

# 벼의 잎 조직에서 발현되는 저온 스트레스 관련 단백질의 분리 동정

이동기 · 이상훈 · 이병현\*

## Identification of Cold Stress-related Proteins in Rice Leaf Tissue

Dong-Gi Lee, Sang-Hoon Lee and Byung-Hyun Lee\*

### ABSTRACT

To investigation protein expression pattern in rice leaves exposed to cold stress, the soluble proteins extracted from leaf tissue were fractionated with 15% PEG and separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE).

Differentially expressed proteins were identified by peptide mass fingerprinting using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Eight proteins up-regulated and 10 down-regulated were found in 15% PEG supernatant fraction. In addition, 13 proteins up-regulated and 14 down-regulated were found in 15% PEG pellet fraction. It was identified the differentially expressed proteins in 15% PEG supernatant fraction as pimerase/dehydratase, fructokinase, ribose-5-phosphate isomerase (Rpi), chaperonin 21 precursor, probable photosystem II oxygen-envolving complex (PS II OEC) protein 2 precursor and thioredoxin h-type (Trx-h) and those in 15% PEG pellet fraction as OSJNBb0059K02.15, hypothetical protein, putative mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK), beta 7 subunit of 20S proteasome, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit. These proteins are involved in metabolism, energy, protein synthesis, disease/defense and signal transduction-related proteins.

(Key words : Cold stress, Molecular breeding, MALDI-TOF, Proteome)

### I. 서 론

식물에 있어서 저온 스트레스는 식물체의 생장 및 생산성에 큰 영향을 미치는 환경요인 중 하나이며, 특히 열대 또는 아열대 식물들은 저온에 대한 적응성이 약해, 저온 스트레스에 처했을 때 적응하지 못하고 죽거나 심한 장애를 받는 것으로 알려져 있다(Guy, 1990). 이러한 식물의 저온 스트레스에 대한 반응기구를 밝히기 위해서 지금까지 많은 연구가 수행되어져

왔으며, 이러한 다양한 연구의 결과들은 작물의 저온 스트레스 저항성을 증가시킨 신품종 개발을 위한 자료로 활용되어져 오고 있다 (Xiong 등, 2002).

프로테오믹스는 단백질 수준에서 유전자 발현에 대한 특성을 파악하고, 직·간접적인 외부환경의 변화에 따른 단백질 발현에 대한 정보를 획득할 수 있는 새로운 기술로서 단백질 발현, 발현 후 수식 및 기능해명에 유용한 기술이라 할 수 있다 (Pandy 및 Mann 2000). 이

경상대학교 응용생명과학부(Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea.

Tel : 055-751-5418, Fax : 055-751-5410, E-mail : hyun@nongae.gsnu.ac.kr

러한 프로테옴 분석은 이차원전기영동 (2-DE) 을 통하여 특정 조건에 따라 다르게 발현되는 단백질을 net charge와 분자량에 따라 분리 한 후 각각의 단백질을 질량분석기로 분석하여 아미노산 서열을 결정하고, 이를 바탕으로 단백질 또는 genome database를 bioinformatics tool로 찾아 단백질의 정체를 확인하는 과정으로 구성된다 (Rabilloud, 2002). 따라서 식물에 있어서 저온 스트레스 환경 하에서 차별적으로 발현되는 단백질들을 프로테옴 분석을 통하여 동정함으로써 저온 스트레스 조건 하에서 실제적으로 기능하는 유전자들을 효율적으로 동정하는 것이 가능할 것이다.

우리나라에 있어서 벼는 가장 중요한 식량작물로 재배되어 왔으며, 최근에는 가축 사료용 품종의 개발도 활발히 진행되고 있다. 또한 벼는 게놈연구에 있어서 화본과식물의 모델식물로 많이 이용되고 있어서, 최근에는 전체 게놈의 염기서열이 밝히는 genome project가 거의 완성단계에 있어 database가 잘 갖추어져 있다. 따라서 genome database 정보가 많이 축적되어 있는 벼를 모델로 하여 프로테옴 분석을 실시하면 저온 특이적인 유전자를 쉽게 동정할 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 저온재해 저항성 신 품종개발에 효율적으로 활용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 벼에 있어서 저온 스트레스 특이적인 발현을 보이는 단백질을 이차원전기영동으로 분리한 후, MALDI-TOF MS를 이용하여 동정함으로써 저온 스트레스 관련 유전자들을 확보하고 이들의 기능을 규명하며, 나아가 이 유전자들을 이용한 저온재해 저항성 신 품종 개발을 위한 자료를 확보하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 저온처리

저온관련 단백질 분석을 위한 재료로는 영남 농업연구소에서 분양받은 동진벼 (*Oryza sativa*

L. cv. Dongjin-byeo)를 사용하였다. 벼 종자를 스포탁 유제 (Samgong, Korea)를 사용하여 12~16 시간 표면살균 후, 증류수로 충분히 세정한 후 2일간 30°C 암 조건에서 발아를 유도하였다. 발아시킨 종자는 tray 위에 균일하게 파종하여 30°C/30°C, 16 h light/8 h dark, 15,000 lux, 상대습도 50~60% 조건으로 growth chamber에서 20일간 수경재배 하였다 (Nakamura 등, 1993). Growth chamber에서 20일간 생육시킨 유묘를 10°C에서 0, 1, 3 및 5일 동안 저온처리한 후, 시료를 채취하여 액체질소로 동결시킨 후 -80°C에 보관 하였다.

### 2. Total soluble protein의 추출

저온처리 후 약 1 g의 잎 조직을 채취하여 액체질소로 완전히 파쇄한 후 10 mL의 단백질 추출 buffer [0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, 2% NP-40, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 4% β-mercaptoethanol] (NP-40 buffer)를 첨가하여 균질화한 후 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하였다 (Kim 등, 2001).

### 3. PEG (Polyethylene glycol) fractionation 및 phenol 추출

대부분의 식물에 있어서 total soluble protein의 약 50% 차지하는 Rubisco 단백질을 효과적으로 제거하여 세포내의 미량 단백질의 분석능력을 높이기 위해 Kim 등 (2001)의 방법을 약간 변형하여 15% PEG pellet 분획으로 enrichment 시켰다. 잎에서 추출한 total soluble protein에 50% w/v PEG stock solution을 첨가하여 4°C에서 30분간 정치 후, 12,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 15% PEG fractionation 한 상등액 분획은 O'Farrell's solubilization buffer에 용해시키고 Lowry 방법을 이용하여 단백질 농도를 결정한 후 일차원 전기영동에 이용하였다. 15% PEG pellet 분획은 NP-40 buffer와

phenol을 첨가하여 단백질을 추출하였다(Lowry 등, 1951; Kim 등, 2001; O'Farrell 1975).

#### 4. 일차원 전기영동(2-DE)과 image analysis

일차원 전기영동은 O'Farrell (1975)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 일차원 전기영동은 직경 2 mm, 길이 23 cm의 glass tube로 수행하였다. 일차원 전기영동을 위한 gel 용액은 4.5% polyacrylamide solution, 9 M urea, 2% NP-40, 2.5% carrier ampholytes (pH 3~10:pH 5~8:pH 4~6.5 = 1:3.5:2.5), 0.02% ammonium persulfate, 0.07% TEMED로 조제하였다. 각각의 단백질 시료는 170 µg 씩 loading하고 일차원 전기영동을 실시하였다. 일차원 전기영동은 250 V 에서 30분, 300 V에서 30분, 400 V에서 30분, 600 V에서 12시간, 800 V에서 6시간, 1000 V에서 3 시간 동안 focusing을 수행하였다. 일차원 전기영동이 끝난 gel은 5 mL의 equilibration buffer [10% glycerol, 2.5% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% CBB R-250]로 평형시킨 후, 12% SDS-PAGE로 일차원 전기영동을 실시하였다 (Kim 등, 2001).

일차원 전기영동이 끝난 gel의 silver staining은 Blum 등 (1987)의 방법에 준하여 실시하였으며, Coloidal Coomassie Blue 염색은 전기영동이 끝난 gel을 Neuhoff 등 (1988)의 방법에 준하여 실시한 후, 특이적인 단백질을 gel에서 잘라내어 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 동정에 사용하였다. 염색이 끝난 gel은 GS-800 densitometer scanner (Bio-Rad)로 scan한 뒤 전용 이미지 분석 프로그램인 PDQuest (Bio-Rad, Ver. 7.2)를 이용하여 비교 분석하였다.

#### 5. 단백질 동정

단백질 동정은 MALDI-TOF MS 방식인 Voyager<sup>TM</sup>-DE STR Biospectrometry Workstation을 사용해 분석하였고, Jensen 등 (1999)의 방법으로

시료를 처리하였다. Standard solution에 사용된 peptide는 Sigma에서 구입한 Bradykinin, Neurotensin을 이용하였다. 최소 질량값은 500 m/z로 사용하였고, 질량값 측정 후에 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)를 이용하여 단백질을 동정 하였다. Search parameter로 적용된 것은 다음과 같다. Sequence database는 NCBI를 이용하였고, mass tolerance는 50 ppm 이하로, miss cleavage는 1로 적용했다. 그리고 carbamidomethylation에 의한 cysteine의 alkylation과 N-terminal acetylation, 그리고 N-terminal glutamine의 pyroGLU 등의 변형이 고려되었다.

### III. 결과 및 고찰

저온처리한 벼의 단백질 발현 양상을 분석하기 위하여, 10°C의 저온처리를 한 것으로부터 분리된 total soluble 단백질을 15% PEG로 fractionation하여 상등액 및 pellet 분획을 2-DE 분석 하였고, silver staining을 이용하여 염색을 실시하였으며, PDQuest software를 이용하여 분석하였다. 분리된 단백질을 전개시킨 gel을 대조구와 비교한 결과 15% PEG 상등액에서는 8개의 단백질 spot이 증가하였고, 10개의 단백질 spot이 감소하여 총 18개의 단백질 spot이 변화를 보였으며 (Fig. 1), 15% PEG pellet 분획에서는 13개의 단백질 spot이 증가 하였고, 14개의 단백질 spot이 감소하여 총 27개의 단백질 spot이 변화를 보인 것으로 관찰되었다 (Fig. 2). 대부분의 변화를 보인 단백질 spot들은 저온처리시간에 따라 점진적인 증가 또는 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3, 4). 이와 같이 저온처리 후의 발현양이 증가 또는 감소하는 단백질 spot을 gel에서 잘라내어 trypsin처리 후 in-gel digestion 과정을 거쳐 추출된 peptides를 MALDI-TOF MS 분석을 실시하여 단백질을 동정하였다. 그 결과 10°C 저온 처리 후 15% PEG 상등액에서 점진적으로 발현양이 증가된 8개의

Table 1. Identification of differentially expressed proteins from rice leaf tissue in 15% PEG supernatant fraction at cold treatment

Spot No./ Protein change	SC(%) <sup>a</sup>	Mr (Da)/pI	Identification of protein	Species	GenBank <sup>b</sup>
1/Up			ND <sup>c</sup>		
2/Down			ND		
3/Down	11	57230/5.6	Putative TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	Rice	AAT77033
4/Down	36	46643/6.0	Glutamine synthetase shoot isozyme, chloroplast precursor	Rice	P14655
5/Down	9	56475/6.3	Putative aminotransferase	Rice	AAQ14479
6/Up	29	42779/5.7	Putative epimerase/dehydratase	Rice	NP_921492
7/Down	21	47111/6.2	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Rice	BAA85402
8/Down	30	47111/6.2	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Rice	BAA85402
9/Down	21	41009/7.7	Putative mRNA binding protein precursor	Rice	BAC83225
10/Up	27	43455/6.0	Fructokinase	Rice	BAD38154
11/Down	13	49485/5.4	Betanidin-5-O-glucosyltransferase-like	Rice	BAD53422
12/Down	14	34282/10.2	Hypothetical protein	Rice	BAD81285
13/Up			ND		
14/Up	26	26973/4.9	Ribose-5-phosphate isomerase (Rpi)	Rice	BAC83440
15/Up	22	26319/7.7	Chaperonin 21 precursor	Rice	BAD35228
16/Down			ND		
17/Up	12	26939/8.7	Photosystem II oxygen-envolving complex (PS II OEC) protein 2 precursor	Rice	NP_911136
18/Up	39	13156/5.2	Thioredoxin <i>h</i> -type (Trx- <i>h</i> )	Rice	Q42443

<sup>a</sup> SC, sequence coverage.

<sup>b</sup> Accession number of NCBI database.

<sup>c</sup> ND, Not detected.

단백질 spot 중에서 6개의 단백질 spot이 동정되어졌으며, 감소된 10개의 단백질 spot 중에서 8개의 단백질 spot이 동정되어졌다 (Table 2).

동정되어진 단백질을 그 기능별로 분류해 보면 세포대사관련 단백질로서 glutamine synthetase shoot isozyme, chloroplast precursor (spot 4), putative aminotransferase (spot 5), putative epimerase/dehydratase (spot 6), betanidin-5-O-glucosyl-

transferase (spot 11), energy에 관련된 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; spot 7, 8), fructokinase (spot 10), ribose-5-phosphate isomerase (Rpi; spot 14), photosystem II oxygen-envolving complex (PS II OEC) protein 2 precursor (spot 17), 단백질 합성에 관련된 mRNA binding protein precursor (spot 9), disease/defense에 관련된 TCP-1/cpn60 chaperonin family protein (spot 3), chaperonin 21 precursor (spot 15), 산

회환원 조절관련 단백질인 thioredoxin h-type (spot 18) 및 아직까지 그 기능이 알려져 있지 않은 hypothetical protein (spot 12) 등의 단백질을 확인할 수 있었다. Ribose-5-phosphate isomerase (Rpi; EC 5.3.1.6)는 pentose phosphate 경로 및 Calvin cycle에서 ribose-5-phosphate 와

ribose-5-phosphate로 상호 변환시키는 중요 효소로서 세포내에 다량으로 존재하는 것으로 알려져 있다 (Zhang 등, 2003). 저온 스트레스에 의해 손상을 가장 많이 받는 곳 중의 하나는 엽록체로 알려져 있다. 따라서 저온 스트레스에 의해 광합성 반응과 관련된 Rpi 단백질의

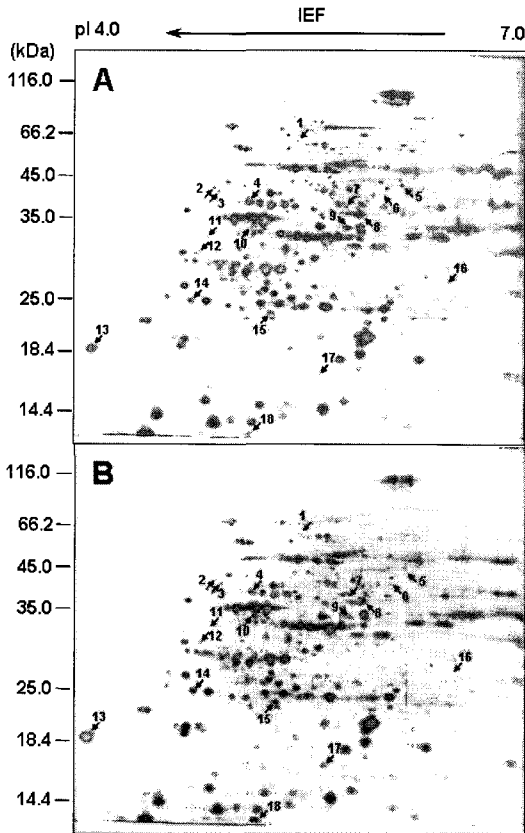


Fig. 1. 2-DE analysis of PEG-fractionated proteins induced by cold treatment in rice leaf tissue. Protein samples (170  $\mu$ g) in 15% w/v PEG supernatant fractions were separated on 2-DE gels (pI4-7), and silver-stained. Arrow indicated up- or down-regulated proteins after cold treatment. The relative Mr are indicated on the left side in kDa. The number of each protein spot (1-18) corresponds to its listing in Table 1. A, control (30°C); B, 10°C for 5 days.

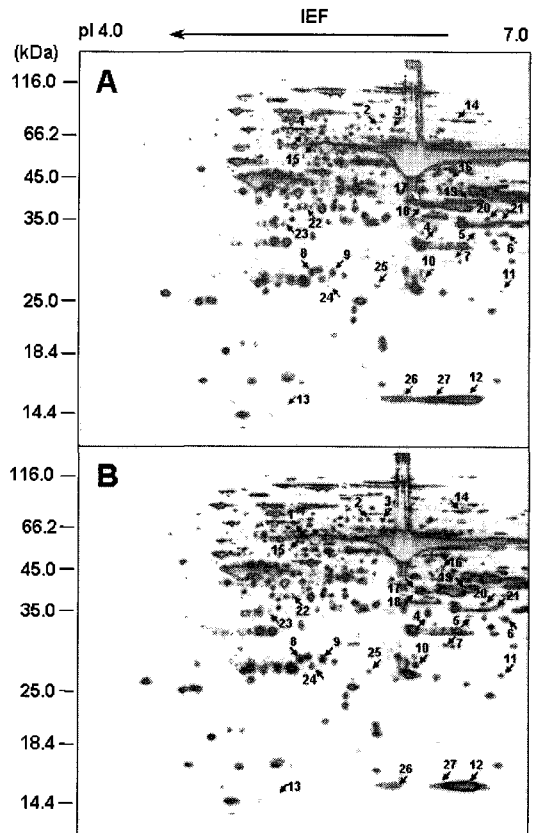


Fig. 2. 2-DE analysis of PEG-fractionated proteins induced by cold treatment in rice leaf tissue. Protein samples (170  $\mu$ g) in 15% w/v PEG pellet fractions were separated on 2-DE gels (pI 4-7), and silver-stained. Arrow indicated up- or down-regulated proteins after cold treatment. The relative Mr are indicated on the left side in kDa. The number of each protein spot (1-27) corresponds to its listing in Table 2. A, control (30°C); B, 5°C for 5 days.

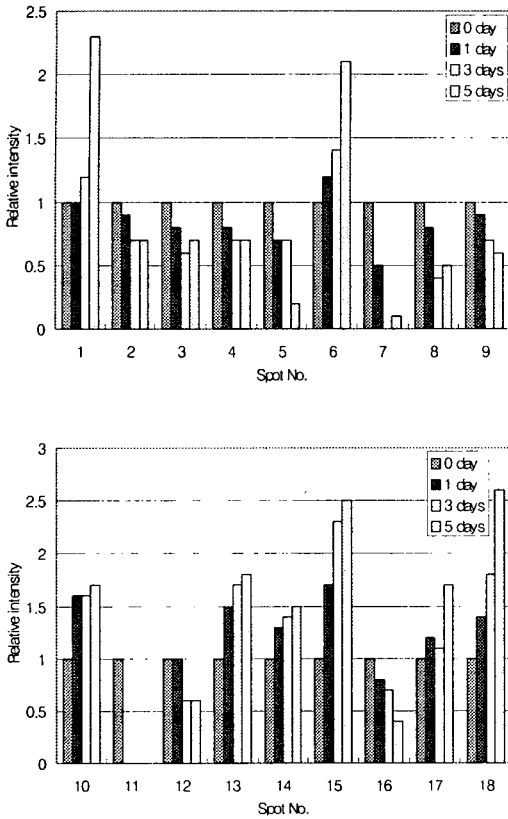


Fig. 3. The expression level of up- and down-regulated proteins compared to those of controls in Fig. 1. The intensities of up- and down-regulated proteins were measured using a densitometer (Bio-Rad) and compared to those of the controls.

발현이 증가되었다는 것은 저온 스트레스에 적응하기 위해 필요한 에너지를 계속적으로 생산하여 저온 스트레스를 극복하기 위한 것으로 예상되어진다.

Thioredoxin은 저분자 단백질로서 세포 내의 산화환원조절에 관여하며 원핵생물에서 진핵생물에 이르기까지 모든 생물체에 존재하는 것으로 알려져 있다 (Gelhaye 등, 2004). Thioredoxin h의 경우 종자 건조 및 발아 기간 동안 산화스트레스에 대한 보호기능을 담당할 뿐만 아니라 (Serrato 및 Cejudo, 2003), peroxire-

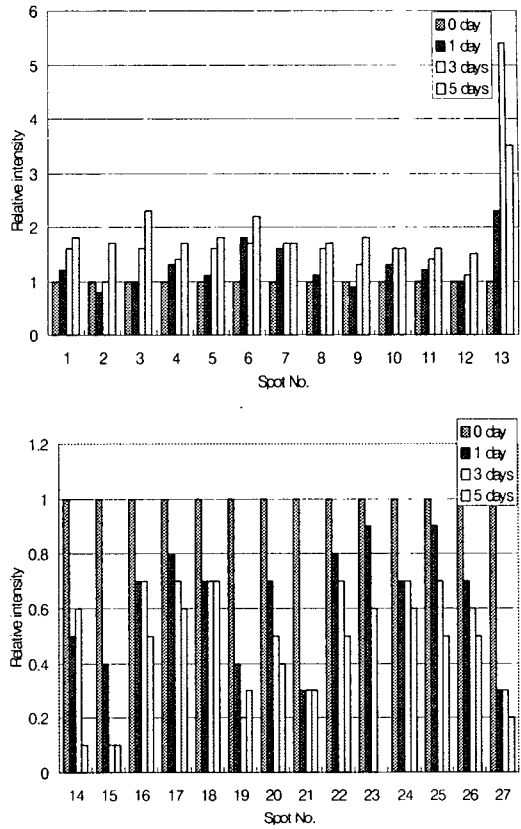


Fig. 4. The expression level of up- and down-regulated proteins compared to those of controls in Fig. 2. The intensities of up- and down-regulated proteins were measured using a densitometer (Bio-Rad) and compared to those of the controls.

doxin, methionine 와 같은 항산화관련 효소에 electron donor로서의 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Gelhaye 등, 2003; Jung 등, 2002; Rivera- Madrid 등, 1995; Rouhier 등, 2001). 따라서 벼의 thioredoxin은 저온에 의한 산화스트레스 극복에 중요한 기능을 담당할 것으로 예상되어진다.

한편 10°C 저온처리 후 15% PEG pellet 분획에서 점진적으로 발현양이 증가된 13개의 단백질 spot 중에서 5개의 단백질 spot이 동정되었 으며, 감소된 14개의 단백질 spot 중에서 6개

의 단백질 spot이 동정되어졌다 (Table 2). 동정된 단백질은 신호전달에 관련된 putative mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK; spot 9), 단백질 합성에 관련된 20S proteasome의

Table 2. Identification of differentially expressed proteins from rice leaves in 15% PEG pellet fraction at cold treatment

Spot No./Protein change	SC(%) <sup>a</sup>	Mr (Da)/pI	Identification of Protein	Species	GenBank <sup>b</sup>
1/Up			ND <sup>c</sup>		
2/Up			ND		
3/Up	13	63965/6.8	OSJNBb0059K02.15	Rice	CAE04505
4/Up	12	48194/6.5	Hypothetical protein	Rice	NP_909713
5/Up			ND		
6/Up			ND		
7/Up			ND		
8/Up			ND		
9/Up	13	32737/7.1	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK)	Rice	BAD35811
10/Up					
11/Up	13	28477/7.1	Beta 7 subunit of 20S proteasome	Rice	BAA96839
12/Up	60	14949/6.6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit	Synthetic construct	CAA59218
13/Up			ND		
14/Down			ND		
15/Down	10	41439/6.1	OSJNBa0013K16.10	Rice	CAE03761
16/Down	19	27991/4.9	OJ1354_H07.109 gene product	Rice	XP_507359
17/Down	15	36773/6.3	OJ000223_09.15	Rice	CAE02009
18/Down	16	42716/7.6	OSJNBa0036B21.24	Rice	CAD40906
19/Down			ND		
20/Down			ND		
21/Down			ND		
22/Down			ND		
23/Down			ND		
24/Down			ND		
25/Down			ND		
26/Down	28	14949/6.6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit	Synthetic construct	CAA59218
27/Down	39	14949/6.6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit	Synthetic construct	CAA59218

<sup>a</sup> SC, sequence coverage.

<sup>b</sup> Accession number of NCBI database.

<sup>c</sup> ND, Not detected.

beta 7 subunit (spot 11), energy 대사에 관련된 ribulose-1,5-biosphosphat carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit (spot 12, 26, 27), 기능을 알 수 없는 OSJNBb0059K02.15 (spot 3), hypothetical protein (spot 4), OSJNBa0013K16.10 (spot 15), predicted OJ1354\_H07.109 gene product (spot 16), OJ000223\_09.15 (spot 17) 및 OSJNBa0036B21.24 (spot 18) 등으로 확인되었다.

식물 잎 단백질을 분석할 경우 가장 어려운 점의 하나는 잎의 전체 수용성 단백질의 약 50%를 차지하는 Rubisco 단백질의 제거이다. 대개의 경우 일차원 전기영동 IEF gel에 loading 할 수 있는 단백질의 총량이 1 mg 이하이므로, 대부분의 house keeping abundant 단백질만 분석하게 된다. 따라서 rare protein인 신호전달이나 활성조절에 관련된 단백질 분리가 거의 불가능한 실정이다. 이런 개선을 위해 본 실험에서는 Kim 등 (2001)의 방법을 약간 변형하여 PEG fractionation 함으로써 Rubisco 단백질이 15% PEG pellet 분획에 enrichment 됨을 확인하였으며, 신호전달에 관련된 MAPKK 단백질도 확인 할 수 있었다 (Fig. 2, Table 2)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade는 다양한 외부 및 내부의 자극을 전이시키는 주요 임무를 수행한다. 주된 기능은 발달 및 성장, 세포 분화, 스트레스에 대한 적응 등의 생리적 반응을 조절하는 것으로 알려져 있으며 (Widmann 등, 1999; Chen 등, 2001), 모든 진핵 생물에서 잘 보존되어 있고 개체들 마다 다양한 종류의 MAPK cascade를 가지고 있다. 일반적으로, 각각의 cascade는 MAPK kinase kinase (MAPKKK) 의존적으로 조절되며, MAPKKK의 인산화에 의해 MAPK kinase (MAPKK)를 활성화시키며, 다시 인산화에 의해 MAPK를 차례로 활성화시킨다 (Chen 등, 2001). 고등 식물에서는 다양한 무생물적 또는 생물적 스트레스에 의해 MAPKs가 활성화되는 것으로 보고되고 있다 (Jonak 등, 2002). 본 실험을 통하여 벼에 있어

서 MAPKK가 저온 스트레스에 의해 조절된다는 것을 프로테오믹스 기법을 이용하여 처음으로 확인할 수 있었으며, 이는 MAPKK 단백질이 저온 스트레스 하에서 중요한 기능을 담당할 것임을 시사하는 결과이다. 또한 이러한 rare protein의 발견은 15% PEG fractionation을 이용한 2-D 분석법의 효율성을 보여주는 것이다.

본 실험을 통하여 얻어진 프로테오믹스 map은 식물의 저온 스트레스에 대한 반응기작을 이해하는데 있어서 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이며, 나아가 각각의 단백질을 code 하고 있는 유전자를 분리함으로써 식물체로 도입을 통한 저온재해 저항성 신종 개발에 효율적으로 활용될 수 있을 것이다.

#### IV. 요약

프로테오믹스 기법을 이용하여 벼 저온 스트레스 관련 단백질을 분리 동정하기 위하여 저온처리한 벼로부터 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질로부터 Rubisco 단백질을 제거하기 위해 15% PEG fractionation을 실시한 후 15% PEG 상등액과 pellet 분획을 각각 일차원 전기영동으로 단백질을 분석하였고, MALDI-TOF MS를 이용하여 단백질을 동정하였다. 15% PEG 상등액에서 8개의 단백질 spot이 증가하였고 10개의 spot 이 감소하였다. 증가한 8개 단백질 spot 중에서 epimerase/dehydratase, fructokinase, ribose-5-phosphate isomerase (Rpi), chaperonin 21 precursor, photosystem II oxygen-envolving complex (PS II OEC) protien 2 precursor, thioredoxin h-type (Trx-h) 등 6개의 단백질이 확인되어졌다. 15% PEG pellet 분획에서 13개의 단백질 spot이 증가하였고 14 spot이 감소하였으며, 증가한 13개 단백질 spot 중에서 OSJNBb0059K02.15, hypothetical protein, mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK), 20S proteasome beta 7 subunit, Rubisco small subunit 등 5개의 단백질이 확인되어졌다. 확인되어진 단백질들



은 기능별로 분류해 본 결과, 세포대사관련 단백질, energy 생성에 관련된 단백질, 산화환원 조절관련 단백질, 식물 병 방어관련, 단백질 합성 및 신호전달 관련 단백질 등으로 분류되었다. 이들 중 RPi와 MAPKK가 저온 스트레스에 의해 발현되는 것이 본 실험의 프로테옴 분석을 통하여 최초로 동정되었다.

## V. 사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2001-000-00102-0)지원으로 수행되었음.

## VI. 인용 문헌

- Blum, H., H. Beoer and H.J. Grodd. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8:93-99.
- Chen, Z., T.B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt and M.H. Cobb. 2001. Map kinases. *Chem. Rev.* 101:2449- 2476.
- Gelhay, E., N. Rouhier and J.P. Jacquot. 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Lett.* 555:443-448.
- Gelhay, E., N. Rouhier and J.P. Jacquot. 2004. The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 42:265-271.
- Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41:187-223.
- Jensen, O.N., M., Wilm, A. Shevchenko and M. Mann. 1999. Sample preparation methods for Mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol. Biol.* 112:513-530.
- Jonak, C., L., Ökrész, L. Bögre and H. Hirt. 2002. Complexity cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:415-424.
- Jung, B.G., K.O. Lee, S.S. Lee, Y.H. Chi, H.H. Jang, S.S. Kang, K. Lee, D. Lim, S.C. Yoon, D.J. Yun, Y. Inoue, M.J. Cho and S.Y. Lee. 2002. A chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* 277:12572-12578.
- Kim, S.T., K.S. Cho, Y.S. Jang and K.Y. Kang. 2001. Two-dimensional electrophoresis analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*. 22: 2103-2109.
- Lowry, O.H., J.N. Rosebrough, A.I. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Nakamura, S., H. Hayashi, S. Mori and M. Chino. 1993. Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant Cell Physiol.* 34: 927-933.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels include isoelectric focusing gels with clear background at nonogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 9:255-262.
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Pandy, A. and M. Mann. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.
- Rabilloud, T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis on proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountain. *Proteomics* 2:3-10.
- Rivera-Madrid, R., D. Mestres, P. Marinho, J.P. Jacquot, P. Decottignies, M. Miginiac-Maslow and Y. Meyer. 1995. Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5620-5624.
- Rouhier, N., E. Gelhay, P.E. Sautiere, A. Brun,

- P. Laurent, D. Tagu, J. Gerard, E. de Fay, Y. Meyer and J.P. Jaquot. 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 127:1299-1309.
18. Serrato, A.J. and F.J. Cejudo. 2003. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* 217:392-399.
19. Widmann, C., S., Gibson, M.B. Jarpe and G.L. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79:143-180.
20. Xiong, L., K.S. Schumaker and J.K. Zhu. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 Suppl: S165-S183.
21. Zhang, R.G., E. Andersson, A. Savchenko, T. Skarina, E. Evdokimova, S. Beasley, C.H. Arrowsmith, A. Edwards, A. Joachimiak and L. Mowbray. 2003. Structure of *Escherichia coli* Ribose-5-phosphate isomerase: a ubiquitous enzyme of the pentose phosphate pathway and Calvin cycle. *Structure* 11:31-42.