

## 애기장대에서 고염 (高鹽) 스트레스 내성에 관여하는 OSM1/SYP61유전자의 동정

김지연, 백동원, 이효정, 신동진, 이지영, 최원균, 김동균, 정우식, 광상수<sup>1</sup>, 윤대진\*  
경상대학교 대학원 응용생명과학부, <sup>1</sup>한국생명공학연구원 환경생명공학연구센터

### Isolation of SYP61/OSM1 that is Required for Salt Tolerance in *Arabidopsis* by T-DNA Tagging

Ji Yeon Kim, Dongwon Baek, Hyo-Jung Lee, Dongjin Shin, Jiyoung Lee, Wonkyun Choi, Donggiun Kim, Woo Sik Chung, Sang-Soo Kwak<sup>1</sup>, Dae-Jin Yun\*

Division of Applied Life Science (BK21 program), and Environmental Biotechnology National Core Research Center,  
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>1</sup>Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Yusong,  
Daejeon 305-806, Korea

**ABSTRACT** Salt stress is one of major environmental factors influencing plant growth and development. To identify salt tolerance determinants in higher plants, a large-scale screen was conducted with a bialaphos marker-based T-DNA insertional collection of *Arabidopsis* ecotype C24 mutants. One line for salt stress-sensitive mutant (referred to as *ssm1*) exhibited increased sensitivity to both ionic (NaCl) and nonionic (mannitol) osmotic stress in a root growth assay. This result suggests that *ssm1* mutant is involved in ion homeostasis and osmotic compensation in plant. Molecular cloning of the genomic DNA flanking T-DNA insert of *ssm1* mutant was achieved by mutant genomic DNA library screening. T-DNA insertion appeared in the first exon of an open reading frame on *F3M18.7*, which is the same as *AtSYP61*. SSM1 is SYP61/OSM1 that is a member of the SNARE superfamily of proteins required for vesicular/target membrane fusions and factor related to abiotic stress.

**Key words:** Genomic DNA library screening, ion homeostasis, osmotic compensation, salt stress, \**ssm* (salt stress-sensitive mutant)

## 서 론

식물은 고염, 가뭄, 냉해와 같은 환경 스트레스에 노출되면 성장에 큰 피해를 받는 것으로 알려져 있다. 그중에서도 전 세계적으로 토양에 과다하게 존재하는 염 농도는 작물의 생육을 억제하여 직접적으로 그 나라의 농업 생산성을 결정짓는 요소로 작용하기 때문에, 고염 스트레스에 관련된 식물의 적응기작에 대한 연구는 인간이 농경 생활을 시

작함과 동시에 꾸준히 관심을 가져온 분야이다 (Yun 2005).

식물이 고염 스트레스에 노출되면 식물 세포내의 이온 농도와 삼투압의 불균형이 초래되며, 2차적으로 영양의 불균형, 활성산소에 의한 스트레스 및 광합성의 장애 등과 같이 식물 성장에 중요한 영향을 끼치는 부분에 문제들이 발생하여, 심할 경우에는 식물이 사멸하기도 한다 (Zhu 2001). 따라서 식물은 고염 스트레스를 받게 되면 세포내의 항상성을 잃지 않도록 여러 유전자들을 발현시켜 적절히 스트레스에 대해 대응할 수 있는 적응기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Figure 1). 대표적으로 고염 스트레스를 받게 되면 식물은 잎에 다량의 abscisic acid (ABA)를 축적하여

\*Corresponding author Tel 055-751-6256 Fax 055-759-9363  
E-mail: djyun@gsnu.ac.kr

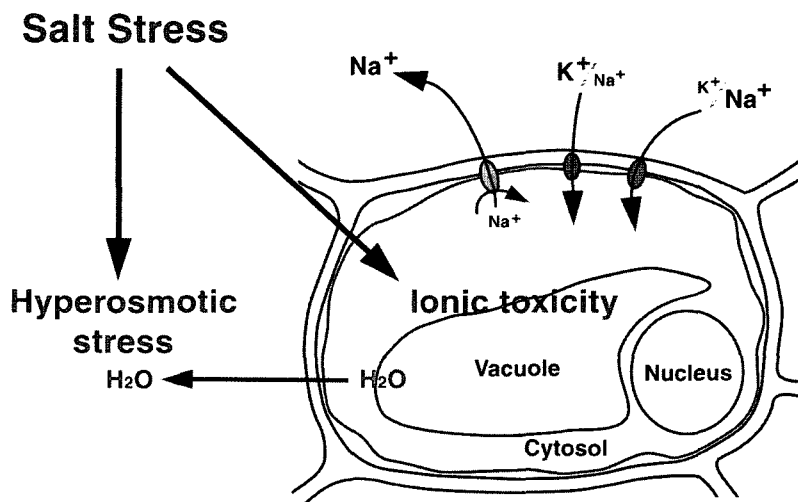
ABA 의존적인 신호 전달 과정과 ABA 독립적인 신호 전달 과정을 개시하여 스트레스 반응에 관련된 유전자를 발현시키고 다른 여러 유전자들을 조절한다 (Grillo et al. 1995; Shinozaki et al. 1997). 또한 세포내의 염을 외부로 내보내는 적응 기작으로 SOS (salt overly sensitivity) 신호 전달경로가 있다 (Qui et al. 2002; Zhu 2002; Shi et al. 2003). SOS 신호전달경로는 고염 스트레스에 의해 증가되어진  $Ca^{2+}$  이온이 SOS3에 결합하고 활성화된  $Ca^{2+}$ 에 결합한 SOS3는 세린/트레오닌 인산화효소 (serine/ threonine kinase)인 SOS2와 결합하여 세포의 원형질막에 존재하는  $Na^+/H^+$  상호 수송체인 SOS1을 활성화시켜  $Na^+$  이온을 세포 밖으로 방출하여 세포내의  $Na^+$  이온농도의 항상성을 유지 시킨다 (Qui et al. 2002; Quintero et al. 2002; Zhu 2003; Knight et al. 1997). SOS1 이외에도  $K^+$  channel인 AKT1 (Qui et al. 2002; Quintero et al. 2002; Qi and Spalding 2004),  $Na^+$  유입에 관여하는 channel인 HKT1 (Rus et al. 2001, 2004) 및 액포에 존재하는 NHX (Yokoi et al. 2002; Qui et al. 2004)와 같은 이온 수송체가 존재하여 식물 세포내의 전반적인 이온의 항상성을 유지시키는 것으로 알려져 있다. 그 밖에도 세포내의 삼투압을 유지시키기 위하여 여러 osmolyte를 생합성하는 것으로 알려져 있다 (Delauney and Verma 1993; Louis and Galinski 1997; McCue and Hanson 1990). 이와 같이 식물의 고염스트레스에 대한 적응기작은 이온 농도의 항상성 유지, 세포내의 삼투압 유지, 상해의 치료 및 성장 저해 등과 같은 기작들이 종합적으로 조화를 이루어 나타낸 결과라 할 수 있다. 하지만 현재까지 연구되어진 사실만으로는 식물의 고염 스트레

스에 대한 적응기작을 이해하기에 부족한 점이 많다. 따라서, 본 연구에서는 애기 장대의 유전학 시스템을 이용하여 현재까지 알려지지 않은 식물체내의 고염 스트레스에 대한 인식, 신호 전달 과정 및 적응에 관련된 유전자를 찾고자 본 연구를 수행하였다.

**재료 및 방법**

식물 재료 및 생육 조건

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*, ecotype C24)에 pSKI015 vector (provided by Weigel D.; Weigel D et al. 2000)를 사용하여 T-DNA activation tagging (Weigel D et al. 2000)을 하였다. 1차선별 방법으로 제초제인 bialaphos (30 mg/L)에 대해서 저항성을 가지고 있는 종자를 채종하여 2차선별 방법으로 여러 스트레스에 대해 저항성 및 감수성을 보이는 돌연변이체를 선별하여 식물의 재료를 준비하였다. 애기장대의 종자를 70% 에탄올을 사용하여 먼저 종자표면을 멸균한 후, 5% 락스에 10분에서 15분 동안 처리하여 소독하고 멸균수를 이용하여 종자표면에 락스가 묻어있지 않도록 7번 씻어 주었다. 식물배지는 MS salt, 2% sucrose, 1.2% agar (pH 5.7)가 들어간 것을 사용하였다. 식물을 발아시키기 전, 4°C에서 밤 상태로 4일 동안 춘화처리를 하였다. 식물 배양실내의 온도는  $22 \pm 2^\circ C$ , 빛 양은 장일조건 (낮 16시간, 밤 8시간)으로 조정된 것을 사용하였다.



**Figure 1.** Plant adaption to high salinity. When plants are exposed to salinity, caused by high NaCl concentrations, apoplasmic levels of  $Na^+$  and  $Cl^-$  alter aqueous and ionic thermodynamic equilibria resulting in hyperosmotic stress and ionic imbalance and toxicity. Survival and growth is dependent on the capacity of the plant to re-establish, expeditiously, cellular osmotic and ionic homeostasis, i.e. adaptation to the stress environment. Tolerance to NaCl stress is mediated by processes that restrict  $Na^+$  uptake across the plasma membrane (presumably due to a combination of reduced influx and increased efflux), facilitate  $Na^+$  and  $Cl^-$  sequestration into the vacuole and regulate compatible osmolyte production and accumulation. The coordinate control of these processes is essential for the osmotic adjustment and ion homeostasis that is required for salt adaptation (Yun 2005).

### 스트레스에 대한 돌연변이체 확보

1차 선별된 종자들을 각각 MS salt, 2% sucrose, 1.2% agar (pH 5.7)의 식물배지에 심은 후, 4°C에서 밤 상태로 4일 동안 춘화처리 하였다. 식물 배양실에 옮겨, 4일 동안 키워, 뿌리의 길이가 1~1.5 cm가 된 식물을 150 mM NaCl가 함유된 배지로 옮겨주었다. 대조군인 wild-type의 뿌리와 비교했을 때, 뿌리가 잘 자라지 못하는 salt-hypersensitive 돌연변이체를 선별하였다. 이러한 선별과정을 통하여 49개 돌연변이체를 선별하였으며, 이렇게 선별되어진 돌연변이체는 T3세대를 거쳐 안정된 돌연변이체를 확보하였다. 다시 위와 동일한 과정을 거쳐 이 돌연변이체가 염에 대해 대조군에 비해서 감수성을 가지고 있는지를 검증하였다.

### Salt 스트레스에 대한 뿌리 길이 측정

스트레스에 대한 뿌리 길이를 측정하기 위하여, 먼저 MS salt, 2% sucrose, 1.2% agar (pH 5.7)의 식물배지에서 4일 동안 키워, 식물의 뿌리 길이가 1~1.5 cm가 된 애기장대를 다양한 농도의 NaCl과 mannitol이 함유된 배지에 옮겨 주었다. 9~11일 사이에 대조군인 wild-type과 *sos1* 돌연변이체와 비교하여 차이를 보이는지를 관찰하고 위의 실험을 3번 반복하여 검증하고 그래프로 나타내었다.

### Southern blot 분석

Hexadecyltrimethylammonium bromide를 이용하여 대조군인 wild-type과 돌연변이체의 잎에서 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA의 농도가 20 µg 되도록 맞추어 *BamH I*, *EcoR I*, *Sal I*, *BamH I*/*EcoR I*의 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 걸어 50V로 8시간 동안 전기영동을 하였다. Gel위에 nylon membrane (Schleicher & Schuell BioScience, Inc.)을 놓고, membrane에 genomic DNA를 옮겨주었다. Probe를 만들 주형은 pGEM T-easy vector (Promega)를 *Dra I* 제한효소로 절단하여 얻은 *Amp<sup>R</sup>* 유전자 부위와 pCambia1302 vector를 *Pvu II*와 *EcoR V* 제한효소로 절단하여 얻은 35S promoter 유전자 부위로 하여, Random primer DNA labeling kit (TAKARA)를 사용해 α-[<sup>32</sup>P]dCTP로 labeled priming을 한 후, 65°C에서 hybridization buffer에서 18시간동안 반응 시켰다. α-[<sup>32</sup>P]dCTP로 labeled priming된 것을 씻어 주기 위해서 1차적으로 1% SDS, 2×SSC washing buffer로 65°C에서 15분, 2차적으로 1% SDS, 0.2×SSC washing buffer로 65°C에서 15분 2번 반복해주었다. 씻어준 membrane은 필름 카세트에 필름과 함께 넣어서 -80°C에서 3일 동안 보관한 후에 필름을 현상하였다. (Baek D et al. 2004)

### Mutant genomic DNA library screening

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 돌연변이체의 genomic DNA를 최대한 깨끗하게 분리하였다. 미리 *BamH I*/*EcoR I* 제한효소로 잘라서 나온 λEMBL3 phage vector (Giga Pack Gold Kit, Stratagene)에 넣기 위해 돌연변이체의 genomic DNA를 *BamH I* 제한효소로 절단하여 vector에 ligase를 이용해 붙여주었다. Phage의 particle로 packaging해 준 후, *E. coli* XL1-Blue MRA P1 strain에 접종하여 LB 0.7% agar를 사용하여 LB 배지 위에 부어주었다. 8시간 후, phage plaque이 생긴 LB배지 위에 nylon membrane을 올려 phage plaque의 λDNA를 옮겨 주었다. Probe로 만들 주형은 pGEM T-easy vector (promega)를 *Dra I* 제한효소로 절단하여 얻은 *Amp<sup>R</sup>* 유전자 부위로 하여, random primer DNA labeling kit (TAKARA)를 사용해 α-[<sup>32</sup>P]dCTP로 labeled priming을 한 후, 65°C에서 hybridization buffer에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 α-[<sup>32</sup>P]dCTP로 labeled priming된 것을 씻어 주기 위해 1차적으로 1% SDS, 2×SSC washing buffer로 65°C에서 15분, 2차적으로 1% SDS, 0.2×SSC washing buffer로 65°C에서 15분 2번 반복해주었다. 씻어준 membrane은 필름 카세트에 필름과 함께 넣어서 -80°C에서 3일 동안 보관한 후에 필름을 현상하였다. 현상된 필름의 검은 점이 있는 부위를 본을 뜬 LB 배지 상의 phage plaque를 선별하여, SM buffer에 희석한 후, 다시 위와 같은 screening을 통해 한 종류의 단일 phage를 얻었다. λEMBL3 phage vector에 돌연변이체의 genomic DNA 조각이 어느 부위인지를 알지 위해서 phage의 λDNA를 추출한 후, 염기서열 분석을 하였다.

### 돌연변이체의 genomic DNA상의 위치 확인을 위한 diagnostic PCR

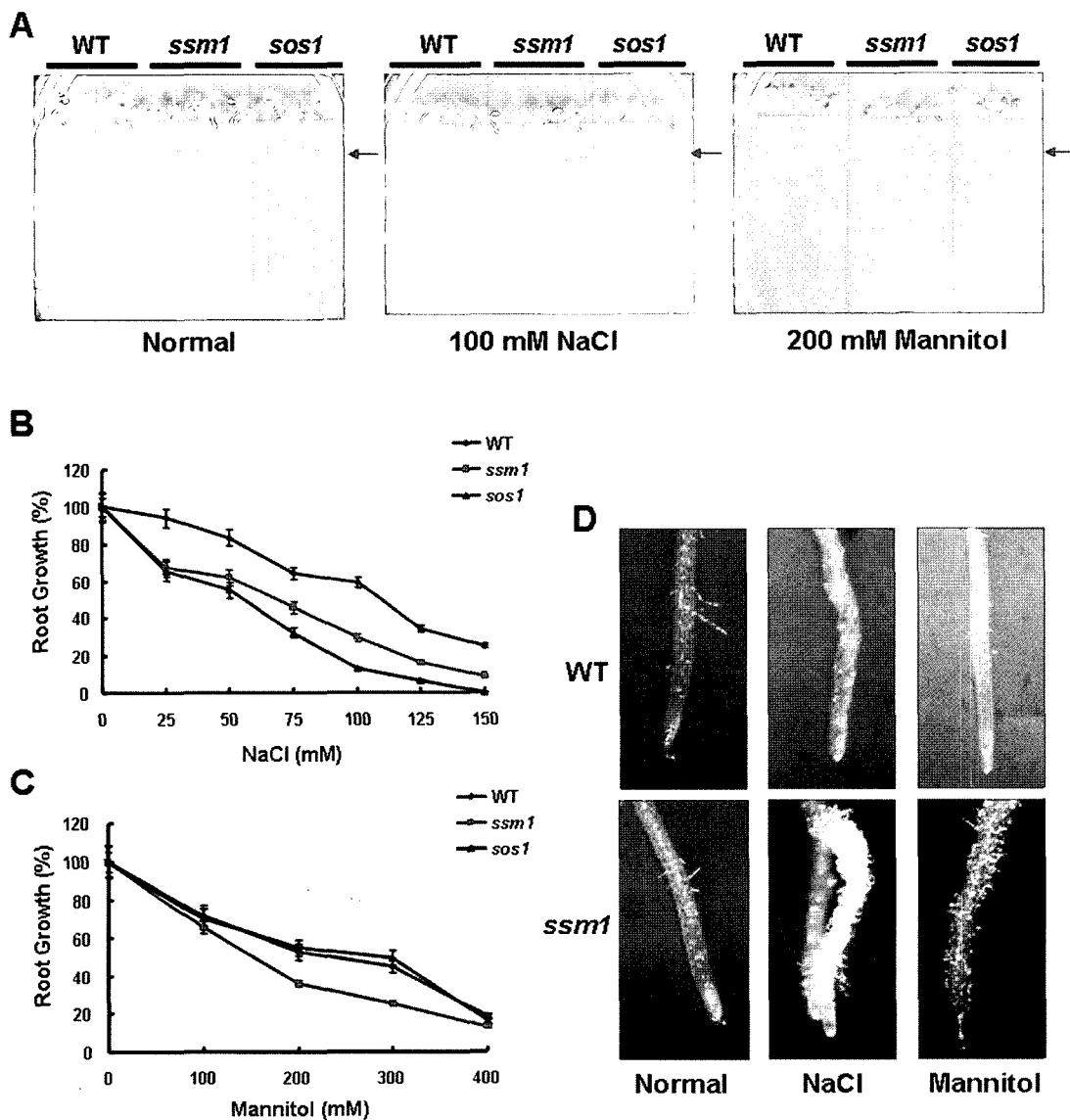
Mutant genomic DNA library screening을 통해 알아낸 T-DNA 상의 위치에 맞게 forward primer (5'-CTCATTGGCAGGGATTGTTCTGGAG-3', *A. thaliana* chromosome 1의 염기서열 10016281부터 10016306까지), reverse primer (5'-CAATAT ATACCATTCTTCTGTGCACCGG-3', *A. thaliana* chromosome 1의 염기서열 10015429부터 10015457까지), left border primer (5'-GTAATACGACTCACTA-TAGGG C-3')를 설계하여 대조군인 wild-type과 돌연변이체의 genomic DNA를 가지고 위의 primer를 각각 짝지어 PCR반응을 시켰다. PCR조건은 95°C에서 먼저 5분 반응시킨 후, 95°C에서 2분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30번 반복 반응시킨 후, 72°C에서 10분 마지막 반응을 시킨 후에 1% agarose gel에 전기영동하였다.

**결 과**

*ssm1* 돌연변이체의 선별 및 고염 스트레스 처리에 대한 *ssm1* 돌연변이체의 감수성 검정

애기 장대 (ecotype C24)에 pSKI015를 이용하여 T-DNA를 삽입한 돌연변이체의 종자를 받아 바스타로 T-DNA가 애기 장대의 genome안에 삽입되었는지 확인한 후, 2차적으로 150 mM NaCl이 함유된 배지에서 대조군에 비해 잘 자라지 못하는 *ssm1* (salt stress-sensitive mutant)을 선별하였다. *ssm1* 돌연변이체의 고염에 대한 감수성을 검정하기 위해,

식물이 고염 스트레스에 노출되었을 때 받게 되는 이온 독성 스트레스와 세포내 삼투압의 불균형에서 오는 스트레스에 모두 관련이 있는지 혹은 한 부분에만 관련이 있는지를 확인하기 위하여 농도별로 이온 독성 스트레스에 관련된 NaCl과 삼투압 스트레스에 관련된 mannitol이 함유된 배지에 wild-type (C24)와 NaCl에 대해서 감수성을 지닌 것으로 잘 알려진 *sos1* 돌연변이체를 대조군으로 하여 *ssm1* 돌연변이체와 같이 뿌리 길이 측정 실험을 수행하였다 (Figure 2A). 농도별로 측정된 결과를 그래프로 나타내어 살펴본 결과 *ssm1* 돌연변이체는 NaCl와 mannitol이 함유된 배지에서 각각 wild-type에 비해 뿌리가 잘 자라지 못하는 감수



**Figure 2.** *ssm1* mutant plants are hypersensitive to NaCl and mannitol. (A) *ssm1* plants are more sensitive to NaCl and mannitol. Four days wild-type, *ssm1*, and *sos1* seedlings were transferred from MS nutrient agar medium to MS agar plates without NaCl (0 mM NaCl), with 100 mM NaCl or with 200 mM mannitol. The photograph was taken 11 days after the seedlings were transferred to the treatment plates. (B) and (C) 4 days seedlings grown on MS agar plates placed vertically were transferred to MS medium or MS medium supplemented with different concentrations of NaCl or mannitol. Root elongation was measured after an additional 11 days of growth. (D) Root morphology of *ssm1* normal (no stress treatment) and after (11 days) seedlings were exposed to 150 mM NaCl or 300 mM mannitol.

성 표현형을 보임을 알 수 있었다 (Figure 2B,C). 또한 현미경을 통해 위의 실험에서 사용한 wild-type과 *ssm1* 돌연변이체의 뿌리 성장점을 중심으로 하여 뿌리의 끝부분을 관찰해본 결과, *ssm1* 돌연변이체가 wild-type에 비해 고염 스트레스를 받았을 때 감수성의 한 표현형으로 나타나는 세포 사멸의 한 형태로 뿌리의 세포가 많이 부풀어 올라 있는 것을 알 수 있었다 (Figure 2D). Figure 2를 통해서 *ssm1* 돌연변이체가 이온 독성과 세포내 삼투압의 불균형에서 오는 스트레스에 대해 감수성을 가지고 있다는 것을 결론 내릴 수 있었으며, *SSM1*은 고염의 세포내의 이온의 농도와 삼투압의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 유전자가 결핍된 돌연변이체라는 것을 알 수가 있었다.

***ssm1* 돌연변이체의 Southern blot 분석**

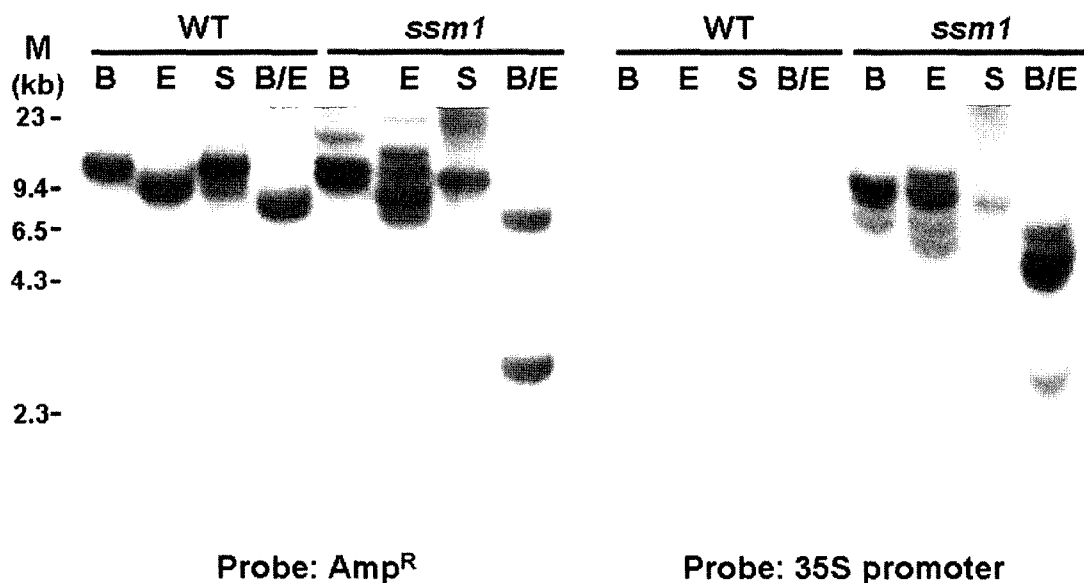
*ssm1* 돌연변이체의 genome내에 T-DNA가 삽입되었는지와 몇 copy의 유전자가 들어있는지를 확인하기 위하여, wild-type과 *ssm1* 돌연변이체의 genomic DNA를 3종류의 제한효소로 잘라 T-DNA에 존재하는 *Amp<sup>R</sup>*와 35S promoter 부위를 probe로 사용하여 Southern blot 분석 실험을 수행하였다. 그 결과 wild-type에 존재하는 band를 제외하고 *ssm1* 돌연변이체에서는 *BamH I*와 *BamH I/EcoR I* 제한효소를 처리한 line에서는 한 band가, *EcoR I* 제한효소를 처리한 line에서는 세 band가 보인다는 결과를 통해 T-DNA가 *ssm1* 돌연변이체의 genome 안에는 최소 3개가 존재하며 이 중 하나 이상이 특정 유전자 발현에 이상을 초래했을 것임을 알 수 있었다 (Figure 3).

***ssm1* 돌연변이체의 genomic DNA library screening 결과**

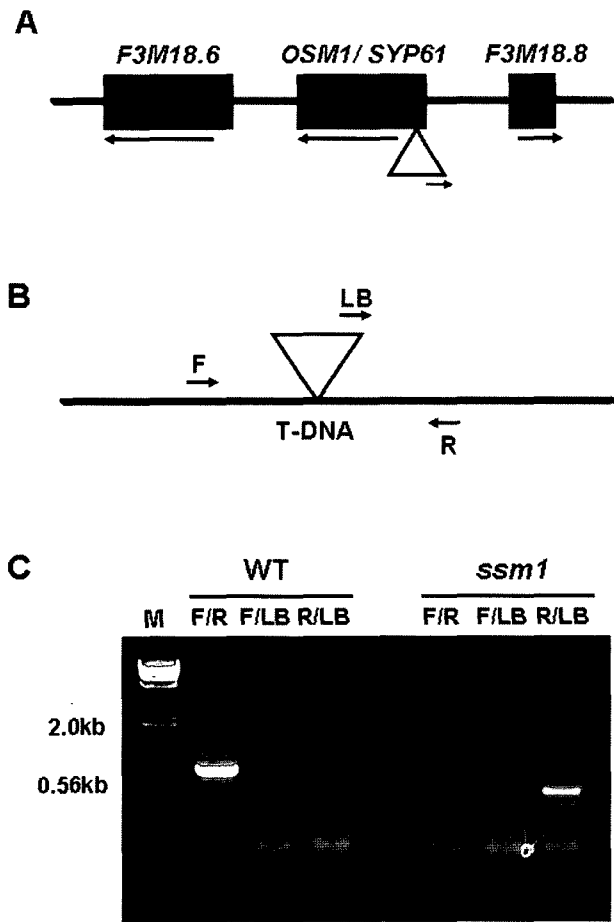
*ssm1* 돌연변이체의 genome내 T-DNA가 삽입된 부위를 찾기 위하여 *Amp<sup>R</sup>* 부위를 probe로 사용하여 genomic DNA library screening을 수행하였다. Figure 4에서와 같이 먼저 *ssm1* 돌연변이체의 genomic DNA를 *BamH I* 제한효소로 절단한 후, λEMBL3 phage vector에 넣어 phage particle로 packing해 준 후에 *E. coli* XL1-Blue MRA P1 strain에 접종하여 phage plaque을 세어본 결과  $5 \times 10^8$  pfu/mL의 library를 얻을 수 있었다 (Figure 4). DNA상에 *BamH I*의 전달 부위가 있을 확률은  $4^6=4096$ 이다. 이 확률을 바탕으로, 애기장대의 genomic DNA상에 *BamH I* 제한효소로 절단될 수 있는 조각의 수는 애기장대의 chromosome I의 경우 7429개, chromosome II의 경우 4810개, chromosome III의 경우 5730개, chromosome IV의 경우 4537개, chromosome V의 경우 6590개가 되며 이를 합치면 29096개가 나온다. 이를 바탕으로 30개의 150 mm agar plate를 준비하여 plate당 *ssm1* 돌연변이체의 genomic DNA library 50,000 pfu가 되게 조절하여 *Amp<sup>R</sup>* 부위를 probe로 이용해 1차 screening하였다. 1차 screening결과 30개의 phage를 분리할 수 있었으며, 다시 2차, 3차 screening을 수행하여 최종적으로 T-DNA가 삽입된 부위의 genomic DNA가 존재하는 단일 phage 15개를 분리할 수 있었다.

**애기 장대의 genomic DNA 상의 *SSM1*의 위치**

Mutant genomic DNA library screening을 통해 얻은 단일 phage에서 λDNA를 분리하여 염기서열 분석한 결과를



**Figure 3.** Southern blot analysis of *ssm1* using *Amp<sup>R</sup>* and CaMV 35S promoter gene. The wild-type and *ssm1* genomic DNA was prepared and digested with *BamH I*, *EcoR I*, *Sal I*, or *BamH I/EcoR I*. The *Amp<sup>R</sup>* probe and CaMV 35S promoter probe was prepared by digesting with *Dra I* in pGEM-T Easy Vector and by *EcoR V* and *Pvu II* in pCambia 1302 vector. Southern blot analysis is performed as described in materials and methods. B, E and S indicate *BamH I*, *EcoR I* and *Sal I*, respectively.



**Figure 4.** *SSM1* locus and T-DNA insertion diagnostic PCR of *ssm1* plants. (A) Physical map of the *SSM1* locus and the insertion site of the T-DNA. The solid line represents a fragment of BAC clone F3M18. Closed boxes indicate the coding region of a gene, whereas arrows under the closed boxes represent the predicted transcription direction. The upward arrow indicates the insertion site of T-DNA in the *ssm1/syp61/osm1* mutant. (B) Scheme of T-DNA diagnostic PCR. F, forward primer; LB, primer specific to the T-DNA left border primer; R, reverse primer. (C) Diagnostic PCR of the T-DNA inserted in *ssm1/syp61/osm1*. M, molecular markers; lane 1, 2, and 3 for wild-type; lane 4, 5, and 6 for *ssm1/syp61/osm1*.

NCBI의 database 프로그램을 통해 검색해 본 결과, 애기장대 chromosome 1의 *F3M18/AtSYP61/OSM1* (At1g28490; 19)의 ATG 번역 개시 codon을 중심으로 상위 529 bp 위치에 T-DNA가 삽입되었다는 것을 알 수 있었다 (Figure 5A). 이 결과를 바탕으로 하여 T-DNA를 중심으로 좌우 genomic DNA를 조사해본 결과, BAC clone F3M18의 nucleotide 25871부터 25952까지의 82 bp와 T-DNA의 left border의 46 bp가 genomic DNA상에 존재하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 T-DNA가 애기 장대의 genome내에 끼어들어가면서 일어난 간섭 현상으로 알려져 있다. 염기서열 분석을 통해 알게 된 T-DNA가 들어간 위치를 확인하기 위하여 primer를 T-DNA가 들어간 부위에 맞게 forward,

reverse, left border primer를 설계하여, 3종류의 primer로 각각 쌍을 지어 diagnostic PCR을 수행하였다 (Figure 5B,C). Wild-type에서는 forward와 reverse primer로 PCR을 수행하여 800 bp의 band가 존재하는 것을 확인 할 수 있었지만 다른 primer의 쌍으로 PCR을 수행했을 때는 band가 존재하지 않는다는 사실을 알 수 있었다. 이와 달리 *ssm1* 돌연변이체에서는, reverse와 left border primer로 PCR을 수행하여, 400 bp의 band가 존재하는 것을 확인 할 수 있었지만, 다른 primer의 쌍에서는 band를 확인할 수 없었다. 이 결과를 바탕으로 *ssm1* 돌연변이체의 T-DNA의 삽입 부위가 앞서 염기 서열 분석으로 확인한 결과와 일치하며 *SSM1*이 *F3M18/AtSYP61/OSM1*임을 알 수 있었다.

### 고 찰

식물은 동물과 달리 환경의 변화에 따라 장소를 이동할 수 있는 능력이 없다. 그렇기 때문에 환경의 변화를 하나의 신호로 인지하여 이에 대해 적응할 수 있는 정교한 기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 고염 스트레스의 경우에도 식물은 이를 하나의 신호로 인지하고 이에 대응할 수 있도록 많은 유전자들을 발현, 조절하여 식물이 고염에 대해 저항성을 갖도록 작용한다. 현재까지 알려진 적응 기작은 앞에서 서술한 바와 같이 이온 독성을 막기 위하여 이온 수송체의 세포막을 통한  $Na^+$ 이온의 유출 및 통제, 액포로의  $Na^+$ 이온 격리, 삼투압 스트레스에 대한 대응으로 스트레스 관련 호르몬인 ABA에 의한 전사 인자들의 조절, osmolyte 생산 및 축적, 물수송체를 이용한 물 수송 조절 및 장거리 수송 반응 등과 같이 하나의 기작의 작용이 아닌 식물체의 다양한 요소들의 종합적인 조절에 의해 수행되어 진다는 것을 알 수 있었다. 하지만 현재까지 알려진 사실만으로는 식물의 고염 스트레스에 대한 적응 기작의 전체적인 그림을 그리기에 부족한 점이 많다. 그렇기 때문에 식물의 모델이 되는 애기 장대의 유전학 시스템을 도입하여 아직 밝혀지지 않은 혹은 알고는 있지만 고염 스트레스와 연관성을 몰랐던 유전자들을 밝혀내고자 하였다.

*ssm1* 돌연변이체는 애기 장대의 유전학 시스템을 이용하여 고염 스트레스에 대해 감수성을 지닌 돌연변이체로 선발되었다. *ssm1* 돌연변이체는 NaCl와 mannitol에 대해 각각 대조군에 비해 뿌리가 잘 자라지 못하는 표현형을 보였으며 이 결과를 바탕으로 *SSM1*이 이온의 농도와 삼투압 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 유전자임을 알 수 있었다 (Figure 2). *ssm1* 돌연변이체의 돌연변이가 일어난 부위를 찾기 위하여 thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)과 inverse PCR (i-PCR)를 수행하였지만 left border부위가 *ssm1* 돌연변이체의 genomic DNA 상에 부분적으로 존재하지 않았기 때문에 기존의 map-based cloning을 수행할

수밖에 없었다. 하지만 이 방법은 기술적, 시간적으로 문제점이 있었기 때문에 새로운 방법을 고안해 낼 필요성을 느꼈다. 그래서 고안해 낸 방법이 T-DNA가 300~500 bp만 존재하여도 genome내에서 찾을 수 있는 genomic DNA library screening이었다.

Genomic DNA library screening 통해, *SSM1*은 vesicular/target membrane 융합에 관여하는 syntaxin 단백질인 AtSYP61/OSM1임을 알 수 있었다. 이 단백질은 동식물의 세포막 융합에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 건조 스트레스를 식물이 받게 되었을 때, ABA 의존적인 신호전달을 통해 잎의 기공개폐를 조절하는 것으로 알려져 있다 (Zhu et al. 2002). ABA는 NaCl stress 반응을 매개하는 중요한 호르몬으로 알려져 있고, 본 연구진이 확보한 OSM1의 또 다른 돌연변이체인 *ssm1*이 NaCl에 sensitive한 것으로 보아, NaCl stress로 인한 protein targeting의 이상이 sensitivity에 영향을 미친다는 것을 알 수가 있다. 그리고, *SSM1*/AtSYP61/OSM1 단백질은 H3 helical domain을 가지고 있으며, 이 domain은 세포막 융합 및 Ca<sup>2+</sup> channel의 조절시 필요하다고 보고 된 바 있다 (Bezprozvnyy et al. 2000). 하지만 현재까지 AtSYP61이 Ca<sup>2+</sup> channel을 조절하여 건조 및 고염 스트레스에 대한 적응 기작을 보인다는 실험적 결과는 없다. 그러므로 *SSM1*/AtSYP61/OSM1이 고염 스트레스를 받게 되었을 때, Ca<sup>2+</sup>을 활성화 시켜 신호를 전달하는 역할을 할 것으로 예측할 수 있으며, 이를 바탕으로 고염 스트레스와 Ca<sup>2+</sup> 및 syntaxin 단백질 사이의 관계 및 정확한 역할을 밝히기 위한 연구를 통하여 OSM1의 기능을 규명하는 것은 흥미로운 것으로 사려 된다.

## 요 약

고염 스트레스에 대한 연구는 농업 생산성에 직결되기 때문에, 고염에 대한 식물의 반응 및 신호전달, 적응기작은 중요한 연구주제가 되어 왔다. 현재까지 연구된 고염 스트레스에 대한 저항성 기작 및 유전학적 요소들이 많이 밝혀졌는데도 불구하고 아직 많은 연구를 필요로 하고 있다. 그래서 본 연구에서는 모델식물로 잘 알려진 애기장대에 pSK1015 vector로 T-DNA를 삽입하여 고염 스트레스에 대해 감수성을 보이는 돌연변이체, *ssm1* 돌연변이체를 선별하였다. *ssm1* 돌연변이체는 고염 스트레스를 받게 되면 이온의 독성 스트레스와 세포내 삼투압의 불균형에서 오는 스트레스에 대해 대조군에 비해 감수성을 보였다. *ssm1* 돌연변이체의 genomic DNA 상의 T-DNA가 삽입된 부위를 찾기 위하여 genomic DNA mutant library screening을 수행한 결과, 기존의 알려진 syntaxin 기능 및 환경 스트레스에 관련된 *F3M18/AtSYP61/OSM1*임을 알 수 있었다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업 및 환경생명과학국가핵심연구센터 연구비 (grant# R15-2003-012-01002-0) 지원에 의한 결과로 수행되었다.

## 인용문헌

- Baek D, Nam J, Koo YD, Kim DH, Lee J, Jeong JC, Kwak SS, Chung WS, Lim CO, Bahk JD, Hong JC, Lee SY, Kawai-Yamada M, Uchimiyama H, Yun DJ. (2004) Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Mol Biol.* 56: 15-27.
- Bezprozvany I, Zhong P, Scheller RH, Tsien RW (2000) Molecular determinants of the functional interaction between syntaxin and N-type Ca<sup>2+</sup> channel gating. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13943-13948
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223
- Grillo S, Leone A, Xu Y, Tucci M, Francione R, Hasegawa PM, Monti L, Bressan RA (1995) Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild-type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiol Plant* 93: 498-504
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067-1078
- Louis P, Galinski EA (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Mari-nococcus halophilus* and osmoregulated expression in *E. coli*. *Microbiol.* 143: 1141-1151
- McCue KF, Hanson AD (1990) Drought and salt tolerance: Towards understanding and application. *Biotechnol* 8: 358-362
- Qi Z, Spalding EP (2004) Protection of plasma membrane K<sup>+</sup> transport by the salt overly sensitive 1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter during salinity stress. *Plant Physiol* 136: 2548-2555
- Qui QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8436-8441
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK (2004) Regulation of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem* 279: 207-215
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo JM (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9061-9066
- Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2004) AthHKT1 facilitates

- Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiol* 136: 2500-2525
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2001) AtHK1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14150-14155
- Sanderfoot AA, Assaad FF, Raikhel NV (2000) The *Arabidopsis* genome; An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol* 124: 1558-1569
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnol* 21: 81-85
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327-334
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malanchruvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J. (2000) Activation Tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 1003-1014
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J* 30: 529-539
- Yun DJ (2005) Molecular mechanism of plant adaption to high salinity. *Korean J Plant Biotechnol* 32: 1-14
- Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song AP, Damsz B, Inan G, Koiwa H, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA (2002) OSM1/SYP61: A syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* 14: 3009-3028
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 66-71
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273
- Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6: 441-445

(접수일자 2006년 2월 1일, 수리일자 2006년 3월 15일)