

FOX hunting system을 이용한 배추 기능유전자 탐색

이인호 · 정유진 · 박종인 · 노일섭 · 강권규

Systematic approaches to identify functional genes using the FOX-hunting system in Chinese cabbage

In-Hoo Lee · Yu-Jin Jung · Jong-In Park · Il-Sup Nou · Kwon-Kyoo Kang

Received: 12 April 2010 / Accepted: 29 April 2010

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Full-length cDNAs are essential for the correct annotation of genomic sequences and for the functional analysis of genes and their products. To elucidate the functions of a large population of Chinese cabbage (*Brassica rapa*) genes and to search efficiently for agriculturally useful genes, we have been taking advantage of the full-length cDNA Over-eXpresser (FOX) gene hunting system. With oligo dT column it purify the each mRNA from the flower organs, leaf and stem tissue. And about 120,000 cDNAs from the library were transformed into λ -pFLCIII-F vector. Of which 115,000 cDNAs from the library were transformed into T-DNA binary vector, pBig5 for transformation study. We used normalized full-length cDNA and introduced each cDNA into *Arabidopsis* by in planta transformation. Full-length Chinese cabbage cDNAs were expressed independently under the CaMV 35S promoter in *Arabidopsis*. Selfed seeds were harvested from transgenic *Arabidopsis*. We had selected 2,500 transgenic plants by hygromycin antibiotic tolerant test, and obtained a number of transgenic mutants. Each transgenic *Arabidopsis* was investigated in morphological changes, fertility and leaf colour. As a result, 285 possible morphological mutants were identified. Introduced cDNA was isolated by PCR amplification of the genomic

DNA from the transgenic mutants. Sequencing result and BLAST analysis showed that most of the introduced cDNA were complete cDNAs and functional genes. Also, we examined the effect of Bromelain on enhancing resistance to soft rot in transgenic Chinese cabbage ‘Osome’. The bromelain gene identified from FOX hunting system was transformed into Chinese cabbage using *Agrobacterium* methods. Transformants were screened by PCR, then RT-PCR and real time PCR were performed to analyze gene expression of cysteine protease in the T1 and T2 generations. The anti-bacterial activity of bromelain was tested in Chinese cabbages infected with soft rot bacteria. The results showed that the over-expressed bromelain gene from pineapple conferred enhanced resistance to soft rot in Chinese cabbage.

Keywords Full length cDNA, overexpression, transgenic plants, morphological mutants, FOX hunting system

서론

1990년대 중반 이후부터 인간을 비롯한 마우스, 벼, 옥수수, 각종 산업미생물 등의 전 염기서열 및 유전자 기능을 결정하는 게놈 프로젝트가 몇몇 선진국과 다국적 거대기업 등에서 앞을 다투어 완성되고 있다. 그 후 전체 게놈이 만들어 내는 단백질의 기능을 밝히려는 proteomics 및 전체 단백질의 3차 구조를 결정하려는 프로젝트가 빠른 속도로 진행되고 있는 실정이다. 유전자 기능 연구를 위해 모델식물을 대상으로 T-DNA, *Tos17* retrotransposon 및 *Ds* transposon 삽입법에 의해 유전자 기능이 소실된 돌

I.-H. Lee · J.-I. Park · I.-S. Nou
순천대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Sunchon National University,
Suncheon 540-742, Korea)

Y.-J. Jung · K.-K. Kang (✉)
한양대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Hankyong National University,
Anseong 456-749, Korea)
e-mail: kykang@hkun.ac.kr

연변이체를 이용하여, 기능 및 발현 제어 등에 관한 연구가 많이 진행되었다 (An 등 2003; Hiochika 등 2004; Chen 등 2003; Ryu 등 2004; Sallaud 등 2004; Miyao 등 2003; 2007; Park 등 2007; Jeong 등 2002; Ichikawa 등 2003). 이들 유전자 Tagging법은 Tag로서 T-DNA 또는 transposon을 무작위로 게놈 중에 삽입시키는데 이러한 Tag가 삽입된 유전자는 그 기능이 파괴되기 때문에 어떤 기능의 유전자가 Tagging되었는지 알 수가 있다. 그러나 이 방법은 게놈내 Tag 삽입 유전자가 over expression 될 경우와 게놈내 여러 유전자에 함께 삽입되어 형질발현 또는 기능 파괴되었을 경우 등에서 해석이 모호하다. 또한 Weigel 등 (2000)은 Tag 내부에 activator로써 enhancer 배열을 사용하여 전사활성화가 가능한 게놈 영역을 살펴본 결과 Tag가 삽입한 영역으로부터 5-10 kb 정도까지 유전자들의 발현에 영향을 미친다고 하였다. 또한 애기장대 및 벼와 같은 모델식물에서는 게놈의 10 kb 영역에 평균 2개 이상의 유전자가 존재하기 때문에 삽입된 enhancer에 의해 어떤 유전자가 활성화 되었는가를 판단하는 것이 곤란하다 (Ichikawa 등 2006; Miyao 등 2007). 따라서 원인유전자를 탐색하기 위해서는 이들 삽입부위 근방의 모든 유전자를 분리하여, 과발현하는 형질전환체에서 표현형의 재현성 여부를 확인하는 것이 불가결하다. 따라서 이들 방법은 목적 형질 대비 원인유전자를 탐색하는데 상당히 많은 시간이 소요된다.

이러한 문제점을 해결하고 유용유전자를 다량으로 확실하게 얻을 수 있는 한 방법이 최근에 개발되고 있다.

식물의 각 기관으로부터 mRNA를 추출하고 이를 바탕으로 새로이 개발된 기술을 이용하여 완전장 cDNA를 다량으로 작성한 후 모든 DNA의 염기서열이 밝혀진 애기장대에 형질전환시켜서 후대에서 나타난 변이체를 이용하여 그 관련 유전자를 분리해낸 후 다시 본래의 식물에 형질전환하여 그 유전자의 기능을 확인하는 방법인데 이를 “Full length cDNA를 이용한 종합적 유전자 기능 해석의 식물 시스템”이라고 한다. 이 방법은 (1) 발현조절배열을 포함하는 완전장 cDNA의 library를 작성하여 이를 식물에 도입하고, (2) cDNA가 도입된 식물 집단에서 목적의 선발조건에 적합한 식물체를 선발하고, (3) 선발된 식물체로부터 cDNA를 단리하고, (4) 단리된 cDNA를 도입된 식물체와 동종의 식물체에 재도입하여 선발조건에 따른 표현형질을 재확인하는 것이다. 이 시스템은 sense mRNA를 발현시키거나 (단백질 과잉 또는 감소 발현), antisense mRNA를 발현시켜 (통상 단백질의 발현량 감소) 특정 형질의 표현형이 나타날 경우 모두 우성 또는 반우성의 표현형질로서 나타나게 된다. Full-length cDNA는 promoter 분석, 발현 및 기능해석과 식물단백질의 구조분석을 위하여 유용하게 이용되며, 이 시스템을 도입하여 작물의 생식기관에서 발현하는 완전장 유전자 (full-length cDNA)를 대량으로 확보할 수가 있다. 최근 애기장대에서 FL (full-length)-cDNA library를 작성하여 (Seki 등 2004), 이들 FL-cDNA를 이용한 기능획득 방법의 일환으로 FOX-hunting system (Full-length cDNA Over-expressor Gene Hunting System)이 개발되었다 (Ichikawa 등 2006). 또한 이 시스템에 의해

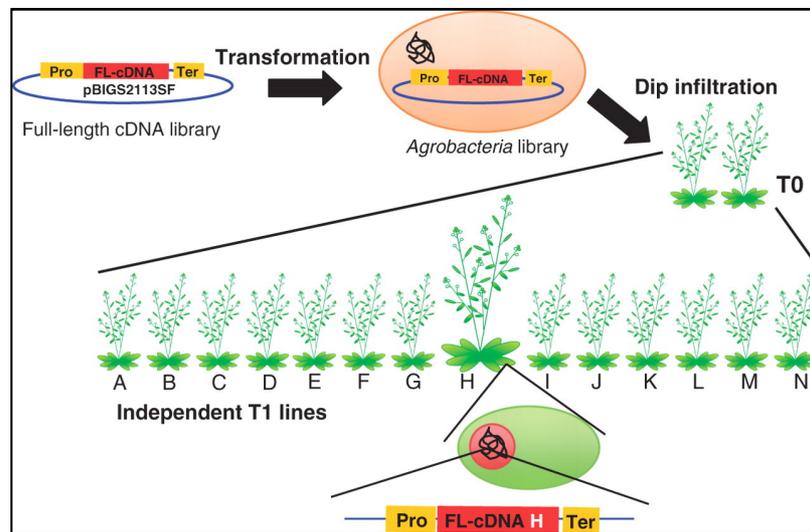


Fig. 1 Scheme for the generation of FOX lines. To generate FOX *Agrobacterium* libraries, RIKEN *Arabidopsis* full-length (RAFL) cDNAs (fl-cDNA) from libraries were recloned into the pBIG2113SF vector containing the *CaMV35S* promoter, the TMV omega sequence (indicated as ‘Pro’) and the *NOS* terminator (indicated as ‘Ter’), and transformed into *Agrobacterium*. *Arabidopsis* plants are transformed with the FOX *Agrobacterium* libraries by floral dip infiltration. The T0 FOX plants generated are self-pollinated, and then many independent T1 FOX seed libraries are obtained. From the T1 FOX lines, phenotypic mutant lines (in this case, the ‘H’ line) are identified. The corresponding gene of the ‘H’ mutation is easily and immediately identified by PCR with T-DNA-specific primers and sequencing

FL-cDNA를 애기장대 세포에서 항시적으로 발현시키는 기술이 확립되었고, 작성된 형질전환 계통들을 FOX-line이라고 하여 유전자 기능해석에 이용하고 있다 (Fig. 1).

미래학자들은 21세기 국부의 척도를 유전자원의 양과 질에 의하여 결정될 것으로 전망하고 있는바, 상품가치가 있는 유전자원의 수집 및 활용을 통한 신작물과 신품종의 개발 없이는 선진농업 진입에 한계가 있을 것이라고 전망하였다. 국제적으로는 생물다양성협약이 발효되고, 식물유전자원 국제규약 개정안을 마련중이나, 자원보유국 (주로 개도국)과 자원이용국 (주로 선진국)간 이해가 상충되고, 이에 따라 국제적인 갈등을 겪기도 하고 있다. 최근 WTO/TRIPs 규정, UPOV 협약 등이 이루어지면서 육종선진국들은 신품종보호 등록 후 로열티를 요구하며, 우리나라에서도 이러한 문제가 심각한 이슈가 되고 있다.

이러한 상황가운데 벼, 배추, 고추, 무 등의 작물을 대상으로 한 한국의 육종 기술 수준은 세계 최고로 평가받아 왔다. 그러나 최근의 국제현황을 살펴보면 분자마커 및 형질전환체 개발에 의한 고품질 신품종의 출현이 등장하면서 국내 종자 시장에 상당한 영향을 미치기 시작했고 이에 대한 국가 차원의 경쟁력을 위해 국내 육종 기술 체계의 패러다임이 매우 절실한 상황에 이르렀다. 따라서 한국이 지속적으로 종자강국을 유지하기 위해서는 전통육종방식에 분자유종체계를 접목시키고 이를 발전시켜야 될 것이다.

본 논문에서는 배추 ('Osome')의 균질화된 완전장 cDNA 및 FOX-Agrobacterium library를 작성하여 대량의 기능성 유전자를 탐색하는 방법 및 그 성과에 관하여 기술하였다.

본 론

균질화된 완전장 cDNA 및 Agrobacterium library 작제법

고 순도 mRNA 정제 및 diol그룹의 biotin화

Total RNA는 배추의 화아조직, 엽조직 및 경조직 등에서 분리하여 MAXS mRNA isolation kit (Miltenyi Biotec, USA) 및 PolyA-Quick (Stratagene, USA) kit를 사용하여 mRNA를 준비하였다. Biotin 반응은 cDNA 합성 전 및 후에 수행하였다. First-strand 합성 후, 시료에 0.8 μ l의 0.5M EDTA 및 1.3 μ l의 5M NaCl을 첨가하였다. 시료를 phenol/chloroform 및 chloroform처리 후, ethanol 침전시켜 70% 및 80% ethanol로 세척한 후, 멸균수에 현탁하였다. 연속하여 시료는 산화촉매제로서 5 mM NaIO₄가 포함된 25 μ l의 66 mM sodium acetate용액 (pH 4.5)에서 mRNA의 diol 그룹을 산화시켰다. 산화반응은 어두운 상태에서 45분간 얼음 위에서 수행하였다. 산화된 mRNA/cDNA hybrid는

연속하여 2.5 μ l의 5M LiCl, 0.5 μ l의 10% SDS 및 동량의 isopropanol을 첨가하여 침전시키고, 또다시 mRNA/cDNA hybrid를 -20°C에서 30분간 방치 후, 4°C, 15분간 15,000 rpm 원심하여 침전시켰다. 침전물은 70% ethanol로 세척한 후 25 μ l의 멸균수로 현탁 하였다. 다음으로 2.5 μ l의 1M sodium acetate (pH 6.1), 2.5 μ l의 10% SDS 및 75 μ l의 10 mM biocytin hydrazide를 현탁액에 첨가하였다. RNA의 산화된 diol 그룹은 실온 (22-26°C)에서 O/N 방치시킴으로써 biotin화시켰다. 마지막으로 핵산들은 2.5 μ l의 5M NaCl, 37.5 μ l의 1M sodium acetate (pH 6.1), 2.5배량의 ethanol을 첨가하여 침전시켜, 얼음 위에서 1시간 방치 후, biotin화된 시료를 4°C, 15분간 원심에 의하여 침전시킨 후, 침전물을 70% 및 80% ethanol로 각 1회씩 세척 후, RNase-free 멸균수로 현탁하였다.

자성 bead의 blocking 및 핵산의 capturing

First-strand full-length cDNA/mRNA hybrid를 streptavidin (CPG, New Jersey, USA)으로 coating된 MPG (magnetic porous glass)입자에 capturing시켰다. 핵산 결합전에 100 μ l의 bead (1% 현탁액: 1 mg의 bead는 800 pmol의 biotin화된 25-mer oligonucleotide를 결합시킬 수 있음)를 10 μ l의 40 μ g/ μ l DNA-free tRNA를 첨가하여 blocking 시켜, 얼음 위에서 혼합하면서 1시간 방울 시켰다. 핵산 capturing 직전에 magnetic stand를 이용하여 bead를 분리하며, pipetting하여 상청을 제거하였다. Blocking 절차 후에 bead를 500 μ l의 2M NaCl 및 50 mM EDTA, pH 8.0 용액으로 3회 세척하며, 100 μ l의 2M NaCl 및 50 mM EDTA, pH 8.0 용액에 현탁 하였다. cDNA (약 0.5 μ g)를 bead sedimentation을 방지하기 위하여 carrier로서 100 μ g의 tRNA 존재하에 온화하게 혼합하면서 30분간 실온에서 capturing하였다. 비 결합된 cDNA를 제거 후, bead를 100 μ g/ml tDNA를 포함한 500 μ l의 2M NaCl 및 50 mM EDTA, pH 8.0 용액으로 4회 세척 하였다. 최후로, cDNA를 100 mM NaOH, 5 mM EDTA를 처리한 bead로부터 elution 시킨 후, alkaline gel에 loading하였다 (Fig. 2).

First-strand cDNA 준비

mRNA의 2 μ g는 first-strand *Xho*I primer-adapter 1 μ g와 함께 65°C, 10분간 변성시켰다. 역전사반응은 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT와 각 3 mM의 dATP, dTTP, dGTP 및 dCTP를 포함한 total 20 μ l의 용액에서 실시하였다. 또한, 방사선표식을 위하여 반응용액에 1 μ l의 [³²P]dGTP (3000 Ci/mMol, 10 mCi/ μ l, Amersham, UK)를 첨가하였다. Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 primer 회합반응을 수행하였으며, 반응액은 45°C에서 전처리한 후, 반응혼합액에 pFLC-III를 첨가하였다. 그 후, 회합반응은 35°C가 될 때까지 1분에 1°C씩 하강시켰다. 그리고

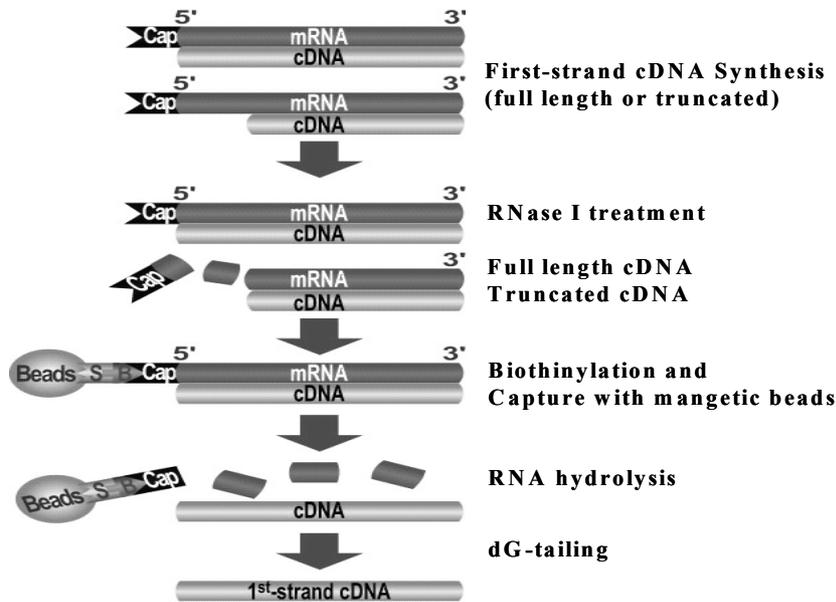


Fig. 2 Flowchart of the proposed protocol for the preparation of the cDNA library by using the modified biotinylated cap trapper

다시 35°C에서 5분간 연속처리 후, 1시간에 걸쳐 45°C까지 상승시킨 후, 10분간 50°C 처리하였다. First-strand 합성량을 계산하기 위하여 0.5 µl의 방사선 표식 반응용액을 DE-81 paper상에 spot한 후, 방사능을 측정하여 incorporation (cpm)을 계산하였다.

Full-length cDNA의 RNase protection 및 TAP처리

First-strand cDNA는 RNase protection을 위해 RNase I (RNase ONE™, Promega, USA) 20unit를 사용하여 30°C, 30분간 처리하였다. 또한 Cap제거를 위하여 150 unit의 TAP (Nippon Gene, Japan)를 사용하였다.

Full-length cDNA의 capturing

Full-length cDNA는 미리 block시킨 500 µl의 자성 bead를 이용하여 capturing하였다. 비결합된 cDNA를 제거한 후에 bead를 100 µg/ml tRNA가 포함된 0.5M EDTA, pH 8.0 용액으로 4회 세척하였다. 그 후, 0.4% SDS, 50 µg/ml tRNA 용액으로 1회, 20% glycerol, 10 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 용액으로 1회, 50 µg/ml tRNA가 포함된 nuclease-free 멸균수로 2회, nuclease-free 멸균수로 1회, 1x RNase H buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT)로 1회 세척하였다. Bead로부터 full-length cDNA를 분리하기 위하여 시료를 0.1% SDS 및 10 mM EDTA가 첨가된 100 µl의 RNase H buffer (2 units)로 37°C에서 30분간, 65°C에서 10분간 연속 반응시켰다. 불완전한 RNase H 처리로 인하여 bead로부터 제거되지 않은 cDNA fraction (약 60%의 cDNA가 결합됨)을 제거하기 위하여 100 µl의 Tris-formate buffer, pH 9.0 용액에서 65°C, 10분간 alkaline 가수분해를 수행하

였다. 반응 후, bead로부터 cDNA가 들어있는 수층을 분리하기 전에 5 µl의 10% SDS 및 1 µl의 0.5M EDTA를 첨가하였다. Alkaline elution을 3회 반복하며, 동시에 alkaline 처리 fraction 및 RNase H-fraction도 함께 제거시켰다. Single-strand cDNA를 phenol/chloroform으로 1회 추출하며, G50 Sephadex chromatography에 주입하였다. 방사선 표식 fraction을 튜브에 수집하고 2 µg의 glycogen을 첨가 후, cDNA를 EtOH로 침전시켰다.

Single-strand cDNA의 oligo (dG) tailing

Single-strand cDNA의 oligo (dG) tailing반응을 200 mM sodium cacodylate, pH 6.9, 1 mM MgCl₂, 1 mM CoCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM dGTP 및 32 unit의 terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara, Japan)가 포함된 용액에서 수행하였다. 시료를 37°C, 30분간 반응시킨 후, EDTA를 최종 농도 50 mM이 되도록 첨가하며 phenol/chloroform 및 chloroform추출을 1회 수행한 후, EtOH로 침전시켰다.

Second-strand cDNA 합성

Oligo (dG)가 tailing된 first-strand cDNA를 최종량 60 µl로 반응액을 조성하였다[3 µl의 second-strand low buffer, 3 µl의 second-strand high buffer, 600ng의 second-strand SacI primer-adapter, 0.25 mM dNTP, 0.5 mM beta-NADH, 15 unit의 Ex Taq DNA polymerase (Takara), 150 unit의 Ampligase, DNA ligase, 3 unit의 Hybridase, RNase H 포함]. PCR반응은 “hot start”법을 이용하였으며, 55°C에서 5분간 반응시킨 후, 35°C까지 분당 0.3°C 씩 하강시키면서 primer 회합을 수행하였다. 그 후 반응액은 35°C에서 15분간 처리후 72°C에서 15분간 연속 반응시켰다. 회합/신장 cycle을 3회 반

복한 후 마지막으로 1 ul의 0.5M EDTA, 1 ul의 10% SDS 및 2 ul의 proteinase K (10 ug/ul)를 첨가하여, 시료를 45°C에서 15분간 반응시켰다. 시료를 phenol/chloroform 및 chloroform 추출한 후, EtOH로 침전시켰다.

제한효소 절단, Cloning 및 염기서열 결정

cDNA를 *Sall/XhoI* 및 *BamHI*으로 절단하였다. 시료에 1 ul의 0.5M EDTA, 1 ul의 10% SDS 및 2 ul의 proteinase K (10 ug/ul)를 첨가한 후, 45°C에서 15분간 반응시켰다. 시료를 phenol/chloroform 처리하며 Sephadex (G100) chromatography로 분획한 후, ethanol 침전시켰다. 140 ng의 cDNA를 lambda pFLC-III vector에 12°C, O/N ligation 반응시켰다. 시료를 전기영동 한 agarose gel로부터 lambda arm을 정제하기 위하여 agarase를 이용하였다. Ligation 된 cDNA는 phenol/chloroform 및 chloroform추출 후, phage에 packaging하였다. Plasmid DNA를 RNase A 처리 후, 추출하였다. DNA 염기서열은 Dye Terminator kit를 이용하여 Applied Biosystem DNA sequences 377로 결정하였다. DNA hybridization은 7% PEG 6000, 10% SDS, 100 ug/ml salmon sperm DNA가 포함된 hybri 용액에서 65°C, O/N 반응시켰다. Hybridization 반응 후, 필터를 2x SSC 및 0.1% SDS용액을 이용하여 65°C에서 세척하였다. 염기서열의 상동성은 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용하여 분석하였다.

in vitro Excision

Phage DNA 추출은 “Wizard[®] Lambda Preps DNA Purification System” (Promega, USA, cat. #A7290)을 사용하였다. 1회 증폭한 phage stock을 적어도 1×10^{10} pfu 사용하여 실험하였다. *in vitro*에서 Cre recombinase에 의한 excision을 하기 위해서 phage DNA를 다시 정제하였다. Phage DNA의 여과는 “MicroSpin S-400 HR column” (Amersham Bioscience, cat. #27-5140-01)을 이용하였다. 정제 phage DNA의 agarose gel 전기영동 해석을 하여 phage DNA의 정량 및 품질확인하였다. EtBr을 포함한 1% agarose gel에 2 μ L 및 5 μ L의 시료를 정량 marker (λ DNA 각 5 ng, 10 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng)와 함께 단시간 전기영동한 후, 시료를 marker와 비교하여 결정하였다. Phage DNA를 plasmid로 변환하기 위하여 phage DNA의 Cre recombinase를 반응시켜 절출하였다. 통상 New England BioLabs의 Cre recombinase (cat. #M0298 S)를 사용하였다. Kit 내에는 pLox2+control DNA가 포함되어 있으며 control로서 매회 사용하였다. 직선화한 pLox 2+의 길이는 3.65 kb로 양쪽으로부터 약 350 bp의 위치에 *loxP* 부위가 존재하고 있다. 2개의 *loxP* 부위간에 복제 origin이나 ampicillin 내성유전자가 위치하고 있고, 이들 2개의 *loxP* 부위간에 조환이 일어나면 환상의 ampicillin

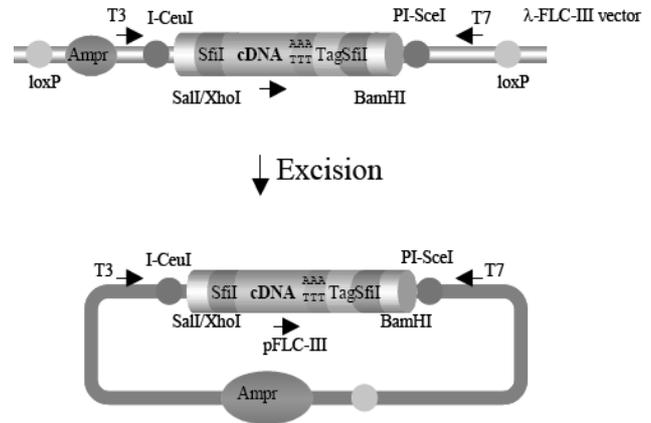


Fig. 3 Phage DNA plasmid vector construction by utilizing Cre recombinase

내성 plasmid가 만들어진다 (Fig. 3). Excision에서 절출한 plasmid DNA를 대장균에 도입시켰다. 박테리아는 ElectroMAX[™] DH10B[™] T1 Phage Resistant Cells (Invitrogen, cat. #12033-015), 전기융합장치는 Disposable Microelectroporation Chamber (Whatman, cat. #11608-031), CELL-PORATOR[®] Pulse Control and Power Supply (Invitrogen LIFE TECHNOLOGIES[™])을 사용하였다.

cDNA의 5'말단 및 3'말단의 sequence 해석

BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem사)를 이용하여 cDNA의 5'말단 및 3'말단의 염기를 해석하였다. 5'말단배열 해석용 primer (M13-21 seq. primer)로서는 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', 3'말단배열 해석용 primer로서는 RV-M primer; 5'-AGCGGATAACAA TTTACACAGGA-3' 및 T7 promoter primer; 5'-TAATACG ACTCACTATAGGG-3'를 사용하였다.

Fox-hunting system을 이용한 Agrobacterium library 작제

cDNA insert를 혼합물체로 강발현 대장균 plasmid vector로 옮겨 필요량의 대장균을 수집, plasmid 추출 후, Agrobacterium에 도입하여 Agrobacterium library를 제작하였다. 완전장 cDNA의 번역개시 ATG codon이 promoter뒤에 반드시 결합되도록 완전장 cDNA를 강발현 vector와 함께 디자인하였다. 그래서 우선 강발현형 binary vector에의 삽입 공정을 위하여 완전장 cDNA를 특정 제한효소로 절단하여 insert cDNA를 회수하며 동일한 제한효소로 절단한 강발현 vector에 도입하였다. 이와 같이 구축된 vector를 대장균에 cloning하고, colony-PCR법에 의해 순도를 확인 한 후, Agrobacterium에 도입하여 library를 구축하였다.

Table 1 Blastn result analysis compared sequences of *A. thaliana* cds and Chinese cabbage unigene

	FLC-library	EST-library
Full-length ratio (blast to <i>A. thaliana</i>)	90.0%	76.0%
% Identity to <i>A. thaliana</i>	87.25%	87.57%
% Identity to <i>B. rapa unigene</i>	95.02%	96.7%
New sequence to <i>A. thaliana</i>	19.0%	18.2%
New sequence to <i>B. rapa unigene</i>	23.9%	15.5%

배추 완전장 cDNA의 품질확인

cDNA library의 insert DNA 크기 및 분포

cDNA library의 품질 평가를 위해 1,700 clone의 plasmid DNA를 추출한 후, *sfi* I 처리 결과 다양한 크기로 insert DNA가 존재하였다. Insert가 없는 것은 18개 clone이었고, 500-1,000 bp에서 538개, 1,000-1,500 bp에서 500개, 1,500-2,000 bp에서 301개 clone으로 전체의 78.8%였으며, 3,000 bp 이상은 35개 clone 이었다. DNA library의 품질을 평가하기 위하여 염기서열을 분석한 결과 제작된 'Osome' library는 완전장율이 90%, noble 유전자가 23.9%로 cDNA library의 품질이 우수하였다 (Table 1).

cDNA 5'말단의 sequence 해석

상기의 조제 plasmid DNA의 96개의 clone들을 sequence 반응용으로 농도조정 후, BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem사)를 이용하여 5' 말단을 sequence 반응 시킨 후 반응액을 DNA analyzer ABI3700 (Applied Biosystem사)를 이용하여 전기영동 후 해석하였다. Sequence 성공수는 96개 clone중 92개 clone이었으며, 92개의 clone중 중복된 clone은 2개였고 오염된 clone은 없었다. 완전장을 해석에 있어서 배추과 작물 유래의 mRNA에 95%이상의 상동성으로 hit한 clone 수는 6개 였으며, 적어도 ORF의 5'측이 포함되어 있는 clone 수는 3개이었다. cDNA 5'측 해석 결과, e-10이하의 significance로 hit한 clone 수는 88개이었다.

배추 FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대 변이체 선발

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)는 배추과 초본식물로서 전형적인 개화식물이며 그 크기가 작아 좁은 공간의 실험실내에서나 멸균된 배양배지에서 배양이 가능하다. 또한, 이 종은 고등식물 중에서 게놈 크기가 70,000 kb로 매우 작을 뿐만 아니라, 반복적인 DNA가 거의 없는 까닭으로 유전자 지도 (genome map) 작성이 용이하며 (Pruitt and Meyerowitz 1986), 돌연변이의 유발과 선택도 용이하다

(Meyerowitz 1985). 애기장대는 이러한 이유 때문에 식물 분화기작을 규명하는 model system으로 이용되고 있으며 (Pattom and Meinke 1988), 또한 life cycle 및 genome organization 등에 있어서도 많은 장점을 가지고 있어 분자유전학적 방법을 이용한 조직배양 또는 원형질체 배양 등의 연구에 많이 이용되고 있다 (Pattom and Meinke 1988; Chaudhury and Signer 1989).

기능 손실 돌연변이체를 통해서 유전자를 클로닝하고 그 기능을 연구하는 방법은 그 광범위한 활용성에도 불구하고 단점이 존재하여 그 유용성이 제한된다. 그리고 기능 손실 돌연변이체를 제조하는 것은 일반적으로 비교적 쉬운 반면, 해당 유전자를 클로닝 하는 것은 매우 시간이 많이 소요되었다. 그러나 바이러스의 35S 프로모터 enhancer를 이용한 활성 표지 선별법 (activation tagging screen)은 기능 획득 돌연변이체를 선별함으로써 전술한 제한점을 극복할 수 있게 되었다. 특히 이 활성 표지 선별법은 얻어진 기능 획득 돌연변이체로부터 유전자를 분리하는데 걸리는 시간이 상대적으로 매우 짧다. 최근 형질 전환 기술의 발달로 대규모의 활성 표지 형질전환체 집단을 만드는 것이 점점 용이해지고 있기 때문에, 본 연구에서는 'Osome' 유래 FOX-Agrobacterium library를 이용한 애기장대의 변이체 선발 유전자 기능 해석을 하였다. 그 결과 2,500계통의 T1종자를 획득하였으며, 1계통씩 line화하여 파종, 개화를 유도하여 표현형질이 변한 285개의 형질변이체를 선발하였다 (Fig. 4).

배추의 완전장 cDNA library로부터 ABC transpoter 유전자 분리

ABC (ATP-binding cassette) 수송체는 생체막을 통한 여러 가지 기질의 수송에 가담하는 다양한 기능을 가지며, 또한 세균에서 인간에 이르기까지 그 구조와 기능이 잘 보존된 가장 큰 유전자군을 이루는 단백질군이다. 기능 면에서 보면, ABC 수송체는 ATP 의존적 pump뿐 아니라 이온통로 조절 활성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 현재 대장균에서 인간에 이르기까지 약 100 여종 이상의 ABC 수송체가 연구되었으며, 가장 많이 연구된 단백질의 예는 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 계열, MRP (multidrug resistance-associated proteins) 계열, MDR (multidrug resistance-related proteins) 계열 등이 있다. 본 연구에서는 표준화된 완전장 cDNA library로부터 1) ABC 수송체 관련 유전자를 선발하였고, 2) 이미 보고된 유전자들과의 상동성 비교 및 구조분석을 하여 그 기능적 특성을 밝혔고, 3) 해당 유전자들의 유전자 발현 조절 기전을 분석하였다.

ABC 수송체의 염기서열 분석 및 BlastX 분석

배추의 표준화된 완전장 cDNA library로부터 ABC transporter 유전자를 탐색, clonning하였다. Clone no. 14, no. 261,

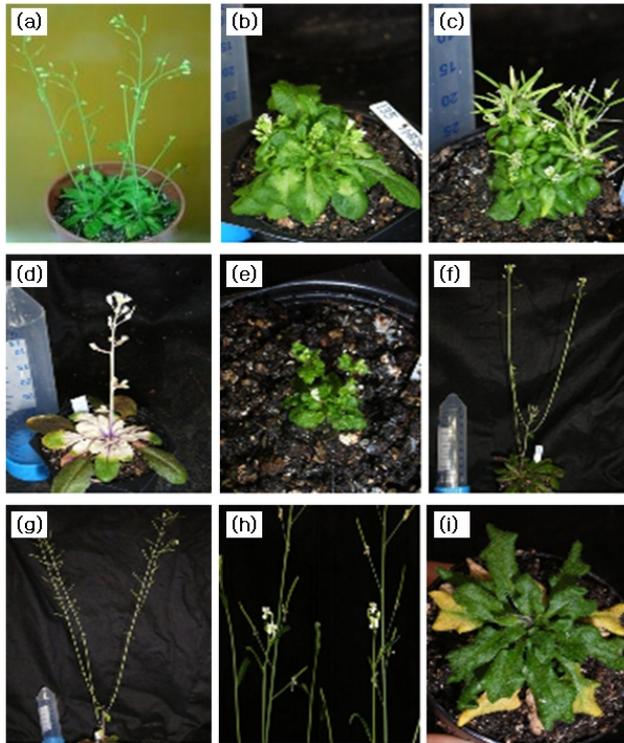


Fig. 4 Visible mutants appearing in Chinese cabbage FOX Arabidopsis lines. Various visible mutants became apparent during construction of the Chinese cabbage FOX Arabidopsis lines. These phenotypes are represented in the T2 generation. (a) Wild-type Arabidopsis at the mature stage. (b) Plant height-dwarf. (c) Plant height-dwarf. (d) Cauline leaves-others (albino). (e) Plant height-dwarf. (f) Branching-other. (g) Branching-other. (h) Flower-petal. (i) Rosette-shape

272 및 289의 염기서열을 결정하여 아미노산배열로 치환하였다. mRNA의 poly A 뒤에 tag한 염기서열로부터 clone no. 14 유전자는 화아조직 (TACG) 유래, clone no. 261, 272 및 289 유전자들은 엽육조직 (CATG) 유래인 것을 알았다. No. 14 유전자는 1,350 bp의 완전장 cDNA였고, No. 261 유전자는 2,061 bp의 완전장 cDNA로써 5' UTR영역을 99 bp, 3' UTR영역을 109 bp 포함하고 있었다. No. 272 유전자는 3,900 bp, No. 289 유전자는 2,124 bp의 완전장 cDNA이었다. BlastX 분석결과, No. 14 유전자는 Arabidopsis의 세포막 결합형 유전자인 ATPase (NP_564383.1)와 95%의 상동성을 나타냈다. 또한 No. 261 유전자는 *Brassica rapa* (cv. pekinensis)의 세포막 결합형 유전자인 ATPase (AAZ41825.1)와 99%의 상동성을 나타내었고, No. 272 유전자는 Arabidopsis의 camodulin 결합형 유전자인 ATPGP1 (NP_181228.1)과 95%의 상동성을 나타냈다. 그리고 No. 289 유전자는 Arabidopsis의 세포막 결합형 유전자인 ATPase (NP_191071.1)와 83%의 상동성을 나타냈다.

ABC 수송체의 아미노산 배열 상동성 비교 및 계통 분석

Cloning된 4종의 ABC transporter 유전자를 Arabidopsis, 벼, 옥수수 유래의 ABC transporter 유전자와 비교하여 계통수를 작성하였다 (Fig. 5). 그 결과, no. 272 유전자는 ABC 유전자 subfamily C군에 속하는 벼의 OsMdr14, 옥수수의 ZmPgp1 및 Arabidopsis의 AtPgp1과 같이 grouping되었다. No. 14 및 no. 289 유전자는 subfamily G군에 속하는 Arabidopsis의 AtAbcg 및 AtAbcg2와 같이 grouping되었다. No. 261 유전자는 subfamily F군에 속하는 Arabidopsis의 AtAbcf2 및 AtAbcf3와 같이 grouping되었다.

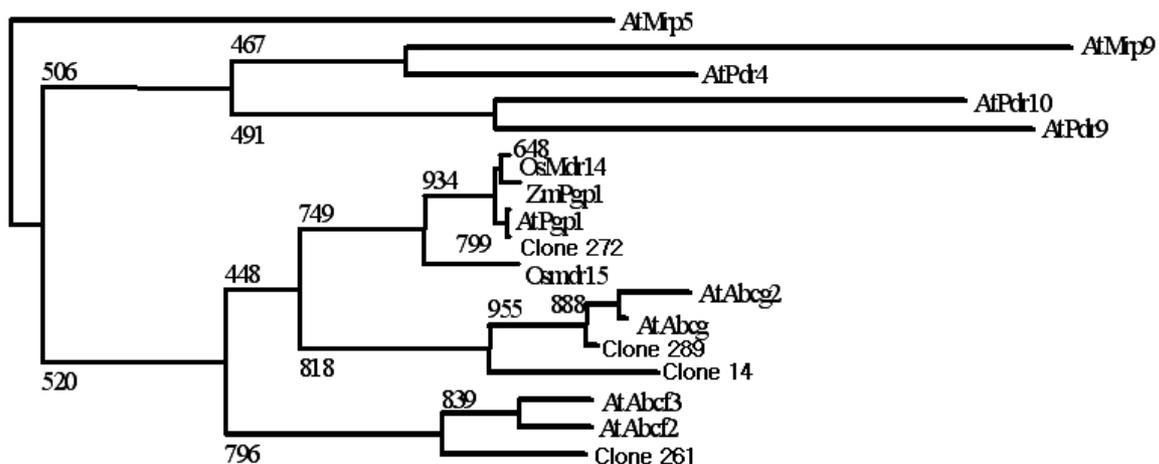


Fig. 5 Phylogenetic tree of ABC transporter proteins. Representative members of the ABC transporter superfamily from *Arabidopsis thaliana* L. (AtMrp 5, AtMrp 9, AtPdr 4, AtPdr 9, AtPdr 10, AtPgp 1, AtAbcg 2, AtAbcf 3, AtAbcf 2), *Zea mays* L. (ZmPgp 1) and *Oryza sativa* L. (OsMdr 14, OsMdr 15). Clone numbers(14, 261, 272 and 289) were isolated from Chinese cabbage in this study

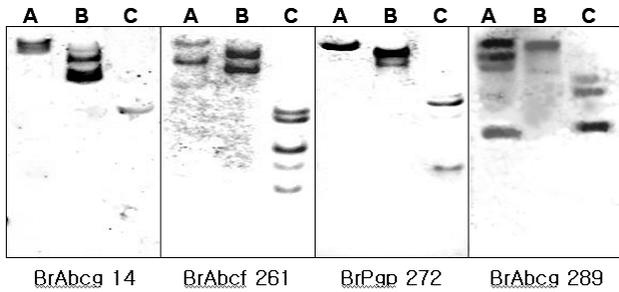


Fig. 6 Southern blot analyses of ABC transporter proteins (No. 14, No. 261, No. 272 and No. 289) in Chinese cabbage. Genomic DNA of Chinese cabbage was digested with *Bam*HI(A), *Eco*R I(B), *Hind*III(C) enzymes.

ABC의 Southern blot 및 RT-PCR 분석

배추 게놈내 ABC transporter 유전자의 다양성을 분석하기 위하여 cloning된 4종 유전자를 probe로 이용하여 Southern blot 분석을 하였다 (Fig. 6). 3종의 제한효소로 소화한 결과 각 유전자는 배추내에 1 copy 이상 존재하였다. 또한 Cloning된 4종 유전자의 기관 발현성을 검토하기 위하여 주두, 수술, 꽃잎, 악편, 화경, 엽, 줄기 및 뿌리의 total RNA를 이용하여 RT-PCR분석을 하였다. 그 결과, 모든 기관에서 유전자 산물이 강하게 발현되었다.

배추 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자 분리 및 기능해석

파인애플 (*Ananas comosus*)의 줄기에서 얻어지는 Bromelain은 단백질 분해효소 중 cystein protease로 분류되는 protease의 복합체이다. 파인애플은 중세 시대부터 세계 여러 곳에서 민간 약용물질로서 사용이 되어왔으며, 파인애플로부터 추출되어진 bromelain은 보조소화제, 소염제 (Mynott 등 2002; Manhart 등 2002; Gaspani 등 2002; Maurer 2001), 항 혈청 응고제, 항암작용, cytokines 조절 및 면역작용, 피부 좌멸조직 제거, 순환계 활성화 증강 등의 의약품으로써 효과가 있는 것으로 보고되어 있다 (Engwerda 등 2001). 배추의 완전장 cDNA library로부터 Bromelain 유전자를 분리하여, 그 기능을 분석하기 위하여 배추 형질전환체를 육성하여 그 특성을 살펴보았다.

Bromelain 유전자를 도입한 형질전환 서울배추의 작성

Bromelain 유전자를 삽입한 식물발현 벡터를 배추범 (Takasaki 등 1997; Kuginuki 등 2001)에 의하여 서울배추에 도입하였다. *Agrobacterium*을 감염시킨 절편체를 callus 유도배지에서 배양 10일 후부터 callus가 형성되기 시작하였다. 또한 재분화 배지에 2회째의 계대배양 후기부터 callus에서 부정아가 형성되기 시작하였으며 3회 계대배양에서는 많은 multi-shoot가 발생하였다. 이들 작은 싹들은 성숙배지에서 초장이 7-8 cm 정도 될 때까지 성장

시킨 후, kanamycin 100 mg/L이 포함된 MS hormone free 배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 발근된 개체는 pot에 옮겨 순화시켰으며, 8-10°C, 40일간 저온처리 후, 개화를 유도하였다. 개화된 개체는 뇌수분에 의해 T1을 획득하였다.

약제내성에 의한 T1 형질전환체 선발 및 T2 transgenic event 선발

항생제 내성실험을 위하여 뇌수분에 의해 획득한 T1 25개체의 자식종자를 Hyg 50 mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 멸균하여 치상하였다. 치상 10일 후, 발아, 생육 및 고사 정도를 판정하여 18개체 (72%)가 형질전환체임을 확인하였다. 이들 18개체 (이하 계통이라 함)들을 배지로부터 pot로 옮겨 본엽 5-6매 정도까지 성장시킨 후, 위와 같이 저온처리 후 자식종자 (T2)를 획득하였다. T2를 계통 당 15-20립을 Hyg 50 mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하였다. 치상 5일 후 지속적 성장여부에 관한 계통 내 분리 유무를 판정하여 생사를 결정하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타냈다. 18계통 중 6계통은 비형질전환체, 7계통은 도입된 유전자가 헤테로, 5계통은 도입된 유전자가 호모이었다 (Table 2).

Transgenic event의 형질전환 확인 및 Bromelain 유전자의 발현

도입유전자가 호모상태인 형질전환체임을 확인하기 위하여 6-8, 6-17 및 6-20으로부터 각각 3개체의 total DNA를 template로 35S promoter primer, 35S와 bromelain primer 조합 및 NPTII primer를 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 그 결과, 유전자를 도입하지 않은 비형질전환체에서는 PCR 산물이 검출되지 않았으나 Transgenic events에서는 목적 size의 DNA 단편이 명확히 검출되었다. 또한 NPTII 유전자와 도입시킨 Bromelain 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 6-4, 6-8, 6-12, 6-17 및 6-20의 mRNA를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, β -actin primer에서는 wild type를 포함한 모든 transgenic event 식물체에서 균일한 발현정도의 산물이 증폭되었으며, NPTII 및 Bromelain 유전자 특이적 primer에서는 목적크기의 발현 산물이 증폭되었다 (Fig. 7).

Transgenic event의 무름병 내성

비형질전환체 및 호모 3계통 (6-4, 6-12 및 6-20)에 무름병균을 접종하고 시간 경과에 따라 발병염율을 조사하였다. 접종 5일후의 상처접종에서 6-4 및 6-12는 wild type과 유사한 발병염율을 나타냈으나, 6-20은 발병염율이 75.3%로 낮게 나타났다. 접종 5일후의 무상처 접종에서는 wild type, 6-4 및 6-12는 모두 100%의 잎 발병율을 나타낸 반면, 6-20은 62%로 무름병 내성이 증진되었음을 알 수 있었다. 금후, 6-20은 뿌리 썩음병 및 나방류의 내성에 관한

Table 2 Genetic segregation of transformed T2 generation by hygromycin selection in Chinese cabbage

Number of samples.	Strain No.	Sowing seed No.	5 day after sowing		Survive ratio(%)	Genetical background (NT/He/Ho)
			Survive	Death		
1	6-1	20	0	20	0	N.T
2	6-2	20	0	20	0	N.T
3	6-3	19	0	19	0	N.T
4	6-4	19	19	0	100	T.E
5	6-5	19	13	6	68.4	He
6	6-6	20	11	9	55.0	He
7	6-8	16	16	0	100	T.E
8	6-9	18	0	18	0	N.T
9	6-10	20	0	20	0	N.T
10	6-12	20	20	0	100	T.E
11	6-13	19	7	12	36.8	He
12	6-17	15	15	0	100	T.E
13	6-18	20	17	3	85.0	He
14	6-19	19	12	7	63.2	He
15	6-20	20	20	0	100	T.E
16	6-21	20	8	12	40.0	He
17	6-22	19	0	19	0	N.T
18	6-23	19	11	8	57.9	He

N.T: none transformants; He: Heterozygotes; T.E: Transgenic events.

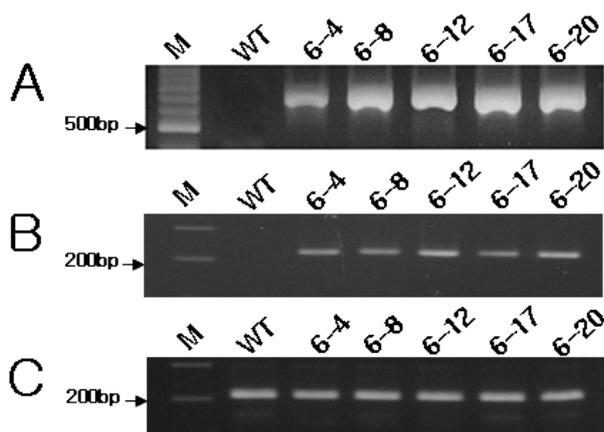


Fig. 7 RT-PCR analysis of the NPTII and bromelain gene in T2 transgenic events. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane WT: wild-type plant, Lanes 6-4~6-20: 5 different transgenic lines(A: NPTII primer, B: bromelain specific primer, C: β -actin primer)

실험이 진행될 것이다. 또한 형질전환된 배추를 육종소재로 활용하여 내병충성 품종을 육성할 것이며, 단백질 가수분해 효소인 bromelain을 추출하여 사료첨가제, 가축의 유방염 치료제, 항주를 치료제, 각질박리 치료제, 및 보습효과가 탁월한 화장품 첨가제 등에 널리 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

Fox-hunting library를 이용하여 기능유전자를 탐색하는 연구는 일본의 국립이화학연구소에 의해 처음으로 시도

되었다. 그들은 애기장대로부터 FL-cDNA를 작성한 후, floral dipping법에 의해 15,000개의 FOX line을 육성하였다 (<http://nazunafox.psc.database.riken.jp>). 각각의 애기장대 FOX line들의 Southern blot 분석을 실시한 결과, 평균 2.6개의 cDNA clone이 포함되어 있었으며, 삽입된 cDNA 크기는 0.3-4.2 kb의 범위로 그 평균은 약 1.4 kb 이었다. 또한 일본 국립생물연구소 (NIAS)팀으로부터 각기 다른 벼 유래 FL-cDNA 28,000개를 획득하였다. 이 중 13,000개의 각기 다른 벼 유래 FL-cDNAs를 사용하여 FOX 애기장대 계통을 육성하였다. 이렇게 육성된 벼유래 FL-cDNA가 도입된 형질전환 애기장대는 *CaMV 35S promoter*에 의해 발현이 조절되었고, 또한 육성된 FOX 애기장대 계통 33,000개를 database화 하였다 (<http://ricefox.psc.riken.jp/>). 그리고 벼 유래 FL-cDNA를 동일한 Nipponbare 품종에 형질전환시켜 12,000개의 서로 다른 형질전환 벼를 육성하였다 (Nakamura 등 2007). 각각의 육성 계통에는 도입된 유전자가 평균 1.04개 포함되어 있었으며, 유전자의 평균 크기는 1.66 kb 이었다. 이들 형질전환체는 기능손실 돌연변이체와 함께 벼 계놈의 기능연구에 큰 공헌을 하고 있다.

스트레스에 유도되는 유전자의 기능을 해명하기 위하여 transcription factors을 이용 하여 FOX-library를 구축하고 분석하였다 (Fujita 등 2007). 총 43개의 애기장대 유래 transcription factor들의 FL-cDNA를 혼합하여 애기장대에 형질전환한 후, 유전자가 도입된 224 형질전환체를 육성하였다. 선발된 salt 저항성 계통은 고농도의 salt하에서 녹색잎을 유지하였다. 한편 벼 유래 FOX 애기장대 계통들을 이용해서 표현형, 광합성 능력, 형태, 원소 조성, 병

해 저항성, 이차대사산물 구성, 환경스트레스 (고염, 고온 UV 및 강광) 내성에 대해 Screening하였다. 표현형변이는 1,297 (5%) 후보 돌연변이는 23,715 T1 벼 유래 FOX 애기장대 lines로부터 분리하였다. 이들 돌연변이로부터 PCR 분석에 의해 도입한 벼 FL-cDNA를 wild type 애기장대에 도입한 결과 같은 표현형을 보이는 약 48%로 나타났다. 또한 같은 표현형으로 나타나는 벼 유래 FL-cDNA를 벼에 형질전환한 결과 22%가 같은 표현형으로 나타났다. 이런 결과는 애기장대 유래 FOX 애기장대 lines에서도 유사하게 나타났다. 벼 유래 FOX 애기장대 lines에서 pigment가 높은 농도를 가진 계통을 대상으로 PCR분석에 의해 FL-cDNA를 분리하고, 염기서열을 분석하여 Blastx을 조사한 결과 Glucan endo-1,3-beta-d-glucosidase, Seed maturation-like protein, Membrane transporter 및 Splicing factor등과 유사성이 높은 유전자군 이었다.

배추 FOX-hunting system에서 육성된 애기장대의 형질 전환체에서 형태적변이, 생장율, 식물 색, 개화기의 변화, 불임성 등 다양한 표현형 변이가 나타났다. 1) 형태적 돌연변이체는 애기장대 FOX-line에서 약 11.4% 정도 보여, activation tagging 계통들에서 보여준 2%보다 훨씬 높게 나타났다. 표현형 (visible phenotypic)의 변이는 T1세대에서 520개 정도 보였으며, T2세대로 약 285개체 정도가 같은 표현형으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이런 현상은 도입된 유전자가 우성 또는 semi-dominant phenotype으로 작용함을 의미한다 (Ichikawa 등 2006). 표현형의 변이체에서 FL-cDNA를 cloning하여 애기장대에 형질전환시켜 처음과 같은 표현형을 보인 FL-cDNA를 염기서열 분석 및 database로부터 annotation한 결과, 같은 표현형을 보였는데도 불구하고 각기 다른 유전자에 상동성을 보였다. 2) 또한 FOX system의 적용 중의 하나는 스트레스 관련 유전자의 기능을 탐색하는데 있다.

이와 같이 FOX-hunting system을 이용한 유전자 기능 획득 전략의 이점은 1) 완전장 cDNA library는 유전자가 기능할 때에 필요한 전 아미노산이 포함하기 때문에 도입하는 유전자가 본래 가지고 있는 전 기능을 발휘 하는 것이 가능하다. 따라서 통상의 cDNA library와 비교해서 기능발현의 효율이 매우 높으며, 전체 cDNA 단편들이 본래의 개시코돈 및 종지코돈 정보를 갖추고 있기 때문에 발현을 위해서 단백질 융합화 등의 필요가 없이 단백질 발현 효율이 높다. 2) 각기 다른 수많은 클론을 포함한 library를 식물에 감염시켜도 한 식물체에는 1-2클론밖에 도입되지 않기 때문에 형질전환 식물체에는 각각 다른 클론이 도입되어진다. 따라서 얻어진 형질전환체로부터 표현형 확인 및 cDNA 분석으로 간단하게 정보를 얻을 수 있다. 3) 종래의 cDNA library에서는 전체의 mRNA를 cDNA로 합성하기 때문에 발현량이 많은 구조 단백질 유전자군과 통상 발현량이 적은 정보 전달 관련 유전자군

등의 각각의 cDNA 존재비가 발현량에 의해 많이 차이가 있었지만, FOX hunting system의 library에서는 유전자의 발현량에 국한하지 않고 전 클론이 동일한 배합으로 포함될 수 있도록 균일화한다. 4) 완전장 cDNA를 포함한 식물체들을 계통화하지 않고 한번의 screening에 의해 목적하는 변이체를 얻는 것이 가능하다는 점이다. 최근 콩, cassava, poplar 및 *Cryptomeria japonica*를 포함한 많은 식물체에서 FL-cDNA 클론들이 수집되고 있다 (Nanjo 등 2007; Futamura 등 2008; Taji 등 2008; Umezawa 등 2008). 또한, 지구의 온난화, 사막화에 있어서 고온, 건조 및 염에 강한 식물체를 만들기 위해 유용한 유전자의 탐색이 중요하고 벼 유래 FOX 애기장대 line들에서 고온 및 높은 염의 농도에서 살아남는 돌연변이체를 선발하였다 (Yokotani 등 2008; Yokotani 등 2009).

따라서 FOX-hunting system은 형질전환계가 아직 확립되지 않은 식물종, 재분화율이 매우 낮은 식물종, life cycle이 매우 길어 유전자기능을 분석하기 매우 어려운 식물종 및 식물체가 갖고 있는 특징적인 유전자의 기능 등을 탐색하기 위해 매우 유용한 방법이라고 생각된다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(308020-5) 및 농촌진흥청 바이오그린 21사업(#2007-05-010, 2007-03-010-34037)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- An S, Park S, Jeong DH, Lee DY, Kang HG, Yu JH, Hur J, Kim SR, Kim YH, Lee M, Han S, Kim SJ, Yang J, Kim E, Wi SJ, Chung HS, Hong JP, Choe V, Lee HK, Choi JH, Nam J, Kim SR, Park PB, Park KY, Kim WT, Choe S, Lee CB, An G (2003) Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiol* 133: 2040-2047
- Chaudhury AM, Signer ER (1989) Non-destructive transformation of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Bio. Rep.* 7:258-265
- Chen S, Jin W, Wang M., Zhang F, Zhou J, Jia Q, Wu Y, Liu F, Wu P (2003) Distribution and characterization of over 1,000 T-DNA tags in rice genome. *Plant J.* 36:105-113
- Engwerda CR, Andrew D, Ladhams A, Mynott TL (2001) Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo. *Cell Immunol.* 25:66-75
- Fujita M, Saho M, Yasunari F, Takanari I, Miki N, Motoaki S, Minami M, Kazuko Y-S, Kazuo S (2007) Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via

- mini-scale full-length cDNA over-expressor (FOX) gene hunting system. *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 364:250-257
- Futamura N, Totoki Y, Toyoda A, Igasaki T, Nanjo T, Seki M, Sakaki Y, Mari A, Shinozaki K, Shinohara K (2008) Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC Genomics* 9:383
- Gaspani L, Limiroli E, Ferrario P, Bianchi M (2002) In vivo and in vitro effects of bromelain on PEG₂ and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. *Pharmacology* 65:83-86
- Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Eun MY, Han C, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H (2004) Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol. Biol.* 54:325-334
- Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Muto S, Gohda K, Suzuki K, Ishikawa A, Kobayashi H, Yoshizumi T, Tsumoto Y, Tshara Y, Iizumi H, Goto Y, Matsui M (2003) Sequence database of 1,172 T-DNA insertion sites in *Arabidopsis* activation tagging lines that showed phenotypes in T1 generation. *Plant J.* 36:421-429
- Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tshara Y, Suzuki K, Ishikawa A, Seki M, Fujita M, Motohashi R, Nagata N, Takagi T, Shinozaki K, Matsui M (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J.* 48:974-985
- Jeong DH, An SY, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An GH (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol.* 130:1636-1644
- Manhart N, Akomeah R, Bergmeister H, Spittler A, Ploner M, Roth E (2002) Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4⁺ cells and the interferon-gamma response in Peyer's patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. *Cell Immunol.* 215: 113-119
- Maurer HR (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol. Life Sci.* 58:1234-1245
- Meyerowitz EM and Pruitt RE (1985) *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science* 229:1214-1218
- Miyao A, Iwasaki Y, Kitano H, Itoh J, Maekawa M, Murata K, Yatou O, Nagato Y, Hirochika H (2007) A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Mol. Biol.* 63:625-635
- Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka, 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
- Mynott TL, Crossett B, Prathalingam SR (2002) Proteolytic inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infect Immun.* 70:86-95
- Nakamura H, Makoto H, Kou A, Akio M, Naoko T, Mariko K, Jinhuan P, Naokuni H, Shigeko A, Seiichi T, Miki F, Akiko E, Motoaki S, Miki N, Takanari I, Kazuo S, Minami M, Yoshiaki N, Hirohiko I (2007) A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol. Biol.* 65:357-371
- Nanjo, T., Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Nishiguchi, M., Kado, T. (2007) Functional annotation of 19,841 *Populus nigra* fulllength enriched cDNA clones. *BMC Genomics* 8:448
- Park SH, Jun NS, Kim CM, Oh TY, Huang J, Xuan YH, Park SJ, Je BI, Piao HL, Park SH, Cha YS, Ahn BO, Ji HS, Lee MC, Suh SC, Nam MH, Eun MY, Yi G, Yun DW, Han CD (2007) Analysis of gene-trap *Ds* rice populations in Korea. *Plant Mol. Biol.* 65:373-384
- Patton DA, Meinke DW (1988) High-frequency plant regeneration from culture cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 7:233-237
- Pruitt RE, Meyerowitz EM (1986) Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biology* 187:169-183
- Ryu CH, You JH, Kang HG, Hur J, Kim YH, Han MJ, An K, Chung BC, Lee CH, An G (2004) Generation of T-DNA tagging lines using a bi-directional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. *Plant Mol. Biol.* 54:489-502
- Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bès M, Piffanelli P, Piégu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Périn C, Sabau X, Ghesquière A, Glaszmann JC, Delseny M, Guiderdoni E (2004) High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant J.* 39:450-464
- Seki M, Masakazu S, Tetsuya S, Kenji A, Kei I, Junko I, Maiko N, Akiko E, Mari N, Miki F, Youko O, Ayako K, Kazuko Y-S, Kazuo S (2004) RIKEN *arabidopsis* full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J. Experimental Botany* 55:213-223
- Taji T, Sakurai T, Mochida K, Ishiwata A, Kurotani A, Totoki Y (2008) Large-scale collection and annotation of full-length enriched cDNAs from a model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biol.* 8:115
- Takasaki T, Hatakeyama K, Ojima K, Watanabe M, Toriyama K, Hinata K (1997) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa* L.. *Breeding Science* 47:127-134
- Umezawa T, Sakurai T, Totoki Y, Toyoda A, Seki M, Ishiwata A, Akiyama K, Kurotani A, Yoshida T, Mochida K, Kasuga M, Todaka D, Maruyama K, Nakashima K, Enju A, Mizukado S, Ahmed S, Yoshiwara K, Harada K, Tsubokura Y, Hayashi M, Sato S, Anai T, Ishimoto M, Funatsuki H, Teraishi M, Osaki M, Shinano T, Akashi R, Sakaki Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2008) Sequencing and analysis of approximately 40,000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res.* 15:333-346
- Upadhyaya NM, Zhou XR, Ramm K, Zhu QH, Wu L, Eamens

- AL, Sivakumar R, Kato T, Yun DW, Kumar S, Narayanan KK, Peacock WJ, Dennis ES (2002) An *iAc/Ds* gene and enhancer trapping system for insertional mutagenesis in rice. *Funct Plant Biol.* 29:547-559
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM *et al.* (2000) Activation Tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 1003-1013
- Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui M, Hirochika H, Iwabuchi M, Oda K (2009) Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene *ONAC063* in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 229:1065-1075
- Yokotani N, Tkaanari I, Youichi K, Minami M, Hirohiko H, Masaki I, Kenji O (2008) Expression of rice heat stress transcription factor *OsHsfA2e* enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 227: 957-967