 있기 때문에 국내에서 PROMOTER를 개발하는 것이 필요하다. 따라서 생체방어 유전자 발현에 사용할 수 있는 PROMOTER 개발이 절실하다.

a) 병저항성 유전자 R genes의 ‘knock-out’ 선발

생물학적 특성이 알려지지 않은 유전자의 기능을 밝히기 위해서 유전적 knock-out을 통하여 연구하는 것이 가장 강력한 방법 중의 하나이다. 세계적으로 아직 벼의 삼입 변이체 집단 형성이 아직 초보 단계에 있으므로 본 연구에서 벼의 삼입 변이체를 이용하는 유전적 접근방법은 아직 세계적으로 앞서가는 연구 방법이다.

제 3 장. 연구 내용 및 결과

1 절: 벼 도열병 저항성 관련 유전자 cloning 및 특성연구.

1. 저항성 유전자의 분리

a) Differential subtraction chain(DSC) 방법에 의한 rare message의 분리

진홍, 다산 품종 저항성 반응(R)과 이병성 반응(S) 벼 잎으로부터 cDNA를 제작한후 각각의 dscDNA를 *Sau3A I*의 제한 효소로 절단한 후 각각 서로 다른 adaptor(adaptor I - 저항성(R)cDNA; adaptor II - 이병성(S)cDNA)를 ligation시키고 각각의 primer를 이용하여 R의 경우3×, S의 경우 30cycle 증폭하고 다시 S의 경우 *Sau3A I*로 절단하여 adaptor 부근을 절단한 후 R과 S cDNA의 비가 1:100이 되게(R:100ng with adaptor I, S:10μg whitout adaptor II) 첨가해서 16시간 hybridization 시켰다. 이를 PCR colum 정제 kit로 정제한 후 ssDNA절단을 위해 *mungbeen nuclease*를 처리했다. 이렇게 함으로써 R·S heteroduplex의 경우 primer(adaptor)쪽의 ssDNA를 절단해서 차후 PCR 증폭을 억제하는 방법으로 6회

실시하여 이러한 과정을 거치는 negative amplification 방법으로 R/S간 차이가 나는 rare message를 최종 subtraction 과정에서 PCR 증폭한 후 *SK vector/BamH I* site에 cloning 하고 successive hybridization으로 공통적인 message를 찾아내고 있다. 현재 1440 clone으로부터 control이나 S반응에 hybridization되는 clone이나 R-specific message 중 PCR증폭으로 중복되는 message를 4회에 걸쳐 hybridization해서 제거하였다.

이러한 방법으로 1000여 clone은 확인이 끝났으며 현재 400여 clone을 다시 확인중이다. 지금까지 94 clone은 sequencing으로 확인되고 있으며 중복되지 않은 clone은 현재 70여개 확보하고 있고 이러한 방법으로 확인할 경우 100~150여개의 독립된 clone을 확보할 수 있을 것으로 예상하고 있다. 확인된 주요한 clone은 아래 table1과 같다.

Table1. Sequence analysis of rice blast disease resistance related genes from leaves of resistant interaction by differential subtraction chain (DSC)

Clone No	cDN A Size	Sequence Homology	Database match		Identity score (blastX)
			Accession No	Source	
R-BamH I 1	525	F1N19.17	AAF19677	<i>A. thaliana</i>	69
5	350	Triticum aestivum beta 1,3-glucanase (Glc1) mRNA contains similarity to other	U30323	<i>wheat</i>	123
21	323	proline-rich proteins	AAF39985	<i>Caenorhabditis elegans</i>	34
26	401	serine/threonine specific protein kinase-like	CAC01827	<i>A. thaliana</i>	108
40	640	putative protein phosphatase 2C	AAC69126	<i>A. thaliana</i>	143
41	438	F16N3.20	AAD46034	<i>thale cress</i>	34
47	200	hypothetical protein - Deinococcus radiodurans	F75297	<i>Deinococcus radiodurans</i>	38
49	200	unknown protein	BAA97191	<i>A. thaliana</i>	103
51	610	putative cycloartenol synthase	AAF03375	<i>O. sativa</i>	192
66	338	elongation factor 2	BAA77028	<i>Lithospermum</i>	55
70	622	putative katanin	AAC26698	<i>A. thaliana</i>	275
74	478	Unknown Protein	AAF97349	<i>A. thaliana</i>	233
75	550	HIV-1 transcriptional elongation factor TAT cofactor (TAT-SF1)	CAB10730	<i>H. sapiens</i>	74
76	300	carbonic anhydrase	BAA31953	<i>O. sativa</i>	203
77	500	similar to yeast BET3	NP_03874 6	<i>S. cerevisiae</i>	157
79	250	Unknown			
80	570	t-SNARE SED5	AAC06291	<i>A. thaliana</i>	133
81	360	hemoglobin 2 - rice	T04162	<i>O. sativa</i>	66

Clone No	cDNA Size	Sequence Homology	Database match		Identity score (blastX)
			Accession No	Source	
82	180	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 9 (EIF-3 ETA)	P56821	<i>N.tabacum</i>	56
83	510	transport protein particle component Bet3p-like protein	BAB08754	<i>A. thaliana</i>	246
84	234	RNA polymerase 1-4 (194 kDa subunit)	NP_033114	<i>Mus musculus</i>	30
85	310	contains similarity to other proline-rich proteins	AAF39985	<i>Caenorhabditis elegans</i>	34
86	194	Msx2 interacting nuclear target protein	NP_062737	<i>Mus musculus</i>	30
87	182	unknown protein	BAA97191	<i>A. thaliana</i>	98
88	630	putative protein	CAB87419	<i>A. thaliana</i>	206
91	175	cytosolic heat shock 70 protein; HSC70-3	AAB97316	<i>Spinacia oleracea</i>	123
94	212	112 Lambda-PRL2 Arabidopsis thaliana cDNA clone 23F4T7 (Unknown)	T04162	<i>A. thaliana</i>	91
95	610	ribosomal protein L5 - rice	S39486	<i>O. sativa</i>	99
96	606	ADP-ribosylation factor	AAD17207	<i>Glycine max</i>	114
97	780	thiol-disulfide interchange like protein	CAB16778	<i>A. thaliana</i>	72
98	157	photosystem I P700 apoprotein A1	AAF29814	<i>Welwitschia mirabilis</i>	111
99	660	Surfeit 1	AAF19609	<i>A. thaliana</i>	187
100	480	unknown protein	AAF19572	<i>A. thaliana</i>	150
102	320	putative protein	CAB85564	<i>A. thaliana</i>	136
103	560	poly(A)-binding protein	AAD37807	<i>O. sativa</i>	256
106	113	unknown			

Clone No	cDNA Size	Sequence Homology	Database match		Identity score (blastX)
			Accession No	Source	
109	255	hypothetical protein	D71422	<i>A. thaliana</i>	38
110	56	Unknown			
112	470	transport protein particle component Bet3p-like protein	BAB08754	<i>A. thaliana</i>	163
113	710	pyruvate,orthophosphate dikinase	T02979	<i>O. sativa</i>	270
116	520	similar to yeast BET3	NP_038746	<i>house mouse</i>	157
120	325	conserved hypothetical protein	CAB89876	<i>S. pombe</i>	39
122	458	hypothetical protein	T01291	<i>A. thaliana</i>	112
124	610	similar to yeast BET3	NP_038746	<i>house mouse</i>	140
126	610	rapa-1	CAB88206	<i>H. sapiens</i>	36
127	420	RNA-binding protein homolog	AAF00075	<i>Brassica napus</i>	110
134	292	HYPOTHETICAL 21.7 KD PROTEIN IN PAHZ1 5'REGION	P52089	<i>P. lemoignei</i>	31
138	365	ubiquitin conjugating protein	AAF73016	<i>Avicennia marina</i>	75
148	608	Unknown protein	T05426	<i>H. sapiens</i>	162
151	651	Unknown protein	T05426	<i>H. sapiens</i>	149
154	685	thiol-disulfide interchange like protein	CAB16778	<i>A. thaliana</i>	243
205	290	delta-COP	AAF67098	<i>Zea mays</i>	197
207	173	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	T03229	<i>N. tabacum</i>	99
223	322	contains similarity to other proline-rich proteins	AAF39985	<i>Caenorhabditis elegans</i>	32

Clone No	cDNA Size	Sequence Homology	Database match		Identity score (blastX)
			Accession No	Source	
286	421	putative protein	CAB91600	<i>A. thaliana</i>	94
287	394	phenylalanine ammonia-lyase	S06475	<i>O. sativa</i>	152
288	458	unknown protein	BAA97191	<i>A. thaliana</i>	101
289	470	eIF3b	AAF67758	<i>A. thaliana</i>	153
297	260	putative protein	CAB87855	<i>A. thaliana</i>	52
303	422	polyprotein	AAD27547	<i>O. sativa</i>	139
304	528	UDP-GlcNAc:dolichol phosphate N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase	BAA83586	<i>A. thaliana</i>	32
310	619	unknown			
316	530	Unknown	T02986	<i>H. sapiens</i>	93
317	442	heat shock protein	AAA62445	<i>Spinacia oleracea</i>	116
319	617	conserved hypothetical protein CP0446	A72093	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	31
320	447	2-oxoglutarate/malate translocator (clone OMT103), mitochondrial membrane - proso millet	S65042	<i>Panicum miliaceum</i>	183
323	340	hypothetical protein	CAC09505	<i>O. sativa</i>	43
324	164	similar to translational activator	AAD38254	<i>A. thaliana</i>	63
326	460	unknown			
327	388	40S RIBOSOMAL PROTEIN S3A (CYC07 PROTEIN)	P49397	<i>O. sativa</i>	196
328	200	Rice gene for phenylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.5)	X16099	<i>O. sativa</i>	396
334	493	unknown			

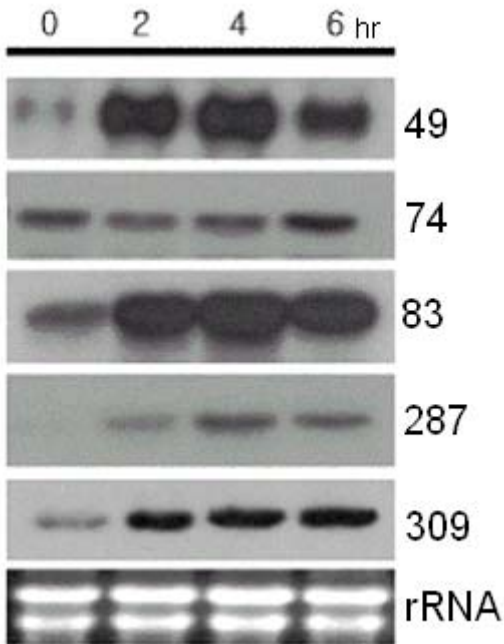


Fig. 2 Northern(RNA) blot analysis of total RNA isolated from control and elicitor-treated(2, 4, 8hr) cells with the elicitor-responsive genes isolated by DSC. Fungal elicitor(50ug of glucose equivalents per ml) was added to the growth medium and incubation were carried out for the indicated lengths of time. The differential expression patterns of the elicitor-responsive genes observed upon treatment with fungal elicitor were shown. A 20-ug aliquot of total RNA was loaded per lane. RNA equal loading was checked by intensity of ribosomal RNA. 49; unknown, 74; unknown, 83;transport protein particle component Bet3p-like protein, 287; phenylalanine ammonia-lyase, 309; Thaumatine like protein (TLP)

b) SAGE 와 DDH에 의해서 분리된 clone의 mirco array 방법에 의한 발현시기별 양적차이 있는 유전자 분리

DSC 방법이 message의 발현유무 차이를 확인하는 transcriptome의 일부라면 **Serial Analysis of Gene Expression(SAGE)**는 유전자 발현양의 차이를 확인하는 새로운 기술이라 할 수 있다. SAGE는 Restriction enzyme TypeⅡs를 이용하여 short(13~14)sequence tag의 차이를 확인하는 최근의 transcriptome 연구분야이다.

본 연구에서는 진흥 품종으로부터 도열병 저항성(R) 및 이병성(S) 반응 조건하에서 접종 후 12, 24시간후의 잎으로부터 mRNA를 분리하여 Biotin을 부착 cDNA를 제작한 후 *Sau3A* 절단하고 avidin-bead를 이용하여 3' cDNA-*Sau3A*절단 부위만 회수한 후 각각 다른 adaptor I,Ⅱ를 ligation 시키고 이를 다시 *Fok I* typeⅡs효소로 절단시키면 13~14bp sequence tag가 release되며 이를 *klenow enzyme*으로 blunt end로 만들고 다시 ligation 시켜 PCR 증폭후 다시 *Sau3A*로 절단하고 tandem ligation 시킨후 pBluescript SK(+) vector(stratagene)의 *BamH I* site에 ligation 시켜 library를 만들었다. 이 과정에서

original SAGE protocol 과 달리 gel-purified 된 28mer ditags를 bead purification 함으로써 ditag와 concatemer의 효율성을 증대시키려 시도하였다(Figure. 2).

SAGE 분석을 통하여 총 2,745개의 tags를 분리하였으며 이중 910(33%)개의 tags는 GenBank을 통하여 동정하였으나, 아직 1,835(67%)개는 동정할 수 없었다. 동정된 910개의 tags 중 development, structure, transcription/translation, stress/defense, signal, metabolism, others, photosynthesis, unknown/hypothetical protein이 각각 1.3%, 10.2%, 3.6%, 13.5%, 4.1%, 10.8%, 11.6%, 33.4%, 11.5%로 나타났다. 대부분이 photosynthesis나 structure에 관련된 유전자의 발현이 많았으며 이병성과 저항성과의 차이는 Stress/Defense 부분에서 저항성 유전자가 더 많이 발현된다는 것을 확인할 수 있었다(Figure. 3). 그러나 아직까지 70%정도가 동정이 안되는 이유는 Rice에 대한 Genome 분이 이 완전히 끝나지 않았기 때문에 지금의 상황에서는 SAGE 방법을 통한 유전자 발현 분석은 한계가 있으며 차후에는 좀더 좋은 결과를 얻을 것으로 생각된다.

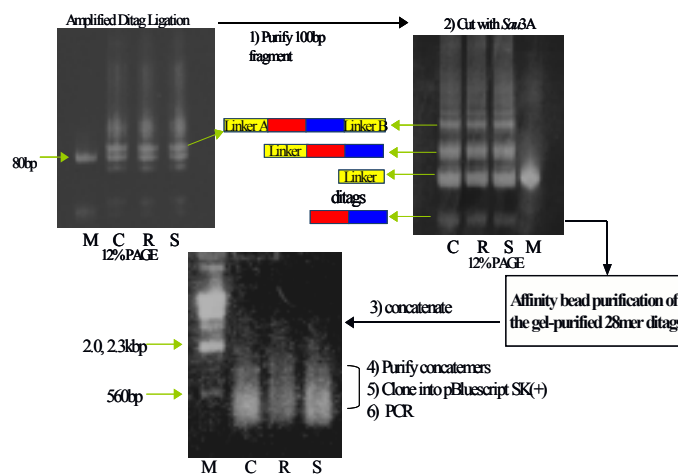
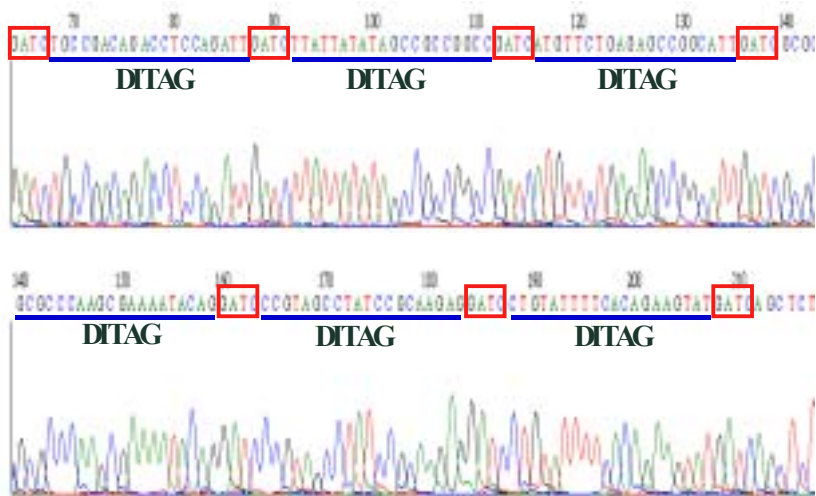


Fig2. Steps of the SAGE method repeated for multiple ditags amplifications.

Linker-ditag molecules were created through a series of enzymatic steps outlined in the SAGE protocol. Dilutions of substrate were used multiple ditags amplification from the same ditag ligation. Amplified ditags were gel purified(step 1) and digested with *Sau3A1*(step 2). Free ditags were gel, affinity bead purified and concatenated(step 3). Large concatemers were gel purified(step 4) and cloned into plasmids(step 5). Individual clones were amplified by PCR(step 6) for sequencing.

(M : Marker, C : Control, R : Resistance, S : Susceptible)

(A)



(B)

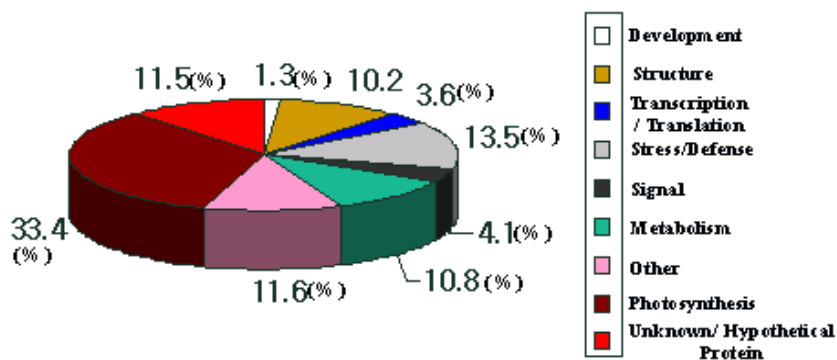


Fig. 3. SAGE sequence output using ABI 377 sequencer and Functional analysis of rice(*Oryza sativa* L.) gene inoculated with rice fungus *M. grisea*.

(A) Anchoring enzyme sites(*Sau3A1*) and ditags are represented by solid(red) and lines(blue), respectively. For tag identification, the tag list of each library was matched against a rice tag database from TIGR release and checked that the EST displayed the 3' *Sau3A* site of the cDNA. (B) Total of 2,745 tags were isolated, 910(33%) tags were identified but 1,835(67%) could not be identified from GenBank database at this moment. Among identified tags, 13.5%, 4.1% tags showed stressed/pathogen and signal transduction related genes, respectively.

또한 DDH 방법을 통하여 약 2만개의 cDNA plaque를 control cDNA probe를 이용(Fig. 4)하여 768개의 clone을분리하였으며 분리된 clone중 411개의 유전자의 염기서열을 이미 분석하였다(Table 2).

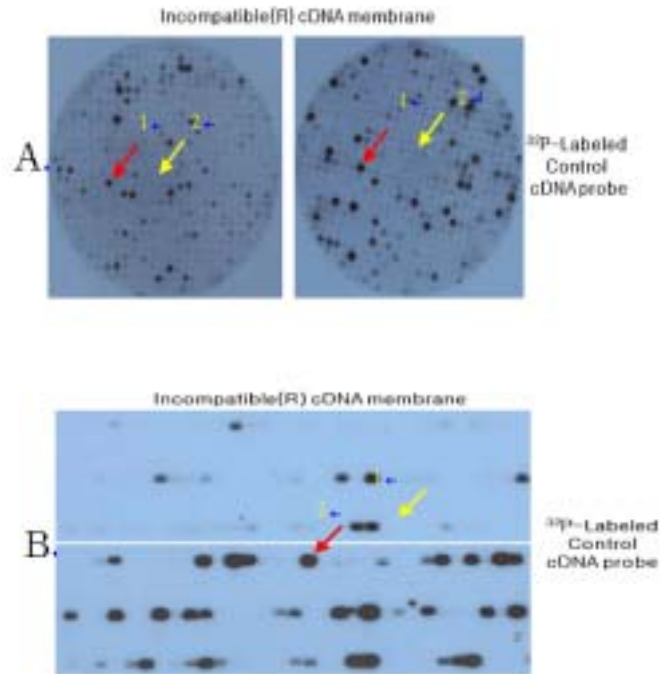


Fig. 4. Detection of differentially expressed genes isolated by Differential Hybridization(A) and Differential Subtraction Chain(B).

Black spots are abundant genes(1) and white spots are rice blast fungal induced genes(2).

Table 2. Sequence analysis of rice blast fungal elicitor induced genes from rice calli in incompatible interaction by Differential Hybridization.

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
Ca1	Amino acid carrier protein	CAA10608	<i>R. communis</i>	110
2	Unknown protein mRNA	AF360263	<i>A. thaliana</i>	111
3	Phospholipase D2 (PLD 2)	P93844	<i>O. sativa</i>	302
4	FUS5	AAC25563	<i>A. thaliana</i>	77
5	WRKY DNA-binding protein 18	AAK28308	<i>A. thaliana</i>	33
7	unknown	AAB65393	<i>D. discoideum</i>	103
8	Hypothetical protein F27K19.170	T49211	<i>A. thaliana</i>	147
9	Squamosa promoter binding protein-like 12	T47827	<i>A. thaliana</i>	109
10	unknown protein	BAA96636	<i>O. sativa</i>	119
11	H ⁺ -transporting ATPase	S52739	<i>maize</i>	317
12	H ⁺ -transporting ATPase	S52739	<i>maize</i>	296
13	PrMC3		<i>P. radiata</i>	102
14	Not56-like protein	AAC63631	<i>A. thaliana</i>	87
15	ESTs	BAA96147	<i>O. sativa</i>	129
16	Transcription factor-like protein	T49067	<i>A. thaliana</i>	64
17	Unknown protein	AAD21437	<i>A. thaliana</i>	191
18	Receptor-like kinase	AAF78019	<i>O. sativa</i>	98
19	Putative integral membrane transporter protein	NP_060877	<i>H. sapiens</i>	57
20	Protein phosphatase 2C-like protein	T45768	<i>A. thaliana</i>	82
21	Pyruvate dehydrogenase E1 β subunit	AAC72192	<i>Zea mays</i>	228
22	Sucrose-UDP Glucosyltransferase	P30298	<i>O. sativa</i>	391
23	SAR DNA binding protein	BAA31260	<i>O. sativa</i>	327
24	r40c1 protein	T03911	<i>O. sativa</i>	123
25	Hypothetical protein	AAB64311	<i>A. thaliana</i>	194
26	Myrosinase-binding protein related protein	BNU59446	<i>B. napus</i>	35
27	Probable leucyl-transsynhetase	Q09996	<i>C. elegans</i>	207
28	27k vesicle-associated membrane protein	JC7234	<i>N. plumbaginifolia</i>	164
29	Putative cinnamoyl CoA reductase	AAC63661	<i>A. thaliana</i>	133
30	Hypothetical protein	AAD39644	<i>A. thaliana</i>	120
31	Unknown protein	BAA97527	<i>A. thaliana</i>	124
32	Putative elongation factor	AAC67362	<i>A. thaliana</i>	104
33	Hypothetical protein F14P22.80	T45669	<i>A. thaliana</i>	204
34	L-allo-threonine aldolase	AAF63783	<i>A. thaliana</i>	163
35	LYTB-like protein precursor	AAG21984	<i>A. palaestic</i>	87
36	Zinc finger protein F15B8.140	T06753	<i>A. thaliana</i>	154
37	Hypothetical protein	BAA83564	<i>O. sativa</i>	103
38	Eukaryotic translation initiation factor 5	CAA10616	<i>Zea mays</i>	271
39	serine/threonine-specific protein kinase	T04831	<i>A. thaliana</i>	72

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
40	Plastidic ATP/ADP-transporter	BAB40979	<i>O. sativa</i>	290
41	Putative ripening-related protein	CAB85633	<i>V. vinifera</i>	221
42	putative protein	BAA93034	<i>A. thaliana</i>	212
43	Pirin	AAF22236	<i>L. esculentum</i>	320
44	Asparatate aminotransfrase (Transaminase A)	P37833	<i>O. sativa</i>	97
45	Ribosomal protein S4	T01203	<i>Zea mays</i>	380
46	Putative magnesium transporter	CAC13982	<i>A. thaliana</i>	139
47	Hypothetical protein	AAD27562	<i>S. bicolor</i>	83
48	MAP kinase 1	AAG40579	<i>O. sativa</i>	278
49	syntaxin of plants 71	AAK40225	<i>A. thaliana</i>	165
50	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	NP_001558	<i>H. sapiens</i>	43
52	hypothetical protein T5L19.160	T04007	<i>A. thaliana</i>	64
53	corresponds to a region of the predicted gene	BAA84613	<i>O. sativa</i>	253
54	DNA-binding protein PD3	T06461	<i>garden pea</i>	185
55	β -1,3-glucanase-like protein	BAB08587	<i>A. thaliana</i>	92
56	putative extracellular dermal glycoprotein	CAC10209	<i>C. arvense</i>	74
57	β -ketoacyl-ACP synthase IIIA (KAS IIIA)	AF026150	<i>P. frutescens</i>	50
60	putative cinnamoyl-CoA reductase	BAB39961	<i>O. sativa</i>	167
61	ADP,ATP CARRIER PROTEIN	P31691	<i>O. sativa</i>	132
62	receptor-like protein kinase	BAB09221	<i>A. thaliana</i>	316
63	glutamyl aminopeptidase	T05189	<i>A. thaliana</i>	160
64	probable cytochrome P450 monooxygenase	T02955	<i>maize</i>	145
65	putative receptor kinase	AAK43512	<i>O. sativa</i>	223
66	ribosomal protein S4 type I	T01187	<i>maize</i>	253
67	putative acyl-CoA synthetase	AAD25843	<i>A. thaliana</i>	268
68	homeotic protein Hox 7	A40560	<i>H. sapiens</i>	33
69	ubiquitin	CAA30333	<i>T. cruzi</i>	172
70	hypothetical protein	CAC32257	<i>L. major</i>	31
71	putative GTP-binding protein	CAC39050	<i>O. sativa</i>	246
72	EREBP-like protein	AF190770	<i>O. sativa</i>	89
73	alpha-D-xylosidase	CAA10382	<i>T. majus</i>	260
74	Nt-iaa4.1 deduced protein	AAD32147	<i>N. tabacum</i>	162
75	prolyl 4-hydroxylase alpha subunit-like protein	BAB02864	<i>A. thaliana</i>	258
76	unknown protein	AAK44087	<i>A. thaliana</i>	332
77	hypothetical protein	BAA93019	<i>O. sativa</i>	169
78	Pyruvate kinase	P22200	<i>S. tuberosum</i>	306
79	beta-1,3-glucanase	T50563	<i>O. sativa</i>	193
80	putative	BAB32076	<i>M. musculus</i>	40
81	ubiquitin-protein ligase 2	AAF36455	<i>A. thaliana</i>	342
82	digalactosyldiacylglycerol synthase	AAD42378	<i>A. thaliana</i>	167
88	EF-1 alpha	BAA23657	<i>O. sativa</i>	145
89	zinc-induced protein	AAK16696	<i>O. sativa</i>	116
90	hypothetical protein	AAK52135	<i>O. sativa</i>	32
91	DNA-like protein	BAB10088	<i>A. thaliana</i>	61
93	predicted GPI-anchored cell wall protein	NP_010013	<i>S. cerevisiae</i>	33
94	VirF-interacting protein FIP1	AAK06847	<i>A. thaliana</i>	178

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
95	glutamate-ammonia ligase	P14656	<i>O. sativa</i>	312
97	oryzain alpha chain precursor	P25776	<i>O. sativa</i>	265
98	unknown protein	BAB10564	<i>A. thaliana</i>	111
99	small GTP-binding protein	AAK38149	<i>O. sativa</i>	292
100	hypothetical protein	BAB32998	<i>O. sativa</i>	60
101	unknown protein	AAD32777	<i>A. thaliana</i>	190
103	hypothetical protein	BAA85423	<i>O. sativa</i>	27
104	sucrose transporter	AAF90181	<i>O. sativa</i>	385
105	phosphatase 2A regulatory A subunit	CAB51803	<i>O. sativa</i>	338
106	axi 1-like protein	AAC67324	<i>A. thaliana</i>	283
107	hypothetical protein	T49452	<i>N. crassa</i>	34
108	arginine/serine-rich splicing factor	P92964	<i>A. thaliana</i>	63
109	aspartate aminotransferase	P37833	<i>O. sativa</i>	259
110	unconventional myosin heavy chain	A59310	<i>maize</i>	294
111	putative senescence-associated protein	AB049719	<i>P. sativum</i>	65
112	fructose-bisphosphate aldolase	P08440	<i>Zea mays</i>	221
113	hypothetical protein	T08454	<i>A. thaliana</i>	69
114	22 kDa kafirin cluster	AF061282	<i>S. bicolor</i>	36
115	unknown protein	BAB01475	<i>A. thaliana</i>	115
117	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	AAC02736	<i>A. thaliana</i>	115
118	nucleoside diphosphate kinase	D16292	<i>O. sativa</i>	273
119	allene oxide cyclase	AJ272026	<i>L. esculentum</i>	162
120	ubiquitin-protein ligase 5	P42749	<i>A. thaliana</i>	201
121	hypothetical protein	T02619	<i>A. thaliana</i>	164
122	hypothetical protein	AC079730	<i>A. thaliana</i>	116
123	hypothetical protein	AC051634	<i>O. sativa</i>	213
124	pyruvate kinase isozyme G	Q40546	<i>N. tabacum</i>	87
125	PYRUVATE KINASE	Q42806	<i>G. max</i>	313
126	NADPH oxidase (RBOH1)	AF088276	<i>L. esculentum</i>	229
128	cationic peroxidase (OsCPX1)	AF019743	<i>O. sativa</i>	100
131	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel	NP_062186	<i>R. norvegicus</i>	32
132	phosphatase type 2C-like protein	AF370608	<i>A. thaliana</i>	114
133	submergence induced protein 2 (sip2)	AF050200	<i>O. sativa</i>	381
134	chromosome 1 BAC T31J12 sequence	AC006416	<i>A. thaliana</i>	266
135	virion-associated nuclear-shuttling protein	AY012159	<i>M. musculus</i>	32
136	β -fructofuranosidase	P49174	<i>Zea mays</i>	221
137	auxin response factor 1	AF140228	<i>O. sativa</i>	117
138	acetyl-CoA C-acyltransferase	S72532	<i>Cucurbita sp</i>	195
139	hypothetical protein	AAK38305	<i>O. sativa</i>	34
140	porin - common ice plant	T12558	<i>M. crystallinum</i>	131
141	unknown protein	BAB39890	<i>O. sativa</i>	116
142	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	T06201	<i>H. vulgare</i>	214
143	Exportin1 (XPO1) protein	T51557	<i>A. thaliana</i>	377
144	mucin	AAA59875	<i>H. sapiens</i>	60

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
145	NLS receptor	AB004660	<i>O. sativa</i>	409
146	NLS receptor	AB004660	<i>O. sativa</i>	66
147	microtubule-associated protein 7	NP_003971	<i>H. sapiens</i>	40
148	truncated protein	S71728	<i>S. cerevisiae</i>	46
149	putative WD-repeat protein RBAP1	BAB39413	<i>O. sativa</i>	290
150	salt-tolerance protein	X95572	<i>A. thaliana</i>	372
151	40s ribosomal protein S11	P25460	<i>Zea mays</i>	182
152	indole-3-acetate β -glucosyltransferase	Q41819	<i>Zea mays</i>	81
153	phosphoglycerate kinase	P12783	<i>T. aestivum</i>	253
154	putative α/β hydrolase	AAG13429	<i>O. sativa</i>	146
155	putative transketolase	BAB19388	<i>O. sativa</i>	211
156	putative t-SNARE SED5	BAB07966	<i>O. sativa</i>	269
158	encoding homeobox protein	Y17898	<i>Zea mays</i>	305
159	ADP,ATP carrier protein	P31691	<i>O. sativa</i>	279
160	extensin	S22697	<i>V. carteri</i>	37
161	exo-1,3- β -glucanase	AAF65310	<i>C. carbonum</i>	55
162	hypothetical protein	T24769	<i>C. elegans</i>	32
163	putative cytochrome P450	AAC06156	<i>A. thaliana</i>	102
164	alcohol dehydrogenase	AAG42508	<i>H. vulgare</i>	45
165	probable mucin DKFZp434C196.1	T43481	<i>Homo sapiens</i>	57
166	senescence-associated protein	T02906	<i>A. thaliana</i>	55
167	senescence-associated protein	T02906	<i>A. thaliana</i>	182
168	early phosphoprotein p50	AAB53250	human <i>herpesvirus 5</i>	39
169	OsCDPK7	AB042550	<i>O. sativa</i>	155
170	protein serine/threonine kinase-like protein	T50817	<i>A. thaliana</i>	67
171	MAP kinase MAPK2	AF241166	<i>O. sativa</i>	342
172	probenazole-induced protein	T02973	<i>O. sativa</i>	180
173	fructose-bisphosphate aldolase	P17784	<i>O. sativa</i>	303
174	probenazole-induced protein	T02973	<i>O. sativa</i>	208
175	putative 14-3-3 protein	AAK38492	<i>O. sativa</i>	192
176	putative RING zinc finger protein	AAF20226	<i>A. thaliana</i>	82
177	hypothetical protein	T47699	<i>A. thaliana</i>	83
178	transketolase TKT1 precursor	T09541	<i>pepper</i>	104
179	syringomycin synthetase	T14593	<i>P. syringae</i>	34
180	hypothetical protein	XP_016940	<i>H. sapiens</i>	41
181	proteophosphoglycan, membrane-associated	T46707	<i>L. major</i>	51
182	virion-associated nuclear-shuttling protein	AAG42155	<i>M. musculus</i>	47
183	putative protein	CAC08329	<i>A. thaliana</i>	288
184	cell wall invertase Incw1 gene	AF050129	<i>Zea mays</i>	285
185	zinc transporter ZAT	AF072858	<i>A. thaliana</i>	225
186	hypothetical protein	T05595	<i>A. thaliana</i>	154
187	unknown protein	BAB08811	<i>A. thaliana</i>	99
188	putative ribosomal protein L26	BAB21209	<i>O. sativa</i>	233
189	unknown protein	AAF79888	<i>A. thaliana</i>	120
190	hypothetical protein	T46054	<i>A. thaliana</i>	157

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
191	larval glue protein Lgp3 precursor	S50125	<i>D. virilis</i>	53
192	chitinase (EC 3.2.1.14) III	JC5846	<i>O. sativa</i>	290
193	Zeugites pittieri maturase (matK) gene	AF144576	<i>Z. pittieri</i>	35
194	NADH dependent Glutamate Synthase	AB008845	<i>O. sativa</i>	425
195	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	P52424	<i>V. unguiculata</i>	244
196	toxins IV/III/V PRECURSOR (TSTX-IV)	P45659	<i>T. serrulatus</i>	32
197	Unknown protein	AAF98430	<i>A. thaliana</i>	95
198	putative membrane protein	AAD12695	<i>A. thaliana</i>	202
199	hypothetical protein	T05585	<i>A. thaliana</i>	189
200	hypothetical protein	T05301	<i>A. thaliana</i>	169
201	unknown protein	BAB16337	<i>O. sativa</i>	375
203	Ser/Arg-related nuclear matrix protein	NP_058079	<i>M. musculus</i>	60
204	hypothetical protein	AAG13445	<i>O. sativa</i>	167
205	putative cytochrome P450	BAB19120	<i>O. sativa</i>	322
206	fructokinase	P37829	<i>S. tuberosum</i>	244
207	TSC22-related inducible leucine zipper	AF201285	<i>M. musculus</i>	48
208	cytochrome P450	BAB02270	<i>A. thaliana</i>	52
209	chaperonin subunit 7	NP_031664	<i>M. musculus</i>	55
210	intron-encoded homing endonuclease	AF139989	<i>O. sativa</i>	52
211	non-functional folate binding protein	HSAF000381	<i>H. sapiens</i>	66
212	putative coated vesicle membrane protein	AF360268	<i>A. thaliana</i>	257
213	genomic DNA, chromosome 6, clone:P0425F02	AP001168	<i>O. sativa</i>	340
214	glycosylphosphatidylinositol-anchored protein	AF319663	<i>A. thaliana</i>	144
215	initiation factor 3g	AF291712	<i>A. thaliana</i>	182
216	putative Bowman Birk trypsin inhibitor	OSA277468	<i>O. sativa</i>	295
219	cysteine proteinase 1 precursor	Q10716	<i>Zea mays</i>	96
220	transcription factor ATBF1	2207230A	<i>M. musculus</i>	38
221	nadh-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa (COMPLEX I-23KD)	P80269	<i>S. tuberosum</i>	100
222	33 kDa secretory protein	AF090872	<i>O. sativa</i>	193
223	Thiobacillus ferrooxidans tapA	TFE277640	<i>A. ferrooxidans</i>	60
224	pyruvate decarboxylase	S71557	<i>O. sativa</i>	83
225	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	T06293	<i>A. thaliana</i>	114
226	Mei2-like protein	T48500	<i>A. thaliana</i>	89
227	Anemia phyllitidis actin 1	AF091808	<i>A. phyllitidis</i>	40
228	unknown protein	BAB11457	<i>A. thaliana</i>	89
229	dermal glycoprotein precursor	T14329	<i>D. carota</i>	49
230	NADP dependent malic enzyme-like protein	T48526	<i>A. thaliana</i>	121
231	pollen extensin-like protein (Pex2) gene	AF159297	<i>Zea mays</i>	47
260	minor mRNA for amino acid permease AAP4	AJ318811	<i>Tick bean</i>	168
261	mucin 2	NP_002448	<i>H. sapiens</i>	30
262	vacuolar proton-translocating ATPase subunit E(Ylp)	U84269	<i>H. vulgare</i>	292
263	β -tubulin cofactor - like protein	NP_191633	<i>A. thaliana</i>	201

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
264	protein kinase (OSPK10)	BAA92954	<i>O. sativa</i>	113
265	putative protein	NP_199793	<i>A. thaliana</i>	304
266	hypothetical protein	NP_173769	<i>A. thaliana</i>	74
268	putative H ⁺ -transporting ATP synthase	BAB39419	<i>O. sativa</i>	314
269	putative protein	NP_194266	<i>A. thaliana</i>	197
270	Hypothetical protein	AC074283	<i>O. sativa</i>	76
271	putative receptor ser/thr protein kinase	BAB16326	<i>O. sativa</i>	342
272	unknown protein	NP_173369	<i>A. thaliana</i>	54
273	pyruvate kinase	NP_200104	<i>A. thaliana</i>	82
274	hypothetical protein	D82039	<i>V. cholerae</i>	234
275	hypothetical protein	AJ245900	<i>A. thaliana</i>	145
276	hypothetical protein	NP_176909	<i>A. thaliana</i>	257
277	enoyl CoA hydratase-like protein	NP_199142	<i>A. thaliana</i>	126
279	unknown protein	NP_188093	<i>A. thaliana</i>	60
282	hypothetical protein	T17261	<i>H. sapiens</i>	32
284	cytochrome oxidase subunit I	AB018233	<i>C. armatus</i>	56
285	T117	NP_116468	<i>T. herpesvirus</i>	35
286	unknown protein	AY034911	<i>A. thaliana</i>	161
287	FB17G10 Fetal brain, Stratagene Homo sapiens cDNA clone FB17G10	T02955	<i>H. sapiens</i>	99
288	transcriptional activator protein	AAC37418	<i>A. thaliana</i>	202
290	Arabidopsis thaliana MYR1 (MYR1)	AF291817	<i>A. thaliana</i>	55
291	similar to 'Mx' GTP-binding proteins	AAB71953	<i>A. thaliana</i>	135
292	hypothetical protein	T18440	<i>P. falciparum</i>	36
293	hypothetical protein	T31611	<i>C. elegans</i>	33
294	hypothetical protein	T16083	<i>C. elegans</i>	54
295	histone-like DNA-binding protein PF 1	S43476	<i>O. sativa</i>	66
296	pgaz gene for endopolygalacturonase	AJ250918	<i>B. napus</i>	67
297	WSI18 protein	BAB44029	<i>O. sativa</i>	56
298	putative leucine-zipper protein	AJ305034	<i>Mus musculus domesticus</i>	151
299	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	P17770	<i>C. roseus</i>	136
300	hypothetical protein	BAB32969	<i>O. sativa</i>	73
301	GDP dissociation inhibitor protein	T02032	<i>O. sativa</i>	119
302	exoglucanase precursor (exg1) gene	AF225411	<i>Zea mays</i>	194
303	auxin-responsive GH3-like protein	AAC61292	<i>A. thaliana</i>	81
304	33 kDa secretory protein	AF090872	<i>O. sativa</i>	78
305	aspartate transaminase	JC5125	<i>O. sativa</i>	271
306	malate dehydrogenase	Q42972	<i>O. sativa</i>	307
307	malate dehydrogenase	Q42972	<i>O. sativa</i>	353
308	cinnamate 4-hydroxylase	AF097664	<i>M. crystallinum</i>	110
309	putative protein	AK019785	<i>Mus musculus</i>	58
310	trehalose-6-phosphate synthase	NP_177979	<i>A. thaliana</i>	348
311	arginase	NP_192629	<i>A. thaliana</i>	219
312	hypothetical protein	NP_188515	<i>A. thaliana</i>	60
313	short chain alcohol dehydrogenase CPRD12	T11579	<i>V. unguiculata</i>	182

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
314	secoisolariciresinol dehydrogenase	AF352735	<i>Forsythia x intermedia</i>	139
316	putative protein	NP_190732	<i>A. thaliana</i>	67
317	actin (Maz89) gene	U60508	<i>Zea mays</i>	231
318	tyrosine kinase	P78621	<i>H. sapiens</i>	34
320	unknown protein	AAF78204	<i>S. purpuratus</i>	37
321	Hypothetical ORF	NP_015086	<i>S. cerevisiae</i>	26
322	hypothetical protein	NP_193353	<i>A. thaliana</i>	43
324	putative cellulose synthase 5-partial	AAG46166	<i>O. sativa</i>	93
325	hypothetical protein	BAB07940	<i>O. sativa</i>	291
326	probable surface antigen protein	CAC01947	<i>L. major</i>	39
327	hypothetical protein	AP002521	<i>O. sativa</i>	278
328	rps20 genes for 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	AB052962	<i>O. sativa</i>	204
329	virion-associated nuclear-shuttling protein	AY012159	<i>Mus musculus</i>	37
330	KIAA1657 protein	AB051444	<i>H. sapiens</i>	34
331	serine/threonine-specific protein kinase	NP_200270	<i>A. thaliana</i>	159
332	putative protein kinase	NP_178651	<i>A. thaliana</i>	195
333	protein kinase	AAG29234	<i>A. thaliana</i>	278
334	profilaggrin	AAA63246	<i>H. sapiens</i>	42
335	plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase	AF231351	<i>N. tabacum</i>	289
336	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	AB052962	<i>O. sativa</i>	103
337	hypothetical protein	BAA90339	<i>O. sativa</i>	163
338	hypothetical protein	AAK27826	<i>O. sativa</i>	259
339	unknown protein	BAB63792	<i>O. sativa</i>	323
340	Human mucin-2 gene	M74027	<i>H. sapiens</i>	64
341	wipTrip wound-induced protease inhibitor (wip1) gene	AF396264	<i>T. dactyloides</i>	182
342	hypothetical protein	BAB19095	<i>O. sativa</i>	114
343	chaperonin 60 alpha subunit	AF030515	<i>C. lineata</i>	113
344	putative pyruvate dehydrogenase E1	NP_181006	<i>A. thaliana</i>	269
346	hypothetical protein, 5'-partial	AC018727	<i>O. sativa</i>	93
347	possible zwh18.1	CAB97841	<i>L. major</i>	74
348	possible zwh18.1	AL117264	<i>L. major</i>	273
349	chitinase	T03614	<i>O. sativa</i>	252
351	AF360235	AF360235	<i>A. thaliana</i>	212
352	Hypothetical protein	AAK52532	<i>O. sativa</i>	345
354	proline-rich protein V-beta 1 precursor	S39206	<i>R. norvegicus</i>	31
356	unknown protein	NP_180196	<i>A. thaliana</i>	75
358	putative purple acid phosphatase (PAP)	AF236109	<i>P. vulgaris</i>	140
360	PRL2	T04482	<i>A. thaliana</i>	204
362	NAD(+)-dependent malic enzyme 2	CAC36330	<i>H. sapiens</i>	303
363	putative protein	BAB23829	<i>Mus musculus</i>	39

Clone No.	Sequence Homology	Database match		Score (blastX)
		Accession No.	Source	
364	putative mitochondrial carrier protein	AAG45489	<i>O. sativa</i>	179
365	acetyl-CoA carboxylase	A57710	<i>T. aestivum</i>	202
367	SAR DNA binding protein	AB015431	<i>O. sativa</i>	45
369	enolase	AAC49173	<i>O. sativa</i>	301
370	phosphoglycerate kinase	NP_178073	<i>A. thaliana</i>	45
371	hypothetical protein	BAB78633	<i>O. sativa</i>	55
372	similar to CG17621 gene	AB058759	<i>H. sapiens</i>	37
373	Sec61p	AAF80449	<i>T. aestivum</i>	91
374	putative glutathione S-transferase	BAB39927	<i>O. sativa</i>	170
375	unknown protein	BAB63665	<i>O. sativa</i>	68
376	development regulation gene OsNAC4	BAB64820	<i>O. sativa</i>	120
377	hypothetical protein	AAG13584	<i>O. sativa</i>	33
378	procollagen, type XVII, alpha 1	NP_031758	<i>Mus musculus</i>	42
379	probable short chain alcohol dehydrogenase	T02257	<i>T. aestivum</i>	79
380	enabled homolog (Drosophila)	NP_034265	<i>Mus musculus</i>	38
381	ribosomal protein S7	AF118149	<i>S. cereale</i>	84
382	Similar to RIKEN cDNA 2410141M05 gene	BC008630	<i>H. sapiens</i>	34
383	putative ribosomal protein L28	NP_179563	<i>A. thaliana</i>	92
384	putative ribosomal protein L28	NP_179563	<i>A. thaliana</i>	102
385	40s ribosomal protein S8	Q08069	<i>Zea mays</i>	139
386	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 169	AC007651	<i>N. tabacum</i>	44
387	Similar to pyruvate kinase	BAA88185	<i>O. sativa</i>	94
388	<i>M. jannaschii</i> predicted coding region MJ0348	NP_247322	<i>M. jannaschii</i>	30
389	putative integral membrane transporter	NP_060877	<i>H. sapiens</i>	57
390	cytokinin oxidase -like protein	NP_191903	<i>A. thaliana</i>	61
391	hypothetical protein	AP002914	<i>O. sativa</i>	37
392	fructose-bisphosphate aldolase	S65072	<i>O. sativa</i>	119
393	unknown protein	NP_180611	<i>A. thaliana</i>	56
394	4-coumarate--CoA ligase 4CL2	AF052222	<i>L. perenne</i>	117
395	RPM1 like protein	AB040028	<i>O. sativa</i>	192
396	unknown protein	NP_174356	<i>A. thaliana</i>	162
397	putative snRNP protein	AAK38497	<i>O. sativa</i>	306
398	putative pyruvate kinase	NP_181197	<i>A. thaliana</i>	70
399	cytochrome b5	NP_199692	<i>A. thaliana</i>	102
400	Ferredoxin-NADP reductase	P41345	<i>O. sativa</i>	226
401	bacterial-induced peroxidase	AAD43561	<i>O. sativa</i>	194
402	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein	CAC42888	<i>A. thaliana</i>	201
404	putative fructokinase	AF429948	<i>O. sativa</i>	198
405	DNA excision repair protein	CAC34483	<i>A. thaliana</i>	213
406	unknown protein	NP_174174	<i>A. thaliana</i>	87
407	putative lipase	NP_175685	<i>A. thaliana</i>	156
408	26S proteasome regulatory subunit S2	NP_179648	<i>A. thaliana</i>	232
409	putative berberine bridge	AC004135	<i>A. thaliana</i>	35
410	mini-collagen	B41132	<i>Hydra sp.</i>	50
411	xanthine dehydrogenase - like protein	NP_195215	<i>A. thaliana</i>	25

2. Rice cDNA chip을 사용한 도열병 저항성 품종 비교.

- ① 유전자 확보를 위한 식물재료: 유전자 칩 생성을 위해 먼저 유전자 자원을 확보하기 위한 재료로 에 도열병을 처리한 rice leaf를 사용하였다. 기타 다당류 및 기타 단백질 제거하는 과정을 삽입하여 Total-RNA를 추출하였고 Life Technologies사의 SuperScript™ Plasmid System을 사용하여 구축하였다
- ② 유전자 자원을 가장 효과적으로 확보하는 방법으로 expressed sequence tags (EST)를 사용 했다. 이들 EST는 발현된 유전자의 단백질 정보 부위만을 포함하기 때문에 세포 혹은 조직 특이성 이나 stress 혹은 생장단계 특이성 유전자의 분리에 효과적으로 이용될 수 있다. 따라서 대량의 EST의 확보는 한 개체의 유전자 자원과 정보를 단 기간에 대량으로 얻을 수 있게 할 뿐 아니라 보다 상세한 RFLP map 작성을 위한 probe, physical map 작성 시 tag site로 이용되며, DNA chip의 소재, 특정 유전자의 선별을 위한 probe로 활용될 수 있고, 조직이나 특정성장 단계의 유전자 발현양상 등의 규명에도 이용될 수 있다.
- ③ cDNA chip 제조: 2000개의 plasmid prep, 전기영동, 플라즈미드 정량화, PCR amplification, Agarose 전기영동, ethanol precipitation, 등을 거쳐 각각의 클론 삽입체를 증폭 microarray slide (super amine)에 Microarrayer로 spotting 하여 제작 하였다.

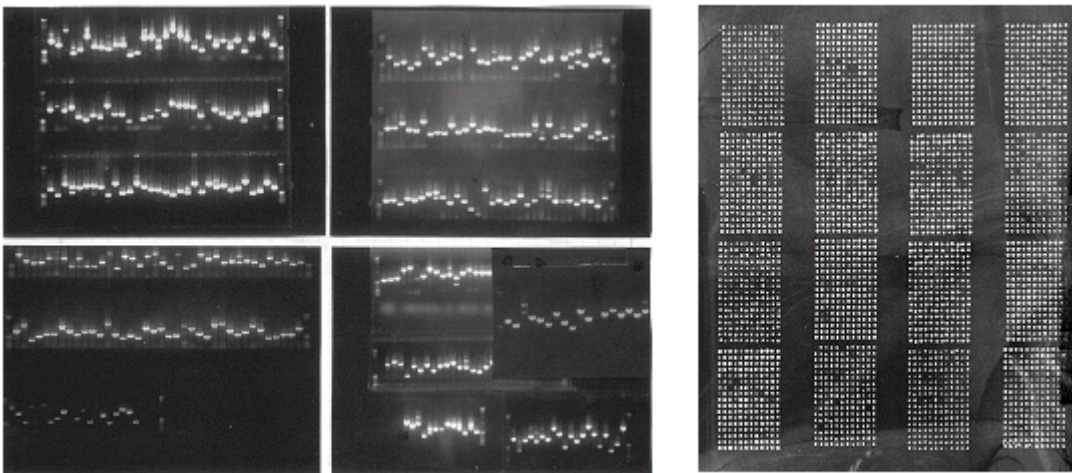


그림. 2000개 EST 로된 cDNA chip을 제조키위한 PCR amplification and slide 그림.

- ④ cDNA chip의 혼성화 및 발현 분석을 통한 유전자 발현 연구

rice leaf cDNA chip을 사용하여 도열병 저항성 계통과, 비 저항성 계통을 각각 서로 비교하고 fungal elicitor 처리후 3hr, 24 hr를 분석 했을 때의 그림은 아래와 같다. 여기서 비 저항성 line 이나 저항성 계통의 발현에 있어 병원균의 침입이전예의 발현 차이는 별로 두드러지지 않는다. 그러나 fungal elicitor 처리시 3시간 후에 발현이 2배이상 증가되는 클론들이 50 여종 발견되었다. Fig. 5, 6 및 table 3 참조. 이들이 병 저항성 관련 유전자 인지를 확인하기 위해 Northern blot 으로 확인하고 염기서열 정보에 따라 기능을 추정하고 추후 형질 전환을 통한 병 저항성 작물 개발에 이용할 예정이다.

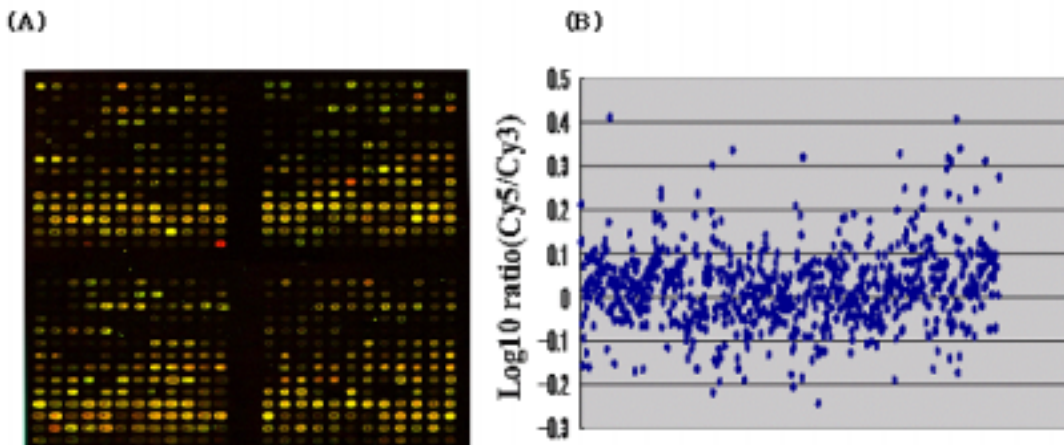


Fig. 5. 768 genes microarray data obtained using callus mRNA treated with fungal elicitor. (A) 768 genes microarray chips were made using Custom made microarray(ReDoh) equipped with 16 Telechem Stelth Pins(SPH-4B. high capacity bubble pins). These slide were made using 768 gene. 100ul of PCR reaction products were ethanol precipitated, dissolved in 10ul of water. Four microliter out of 10ul (100-150ng of insert DNA/ul) was mixed with 4ul of 2X spotting solution(Telechem Co.) and arrayed either into silylated (aldehyde) slide (CEL Associates. Inc) or superaldehyder slides(Telechem Co.). Hybridization was done with Cy 3-labeled control mRNA and Cy 5-labeled callus mRNA treated with fungal elicitor and rice leaf mRNA inoculated with rice blast fungus, *M. grisea*. respectively. (B) The expression ratios experiments of log10 Cys5/Cys3 from callus mRNA treated with fungal elicitor are plotted against the order of 768 genes printed on the microarray. Two fold regulation is indicated as 0.3.

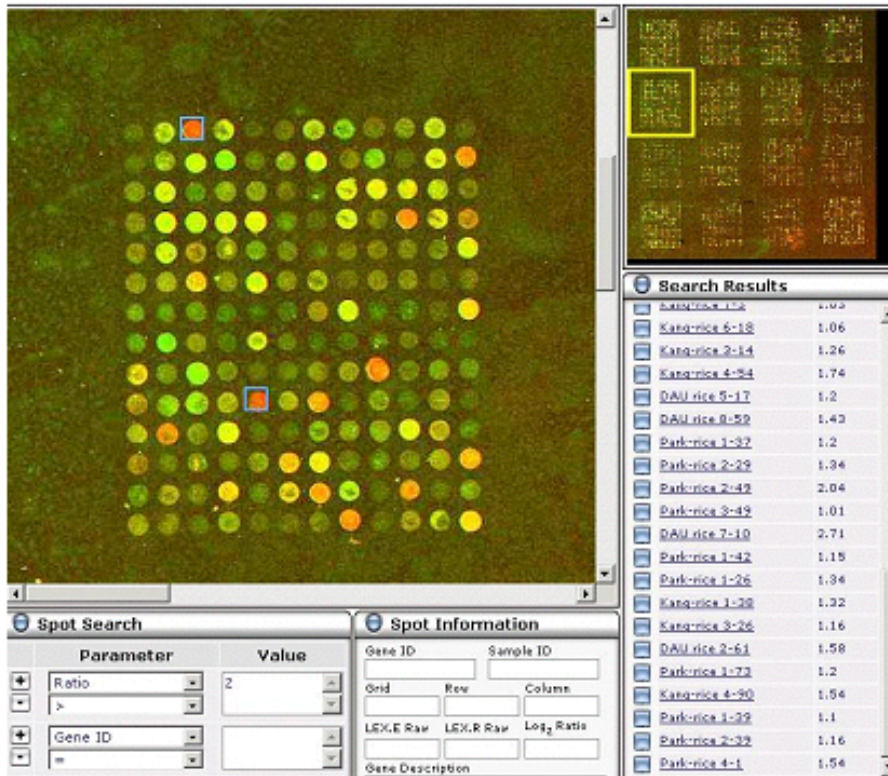


Fig. . Rice 2K cDNA chip을 사용한 도열병 저항성 및 elicitor 처리 후 발현양상 분석. 상기 그림은 elicitor 처리후 발현된 유전자가 표시된 이미지. 아래 그림. Hierarchical clustering 에 의한 2배 이상 발현 유전자와 도열병 내성 및 감수성 벼의 차이 분석.

이 방법을 통해 얻어진 768 genes의 발현 수준을 확인하기위해 fungal elicitor를 처리한 Callus mRNA를 제2 세부과제 홍중찬 교수가 제작한 Microarray technology 이용하여 이들 유전자들의 발현 양상을 확인한 결과 (Figure 5) 476genes의 발현량이 증가하였음을 확인하였다. 또한 defense - stress responses 관여하는 β -1,3-glucanase, PBZ, PR-10, 1,3-beta-glucosidase precursor, metabolism에 관여하는 Sucrose-UDP Glucosyltransferase, L-allo-threosine aldolase, hormonal response 관여하는 OsGAI, 그리고 putative protein, hypothetical protein는 2배 이상의 증가를 보였다(Table 3).

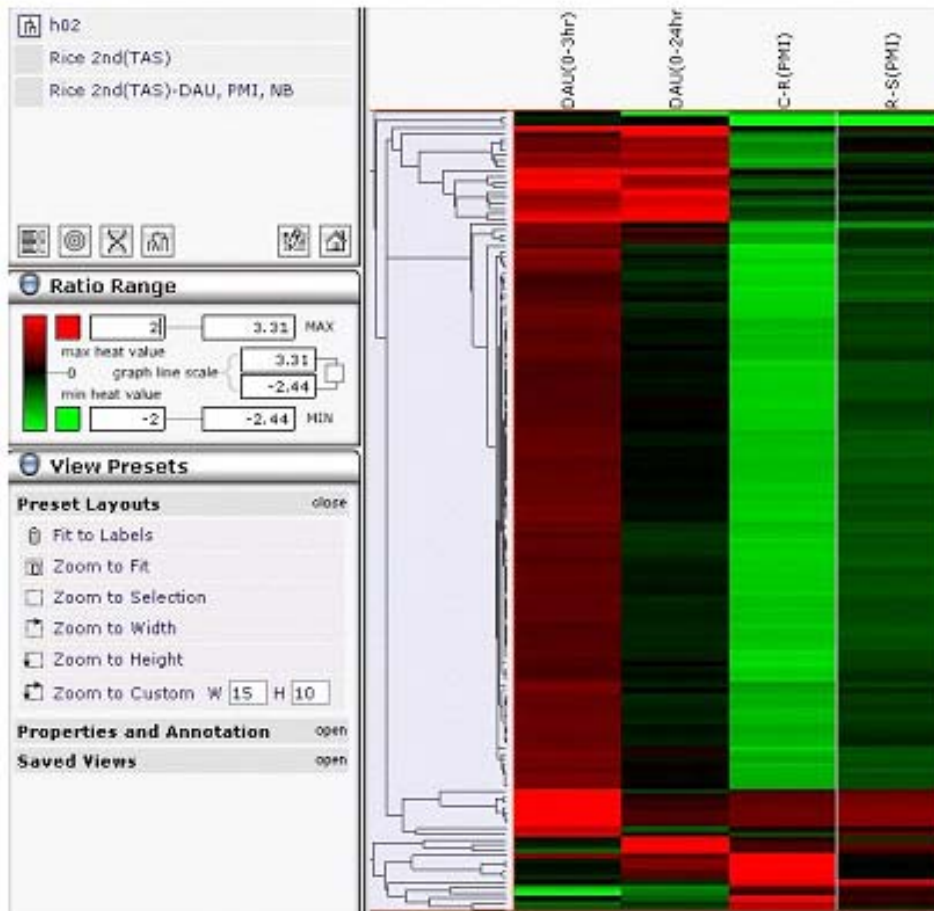


Table 3. Fungal elicitor를 처리한 Callus mRNA에서의 2배이상 증가된 유전자

Clone No.	Sequence Homology	Array Ratio	Database match		Score (blast x)
			Accession No.	Source	
Ca16	Transcription factor-like protein	1.8	T49069	A. thaliana.	64
Ca22	Sucrose-UDP Glucosyltransferase	2.5	P30298	O. sativa	391
Ca34	L-allo-threonine aldolase	2.0	AAF63783	A. thaliana	163
Ca79	beta-1,3-glucanase	2.0	T50563	O.sativa	193
Ca174	PBZ	5.5	T02973	O.sativa	208
Ca181	proteophosphoglycan	2.1	T46707	L. major	51
Ca363	putative protein	2.5	BAB23829	Mus musculus	39
Ca459	OsGAI	2.1	BAA90749	O.sativa	215
Ca538	Hypothetical protein	2.4	NM_113457	A. thaliana	47
Ca572	beta-1,3-glucanase precursor	3.3	U72255	O.sativa	49
Ca618	Putative Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	3.3	AAM08614	O.sativa	156

이렇게 확인된 유전자들을 확보하여 Callus Suspension Cell에 fungal elicitor를 처리하여 RNA level 에서의 발현 양상을 확인하였다 (Fig. 6). 그 결과 대부분의 유전자들의 발현양상은 Microarray의 결과 와 일치하는 것을 확인 하였으며 대부분의 유전자들이 Control에서는 그의 발현 되지 않으나 Fungal elicitor를 처리한 1시간 뒤부터 확연하게 발현 양이 증가함을 확인할 수 있었다.

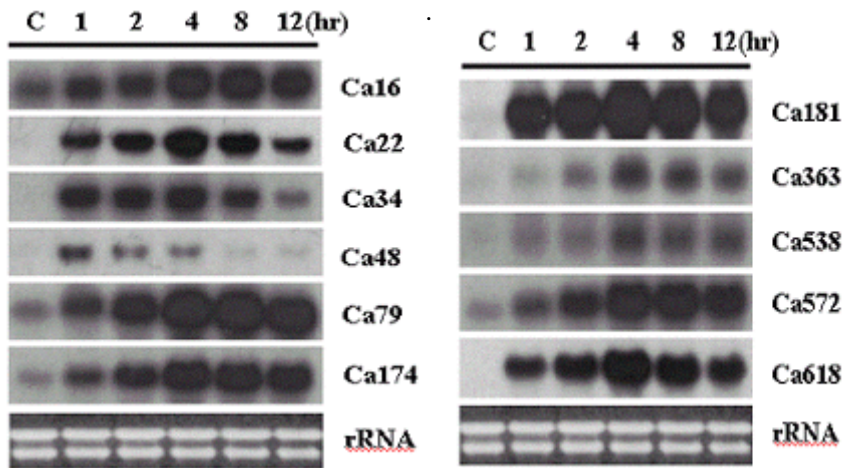


Fig.6 Northern(RNA) blot analysis of total RNA isolated from control and elicitor-treated (1,2,4,8 and 12h) cells with the elicitor-responsive genes isolated by Differential Hybridization and Microarray. Fungal elicitor (50ug of glucose equivalents per ml) was treated to the growth medium and incubation were carried out for the indicated lengths of time. The differential expression patterns of the elicitor-responsive genes observed upon treatment with fungal elicitor were shown. Total RNA (20 ug) was loaded per lane. RNA equal loading was checked by intensity of ribosomal RNA

3. 단백질 2D-PAGE, 저항성 유전자 기능 분석.

도열병에 대한 방어관련 단백질을 찾기 위해서 2-DE 분석을 통해서 실시했다. callus는 sample 처리가 용이하고, 그리고 반응이 일관적으로 일어나는 장점이 있기 때문에 효과적인 동정을 위하여 먼저 벼 callus에 도열병을 처리하여 2-DE 분석을 실시하였다. 그 결과 약 550여 종류의 서로 다른 Mr 과 pI값을 가지 proteins spot을 확인 했다. 그 중 도열병에 특이적으로 증가되는 14개의 단백질을 확인했다.

동정은 n-terminal amino acid sequence를 실시했다. 그러나 blocking 되는 protein이 상당히 많아서 다시 blocking 된 spot들만 따로 typtic digestion에 의한 internal sequence를 실시했다.

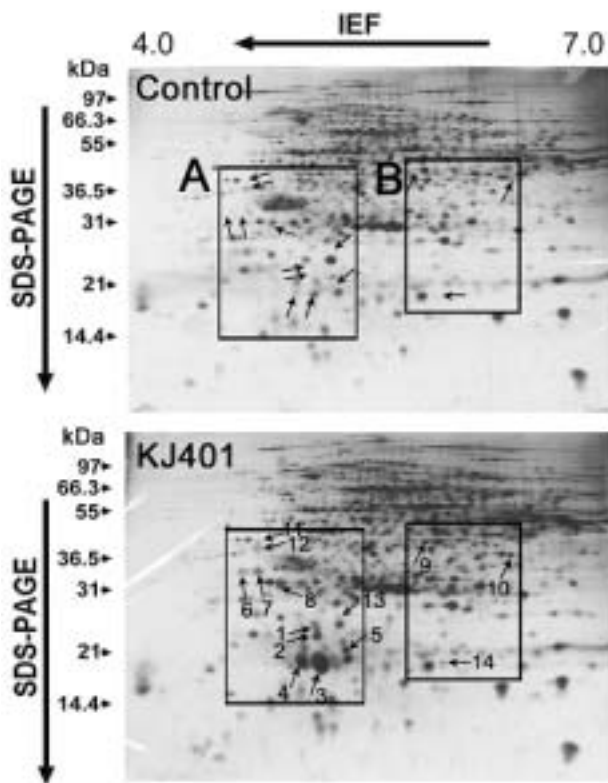


Figure 7. 2-DE analysis of PEG-fractionated proteins induced by rice blast fungus in suspension-cultured rice cells. Protein samples (150 ug) in 15% PEG supernatant fractions were separated on 2-DE gels (pI 4-7), followed by silver staining. Pathogen-induced proteins were located in the framed areas (A and B). A total of 14 proteins were induced by rice blast fungus (KJ401). Arrows indicate proteins induced over control. The pI range of the A frame was from 4.6 to 5.5, and the range of the B frame was from 5.8 to 6.6. The relative molecular masses are indicated on the left side in kDa.

이렇게 해서 sequence 된 peptide을 NCBI, FASTA, EST 등 search program을 통해서 동정을 실시했다. 그 결과는 아래 Table 4에 명시 했다.

Table 4. Identification of differentially induced proteins from suspension-cultured rice cells

treated with rice blast fungus (KJ401), fungal elicitor, and treatment of JA, SA, and/or H₂O₂.

Spot no.	MW/pI	Sequence	Protein (% identity)	Organism	AC
1	23.36.2	N-ARACVSDERAAWVSA	Probeiazole induced gene, PBZ (100%)	Rice	T02973
2	22.96.2	N-ARACVSDERAAWVSA	Probeiazole induced gene, PBZ (100%)	Rice	T02973
3	18.86.22	N-ARACVSDERAAWVSA	Probeiazole induced gene, PBZ (100%)	Rice	T02973
4	19.16.11	N-ARACVSDER	Probeiazole induced gene, PBZ (100%)	Rice	T02973
5 ^a	19.26.3	nd	Probeiazole induced gene, PBZ	-	
6	33.8/4.73	N-TLVKQPIWGGNGGSAQDISV	Salt induced gene, Salt (100%)	Rice	AF001395
7	33.8/4.79	HAFNYIGVDGQ EYA	Salt induced gene, Salt (100%)	Rice	AF001395
8	31.2/4.98	HDDFLADKKGPGQLT	Putative receptor kinase (100%)	Rice	AAL87185
9	44.0/6.91	HVMARAR	Probable β -glucosidase (83%)	Arabidopsis	T02400
10	41.0/6.44	HHPTTALVR,	Isoraffinose reductase, IFR (100%)	Rice	AY071920
		HAGVTLPLPGXLY,	Isoraffinose reductase, IFR (90%)	Rice	AY071920
		HHVXLASAR	Isoraffinose reductase, IFR (100%)	Rice	AY071920
11	36.5/4.79	nd			
12	36/4.79	nd			
13 ^a	25/5.26		Probeiazole induced gene, PBZ		
14	17.0/6.40	HASHMASANPV	Pathogen-related gene, PR-10 (77%)	Sorghum	T14817
		HSLMGIF	Pathogen-related gene, OsPR-10 (95%)	Rice	AF416604

N: N-terminal amino acid sequence. I: Internal amino acid sequence.

a: Proteins identified by Western blot analysis. AC: Accession Number. nd : not detected

차이 나는 14 종류의 단백질이 도열병뿐만 아니라 다양한 stress (fungal elicitor, jasmonic acid, salicylic acid, H₂O₂)에도 어떻게 반응하는 지을 알아보기 위해서 다시 2-DE 분석을 실시했다. 먼저 도열병 균사가 callus와 직접 interaction 하지 못하도록 간접적으로 접종한 것과 도열병 균사체로부터 추출한 fungal elicitor를 처리한 callus로부터 분

석결과 거의 도열병을 직접 처리한 시료와 거의 동일하게 14개의 단백질이 유도되는 것을 확인했다 (Figure 8 and Figure 10). 그 중 특이하게도 PBZ1 proteins이 서로 다른 pI 와 Mr을 가지 4종류가 나오고 2개의 서로 다른 pI 값과 이론적 값보다 2 배 더 높은 Mr을 가지는 salt induced proteins, SaIT를 확인했다.

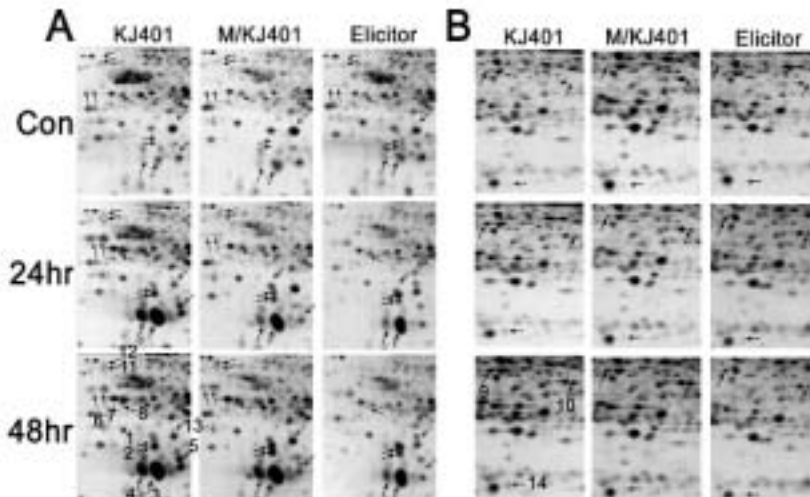


Figure 8. Close-up of the framed areas (A and B) showing the significant differences of protein expression by blast fungus and elicitor. Suspension-cultured rice cells inoculated with *M. grisea* KJ401 or fungal elicitor (50 ug/mL) were harvested at 24 h or 48 h after treatment, and the supernatant proteins (150 ug) were separated on 2-DE gels (pI 4-7) and stained with silver for data analysis. KJ401 and M/KJ401 indicate protein patterns expressed during co-culture of cv. Jinheung suspension-cultured cells and incompatible race KJ401 with either direct contact or indirect contact through a membrane (pore size, 0.25 um), respectively.. The arrowheads in both the A and B frames indicate proteins induced over control (Con.). The number of each protein spot (1-14) corresponds to its listing in Table 1. Data analysis was performed using Adobe Photoshop software. Arrows indicate IEF direction (right to left) and SDS-PAGE direction (top to bottom).

이 두 유전자는 post translational modification (PMT)이 일어나는 것으로 생각되면 구체적인 PMT 에 대한 증거는 본 실험에서는 밝히지는 못했지만 앞으로의 연구에서 PMT와 저

항성간에 서로 연관성을 평가되어 야 할 것으로 생각된다.

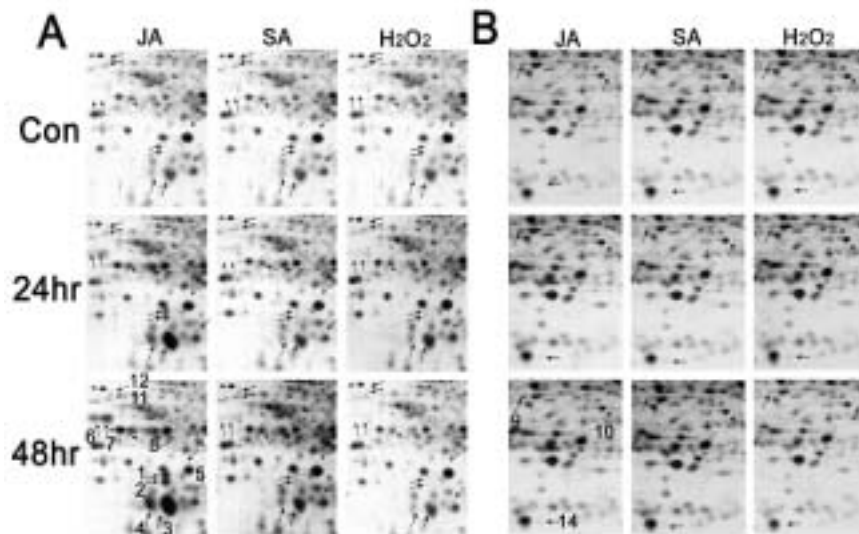


Figure 9. Close-up of the framed areas (A and B) showing the significant differences of protein expression by JA, SA, and H₂O₂. Suspension-cultured rice cells treated with JA, SA, or H₂O₂ were harvested at 24 h or 48 h after treatment, and the patterns of proteins fractionated by PEG were analyzed by 2-DE. JA, SA, and H₂O₂ indicate the protein patterns after various chemical treatments (250 μ M of JA, 5 mM of SA, or 5 mM of H₂O₂). The arrowheads in both the A and B frames indicate proteins induced over control (Con.). The number of each protein spot (1-14) corresponds to its listing in Table 1. Data analysis was performed using Adobe Photoshop software.

또한 식물의 signal molecules (jasmonic acid; JA, salysilic acid; SA, H₂O₂)에 대해서도 분석을 실시했다. 특히 JA는 단자잎 식물에서 가장 중요한 signal molecules로 잘 알려져 있으며 도열병에 의해서 유도 되어진 14개의 proteins의 발현에 이들 단백질이 어떻게 반응하는지 알아보았다. 그 결과 SA 나 H₂O₂ 와 같은 signal molecules 물질에 대해서는 반응하지 않았지만 JA처리된 시료에서는 도열병과 fungal elicitor와 유사하게 발현되는 것으로 확인했다 (Figure 9 and Figure 10). 그 결과 벼 도열병에 의해서 발현된 단백질은 intercellular level에서 JA에 의해서 유전자의 발현이 매개 된다고 할 수 있겠다.

이런 data을 재확인하고자 full length cDNA clone을 cDNA library로부터 screening 해

서 각각 유전자 PBZ1, SalT, isoflavone reductase, OsPR-10, OsRLK 등 유전자를 cloning 하여 Northern 분석을 실시한 결과 앞의 2-DE data와 동일하게 발현되는 것을 확인했다 (data not shown). 이런 결과는 2-DE data과 정확 하다고 할 수 있다. 또한 western blot 에서도 반응을 알아보려고 먼저 각 유전자에 대해서 antibody를 생산했다. antibody를 만들기 위해서 각 유전자의 recombinant protein을 pQE30 발현 vector에 실어 단백질을 얻어 토끼에서 antibody를 생산 했다.

먼저 2-DE data로부터 얻는 결과가 정확한지 알아보려고 PBZ1, OsPR-10, SalT, OsIRL의 antibody로 2-DE western blot 분석을 실시했다. 그 결과 4개의 protein이 정확하게 일치됨을 확인했다. 특히 PBZ1은 서로 다른 peptide가 6종류가 나왔다. 그 각각의 peptide들이 서로 다르게 stress 에 조절된다는 것에 중요성이 있다 (Figure 11). 특히 spot 13은 fungal elicitor에 특이적으로 생성되며, spot 4는 JA에 더 많이 생성되는 것을 확인했다 (Figure 10). 따라서 이런 결과는 PMT에 의해서 서로 다르게 조절 되는 것으로 더 깊게 연구해볼 가치가 있다고 생각한다. 또한 본 연구에서 처음으로 밝힌 OsPR-10과 OsIRL은 그 학문적 의미가 더 깊다고 할 수 있겠다. 앞으로 우리는 이들 유전자의 기능 분석에 더욱 연구할 계획이다.

이들 단백질들의 signal molecules에 대한 반응과 병원균에 대한 반응을 1-DE 상에서 또 확인해 본 결과 정확히 발현의 경향이 2-DE의 것과 동일함을 재확인했다 (Figure 12). 특히 OsPR-10은 pathogen dependent 한 경향을 알 수 있었다. 즉 JA, SA, H₂O₂에는 전혀 반응하지 않았다. 그리고 나머지 3 단백질은 JA에는 발현 되지만 SA 나 H₂O₂에는 반응하지 않았다. 이상으로 우리의 data정확하게 일치함을 2-DE , Western, Northern 모두 일치함을 보여 주었다.현재 이들 유전자들을 더 분석을 하기위해서 protein level에서 biochemical analysis와 in vivo에서의 functional study를 위해서 transgenic plant를 구축하고 있다.

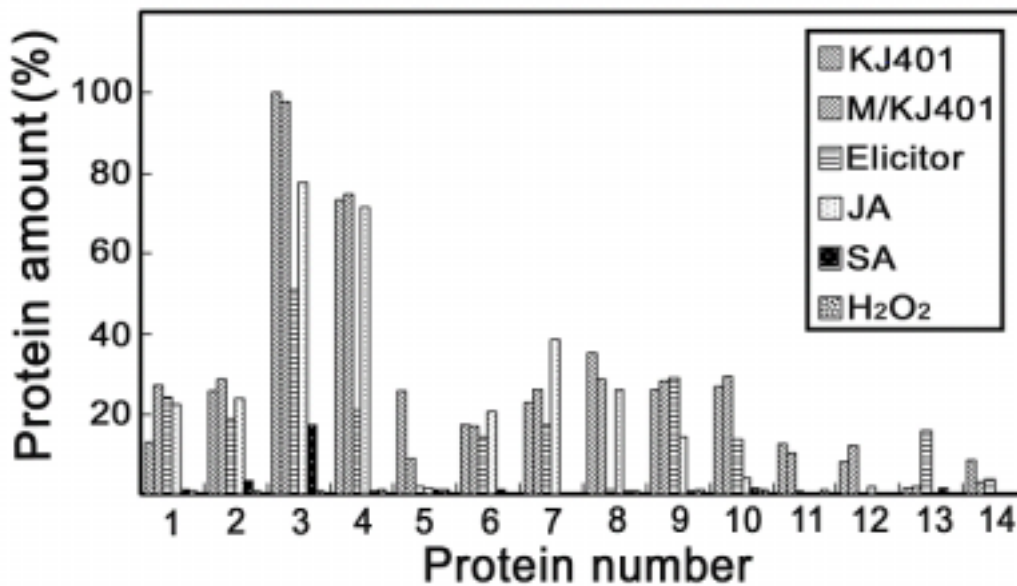


Figure 10. The expression levels of spots 1 through 14 to those of controls. The histograms of differentially induced proteins. The intensities of 14 induced protein spots were measured by a densitometer (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) and compared to those of controls. The relative induction levels were shown in the histograms. The spot 3 induced by KJ401 was referred as the highest 100% among proteins induced.

또한 이들 4개의 유전자가 callus가 아닌 whole plant에서도 어떻게 반응하는 지를 알아보기 위해서 벼 whole plant에 incompatible race, KJ401 과 compatible race, KJ101을 inoculation 해서 12, 24, 36, 48, 60, 72 hr interval 로 sample을 harvest 하여 단백질을 분리 하여 SDS-PAGE로 분리해서 Western blot analysis 로 분석한 결과 PBZ1, SalT, OsPR-10 은 저항성 반응에서 더 빨리 또는 더 많이 발현되는 것을 확인했다 (Figure 13). 지금까지 보고된 바로는 일반적으로 pathogen-related protein 은 저항성 반응에서 더 빨리 또는 더 많이 생성된다고 보고 되어 있다. 그 결과를 토대로 해볼 때 우리가 확보한 이 단백질들은 저항성 반응의 좋은 marker로서 훌륭하다고 할 수 있겠다. 그런데 OsIRL은 whole plant에서는 전혀 response 하지 않았다. 이것은 이 유전자는 callus에 만 특이적으로 축적되는 것으로 생각 된다. 하지만 그 기능에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다. 특히 OS-IRL은 isoflavone like reductase을 encoding 하는 유전자로 아직 벼에서는 그 기

능이 정혀 알려져 있지 않다. 이 유전자는 legume plant의 isoflavone phytoalexin 의 생합성에 아주 중요한 key role을 하는 유전자로 알려져 있지만 rice 에도 이와 같이 그 역할이 동일할지는 더 연구해볼 가치가 있다고 생각된다.

SalT는 salt induced protein을 encoding 하는 단백질인데 이 단백질은 원래 벼 뿌리에서 salt 에 반응해서 induction 되는 것으로 알려져 있으며 최근에는 lectin 과 결합하는 성질이 있다고 보고 되었다. 구래서 이런 lectin binding 성질 때문에 이론적인 Mr 값보다 더

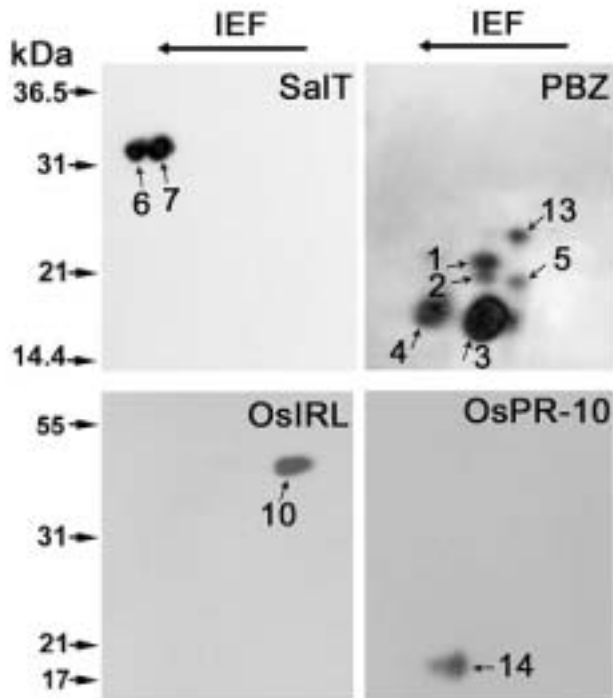


Figure 11. Western blot analysis of 2-DE gels corresponding to the position of the PBZ1, OsPR-10, SalT, and OsIRL proteins. Western blot analysis was performed with the supernatant fraction after PEG fractionation from suspension-cultured rice cells to confirm the protein spots differentially expressed on the 2-DE gels. Protein samples (150 ug) were harvested 48 h after fugal elicitor treatment and separated by 2-DE. The gels were blotted onto a PVDF membrane. The membranes were incubated with each purified antibody (dilution, 1:1000) for 2 h. A goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase was used as a secondary antibody, and each signal was detected using ECL.

높게 (30kDa) 나오는 것이 아닌가 생각된다. 이 단백질 또한 lectin이 결합함으로써 병원균에 대해서 어떤 역할을 할지는 알려진 바가 없지만 일반적으로 lectin은 병원균을 aggregation 시킨다고 보고된 바가 있다. 이를 근거로 볼 때 만약 SaIT에 lectin이 결합함으로써 lectin에 의한 antifungal activity가 있지 않을까 생각된다. 그러나 정확한 결과는 더 평가되어야 할 것으로 생각된다.

PBZ1 과 OsPR-10은 pathogen-related PR-10 family 의 단백질로써 서로 간에는 28% 유사성이 있어 서로 다른 cell 내에서 기능을 할 것으로 생각된다. 지금까지 많은 종류의 PR-10 family 들이 보고 되었다. 그리고 일부 식물에서 예로 RNase activity 가 있는 것으로 보고했으며, 이들 단백질은 주로 defense 뿐만이 아니라 식물의 발달에도 상당히 많이 관여 하는 것으로 알려지고 있다. 하지만 구체적으로 그 정확한 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. 특히 rice에서는 이들 유전자들이 RNase activity 가 있다는 보고는 없다.

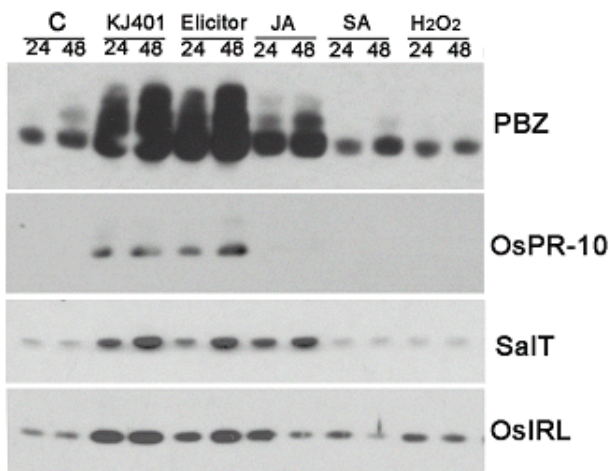


Figure 12. Western blot analysis and expression levels of PBZ1, OsPR-10, SaIT, and OsIRL in suspension-cultured rice cells. Western blot analysis of differentially induced proteins at 24 and 48 h after treatment with KJ401, elicitor, and signal molecules such as JA, SA, and H₂O₂ was carried out. C indicates untreated sample. Each protein sample (20 ug) was loaded onto a 12.5% SDS-PAGE gel, electrophoresed, and blotted onto a PVDF membrane. The membranes were incubated with each purified antibody (dilution, 1:1000) for 2 h. A goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase

was used as a secondary antibody, and the signal was detected using ECL.

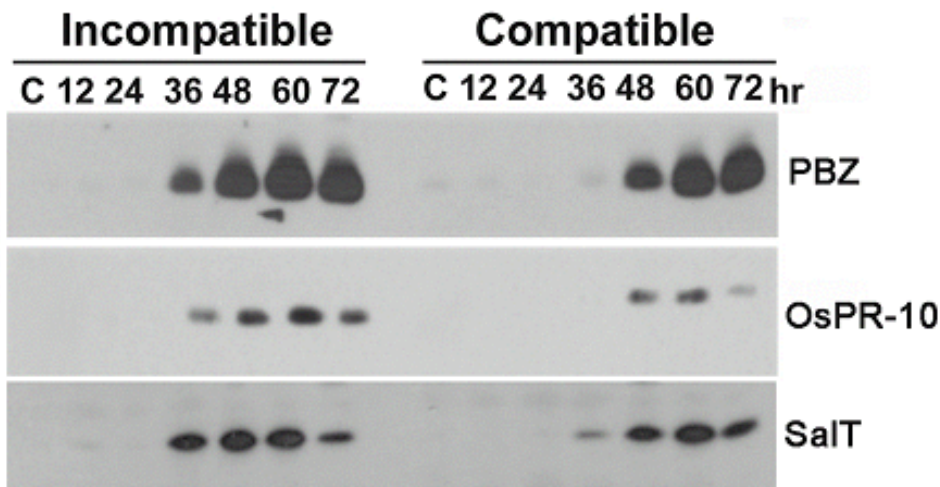


Figure 13. Western blot analysis of PBZ1, OsPR-10, and SalT from rice leaves. Whole Jinheung rice plants were used to monitor the accumulation of PBZ1, SalT, and OsPR-10 in response to infection with *M. grisea* raceKJ401 (incompatible) or race KJ101 (compatible). Fourth- and fifth-leaf stage rice seedlings were infected with fungal spores (1×10^5 conidia/mL), kept in a humidity chamber at 28°C, and harvested at 12, 24, 36, 48, 60, or 72 h after inoculation. C indicates untreated sample. Protein samples (20 ug) were separated and immunodetected.

따라서 2-DE 와 Western 결과와 recombinant protein을 가지고 특히 PBZ1protein의 기능을 규명하는데 주안점을 두고 본 연구를 더 실시했다. recombinant protein는 실제로 PR-10 family 인 PBZ1 단백질이 RNase activity가 있는 지 확인하기위해 사용되었다. 또한 antibody는 immunolocalization을 보기 위해서 specific한 antibody를 얻었다. 그리고 tissue에서 PBZ1의 단백질의 localization을 보았다.

4. PBZ1 protein의 기능 분석

PBZ1의 기능을 알아보기 위해서 우리는 immunolocalization에서 PBZ1의 기능에 대한 idea을 얻을 수 있었다. 대부분의 경우 PBZ1의 발현은 식물의 cell death와 연결되어서 발현된다는 사실을 western blot analysis를 통해서 알 수 있었는데, 그 발현의 pattern이 식

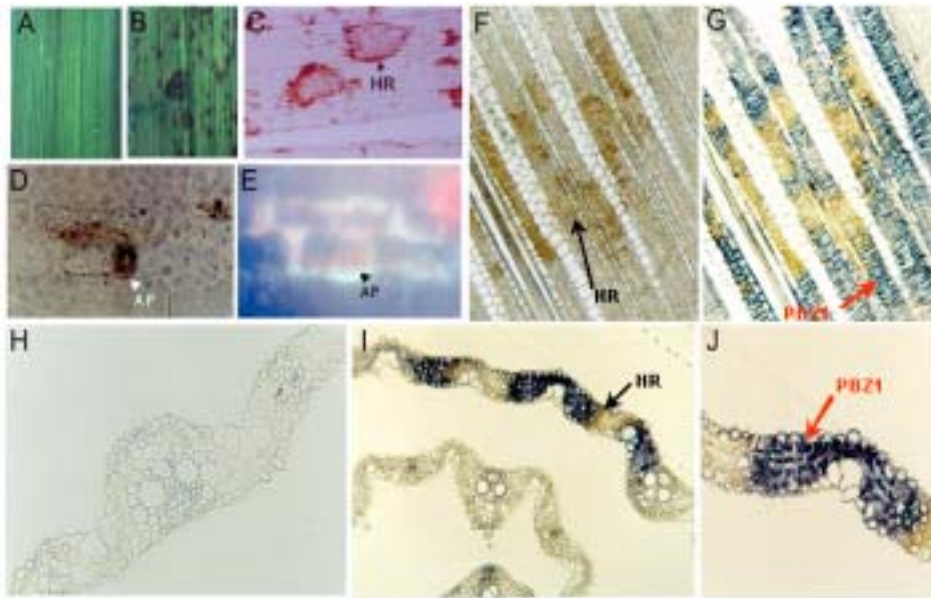


Figure 14. Localization of PBZ1 proteins in leaves inoculated with incompatible race, KJ401.

A, H, Uninoculated leaf tissue at the 4-5 leaf stage. **B, C, F, G, I, and J**, Leaf tissues at 72 h after inoculation with rice blast fungus, KJ401. **F, and G**, Longitudinal section of leaf. **H, I, and J**, Cross section of leaf. **B**, leaf showing hypersensitive response (HR)-like phenotype after inoculation. **C**, staining with acid fusion. Red-colored spots indicates HR. **D, and E**, Light and fluorescent microscopic-graphs of invaded-leaf. AP, appressorium. **E**, Accumulation of autofluorescent and callose deposition in the inoculated leaf. Leaf blade pretreated with 1N KOH was stained with aniline blue. **F, G, I, and J**, Immunohistochemical analysis using antibody against PBZ1 protein. **H**, Tissue treated with free antibodies: negative control. **H**, Brown color indicates invaded leaf, that is, HR. **G, and J**, Red arrow indicate the accumulation of PBZ1 proteins. To data, accumulation of PBZ1 proteins was coordinated with HR-like cell death in rice invaded tissue.

물의 programmed cell death (PCD) 와 상당히 일치된다는 사실을 알 수 있었다. 식물은

발달, 외부로부터의 병원균의 공격에 대응하기 위한 수단으로써 PCD을 일으키는데, 이를 hypersensitive response(HR) 라고 한다. 이 HR은 일반적으로 저항성 반응에서 발생되며 식물의 invaded된 조직의 일부를 괴사시킴으로써 잎 전체로의 병원균의 확산을 막음으로 저항성을 획득하는 하나의 저항성 mechanism으로 잘 알려져 있다.

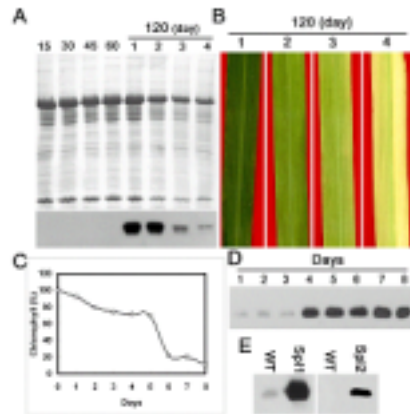


Figure 15. Accumulation of PBZ1 protein during senescence and in lesion mimic mutants (*sp1* and *sp2*). **A, D,** Western blot analysis of PBZ1 protein that induce in abundance during leaf senescence of rice whole plant (A) and detached leaves (D). Proteins were extracted at 15, 30, 45, 60, and 120 day. **B,** 1 refers to fully expanded green leaf (100 % Chl); 2 refers to senescing leaves (70-95 % Chl); 3 refers to senescing leaves (50-70 % Chl); 4 refers to senescing leaves (30-50 % Chl); **C,** Chlorophyll contents during senescence (1, 2, ,3 ,4 ,5 ,6 ,7 ,and 8 day) of detached leaves *in vitro*. **E,**Western blot analysis of PBZ1 protein of lesion mimic mutants, *sp1* and *sp2*.

실제로 PBZ1의 발현 양상이 식물의 cell death와 관련이 있는지를 알아보기의해서, 우리는 HR반응을 잘 일으키는 품종인 진흥에 KJ401 race을 접종 후 3일후 많은 HR반응이 생성된 조직을 section고서 immunolocalization을 통해서 r이 PBZ1의 단백질이 cell death와 association 되는지 확인했다 (Figure 14). 놀랍게도 PBZ1의 발현은 정확히 cell death되

는 조직 주변으로 발현이 현저히 증가되는 사실을 확인할 수 있었다. 그림1의 G와 J에서 잘 나타내주고 있다.

식물의 PCD는 병원균에 대한 방어 수단으로써 HR만이 국한되는 것은 아니다. 지금까지 식물에서의 PCD조직을 열거해보면 다음과 같다. 대표적으로 senescence (leaf, coleoptile)를 들 수 있다. 그리고 root의 aerenchyma cell 형성, Root cap, seed aleurone cell 등을 들 수 있다. 따라서 우리는 이 PBZ1의 발현이 이들 모든 조직에서 PCD 현상과 동일시되게 발현되는지 알아보았다. 먼저 leaf senescence에서 Western blot을 실시했다. 그리고 cell death 되는 lesion mimic mutants (spl1, spl2)에서도 발현되는지 알아보았다. 그 결과 그림 2에서처럼 정확히 PBZ1의 발현이 leaf senescence 와 mutants에서 동시에 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 senescence의 marker로써 가장 많이 쓰는 Chlorophyll 량이 감소함에 따라서 증가되는 현상을 볼 수 있다 (Figure 15 C, D). 또한 자발적인 senescence leaf에서는 PBZ1의 accumulation이 일어나는 현상을 관찰 할 수있었다.

또한 Leaf senescence 뿐만이 아니라 coleoptile에서도 그 양상을 보았다. coleoptile의 senescence는 최근에 annals botany에 보고 되었는데 일반적으로 벼의 coleoptile은 seed germination 동안에 초엽을 보호하는 기구로 postgermination후 이 coleoptile은 shoot에서 초엽이 나오고 난 후 급격하게 cell death을 일으키는데, 그 것을 더 자세히 보기위해서 coleoptile을 anaerobic 상태에서 즉 submerged condition에서 발아를 하면 coleoptile만이 성장한다. 그리고 3일 후 coleoptile을 길이가 3 cm 정도 후 다시 aerobic condition에서incubation을 하면 이 coleoptile은 급격히 senescence가 발생하는데 그때의 sample을 매일 6일간 harvest하여 western blot analysis와 immunilocalization을 실시했다. 정확하게, senescence가 발생하는 조건에서 시간이 지남에 따라서 PBZ1의 발현 량이 증가 됨을 알 수 있었다 (Figure 16 A). 또한 전보에서 PCD가 발생하는 coleoptile조직은 주로 vascular 조직과 aerenchyma cell에서 주로 발생된다고 보고 되었는데, 놀랍게도 PBZ1의 accumulation위치가 coleoptile의 aerenchyma cell에서 축적되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 PBZ1의

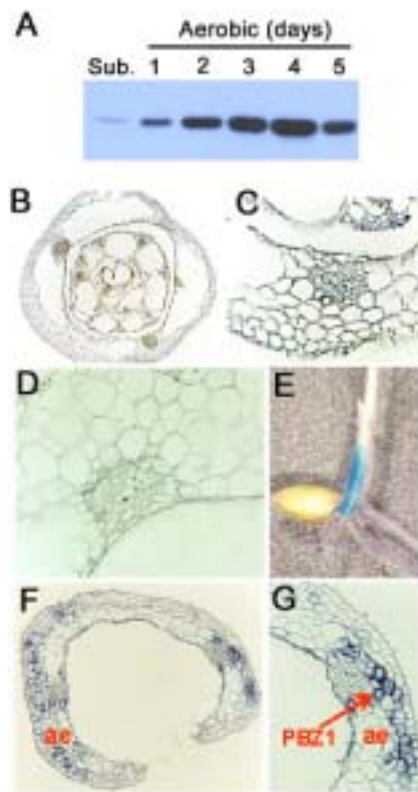


Figure 16. Accumulation and immunolocalization of PBZ1 protein in coleoptiles obtained from seedling grown under aerobic or submerged conditions

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.

발현은 PCD와 직접적인 관련이 있을 것으로 생각된다.

또한 Root에서도 aerenchyma cell에서 축적이 일어나는 현상을 관찰 할 수 있었다 (Figure 17 D, E). 일반적으로 Root의 aerenchyma cell의 formation은 anaerobic condition에서 발생되는데 rice root는 원래 anaerobic condition에서 자라는 작물인데 만약 aerobic condition에서 발아를 하면 즉 담수 조건이 아닌 상태에서 발아한 뿌리는 aerenchyma formation이 생성되지 않는다 (Figure 17 A).

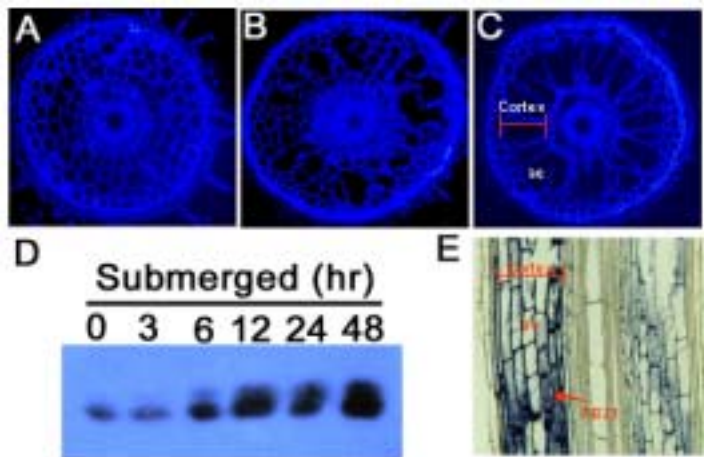


Figure 17. accumulation and immunolocalization of PBZ1 protein in root during aerenchyma formation obtained from seedling grown under aerobic or submerged conditions.

A, B, C, Induction of PBZ1 protein in root aerenchyma cell obtained from seedlings that had been transferred from aerobic conditions (5 day) to submergence (48 h). **A,** Root sections grown under aerobic. **B,** Root sections grown for 24 hr under submerged conditions. **C,** Root sections grown for 48 hr under submerged conditions. **D.** Western blot analysis of induced PBZ1 protein. Proteins were extracted at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 hr after submergence. For western blot analysis, total proteins (10 ug/ml) were electrophoresed by SDS-PAGE, and transferred onto a PVDF membrane. **E,** Immunolocalization of root submerged for 48 hr. Each root cross-section was treated with purified specific anti-PBZ1 for immunohistochemical analysis and detected by NBT/BCIP. Most of PBZ1 was accumulated in aerenchyma cell in the root cortex (arrow).

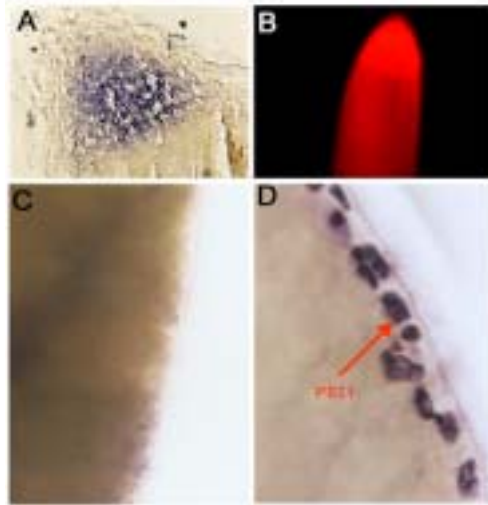


Figure 18. Immunolocalization of PBZ1 protein in root cap(A) and seed aleurone cell (D).

B, Cell death in root cap was stained with Propidium iodide (5 ug/ml) to stain dead cells. C, and D, For immunohistochemical analysis, the germinating seed was used and cross-sectioned with hand-blade. C, Tissue treated with free antibodies: negative control. Red arrow indicate the accumulation of PBZ1 proteins. Accumulation of PBZ1 proteins was coordinated with root cap and seed aleurone cell.

비답수 조건에서 발아된 rice root을 답수조건으로 배양시키면 급격한 aerenchyma cell 이 발생하는데 이때 시료를 취하여 western blot과 immunolocalization을 실시해보면 정확히 aerenchyma cell formation과 PBZ1의 발현의 시기와 일치함을 알 수있었다. 특히 immunolocalization을 root cortex의 aerenchyma cell 에 정확히 발현 되는 사실을 확인 할 수 있었다. (Figure 17 D, E). 또한 root cap 과 seed aleurone cell 에서도 정확히 발현되는 사실을 확인 할 수 있었다 (Figure 18). 따라서 PBZ1의 발현이 식물 PCD event와 동일하게 발현되는 사실에서 PBZ1은 cell death을 일으키는 단백질이라는 결론을 내릴 수 있었다.

PBZ1 이 실제로 cell death 일으키는지 알아보기 위해서 purified PBZ1 단백질을 tobacco leaf에 infiltration을 실시했다. PBZ1 protein 100 ug/ml에서 효과적으로 cell death 을 일으키는 사실을 확인했다 (Figure 19). 그리고 negative control은 PBZ1 antibody을 이

용해서 PBZ1 단백질과 co-infiltration을 했을때 cell death의 정도가 현저히 감소되는 것으로 보아 PBZ1에 의해 cell death가 발생한 것으로 추정된다. 또한 cell death가 rice suspension cell에서도 관찰했는데 마찬가지로 tobacco와 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 20).

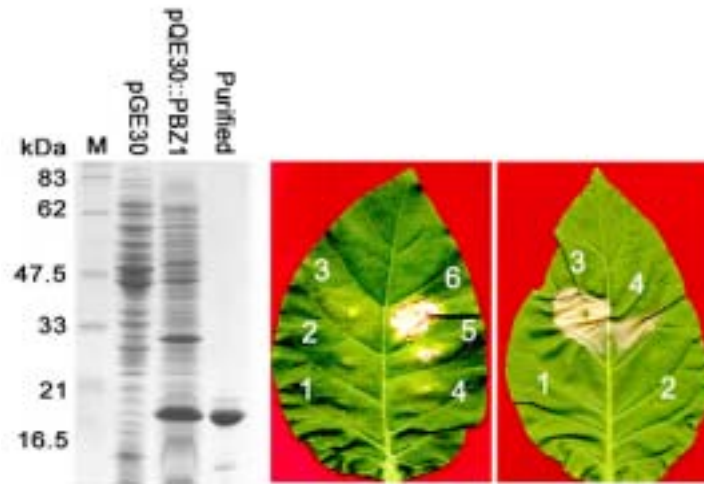


Figure 19. Purified PBZ1 proteins induces a hypersensitive response-like response in tobacco. **A**, The recombinant 6His-tagged PBZ1 proteins were generated in *E. coli* strain (BL21) carrying a pQE30expression vector and purified according to the suppliers instructions (Qiagen, Valencia, CA, USA). Lane 1, molecular size marker; lane 2, crude extract of BL21 carrying a pQE30 expression vector; lane 3, total *E. coli*. proteins containing overexpressed PBZ1 proteins; lane 4, purified PBZ1 protein. The arrow indicates the overexpressed PBZ1 proteins. **B**, Tobacco leaves of five days after infiltration with PBZ1 proteins. Left leaves: 1, 10 mM HEPES buffer pH 7.0; 2, acetylated bovine serum albumin (BSA ; 100 ug/ml); 3, purified PBZ1 protein (10 ug/ml); 4, purified PBZ1 protein (25 ug/ml); 5, purified PBZ1 protein (50 ug/ml); 6, purified PBZ1 protein (100 ug/ml). Right leaves: 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-PBZ1antibody

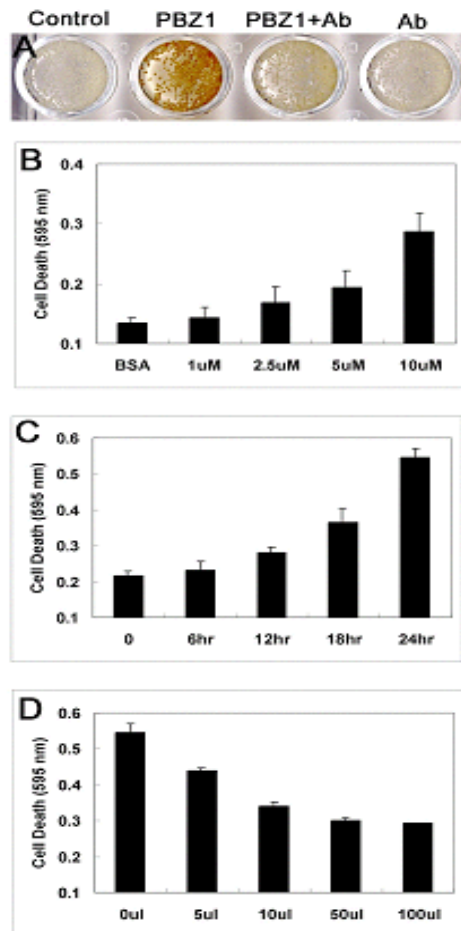


Figure 20. Induction of cell death in cultured rice cells by PBZ1 purified from *E. coli*. Cell death induced by PBZ1 proteins after treatment is shown. Degree of the cell death was estimated by Evans blue staining of individual cells at A595. Each bar represents S.E. of three independent experiments. 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 uM) and time-course (6, 12, 18, 24 hr) dependent cell death assay, respectively. **D**, Cell death blocking assay was used with anti-PBZ1antibody. effect of anti-PBZ1 antibody on cell death induced by purified PBZ1 (100 ug/ ml). Each amount of anti-PBZ1 antibody (0,?,?0, 60, 100 ul) was added into the medium of cultured rice cells together with purified PBZ1 proteins (100 ug/ml).

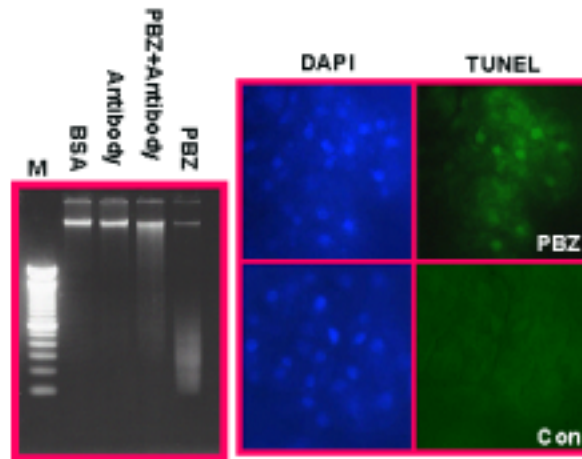


Figure 21. Agarose gel analysis of rice callus DNA fragmentation after 24 hr of treatment (10 μ M of purified PBZ1 protein). **A**, Callus treated with PBZ1 proteins, negative control (BSA or antibody of PBZ1), and PBZ1 + antibody Lane M: the DNA marker of 1.5 kb DNA ladder. **B**, TUNEL detection of 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.

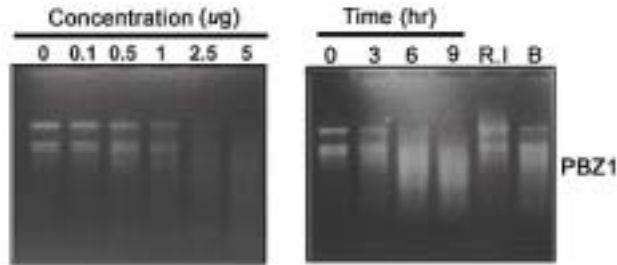


Figure 22. Ribonuclease activity of the purified PBZ1 proteins. The assay was tested against rice leaf total RNA (5 ug). RNase activity of PBZ1 was assayed in agarose gel. In the RNA degradation assay. RNase activity of PBZ1 was assayed in agarose gel. R.I indicates RNase inhibitor (50 unit) B indicates boiled PBZ1 proteins (100°C for 10 min) for negative control.

PBZ1이 처리된 cell은 뚜렷한 HR반응을 보였으며, 또한 Evans blue 염색에서 정량적으로 분석한 결과 dosage 또는 time dependent 하게 cell death가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 식물의 PCD의 marker로서 DNA fragmentation을 들 수 있다. PBZ1 단백질을 처리한 cell에서 DNA fragmentation을 확인해본결과 PBZ1이 처리된 cell에서 DNA fragmentation이 발생했다. TUNEL 분석에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 21). 그렇다면 PBZ1이 어떻게 해서 cell death을 일으키는지 알아 보기 위해서 PBZ1의 activity을 조사 했다.

조사한 결과 PBZ1은 Figure 9에서처럼 RNase 활성이 있는 것을 확인했다 (Figure 22). 그렇다면 PBZ1의 RNase 와 cell death 와의 서로 상호 관계는 정확하게 규명되지 않았다. 지금까지의 PCD을 일으키는 단백질은 주로 protienase와 DNase 등이었는데, 최근에 RNase도 또한 cell death을 일으키는 인자로 밝혀졌다. 그렇지만 실제로 PBZ1가 RNase의 활성을 가진다고 해서 cell death을 일으킨다고 정확한 증거를 in vivo에서 조사되지 못했다. PBZ1의 cell death는 RNase에 의해서 발생될 것인지는 더 연구되어야 할 것이다.

2절. 생체방어 관련 전사조절인자인 rice NIM1/NPR1 interacting protein 분리 및 기능연구.

1. NIM1 interacting proteins의 분리:

일반적으로 식물은 병원균 감염에 대처하기 위한 다양한 생체 방어 반응을 일으키는데, 이 중 pathogenesis-related (PR)-1 gene과 같은 생체 방어 유전자의 발현을 유도하고 병 저항성을 증가시키는 salicylic acid (SA) 매개 신호 전달 경로에서 NIM1/NPR1은 중요한 구성인자로 작용한다.

벼에서의 이러한 유전자의 발현과 그 역할, 그리고 생체 방어 기작을 이끄는 신호 전달 체계에서 다른 단백질들과의 상호작용에 대해 연구하기 위해, Arabidopsis NIM1을 bait로, Rice cDNA library를 prey로 하여 yeast two-hybrid screen을 수행하였다. 총 7.6×10^6 개의 colony로부터 -Trp, -Leu, -Ade, -His 선택 배지와 β -Galactosidase 활성조사를 통해 35개의 positive clone을 분리하였고, 이를 retransformation으로 재확인하였다. 이렇게 분리된 cDNA 단편들의 염기서열을 분석한 결과, 9개의 clone이 두 개의 class에 속함을 알게 되었다.

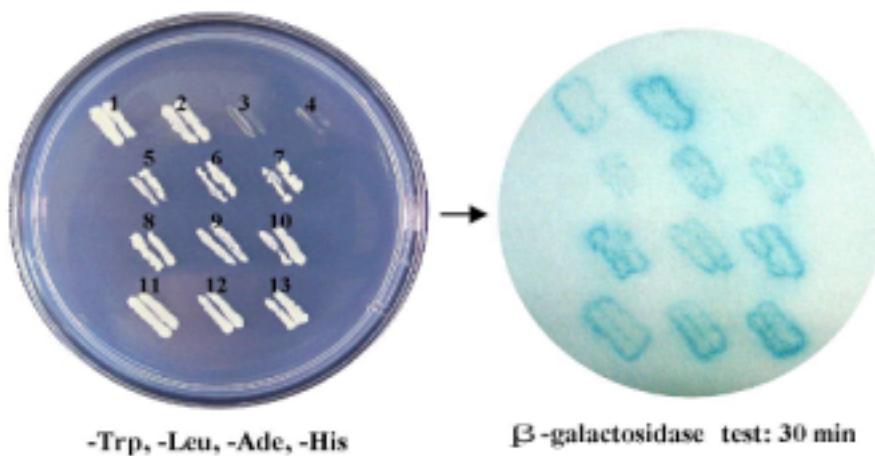


Fig. 1. Isolation of 9 cDNA clones which encode NIM1-interacting proteins.

Nine isolated yeast clones were plated on selective media SD (-Trp, -Leu, -Ade, -His) and tested for β -galactosidase activity. Positive control; 1: pVA::pTD1, 2: BD-HY5ZIP::AD-#7-3, Negative control; 3: BDNIM1, 4: BDNIM1::ADempty, 5 to 13: selected clones

그 중 가장 긴 2개의 clone (OsNIP1 and OsNIP2) 은 각각 300개와 331개의 아미노산을 합성하는 cDNA로써, 아미노 말단에 bZIP domain을 갖는 형태였으며, 아미노산 수준에서 서로 92%의 높은 유사성을 보여 주었다. 이들 OsNIP1과 OsNIP2는 RT-PCR에 의해 모두 full length를 얻을 수 있었다. 또한 rice est data base에서도 full-length clone을 갖는, 즉 5'-말단을 cDNA를 발견할수 있어 full-length 서열 구축에 사용하였다.

G C A C G A G G G C C T T T E T E G A A G C T T E C T E C C C C C A	33
A A C C E E T T E E E E E E E C E	35
E E C E T A G E	153
T A A E C T G G G G G T G A T T E T T T T T E E E E E E E E E E E E E	213
T E C C C G G G G G G G G G A G G G G G G G E A G A G G G G T G A T E A T	273
E G A G A T T T E E E C A A C E G E E A C E G A G A T T G T T E A C T A G G E	333
T C C A A G C T E T T G G G C C E E C A G G G A G A T T G G C E A A C E T G T	393
A A T T E A G E C A T E G A T E A A T E T G G C G G T T E A T A G G G C T G E	453
A A A G G A G A G E A A A G T G A T T E G E T E E C E G T T G A T T G T G G E E	513
A T G G C A G A C T A G T T C A A G G A C T G A C A C A T C G A T T G T G T A G	573
A C A	633
C A C C A G T T A G A A A C G G A C A T A G T G G T G C A G T C A T G C T E C T	693
S Q 1 E M G 2 2 2 0 A V K A 3 M 2 2 D 2 2	753
G A C A G A T C T G A C A A A C T T A T G G A C C A A A A G A C A A T T C G G C G	813
D 2 2 D 2 1 K D 2 2 R T 1 S 2 1 A Q M 2 E	873
G C A G C A A G A A A A A A G T C G G C T A G G A A A A A G C A T A T G T C A A C	933
A A	993
C T G A A G C T G C A C A G C T A G A G C A G A A C T C A G A A A G C T C G T C	1053
1 R [] A Q 1 E Q E [] Q R A 2 2 2 2 I P	1113
T C T A G C T T G G A G C A G A C C C A T G C C A T A G T G A A A T G G G C A T T	1173
2 2 2 G D 2 2 T 2 A K 2 2 G M G A 1 T P D 1	1233
G A A T A C A C T A G A T G G C T C A G G A G C A A A A T A A G C A G A T A A A T A	1293
E Y T 2 M 1 E 2 Q M R Q E M E 1 2 T A V	1353
A A T G C T C A T G C A A G T G A C A G T G A C C T T C G T C T T A T T G T T G A T	1413
M A 2 A 2 E 2 2 D 1 2 1 E V D 2 2 E K A 2	1473
G A C G A G T A T T C A A G G T T A A G G T G T A G C T G C A A G G C C G A T G T	1533
D E V P R V R G V A A R A D V P 2 2 I 1 2	1593
G G C A T G T G G A A G A C A C C C G C A G A A G A T G C T T C C T G T G C T T G T	1653
G K M R T 2 2 A E 2 C P 1 M 1 G 2 P 2 2	1713
G A G C T C T A A A G C T C C T A G C A A A T C A C C T C G A A C C T T A A C C	1773
E 1 1 R 1 1 A M 2 1 E 2 1 E 2 2 2 2 2	1833
T T A A A C A C C T C C A G G A A T C T C A G C A G C G G A G A T G C A C T T C A C	1893
1 M M 1 Q E 2 2 Q 2 A E D A 1 2 2 Q G E E	1953
G C A C T G C A G C A A T C T C T G C G A T A C T E E T G C T G A T C T E C G G T	2013
A 1 2 2 2 1 A D T 1 A G 2 1 G 2 2 G 2 2	2073
G G A A T T G G C G A A C A C A T G G G T C A G A T G C A A T G C C A T G G T A A C	2133
G M V A M Y K G Q K A K A K G R 1 G T 1	2193
G A G A A T T C C T T E C C A G C G G A C A A C C T C G A C A G C A G A C A T T G C	2253
E M P 1 C Q A D M 1 2 Q Q T 1 2 2 Q K Q 2	2313
A T T C T G A C G A T C C G G C A A G C C T C G C T G C T C T T C C A T A C A C G A T	2373
I 1 E I 2 2 2 2 A 1 1 A I 2 D Y P 2 2	2433
T T C G T G C E T T G A G T E C C T E G G C T A G C C A C G G A A G T A A C A A A T	2493
1 2 A 1 2 2 1 M 1 A 2 2 E 2	2553
T G C T G T G A C C A G G T T A G A C G C T A T T G A T G A C T G C A G A T A A T G G	2613
A C A A T T G T G T T G G C A G C T A A A G T T A A A A A C T A G T A C C T A A A G	2673
G C A A A T A G G T A A G C T C T A A G T A A G T T A A C A T A A A A A A A A A A A	2733

Fig. 2a. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the OsNIP1 cDNA.

Full length OsNIP1 clones was isolated by RT-PCR. The N-terminal basic DNA binding domain are indicated by shadowed box, and leucine zipper region are indicated by open boxes. The longest partial OsNIP1 clone isolated from yeast two-hybrid screen is indicated by the bold letter.

```

CCAACGCTGACAGCTAATTTGATCTGTTGGGGCCCTTAGCTAGAAAAG 46
CTGCCGACTCTGCCATCTCACTGATCATAGGGCATTGGAAGCTGGCCCTGCATCCCTCTTA 106
CAAGTAAAGGACAAACAAGCAATTTGTCTCTCTTTATTTGGAGCTGGGAAGAACCCGGC 166
ATGGCAGATGCTAGTTTGGAGACTGACACATCAACAGTCTTGGATACCGACGATAAGAAAT 226
M A D A S S R T D T S T V L D T D D K N (20)
CAGATGGTAGACGGGCAAAAGTGGAGCTATTCTGCCCTTAATTCATCTGATCGGTCTGAC 286
Q H V D C Q S C A I V P S N S S D R S D (40)
AGRTCTGMCARGCCCMFGGACCARAAGGCTTACGCCGGCTTCTCRRARTCTGAGGCT 346
R S D K P M D Q K V L R R L R A Q N R F A (60)
GCRRARRAAGTCCGCTGARRARRAAGGCTATATGTACRACRATTCRGGAGCRGTARAGCTG 406
R E K S R L R K K A Y V O Q [ ] E S S K L (80)
RARCTTGCARAGCTTGGACCAGCGATCRRTRARAGCTCGCCRACRAGCRATTTACRITTCG 466
K [ ] A S L K O E [ ] N K A R O Q G I Y I S (100)
AGCTCAGGAGCCRAMCTATGCTATGCTGGAATGGAGCTATGACTTTTGRITTAGAA 526
S S G D Q T H A H S G N G A M T F D L E (120)
TRTCCCTTGGTTCGAGGANCACRACRACRATTCRAGCTCAGGACTGCRGTARRTGTCT 586
Y A R W L E E E Q P A D N E L R T A V N A (140)
CRTCARCTGACRACRACCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 646
H A S D S D F E R L I V D G I M A H Y D E (160)
ATRTTCAGGCTGRRGGGTGTTGCCGARRGGCTGATGTGTTTCTATRTACTTTCRGGCTG 706
I F R L K G V A A K A D V F H I L S G H (180)
TGGARRACACTCTCTGARRGGTCTCTCTCTGCGCTTGGGGCTTTCTGCTTCTCTGAGCTT 766
W K T P A E R C F E L W L G G F R S S E L (200)
CTRRAGCTTCTTCTGARRAGCTCTGAGCCATTACTGRCRACRACCTTCTGCGACTATCG 826
L K L L V N O L E P L T E O Q L L G L S (220)
ARCTCCRACRACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 886
N L Q Q S S Q Q A E D A L S Q G H E A L (240)
CARACTCTTGGCAGATAGCTTGGCCGGGTCCTTGGTCCATCAGGRTCTTCRGGGAC 946
Q Q S L A D T L A G S L G P S G S S G N (260)
GTGCRARCTACRACRACCTGARRTGGCTRTGGCCATCGCCARACTTGGGACCTTGCARAT 1006
V A N Y M G Q M A M A M G K L G T L H N (280)
TTCTCCGTCRGGCTGACRATTTGCCGCRACRACCTTACTCTCARRTGCACCGARTTCFG 1066
F L R O A D N L R O O T L H O M O R I L (300)
ACRATCCGACRAGCTGCCGGTCTCTACTTGCARACTRGTACTTCTCAGCTTTCGCT 1126
T I R O A R A L L A I H D Y F S R L R (320)
GCCCTGAGTTCTCTCTGCTTGGCCACGGGAGTACRACRACRRTGGGTGCRTCC 1186
R L S S L W L A R P R E * (332)
GTTARACTTCTGARRTACTTGGGAGGACGGCCGGCCGGCTGRTTCCGGRTGCAT 1246
TTGCRAGRATTCCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1306
RTCTCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1366
TTRTGRTTGGCRATGTCARATTTGATTCRATARRATARRAGGTGATARRAGCTTGG 1426
ARRARTACCACGCTCTTARRARRARRARRARRARRARRARRARRARRARRARRARRARRARR 1470

```

Fig. 2b. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the OsNIP2 cDNA.

The N-terminal basic DNA binding domain are indicated by shadowed box, and leucine zipper region are indicated by box.

분리된 두 개의 유전자에 의해 합성되는 단백질의 아미노산 서열을 6개의 Arabidopsis TGA factor 와 비교한 결과는 Fig 3 과 같다. 이들은 모두 DNA 결합에 알려져있는 basic leucine zipper (bZIP) domain을 아미노 말단에 갖고 있었다.

```

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

OsNIP1 (Fu11)
OsNIP2
HEP-1b
bZIP TF
OBFS. 2
TGA2
TGA5
TGA6
TGA1
TGA4
TGA3
-----ME

```

Fig. 3. OsNIP1, 2 의 아미노산 서열 비교 분석

두 개의 OsNIP 단백질과 6개의 Arabidopsis TGA factor의 아미노산 서열을 비교한 그림. 아미노 말단에 DNA 결합에 관련된 bZIP domain을 갖고 있음
 아미노산 서열을 GenBank Search 한 결과 이들은 bZIP transcription factor인 OBF/TGA family와 유사성을 보이는 것으로 나타났고 그 중에서도 이미 Arabidopsis NIM1과 결합하는 것으로 보고된 Arabidopsis TGA2, 5, 6, 즉 groupII의 TGA family와 더 높은 유사성을 보임을 알수 있었다 (Fig.3).

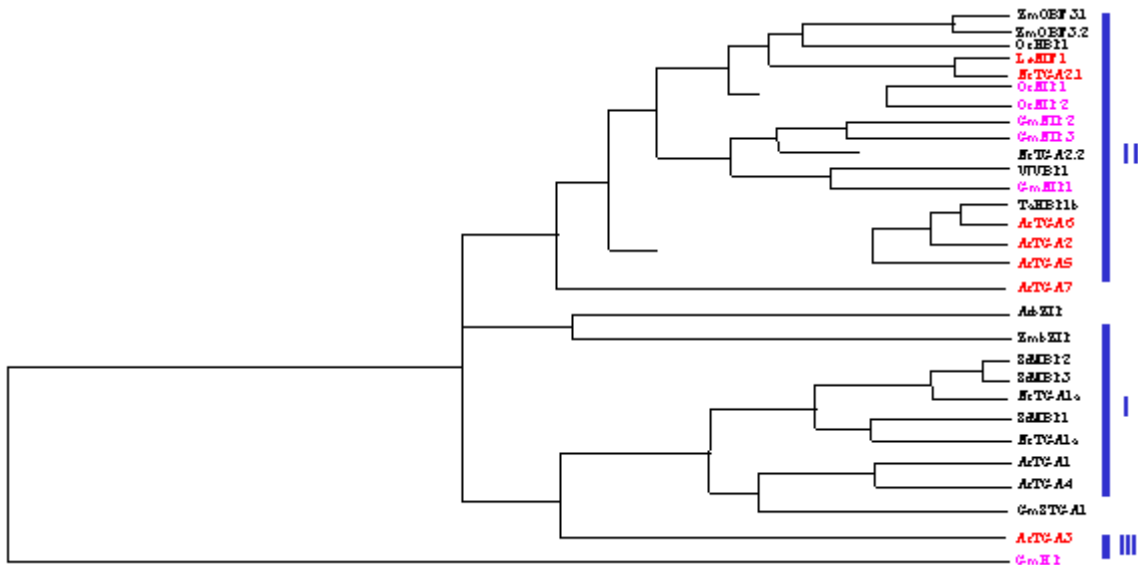


Fig.4. 수도의 NIM1 interacting protein (OsNIP1 and OsNIP2)과 기타 다른 식물의 관련 TGA관련 transcription factor 와의 관계모식도.

2. 분리된 OsNIP1 의 단백질 부위와 NIM1과의 결합관계 기능 분석-결합부위 분석

수도에서 분리된 OsNIP 단백질이 NIM1 과 결합할 때 관여하는부위를 알기위해 아미노 말단부터 절단된 OsNIP들과 NIM1과의 결합을 b-Gal assay로 분석하여 보았다. 다행히도 분리 초기에 9개 clone 모두가 각기 다른 아미노 말단을 가지고 있었다. 이들을 pGAD424 vector, 즉 prey vector에 삽입하고 yeast 에 BD-NIM1 과 같이 동시에 형질전환하여 보았다. 그 결과 아미노 말단 즉 DNA binding 에 관여하는 bZIP domain 중

basic DNA binding domain 이 제거 될수록 NIM1 에 더 잘 결합함을 알 수 있었다. 따라서 NIM1 결합부위는 C-말단의 아미노산이 관여함을 알 수 있었다.

이로서 아미노 말단 부위는 NIM1과의 결합에 방해를 주는 것을 알 수 있었다.

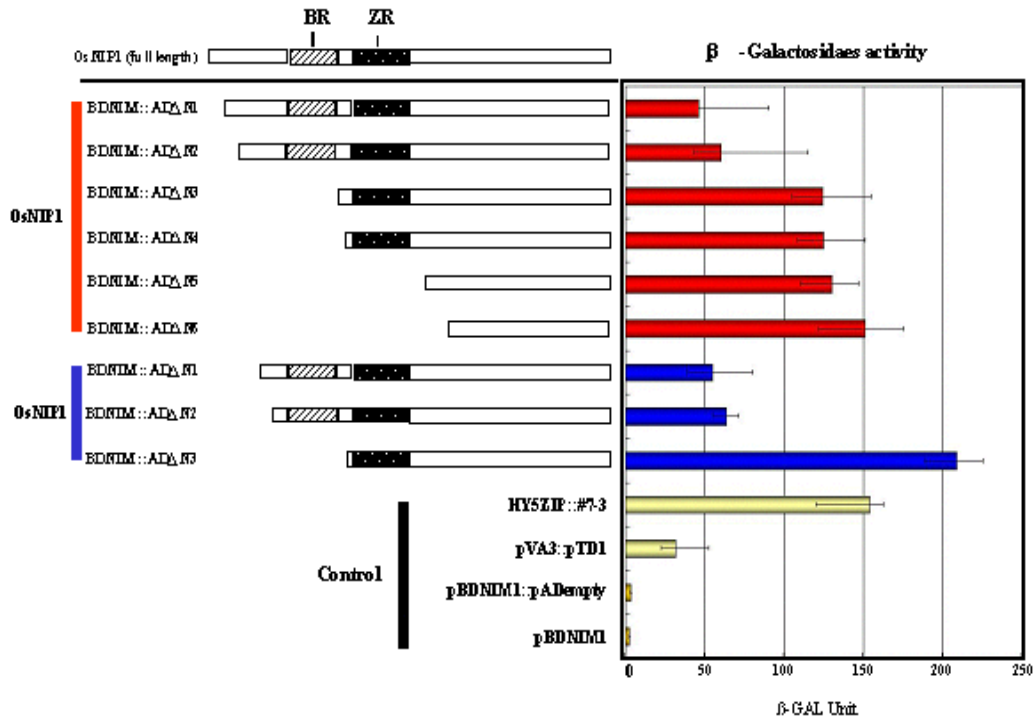


Fig. 5. The effect of N-terminal domain of OsNIP1 on binding to NIM1.

Left panel illustrates a schematic diagram of the vector construct showing full length and deleted forms of OsNIPs. The basic region domain (BR) and leucine zipper (ZR) domain of OsNIPs are indicated. The level of protein-protein interaction between OsNIPs and NIM1 was determined by measuring the β -galactosidase activity (Unit) of yeasts transformed with two different vectors (prey and bait). Their respective β -galactosidase activities was shown in the right panel as β -Gal Unit. The standard deviations are represented by the error bar. Positive control was performed with pVA3::pTD1, BD-HY5ZIP::AD-#7-3, while Negative control vector combination is BDNIM1, BDNIM1::Aempty. presence of leucine zipper domain did not affect the interaction of OsNIP to NIM1.

3. 분리된 OsNIP1 유전자의 발현분석:

NIM1 결합단백질인 OsNIP 유전자가 수도의 계놈상에 얼마나 존재하는지를 알기 위해 Southern blot analysis를 시행 했다. 본 결과로 볼 때 OsNIP유전자는 small gene family

로 존재한다는 것을 알 수 있었다(Fig.5). 그리고 이 유전자가 어떻게 발현되는가를 알기 위해 Northern blot analysis를 시행하였다. 본 연구에서는 곰팡이 유도체나 도열병, Jasmonic acid 처리 시 OsNIP의 발현이 점차적으로 증가함을 보여줌을 알 수 있었다 (Fig. 5). 이는 OsNIP가 여러 외부적인 환경 스트레스에 중추적으로 작용하는 핵 단백질임을 암시하는 것이다. 단백질 합성 저해제인 cycloheximide를 처리했을 때 그 발현양상이 거의 변화가 없는 것으로 보아 이 OsNIP1 전사조절인자는 생체내에서 signal과 상관없이 항상 일정수준으로 존재하며 다른 인자들과 상호작용에 의해 그 역할을 수행할 것으로 보인다.

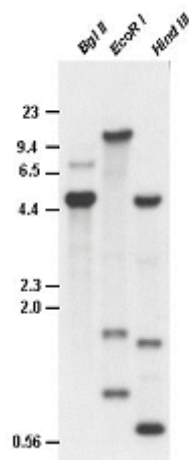


Fig. 6 Southern blot analysis of genomic DNA for OsNIP1

Genomic DNA was isolated from rice. 20 μ g of rice genomic DNA was digested with Bgl II, EcoRI, Hind III and fractionation on a 0.8 % agarose gel electrophoresis. The DNA was transferred an to nylon membrane and hybridized with a radioactivity labeled OsNIP1 cDNA as a probe. Position of the size markers in kb are indicated.

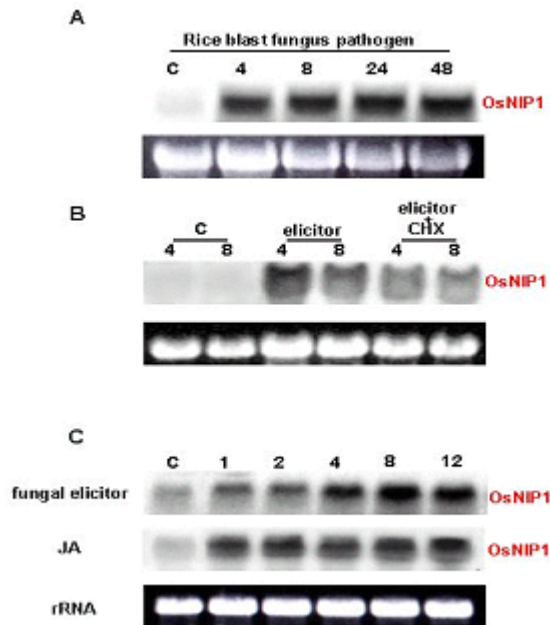


Fig. 7. Northern blot analysis of OsNIP1. Expression pattern of OsNIP1 mRNA after exposure to rice blast fungus pathogen. Total RNA

was prepared from rice leaves treated with rice blast fungus pathogen for 4, 8, 24, 48 hr, respectively. Expression pattern of OsNIP1 mRNA after exposure to CHX (cyclo heximide) or fungal elicitor for 4, 8 hr. Expression of OsNIP1 mRNA treated with fungal elicitor or JA. OsNIP1 gene expression was rapidly induced by JA and fungal elicitor. 20 μ g of the RNA was loaded and hybridized with the cDNA encoding OsNIP1, rRNA, ethidium bromid staining.

4. OsNIP1의 생체방어상 기능 연구.

NIM1에 결합하는 OsNIP1의 기능을 연구하기 위해 NIM1과 그 interacting protein의 역할을 protein-DNA interaction 측면에서 연구하기 위해, GST가 fusion된 재조합 NIM1, OsNIP1 단백질을 분리하여 EMSA를 수행하였다. 그 결과 NIM1은 OsNIP1과 TGACG motif element인 *as-1* element (SA-mediated PR-1 promoter element)와 *nos-1* element와의 결합 시 결합을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 7).

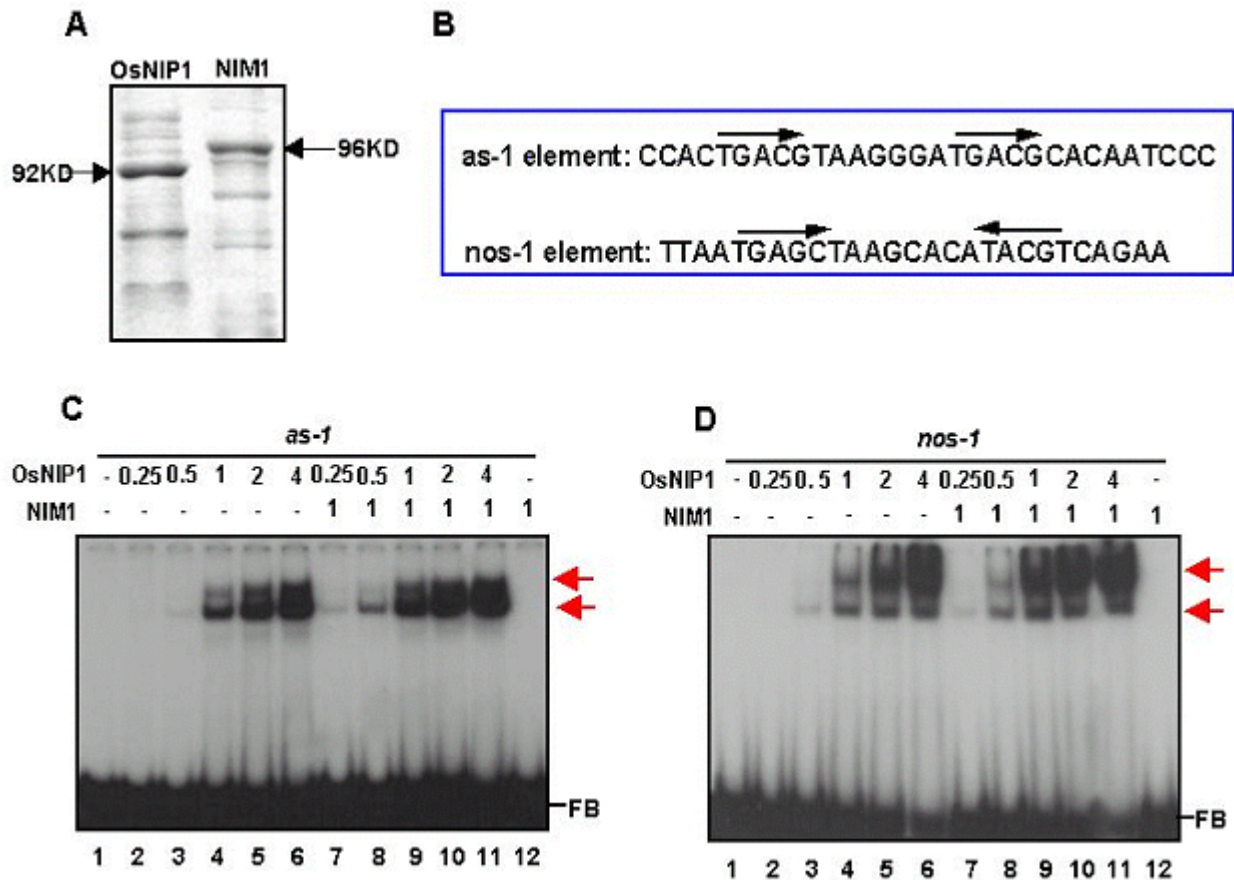


Fig. 8. Binding of OsNIP1 to the TGACG motif element is enhanced by NIM1.

A. SDS-PAGE of the GST-OsNIP1 and NIM1 protein. The position of the GST-OsNIP1 and GST-NIM1 protein is marked by an arrow.

B. Two TGACG-containing sequence (*as-1* and *nos-1*) were used as binding site probe for EMSA.

C, D. Effect of NIM1 on OsNIP binding to TGACG containing motif. Binding of OsNIP1 to the *as-1* and *nos-1* element is enhanced by NIM1. NIM1 was added to the OsNIP1 prior to interaction to *as-1* or *nos-1* element (lane 7 to 12). The arrow indicates the positions of the OsNIP1-complexes. FB indicates position of the free probe.

본 연구에서 볼 때 OsNIP1은 *as-1* 이나 *nos-1* element와 같이 defence 에 의해 발현되는 유전자 promotor에 결합하여 방어 유전자를 발현시키는 DNA 결합단백질이고 NIM1의 역할은 이들 단백질이 방어 신호전달과정을 전달하여 OsNIP1으로 하여금 DNA 결합을 증진시키는 것으로 밝혀졌다. 이것은 NIM1의 기능 중 일부일 수도 있으나 본 연구에서 볼 때 promotor의 인식 강도를 높이어 발현을 유도하는 한가지 예를 본 연구에서 밝힐 수

있었다.

여러 생체 방어 관련 유전자로서 도열병을 포함한 기타 다른 식물 병에 의해 발현 유도되는 유전자는 의 5'-end에는 여러 가지 생체방어 관련 promoter element를 갖고 있다. NIM1/NPR1 및 TGA 관련 family가 관련된 cis-element로서는 OCS, NOS, CaMV 35Spromoter as-1등과 같은 TGACG-element가 있다. 이들을 인식해서 방어 유전자들의 발현 유도에 관계하는 것으로 추정되는 전사조절 인자로서 Arabidopsis TGA family 에 관련된 여러 member 들이 있다. 여기서 본 연구 그룹이 분리한 OsNIP1은 아래 그림과 같이 Group 2 에 해당하는 것들이었다. 그러나 다른 그룹의 bZIP factor 들이 동일 종에 존재하는 것으로 보아 이들과의 발현 조절 상 상호 관계를 분석함이 궁극적으로 전사조절 network를 이해하고 응용하는데 필요함을 알 수 있었다.

대개 식물에서 3 그룹의 TGACG-motif 결합 단백질이 존재한다. 그중 class II 로서 OsNIP1이 포함된다. 이중 class 1 에 속하는 분화발달 관련 OsTGA1은 Arabidopsi 및 담배에서 발견되는 TGA1과 유사 부류에 속한다.

여기서 OsNIP1 과 다른 TGA family 와의 기능상 차이를 알기위해 일차적으로 promotor sequence 와 DNA와의 인식기작 차이를 분석코자하였다. 이를 위해 OsTGA1을 클로닝 하였다. OsTGA1을 클로닝 하기 위해 Rice EST Gene Bank 와 genome bank를 분석 하였고 아래와 같은 유전자를 발견 하였다.

이 유전자를 분리키 위해 5'-end, 3'-end primer 2개를 합성하였고 55C annealing temp로서 total RNA에서 유전자를 분리 하였다. 이 것은 ORF만 클론 한 것으로 이를 발현시키기 위해 2단계로 (PCR-product cloning vector, GST overexpression vector) 클로닝 하였다. pGEX2-T vector 에 삽입하고 DE52(pLysS) host 에 형질전환하여 여러 조건에서 발현을 시도 하였다. OsNIP1의 경우 대장균에서 대량 발현에 어려움이 있었던 것과 마찬가지로 OsTGA1도 발현양이 적었다. 그러나 상대적으로 발현 양에 있어 차기 실험에 양호함을 알 수 있었다.

```
MADASSRTDTSTVLDTDDKNQMVDGQSGAIVPSNSSDRSDRSKD  
PMDQKVLRRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLESSKLLASLEQEINKARQQGIYISS  
GDQTHAMSGNGAMTFDLEYARWLEEQNKQINELRTAVNAHASDSDLRLIVDGIMAHYD  
EIFRLKGVAAKADV FHILSGMWKTPAERCFLWLGGFRSSELLKLLVNQLEPLTEQQLL  
GLSNLQQSSQQAEDALSQGMEALQQSLAGTLAGSLGSPGSSGNVANYMGQMAMAMGKL  
GTLENFLRQADSLRQQTTLHQMQRILTI RQAARALLAIHDYFSRLRALSSLWLARPRE
```

그림2. OsTGA1의 아미노산 서열

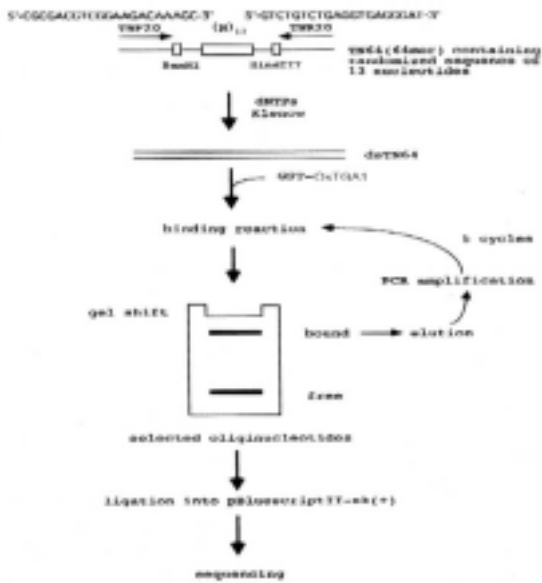
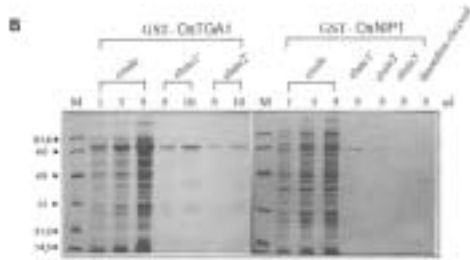
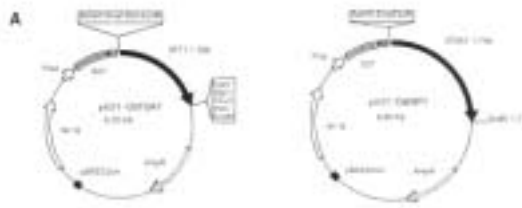


그림3. OsTGA1 과 OsNIP1의 promoter 인식 기작 비교를 위한 발현 벡터구축 및 대장균내 대량생산

그리고 promoter 인식 염기서열을 알기위해 이 단백질을 3 ug 씩 사용하여 합성된 random oligomer 와 tube 내에서 반응시켜 특이적 결합을 유도하였다. 이때 random oligomer는 중간에 20 base를 dNTP (G,A,T,C) 가 무작위적으로 끼여 들어가도록 하고 양쪽 말단에 24-mer의 특이적 염기서열 그리고 각가 6bp의 제한 효소 sequence를 삽입하였다. 양쪽 말단의 24-mer는 서로 다른 염기 서열로 되어 있어서 PCR로 증폭할 때 template sequence로 사용케 된다. 따라서 Gel

retardation으로 DNA-protein complex를 전기영동으로 분리하고 여기에 결합된 random oligonucleotide를 함유하는 gel 조각을 잘라내어 이로부터 소량의 DNA를 용출해 내었다. 이로부터 PCR 로 산물을 증폭하고 재차 gel-retardation을 하여 결합된 DNA를 분리한다. 총 5 cycle을 한 후 증폭하여 제한효소로 자른다음 이를 plasmid vector 에 삽입하여 형질전환하고 무작위적으로 clone을 채취하여 DNA sequencing 하고 있는 중이다. 여기서 각각의 염기서열을 분석하고 promoter sequence를 분류하여 high affinity binding site를 알아낸 후 이로서 defence에 강력히 유도되는 promoter element를 분리할 예정이다.

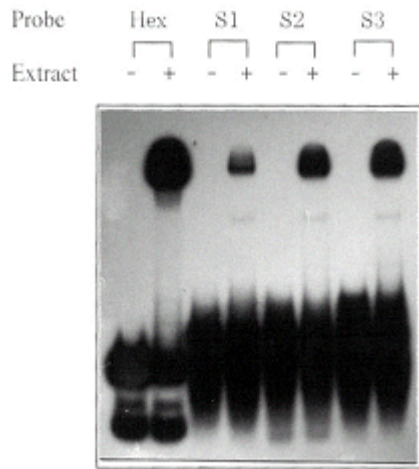


그림4. Random binding site selection으로 high affinity promotor element를 찾기 위한 방법. 우측은 실제 실험 수를 거침에 따라 high affinity oligonucleotide 가 capture 되는 전기영동사진

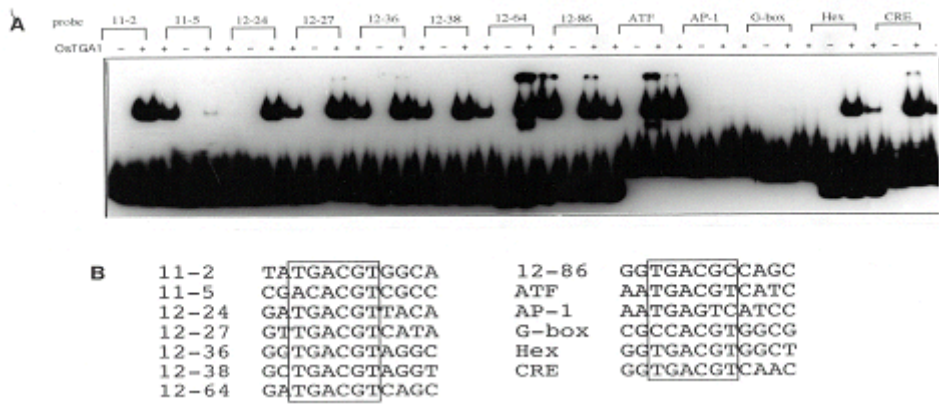


그림5. OsTGA1을 발현 시켜 몇 개의 cis-element와 결합력 상대비교 실험

2. OsNIP1발현용 Ti-vector 구축 및 형질 전환식물체 개발

생체방어 관련 유전자를 발현시키는데 직접적으로 관련되어 있는 OsNIP1의 mRNA 가 도열병 및 관련 방어 신호에 의해 발현됨이 Northern으로 관찰되었다. 이는 도열병을 포함한 병저항성 작물 개발에 OsNIP1 이 사용될 수 있다는 가능성을 내포하고 있는 것이다. 따라서 본 2차년도 과제에서 OsNIP1을 미리 발현시켜 병 저항성 형질 전환벼를 개발하고자 하였다. 이를 위해 35S-promoter에 OsNIP1 coding region을 삽입하여 vector를 구축하고 Ti-plamid에 삽입, Agrobacterium을 통한 벼의 형질 전환을 하였다. 또한 PR1 promotor 의해 OsNIP1이 발현되도록하여 병 접종시 조기에 유전자가 발현되고, 필요시 대량발현을 가능케 하는 전략을 사용 중이다. 이 전략은 평상시에 식물 생장에 저해를 주지 않으면서 방어기전이 매우 강력한 형질 전환체를 개발하는데 처음으로 시도해보는 전략으로 예상된다. inducible promotor나 constitutive promotor를 사용하여 형질 전환 시켜 *in vivo*에서 PR-Gus reporter 발현으로 분석키 위한 시스템구축 assay 조건을 확립 중임.

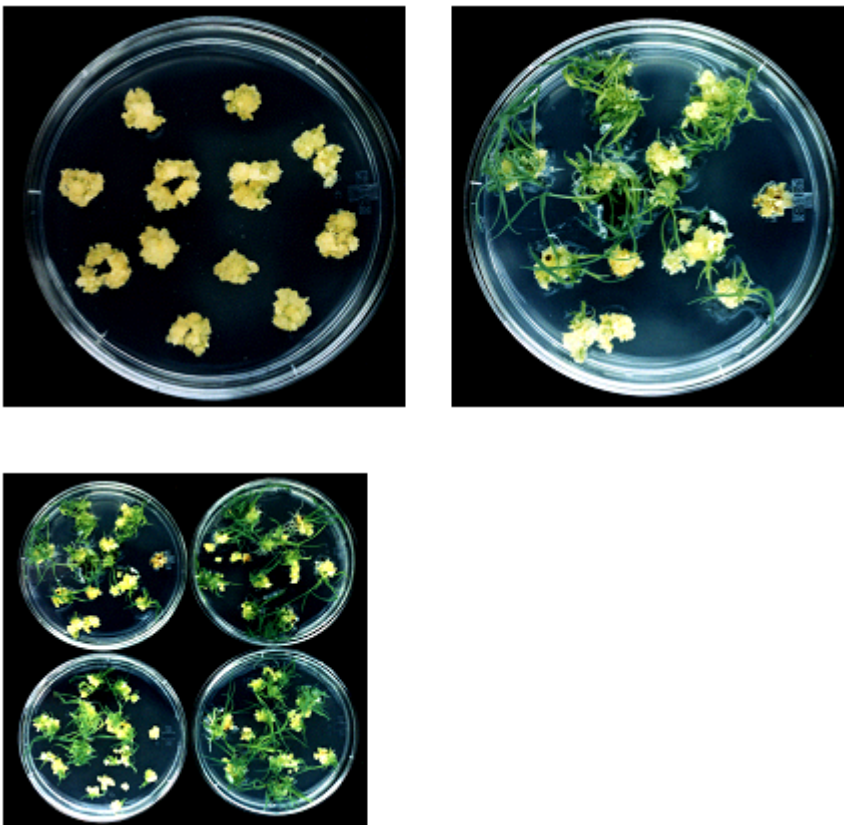


그림6. OsNIP1을 Ti-plasmid 삽입하고 Agrobacterium을 통해 형질전환후

재분화과정.

현재 T0 상태의 OsNIP1 overexpressor이 만들어져 있다. Hygromycin 저항성을 보이는 벼 종자를 선발 중이며 OsNIP 형질 전환체에서 T-1 세대 T-2 세대까지 가야 정확한 기능 분석을 할 수 있다. 향후 1년 이후에 기능 분석이 가능하다. 향후 microarray에 의한 유전자 발현분석을 통해 형질 전환체 기능 분석이 가능하다. 현재 2K cDNA chip으로서는 유도되는 유전자가 제한됨으로 향후 oligonucleotide 이나 whole genome chip을 사용한다면 전체의 유전자 발현 분석을 용이하게 분석 할 수 있으며, 또한 현재의 기술 축적을 바탕으로 효율적으로 형질전환체를 검증 할 수 있다.

3 절 식물생체 방어 관련 유전자의 형질전환에 적합한 promotor의 개발 및 형질 전환체 개발.

1. constitutive expression cassette vector 구축과 이를 통한 OsSNF1 발현 형질전환체 개발

원하는 유전자가 ectopic 그리고 constitutive expression되는 형질전환체를 만들기 위하여 T-DNA vector를 구축하여 wounding에 반응하는 유전자인 OsSNF1 cDNA를 삽입하여 형질전환체를 생산하였다.

그림 1은 OsSNF T-DNA vector map을 나타낸 것이다.

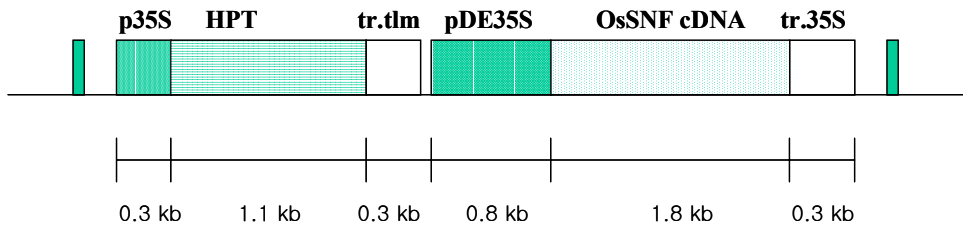


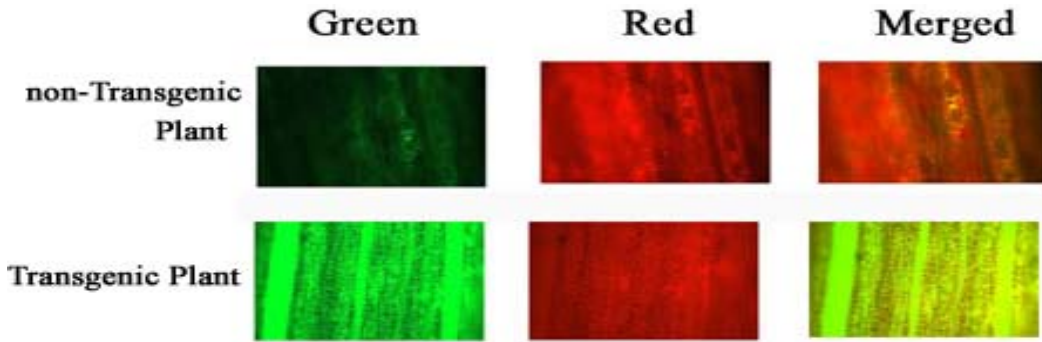
Fig. 1. OsSNF1 T-DNA vector for constitutive expression

도관조직 (vascular system)과 wounding에 반응하는 OsSNF1를 ectopic/over-expression 시키기 위해 OsSNF1cDNA를 double enhanced 35S promoter에 발현시켜 형질전환체를 만들었다.

2. OsSNF1의 promoter를 이용하여 GFP/GUS가 wounding과 도관에 특이적으로

발현하는 형질전환체 생산

병원체 침입에 따른 wounding에 반응하여 발현되거나 통도조직에 발현되어 목도열병과 같이 도관 조직에 침해하는 병원체에 반응하기 위하여 OsSNF1의 promoter를 GUS/GFP 표식인자에 fusion 시켜 형질전환체를 생산하였다. 그림 2 아래는 형질전환체에 사용한 vector의 도식을 나타낸 것이다. 그림 2의 위는 형질전환체에서 도관에만 발현되는 GFP를 green light에서 관찰하였고 도관에서의 발현을 화살표로 표시하였다.



따라서 OsSNF1의 promoter는 통도조직에 발현하여 도관에 침입하여 병증을 일으키는 목도열병에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

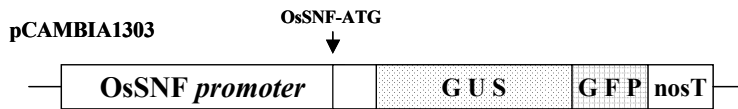


Fig. 2 OsSNF promoter와 fusion된 T-DNA vector (상단) 와 형질전환 식물체에서의 발현 (하단)

3. OsSNF1의 wounding과의 상호관계를 위한 Northern analysis

OsSNF1는 Arabidopsis에서 Calcineurin B-like calcium sensor proteins (AtCBLs)와 결합하는 serine-threonine protein kinase group에 속하는 것으로 사료된다. 이들 일부 kinase 들은 외부환경에 반응하는 신호전달체계에 관여하는 것으로 밝혀졌다. OsSNF1은 통도조직에 특이적으로 발현될 뿐만아니라 wounding에 대해 up-regulation되는 것으로 밝혀졌다. 아래 그림 3은 cutting에 의해 OsSNF1의 발현이 유도되어 상처 부위에 발현되는 GUS를 나타냈으며 wounding후에 induction 되는 OsSNF1의 mRNA를 Northern blot을 통하여 관찰하였다.

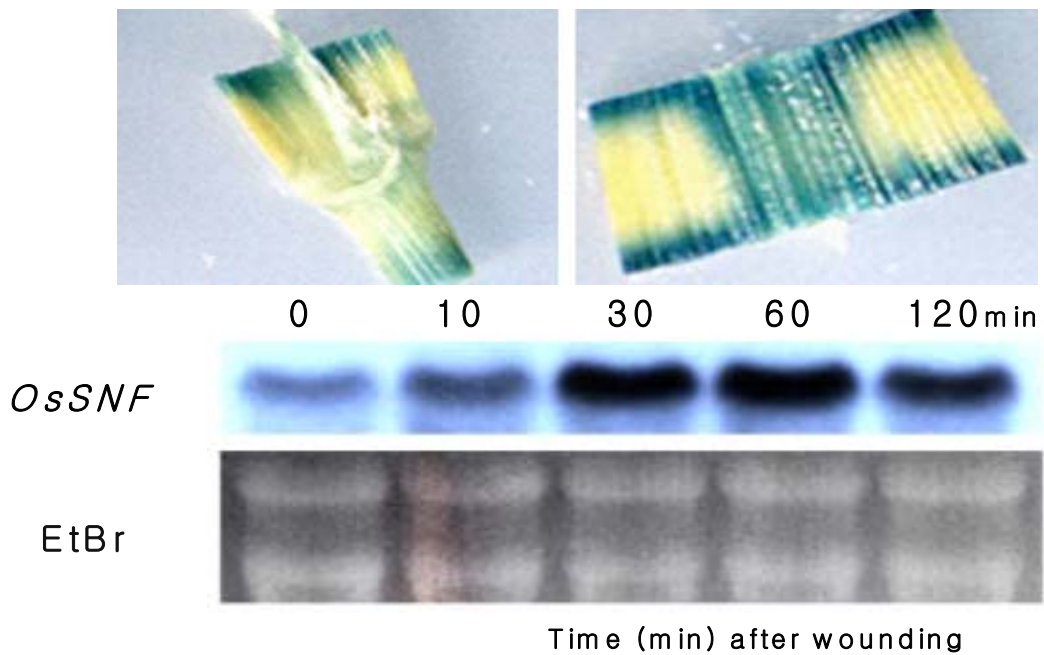
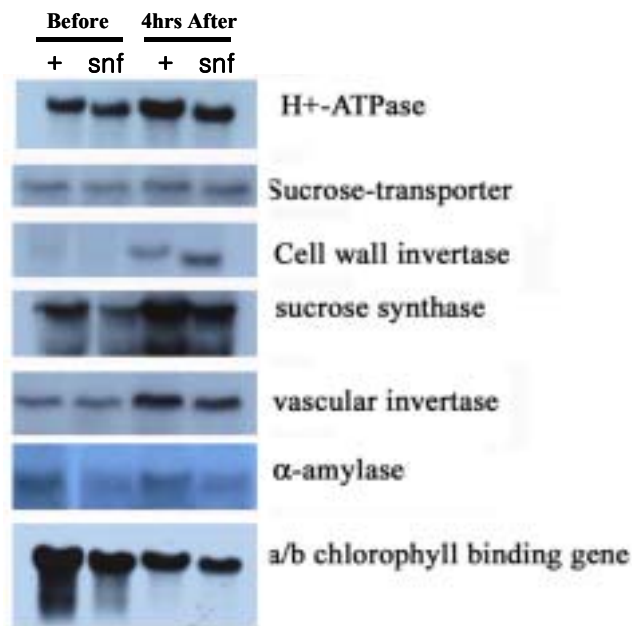


Fig. 3. cutting에 의해 *OsSNF1*의 발현이 유도되어 상처 부위에서의 GUS 발현 (상단) 과 wounding후에 induction 되는 *OsSNF1*의 mRNA를 나타낸 Northern hybridization.

Wounding의 signal이 통도조직을 통하여 이동하는 것으로 최근에 발표가 있었고 carbohydrate의 상태와 wounding 과의 상호의존관계가 알려져 있다. 통도조직에 발현되는 *OsSNF1* 이 통도조직을 통해 이동되는 wounding signal에 관련되는 지를 알기 위해서 wounding signal transduction의 marker genes을 이용하여 조사하고 있다 (data not shown). 그림 3은 wounding stress에 따라 carbohydrate의 대사와 전이에 관련된 유전자의 형질발현에 *OsSNF1* 가 관여하는 지를 알기 위해 실시한 Northern blot이다. 그림 4에서 처럼 wounding 에 따라 발현이 유도되는 것은 cell wall invertase이며 *OsSNF1* 변이체에서는 크기가 다른 cell wall invertase가 발현되는 것을 볼 수 있다.

Fig 4. 정상적인 (+) 식물과 OsSNF1 변이식물체에서 wounding 에 따라 달리 반응하는 여러 유전자의 mRNA 발현정도를 측정 한 Northern hybridization.

OsSNF1의 wounding에 대한 효과를 분석하기 위하여 정상적인 식물체 (+) 와 OsSNF1 knock-out (snf) 를 wounding 주기전 (before)와 wounding 준후 4시간에 조직을 채취하여 Northern blot 실시하였다



4. 병저항성 유전자 R genes의 'knock-out' 선발

1,000개 이상의 전이인자 insertion sites의 염기서열 분석을 통하여 tagging된 유전자 중에 NB-ARC homology를 가지는 계통을 선발하여 도열병에 대한 이병성과 저항성 정도를 검증하고 본 제1과제./제2과제에서 개발한 유전자들의 반응을 knock-out 식물체를 통하여 조사하여 이들 유전자와 R 유전자와의 상호관계를 추측할 수 있는 자료로 사용하고자 선발/계통 유지를 하고 있다.

1) P113

유전자 구조: 약 3.3 kb coding region으로 2개의 exon 과 1 개의 intron 으로 예상된다.

Ds insertion site: intron에 삽입됨

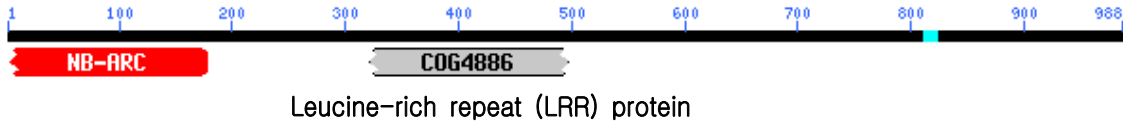
Protein coding region: FGENESH gene prediction에 의한 putative 930 amino acid 서열이 예상되며 R 유전자의 전형적인 NB-ARC domain 과 LRRs 을 가지고 있다

```

YFALIDNIFNESDLELIKGFPPNNNRGSRILFTAGDERIAGWCLSNYNGIVHKMKPLSHS
DSEKLLHIKAFGSMDDCPPENLKLDCDEILMKCRGIPSIITGMADWLKQHQQHGGSSAIP
RVEEVRLLLKQFEHWLSFDYSDELRSLLYLSMLPQGYVFEKDRLVMKWLDEGLLSEL
HFSEMVDRNIITPAARNCGHNLDDEDDLCLWQVNPFLRFLAYRAAEKGYVITSATL TSA
PRGGGNNTRIARRLALHHPDTQLPEMLQEMDSLHTRSLISGAVNRTTVPLDKFGYLV
SLDLQGWENLKDEDLLQICKMLMLSYSVSN TKVSKLPPQIKELRTLNALDISHTHISEI
PSEVCEPGSLRMLDLRGTQIKHMPEQIVRLKMLKHF LIDLSEFSERSVKYLGDLHDLKIL
AVTWAFHCNDKAYQQALLSSLGKWRQLKSLTIHCGLGCSMEFLRSLSDPPKFLDEFK
VTAGKFANVPPWIKGLEHLTFLQITVCKQVAGDVKILAGLVKLQRLILGLEFIPEEAIVIE
SKGFKELEKFSLDCPVPRLTFEEEEAMPKLTYLRLNLHTSPMSEMSVPSGIGNLKMLSEV
ALCYNVRYMNSPNIKRKVEAVSKEVAKHRNPIDLFIRGMQIEVNQAGEEEAEGATRFN
QVNSPEDVVQAAD EAAAPRRETEFQSEIEDEALRSRWLWQQRTSPDKPWQGLNIPVSQK
    
```

ERNLLSISFVCSVGD EKLVRFWEDCW LQGSSIRSLAPAVYAAV PARFRNRRTVAEALQ
 DRRWIRDICAA LGIQAILEY LKLWDILQSIQLGEEPDTISWRWESSGSYSARSAYRLLFA
 GRTSVEHKPIWKSLAPPRCRYFLWLVALNRCWTADRLRSRGLSHPARCPLCDQCDETI
 DHLLVACSESRQLWWIALSAIGHSECLPLNEHSRRGFDTITTLVAWTIWKERNNQVFN
 EKSRTWAEIARAMTGEADLWRLARAAIPAMATPMSGGRSPHSLGD

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



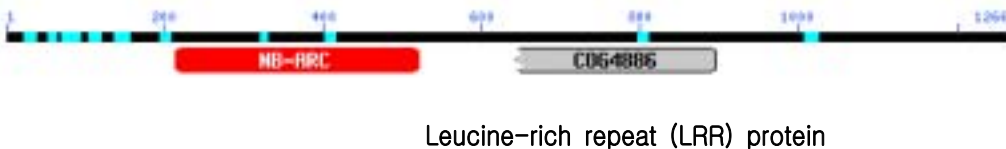
2) P193

유전자 구조: 약 5.7 kb coding region으로 한개의 exon 으로 예상된다.
 Ds insertion site: near the 3' end of the coding region

Protein coding region:

MPSTFGWSASAFVAAV LARLIGKGLALLAELDDAAAGHLRRLEALLAPVWRVLDAAAD
 AGAIDVVGHRRLQDLLDAAYAADDALDDL VLLQSDAMARGGEHGV DARGTPAAGA
 ARKPKPRSP LRFLLCFSPPRNAVASSSSSSSGSHGKSSKGNKSNPDLRGLGVAFEMMA
 QAA YRCTSAYEHVVAGKNYATMVSAQAEAATAAEAADYDQFQNDIFGRETEVEQIL
 EKVRFSDDPHYRLGIGVLP IVGVEGVGKTALA QFIFHHEVVKA EFPV RMWVHVSGEVQ
 LKDELVVQMIHG VAGDAHEVEDIREILHEELTGKRFLLV LDDVSDVGD IQWKDLMRL
 LQPAARRSMIMVTTQSEIAANAIGTMPPLILNPLESEDYQKMF RHFAFGSSDESEDYTPL
 GDEWDDVEDEDEEEKQSPMEKVALELAKKMGPPLPATAIARALFFRREDKEHWKNV
 LEDKLWEQRDVAGISPALWLSYQHLDPRLKQCFAYS AVFPCSHAFTKDELVQMWVAQ
 GLIYSEDAVARPEDIGSKFFEDLVERRFFQPIGSSRYV VHNSMRKLAQAVSTDQFFMVT
 ESSGDVPLEVRHLTIMTNNLSKLINDLSLKISHSSGSDQHFLQRVRTIIFADFSNSDEFIE
 FLAEIFKVAKDVRVLGV TYANIAFLPAEIGFLRHLRYL NLLGNRIADLPESVCDLHLLQV
 LDVRCSSPYLRAPNGITNLIYLRHLHASEPFLSIIPKIQNLSHLQELEVYKVSSISRIDALQ
 GMTQLRGTLCLKDLHQVDVSELRK GILKGMQHNLNILELSWSSSDS QSREASTDED TLE
 CLQPHENLKDLRITGYRSTKCP SWMLKTPCSLSNATS VFLTDCVNLKNLPPFHIMPCLE
 IEMRKIHSV NKNVNTVPQRS DQIMFPKLR LRVFEDVLNCTEWSTGSSKSRNTVFPCLCE
 IQIRNCPKLRNFPDLPLTLTTMIENVGLETLPRIQDRHSLPPSSSSDAIATSKEGRWTSR
 LTTLQIHQCHGLKSLGSSLLQQQHLLRSLEVLSIKNCDNV TCDLSDGFQDLTALTDLSL
 YDCPKLLVDKFHTSLRKLEISECFITHGAWVDDYPFLFSVWTLKVTSCPHVSTDQESS
 FSIEPLDWLNCLFNVCSLHLENTLLLKLSMFNRLRSLEILEIDGSR SFDDLVEFEWLEK
 LQDLSIRNCKELRMLPANISTLPVLEELCIENCPALEALPASGLPTSLKRLSISKCS PRLTQ
 RCLDDEPDNLNIAKIAVVYIDGQCISIQK

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



3) RC93-1

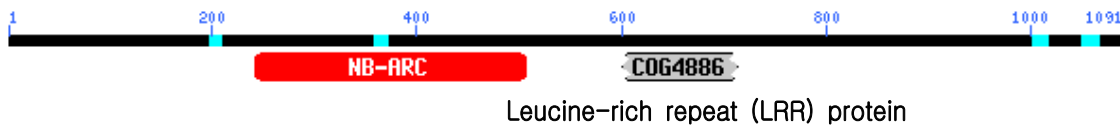
유전자 구조: 약 4.1 kb coding region으로 3개의 exon 과 2 개의 intron 으로 예상된다.

Ds insertion site: 두 번째 intron에 삽입됨

Protein coding region:

MDAVETIISTGINIHEATQLSNELSRLQATLPKARFLINRGEWGRFKNKDMALLLSQLK
DTTYDAEDLLRESDDQALRQKMEDADRNWFGKRYSSILNLAKILIRGSKTKIKEAREKL
DKAVADLEGVLNSVGVSEAVQHMPETSSVICVSQVFGRDKERDLVIEKLGVCMSIGCD
SQRDHVIELLGVPLITRSGVARARAKGKRAAAPVIGNTSASSRAKQLKRDTRARPLAE
AKCIDNVPVLPFIGGIGVGTTLAQFIYNDPRVQAHFGNRRVWVCVSDLFDKRVNTNEI
IESFNREEYKPLCGLDALQVELMEQLERQKFLVLDDIWQEAIDEWESFYTPFKNGPKG
SMILVTTRFTTVVDRVATNCKPIQLEGLDRDIFWEFFSKCAFGECEPESYPQLQDIGRS
IASRLCGSPLVAKTTGRLLNMKLTVQHWETVQNSELWELPHRDNEILPALQLSYLYLP
QELKRCFAFCSMFPKDYSEFERDEIVDIWVAEGFVASGGIMRLEDMGIRYLLDLRSRFLF
QTDPMPYDQTRYVMHDLIHDMAQSVYVDECLLMQDLRSRNERMLHVVRHMSVKVA
DESLKNGMRGIQDLNKLHSLRFGIKLNVEITWFNQLSNILYLSLKGCKLVKLPESIGELN
SLRYLDIRSGVQELPKKFCSLYSLQVVDASRSSLK AISLDVIKLINLRRLALPNDKEAAE
ASLVEKQYLQELVLLWRGHGKEIGKSENGVVEALRPPPRIVRLKVQGFGGDSFSPSWF
RPECLLNLSLELSKCDGLKNLSIASLPSLERLMLEANLRMEAVTILGGSTGGEKTKHT
SSSSNCTACLRLTTRILVNCYQLQNLGCLSP EYLP SIECTEINKSSHLGLSIHVDSFV
GFEHLQEMKIWRCKLVCPQGMVLPPLSLRRLSIVNCRKLD FPA YLQSLTSLDILHFRACN
NMESIPLGTNLRVKCLIKSCSELSSIGGSRALSSMQVVSISDGPKLHEVEQPF TKGLLT
KEEKVELLKFTGSMYYLNPLCPMSGNGDGWSMGERGSDRDDEVVLA AAAAGAWWT
MAAAVCGVEVVMESSEPAIWRQRQGLWRLQ

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



4) A10701-1

유전자 구조: 약 3.6 kb coding region으로 5 개의 exon 과 4개의 intron 으로 예상된다.

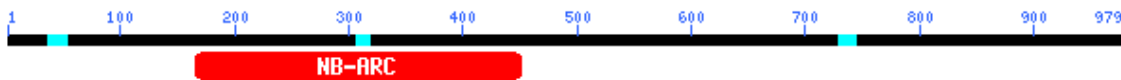
Ds insertion site: 2번째 exon에 Ds가 삽입됨

Protein coding region:

MAESLILPMVRGVA AKAADALVQRVTGACGAVDDDRRKLQRQLLAVQRALADAEAK
SETNLAVRRWMKDLNAAAYEADDVLDDFRYEALRRDGDATAGKVLGYFTPHNPLLF
RVTMSKKL SNVLEKMNKLVDKMNELGLSVDRTESPQELKPPYLQMHS AALDESSDIV
GRDDDKEVVV KLLLDQRYEQRLQVLPVIGIGSGKTTLAKMVYNDTRVRDHFQLKMW
HCVSENF EAVPLLSIVELATNRRQCVPDKDTIELLRQLG AIGSRRFLLVLDDVWNE

DENKWQDEL RPLLCSAAGGHGSVVVVTTTRSQQVASIMGTMRSHELACLNDDDSWELF
 SKKAFSEEVRETAELVTIGRLIVKKCRGLPLALNAMGGLMSSKQQLHEWKAIADSARD
 KDEILSMLKLSYRHLPSEMKPSFAFC SIFPRNHEMDKEVLIQLWMANGFIQEDGIMDLE
 QKGEYTFQYLLWRSFLQDVKAKKTL DHLAELQPSTILQKEIMDKALPYESIGCKMHDL
 MHDLAKDVADECVTSEHVLQHDA SVRNV RHMNISS TFGIFLKYLPESMGKMRKLLHL
 YLLGCDSLVRMPPNFGLLNNLRTL TTFVLDTKAGCGIDELKNLRHIANRIYTPANSAYN
 EEEVLESLTPHGKLELHGYSGLKIPQW MRDPQMLQCLTTLRISNCLGCKDLSTLWL
 SVSLEHLQLSRMDNLTTLCKNVGVGAEGYTIPQQVFPKLSLKLLELLFSLEKWAENTA
 GEAKNLVTFPELEMLQIIRCSKLASVPDCPVLKELDRFGSYMLAMNELTHLTSLSKLN
 VANSLCDVEANQGQLEYLRSLSLVNCFTAASGSSEMRLGLWKCF AFVEDLRLESCRR
 LVALASNLGNLAMLRLHLYMNCYV LKDLPDGMDGLVSLKILEIQACAEIEEFPQGLLQR
 LPTLKELSIQGCPLGLETRECREGGEYFDLVSSVQRICIPAAAKTEMEEESRSGI

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



5) A11403

유전자 구조: 약 3.0 kb coding region으로 4 개의 exon 과 3 개의 intron 으로 예상된다.

Ds insertion site: 두 번째 intron에 Ds가 삽입됨

Protein coding region:

MGEVQTGVQQNLIRPLNRCSCAERALNSPEVKATSAVLAHQGYQLLQKLLISSQMQ
 GGASATILWEWILLGTKNSNGEAPLFFSTYDHA AVLNLAMDKVVGILRGVAGVAADA
 NAFREFFHWVTPHVLAAVRSQQQQQLQLDSSGGPVSASTGNNRTAPLHQIQDDLQKL
 EHNLWVIQTITSTMHDLIDRLEWHSRETEARHLRQIKDAVYDAEDLLDEYNYYALK
 VKVEASKNLGQDHSHPVLEFLDSVNFNGNFSKVMEIQDRLKHVFDQSMGLGLHKTP
 KKFDRLLVRPETCRVLDESQIFGREQELKELMQMLGVDGHKRGRPAAHNTNTEARRME
 LPVLPVGMGGVGKTTMAQQICEDPEVRKHFHRIIWICVSDEFEVNRLTKDALKSLGV
 KSEDTDTRDNLMDKGGWRTFHRTL SNGLDGSMLVTTRSSKVANLVSDGNHYELKGL
 QDGVFWNFKLC AFGSVQSWSNRPELQRIRPELERIGRAILPKLKGSPAAKTLGRLLK
 CNRSIEHWEDILKRAVAIRTRGD

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



6) A513-1

유전자 구조: 약 4.8 kb coding region으로 4개의 exon 과 3 개의 intron 으로 예상된다.

Ds insertion site: 2번째 exon에 Ds가 삽입

Protein coding region:

MGALLSKLGNLLKEEYKLRNLRREEITFLKSELESMEAALLKVSEAPIDQPPDRQVKIW
ARDVRDLSYDIEDSVDEFMVCIDSRTPNNSCSFGGFVYRSMDLLNRAKFRHKIGTDIKGI
KSRIKEVNDRHVDYKVDGVLTKPIGPTVDSLNEFVGIDEKSDELVRMLMGTGEYIDK
KKKKGFGGLGKTTLANVVYERLKTQFYCFVFPVSLTPNMEKIFKNMLHQFDKKKYR
NINEVTWDEAQLIAELREFLRNKRYLIVIDDIWDISAWEKIKCSFVDSSENGSGIITTRNV
DVAKEVGGVYQLKPLCHVDSRKLFLNLRIFGAEDKCPPQLAELSERILKKCSGVPLAII
ASMLASKIENENAHEDDFKQLSISNLSHVRSLIFFKGFNSFPAYSSFPLLRVNLNSGCKK
VDNNHCKDICLYFHLRYLNLRSRTSVTEIPREIENLQSLQVLCINGIEIEDLPSTFVRLGQI
LYLNVYLKTRIPDGFGLSKYLQELKGRILIGSLTNVHDLGKLTERRLHIEFQGWETSW
KEPLHRCLSNLVSLEDLTIAGCFGSLDSACDDSSPRPQQQLCSIGMWNSTIHAVPNWMVS
LSTLSNLTIKLDLTKERDLQILGSIPSLRSLYLGVEKPTVDRDERLIISYRFKCLSLFEYWS
DTMEIEFAQGAMQNLRTLKLFIDVHKTHDHVDFGLENLSALEHAYLYLNNCPEEMHE
VVEAGIRRQIHMNPNSPTLDLSM

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



7) D2501-1

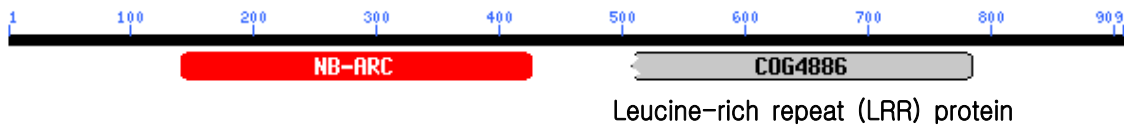
유전자 구조: 약 2.7 kb coding region으로 한 개의 exon 으로 예상된다.

Ds insertion site: exon에 Ds가 삽입됨

Protein coding region:

MEFVASIVDAVFRPLKDYFARTFGYVMSCGDYIDLLGHEMDELKSKRDDVKRLVDVA
ERRGMEATSQVKWWLECVSRLEDAARIEEEYQARLRPPEQAPGLRATYHLSQRAD
EMFAEAANLKEKGAFHKVADELVQVRFEEMPSAAVVGMDAVLQRLHACVRHGDVGI
VGIYGMAGVGKTALLNKYNNDFLINSPPDINVAINIEVGKEFSLDDIQKIIGDRLGVS
WENRTPRERAGMLYRVLTKMNFVLLDDLWEPLNFQMIGIPVPKHNSKSKIVLTTRIEDV
CDRMDVRRKLMKMECLPWEPAWELFREKVGEHLMFSSIEIQEQAKALAMKCGGLPLALIT
VGRAMASKRTEKEWKHAITVLKVAPWQLLGMEMDVLMLPLKNSYDSLPSDKLRLCLLY
CSLPPEEFSISKEWIIGYCIGEGFIDDLYTDMDEIYNKGHDLGLVVKIACLEKGDDE
DHISMHPMVRAMALWIASDFGTKETKWLVRAGVGLKEAPGAEKWSDAERISFMRNNILE
LYERPNCPLLKTLMLQVNPALDKICDGFQFMPSLRVLDLSHTSIHELPSGISSLVELQYL
DLYNTNIKSLPRELGALVTLRFLLSHMPLDLIPGGVISSLTMLQVLYMDLSYGDWKVD
ATGNGVEFLELESLRRLKILDITIQSLEALERLSLSNRLASSTRNLLIKTCASLTKVELPS
SRLWKNMTGLKRVWIASCNLAEVIIDGNTETDHYRQPDVISQSRGDHYSNDEQPIL
PNLQNIILQALHKVKIYKSGCVQNTSLYIYWYCHGLEELITLSDDEQGTAAANSSEQAARI
CRDITPFPNLKELYLHGLANCRALCSTTCFLRFPLLGNLKIVDCPKLKKLELPVGNLNAV
QCTREWWDALEWDDAEVKASYDPLFRPLH

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



8) c289-1

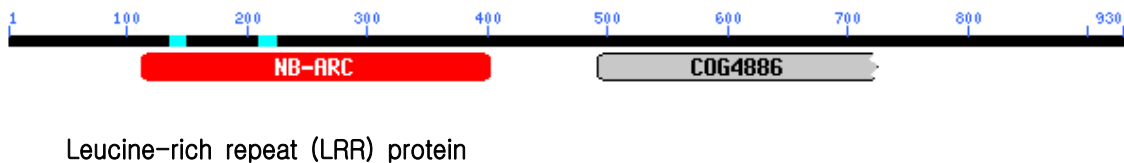
유전자 구조: 약 2.8 kb coding region으로 한 개의 exon으로 예상된다.

Ds insertion site: exon에 Ds가 삽입됨

Protein coding region:

MEENIGKLDNTIKNLEVRKNKIQIRLSISEGKQETCNPEVTEWLQKVAAMETEVNEIKN
 VERKRKQLFSYWSKYEIGMQAAKKLKEAEMLHEKGAFKEVSFEVPPYFVQEVPTIPST
 EETECNLKEVLQYLKDDNVGILGIWGMGGVGKTTLLRKINNHFLGVTKENYGFDLVVY
 VVASTASGIGQLADIAERIGLFLKPGCSINIRASFLLSFLRRKFKLLIDDLWGYDLAE
 AGIPYPNGLNKQKVVLATRSESVCGHMG AHKTIFMECLDQEKAWRLFKEKATEEVIN
 SDVRIESLAKEVAEECGGLPLALATLGRAMSTKRTRHEWALALSYLKKSRIHEIPNMG
 NTSHIYTRLKLSYDYLQDKQIKECFLCCSLWPEGYSIWKV ALIDCWMGMGLIEYDTIEE
 AYDKGHSII EYLKNACLEAGYLEDREVRIHDIIRDMAISSSGCVDQSMNWIVQAGVGI
 HNIGSRDIEKWRSARKISLMCNYISELPHAI SCYNLQYLSLQQNFWLNVIPPSLFKCLSSV
 TYLDLSWIPIKELPEEIGALVELQCLKNQTLIKSLPV AIGQLTKLKYLNLSYMDFLEKIP
 YGVIPNLSKLQVLDLYGSRYAGCEEFGHSRSHMDYDEFRIEELSCLTRELKALGITIKKV
 STLKLLDIIHGSHMRLGLYKLSGETSLALTIPDSVLVLNITDCSELKEFSVTNKPQCYG
 DHLPRLEFLT FWDLPRL EKISMGHIQNLRLVLYVGKAHQLMDMSCILKPHLEQLDVSFC
 NKMKQLVHIKKNINTEVQDEMPIQGFQRLRILQLNSLPSLENFCNFSLDLPSLEYFDVFA
 CPKLRRLPFGHAIKLSVMGEKTWWDNLKWDDENSPLLLFPFFKASSETRIASLRPEL
 DTSVASSPKAFFTKRQPYLSSSIRYTSFLKSMFEAEFSSSL

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



9) 40-H79

유전자 구조: 약 3.7 kb coding region으로 한 개의 exon으로 예상된다.

Ds insertion site: exon에 삽입됨

Protein coding region:

MEGAIVSIATGALKPVLMLKATLVCNEYMISKEVHKEIETLSSELT AIHSFLLKMSEEE
 NPDAQDHAWMMDVRELSYDIEDIIDEFMVRVDDDSANPDGFISKCKNSLAKMKTRSRI
 AKAIRDFKSQITKVGDRHARYRTRET VLR TNNRIVDHRALSIFELASNLVGIDEPKNEVI
 KLLSSNDGCESMQQP KVISIVGFGGLGKTTLAYQVYQELKGFDCSAFLSVSRPNM

MRILRTLSEVAQRDYALTEDGYEQQLIIKISNFLSNKRYLIVIDDIWKVEIWNIIKGAFSM
 SSQCSKIITTRINDVARSCSSFSGHVYNIRPLNMVHSRHLFHRRLFNSEEKCPSHLEE
 VSDQILKKCDGLPLAIIAISGLLVNKPMTKDQWDHVKNSIGSALERNPSVDVMISILSLS
 YYDLPPHLKTCLLHLSIFPEDYLIKDDLILRWV AEGFIHKKGSYTSFELGEMCFNELAN
 RNLIQRCSNKDDWKVHDTILDFIISMSIKDNFVTLV ASPDQTIGTNKVRRLSLQIGIEDGN
 SILQRRLSDLSHARSLDVFCYQPKLPSLLEFRHLRVLSFRYCKWLKSHCIANIGRLFQLR
 YLNLKKTGLTELPEEIGCLQSLETLNVMDNHMVQLPQCITRLGNLMHLFIGNQIQLPDGI
 AKMQALETLQAVDLSKHSSNIVKELGQLKNLRELNLLIYDYDACTEEHMKTIASCLLQ
 LGTYNLRRLNIMTSIILGNIYLPDPWCPAPLKLEGLDISGSPMPRVPTWIGSLVNLKRLGL
 ALEGVNCEDLSIIGCLPSLLQLSLRVPGYRDSLIIISGCYGFSCLRDFCFIGQQPIFTAGSMP
 RLELLILNINASKPETVTNAALENLPCMLTVQYLLYQYNKNDHEIENAEAALKRA

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



Leucine-rich repeat (LRR) protein

10) HL 200

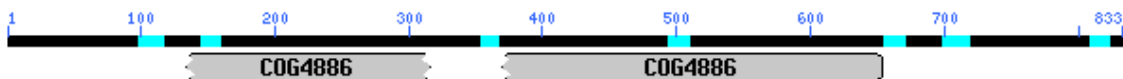
유전자 구조: 약 2.5 kb coding region으로 한 개의 exon으로 예상된다.

Ds insertion site: exon에 삽입됨

Protein coding region:

MDGTSAKVVLFIGASFSFFLITHAQQQATRCRPQERDALLSFKQGITNDSVGLLSSWRR
 GHGDCCSWAGITCSSKTGHVVKLDVNSFLTDDSPMVGQISPSLLSLNYLQYLDLSSNLL
 AGPNGSVPEFLGSMNSLIHLDL SYIPFSGTLPPLLSNLTNLEYLDLSFTSFSGTLPQQLGN
 LSNLRYLDVSEMQRVVYSTDL SWLSRLHLL EYIDMSNTILSKITNLP AVLNKIPTLKHV
 LLNCSIPSANQSITHLNL TQLEELDLSLNYFGHPISSCWFWKVTSIKSLRLDETYLHGP
 FPDELGEMVSLQHLD FCFNGNAATMTVDLNNLCDLESIYLDKSLSSGNITDLMDKLQC
 SSKLYSLSSISNNMIGMLPSSIEHFTSLNHIDL TNN SVSGVM PRGFQNM ANLEYLHLSSN
 RLSGQMPLLP TSLKILHAQMNFLSGHLPLEFRAPNLENLISSNYITGQVPGSICESENMK
 HLDLSNNLFEGEVPHCRRMRNLRFLLSNNSFSGKFPQWISFSSLVFLDLSWNMFYGS
 LPRWIGDLVTLRILHLGHNMFN GDIPVNITHLTQLQYLN LADNNISGLIPLSLSHFNEMT
 LKAVGDSISTLAFDESFD TFSLGMKHQILKYGSHGVVDMV GIDLSLRITGGIPEEITSL
 DRLSNLNLSWNRLSGKIPENIGSMKSIESLDLSRNYLCGEVPSSLTDLTYSYLDLSYNN
 LTGKVPGRQLDTLYLENPSMYNGNIGLCGPPLQRNCSSNGYAQGHGDHKGQEKDSNS
 MFFYYGLASGFVVG YWVFCALLFHKS WRV TYFCLVDK VYDKLYVYVVITWTRWM
 NTTN

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



20x Leucine-rich repeat (LRR) protein

11) A2813

유전자 구조: 약 7.6 kb coding region으로 9개의 exon 과 8개의 intron 으로 예상된다.
Ds insertion site: 6번째 exon에 삽입됨

Protein coding region:

MEAAVVSSTEGVVHILLGKLGFLSDKYVLLSGVRHEIQELKDDLESMNACLRLDLAAA
GDYHQTQQHDESFFLQTRTWKQVREVAAYDAEDCIDSFRYHVGGDRYRDEDLAGW
LRRTVLRPLTTLRAMYKLAVEVQSLKARALMVSEERRLYKLEPPAAASSSAGEYAPRC
YDDLDRRLPALSVDDKTRAVLKLLDMVGGDDGSARRKVVSIVGFGGLGKTTLAAMVY
KSPAGIRDGPELQPSSSAGIVGGAALRANARFTLLHEEDDHGSRRLRGIETKDIPQLLA
HCSTHLRDKRYFVVVDDVWSLEDWASLKPAFPDNDIHSRVVITTRNRQVAESCCSLPV
DRVYSMDVLQDDQSRKLFNTVFRSNKCPAGYRRELETISGNILAKCGGLPLAIVSVGGM
LAQAENKTPAEWMKVCDRLGSRLLSTSAMMERMRRIMSLSYHDLLYHLKACFLYLSVF
REGYEIKRGPLVRRWAAEGFVGGRRRECTPEEAAGKYLDEFVGRSIVTPTRVVSNGVVR
CCKVHDIMLEMMTEKCMEEFNISLLGSPSKHGHQQHMMVAAGHDKIRRLSVHGAHT
SQGKQAGGVHDKHLRRIKDEEQDDVLSSGDLSCVRSLLMLRCIEKPIPVISFAKLLK
IRVLDLEGCRWLSNHDLEDICKLSLLRYLSLRDTGVQRLPRLIGRLKELLTLDIRETDVRA
LPETITRLGRLRHLLAGRYRYTRSHRVKLFEPFEAVTIPPGLAAMGSLQTIAHANASS
SIAMGELGDLPLTKLCVMNCEEGPSKWEFVVISLNKLSYSLRSLILHWQYDNAGLEA
LLDLTSPPIFLEKFFLWGKLSLPSVWVSHLSNLVDLCLRENFLNGEVIIEQLGKLPSSL
KLYRASYLGRELRFREKLFPRKQLIVDNLNPIEELSFQGGAPQLERLTLAVLKKPEDGI
FGIDKLPMLEKVEFYGHMIDSVVAEMPWKLAVVVVSSTEGVVRILLAKLGDFFSDNTSS
SPPSRHEIQELKDDLESMNACLRLDLAAAGDDDQTQQVISLAAASRFVRLRVLEMMNHI
SFVVADEDVDEAGEGGVAYNAEDCIDGFWHHRGRHYRGDEGLVAGWLRRTVIQPLET
LRAMHKLALDVQSLKARALKVSEERRLYKLEPPATATAAWTVPSYDDLDRRLPALN
MDESRRPASWASAARRKPSWSCWRTVVIMAATTTTRRRLAGRWSISIVGFGGLGKTTL
AATGIQHRAFTVSRNCDLRALLESLKQLVETPLMRDPRKCCGQETAAGDGDHDPLR
GIETLGPIPSVIHGERELCIPENLFRRLKHLIVDNLNDELDFQGGAPQLERLTLPLKPEP
ADGIVGIDKLLRLKEVEFFGHTTVDSVVEGMVDVYKAHPNRPRVYRNDRPMEDSESS

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



12) 21

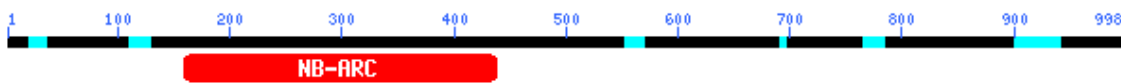
유전자 구조: 약 2.5 kb coding region으로 2개의 exon 과 1 개의 intron 으로 예상된다.
Ds insertion site: 첫째 exon에 삽입됨

Protein coding region:

METAVLSAVLRTLGPPLYAFLRDGHDLRRDLERDVHYIRNELAMIAAAIEEHDRRPPP
AAGDVRSAWIRGVRDLACDMEDCVDRFVHRATGHGLASMGARAKFAAVIQELRRKSE
ELSRLRASYAAAAGEPSCWVATGSSALTLPASSEAHTLASDIVGMDGPRDEILELIGE
TQQQLKVISIVGFGGLGKTLLARQIYESDAVAAQFHPRIWVRAAGKNAEDVLMDILQQL

```
GMPVHHCHASNLVVNLRNCLESKRFFVVIDDMQREYWNSSFRNAFPSDTGLSSIVIVT
TAIQSIANACSSRNSHVYVMRTLNEEHSRQLFLKEASWKDYPPGSEAILKKCDGLPLAL
VTTAQFLQSRCQQQPLGCAKLCDNLGKHLVTEDTLARMKRVLVHHYSSLPGHVIVKAC
LLYLGFPSGHPVRRKTLIRRWSAEGFVGADHHRSSLDVAIDSFEELVNRSIIQPVDVSSN
TEVKTCQTHGMMLEFILHKSICDNFITFLYGQARLPDKIRCVSIIQQNSGSKTRVSDIDL
SLVRSLTIFGKAHKSFLNFSRYKLLRVLDLEECDELEDEHLKKICKRLLLKYLSLGRGIT
VLPKEIAKLKFLLETDLRRTVIKFLPIQVLELPLIHLFGVFKIQDADQQMRKLSFLTEK
SKLETLAGFVTDRCQTFPQLMKHMTNLAKVKIWCENTADASSSSNSDVHLSEAIQEFI
QRGTDVNDVRSLSLDVGECSQEFLNFSLGDSCYLSSLKLGKGNKICRLPPFVTS LAVLTD
LCLSSSDRLSSDVLAALS NVRALRYLKL IARHLDRFVIERGDLQSLRRLHIVVVSMTTMS
KQQPEIQEGALPNLESFHLLCKDLDGPCGHGGIRIDSLGLGCLREIVLDDGVRETAKEQW
KDAARRHPKRPKVVFVGAGDVDRRRVGAAPAAAGESNSAMAPAAVASVVAAGDVKR
PAREESDISAALASLPKMARLLGAASIHQSSGTQGELSCGGNGASQRHFS
```

NCBI search에 따른 예상되는 protein domains:



R gene cluster에 대한 multi-mutation 창출 및 기능 분석 실시를 위한 자료

계놈상의 Disease Resistance Genes 의 또 하나의 구조적인 특이성은 염색체상에 한곳에 Tandem repeat로 2-19개의 유전자가 모여 있다는 것이다. 이러한 R 유전자는 진화과정 중 Duplication에 의해 증가해 온 것으로 추정되어 지며 tandem으로 존재하는 유전자는 비슷한 기능을 하는 것으로 추정할 수 있다. 따라서 전이인자를 재이동시키어 multi-mutation을 유발하거나 chromosomal deletion을 유도하여 여러 disease resistance R 유전자가 동시에 knock-out된 변이체를 확보하고 이를 통한 기능 분석하는 것이 현명하다.

전통적으로 *Ds* (state I) 은 삽입장소에서 deletion혹은 translocation 같은 염색체 rearrangement 를 유도하는 것이 알려져 왔으며 아래 그림에서 와 같이 두개의 *Ds*가 서로 다른 방향으로 나란히 위치해 있거나 서로 다른 방향으로 포개져 있는 경우, 90% 이상 염색체에 이상을 일으켜 염색체 deletion 이 생기게 되는 것이 옥수수나 arabidopsis에서 보고 되었다 (for review, Zhang and Peterson. 1999. Genetics 153: 14031410).

아래 Fig. 은 옥수수의 sh와 wx에 두개의 *Ds*가 삽입되어 있는 경우를 나타낸 것이다.

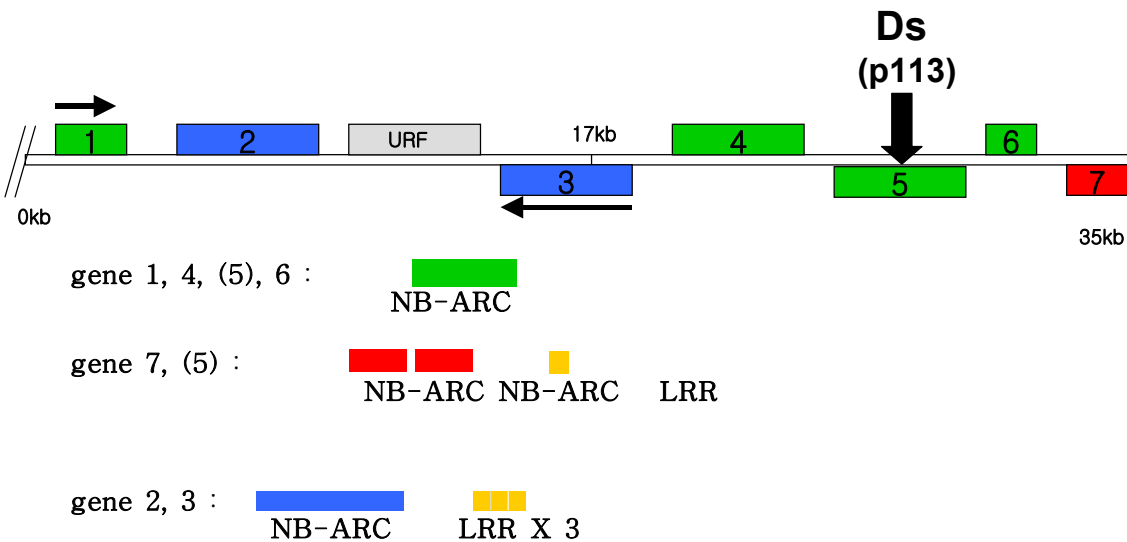
Fig. 5 옥수수수의 Sh 와 wx loci에 두개의 Ds가 서로 다른 방향으로 삽입되어 있는 모식도

위의 경우와 같이 서로 다른 방향으로 두개의 Ds가 인접한 경우 90% 이상의 Ds 움직임에 의해 염색체에 deletion이 유도된다.

P113

Ds에 의해 확인된 P113 R 유전자는 R gene cluster중 하나이다.

주위의 다른 R 유전자들와의 상호작용을 밝히기 위해서 Ds를 재이동시키거나 위에서 설명한 state I double Ds를 선발하여 여러 유전자도 동시에 deletion된 계통을 선발하여 P113이 속해있는 R gene cluster의 기능을 밝히고자 한다.



(최종 연구 성과)

구분	연구 성과
제 1 세부과제	-DD, DSC 방법으로 screening하여 1200여종 발굴. -SAGE 분석을 통하여 총 2,745개의 tags를 분리 -tags 중 development, structure, transcription/translation, stress/defense, signal, metabolism, others, photosynthesis, unknown/hypothetical protein이 각각 1.3%, 10.2%, 3.6%, 13.5%, 4.1%, 10.8%, 11.6%, 33.4%, 11.5%로 나타났다. - microarray로 확인해서 서로 다른 16종류의 유전자를 Northern으로 확인 했다. -2-DE을 통해서 방어관련 단백질을 14종류 확인. -그중 4종류 (PBZ1, OsPR-10, OsIRL, SalT)의 antibody를 생산 그 기능 연구 -PBZ1의 기능이 cell death와 관련성 규명
제 2세부과제	-NIM1-interacting protein 2 종의 bZIP protein을 분리 -아미노 말단 부위가 일부 제거된 7종의 bZIP factor를 얻음 -이들 결합부위 규명, 프로모터 인식 규명, 발현 분석으로 형질 전환체에서 광범위 병저항성 개발의 기초를 놓았다.
제 3세부과제	-wounding 에 반응하는 OsSNF1을 동정 -Promoter를 분리하여 GFP/GUS가 wounding과 도관에 특이적으로 발현하는 형질 전환체를 생산하였다. -constitutive expression cassette T-DNA vector 구축 -1,000 개 이상의 Ds flanking DNA의 염기서열 분석을 통하여 Ds가 R 유전자 에 들어가 유도된 knock-out 변이 선발하고 병 저항성 연구에 사용

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구개발 목표	달성도	관련 분야의 기여도	
1 차 년 도 2 0 0 0	제 1 세 부과제	1.저항성 유전자 분리 2.단백질 2D-PAGE	a. DSC 방법에 의한 rare message 분리. (100%) b. SAGE방법에 의한 발현 시기별, 양적차이 있는 유전자 분리. (100%) c. NBS/LRR degenerate primer PCR (100%) a. R/S specific 단백질 분리. (100%) b. 분리한 단백질 sequencing (100%)	벼 저항성관련 유전자를 대량 발굴해서 도열병 연구에 크게 이바지 할 것이며, 특히 SAGE 기술을 확립함으로써 다른 연구 분야에서 큰 기대가 예상됨
	제 2 세 부과제	1. NIMI/NPRI 결합단백질 분리.	a. NIMI/NPRI probe를 이용한 cDNA library screening으로 벼의 관련 유전자 cloning (100%) b. OsNIMI을 bait로 하여 yeast two-hybrid screen을 통한 결합 단백질 분리 (100%)	벼에서 생체방어 신호전달 및 유전자 발현 조절 매개체 분리에 기여
	제 3 세 부과제	Promotor 개발	본 실험에서는 wounding 에 따라 유전자의 발현이 달라지는 유전인자 OsSNF1의 promoter를 분리하여 expression vector로 개발하였다. (100%)	새로운 inducible promoter를 개발하였다.

구분	연구개발 목표	달성도	관련 분야의 기여도	
2차 년 도 2 0 0 1	제1세부 과제	1. 단백질 2D-PAGE 분석 2. 저항성 유전자 기능연구	a. elicitor 처리에 의해 생성된 단백질 분석 (100%) b. chemical 처리에 의해 생성된 단백질분석 및 sequencing (100%) a. Northern blot(100%) b. Fusion 단백질 생산 (100%) c. Ab 생산, Western blot.(100%)	rice proteomic study에 좋은 재료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.
	제2세부 과제	도열병 저항성 유전자 발현 관련 조절 단백질 분리, 기능연구	a. 도열병 저항성 유전자로서 추정되는 Two-hybrid system에 의한 OsNIP 2종 구조 분석 (100%) b. OsNIP bZIP protein 의 발현 분석 (100%) c. OsNIP 부위별 절단에 의한 결합 역할 규명 (100%)	bZIP protein 과 NIM/NPR 과의 단백질 결합 규명 기여
	제3세부 과제	형질 전환체 개발	1. OsSNF1의 promoter를 이용한 형질전환체를 만들었다.(100%) 2. 전이인자 insertion sites의 염기서열 분석을 통하여 tagging된 유전자 중에 NB-ARC homology를 가지는 계통을 선발하였다.(100%)	새로운 R 유전자의 변이체를 선발하여 병원균과의 상호작용을 연구할 수 있는 자료를 확보하였다.

구분	연구개발 목표	달성도	관련 분야의 기여도	
3차 년 도 2 0 0 2	제1세부 과제	1. 저항성 유전자 기능연구	PBZ1 단백질의 기능 분석 -Western blot analysis (100%) -immunolocalization (100%) -Biochemical study (100%)	rice cell death 연구에 아주 훌륭한 marker protein으로 사용될 것으로 생각된다.
	제2세부 과제	형질 전환체 분석 통한 병 저항성 분석	a. 유전자 칩에 의한 유전자 발현 분석 b. 분리된 조절단백질을 constitutive overexpression 된 형질전환체제작 (100%)	genomic proteomic 연구의 발판 마련 형질전환체 검증
	제3세부 과제	생체방어 유전자 생물학적 기능 구명	1,000개 이상의 전이인자 insertion sites의 염기서열 분석을 통하여 tagging된 유전자 중에 NB-ARC homology를 가지 는 계통을 선발하여	새로운 R 유전자의 변이체를 선발하여 병원균과의 상호작 용을 연구할 수 있는 자료를 확보하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절 기대효과

1) 기술적 측면

본연구진은 최근 몇 년간 저항성관련 유전자 분리를 위해 nearly isogenic lines을 이용한 (BC₄F₃) DSC, DD, SAGE, 2-DE technique 등으로 저항성(R)과 이병성(S) 벼-도열병 균상호작용 실험을 수행했으나 좋은 결과를 얻지 못했다. 이는 R과 S 반응의 산물의 차이는 아주 미미한 반면 R/S와 Control의 차이에 기인한 것으로 확인되고 있다. 이는 저항성과 이병성 반응의 차이는 기존의 signal pathway model을 그대로 이용하거나 차이가 있다고 해도 그 쪽의 차이가 낮은 경우 또는 여러 요인들의 상호 작용이나 synergistic interaction의 결과로 해석 할 수 있다.

이러한 미묘한 유전자 발현 및 신호전달의 차이는 최근 동물 system에서 응용되는 SAGE나 negative amplification technique을 이용한 DSC, 본 연구진에 의해 setup된 조직배양세포-도열병균 상호작용 산물의 two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) 분석 및 관련 유전산물 peptide의 sequencing에 의한 functional genomic등 high throughput selection system을 이용한 종합적인 접근방법으로 major gene product나 multiple gene product 또는 quantitative trait loci (QTL)분석에 의한 유전자까지 분리할 수 있는 기술개발의 체계화를 수립했다.

DSC, SAGE, DHH, Microarray 분석 방법과 2-DE, Northern 결과가 다소 일치 하지 않는 경우가 있어도 transcriptome 과 proteome의 상호 보완적인 연구의 기반을 확립했고, 특히 상기 방법을 통해서만 확인 될 수 있었던 10 여종의 유전자는 차후 도열병 또는 병 저항성 관련 marker로 사용 할 수 있을 것이며, 이를 기초로 형질 전환 식물이 만들어지면 activation(overproduction), deactivation(예로 RNAi 또는 Ds mutants)등의 in vivo 기능검정으로 병 저항성관련 연구의 큰 발전을 가져 올 수 있는 기초 연구를 수립 했다.

Yeast two hybrid system에 의한 up-/down stream 유전자 분리하고 병 저항성 또는 stress, phytohormone responsive transcription factor를 확인, cloning했고 이들과 상호 작용하는 cis element와 결합 부위, 결합 정도의 세기를 GUS로 확인 동정 했다. 아울러 이들을 형질 전환 시켜 overproduction 시키는 line 들을 선발하여 확인 중이다. 이들은 신호전달 기구를 이용한 저항성 작물 개발에 기초적인 연구를 완성 해 추후 저항성 관련 유전산물(제 1 세부과제)과 신호 전달과정을 이용한 Upstream 에서의 저항성 형질 전환 작물 개발의 체계적인 연구라 할 수 있다.

저항성(이병성), 또는 wound 특이적 발현의 promoter 찾아서 cloning하고 이를 이용한 형질전환 식물체를 만들 수 있으므로 해서 병발생과 밀접한 관련이 있는 wound inducible promoter로 이들이 병 발생과 저항성 발현 또는 상처처리시에 어떻게 발현 조절 되는지에 대한 연구에 주요한 정보를 제공 할 것이다. 또한 병 저항성과 관련이 높다고 보고된 ND-ARC 주변 유전자에 Ds tagging된 mutant lines 들을 1000여 line로부터 IP PCR로 cloning하고 sequencing 하여 그 유전자의 organization을 벼에서 처음으로 확인 했다. 이들 line 들의 유전 형질이 확인되면 각 mutant별로 얻어진 종자들로부터 그 유전형질과 저항성 knock out를 확인함으로써 이들 각각이 저항성에 어떠한 연관이 있는 지를 밝힐 것이다. 이는 유전학-식물병학-분자생물학의 연구의 systematic approach의 model system으로 신기술 개발, 체계화에 크게 공헌 할 수 있을 것이다.

2) 경제 · 산업적 측면

도열병 방제에 관련된 분자생물학적 연구로 작물의 병해충에 대한 방어 기작의 이해와 발현조절연구, 이를 체계화한 형질전환 작물을 개발, 저항성 유전자의 기능, 상호 작용 및 조절을 연구하고, 이를 이용한 도열병방제로 매년 670억 원이 소비되는 직접적 경제적 이득은 물론이요, 환경오염, 독성 등으로 인한 부작용을 경감시켜 안전한 농산물 생산의 기반을 확고히 할 수 있다.

이러한 기술은 생물공학 산업의 2천억불 시장 규모 중 농업관련 biotech 산업의 200억불 시장의 큰 분야를 차지하고 있는 병해충 저항성 작물개발 분야의 기초적인 연구로 그 역할을 할 수 있다.

3) 사회 · 문화적 측면

벼-도열병 상호작용 및 병 저항성 유전자원의 확보 및 그 응용으로 수 천년 동안 co-evolution되어 왔던 상호간의 cross-talk를 이해하고 이를 극대화함으로써 병 방제에 직접적으로 투자되는 농약사용을 상당히 줄일 수 있고 이를 토대로 안전한 환경 농산물 (environmentally safe agroproduct)생산의 기반을 확립함으로써 식량증산 및 친환경 농업의 기틀을 마련한다.

2절 활용방안

- 추가연구의 필요성

제1 세부과제에서는 transcriptome 과 proteome를 이용한 도열병 저항성관련유전 산물을 찾아 cloning하고 그 기능을 주로 연구하고, 제2 세부과제에서는 그 upstream 영역인 transcription factor 및 그 interaction partner 연구, 제3과제에서는 병 저항성 또는 wounding과 연관이 있는 promoter를 개발하고 병저항성에 관련이 있다고 보고 되고 있는 NB-ARC 유전자 주변 sequence에서의 Ds element에 의해 만들어진 insertion mutant 들을 1000여 line 이상 선발하고, sequencing하여 그 유전자 구조를 연구했다. 그러나 이 연구에서 찾았거나 만들어 진 system을 종합적으로 연결하고 in vivo기능을 알아 보기위한 형질 전환체는 연구기간이 다소 짧아 일부 계속되고 있지만 종합적이고 체계적인 연구가 추후 절실히 필요하다고 생각된다.

- 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

종합적인 high throughput transcriptome 연구와 proteome 연구의 병행, mutant, transcription factor 연구등 일련의 상호 연관된 체계적 연구는 다른 연구 분야에서, 특히 functional genomics 연구에 좋은 model 이 된다고 생각되며, 유전학-식물 병학-분자 생물학의 학제간 연구의 좋은 본보기가 된다고 본다.

본 연구에서 확인한 병 저항성관련 유전자 및 단백질 들은 병 저항성 관련 marker로서 개발이 가능하며 특히 PBZ1 유전자의 생체내 PCD 관련 연구는 처음으로 PCD관련 marker enzyme로 등록 할 예정이다. 또한 Transcription factor 그의 형질 전환체의 병 저항성 관련 연구는 광범위 병 저항성 작물 개발의 가능성을 가늠해 볼 수 있고, promoter 개발과 Ds mutant의 characterization 은 병 저항성 기작의 연구는 물론이요 , 이를 이용한 산업 개발의 기초가 된다고 생각된다.

- 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

- 광 범위 내병성 벼 개발에 필요한 vector 구축 및 상시 발현에 의한 형질변환 추구

- 도열병 및 기타 병저항성 작물 개발을 위한 다각적 해결을 위한 전략 제고

- NIM1, NPR1 이 병 저항성 기작의 핵심 매개체 중의 하나로 알려져 있음. 수도에서 NIM/NPR1 이 작용하는 target DNA 결합 단백질을 분리함으로 이들 통한 하위단계의 저항성 유전자 의 인위적 발현 유도가능. 이를 통해 PR gene 들을 내재적으로 발현시켜 병 감염 초기에 식물 자체적으로 저항성 유도하는 전략으로 삼을 수 있다. 결합단백질의 특정 부위를 변경시키거나 제거, 또는 이중 단백질과의 chimaric protein 제조 등을 통해 분자간 반응성을 높이고 이를 식물에 도입하여 특정 형질에 효율적인 식물을 개발하는 전략에도 사용 가능하다.

추가연구의 필요성

본 연구를 통하여 선발된 병 저항성 유전자의 knock-out 계통을 유전자원으로 이용하여 제 1 과제와 제 2과제에서 개발된 유전자와 기술을 이용하여 분석하는 실험이 필요하다.

원천 기술의 확보

- transcriptome/proteome 병행 연구로 병 저항성 유전자 선발 및 이를 이용한 기능 유전체학의 기초 수립
- transcription factor를 이용한 병 저항성 형질 전환체 도입
- 저항성 또는 wound inducible promoter개발
- Ds line 선발로 우수한 유전 자원 확보 및 그 기능 연구

핵심기술	국내의 기술현황 (국외 기술에 대한 국내 기술%)
<ul style="list-style-type: none"> · 유전자도입기술 및 재분화 · 병 저항성 유전자의 유전 자원 확보 	<ul style="list-style-type: none"> · 벼에 대한 재분화는 국제수준임 단 indica type 제외(80%) · 벼의 전이인자를 이용한 병 관련 유전자 선발 유지 (아직 해외에서 병 유전자 대량 집단 형성이 이루어지지 않았음)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 본연구와 관련되어 differential screening, protein 2-D gel, proteomic, genomic 범주에 속하는 많은 연구와 시도가 있으나 벼에 있어 구체적으로 진행된 것은 많지 않다.
- NIM1/NPR1 에 결합하는 핵심 TGA 관련 단백질이 애기장대에서 보고 되어 있고 벼에서도 1개 보고 되어 있다. 그러나 이들의 발현 분석연구는 발표가 되어 있지 않다. Arabidopsis에서 TGA2 factor 와 NPR이 yeast two-hybrid system 이나 in vitro에서 결합한다. 그러나 보통 조건의 식물 세포내에서 이들은 결합하지 않는다. 연구 결과

NPR1/NIM1 이 Salicylic acid 처리 후에만이 핵에서 결합한다는 것이 보고되어 있다. 따라서 식물 내 over-expression 에 의한 병 저항성 획득을 위해서는 protein-protein interaction 의 세포내 조절기작에 대한 규명이 추가적으로 뒤따라야 할것이다.

- Rice의 genome sequencing 이 거의 완료된 이래 60,000개 oligonucleotide chip의 제조가 현실화 되었다. 이를 사용하면 전체 유전체 차원에서의 발현 분석이 가능하고 단백질체 (proteomic) 연구와 더불어 식물 미생물 상호작용, 생체방어 기작의 이해 및 응용에 획기적 전환점이 될 것으로 예상된다. 본 연구에서 사용된 2,000 cDNA microarray는 향후 사용될 whole genome oligonucleotide array 활용에 도움을 줄 것이다.

제 7 장 참고문헌

- Mosfhat,A.S:(1994) Mapping the requence of disease resistance. Science 256 :1804-1805.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse,J. Frary,A., Ganal, M.W., Spivey, R., Wu.T., Earle, E.D., Tankslery ,S.D., (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science .265 : 1432-1436
- Bent,A.F., Kunkel,B.N., Dahlbeck.D., Brown,K.L., Schmidt, R., Giraudat,J, Leung,J., Staskawicz,B.J., (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: leucine-rich repeat. class of plant disease gene. Science. 265 : 1856-1859
- Grant,MR., Godiard,L.,Straube,E., Ashfield,T., Lewald,J., Sattler,A., Innes,R.W., Dangl.J.L., (1995) Structure of the Arabidopsis *Rpm1* gene enabling dual specificity disease resistance. Science. 269 : 841-846.
- Salmeron,J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens,C.M.T., Scofield,S.R., Kim,H.S., Lavelle,D.T., Dahlbeck,D., Staskawicz,B.T. (1996) Tomato Pr5 is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto.kinase gene cluster. Cell. 86 :123-133
- Lawrence,G.J., Finnegan,E.J., Ayliffe,M.A., Ellis,J.G.(1996) The L6 gene for rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene N. Plant Cell 7 : 1195-1206
- Anderson,P.A., Lawrence,G.J., Morrish,B.C., Ayliffe,M.A., Finnegan,E.J., Ellis, J.G.(1997)

- Inactivation of the flax resistance gene M associated with loss of a repeat unit within the leucine-rich repeat coding region, *Plant Cell* 9 : 641-651
- Wang,Z.X., Yano,M., Yamanouchi,U., Iwamoto,M., Monna,L., Nayasaka,H., Katayose,Y., Sasaki,T.(1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* 19 : 55-64
- Yoshimura,S., Yamaouchi,U., Katayose,Y., Toki,S., Wang, Z.X., Kono,I., Kurata,N., Yano.M., Iwata,N., Sasaki.T.(1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc.Natl .Acad. Sci* 95 : 1663-1668
- Sakamoto,K., Tada,Y., Yokozaki,Y., Akagi,H., Hayaschi,N., Fujimura,T., Chikawa,N.(1999) Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding sites and leucine-rich repeats. *Plant Mol.Biol.* 40 : 847-895
- Buschges,R., Holtricher,K., Panstruga,R., Simons,G., Wolter,M., Frijters,A., Van Daelen,R., Van der Lee,T., Diergaarde,P., Groenendijk,J., Topsch,S., Vos,P., Salamini,F., Schulze-Lefert,P.(1997) The barley *Mlo* gene : a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell.* 88. 695-705
- Dixon,M., Jones,D., Keddie,J., Thomas,C.M., Harrison,K., Jones,J.D.G(1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine rich repeat proteins. *Cell.* 84 : 451-459
- Jones,D.A., Thomas,C.M., Hammond-Korsack,K.E., Balint-Kurti,P.J., Jones,J.D.G(1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium flulvum* by transposon tagging, *Science* 266 : 789-793
- Song,W.Y., Wang.G.I, Chen,I., Kim,H.S., Pi,L,Y, Gardner,J. Wang.B., Holsten,T., Zhai ,W.X., Zhu,L,H, Fauquet.C., Ronald,P.(1996) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science* 270. 1804-1806
- Baker,B., Zambryski,P., Staskawicz,B., Dinesh-Kumar,S,P.(1999) signalling in plant-microbe interactions. *Science* 276 : 726-733
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.-H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri,F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., *et. al.*, (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L.*japonica*). *Science* 296: 92-100
- Jones, D.G.J. (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work *Current Opinion in Plant Biol.* 4: 281-287

- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R.W. (2003)
Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in Arabidopsis *The Plant Cell*
15: 809-834
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y.,
Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C.,
Tong, W., Cong, L., *et al.*, (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza*
sativa L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92

논문 발표

- 1) Sun Tae Kim, Kyu Seong Cho, Yu Sin Jang, Kyu Young Kang (2001)
Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* **22**, 2103-2109. (Impact factor : 4.2)
- 2) Sun Tae Kim, Kyu Seong Cho, Seok Yu, Sang Gon Kim, Jong Chan Hong, Chang-Deok Han, Dong Won Bae, Myung Hee Nam, Kyu Young Kang. (2003)
Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cell. *Proteomics* (In accepted) (Impact factor : 4.00)

Sun Tae Kim
 Kyu Seong Cho
 Yu Sin Jang
 Kyu Young Kang

Department of Agricultural
 Chemistry, Plant Molecular
 Biology and Biotechnology
 Research Center,
 Gyeongsang National University,
 Chinju, Korea

Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays

Two-dimensional electrophoresis (2-DE) is known as the most effective as well as one of the simplest methods for separating proteins. However, a few hundred plant leaf proteins out of thousands visualized on a 2-DE gel can be identified by chemical analysis due to the presence of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) that limits protein loading. We describe the extraction and fractionation technique with polyethylene glycol (PEG) to analyze rice leaf proteins. Rice proteins were extracted with Mg/NP-40 extraction buffer. The Mg/Nonidet P-40 (NP-40) buffer extract was further fractionated with PEG into three fractions: 10% PEG and 10–20% PEG precipitants and the final supernatant fraction that was precipitated with acetone. Rubisco, the most abundant rice leaf protein, was enriched in the 20% PEG precipitant. This fractionation technique analyzed at least 2600 well-separated protein spots and exhibited less than 1.2% of noticeable overlapping spots. An immunological approach was used to verify the efficiency whether PEG fractionation technique can detect or enrich signal transduction components such as G α , ADP ribosylation factor, small GTP binding protein and 14-3-3. The ADP ribosylation factor (ARF) and G α were only detected in the PEG supernatant fraction not in the total protein fraction. The small GTP binding protein (Rab 7) was identified in the 10% PEG fraction and only faintly in the total protein fraction. The 14-3-3 protein was detected in all fractions but was especially prevalent in the 20% PEG fraction.

Keywords: Two-dimensional electrophoresis / Polyethylene glycol fractionation / Proteomics / Rice / Rubisco
 EL 4429

1 Introduction

Since O'Farrell's [1] introduction of two-dimensional electrophoresis (2-DE), it has been known as the most effective as well as one of the simplest methods for separating proteins. The high resolution of 2-DE is useful for separating complex protein mixtures. Due to its high-resolving power, the technique has been employed in studying alterations in protein expression during development and differentiation or in response to environmental changes. 2-DE analysis has been used to establish master maps for entire organisms, tissue types, and developmental model organisms or to examine altered gene expression patterns under diverse biological processes [2–7].

The most important application of 2-DE involves effective extraction, solubilization, and denaturation to remove non-protein components. These are nucleic acids, carbohydrates, and lipids [8]. A number of modifications of the 2-DE method have been published in order to obtain more reproducible results. These include development of a high-resolution method and increased solubilization of membrane proteins using chaotropes such as urea and thiourea [9], detergents including Nonidet P-40 and CHAPS [10], and reducing agents such as β -mercaptoethanol, DTT and tributyl phosphine (TBP) [11]. Recently, Corthals *et al.* [12] have fractionated human proteins under nonreducing conditions using the reflux mode, in which proteins are fractionated according to their relative mobility under controlled electrophoresis conditions. More recent advances in 2-DE techniques have been aimed at improving and maintaining protein solubility by sequential three differential extraction buffers [13]. These methods improved solubility of membrane proteins by employing reagents with stronger solubilization power such as SB 3–10 [14], thiourea, and TBP instead of traditional solubilizing solutions made of urea, CHAPS, DTT and carrier ampholytes. These improved techniques are useful in applying proteomes and proteomics [15]. The success of the 2-DE technology for proteome analysis will rely on the ability to display more rare proteins and insoluble proteins.

Correspondence: Dr. Kyu Young Kang, Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660–701, Korea
E-mail: kykang@nongae.gsnu.ac.kr
Fax: +82-55-757-0178

Abbreviations: **Rubisco**, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase; **SB 3–10**, *N*-decyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate

In the plant leaf sample, however, Rubisco is the most abundant protein (about 50% of soluble protein) [16] that has hindered high resolution of 2-DE due to the limitations of the loading capacity on the IEF gel. Low abundance proteins present or induced in leaf samples remain difficult to analyze, despite the sensitivity of current instrumentation and high loading capacity of immobilized pH gradient strips (IPGs) [17]. Therefore, an alternative measure is necessary to enrich these proteins prior to analysis. Differential fractionation of Rubisco into a certain fraction before loading on the IEF will become an important means to expand proteome studies.

In this report, we describe a simple extraction method that compares with conventional phenol and TCA/acetone extraction method. Differential concentration of the PEG-mediated protein fractionation technique is applied to proteins extracted from leaf, callus, seed, and root to display rare proteins more effectively. We verified that PEG fractionation enables us to display more proteins and to detect low-abundance signal transduction component proteins using the Western blots analysis. This extraction and fractionation technique is simple and versatile compared with fractionation methods published earlier [12, 13] and provides more in depth comparison of protein arrays.

2 Materials and methods

2.1 Plant materials

Rice green leaves and roots of young seedlings grown in a green house were used in this study. Mature seeds were obtained from National Yeongnam Agricultural Experimentation Station.

2.2 Chemicals

Acrylamide, bisacrylamide, standard molecular weight markers and carrier ampholytes were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). SDS, TEMED, ammonium persulfate, β -mercaptoethanol and NP-40 came from Amresco (Solon, OH, USA). Goat anti-rabbit IgG-horse-radish peroxidase came from KPL (Gaithersburg, MD, USA). An ECL detection kit was purchased from Amersham (Little Chalfont, UK). All other chemicals were standard reagent-grade laboratory chemicals. Double distilled water was used for all solutions.

2.3 Protein extraction

2.3.1 Mg/NP-40 extraction

Two grams of plant tissues were placed in liquid nitrogen and then stored at -80°C . The plant tissue was transferred to a prechilled mortar, and ground with a pestle in liquid

nitrogen to a fine powder. The powder was homogenized in 10 mL of ice-cold Mg/NP-40 extraction buffer containing 0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, 2% v/v NP-40, 20 mM MgCl_2 , 2% v/v β -mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1% w/v polyvinylpyrrolidone (PVPP). After centrifugation at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4°C , proteins in the supernatant were precipitated by adding four volumes of cold acetone at -20°C for 30 min for analysis of total protein by 2-DE. After centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min, the pellets were air-dried and applied to IEF. For protein fractionation, the supernatant was subjected to PEG fractionation followed by the first dimensional IEF analysis.

2.3.2 Phenol extraction

Two grams of plant leaves grounded in liquid nitrogen were homogenized in 10 mL of ice-cold Mg/NP-40 extraction buffer containing 0.7 M sucrose. The phenol extraction method was followed by the method described earlier in Hurkman *et al.* [18].

2.3.3 TCA/acetone extraction

Two grams of plant leaves grounded in liquid nitrogen were homogenized in four volumes of cold acetone (-20°C) containing 10% w/v TCA and 0.07% v/v β -mercaptoethanol. The TCA/acetone extraction method was followed by the method described earlier by Santoni *et al.* [19].

2.4 PEG fractionation

The Mg/NP-40 buffer extracted sample was fractionated with PEG. The first and second fractions were taken from 10% w/v PEG and 10–20% w/v PEG precipitants, respectively, and the final supernatant fraction was precipitated with acetone. Each protein fraction was displayed on IEF gels. The callus, root and seed extracts were taken from 15% w/v PEG precipitants and acetone precipitated supernatant. Two grams of samples were extracted with 12 mL Mg/NP-40 buffer and followed by centrifugation at $12\,000 \times g$ for 15 min. The proteins in the supernatant were subjected to the PEG fractionation by adding a 50% w/v PEG stock solution. The 10% PEG sample was incubated on the ice for 30 min and then centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min. The precipitant was saved. The supernatant was adjusted with the 50% w/v PEG stock solution to make up 20% w/v PEG. The mixed sample was incubated on ice for 30 min and then centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min. The pellet was used for the 20% w/v PEG fraction precipitant. The final supernatant was recovered and precipitated with acetone. All pelleted fractions were solubilized in the conventional O'Farrell's solubilization buffer [1] for IEF tube gel analysis.

2.5 Two-dimensional gel electrophoresis

2-DE was performed according to O'Farrell [1] with some modifications. IEF was carried out in glass tubes, 5 mm inner diameter and 20 cm in length. The bottom of each tube was sealed with Parafilm. The IEF gel mixture consisted of a 4.5% w/v acrylamide solution, 9.5 M urea, 2% v/v NP-40, and 2.5% v/v carrier ampholytes (pH 3–10 : pH 5–8 : pH 4–6.5 = 1 : 2.5 : 3.5). To polymerize the gel, TEMED and 10% w/v ammonium persulfate were added into the gel mixture. Each tube was filled with the gel solution up to 18 cm using a Pasteur pipet and overlaid with 5 M urea. The gels were polymerized for 3 h. After the gel polymerization, the top of each gel was overlaid with a 10 μ L IEF sample buffer and preran according to the following schedule: 250 V for 20 min, 300 V for 30 min, and 400 V for 30 min. Each sample (150 μ g of protein) was mixed in the sample buffer and then loaded. IEF was performed at 600 V for 12 h, 800 V for 6 h, and then 1000 V for 3 h. The cathode buffer was 20 mM NaOH and the anode buffer was 10 mM H₃PO₄. Upon completion of IEF, the gel was extruded using a syringe and then rinsed with water. Each of the focused gel was put into a 20 mL screw cap tube with 5 mL of an equilibration buffer that contained 10% v/v glycerol, 2.5% w/v SDS, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% v/v β -mercaptoethanol and 0.1 mg/mL bromophenol blue (BPB). It was then agitated gently at room temperature for 1 h. SDS-PAGE in the second dimension was carried out as described by Laemmli [20]. The second-dimensional SDS gel was 1 mm thick and consisted of an 18 cm separation gel of 12.5% w/v acrylamide overlaid with a 1.5 cm stacking gel of 4% w/v acrylamide. The focusing gel was sealed to the SDS gel with 0.8% w/v low melting agarose in the equilibration buffer without β -mercaptoethanol. The running buffer contained 25 mM Tris (pH 8.3), 195 mM glycine, and 0.1% w/v SDS. Electrophoresis was carried out at 80 V constant voltage until the tracking dye had traversed the stacking gel and then at a 60 V constant voltage overnight until the dye had reached the bottom of the gel.

2.6 Silver staining and drying of gels

Two-dimensional gels were fixed and silver stained by the method of Blum *et al.* [21]. Before drying, gels were shaken at room temperature for 1 h in 50% v/v MeOH. The gels were then dried between two cellophane sheets.

2.7 Quantification of proteins

A small volume of solubilized protein was precipitated by four volumes of cold acetone (-20°C) containing 10% w/v TCA for 20 min at -20°C . After centrifugation at 12 000 \times g for 10 min, the pellet was rinsed with 80% v/v cold ace-

tone (-20°C). The pellet was then dried and solubilized in 1 N NaOH. Proteins were measured according to the procedure of Lowry *et al.* [22].

2.8 Data analysis

The silver-stained gels were digitized with a ScanJet 4100C scanner (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) at 150 dots per inch. Spots were detected and quantified with Bio-Rad (Richmond, CA, USA) PDQuest software on the basis of their relative volume, that is, the spot volume divided by the total volume over the whole set of gel spots. A sample gel was compared with a reference gel. Synthetic gels were made and quantified with Photoshop 5.0 software. Synthetic gels were computed for each sample by matching gel replicates.

2.9 Western blots

The PEG fractionated samples were electrophoresed by SDS-PAGE, and transferred onto a PVDF membrane with a semidry electrophoretic apparatus (Hoefer, San Francisco, CA, USA). The blotted membrane was blocked for 2 h in TTBs (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 0.1% v/v Tween 20, and 150 mM NaCl) containing 5% w/v nonfat dry milk. Antibodies used were directed against a G α of soybean, an ADP ribosylation factor of rice, a small GTP binding protein of rice and a 14-3-3 of soybean. The primary antibodies were diluted in TTBs to 1:10 000 for G α of soybean and 1:5000 in the rest of them. The antigen-antibody interaction was carried out for 2 h. After being washed (3 \times 20 min) in TTBs, the secondary goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase diluted at 1:5000 in TTBs was used for immunodetection on Western blots. After being washed in TTBs, immunoblots were detected using ECL.

3 Results and discussion

3.1 Analysis of 2-DE protein patterns of Mg/NP-40, phenol, and TCA/acetone extraction system

To test whether the Mg/NP-40 extraction system is effective, three different procedures (Mg/NP-40, phenol, and the TCA extraction system) were compared on the basis of their 2-DE analysis (Fig. 1). The phenol and the TCA/acetone extraction system reported earlier [18, 19] were broadly used for extraction of plant proteins. A comparison was made between 2-DE gels of Mg/NP-40 (Fig. 1A), phenol (Fig. 1B), and TCA/acetone extraction system (Fig. 1C). A synthetic map was made by Bio-Rad PDQuest software (Fig. 1D). From the analysis using Bio-Rad PDQuest software, approximately 987, 887, and 925 spots were resolved on a 2-DE gel after extraction with Mg/

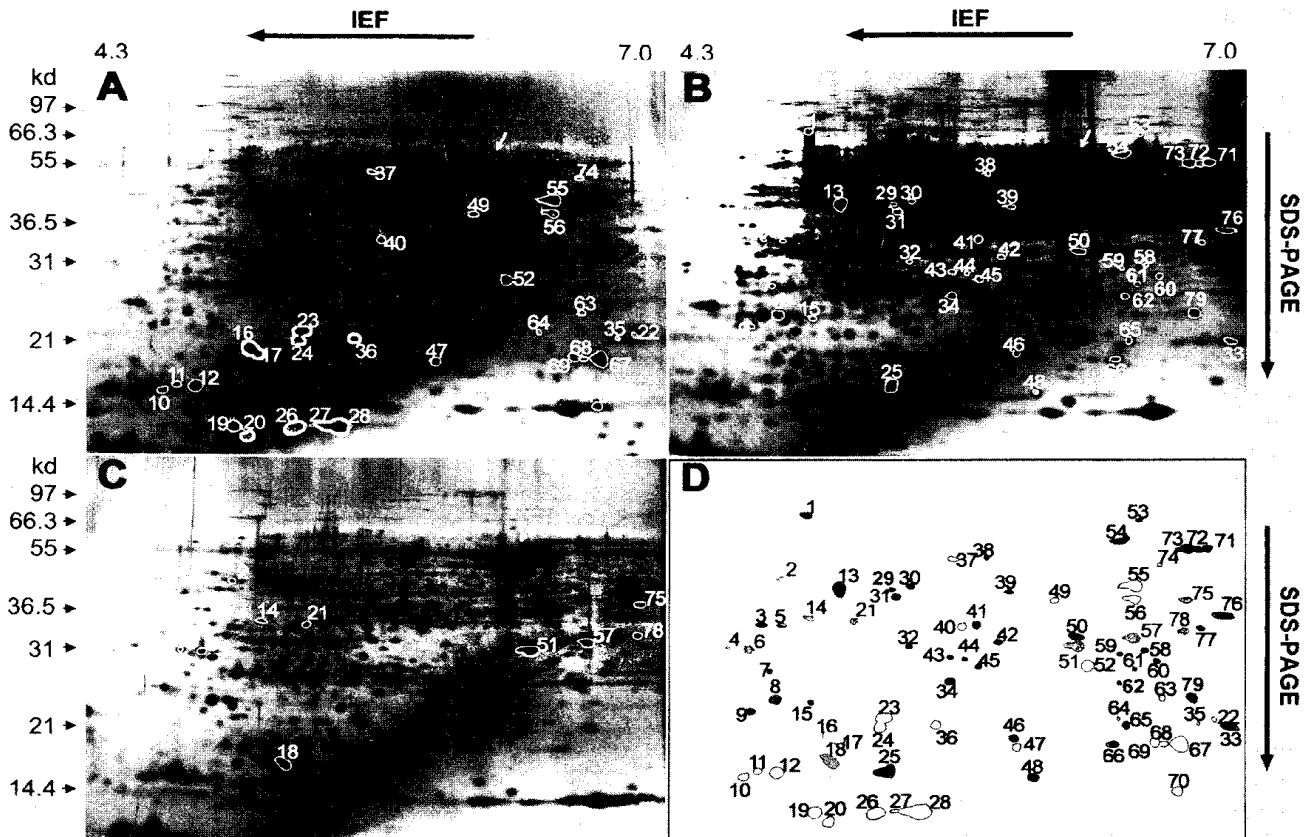


Figure 1. 2-DE analysis of rice leaf proteins extracted with three different extraction buffers. All the proteins extracted with three different extraction buffers were displayed and silver-stained; (A) Mg/NP-40, (B) phenol, and (C) TCA/acetone extraction system. An arrow indicates a large Rubisco subunit. The synthetic map shows that the spots present only in each extraction buffer system. The numbers indicate unique proteins extracted from Mg/NP-40 buffer (white spots), phenol (black spots), and the TCA extraction system (grey spots), respectively. The synthetic map was constructed with the Adobe Photoshop 5.0 software program.

NP-40, phenol, and TCA/acetone extraction buffer, respectively. The Mg/NP-40 extraction system produced more resolvable spots by reduced extraction of Rubisco which is about 50% of total soluble rice leaf protein (16) and preservation of water-soluble low-molecular-weight proteins (Fig. 1). However, the resolution of protein extracted with Mg/NP-40 buffer system in the 2-DE gels was slightly inferior to phenol or TCA/acetone extraction system. These specific proteins detected only by each of the three extraction methods, Mg/NP-40, phenol, and TCA extraction system were 29 (white spots), 40 (black spots), and 10 (grey spots), respectively.

Hurkman and Tanaka [18] reported earlier that an extraction buffer containing 4% SDS resulted in good separation of membrane proteins as well as soluble proteins in 1-D SDS gels. One disadvantage of 2-DE analysis of mem-

brane proteins solubilized by SDS was high background staining. Nucleic acids also interacted with proteins and adversely affected resolution obtained on focusing gels [23]. Nucleic acids are conventionally extracted by a two-phase phenol/buffer isolation method where proteins are partitioned in the phenol phase and nucleic acid in the aqueous phase. Recovery of proteins from the phenol phase has been used to prepare protein extracts from plant tissue for a 2-DE analysis. The phenol extraction method seemed to minimize proteolysis and optimize extraction of membrane proteins. This method resulted in the best resolution of proteins on 2-DE gels because the phenol extraction method removed nonprotein components that interfered with IEF. Disadvantages of the phenol extraction system were the presence of a large proportion of a large subunit of Rubisco and an incomplete solubility of these acetone precipitants in IEF solubilization buffer.

The TCA/acetone extraction system is simpler and cleaner than the previous one and avoids proteinase actions. Disadvantages of the TCA extraction system, like phenol extraction, were a slightly low extraction efficiency and a low solubility of an acetone precipitated sample into IEF buffer. Low solubility of acetone-precipitants from both the phenol and TCA/acetone methods in protein extraction buffer abolished PEG fractionation steps. But the Mg/NP-40 extraction system used in this study provided a simple extraction technique that brought resolution, good protein solubility, and furthermore facilitated PEG fractionation.

3.2 PEG fractionation

Proteomic studies are obvious tools of choice to complement genomic approaches [24]. However, one limitation of proteomics at present is a lack of appropriate techniques to display minor gene products due to the low sample loading capacity even though IPG strips alleviated this problem to some extent. We described a sequential process of PEG fractionation in an attempt to enrich abundant rice leaf protein, Rubisco, in a certain fraction. The Mg/NP-40 buffer extract was fractionated by increasing the concentration of PEG. The first and second fractions were taken from 10% PEG and 10 ~ 20% PEG precipitants, respectively. Proteins in the final supernatant fraction were precipitated with acetone. To validate fractionation efficiency, PEG fractionated protein samples were applied to SDS-PAGE analysis (Fig. 2). The large subunit of Rubisco (LSR) and small subunit of Rubisco (SSR) were specifically detected in the 20% PEG fraction in the SDS-PAGE gel.

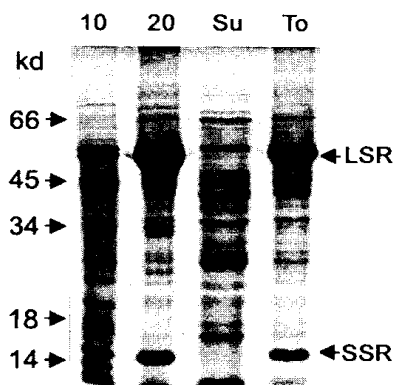


Figure 2. SDS-PAGE analysis of rice leaf proteins fractionated with PEG. The proteins from 10% PEG (10), 20% PEG (20), PEG supernatant fraction (Su), and total extracts (To) were analyzed on 12.5% SDS-PAGE. The proteins were visualized using Coomassie Brilliant Blue R-250. LSR, large subunit of Rubisco; SSR, small subunit of Rubisco.

Rice leaf proteins fractionated by the 10% PEG (Fig. 3A), 20% PEG (Fig. 3B), and PEG supernatant (Fig. 3C) were analyzed on gels using 2-DE. A synthetic map was made after data acquisition from gels of each fractionated protein (Fig. 3D). Approximately 972, 672, and 1026 protein spots were detected in the 10% and 20% PEG fractions and the PEG supernatant fraction, respectively. Nineteen proteins (no. 8–14, 16–22, 24, 28–31) marked as black spots in the synthetic map were overlapped in the 10% PEG and 20% PEG fractions. Seven proteins (no. 1, 3–7, and 15) were overlapped in the 20% PEG and PEG supernatant fractions and marked as white spots. Five proteins (no. 2, 23, 25–27) were detected in all fractions and marked as grey spots (Fig. 3D). These amount to less than 1.2% of the overlapping spots out of the 2670 protein spots separated. Rubisco again was only present in the 20% PEG fraction as shown in Fig. 2. However, broad protein spots were observed in basic regions of the gels as PEG concentration increased for fractionation. This could be the presence of PEG in protein sample that might have affected the separation on IEF gel.

To further test feasibility to detect rice low-abundance proteins fractionated with PEG, we tested them by using Western blots. Low-abundance proteins with regulatory functions such as signal transduction components were not well detected without employing an enrichment method [25]. Enrichment of rice low-abundance proteins was evaluated by subjecting SDS-PAGE Western blots to antibodies raised against known signal transduction components such as a $G\alpha$ of soybean, an ADP ribosylation factor (ARF) of rice, a small GTP binding protein of rice and a 14-3-3 of soybean. As shown in Fig. 4, the ADP ribosylation factor and $G\alpha$ were only detected in the PEG supernatant fraction, not in the total protein fraction. The small GTP binding protein (Rab 7) was identified in the 10% PEG pellet fraction but only faintly detected in the total extract fraction. The 14-3-3 protein was detected in all fractions but much more so in the 20% PEG fraction. These results suggest that the prefractionation of protein samples using PEG prior to 2-DE can assist proteome studies in general because protein samples must be enriched to allow low-abundance proteins such as signal transduction components to be available for post-separation analysis. Advantages of using PEG are that proteins were fractionated under native conditions and analysis of 2.7 times more well-separated polypeptides compared with conventional single-step analysis. PEG fractionation might provide a tool to aid applications into functional genomics. We used callus, root, and seed samples in order to test whether our PEG fractionation was an efficient method in the different tissues. The 2-DE analysis of callus, seed, and root proteins obtained with 15% PEG fractionation and 15% PEG supernatant fraction provided

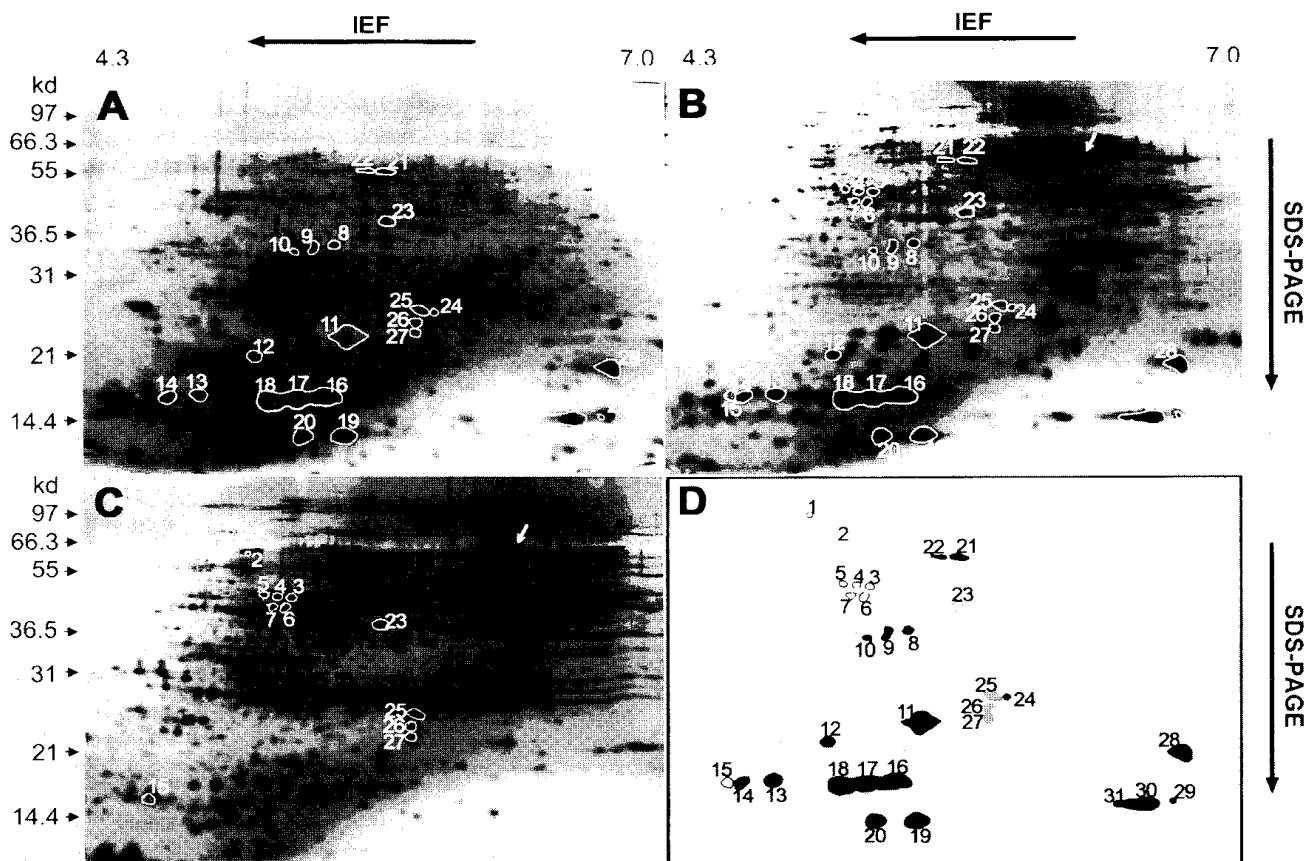


Figure 3. 2-DE analysis of rice leaf proteins fractionated with PEG. (A) The 10% PEG fraction, (B) 20% PEG fraction, and (C) PEG supernatant fractions were analyzed on 2-DE gels and silver stained. An arrow indicates a large Rubisco subunit. Overlapping protein spots that fractionated with PEG were numbered. (D) Synthetic map illustrates common spots between 10 and 20% PEG (black spots), 20% PEG and supernatant (white spots), and all fractions (grey spots). The synthetic map was constructed with the Adobe Photoshop 5.0 software program.

a high resolution of the gels similar to that of the rice leaf (data not shown). Thus, PEG fractionation can provide for versatile application methods depending on the proteins to be analyzed.

4 Concluding remarks

An improved fractionation method for analysis of plant leaf proteins on 2-DE gels has been developed by the Mg/NP-40 extraction buffer system combined with PEG fractionation. Major advantages of this fractionation method are: (i) enrichment of the most abundant leaf protein, Rubisco, into 20% PEG precipitant; (ii) analysis of 2.7 times more well-separated protein spots compared with single-step 2-DE analysis, which highlights proteome analysis in future research; and (iii) versatility of fractionation steps depending on samples to be analyzed. Rubisco

is one of the limiting factors of work on proteomics from proteins of plant leaves. This extraction and fractionation technique gave low amounts of Rubisco and was enriched specifically only in 20% PEG precipitant fraction. Approximately 1.2% out of the 2600 total proteins analyzed was overlapped between the PEG-fractionated protein arrays. This indicates that the PEG fractionation technique is superior to the ammonium sulfate or sucrose gradient fractionations. Western analysis results also confirmed the enrichment of low-abundance proteins such as transcription factors and signal transduction component proteins.

The authors thank Dr. Sang Yeol Lee for providing anti-Gα, Dr. Jong Chan Hong for providing anti-14-3-3, Dr. Jeong Dong Bahk for providing anti-Rab7, and Dr. Chae Oh Lim for providing anti-ARF. The authors also express thanks to Dr Yunbae Pak for his critical reading and discussion

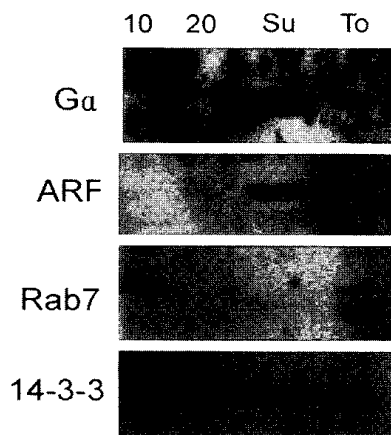


Figure 4. Western blot analysis of PEG fractionated protein samples. Thirty μg of each proteins from 10% PEG fraction (10), 20% PEG fraction (20), PEG supernatant fraction (Su), and total fraction (To) were separated by SDS-PAGE and blotted. The membranes were probed with anti-G α , anti-ARF, anti-Rab7, anti-14-3-3 antibodies as described in Section 2.9. Immunoblots were detected using ECL.

of the text. This work was supported by Research Fund from Korea Science and Engineering Foundation to PMBBRC, Agricultural R&D Promotion Center, and the Brain Korea 21 Program.

Received November 16, 2000

5 References

- [1] O'Farrell, P. H., *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.
- [2] Celis, J. E., Olsen, E., *Electrophoresis* 1994, 15, 309–344.
- [3] Garrels, J. I., Futcher, B., Koboyashi, R., Latter, G. I., Schwender, B., Volpe, T., Warner, J. R., McLaughlin, C. S., *Electrophoresis* 1994, 15, 1466–1486.
- [4] Van Bogelen, R. A., Sanker, P., Clark, R. L., Bogan, J. A., Neidhardt, F. C., *Electrophoresis* 1992, 13, 1014–1054.
- [5] Latham, K. E., Garrels, J. I., Chang, C., Solter, D., *Appl. Theor. Electrophor.* 1992, 2, 163–170.
- [6] Ji, H., Whitehead, R. H., Reid, G. E., Moritz, R. L., Ward, L. D., Simpson, R. J., *Electrophoresis* 1994, 15, 391–405.
- [7] Honore, B., Leffers, H., Madsen, P., Celis, J. E., *Eur. J. Biochem.* 1993, 218, 421–430.
- [8] Rabilloud, T., *Electrophoresis* 1996, 17, 813–829.
- [9] Rabilloud, T., *Electrophoresis* 1998, 19, 758–760.
- [10] Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A.-C., Miller, M. J., Merril, C. R., *Anal. Biochem.* 1988, 173, 424–435.
- [11] Herbert, B. R., Molloy, M. P., Gooley, A. A., Walsh, B. J., Bryson, W. G., Williams, K. L., *Electrophoresis* 1998, 19, 845–851.
- [12] Corthals, G. L., Molloy, M. P., Herbert, B. R., Williams, K. L., Gooley, A. A., *Electrophoresis* 1997, 18, 317–323.
- [13] Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L., Gooley, A. A., *Electrophoresis* 1998, 19, 837–844.
- [14] Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J., *Electrophoresis* 1997, 18, 307–316.
- [15] Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F., *Nat. Biotechnol.* 1996, 14, 61–65.
- [16] Des Francs, C. C., Thiellement, H., Vienne, D. D., *Plant Physiol.* 1985, 78, 178–182.
- [17] Davidsen, N. B., *Electrophoresis* 1996, 17, 1280–1281.
- [18] Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., *Plant Physiol.* 1986, 81, 802–806.
- [19] Santoni, V., Bellini, C., Caboche, M., *Planta* 1994, 192, 557–566.
- [20] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [21] Blum, H., Beier, H., Gross, H. J., *Electrophoresis* 1987, 8, 93–99.
- [22] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265–275.
- [23] Blackstock, W. P., Weir, M. P., *Trends Biotech.* 1999, 17, 121–127.
- [24] Dunn, M. J., Burghes, A. H. M., *Electrophoresis* 1983, 4, 97–116.
- [25] Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R., *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, 1720–1730.

주 의

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