

과발현 형질전환벼에서 CCCH type zinc-finger protein 유전자 *OsZF2* 기능 분석

이정숙* · 윤인선 · 윤용한 · 이강섭 · 변명옥 · 서석철
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

Functional characterization of a CCCH type zinc-finger protein gene *OsZF2* by ectopic overexpression of the gene in rice

Jung-Sook Lee* · In-Sun Yoon · Ung-Han Yoon · Gang-Seob Lee · Myung-Ok Byun · Seok-Chul Suh
National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT We have previously isolated a CCCH type zinc-finger protein gene, *OsZF2* (*Oryza sativa* Zinc Finger 2), from the cold-treated rice cDNA library. To investigate the potential role of *OsZF2*, transgenic rice lines over-expressing *OsZF2* under the control of CaMV 35S promoter have been developed through *Agrobacterium*-mediated transformation. Elevated level of *OsZF2* transcripts was confirmed by RNA gel blot analysis in transgenic rice. Under the 100 mM NaCl condition, the transgenic rice showed significantly enhanced growth rate in terms of shoot length and fresh weight, implicating that *OsZF2* is likely to be involved in salt response of rice. In the field condition, however, the transgenic rice showed a dwarf phenotype and flowering time was delayed. Genome expression profiling analysis of transgenic plants using the 20K NSF rice oligonucleotide array revealed many up-regulated genes related to stress responses and signaling pathways such as chaperone protein dnaJ 72, salt stress-induced protein, PR protein, disease resistance proteins RPM1 and Cf2/Cf5 disease resistance protein, carbohydrate/ sugar transporter, OsWAK kinase, brassinosteroid LRR receptor kinase, and jasmonate O-methyltransferase. These data suggest that the CCCH type zinc-finger protein *OsZF2* is a upstream transcriptional factor regulating growth and stress responsiveness of rice.

서 론

벼는 중요한 주곡작물로서 비교적 작은 게놈 사이즈로 인해 단자엽 식물의 모델 식물로서 이용되며 또한 전체 유전체 염기서열이 해독됨에 따라 유전자 기능분석을 위해 많은 노력이 시도되고 있다. 벼는 유전적 현상을 해석하기 위한 다양한 유전자 지도가 작성되어 있으며 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다. 벼에서 저온스트레스는 온대성 기후에서 급격한 기상이변과 고랭지 지역 등에서 벼 생산과 직결되는 주요한 자연재해 중의 하나로서 유묘기 내냉성 및 수잉기 내냉성은 벼 육종의 중요한 목표중의 하나이다. 일반적으로 한발, 고엽 및 저온과 같은 환경 스트레스는 공통적인 대응 메커니즘이 있는 것으로

알려져 있으며, 다양한 환경스트레스간에 유전자 발현을 공통적으로 조절하는 신호전달 경로가 있는 것으로 보고되고 있다 (Rabhani et al. 2003; Yamaguchi-Shinozaki et al. 2006). 이러한 스트레스에 식물체가 노출되면 많은 유전자의 발현이 유도되어 세포 손상을 보호하거나 신호전달에 관련된 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려졌다 (Yamaguchi-Shinozaki et al. 2006). 애기장대에서는 많은 스트레스 유도성 유전자들이 알려져 있으며 대표적인 내재해성 유전자로서 CBF/DREB는 AP2/ERF 그룹의 전사인자로서 저온에 의해 발현이 유도되며 이들 유전자의 과발현 형질전환체는 내냉성 뿐만 아니라 내염, 내건성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Thomashow 1999; Maruyama et al. 2004). 애기장대에서 보고된 CBF/DREB 전사인자이외에 보리, 벼 등에서 DREB ortholog 유전자를 분리하여 과발현 형질전환체에서 스트레스 내성을 증진시킨다는 많은 보고가 있다 (Jung et al. 2007; Oh et al. 2007). 이러한 스트레스 신호전달에 관련된 AP2/ERF 전사인자에 관한 연구뿐만 아니라 bZIP 단

*Corresponding author Tel 031-299-1725 Fax 031-299-1722
E-mail: junglee@rda.go.kr

백질, NAC domain 단백질, zinc finger 단백질 등이 또한 스트레스 내성을 증진 시키는 전사인자로서 알려져 있다 (Yamaguchi-Shinozaki et al. 2006; Kim et al. 2006; Nakashima et al. 2007). 벼에서 저온처리에 의해 발현이 유도되는 OsCOIN 유전자는 RING finger 단백질로서 proline 함량을 증가 시켜 저온, 건조, 염해 등에 저항성을 증진시키는 것으로 알려졌으며 NAC-type의 전사인자 또한 환경스트레스에서 발현이 유도되며 내재해성을 증진시키는 것으로 나타났다 (Nakashima et al. 2007).

zinc finger 단백질은 zinc 이온과 결합하는 아미노산의 배열에 따라 여러 그룹으로 나뉘며 전사인자로서 역할을 수행하거나 단백질 등 다른 분자와의 상호작용에 의해 세포내에서 중요한 생물학적 과정을 수행한다. 현재까지 식물체에서 알려진 zinc finger 그룹은 RING-finger, ERF, WRKY, DOF, LIM 등이 알려져 있으며 대부분은 DNA-결합 전사인자로서 역할을 하거나 단백질-단백질 상호작용에 의해 유전자발현을 조절하는 것으로 그 기능이 알려져 있다 (Wang et al. 2008). CCCH type zinc finger 단백질은 사람과 효모에 이르기까지 많은 그룹을 차지하고 있으며 동물에서는 RNA 프로세싱과 관련된 RNA-결합 단백질로 추측되며 단백질 안정화와 초기 배 발달에서 암컷의 수정 능력과 세포의 운명에 관여하는 등 그 기능이 많이 알려졌으나 식물체에서는 일부분만 그 기능이 알려져 있다 (Addepalli et al. 2008; Ramos et al. 2004). 애기장대에서 알려진 PEI1은 배아 특이 CCCH zinc finger 단백질로써 배발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며 (Li et al. 1998), 벼에서 분리된 OsDOS는 핵에 위치하는 단백질로써 jasmonate 경로에 의한 발달 단계 시그널에 관여하여 잎의 노화를 지연시키는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Kong et al. 2006).

본 연구에서는 벼에서 저온처리 및 이삭에서 유전자 발현이 증가하는 CCCH zinc finger 단백질을 코딩하는 *OsZF2* 유전자 (Lee et al. 논문 준비중)가 과발현되는 형질전환체를 제작하고 환경스트레스 및 관련 표현형을 분석하여 유전자 기능을 확인하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

운반체 제작

벼 형질전환체를 육성하기 위해 사용된 운반체인 pCAMBIA1300PRON은 pCAMIA1300을 기반으로 하여 CaMV 35S promoter와 3'-nos 터미네이터 사이에 멀티클로닝 제한효소부위를 삽입하여 클로닝이 용이하도록 제작되었다. *OsZF2* 유전자를 클로닝하기 위하여 EST library에서 사용되었던 pBluescript 벡터에 삽입된 LS333 유전자를 BamHI과 KpnI로 절단한 후 1.2kb 크기의 밴드를 분리한 후 pCAMBIA1300PRON 벡터의 BamHI과 KpnI 위치에 삽입하여 pCAM333이라 명명하였다. 운반체의 선발마커로는 하이그로마이신 항생제 저항성 유전자(*hptII*)를 사용하였으며 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하여 벼 형질전환에 사용하였다.

벼 형질전환 및 동형접합 전환체 선발

형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 YEP (50 mg/l kanamycin) 액배지에 접종하여 48시간 진탕 배양하였다. 낙동벼를 이용하여 배상체 캘러스를 유기한 후 *Agrobacterium* 배양액과 공동 배양하여 감염시킨 다음 hygromycin 선발배지에서 형질전환된 재분화 식물체를 얻기 위하여 3주 마다 계대 배양하였다. 선발된 형질전환체는 hygromycin (50 mg/l)이 첨가된 MS 배지에 50립을 치상하여 hygromycin 저항성 개체수를 확인하였다.

PCR 분석

형질전환된 재분화 식물체에 *OsZF2* 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환체의 genomic DNA는 Genomic DNA Prep Kit for Plant (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 예비변성한 다음 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 풀림, 72°C에서 1분간 신장하는 과정을 35 사이클 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분간 신장 시켰다. PCR 반응에 사용된 forward 프라이머는 *OsZF2* 유전자 특이 프라이머 (5'-ACT CGC CGC TGT CGC TCT CC-3')를 사용하고 reverse 프라이머는 3'-nos terminator 부위에서 작성하여 (5'-ATTGCCAAATGTTTGAACGA-3') 사용하였다. PCR 산물은 0.9% agarose gel에서 전기영동 하였으며 EtBr로 염색하여 밴드를 확인하였다.

RNA 분리 및 Northern 분석

형질전환체에서 *OsZF2* 유전자 발현을 확인하기 위하여 벼 잎에서 total RNA를 Trizol로 분리하여 Northern 분석을 실시하였다. 10 µg RNA를 1.1% formamide/agarose gel에서 전기영동 후 나일론 멤브레인 (Hybond N+, Amersham) 으로 전이시킨 다음 *OsZF2* 유전자를 ³²P-dCTP로 표식시킨 후 60°C에서 16시간 동안 잡종화반응을 시켰다. 멤브레인은 워싱 용액에 세척하고 포스포이미지 강화 스크린에 감광시킨 후 밴드를 확인하였다.

내염성 검정 및 형태적 관찰

소독한 벼 종자 25립을 MS 배지와 100 mM NaCl이 첨가된 MS 배지에 각각 치상하여 28°C, 광 상태에서 1주간 배양한 후 발아된 23립의 총 중량과 지상부 잎 길이 및 뿌리 길이를 측정하여 평균값과 표준편차를 측정하였다. 포장에서 형태적 발달 상태를 관찰하기 위해 50공 모판에서 재배하여 4주 후 유전자변형식물체 시험포장에 이양하여 형태적 특성과 출수시기를 확인하였다.

Microarray 분석

벼 20K 올리고 chip (NSF rice oligonucleotide array 20K)을 사용

하여 microarray 분석을 하였다. 고 순도의 RNA를 분리하기 위하여 column을 사용하는 RNeasy isolation Midi kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 벼 잎으로부터 RNA를 분리하였다. total RNA는 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, USA)를 이용하여 28S rRNA/18S rRNA ratio를 측정하여 RNA QC를 수행한 후 microarray 분석에 사용하였다. Labelling은 Amino Allyl MessageAmp™ aRNA Kit (Ambion Catalog #1752)을 사용하여 제조사의 방법으로 RNA를 합성한 후 10 µm antisense amino allyl RNA (aRNA)를 cye dye coupling에 사용하였다. 대조구는 cy3, 처리구는 cy5 dye를 사용하여 라벨링된 cRNA 20 µm을 잡종화 반응에 사용하였다 (Eom et al. 2006). MAUI 잡종화시스템에서 42°C, 16시간 반응 후 Axon4000B 스캐너에서 GenePix Pro v6.0 (Axon Instrument, Union City, USA) 프로그램을 이용하여 cy3, cy5의 강도를 측정하였다. Normalization과 발현분석은 Genespring5.1 프로그램을 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

***OsZF2* 유전자의 벼 형질전환 및 과다발현 동형접합 형질전환체 선발**

벼에서 분리된 *OsZF2* 유전자는 CCCH 형태의 zinc-finger 도메인을 2개 함유하고 있으며 애기장대의 꽃 분화와 관련된 *PEII* 유전자와 높은 상동성을 보인다 (Lee et al. 논문 준비중). *OsZF2* 유전자는 벼에서 저온 스트레스에 의해 발현이 약하게 유도되며 캘러스와 이삭에서 발현이 검출되고 일반적인 기저 수준에서는 발현이 거의 검출되지 않는다. *OsZF2* 유전자의 식물체내에서 기능을 분석하기 위하여 벼에서 유전자 과발현 형질전환체를 육성하였다. 벼 형질전환용 벡터는 35S 프로모터를 사용하였고 형질전환체 선발은

하이그로 마이신 항생제 저항성 유전자를 사용하여 운반체를 작성하여 pCAM333이라 명명하였다 (Figure 1a). pCAM333 운반체를 아그로박테리움에 도입한 후 낙동벼를 이용하여 배상체 캘러스를 유기하여 공동배양 하였다. 선발된 캘러스는 cefotaxime과 hygromycin이 첨가된 배지에 치상하여 재분화를 유도하였으며 재분화된 식물체는 순화과정을 거쳐 온실에서 재배되었다. 재분화된 형질전환체에서 *OsZF2* 유전자가 벼 염색체에 삽입된 것을 확인하기 위하여 *OsZF2* 유전자에서 유전자 특이 forward 프라이머를 제작하고 Nos 터미네이터 부위에서 reverse 프라이머를 작성하여 PCR 분석을 실시하여 벼에 내재적으로 존재하는 유전자와 구별하였다. 벼 형질전환체 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 검정을 한 결과 대조구인 낙동벼에서는 유전자 단편이 증폭되지 않았으나 형질전환체에서는 positive control로 사용된 pCAM333과 같이 모두 650bp 크기의 *OsZF2* 유전자 단편이 증폭된 것을 확인하였다 (Figure 1b). 35S:*OsZF2* 형질전환체에서 *OsZF2* 유전자가 항상성 있게 과발현되는 지를 확인하기 위하여 total RNA를 분리하여 *OsZF2* 유전자를 탐침으로 하여 Northern 분석을 하였다. 대조구에서는 발현이 거의 되지 않았으나 CaMV 35S promoter와 융합되어 도입된 *OsZF2* 유전자는 형질전환체에서 발현이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2). 도입 유전자에 대한 동형접합체 계통을 선발하기 위하여 40립 이상의 T2 종자에 대하여 하이그로마이신 저항성을 검정한 결과 낙동벼의 경우 발아는 하였으나 거의 자라지 못하고 형질전환체는 정상적으로 자라는 것을 관찰하였다 (Figure 1c). 검정한 계통 중에서 치상한 40립의 종자 모두 저항성을 나타내어 정상적으로 자라는 동형접합체 계통을 선발하였다.

***OsZF2* 형질전환체의 내염성 검정 및 표현형 분석**

35S:*OsZF2* 형질전환체에서 *OsZF2* 유전자 발현이 강하게 나타난 LS333-8 계통에서 동형접합체 라인을 선발하여 스트레스 저항성을 검정하기 위하여 MS 배지와 100 mM NaCl을 함유한 MS 배지에서 일주일간 생육시킨 후 23개체의 총 증량과 지상부 잎과 뿌리의 길이를 각각 측정하여 평균값을 구하였다 (Figure 3). 무처리

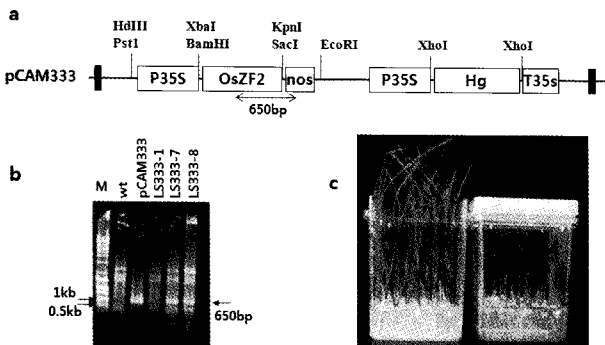


Figure 1. Identification of transgenic rice. (a) A linear map of pCAM333 with *OsZF2* gene and Hygromycin selectable marker gene (Hg) used for plant transformation; P35S (CaMV35S promoter), T35s (CaMV35S terminator), and nos (NOS terminator). (b) Agarose gel electrophoresis of amplified fragments from *OsZF2* gene specific primer and Tnos primer. Arrow indicated the PCR product (650bp) for *OsZF2* gene integration into rice chromosome. Plasmid pCAM333 was used as a positive control. (c) Homozygous lines and plants (left) were selected based on uniform and normal growth of all the seedlings of a transgenic line in MS media supplemented with 50 mg/L of hygromycin

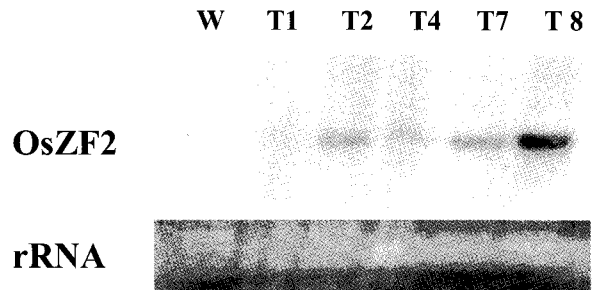


Figure 2. Northern blot analysis of *OsZF2* gene expression in transgenic rice. The ethidium bromide-stained RNA shows equal loading. W: Wild-type plant; T1, T2, T4, T7, T8: Independent *OsZF2* transgenic lines (LS333-1, LS333-2, LS333-4, LS333-7, LS333-8, respectively)

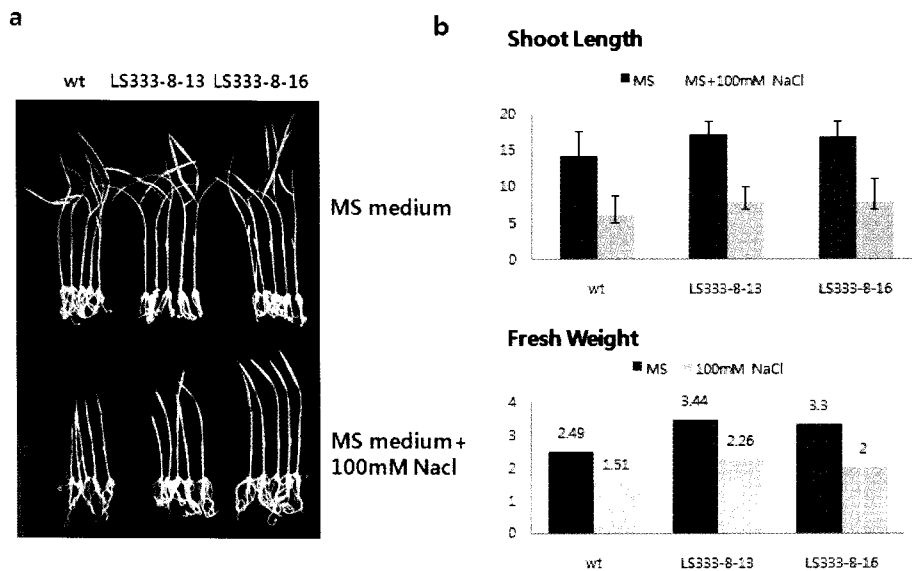


Figure 3. Measurement of salt stress response of 35S:OsZF2 transgenic rice. (a) One-week-old seedlings were grown on MS medium supplemented with 0 or 100 mM NaCl. (b) Shoot length (mean±SD) and total fresh weight of the transgenic plants (LS333-8-13, LS333-8-16) and wild-type (wt, NacDong-byeo) plants treated with 0 or 100 mM NaCl were measured to monitor the salt response. Measurements were performed for using at least 20 germinated seedlings

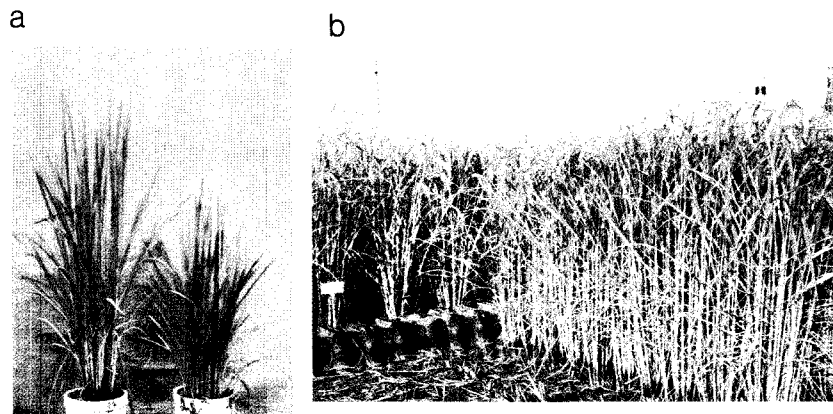


Figure 4. Phenotype of 35S:OsZF2 transgenic line. (a) Transgenic rice (LS333-8, right) was dwarfed in relation compared with the wild-type plants (left). Photograph was taken 3 months after seeding. (b) Seed maturation of the transgenic plants (right) was delayed compared to that of the wild-type plants (left) in the GMO field

상태에서 35S:OsZF2 형질전환체의 생육과 중량이 대조구인 낙동벼보다 다소 우수하였으며 100 mM NaCl을 함유한 배지에서도 35S: OsZF2 형질전환체가 낙동벼보다 생육이 다소 양호한 것으로 나타나 기내 실험에서는 어느 정도 내염성 효과를 보였다. 예기장대에서 분리된 CCCH type의 zinc finger 유전자인 *AtSZF1*과 *AtSZF2*의 경우 염스트레스에 의해 발현이 유도되고 내염성 증진에 중요한 역할을 한다고 보고하였다 (Sun et al. 2007). 벼에서 분리된 OsCOIN의 경우 저온에서 발현이 유도되는 RING finger 단백질로서 또한 저온, 염, 건조에 저항성을 보이는 것으로 보고되었다 (Liu et al. 2007). zinc finger 유전자는 스트레스내성을 증가시키는 전사인자로서 알려져 있으므로 OsZF2도 저온에 의해 발현이 유도되는

유전자로서 스트레스에 관련되어 있을 것으로 추정된다. GMO 포장에 이식하기 위하여 형질전환 벼와 대조구인 낙동벼를 모판에서 4주 간 생육시켰으며 유묘의 성장에는 35S:OsZF2 형질전환 벼와 대조구인 낙동벼 두 품종 간에 별다른 차이가 없었다. 그러나 이앙 후 8주후까지 35S:OsZF2 형질전환체는 생육이 지연되어 왜화현상을 보여주며 또한 출수도 낙동벼 보다 열흘 정도 지연되는 현상을 나타내었다 (Figure 4). 그러나 출수 후 등숙기에는 낙동벼와 비슷한 초장을 유지하며 생육지연과 관련하여 등숙시기도 낙동벼와 비교하여 지연되는 것을 관찰하였다. Kong 등 (2006)이 보고한 벼에서 분리된 OsDOS는 OsZF2와 같이 2개의 CCCH 형태의 zinc finger 도메인을 함유하고 있는 유전자로서 이앙 이식에서 발현이 높으며

Table 1 Partial list of the downstream regulated genes in the 35S:OsZF2 transgenic rice

Group	Gene_Symbol	Ratio (LS333 8-13)	Ratio (LS333 8-16)	Description
OsZF2	LOC_Os05g45020	5.2	4.1	LS333, CCCH transcription factor, putative
Biotic/abiotic	LOC_Os01g17040	21.9	19.7	Chaperone protein dnaJ 72, putative, expressed
	LOC_Os01g24710	6.5	5.5	Salt stress-induced protein, putative, expressed
	LOC_Os07g03288	6.2	4.3	Pathogenesis-related protein PRB1-3 precursor
	LOC_Os06g22460	4.9	5.6	Disease resistance protein RPM1, putative
	LOC_Os10g22930	4.5	4.3	Cf2/Cf5 disease resistance protein, putative
Protein kinase	LOC_Os03g44050	17.6	6.1	OsWAK27 - OsWAK receptor-like protein kinase
	LOC_Os12g42040	6.1	4.4	OsWAK126 - OsWAK receptor-like protein kinase
	LOC_Os03g16960	14.1	6.3	CRK6, putative, expressed
	LOC_Os02g06620	13.4	4.2	Brassinosteroid LRR receptor kinase precursor
	LOC_Os06g30130	5.5	4.5	Serine/threonine-protein kinase receptor precursor
DNA binding	LOC_Os10g26270	7.8	6.4	No apical meristem protein
	LOC_Os06g30810	4.6	5.2	DNA binding protein, putative
	LOC_Os10g14150	4.5	4.1	Ras-related protein Rab-2-B, putative
Metabolic enzymes	LOC_Os01g37000	14.6	5.9	Carboxyl-terminal peptidase, putative, expressed
	LOC_Os04g01810	14.6	9.1	Aristolchene synthase, putative, expressed
	LOC_Os10g11260	7.8	5.0	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12-like, putative
	LOC_Os06g11240	7.6	5.1	12-oxophytodienoate reductase 2, putative
	LOC_Os10g28450	5.9	6.3	CAF1 family ribonuclease containing protein
	LOC_Os10g26050	5.7	5.3	Methionyl-tRNA synthetase, putative, expressed
	LOC_Os09g17560	4.8	5.4	O-methyltransferase ZRP4, putative, expressed
	LOC_Os06g21020	4.4	4.5	Jasmonate O-methyltransferase, putative
Others	LOC_Os10g39330	4.1	4.3	Aspartic proteinase nepenthesin-1 precursor, putative
	LOC_Os04g45140	14.8	5.3	Lipopolysaccharide-modifying protein, putative
	LOC_Os03g21450	10.8	5.1	Bromodomain containing protein, expressed
	LOC_Os10g31500	9.2	11.4	Fibroin heavy chain precursor, putative, expressed
	LOC_Os06g15680	8.3	4.2	Cytochrome P450 71A6, putative
	LOC_Os07g34720	6.7	5.1	Harpin-induced protein, putative, expressed
	LOC_Os10g28150	6.1	4.3	Zinc knuckle family protein
	LOC_Os09g24220	6	4.4	DNA mismatch repair protein MSH6-1, putative
	LOC_Os08g38480	5.1	8.2	F-box domain containing protein, expressed
	LOC_Os09g20500	4.3	5.4	Carbohydrate transporter/ sugar porter/ transporter
LOC_Os10g20390	4.2	5.4	Transparent testa 12 protein, putative, expressed	

잎의 노화를 지연시키는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이는 *OsZF2* 유전자가 잎에서 발현이 되지 않고 이삭에서 발현이 증가하는 것과는 약간 다른 양상을 보여주고 있으나 왜화 현상을 보이는 성장 지연과 이에 따른 출수지연 및 등숙 지연 등 zinc finger 단백질로써 성장 발달에 영향을 주는 것으로 추정된다. 벼에서 분리된 zinc finger 유전자인 *OsLOL2*의 경우, *OsLOL2* 발현을 저하시킨 역전사 형질전환벼의 경우 GA 합성과 관련되어 왜화 현상을 보이고 벼의 성장 발달에 영향을 주며 과발현 형질전환벼의 경우 벼 흰잎

마름병에 저항성을 보이는 것으로 보고하였다 (Xu et al. 2007).

Microarray 분석에 의한 하위 유전자 발현 확인

최근에 들어서는 과발현 형질전환체에서 하위 유전자 발현 양상 분석에 DNA chip을 이용한 유전체 발현분석 방법이 널리 이용되고 있다 (Maruyama et al. 2004). 35S:OsZF2 형질전환체에서 발현이 조절되는 유전자를 확인하기 위하여 2주간 생육시킨 유묘를 이

용하여 낙동벼와 35S:OsZF2 형질전환체에서 total RNA를 분리하고 Bioanalyzer 2100를 이용하여 28S rRNA/18S rRNA ratio가 1이상인 고순도의 RNA를 사용하여 유전체 발현 분석을 하였다. 35S:OsZF2 형질전환 계통 중에서 LS333-8의 독립적인 2계통을 이용하여 각각의 분석을 수행하였는데 무처리 낙동벼를 cy3, 무처리 형질전환벼를 cy5로 라벨링을 하여 DNA chip 분석을 수행하였다. DNA chip 분석 결과 과다발현 시킨 *OsZF2* 유전자가 두 형질전환 계통에서도 낙동벼에 비해 4배 이상 발현이 증가되었으며 이는 Northern 분석에 의해 35S:OsZF2 형질전환체에서 *OsZF2* 발현이 증가된 현상과 정확히 일치 하였다 (Table 1). 대조구인 낙동벼에 비해 두 계통 모두에서 4배 이상 발현이 증가된 유전자는 100 개로 확인이 되었으며 실제로 계놈상에 주석이 된 유전자는 35개로 나타났다. 65개 유전자는 기능이 아직 알려지지 않은 유전자, 가상 유전자 및 트랜스포존 유전자였다. 35개 유전자에 대한 계놈 주석을 근거로 기능을 유추하면 신호전달과 관련된 protein kinase, DNA binding protein 과 대사에 관련된 효소 유전자 및 스트레스 반응 유전자들의 발현이 증가되었다. 내염성과 관련된 유전자로서 Chaperone 단백질인 dnaJ 72 유전자 발현이 거의 20배 이상 증가하였으며 salt stress-induced protein의 발현도 5배 이상 증가 하였다. 또한 병저항성과 관련된 유전자 발현이 상당히 증가한 것으로 나타났다. wall-associated kinase인 OsWAK27, OsWAK126 유전자 발현이 5배 이상 증가 하였다. 애기장대에서 WAK 유전자 그룹은 세포팽창, 병저항성 및 증감속 스트레스 저항성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으며 벼에는 125개의 WAK 유전자가 계놈상에 존재한다고 보고되었다(Zhang et al. 2005). 따라서 zinc-finger 단백질인 *OsZF2*는 세포내 과발현에 의해 다른 유전자들의 발현을 조절하고 발현 양상에 영향을 주는 것으로 추측되며 이는 염처리에 의한 스트레스 반응에서 어느 정도의 저항성을 보이는 현상과 생육 및 출수 지연 현상을 일부 설명할 수 있으리라 추측된다. 따라서 벼에서 분리된 *OsZF2* CCCH zinc finger 유전자는 벼 성장 발달과 스트레스에 반응하는 상위조절자로서 기능을 할 것으로 추측된다.

적 요

벼의 저온처리 cDNA 은행에서 분리된 CCCH 형태 zinc finger 단백질인 *OsZF2*의 기능을 분석하기 위하여 벼에서 CaMV 35S 프로모터 조절하에 *OsZF2*가 발현(35S:OsZF2)되는 형질전환벼 식물체를 개발하였다. 35S:OsZF2 형질전환벼에 대한 하이그로 마이신 저항성 검정을 통해 동형접합체 계통을 선발하고 Northern 발현분석에 의해 *OsZF2* 유전자가 형질전환체에서 과발현되는 것을 확인 하였다. 형질전환체와 대조구인 낙동벼를 100 mM NaCl 첨가 MS 배지에서 키운 후 잎과 뿌리의 길이를 측정하여 내염성 검정을 수행한 결과 대조구에 비해 형질전환체 생육이 다소 양호한 것으로 나타났다. GMO 포장에서 생육상태를 관찰 한 결과 형질전환체는 생육지연으로 인한 왜화 현상을 나타내며 출수기 또한 열흘 정도 지연되거나 동숙기에는 대조구와 같은 초장을 보였다. zinc finger 유

전자는 식물체의 발달과 분화 단계 및 환경 스트레스 반응 등 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 유전체발현 분석으로 하위단계에서 조절되는 유전자 발현 양상을 분석하였다. 35S:OsZF2 전환체에서 낙동벼보다 4배 이상 발현이 증가된 유전자 중에서 계놈 주석에 기초한 기능을 유추하면 신호전달과 관련된 protein kinase, DNA 결합단백질과 대사에 관련된 효소 유전자, 스트레스 반응에 관여하는 일부 유전자 및 병저항성과 관련된 유전자들의 발현이 증가되었다. 따라서 벼에서 분리된 *OsZF2* CCCH type zinc finger 유전자는 벼 성장 발달과 스트레스에 반응하는 상위 조절자로서 기능을 할 것으로 추측된다.

사 사

본 연구는 국립농업과학원 농업생명자원부 기관고유사업비와 농촌진흥청 바이오그린 21 사업 연구비의 지원으로 수행되었음.

인용문헌

- Addipalli B, Hunt AG (2008) Ribonuclease activity is a common property of Arabidopsis CCCH-containing zinc-finger proteins. *FEBS Lett* 582:2577-82
- Eom H, Lee CG, Jin E (2006) Gene expression profile analysis in astaxanthin-induced *Haematococcus pluvialis* using a cDNA microarray. *Planta* 223:1231-1242
- Jung J, Won SY, Suh SC, Kim H, Wing R, Jeong Y, Hwang I, Kim M (2007) The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in Arabidopsis. *Planta* 225:575-88
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO, Cho MJ (2006) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* 25:247-59
- Kong Z, Li M, Yang W, Xu W, Xue Y (2006) A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiol* 141:1376-88
- Lee JS, Yoon IS, Yoon UH, Lee GS, Byun MO, Suh SC (2009) Two CCCH type zinc-finger protein genes responsive to cold stress in rice. (Manuscript in preparation)
- Li Z, Thomas TL (1998) PEI1, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:383-98
- Liu K, Wang L, Xu Y, Chen N, Ma Q, Li F, Chong K (2007) Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta* 226:1007-16
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J* 38:982-93

- Nakashima K, Tran LS, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J* 51:617-30
- Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK (2007) Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 5:646-56
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* 133:1755-67
- Ramos SB, Stumpo DJ, Kennington EA, Phillips RS, Bock CB, Ribeiro-Neto F, Blackshear PJ (2004) The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* 131:4883-93
- Sun J, Jiang H, Xu Y, Li H, Wu X, Xie Q, Li C (2007) The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 48:1148-58
- Thomashow MF (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599
- Wang D, Guo Y, Wu C, Yang G, Li Y, Zheng C (2008) Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* 9:44
- Xu C, He C (2007) The rice OsLOL2 gene encodes a zinc finger protein involved in rice growth and disease resistance. *Mol Genet Genomics* 278:85-94
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57:781-803
- Zhang S, Chen C, Li L, Meng L, Singh J, Jiang N, Deng XW, He ZH, Lemaux PG (2005) Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. *Plant Physiol* 139:1107-24

(접수일자 2009년 2월 4일, 수리일자 2009년 2월 18일)