

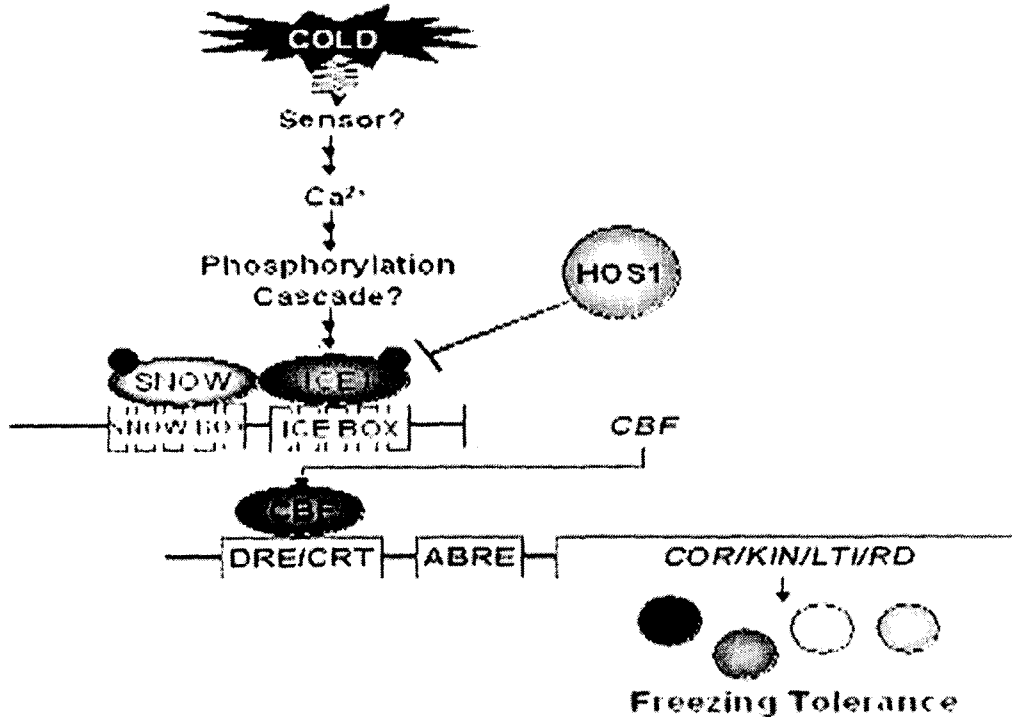
Characterization of mutant with defects in environmental signaling pathways

고려대학교 생명환경과학대학 생명유전공학부

이호정

식물의 생육에는 여러 가지 중요한 환경적 인자들이 관여하고 있는데 그 중에서도 저온은 식물의 성장 및 발달에 큰 영향을 끼친다. 그러나, 식물의 종에 따라 그 반응에는 큰 차이가 있는 것으로 보여진다. 즉, 어떤 식물들은 저온에 순화하는 기작을 보유하고 있어 1-10℃ 정도의 (종에 따라 다름) 저온에 노출된 뒤에는 영하의 (-1 에서 -30) 온도에도 거뜰히 살아남는 종 (겨울 밀 등이 이에 속함)이 있는 반면, 벼와 같이 4℃ 정도의 저온에도 바로 시들어 고사하는 종이 있다. 이러한 현상은 식물의 어떤 종은 열악한 환경에 적응할 수 있도록 발전해온 반면, 벼 등의 경제 작물은 오랜 기간의 인류에 의한 선택적 육종으로 말미암아 환경 적응도를 위한 과정이 덜 발전했다고 볼 수 있다. 식물의 환경 스트레스 저항성은 물론 저온/고염/ABA에 대한 기작만이 연루될 수도 있으나 상당 부분은 다른 스트레스, 즉 heat stress 나 reactive oxygen species (ROS) 등에 의한 현상과 cross-talk이 일어날 수도 있다. 환경 스트레스에 관련된 다양한 유전자들의 발견은 식물의 생산성 증가에 큰 걸림돌이 될 수 있는 여러 스트레스에 대한 기작을 이해하는데도 도움이 될 것이며, Arabidopsis 연구 결과로 얻어진 이런 유용유전자들은 다른 경제 작물로의 이전이 가능하며 유사 유전자를 찾는 데 기여할 것으로 전망된다.

식물의 abiotic stresses에 관한 연구는 현재 상당한 진척을 보이고 있는데, 지금까지의 식물의 저온 저항성에 대한 연구 결과를 살펴보면 다음의 그림과 같이 요약될 수 있다



식물의 저온 저항성은 유전자에 그 정보가 암호화되어 있으며, 매우 많고도 다양한 생화학적, 생리학적인 변화들이 이에 수반되는 것으로 알려져 있다 (10, 15). 예를 들면, 식물의 세포 내 ultrastructure, 막구성 성분, 단백질 조성, 효소 활성, sugar/polyamines 축적량 등에 큰 변화를 초래

하는 것으로 알려져 있다 (1, 2, 10). 식물 호르몬의 일종인 abscisic acid (ABA)가 식물의 여러 환경 스트레스 방어 기작에 관여하는데, 이는 저온과 같은 스트레스 처리 시 이 호르몬의 양이 증가하며, ABA 처리 시 식물의 저온에 대한 저항성이 현저히 증가함으로 알 수 있다 (4). 또한 저온에 의해서 여러 가지의 다양한 식물 유전자들이 발현되는 것으로 알려져 있다 (3, 5, 11, 14, 17). 이들은 *COR* (for cold regulated), *KIN* (for cold induced), *LTI* (for low temperature induced) 혹은 *RD* (for responsive to desiccation) 라고 일반적으로 불리는데 그 이름의 다양성에서 알 수 있듯이 그 종류가 매우 많다. 저온 유도 유전자의 기능은 정확하게 알려져 있지는 않지만 이들을 과 발현시켰을 때 식물의 저온 저항성이 증가함이 보고되어 있다.

COR/KIN/LTI 유전자들의 발현에는 여러 신호 전달 인자들이 관여함이 식물의 저온 저항성에 이상을 보이는 *Arabidopsis* 돌연변이체 연구 결과로 밝혀졌다 (6, 9). 즉, 기존의 한 저온 유도 유전자, 즉 *RD29A*의 promoter 영역을 luciferase라는 reporter 유전자에 접합시켜 만든 transgenic plant를 대량으로 돌연변이시켜 얻은 결과에 따르면 식물의 저온에 대한 반응은 상당량의 유전자와 관련되며 그 신호 체계 또한 아주 복잡하다는 것이다 (7, 8, 12, 13, 16).

아라비답시스의 한 돌연변이인 *los2*는 저온 유도 유전자의 발현, 냉해 저항성, 저온 저항성의 획득이 현저히 떨어지는 형질을 보이는 것에 근거하여 선발된 EMS 돌연변이체이다. *los2* 돌연변이는 저온 노출시 발현되는 일련의 유전자들이 거의 발현되지 않는 특성에 비추어볼 때 이들 유전자의 발현 조절에 관여하는 인자로 추정된다. 전통적인 Positional cloning 방법을 통하여 *LOS2*를 확인한 결과 glycolytic pathway에 기능하는 enolase를 만드는 유전자임을 밝혔다. 기본대사에 관여하는 enolase가 저온에 의해 유도되는 유전자들의 발현을 어떻게 조절하는 지를 알기 위하여 살펴본 결과 동물 시스템에서 수행된 연구 결과에 의하면 Enolase가 c-myc 이라는 유전자의 promoter에 결합하여 그의 발현을 조절하는 전사조절자로(transcription factor) 기능한다고 보고되어 있다. 더 나아가, 식물에서 발현되는 enolase, 즉 *LOS2*가 암호화하고 있는 유전자의 기능을 유추 및 분석하기 위해 *LOS2* 단백질의 세포 내 존재 기관을 알아내기 위하여 green fluorescent protein(GFP)에 *LOS2* 유전자를 접합시켜 발현 분석을 실시한 결과 핵 및 세포질 내에 *LOS/enolase*가 분포하고 있음을 확인하였는데 이는 *LOS2* 단백질이 enolase의 기능뿐 만이 아니라 동물 세포에서의 경우와 마찬가지로 전사 조절자의 기능을 할 수도 있음을 시사한다고 하겠다. *LOS2/enolase*가 전사조절자로 작용한다면 이 단백질이 식물 유전자의 특정 프로모터에 결합하게 될 것이다. 그 결합 가능한 아라비답시스 내의 target promoter를 genebank data 시스템에서 조사한 결과 *STZ/ZAT10* 이라고 알려진 a zinc finger motif를 가지는 전사조절 억제자 (transcriptional repressor)의 promoter에 결합할 가능성이 있음이 확인되었다. *STZ/ZAT10* 유전자 자체가 저온에 의하여 발현이 순간적으로 증가하는 것이 확인되었는데 이 발현이 *los2* 돌연변이체에서는 지속적임이 확인되었다. Transient gene expression 기술을 이용하여 조사한 결과 *STZ/ZAT10* 이 *RD29A-LUC* reporter gene의 발현을 억제하는 것으로 나타났는데 이는 *LOS2* 단백질이 *STZ/ZAT10*의 발현을 억제함으로써 결과적으로 *RD29A*와 같은 저온 유도 유전자의 발현을 조절하는 것으로 결론지을 수 있다.

참고문헌

1. Chilling-induced wilting and hydraulic recovery in mung bean plants. *Plant Cell Environ.*, 6, 457464. (1983)
2. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, 4, 215223 (1993)
3. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.*, 124, 18541865. (2000)
4. Detection of polypeptides associated with the cold acclimation process in spinach. *Electrophoresis*, 9, 787-796 (1988)
5. Genetic analysis of osmotic and cold stress in *Arabidopsis thaliana* : interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, 9, 19351949. (1997)

6. *HOS1*, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 11511161. (1998)
7. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280, 104106 (1998)
8. The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the *CRT/DRE* sequence motif. *Plant Cell*, 11, 875886. (1999)
9. The *Arabidopsis HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.*, 15, 912924. (2001)
10. Responses of Plants to Environmental Stress, Vol. 1: Chilling, Freezing and High Temperature Stress. Academic Press, New York, NY, pp. 137141. (1980)
11. The *Arabidopsis CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.*, 119, 463470. (1999)
12. *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 62086212. (1993)
13. Mode of action of *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 1457014575. (1998)
14. *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 10351040 (1997)
15. Plant cold acclimation freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 571599. (1999)
16. *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 77997804 (1998)
17. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6, 251264. (1994)