

식물 유전자 연구의 최근 동향

조용구 · 우희종 · 윤웅한 · 김홍식 · 우선희

Current status on plant functional genomics

Yong-Gu Cho · Hee-Jong Woo · Ung-Han Yoon · Hong-Sig Kim · Sun-Hee Woo

Received: 13 April 2010 / Accepted: 29 April 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract As the completion of genome sequencing, large collection of expression data and the great efforts in annotating plant genomes, the next challenge is to systematically assign functions to all predicted genes in the genome. Functional genome analysis of plants has entered the high-throughput stage. The generations and collections of mutants at the genome-wide level form technological platform of functional genomics. However, to identify the exact function of unknown genes it is necessary to understand each gene's role in the complex orchestration of all gene activities in the plant cell. Gene function analysis therefore necessitates the analysis of temporal and spatial gene expression patterns. The most conclusive information about changes in gene expression levels can be gained from analysis of the varying qualitative and quantitative changes of messenger RNAs, proteins and metabolites. New technologies have been developed to allow fast and highly parallel measurements of these constituents of the cell that make up gene activity. We have reviewed currently employed technologies to identify unknown functions of predicted genes including map-based cloning, insertional mutagenesis, reverse genetics, chemical mutagenesis, microarray analysis, FOX-hunting system, gene silencing mutagenesis, proteomics and chemical genomics. Recent improvements in technologies for functional genomics

enable whole-genome functional analysis, and thus open new avenues for studies of the regulations and functions of unknown genes in plants.

Keywords Functional genomics, gene identification, insertional mutagenesis, mutants, map-based cloning, reverse genetics, microarray, FOX-hunting system, gene silencing, proteomics, chemical genomics

서론

21세기 초에 선진국을 중심으로 초파리 (*Drosophila melanogaster*; Science 287, 2000), 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*; Nature 408, 2000), 인체 (*Homo sapiens*; Nature 409, 2001), 벼 (*Oryza sativa*; Nature 436, 2005), 콩 (*Glycine max*; Nature 463, 2010) 등 유전체 전 염기서열 해독 프로젝트가 완료되었으며 이후 이들 동식물의 유전자 기능분석 연구가 활발히 수행되고 있다. 최근 들어 모델식물로 벼와 애기장대를 이용한 구조 유전체 및 비교 유전체의 비약적인 연구 성과에도 불구하고, 계놈상의 유전자들 중 약 60% 이상이 아직 기능이 밝혀지지 않은 상태로 놓여 있다. 따라서 Post Genome 시대의 연구방향은 유전자 기능분석 연구에 집중되고 있는 실정이다. 아울러 현재의 데이터 베이스에 저장된 수많은 유전체정보는 유전자의 기능을 밝히는 데에 이용되고 있다.

특정 종의 모든 유전자들의 정확한 염기서열과 위치를 아는 것은 어떻게 생물의 모든 부분이 함께 작용하여 생명현상이 일어날 수 있는 가를 이해하는 첫 걸음이 될 것이다. 이러한 관점에서 기능유전체학은 수많은 유전정보의 양적인 것으로부터 유전자의 기능을 밝히는 질적인 것으로 전환하는 핵심적인 접근이 되는 것이다. 기능유

Y.-G. Cho (✉) · H.-S. Kim · S.-H. Woo
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju 361-763, Korea)
e-mail: ygcho@chungbuk.ac.kr

H.-J. Woo · U.-H. Yoon
국립농업과학원
(National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon
441-707, Korea)

전체학은 미지의 유전자에 새로운 기능을 부여함으로써 생체 조직에 작용하는 유전자들이 어떻게 함께 상호작용하는지를 이해할 수 있는 일반적인 접근 방법이 되는 것이다. 미지의 유전자의 기능을 추정하기 위한 이들 유전자 정보는 이미 알려진 다른 유사한 유전자들의 기능을 비교함으로써 그들의 염기서열의 구조에 근거하여 추정할 수 있다. 또한, 어떤 유전자의 염색체상의 위치 정보는 이미 기능이 밝혀진 유사한 염기서열을 가진 유전자들의 염색체 위치와 기능을 통하여 그 유전자의 기능을 추론할 수 있게 한다. 그러나, 미지의 유전자의 기능을 정확히 밝히기 위해서는 식물 세포에서 모든 유전자 활동의 복잡한 상호작용에서 각 유전자의 역할을 이해하는 것이 필요하다. 따라서, 유전자의 기능분석 연구에서는 공간적 시간적 변화에 따라 발현하는 유전자의 패턴의 분석이 필요하다. 유전자 발현 수준에서의 변화에 대한 결정적인 정보는 mRNA, 단백질, 대사물질들의 다양한 질적, 양적 변화의 분석으로부터 얻을 수 있을 것이다. 최근에 유전자들의 작용을 밝힐 세포 구성요소들을 측정할 빠르고 정교한 새로운 기술들이 개발되어 이용되고 있다. 기능유전체 연구를 위하여 forward genetics, reverse genetics, transcriptomics (microarray profiling), FOX-hunting system, proteomics, chemical genomics 등의 기술들이 사용되어지고 있으며 이들 기술을 이용하여 미지 유전자들의 세포에서의 기능을 정확히 동정하고 있다.

따라서 본 총설에서는 벼 유전체 염기서열 분석 동향, 분자유전자지도에 의한 유전자 분리, 삽입돌연변이체에 의한 유전자 기능 연구, 유전자의 역유전학적 (reverse genetics) 분석, microarray를 이용한 유전자 대량 발현분석, FOX-hunting system에 의한 유전자 분석, gene silencing mutagenesis에 의한 유전자 기능 분석, proteomics에 의한 유전자 기능 분석 및 chemical genomics에 의한 유전자 분석 등에 대한 최근 연구동향에 대해 기술하고자 한다.

벼 유전체 염기서열 분석

벼는 세계인구의 반 이상이 주식으로 이용하고 있는 가장 중요한 식량작물의 하나로서 $n=12$ 의 염색체를 갖는 이배체 단자엽식물이며 그 게놈의 크기가 430 Mb (Arumuganathan and Earle 1991)로서 비교적 작아 분자유전연구의 모델식물로 이용되고 있다. 특히 벼는 다른 곡류 작물들과 유전자의 높은 상동성을 나타내며 염색체 상의 유전자 배열이 유사하여 유전자 연구에 매우 좋은 작물로서 이용되고 있다.

벼 염색체완전해독연구 (IRGSP)로 전체 염색체길이 389 Mb 중 95%인 370 Mb의 염기서열을 결정하였으며 염색체에는 전이인자를 제외한 37,544개의 유전자들이 포함되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Nature 436, 2005). 이들 유전자 중 71%의 유전자는 *Arabidopsis* 유전자와 상동성을 나타냈으며 29%는 clustered gene families인 것으로 밝혀졌다. 새롭고 정확도가 증가된 유전자지도를 기본으로 한 벼 전체 염기서열정보는 염색체 위치가 밝혀진 마커들과 연관된 유전자들을 동정하는 데에 훨씬 더 유용하게 이용될 전망이다. 국제 벼게놈염기서열분석 프로젝트 (IRGSP)의 수많은 과학자들에 의하여 얻어진 정보는 공공의 데이터베이스에 저장되어 전 세계의 과학자들에게 제공되고 있으며 (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>; <http://www.gramene.org/>; <http://rice.plantbiology.msu.edu/>; <http://rice.genomics.org.cn/>), 이미 많은 과학자들은 이 전체 염기서열정보를 이용하여 벼의 생장, 수량, 품질, 개화기 등과 같은 농업적으로 중요한 형질과 연관된 유전자들을 밝히는 연구에 활용하고 있다.

식물 유전체의 전체 염기서열정보가 밝혀지게 되면 모든 유전자들은 동정되어질 수 있는데, 그들 유전자의 기능은 염기서열간의 비교와 이미 기능이 알려진 유전자와 미지의 유전자의 기능을 단백질의 구조를 추정하는 algorithm들에 의하여 추론될 수 있다. 이와 같이 *in silico* 방법에 의하여 수많은 미지의 유전자들의 기능 예측이 가능하게 될 것이다. 그러나, 염기서열의 비교에 의한 유전자 기능의 예측은 항상 올바른 결론에 도달하지는 못한다. 왜냐하면 하나의 유전자와 관련된 일련의 단백질들을 알아도 어떤 유전자의 정확한 기능이 밝혀지지 않을 수 있다는 것이다. 실제로 *Arabidopsis*에서 예측된 유전자들의 45%가 그 기능이 맞지 않은 것으로 알려지고 있다 (Somerville and Dangl 2000). 이러한 경우에 유전자의 기능은 유전자 산물의 작용기작과 식물의 발달과정, 또는 특정한 환경조건에서의 유전자 발현에 대한 연구 등을 통하여 추론되어야만 할 것이다.

분자유전자지도에 의한 유전자 분리

유전자지도를 이용한 유전자분리 (map-based cloning)는 목표로 하는 유전자 산물에 대한 사전 정보 없이 염색체 상의 유전자 위치와 물리지도 거리에 근거하여 유전자를 분리하는 기술이다. 이러한 유전자지도를 이용한 유전자

클로닝의 첫 걸음은 우선 목적 형질 또는 유전자와 밀접히 연관된 DNA 마커를 찾는 것이다. 이를 위해서는 형질이 분리하는 100-200 계통으로 구성된 유전집단이 필요하고 이 집단을 이용하여 DNA 마커들을 염색체별로 위치시키는 분자유전자지도 (molecular genetic map)를 작성해야 한다. 또한, 이 유전집단에서 형질의 발현을 분석하고 각 계통에서의 유전분리 양상을 조사하여 유전분석을 통하여 유전자지도에 위치시켜서 그 형질과 밀접히 연관된 DNA 마커의 정보를 얻게 된다. 일단 형질 또는 유전자의 염색체상의 위치정보를 얻은 후에는 그 유전자 주변에 마커가 밀접히 분포하는 유전지도 작성이 되도록 고밀도 유전자지도를 작성해야 한다. 고밀도 유전자지도의 작성을 위해서는 유전자와 마커간에 낮은 빈도로 발견되는 recombination의 확률을 높이기 위하여 500-600 계통을 가진 유전집단이 필요하게 된다.

그 다음 단계에는 유전자와 밀접히 연관된 마커를 가지고 거대 genomic DNA 은행으로부터 BAC 또는 YAC 클론을 선발하여야 한다. 그렇게 하여 밀접히 연관된 마커를 거대 DNA 단편에 위치시키면 그곳으로부터 유전자가 있는 곳까지 'chromosomal walking'에 의하여 찾아가야 한다. 이 단계에서는 새로운 마커의 개발이 요구되고 마커와 유전자간의 recombination을 높이기 위하여 1,000-3,000 개체의 대집단을 이용해야 한다. 이 정밀유전자지도의 작성은 목표 유전자와 마커간에 조환이 발견되지 않고 공 분리 (co-segregation) 할 때까지 하여야 하며 이때 공 분리의 의미는 마커와 목표 유전자간에 조환이 없고 염색체 상의 마커의 위치에 바로 찾고 있는 유전자가 위치함을 뜻하는 것이다. 일단 목표 유전자 양쪽의 마커와 유전자간에 조환이 없는 마커들을 찾게 되면 목표 유전자는 이들 마커 사이에 존재하게 되는 것이다. 이 마커들 사이에 존재하는 모든 구조유전자들을 클로닝하여 벡터에 삽입하여 wild type 식물체에 유전자 형질전환에 의하여 각 유전자를 도입하여 돌연변이체를 육성하고 돌연변이체에서 목표 유전자의 발현을 분석한다. 만일 목표 유전자의 표현형이 돌연변이체에서 발현을 하게 되면 바로 그 구조유전자가 목표 유전자인 것이다. 마지막으로 그 구조유전자의 염기서열을 결정하여 추가적으로 필요한 분석을 통하여 최종 목표 유전자를 결정하게 된다.

이와 같은 방법은 현재 질적 및 양적형질 유전자 모두에 광범위하게 적용되고 있는데, 그 예로 토마토의 *Pseudomonas* 저항성 유전자인 protein kinase (*Pto*) 유전자를 map-based cloning으로 Martin 등이 분리하여 Science 262호

(1993)에 보고한 이래, 벼의 *Xanthomonas* 저항성 유전자인 *Xa21* (Song et al. 1995), 토마토의 *Pseudomonas* 저항성 유전자인 *Prf* (Salmeron et al. 1996) 등의 분리가 보고되고 있다. 질적유전자인 병 저항성인자 뿐만 아니라, 양적형질에 대한 연구결과로 토마토의 fruit size를 결정하는 인자인 *fw2.2* (Frary et al. 2000)나 애기장대의 blue light receptor인 *NPL1* (Kagawa et al. 2001), 벼의 개화조절 유전자 *Hdl* (Yano et al. 2000), 붉은 종피색 *Rc* (Sweeney et al. 2006, 2007) 등의 유전자가 클로닝되고 있다. 한편, 벼에서는 분자유전자지도를 이용한 유전자분리 기술로 70종의 유전자가 분리되어(Jiang and Ramachandran 2010) 왔다.

삽입돌연변이체에 의한 유전자 기능 연구 (Transposons & T-DNA)

유전자의 기능이 밝혀지지 않은 수많은 유전자들의 기능을 밝히기 위해서 연구되고 있는 한 분야가 삽입돌연변이체를 이용한 기능유전체 연구 분야인 것이다.

Ac/Ds와 같은 transposon (Martienssen 1998; Chin et al. 1999)이나 *Agrobacterium tumefaciens*의 T-DNA (Azpiroz-Leehan and Feldmann 1997; Jeon et al. 2000), 그리고 Tos17 retrotransposon (Hirochika 2001; Miyao et al. 2003)을 식물체에 삽입하여 작성한 삽입돌연변이체를 유전자의 기능연구에서 활용하게 되면 더욱 효율적으로 그 기능을 밝힐 수 있다. 이 방법은 DNA 단편의 삽입으로 발생하는 기능상실로 돌연변이체를 육성하여 삽입부위의 유전자를 PCR을 이용한 전략으로 보다 쉽게 클로닝하고 그 기능을 밝히려는 접근 방법이다. 즉, Ac/Ds, T-DNA 및 Tos17이 삽입된 부위의 유전자는 그 기능이 상실되거나 예측하지 못한 변화가 발생되기 때문에 정상적인 식물체에 비하여 잎모양, 분지수, 화기모양 등의 형태적 변이, 종자색, 잎색, 경색, 부선색 등 식물체 색의 변이, 저온, 한발, 병해충 등 재해저항성의 변이 및 기타 생화학적 기능의 변화가 나타날 수 있어(Park et al. 2009) 그러한 변화를 잘 관측해 낸다면 대량으로 유전자를 발굴할 수 있고 이를 정상 식물체(wild type)와 기능을 비교 분석함으로써 미지 유전자의 기능을 밝힐 수가 있는 것이다.

DNA 삽입돌연변이체의 육성에서 DNA가 삽입된 부위의 유전자에 기인하는 변이만 발생한다면 삽입돌연변이체에 의한 유전자의 기능연구는 매우 효율적일 것이다. 그러나, 육성된 삽입변이체들에서 표현형적으로 변이를 구분하여 관련 유전자의 기능을 밝히는 것은 한계를 드

러내고 있다. T-DNA tagging 계통의 분석의 경우를 보면 Jeon (2000) 등은 대부분의 삽입돌연변이체에서 단간 (7%) 및 잎 색소변이 (9.5%)가 빈번히 발견되고 식물체 발달과정의 변이체가 많이 발견되었다고 하였다. 벼 전체 염기서열에서 추정되는 유전자는 32,000개에 이르는데 반해 우리가 육안으로 관찰할 수 있는 표현형변이는 한계가 있으며 또한 표현형 변이를 보인다 해도 그것이 DNA 삽입에 의한 변이인지 구분하기 위해서는 후대 분석이 필요하다. 즉, 발견된 변이가 Ac/Ds나 T-DNA의 삽입에 의한 것인지를 결정해야 한다. 또한, DNA 삽입에 의한 변이 이외에도 형질전환을 위하여 조직배양을 하는 과정에는 체세포변이가 발생하기도 하고 Tos17과 같은 retro-transposon이나 MITEs(miniature inverted-repeat transposable elements) 등에 의하여 돌연변이체가 빈번히 발생하므로 유전자의 기능연구에 제한 요인으로 지적되고 있다. 그럼에도 불구하고 삽입돌연변이체를 이용하여 유전자 삽입위치 및 다양한 표현형 변이분석을 통한 미지 유전자들의 기능을 밝히는 것은 매우 효율적인 방법이다. 다양한 방법으로 변이체가 만들어졌는데, 우리나라는 농촌진흥청을 중심으로 Ac/Ds를 이용하여 동진벼에서 약 123,000점의 변이체를 육성하였고 (Lee et al. 2010), 경희대에서는 T-DNA를 이용하여 약 100,000점의 변이체를 확보하는 결과로 이어졌는데 (Ryu et al. 2010), 이는 세계 최대의 벼 변이체 pool을 확보하는 성과로 평가받고 있다. 또한, 일본의 농업생물과학연구소에서는 47,196 계통의 Tos17 돌연변이 벼 계통을 육성하여 (Miyao et al. 2003) 유전자의 기능 연구를 수행하고 있다.

유전자의 역유전학적 (reverse genetics) 분석

역유전학 (reverse genetics) 분석방법은 1995년 애기장대에서 McKinney 등에 의해 소개된 후, 많은 고등식물 유전자들의 기능 분석에 활용되고 있다 (Vitha et al. 2003; Leonhardt et al. 2004; Li et al. 2004; Adham et al. 2005; Zolman et al. 2008). 식물의 전체 유전자의 염기서열이 해독됨에 따라 특정 유전자를 선택하여 해당 돌연변이체를 분석하여 기능을 밝히는 '유전자로부터 표현형 (from gene to phenotype)'의 방향으로 진행되는 역유전학 분석이 주된 연구방법으로 활용되고 있다.

식물의 경우 삽입돌연변이 계통(Ac/Ds, T-DNA, Tos17), 과발현체 및 siRNA 등을 이용한 재료 육성이 많이 이루어지고 있으며 이들 재료를 이용한 역유전학적 유전자

기능분석 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다.

역유전학 연구방법은 주로 다음과 같은 두 가지 방법을 활용한다. 돌연변이 개체를 2차원 및 3차원의 풀(pool)로 조직화하고, 이를 이용하여 PCR을 통해 특정 유전자의 돌연변이를 찾는 방법과, 삽입된 T-DNA나 transposon의 인접 염기서열을 모든 라인으로부터 분리하여 데이터베이스로 만들어서 활용하는 방법이다.

염기서열 결정에 의해 동정된 유전자의 기능을 밝히는 직접적인 방법은 기능상실(loss-of-function) 돌연변이체를 작성하여 그 변이체의 표현형을 비교 연구하여 기능을 밝히는 것이다. 여러 모델식물에서 정상의 유전자를 돌연변이 된 유전자로 교체함으로써 특정 유전자의 돌연변이를 연구하는 데에 homologous recombination 방법이 효율적으로 이용된 바 있지만(Kempin et al. 1997) 대규모 유전자의 기능을 밝히는 데에는 효율적이지 못하다. 따라서, 유전체 염기서열분석에서 동정된 많은 유전자들의 돌연변이체를 얻기 위하여 T-DNA나 transposon의 삽입에 의하여 수많은 돌연변이체를 얻을 수 있었고(McKinney et al., 1995; Martienssen, 1998; Chin et al. 1999; Jeon et al. 2000) 이들을 이용하여 많은 미지 유전자의 분리와 그 기능을 밝히는데 효율적으로 이용되어 왔다. *Arabidopsis*에서 삽입돌연변이체를 이용한 연구에서 DNA의 삽입에 의해 육성한 돌연변이체에서 열악한 형질의 출현이 빈번히 나타났으며(Gilliland et al. 1998; Hirsch et al. 1998), 많은 경우에 삽입 유전자와 관련이 있는 변이체의 뚜렷한 표현형의 구분이 어려웠다(Bechtold et al. 1993).

따라서, 이러한 문제점을 보완하고 유전자들의 기능을 보다 효율적으로 밝히기 위하여 유전자의 기능을 결실시킨(loss-of-function) 돌연변이체와 더불어 유전자의 발현을 증대시키는 과발현(gain-of-function) 돌연변이체를 육성하여 미지의 유전자의 기능을 밝히려는 연구가 시도되고 있다. 벼나 *Arabidopsis*와 같은 모델 식물들에서는 유전체 염기서열결정 프로젝트를 통하여 이미 전체 염기서열이 밝혀져서 database에 저장되어 있고 T-DNA나 transposon의 삽입돌연변이체에서 삽입부위의 유전자에 대한 FST (flanking sequence tag) 정보가 밝혀져서 database에 저장되어 있어 이용이 가능하므로 이들 정보를 이용하여 유전자를 RT-PCR 등에 의하여 분리하여 다시 정상 식물체에 형질전환에 의하여 과발현 변이체를 육성하고 T-DNA 또는 Ac/Ds 삽입돌연변이체, 정상 식물체를 상호 비교함으로써 유전자의 기능을 효과적으로 밝힐 수 있다(Zheng 2007).

FOX-hunting system에 의한 유전자 분석

미지의 수많은 농업형질 유전자의 기능을 해석하기 위해서 최근에 주요 식물에서 밝혀진 염기서열 유전정보를 이용하여 식물의 기관별로 완전장 발현유전자 (full-length cDNA; FL-cDNA)의 분리와 이들을 조직내에 과발현시켜 유전자 발현양상 및 표현형분석에 의한 기능 동정이 보다 효율적인 접근 방법으로 시도되고 있다. 유용유전자를 다량으로 확실하게 얻을 수 있는 방법으로 식물의 각 기관으로부터 mRNA를 추출하고 이를 바탕으로 새로이 개발된 기술을 이용하여 완전장 cDNA를 다량으로 작성한 후 모든 염색체 염기서열이 밝혀진 벼나 애기장대에 형질전환시켜서 후대에서 나타난 변이체를 이용하여 그 관련 유전자를 분리해낸 후 다시 본래의 식물에 형질전환하여 그 유전자의 기능을 확인하는 방법으로 이를 “full length cDNA를 이용한 종합적 유전자 기능 해석 시스템” (FOX-hunting system; Full-length cDNA Over-expressor gene hunting system)이라고 한다 (Ichikawa et al. 2006). FOX-hunting 시스템에서는 하나 또는 소수의 FL-cDNA를 형질전환체에 과발현하여 이용하는 것이다. 이와 같은 형질전환체는 많은 수의 우성 돌연변이를 유기하여 유전자의 기능을 동정하거나 중요한 형질의 발현 정보를 분석하는 데에 효율적으로 이용될 수 있다.

최근 식물에서는 발현 유전자의 대량 염기서열분석 및 완전장 유전자 (full-length cDNA, FL-cDNA) 분리 연구가 *Arabidopsis* (Seki et al. 2004), 벼 (Kikuchi et al. 2003) 및 배추 (Lee et al. 2010) 등에서 수행되었고 이를 이용하여 FL-cDNA를 식물형질전환용 운반체에 삽입한 FL-cDNA library를 제작하여 이들 FL-cDNA를 식물체에 도입하여 수많은 과발현 (gain-of-function) 돌연변이체를 육성하여 유전자의 기능을 밝히려는 시도가 진행되고 있다 (Ichikawa et al. 2006; Nakamura et al. 2007). 애기장대에서는 이 시스템에 의해 FL-cDNA를 애기장대 세포에서 항시적으로 발현시키는 기술을 확립하여 15,000개의 과발현 형질전환체를 육성하였고 (<http://nazunafox.psc.database.riken.jp>), 작성된 형질전환 계통들을 FOX-line이라고 하여 유전자 기능 해석에 이용하고 있다. 벼의 경우 일본 농업생물자원연구소에서는 *japonica* 벼인 Nipponbare 품종 유래 FL-cDNA를 동일한 Nipponbare 품종에 형질전환시켜 12,000개의 서로 다른 형질전환 벼를 육성하여 (Nakamura et al. 2007) 수많은 미지 유전자의 기능연구에 활용하고 있다.

Gene Silencing Mutagenesis (RNAi)에 의한 유전자 기능 분석

최근 유전자의 작용을 불활성화하여 유전자의 기능을 결정하는 방법이 미지 유전자의 기능을 밝히는 연구에 매우 효율적인 방안으로 이용되고 있다. Anti-sense 또는 co-suppression 현상은 유전자 형질전환 식물체에서 빈번히 발견되고 있는데 (Baulcombe 1996; Jorgensen 1999), 어떤 경우에는 단지 부분적인 기능만이 anti-sense 또는 co-suppression에 의하여 억제되기도 한다. RNA silencing 방법 중에서 RNA interference (RNAi) 기술이 gene silencing을 유도하는 데에 가장 광범위하게 이용되고 있다 (Zheng et al. 2007).

RNA silencing이 발생할 때에는 dsRNA는 RNaseIII 같은 효소 (Dicer1)에 의하여 20~25 bp의 짧은 RNA의 siRNA (short interfering RNA)와 miRNA (micro RNA) 절단되어진다. 이 siRNA와 miRNA가 RNA-induced silencing complex (RISC)를 이루어 전사, RNA 안정성 및 번역단계에서 유전자 발현을 억제하게 되는 것이다.

식물에서 RNAi silencing을 이용하는 주요 내용은 어떻게 dsRNA를 식물내로 도입하는가이다. 현재 식물에서는 RNA-mediated silencing을 위하여 2가지 형태의 방법이 이용되고 있는데, 하나는 식물 세포내로 dsRNA를 운반하는 virus-based vector이다. 그러나 이 시스템은 후대에 유전되지 않는 단점을 가지고 있다. 다른 방법은 hairpin RNA (hpRNA)-mediated gene silencing 방법으로 목표 유전자와 관련이 없는 염기서열로 중간이 채워진 inverted repeat의 형태로 제작하여 쌍자엽 식물에는 35S CaMV, 단자엽 식물에는 옥수수의 ubiquitin 1과 같은 강력한 프로모터와 함께 이용하게 된다. 중간의 spacer로서 intron이 이용될 경우에는 효율이 매우 높아 형질전환체의 거의 100%가 gene silencing을 보인다 (Kusaba 2004). 그러나, 이 방법은 식물의 재분화를 방해하거나 배의 치사를 일으키는 유전자에는 사용할 수 없다.

유전자의 기능을 전체 genome에 대하여 수행하기 위하여 inverted repeats를 이용하여 목표 유전자를 대량으로 클로닝 하기 위한 운반체가 Wesley 등 (2001)에 의하여 개발되었다. 또한, heterologous 3'UTR의 inverted repeat로부터 RNA targeting (transitive RNAi)를 이용하는 RNAi 운반체도 개발되었다 (Brummell et al. 2003). 따라서 RNAi를 이용하는 gene silencing은 단일 유전자 또는 유전자군의 기능을 밝히는데 뿐만 아니라 전체 genome의 유전자들에 대한 기능 연구에도 효율적인 방법으로 이용되고 있다.

이 RNAi-mediated gene silencing 방법은 벼에서 미지 유전자들의 기능을 밝히는 데에 성공적으로 이용되어 왔다. 최근까지 전사인자, 개화 관련 단백질, pathogen/membrane

관련 단백질, 다양한 protein kinase 및 세포분열 관련 단백질 등 70여종의 유전자들이 RNAi silencing에 의하여 그 기능이 밝혀졌다 (Zheng et al. 2007). 이러한 결과는 RNAi에 의한 gene silencing에 의하여 보다 다양한 유전자들의 기능분석에 효과적으로 적용될 수 있음을 보여주고 있다.

화학돌연변이 유기와 Tilling에 의한 유전자 기능연구

화학돌연변이의 유기에는 ethyl methane sulfonic acid (EMS)가 가장 흔하게 이용되고 있다. 이 alkylating agent는 핵산의 화학적 변형을 손쉽게 일으켜 nonsense, missense and silent mutations 등을 포함하는 다양한 점돌연변이를 유발한다. 이들 돌연변이 형태 중에서 silent mutation은 표현형의 변화를 일으키지 않으므로 돌연변이원으로는 사용할 수 없다. *Arabidopsis*에서 EMS는 주로 C를 T로 변화시켜 C/G를 T/A로 치환하며 낮은 빈도로 G/C를 C/G로 또는 7-ethylguanine hydrolysis에 의해 G/C를 T/A로 피리미딘이 퓨린과 치환되는 염기쌍치환 돌연변이 또는 3-ethyladenine pairing errors에 의한 A/T를 G/C로 전이시킨다 (Krieg 1963). EMS 처리된 애기장대의 codon usage를 분석한 결과 stop codon과 missense mutation의 발생빈도는 각각 5%와 65%인 것으로 보고되었다 (McCallum et al. 2000).

애기장대에서는 125,000개 M1 계통이 EMS 처리에 육성되었는데 (Jander et al. 2003), 이들 돌연변이체를 이용하여 기능분석연구를 수행하기 위해서는 어떠한 방법으로 단일 염기변이(SNP)와 염기치환을 돌연변이체에서 발견하는가에 달려 있을 것이다. McCallum 등(2000)은 이를 해결하기 위하여 SNP (single nucleotide polymorphism)를 탐색하는 기술을 근간으로 하여 denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)로 보완된 TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes)이라고 불리는 새로운 탐색 방법을 개발하였다. 이 기술에 의해 화학적으로 유기된 돌연변이 pool을 역유전학적인 방법으로 분석할 수 있게 되었으며 자동화 분석장치의 도입에 따라 짧은 시간내에 광범위한 돌연변이 pool의 스크린이 가능하여 많은 동식물에서 이용되고 있다 (Triques et al. 2007, 2008). 벼에서는 diepoxybutane과 EMS에 의하여 각각 18,000개와 9,000개의 돌연변이체가 육성되었으며 (Wu et al. 2005), 10개의 유전자에 대한 TILLING 분석에 의하여 독립적인 돌연변이체로부터 2개의 유전자 기능을 밝혔다. 또 다른 연구팀에서는 10개의 유전자에 대하여 분석하여 10개의 유전자를 동정하였고 (Till et al. 2007) 각각의 유전자로부터 다수의 염기변이를 발견하였다. 이와 같이 EMS와 같은 화학물질에 의하여 유기된 돌연변이체를 이용하여 유전자 기능분석을 할 경우 TILLING 방법이 보다 효율적으로 사용 가능하다.

Microarray를 이용한 유전자 대량 발현분석

식물 유전체의 미지의 유전자들에 대하여 유전자의 기능을 밝히거나 세포에서의 역할에 대한 정보를 얻는데에 differential gene expression에 의한 대량 분석방법은 매우 강력한 수단으로 이용되고 있다. 최근 식물에서 전체 유전체 완전 염기서열에 대한 annotation project (Rice Annotation Project 2007; Swarbrek et al. 2008)에서 동정된 유전자들을 이용하는 microarray에 의한 전사체 profiling은 기능유전체 연구에서 가장 확실한 수단으로 개발되어 왔으며 수많은 가공되지 않은 염기서열정보로부터 유전자의 기능 정보를 얼마나 효율적으로 이끌어 낼 수 있는가를 보여주고 있다. mRNA의 합성은 단백질 합성의 첫걸음이며 많은 유전자들에서 mRNA 발현의 변이는 결국 단백질 합성의 변화를 초래하게 된다. 즉, mRNA 발현량의 상대적인 차이는 환경의 변화에 대한 반응이며 식물 발육의 변화의 척도가 되거나 식물이 받은 모든 종류의 자극에 대한 반응의 결과로 생각할 수 있다. 유전자의 기능을 이해하기 위해서는 언제, 어디에서 어느 정도로 유전자가 발현되는지를 아는 것과 목표 유전자와 같이 조절되는 다른 유전자들을 발견하는 것이 중요하다. 특정 유전자들에 대한 mRNA의 농도를 측정하여 어떤 기관에서 전사되는 mRNA를 관찰함으로써 미지 유전자의 기능을 예측할 수 있게 된다. 이와 같은 접근 방법으로 microarray를 이용하는 전사체 profiling은 기능유전체 연구를 위한 가장 강력하고 다양한 기술들이 시도되고 있다.

Microarray (또는 DNA chip)는 유전자의 발현양상을 대량으로 분석 가능하게 하여 기존 종래의 단일 유전자 발현 분석에 비하여 매우 빠른 속도로 분석을 가능하게 하였다. 벼 발현유전자 정보분석의 경우 일본 농업생물자원연구소에서는 벼 염색체 염기서열정보를 기초로 발현유전자영역을 분석하는 프로그램(RAPD)을 이용하여 32,745개의 발현정보를 분석하여 IRGSP Build4를 통하여 발현정보를 제공하고 있고, 미국의 경우 미시간대학 벼 계통 annotation 프로젝트를 통하여 56,797개의 발현유전자 정보를 제공하고 있다. 초기에는 베이징 계통연구소의 발현정보를 이용한 60K microarray (GreenGene Biotech)가 제작 상용화되어 대량유전자 발현분석 등 기능유전체 연구를 위한 도구로 사용되어 왔으나, 현재 벼 발현유전자 정보를 이용하여 44K microarray (Agilent), 45K microarray (NSF), 135K microarray (GreenGene Biotech), 300K microarray (GreenGene Biotech), GeneChip array (Affymetrix) 등이 제작되어 활용되고 있다.

벼의 주요 농업형질관련 유전자 발현 profiling 분석으로 microarray를 이용하여 유전자 발현을 조절하는 2,700여개 전사조절인자의 조직부위별 발현을 검정하고 있으며 호르몬, 내재해성, 종자발달단계 등에서의 유전자 발

현을 검정하는 광범위한 실험이 수행되고 있다 (Sato et al. 2007; Jain et al. 2009; Degenkolbe et al. 2009; Shinozaki et al. 2006; Furutani et al. 2006). 국내에서 벼 microarray를 이용한 유전자 대량발현분석 연구의 경우는 국내에서 대량으로 확보하고 있는 Ac/Ds tagging 삽입변이체 및 T-DNA tagging 삽입변이체 재료를 이용하여 유전자발현 profiling 분석과 유전자간 상호작용을 분석하고 있다 (Jung et al. 2008; Lee et al. 2009). 특히 식물의 특정 형질 유전자들은 식물의 발달과 생장, 환경스트레스 및 종자의 발달 등에 특이하게 작용할 것으로 유추되며, 이들의 발현분석에는 microarray에 의한 transcriptome profiling의 분석이 필수불가결하다 (Rensink et al. 2005). 또한 유전자 상호간 및 단백질간의 상호작용의 이해는 여러 유전자가 복합적으로 작용하는 주요 수량, 재배, 발달, 미질 관련 형질의 개선에 크게 기여할 것으로 기대되며 형질유전자들 간의 발현 network 구축은 필수적이다.

따라서, 최근 microarray를 이용한 대량 유전자 발현분석 및 이들 정보를 활용할 수 있는 시스템의 구축과 실제 유전자 발현네트워크를 이용한 유용형질 유전자 분리 연구에 많은 관심이 고조되고 있으며, 벼의 주요 농업형질의 개선연구에 이용하고 있다 (Shinozaki et al. 2007). 따라서 향후 개발되는 21세기의 환경 친화적 신형질 벼의 개발을 위한 관련 유전자 분석 등에 microarray 기술이 크게 이용될 것이며, 이러한 microarray에 의한 유전자의 대량 발현분석은 유전자의 전반적인 발현 조절기작 및 주요 농업형질 관련 유전자 기능분석 연구에도 크게 이용될 수 있다.

Proteomics에 의한 유전자 기능 분석

프로테오믹스(Proteome)는 단백질 (protein)과 게놈 (genome)의 합성어로서 프로테오믹스는 proteome의 어미에 접미사 -ics를 붙여 프로테오믹스를 연구하는 방법과 기술을 포괄적으로 의미하는 말로 (Wilkins et al. 1996), ‘단백질체학’으로 불리운다. 프로테오믹스의 개념에서 가장 중요한 기능적인 의미는 ‘한 생명체에서 발현되는 전체 단백질을 한 번에 총체적으로 연구하는 기술’을 뜻한다. 즉, 한 생명체가 가지고 있는 전체 유전자는 게놈 (genome)이고 프로테오믹스 (proteome)는 게놈에서 발현되는 전체 단백질을 의미하고 프로테오믹스는 이들 단백질을 한 번에 분석하는 학문을 의미한다. 프로테오믹스 (proteomics)는 단백질을 동정 (identification)하고 정량 (quantitation)하며 세포내 위치 (localization), 수식화 (modification), 단백질 상호작용 (interaction), 단백질 활성 (activities), 그리고 궁극적으로 세포내 기능 (cellular function)을 연구하는 분야로서 (S. Fields,

2001), 다른 단백질과의 연관성 (protein-protein interaction)에 초점을 두고, 생명체내의 단백질 발현 과정과 연계되는 단백질들 그리고 질병과 같은 외적요인 등에 관계되는 단백질을 총체적으로 분석하는 기술이다.

프로테오믹스와 지노믹스는 공히 유전자의 기능을 밝힌다는 점에서 목표는 같으나 방법이 매우 다르다. 기술적으로는 실험의 출발점도 전자가 단백질 차원에서, 후자는 유전자차원에서 각각 유전자의 기능을 연구하는 기술이므로 연구형태가 매우 다르다. 그러나 이 둘은 실제 유전자구조를 이용한다는 점에서 한 뿌리이며 상호보완적인 연구분야이다. 가령 지노믹스가 세포의 핵산 (DNA, RNA, 또는 이들의 유사체)을 대상으로 각 유전자 발현의 정도차이를 분석하고, 유사 유전자들의 수집 및 분류, 특정 생리조건에 반응하는 유전자들의 대량분석 (DNA칩 및 올리고 칩), 특정 유전자의 발굴 (mining)을 수행하는 연구분야로서, 이미 알고 있는 유전자구조를 근간으로 연구하는 기술인데 비해, 프로테오믹스는 일단 유전자의 산물인 단백질을 대상으로 조직이나 세포, 체액과 같은 개체의 실시간 세포 생리현장에서 얻어진 시료를 대상으로, 이들을 대량으로 분석하고, 상호기능관계의 지도를 작성하며, 구조분석을 통하여 궁극적으로 특정 단백질과 이를 만드는 유전자의 기능을 동시에 밝혀내는 기술이다. 실제로, 특정 유전자의 발현과 단백질의 발현차이에는 밝혀진 유전자를 기준으로 30% 이상이 상관성이 거의 없는 것으로 알려져, 그 만큼 지노믹스의 수단으로 단백질과 유전자의 발현(mRNA) 상관성을 분석하고 예측하기는 불가능하다. 이 두 분야에 속한 공통분야가 있는데, 구조유전체학 (structural genomics) 또는 구조프로테오믹 (structural proteomics)라고도 불리는 단백질 구조분석 연구이다. 이 분야는 프로테오믹스에 의해 밝혀진 특정 단백질이나 이미 알려진 게놈 DB상의 특정 유전자 정보를 바탕으로 단백질의 1 차 구조를 예측하고, 구조와 기능간의 관계를 유추하여 궁극적으로는 생리적 활성상태인 가상적인 3차 구조를 추측해 낸다. 이러한 결과를 사용하여 한 유전자가 최종적으로 세포 내에서 어떠한 기능을 하는가 얼마나 정교하고, 적절하게 단백질 합성 후 변형되는가 등을 연구한다. 프로테오믹스를 이용해 최종적으로 완벽한 모양과 기능이 갖추어진 단백질을 분석하지 않고는 그 유전자의 세포내 기능을 알 방법이 없기에 프로테오믹스의 독특한 가치가 여기에 있는 것이다.

유전체학 (genomics)은 생명체의 DNA, RNA 등의 유전

정보의 수집, 분석, 발굴 등에 관련된 연구분야와 유전 정보를 바탕으로 구조와 기능을 추정하는 구조유전체학 (structural genomics) 분야 등이 있다. 이러한 연구를 바탕으로 여러 생명현상들에 대한 후보 유전자를 추정하고 리간드 (ligand)나 수용체 (receptor)들을 추정함으로써 연구 방향을 설계한다. 이러한 연구를 수행하는 유전체학의 주된 연구방법은 게놈 염기서열 분석을 통한 염색체 지도 작성, 유전자의 유사성 등을 비교분석, DNA 구조결정 등이 있다. 하지만 유전체의 염기서열 결정만으로 해결되지 않는 문제점으로는 1) 분석된 유전자들이 실제로 발현되어 단백질로 만들어지는 유전자인가? 2) 어떤 유전자가 세포내에서 발현이 많고 적은가? 3) 유전자가 단백질로 발현 되었을 때 생리적으로 어떠한 특성을 가지는가? 4) 활성화된 단백질이 되기 위해 어떠한 번역 후 수식 과정을 거치는가? 등의 문제점들의 해답을 위해서는 유전정보에서부터 전사되고 번역되어 최종적으로 생명체 내에서 기능을 나타내는 단백질들을 분석하지 않고는 그 유전자의 세포내의 역할과 기능을 알 수가 없다. 그리고 유전자에서 전사된 mRNA가 단백질로 번역되는 단계도 세포, 조직, 시간, 외부환경 등에 따라 다양한 것으로 알려져 있다. 그렇기 때문에 직접적으로 생명체 내에서 어떠한 기능을 나타내는 단백질을 직접적으로 연구해야 할 필요가 있다.

Chemical genomics에 의한 유전자 분석

인체를 비롯한 생물의 유전체 염기서열 정보의 완성으로 생명의 실체에 대한 이해를 획기적으로 앞당길 수 있는 기능유전체학 (functional genomics) 시대가 도래하였으나, 인체와 벼 등에서 3만 여 개로 추정되는 유전자들의 기능 분석에는 더 많은 시간과 노력이 필요하다. 이러한 필요성에 등장한 효율적인 연구방법론으로 인체에서 질병연구 및 치료약의 개발을 위해 새로 등장한 platform technology중 하나가 미국 하버드 대학의 Stuart L. Schreiber 교수 (2003)의 주도로 생겨난 화학 유전체학 (chemical genomics)이다. 유전자의 기능 해석을 위한 기존의 보편적인 방법은 특정 유전자에 화학적 변형을 유발한 돌연변이체를 이용하는 것이었으나, 유전자의 변형 없이 유전자의 산물인 단백질과 친화도가 높은 화합물을 이용하여 단백질의 기능을 직접 조절함으로써 유전자를 돌연변이 시켰을 때와 상응하는 효과를 나타낼 수 있다는 것이 화학유전체학의 개념이다.

현재 화학유전학은 순화학유전학적 접근에 초점을 맞추고 있다. 식물에서 특정 표현형을 주는 표적단백질들의 새로운 기능의 발견은 식물의 생장과 발육, 병원균이나 해충방제 등의 표적이 될 수 있고 그 표적에 결합하는 저분자화합물은 바로 식물의 생장과 발육을 조절하는 새로운 물질의 동정이 가능하고, 또 새로운 개념의 농약 개발을 위한 선도물질로서 활용할 수 있기 때문에 가장 효율적인 유용 화학물질의 발굴과 식물의 발달을 조절하는 화학물질 및 새로운 농약 후보 물질 도출 기법으로 각광받고 있다. 화학 유전체학에서는 대량의 다양한 화학물질을 이용하여, 대량의 유전자의 발현과 기능을 연구하는 학문이다. 화학 유전체학은 분자량 1,000 이하의 저분자 화합물과 최신 유전체학의 개념 및 기술을 사용하여 유전자 기능해석과 신약 개발의 효율성을 극대화하는 새로운 패러다임의 연구 기법이다. 즉, 특정 유전자의 기능을 알아보기 위해선 그 유전자에 대한 화학적 변형을 유발한 특정 돌연변이체를 이용하는 기능유전체학과 달리, 화학유전체학은 유전자의 변형 없이 그 유전자가 생산하는 단백질과 친화도가 높은 화합물을 이용하여 단백질의 기능을 직접 조절함으로써 유전자의 정체 및 기능을 규명할 수 있다. 화학 유전체학은 유전체학 계열중에서 신약 개발 및 새로운 농약 개발과 가장 가까운 분야이다. 즉, 특정 유기화합물이 생체기능을 조절하는 활성이 있는 경우 이 화합물질을 생체 기능을 조절하는 신약개발의 선도물질로서 화학적 정보(chemoinformatics)를 제공할 뿐만 아니라 이들 화합물의 세포내 표적 단백질이 결정될 경우 이 단백질이 특정 병과의 관련 여부를 확인하게 할 수 있게 함으로써 단백질의 기능을 매우 간편하고 효율적으로 해석할 수 있는 유용한 수단이 될 수 있다.

사 사

이 연구는 농촌진흥청 바이오그린21연구과제 (# 20070501-034-005)와 어젠다연구과제 (# 2-7-11)의 지원에 의해 수행되었다.

인용문헌

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287:2185-2195
- Adham AR, Zolman BK, Millius A, Bartel B (2005) Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. Plant J 41:859-874
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. Trends Genet 13:

- 152-156
- Arumuganathan K and Earle ED (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Bio Rep* 9:229-233
- Baulcombe DC (1996) RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol*. 32:79-82
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Ser III* 316:1194–1199
- Brummell DA, Balint-Kurti P, Harpster MH, et al. (2003) Inverted repeat of a heterologous 3'-untranslated region for high-efficiency, high-throughput gene silencing. *Plant J*. 33: 798-800
- Chin HG, Choe MS, Lee SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, et al. (1999) Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J* 19:615-623
- Degenkolbe T, Do PT, Zuther E, Repsilber D, Walther D, Hinch DK, Köhl KI (2009) Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant Mol Biol*. 69:133-153
- Fields, S (2001) Proteomics. *Proteomics in genomeland. Science* 291:1221-1224
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) Fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289:85-88
- Furutani I, Sukegawa S, Kyozuka J (2006) Genome-wide analysis of spatial and temporal gene expression in rice panicle development. *Plant J*. 46:503-511
- Gilliland LU, McKinney EC, Asmussen MA, Meagher RB (1998) Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual *Arabidopsis* actin genes. *Genetics* 149:717-725
- Hirochika H (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol*. 4:118-122
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR (1998) A role for AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: 918-921
- Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, et al. (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J*. 48:974-985
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800
- Jain M, Khurana JP (2009) Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J*. 276:3148-3162
- Jander G, Baerson SR, Hudak JA, et al. (2003) Ethyl methanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiol*. 131: 139-146
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, Kim C, Jang S, et al. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J* 22:561-570
- Jiang SY and Ramachandran S (2010) Natural and artificial mutants as valuable resources for functional genomics and molecular breeding. *Int J Biol Sci* 6:228-251
- Jorgensen RA, Que Q, Stam M (1999) Do unintended antisense transcripts contribute to sense co-suppression in plants? *Trends Genet*. 15:11-12
- Jung KH, An G, Ronald PC (2008) Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nat Rev Genet* 9:91-101
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M (2001) *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291:2138-2141
- Kempin SA, Liljegren SJ, Block LM, Rounsley SD, Lam E, Yanofsky MF (1997) Inactivation of the *Arabidopsis* *AGL5* MADS-box gene by homologous recombination. *Nature* 389: 802-803
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, et al. (2003) Collection, Mapping, and Annotation of Over 28,000 cDNA Clones from Japonica Rice, *Science* 301:376-379
- Krieg DR (1963) Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4rII mutants. *Genetics* 48:561-580
- Kusaba M (2004) RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotechnol*. 15:139-143
- Lee GS, Park SH, Yun DW, Ahn BO, Kim CG, Han CD, Yi GW, Park DS, Eu MY, Yoon WH (2010) Current status of Ac/Ds mediated Gene Tagging Systems for Study of Rice Functional Genomics in Korea. *Journal of Plant Biotechnology* 37(2): 125-132
- Lee IH, Jung YJ, Park JI, Nou IS, Kang KK (2010) Systematic approaches to identify functional genes using the FOX-hunting system in Chinese cabbage. *Journal of Plant Biotechnology* 37(2):174-185
- Lee TH, Kim YK, Pham TT, Song SI, Kim JK, et al. (2009) RiceArrayNet: a database for correlating gene expression from transcriptome profiling, and its application to the analysis of coexpressed genes in rice. *Plant Physiol*. 151: 16-33
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI (2004) Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16:596-615
- Li X, Cordero I, Caplan J, Molhoj M, Reiter WD (2004) Molecular analysis of 10 coding regions from *Arabidopsis* that are homologous to the MUR3 xyloglucan galactosyltransferase. *Plant Physiol* 134:940-950
- Martienssen RA (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2021-2026
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993)

- Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, et al. (2000) Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123:439-442
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meagher RB (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J* 8:613-622
- Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka Y, Onosato K, Hirochika H (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon rich regions of the genome. *Plant Cell* 15:1771-1780
- Nakamura H, Makoto H, Kou A, Akio M, Naoko T, Mariko K, et al. (2007) A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol. Biol.* 65:357-371
- Park DS, Park SK, Han AI, Wang HJ, Jun NS, Manigbas NL, et al. (2009) Genetic variation through Dissociation(Ds) insertional mutagenesis system for rice in Korea : progress and current status. *Molecular Breeding* 24:1-15
- Rensink WA, Buell CR. (2005) Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends Plant Sci.* 10:603-609
- Ryu HS, Ryoo NY, Jung KH, An JH, Jeon JS (2010) Rice Functional Genomics Using T-DNA Mutants. *Journal of Plant Biotechnology* 37(2):133-143
- Rice Annotation Project (2007) Curated genome annotation of *Oryza sativa ssp. japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 17:175-183
- Satoh K, Doi K, Nagata T, Kishimoto N, Suzuki K, Otomo Y, et al. (2007) Gene organization in rice revealed by full-length cDNA mapping and gene expression analysis through microarray. *PLoS One.* 2:e1235
- Salmeron JM, Oldroyd GE, Rommens CM, Scofield SR, Kim SR, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (1996) Tomato Prf is a member of leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell* 86:123-133
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, et al. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183
- Schreiber SL (2003) The small-molecule approach to biology: chemical genetics and diversity-oriented organic synthesis make possible the systematic exploration of biology. *Chem Eng News* 81:51-61
- Seki M, Masakazu S, Tetsuya S, Kenji A, Kei I, Junko I, et al. (2004) RIKEN arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J. Experimental Botany* 55:213-223
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot.* 58:221-227
- Somerville C and Dangl J (2000) *Plant Biology in 2010*. *Science* 290:2077-2078
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, et al. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science* 270:1804-1806
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, et al. (2008) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D1009-14
- Sweeney MT, Thomson MJ, Pfeil BE, McCouch SR (2006) Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *Plant Cell* 18:283-294
- Sweeney MT, Thomson MJ, Cho YG, Park YJ, Williamson SH, et al. (2007) Global dissemination of a single mutation conferring white pericarp in rice. *PLoS Genetics* 3(8):e133.doi: 10.1371
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815
- Till BJ, Cooper J, Tai TH, et al. (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.* 7:19
- Triques K, Sturbois B, Gallais S, et al. (2007) Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J.* 51:1116-1125
- Triques K, Piednoir E, Dalmais M, et al. (2008) Mutation detection using ENDO1: application to disease diagnostics in humans and TILLING and Eco-TILLING in plants. *BMC Mol Biol.* 9: 42-51
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H, Osteryoung KW (2003) ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* 15:1918-1933
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, et al. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27:581-590
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:19-50
- Wu JL, Wu C, Lei C, et al. (2005) Chemical- and irradiation-induced mutants of *indica* rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol.* 59:85-97
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000) *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2484
- Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF and Chen Z (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biology* 7:1-13
- Zolman BK, Martinez N, Millius A, Adham AR, Bartel B (2008) Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics* 180:237-251