

## 애기장대에서의 벼 유래의 고친화성 인산 운반체 유전자들의 기능 분석

서현미 · 정윤희 · 김윤희 · 권택민 · 정순재 · 이영병 · 김도훈 · 남재성\*

동아대학교 분자생명공학부

Received February 18, 2008 / Accepted April 2, 2008

**Functional Analysis of the High Affinity Phosphate Transporter Genes Derived from *Oryza sativa* in *Arabidopsis thaliana*.** Hyounmi Seo, Yunhui Jung, Yunhye Kim, Tackmin Kwon, Soon-Jae Jeong, Young-Byung Yi, Doh-Hoon Kim and Jaesung Nam\*. *Division of Molecular Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea* - Phosphate, a favorable phosphorous form for plant, is one of major nutrient elements for growth and development in plants. Plants exhibit various physiological and biochemical responses in reaction to phosphate starvation in order to maintain phosphate homeostasis. Of them, expression of high affinity phosphate transporter gene family and efficient uptake of phosphate via them is a major physiological process for adaption to phosphate deficient environment. Although the various genetic resources of high affinity phosphate transporter are identified recently, little is known about their functions in plant that is prerequisite information before applying to crop plants to generate valuable transgenic plants. We demonstrated that *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing two different high affinity phosphate transporter genes, *OsPT1* and *OsPT7*, derived from rice, exhibit better growth responses compared with wild-type under phosphate starvation condition. Specially, *OsPT7* gene has proven to be more effective to generate *Arabidopsis* transgenic plant tolerant to phosphate deficiency than *OsPT1*. Furthermore, the expression level of *AtPT1* gene that is one of reporter genes specifically induced by phosphate starvation was significantly low compared with wild-type during phosphate starvation. Taken together, these results collectively suggest that over expression of *OsPT1* and *OsPT7* genes derived from monocotyledonous plant function efficiently in the dicotyledonous plant, relieving stress response caused by phosphate starvation and leading to better growth rate.

**Key words :** Phosphate, phosphate transporter, *Oryza sativa*, phosphate starvation response

### 서 론

인산은 식물이 필요로 하는 필수 영양소 중의 하나로서 에너지 전달, 신호전달, 대사산물의 생합성, 광합성 그리고 호흡 등의 식물세포 내에서 물질 대사과정에 중요한 기능을 할 뿐 아니라 DNA와 RNA의 중요한 구성성분으로 질소와 함께 식물체가 가장 많이 필요로 하는 영양원소이다[9,10,11, 12]. 식물체의 성장에 필요한 많은 양의 인산은 주로 비료의 형태로 식물체에게 공급되고 있으나 대부분의 인산은 토양에서 식물이 이용할 수 없는 유기물 또는 금속이온들과 결합한 형태로 고정화 된다[9,10]. 따라서 실제 식물이 이용할 수 있는 유효인산의 양은 토양 속에 극히 적은 양으로 존재하고 있다. 특히 산성 토양의 경우, 과다하게 축적된 알루미늄 이온에 의한 인산의 고정화로 토양의 인산 유효성을 더욱 낮추고 있다[9,11]. 매년 전체 영농비용의 상당부분이 토양의 유효인산 농도를 증가시키기 위한 비료 구입비용으로 사용되고 있다. 또한, 농업 환경오염원 중에서 비료의 과다 사용으로 인한 토양의 산성화와 염의 집적 등의 토양오염은 작물의

생육에 나쁜 영향을 미칠 뿐 아니라 지표수에 침투하여 수자원의 주 오염원인 부영양화를 초래한다. 현재 화학 비료를 대체하기 위한 여러 가지 유기질 비료가 개발되어 사용되고 있으나 화학비료를 대체하기에는 아직 많은 문제점이 있다. 따라서 보다 근원적인 문제 해결방안은 식물의 인산 흡수력을 향상시킴으로서 비료의 사용량을 줄이는 것이다.

식물체는 체내의 인산 항상성을 유지시키는 기작들을 오랜 진화 동안 발전시켜 왔다. 인산이 충분히 있는 조건에선 저친화성 인산운반체를 통해서 토양의 인산을 체내로 수송하고 체관부와 물관부를 통해서 생장과 분화 발달이 활발히 일어나는 조직으로 이동한다[9,10,11,12]. 고농도의 인산은 독성효과를 보이므로 세포질내의 적정 인산 농도(mM 수준)를 유지하기 위해서 여분의 인산은 액포로 이동되고 저장된다[9]. 한편, 초기의 인산 결핍 조건에선 먼저 액포에 저장된 인산을 이용할 수 있으나, 인산 결핍이 장기화되면 식물체는 외부로부터 효과적으로 인산을 흡수하기 위한 다양한 생리·생화학적 반응을 보인다. 지하부에서 인산 흡수를 위한 뿌리의 표면적을 넓히기 위해서 주뿌리의 생장을 감소하고 곁뿌리와 뿌리털의 생장이 촉진된다. 또한 뿌리 주변의 토양에 고착화된 인산기를 유리시켜서 식물체가 흡수할 수 있는 유효 인산의 농도를 증가시키기 위해서 인산 가수분해효소

\*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7518, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : jnam@dau.ac.kr

와 유기산 등이 뿌리에서 분비된다. 직접 인산의 흡수에 관여하는 고친화성 인산 운반체 유전자들이 과발현 되면서 토양으로부터 식물체의 인산 흡수력이 증가되고 인산 결핍에 의한 스트레스 상황을 극복한다[9,10,11,12]. 따라서 작물의 고친화성 인산 운반체 유전자들은 오랫동안 연구의 대상이었으며, 최근의 애기장대와 벼의 전체 유전체 정보가 공개되면서 다양한 식물체로부터 많은 고친화성 인산 운반체 유전자들이 분리되었다[4,6,8,13]. 그러나 아직 식물체내에서 그 기능이 확인되고 중요 작물에 응용된 예는 없다.

생명공학적인 방법을 이용하여 인산 흡수 능력이 향상된 새로운 유용 작물의 개발을 위해서는 반드시 필요한 유전자원인 새로운 고친화성 인산 운반체 유전자를 분리하고 작물에 직접 응용하기 전에 그 기능을 식물체에서 검정하는 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자인 *OsPT1*과 *OsPT7*를 과발현하는 애기장대 형질전환체를 제작하고 모본인 야생형과 함께 인산 결핍에 의한 스트레스 조건하에서 생육을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 성장 방법

본 연구의 형질전환체 제작에 사용한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 야생종인 Col-0 ecotype을 사용하였다. 무균 배양을 위해서는 애기장대 종자를 0.1% SDS가 포함된 50% bleach 용액에 5분간 담가서 1차 표면소독을 하고난 후 멸균수로 5회 반복하여 세척을 하였다. 소독한 종자는 Gamborg's B5 (GIBCO) 배지에 파종하였다. 이틀간 4°C에서 저온처리 후에 형광등 빛에서 16시간 암주기, 8시간의 광주기가 조절되고 22°C가 유지되는 배양상에서 배양 하였다. 자란 유식물체를 배양용 포트에 옮겨 심고 같은 조건에서 4 주간 더 배양한 후에 실험에 이용하였다. 다음 실험을 위해서 씨앗을 얻기 위한 식물체는 24시간의 광주기 조건에서 배양하여 개화를 촉진하였다.

### 형질전환용 vector 제작 및 애기장대의 형질전환

식물 형질전환용 vector를 제작하기 위하여 먼저 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자의 coding 영역을 제한효소 XbaI의 작용 염기서열을 가진 primer 조합(*OsPT1* For; tgtctagacatggcgggagggcagctc, *OsPT1* Rev; gctctagaattacttcgggtaggccc, *OsPT7* For; gttctagacatggcgggcatcagatgc, *OsPT7* Rev; actctagaatcagcgctggccgacctcg)을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 XbaI 제한효소로 절단시키고 같은 제한효소로 절단된 pBTEX binary vector에 연결시켰다. 애기장대의 형질전환은 개화하고 있는 애기장대의 꽃봉오리 전체를 *OsPT1* 또는 *OsPT7* 유전자를 대량 발현하도록 제작된 binary vector를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)

용액에 담그고 진공을 잠시 걸었다가 풀어주는 vacuum infiltration 방법을 사용하였다[1]. T<sub>0</sub> 세대 식물체에서 수확된 모든 씨앗을 hygromycin (20 µg/ml)이 들어있는 Gamborg's B5 배지에서 발아시켜서 형질전환체를 선별하였다.

### RNA 분리 및 RNA blot 분석

RNA를 추출하기 위해서 먼저 배양토에서 3-4주 동안 자란 애기장대 형질전환체 또는 전 처리된 식물체로부터 잎 조직을 채취하고 액체질소로 완전히 얼린 후에 유발로 분쇄 하였다. 전체 RNA를 TRIzol (Invitrogen) 용매를 사용하여 제공하는 방법에 따라서 추출하였다. RNA blot 분석을 위해서 10 µg의 RNA를 1.2% formaldehyde-agarose gel 에서 전기영동을 한 후, 모세관법에 의해서 Hybond N+ hybridization membrane (Amersham-Pharmacia Biotech, USA)에 RNA를 전이시켰다. UV cross-linkage를 하여서 RNA를 membrane에 고정 시킨 후, 65°C에서 1시간가량 pre-hybridization을 하였다. 다시 새로운 hybridization 용액을 첨가한 후, <sup>32</sup>P로 label된 probe와 함께 16-20시간 반응하였다. *OsPT1*, *OsPT7*와 *AtPT1* 유전자 특이적인 probe은 이들 유전자들 간에 염기서열 유사성이 가장 적은 3' UTR을 포함하는 카르복시 말단 영역을 PCR로 증폭한 DNA 단편을 주형으로 random primer DNA labeling kit (Stratagene)를 사용해 α-[<sup>32</sup>P]dATP로 표지하였다. Hybridization 반응 후, membrane은 washing buffer로 15분간 3회 반복해서 씻어주었다. Labeling 된 membrane은 랩에 싸서 필름 카세트에 x-ray 필름과 함께 넣어 -70°C 정도에서 보관한 후에 현상하였다. 유전자의 발현 양상은 사진의 이미지를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자 족

벼의 전체 유전체의 염기서열이 완전히 밝혀진 현재, 벼에는 13 종의 고친화성 운반체 유전자(*OsPT*)들이 존재하는 것으로 보고되고 있다[8]. 그 중에서 9 종의 *OsPT* 유전자들(*OsPT1*, *OsPT2*, *OsPT3*, *OsPT4*, *OsPT5*, *OsPT6*, *OsPT7*, *OsPT8*, *OsPT12*)은 서로 아미노산 서열이 70% 이상 같으며, 이들 유전자들은 애기장대[4], 감자[6], 토마토[6] 등 다른 종에서 분리되고 잘 연구된 고친화성 운반체 유전자들과도 아미노산 서열이 유사하였다(Table 1). 이러한 결과는 이들 유전자들은 다른 종에서 실험적으로 확인 된바와 같이, 토양으로부터 인산의 흡수와 이동 등 식물체내의 인산 항상성 유지에 관여 할 것으로 생각된다. 그러나 나머지 4 종의 *OsPT* 유전자들(*OsPT9*, *OsPT10*, *OsPT11*, *OsPT13*)은 아미노산 서열이 기존의 고친화성 운반체 유전자들과의 유사성이 낮은 것으로 보아 그 특이적인 기능이 있을 것으로 예상된다[6]. 따라서 전자의 9 종의 *OsPT* 유전자들을 그룹1로, 후자의 4 종의 *OsPT* 유전자들을

Table1. Amino acid identities and chromosome locations of high affinity phosphate transporter genes derived from rice

	OsPT1	OsPT2	OsPT3	OsPT4	OsPT5	OsPT6	OsPT7	OsPT8	OsPT9	OsPT10	OsPT11	OsPT12	OsPT13	CH.NO
OsPT1	100 <sup>a</sup>	84.1	87.1	73.0	68.7	70.5	70.0	74.7	48.1	47.7	56.9	70.1	55.1	3
OsPT2		100	81.9	70.6	66.8	70.9	70.8	73.8	47.0	47.8	57.1	71.2	53.9	3
OsPT3			100	73.1	70.1	70.9	71.1	76.2	48.8	48.8	36.9	72.0	54.9	10
OsPT4				100	87.1	71.2	71.0	77.6	46.6	47.2	55.9	72.3	58.9	4
OsPT5					100	69.7	69.8	74.1	47.5	47.9	35.0	70.7	57.1	4
OsPT6						100	76.0	74.5	46.8	46.8	39.9	72.8	54.4	8
OsPT7							100	74.2	47.5	48.2	45.9	70.1	52.7	3
OsPT8								100	47.6	48.0	56.6	81.2	54.7	10
OsPT9									100	84.3	43.6	46.4	42.0	6
OsPT10										100	43.0	46.6	44.0	6
OsPT11											100	40.1	47.7	1
OsPT12												100	54.7	3
OsPT13													100	4

a: The protein sequences of OsPT proteins were aligned pair-wise using the ClustalW program. Level of amino acid identity was indicated with percentage (%).

그룹2로 세분하였다. 또한 그룹1과 그룹2 간에는 유전체의 구성적인 면에서도 확연한 차이점이 발견된다. 그룹1에 속하는 *OsPT* 유전자들은 모두 하나의 exon으로 구성되어있는 반면에, 그룹2에 속하는 *OsPT* 유전자들은 하나 이상의 intron을 포함하고 있다. 이러한 구조적 차이점은 그룹2의 *OsPT* 유전자의 진화 과정은 그룹1의 *OsPT* 유전자들과는 별개로 진행되어 왔을 가능성을 시사한다. 특히 벼의 *OsPT11* 유전자[8]와 감자의 *StPT3* 유전자[6,13]가 뿌리에 공생하며 식물체에 인산을 공급하고 arbuscular mycorrhizal 균류의 감염에 특이적으로 반응하며, 균류로부터 직접적으로 인산을 흡수하는데 관여한다는 연구 결과는 이러한 가설을 지지한다.

벼에는 12개의 염색체가 존재하는데, 13 종의 *OsPT* 유전자는 6개의 염색체에만 편재되어 있다(Table 1). 특히, 3번 염색체에는 가장 많은 4개의 *OsPT* 유전자들이 존재하는데, 이들 서로 간의 아미노산 서열의 유사성이 높기 때문에 하나의 유전자가 진화 과정 중에 2번의 duplication 과정을 거쳐서 현재의 상태로 이른 것으로 생각된다. 그러나 4번 염색체에 존재하는 3개의 *OsPT* 유전자들의 경우, *OsPT13* 단백질의 아미노산 서열은 다른 두 종의 *OsPT* 단백질과는 확연히 다른 반면에 *OsPT4*과 *OsPT5* 단백질의 아미노산 서열이 서로 유사하다. 이러한 결과는 *OsPT4* 또는 *OsPT5* 유전자와 *OsPT13* 유전자는 진화초기에 기능적으로 분리되었고 *OsPT4*과 *OsPT5* 유전자는 최근의 duplication 과정을 거쳐 형성된 것임을 의미한다. 따라서 현재의 벼 유전체에 존재하는 13 종의 *OsPT* 유전자 중에서 아미노산 서열이 서로 유사한 그룹1의 *OsPT* 유전자는 소수의 원시 *OsPT* 유전자가 최근의 duplication에 의해서 형성되었으며 기능적으로도 유사할 것으로 생각된다.

**벼의 고친화성 인산 운반체의 위상**

본 연구에서는 전형적인 고친화성 인산 운반체 유전자 군에 속하는 *OsPT1*과 *OsPT7* 유전자의 기능 분석에 집중하였

다. Figure 1B의 hydrophobicity plot에서 보는 바와 같이, *OsPT1*과 *OsPT7* 단백질은 아미노 말단과 카르복시 말단이 세포질 쪽으로 존재하고 세포막을 가로지르는 12 개의 비친수성 영역을 가진 전형적인 세포막에 존재하는 내재성 단백질의 구조를 가지고 있다[4]. 특히 6번째와 7번째 비친수성 영역 사이와 카르복시 말단 부위에는 긴 친수성 영역이 세포질 쪽으로 존재하며, 구조적으로 유사한 모든 고친화성 인산 운반체에서도 이러한 영역들이 존재한다는 사실은 이 영역이 인산 운반체의 기능 조절에 중요한 기능을 할 것이라는 추정을 가능하게 한다[6]. 실제로 protein kinase C와 casein kinase II에 의해서 인산화 될 것으로 추정되는 아미노산 잔기들이 컴퓨터를 이용한 조사에서 발견된다(Fig. 1A). 그러나 아직 이러한 기능이 생화학적 실험으로 증명되지는 않았다. 일반적으로 고친화성 양분 운반체 유전자는 해당 양분이 충분히 있는 조건에선 그 발현이 억제되었다가 결핍이 오면 급속히 발현이 증가되는 양상을 보인다. 이러한 전사단계의 주된 조절이외에도 단백질 수준에서 활성 조절 기작 또한 매우 중요할 것으로 생각된다. 특히 desensitization 반응에서처럼, 미세한 환경 변화에 신속한 반응이 필요한 경우 또는 환경 변화에 따라 더 이상 단백질의 기능이 필요 없는 경우에는 단백질 수준에서의 조절이 유리하다. 실제로 질산 결핍시 대량 발현되는 효모의 고친화성 질산 운반체 단백질은 질산이 충분한 조건에선 그 유전자의 전사과정이 억제됨과 동시에 단백질은 ubiquitinylation 과정을 거쳐 액포에서 분해됨으로써 식물체내의 질산 항상성을 유지하는 것으로 보고되고 있다[7]. 이 단백질의 중앙에 있는 긴 친수성 영역은 세포질 쪽으로 존재하며 ubiquitinylation의 표적 부위로서 단백질의 안정성을 조절한다고 알려져 있다[7].

***OsPT* 유전자가 항상 대량 발현하는 애기장대 형질전환체 제작**  
 벼의 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자들의 식물체에서의 기능을



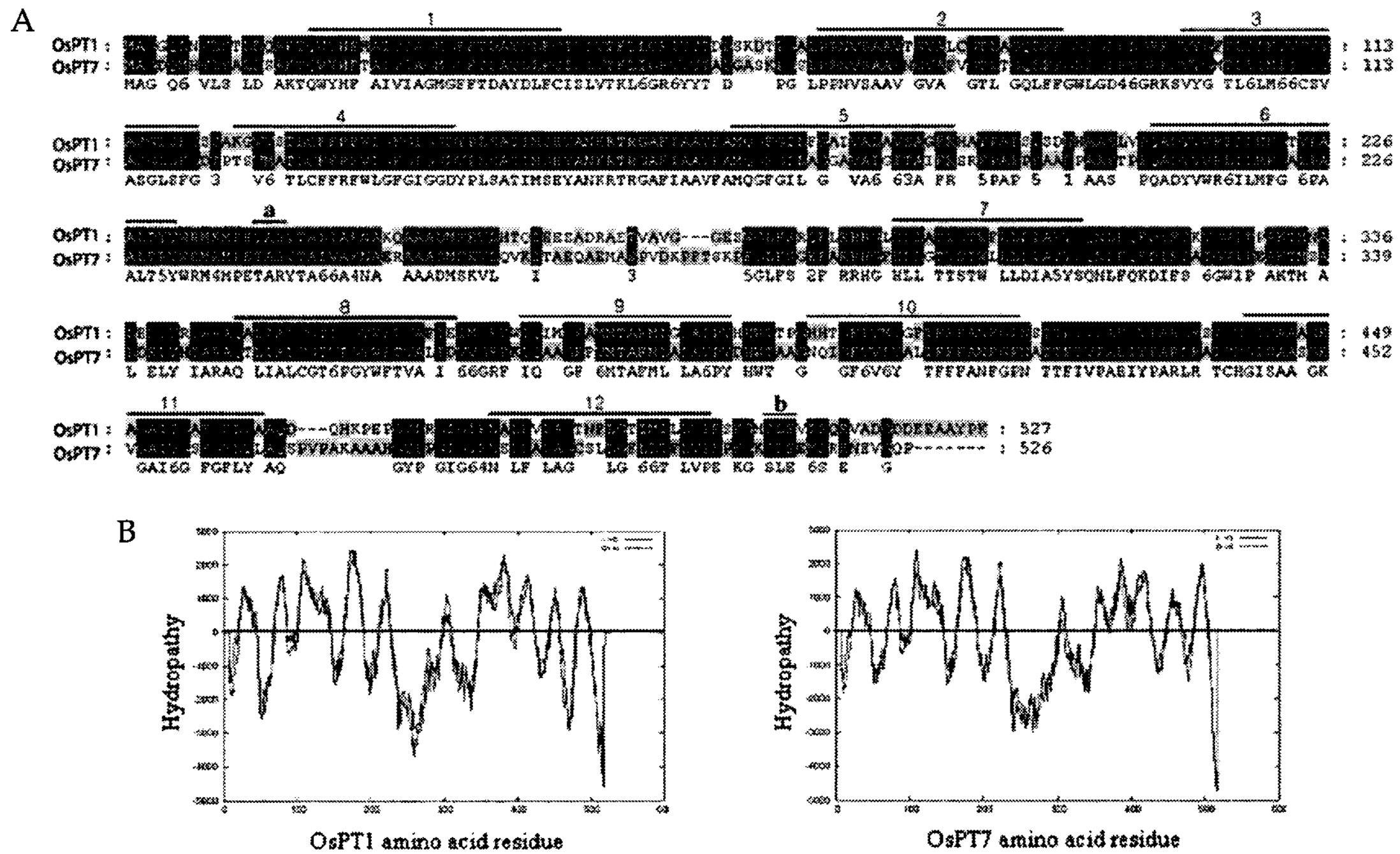


Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of *OsPT1* and *OsPT7* genes and their hydrophobicity profiles. (A) Alignment was performed with CRUSTALW program. Black shading and grey shading indicate identical amino acid residues and similar amino acid residues, respectively. Bars above the alignment indicate the positions of the 12 putative membrane-spanning domains in *OsPT1* and *OsPT7* proteins. The putative consensus sites for phosphorylation by casein kinase II and protein kinase C were indicated with a and b. (B) Hydrophobic and hydrophilic domains of *OsPT1* and *OsPT7* proteins were plotted with Kyti-Doolittle Hrophobicity plot program. The 12 membrane-spanning domains arranged in a 6+6 configuration is a typical topological character of phosphate transporters.

확인하기 위해서 CaMV 35S promoter에 의해서 항상 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자를 각각 대량 발현하는 애기장대 형질전환 식물체를 제작하였다. 먼저 최근에 공개된 벼의 전체 유전체의 정보를 이용하여 벼의 고친화성 인산 운반체 유전자 족 중에서 그룹1의 모든 유전자들은 intron이 없는 단일 exon으로 구성되어 있음을 확인하였다[8]. 그리고 이들 유전자들에 대한 염기서열 정보를 이용해서 벼의 전체 genomic DNA에서 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자의 coding 영역을 PCR 방법으로 증폭하고 분리한 후에, 염기서열의 정확성을 확인하고 식물체의 대량발현용 binary vector인 pBTEX vector에 XbaI 제한 효소를 이용하여 재조합 하였다[3]. 이렇게 재조합 되어진 pBTEX-*OsPT1*와 pBTEX-*OsPT7* construct는 vacuum infiltration 방법으로 애기장대 Col-0에 형질전환 시켰다. Hygromycin (20 µg/ml)에 대한 저항성으로 선별된 형질전환체를 배양토에서 4주 정도 배양한 후에, 각각의 형질전환체로부터 잎의 조직을 채취해서 total RNA를 추출하고 northern blot 분석을 통하여 이 유전자의 발현정도를 분석하였다. 모본으로 사용된 애기장대 Col-0에서는 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 존재하지 않기 때문에 그 발현량이 검출되지 않지만 pBTEX-*OsPT1*와 pBTEX-*OsPT7* construct로 각각 형질전환된 애기장대에서는 도입 유전자가 대량 발현되고

있는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이 형질전환 식물체들에 대한 인산 이용성 조사를 위해서, 각 construct당 적어도 그 발현량이 서로 다른 3 개의 line을 자가수분 후에 다음 후속 세대에서 선별과정을 거쳐서 homozygote line들을 선별하였다.

#### 애기장대에서 *OsPT* 유전자의 대량 발현 형질전환체의 인산 이용성

인산은 식물 생육에 필요한 절대 영양소이므로 인산 결핍 시에는 다양한 생리적 변화가 발생하며 최종적으로 확인한 생육장애 현상이 일어난다고 알려져 있다. 따라서 본 연구팀은 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 대량 발현하는 형질전환체들의 인산 결핍에 대한 반응성을 조사하기 위해서 먼저 인산 결핍 조건에서 생육 상태를 비교하였다. 인산 충분 상태인 B5 고체배지(1 mM Pi)에서 발아시키고 7일간 배양한 형질전환체들과 모본으로 사용한 애기장대 야생형 Col-0의 유묘를 인산 부족 상태의 B5 액체배지(35 µM Pi)에 옮겨서 10일간 수경 배양한 후에 전체 식물체의 wet weight를 측정하였다. *OsPT1* 유전자를 과발현하는 형질전환체의 생육이 모본에 비교해서 약 30% 증가하는 결과를 보였다(Fig. 3). 그러나 발현정도가 낮은 두 종의 형질전환체들의 생육은 모본과 비슷하였다. *OsPT7* 유전자를 과발현하는 형질전환체의 생육도

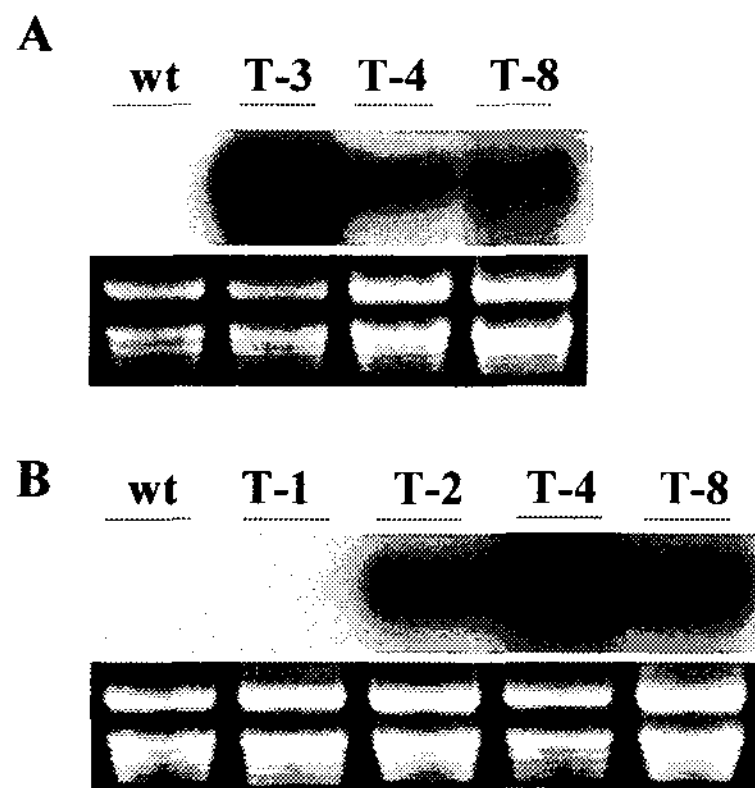


Fig. 2. Generation of *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing *OsPT1* and *OsPT7*. Total RNAs from 4 weeks old seedlings from the wild type Col-0 and transgenic plants overexpressing *OsPT1* (A) and *OsPT7* (B) were subjected to RNA gel blot analysis using <sup>32</sup>P-labeled *OsPT1* or *OsPT7* specific DNA sequences as probes. Equal loading of RNA (10 μg) in each lane was confirmed by pre-staining the gel with ethidium bromide (lower; rRNA).

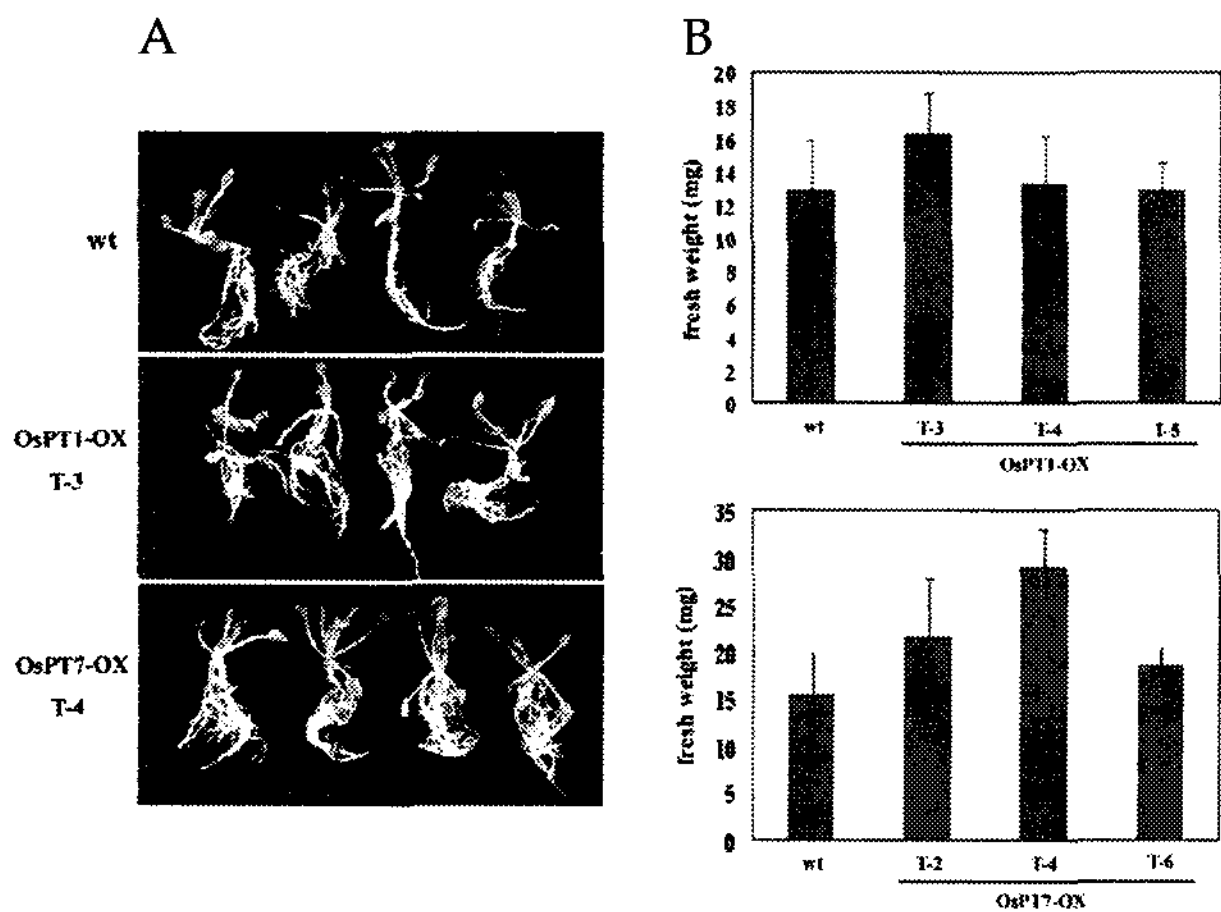


Fig. 3. *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing *OsPT1* and *OsPT7* enhanced growth rate under the phosphate deficient condition. The plants were photographed and their the total wet-weight were measured after cultivation of seedlings in the phosphate-deficient B5 media (35 μM Pi) for 2 weeks. (up) The gross morphology of wild-type and transgenic plants overexpressing *OsPT1* (T<sub>1-3</sub>) and *OsPT7* (T<sub>1-4</sub>). (bottom) Quantitative measurement of the effect of overexpressing *OsPT1* and *OsPT7* on growth rate in the phosphate-deficient condition. Three independent homozygote transgenic lines expressing *OsPT1* and *OsPT7* in a different levels. This experiment in which at least 15 plants per line were used was repeated twice with similar results.

*OsPT7* 유전자의 발현량에 비례해서 증가하는 양상을 보였으며, 발현이 가장 높은 T-4 line은 생육이 약 2배 증가하였다

(Fig. 3). 이러한 결과는 단자엽 식물 유래의 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 쌍자엽 식물체에서도 고친화성 인산 운반체의 기능을 정상적으로 수행한다는 것을 의미한다. 또한 그 발현량이 증가할수록 인산 부족 조건에서 더 효과적으로 인산을 흡수하고 체내의 인산 항상성을 유지함으로써 인산 부족으로 인한 스트레스 반응을 줄이고 좋은 생육 상태를 유지한 결과로 생육이 모본에 비해서 크게 향상된 것으로 생각된다. 이러한 가설을 조사하기 위해서 애기장대에서 인산 결핍 시에 특이적으로 발현하는 고친화성 인산 운반체 유전자(*AtPT1*)의 발현량을 인산 결핍 처리 시간대 별로 조사하였다. 모본인 야생형에서는 예상한 바와 같이 인산 결핍 시간이 증가할수록 *AtPT1* 유전자의 발현이 강하게 증가하는 양상을 보였다. 그러나 인산 결핍조건에서도 생육상태가 양호했던 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 과발현하는 형질전환체에서는 이 유전자의 발현의 증가 양상이 현저히 약화되는 양상을 보였다(Fig. 4). 식물체는 인산 결핍에 대한 반응으로 고친화성 인산 운반체를 비롯한 체내의 인산 항상성 유지에 관련한 다양한 유전자의 발현을 증가시킴으로써 인산 결핍 스트레스를 극복하기 때문에, 인산 결핍에 특이적으로 발현하는 유전자의 발현량의 조사는 이 식물체의 현재 체내 인산 농도 상태를 간접적으로 보여주는 아주 좋은 지시 유전자의 기능을 한다[4,5]. 따라서 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 과발현하는 형질전환체들에서 인산 결핍에 따른 *AtPT1* 유전자의 발현이 모본에 비해서 약하다는 것은 형질전환체가 인산 부족에 의한 스트레스가 적다는 것을 간접적으로 보여주는 좋은 증거다.

한층 흥미로운 사실은 *OsPT1*과 *OsPT7* 단백질은 구조적으로 유사 할 뿐만 아니라 아미노산 염기서열이 70% 이상 같음에도 불구하고 애기장대에서 *OsPT7* 단백질이 보다 효

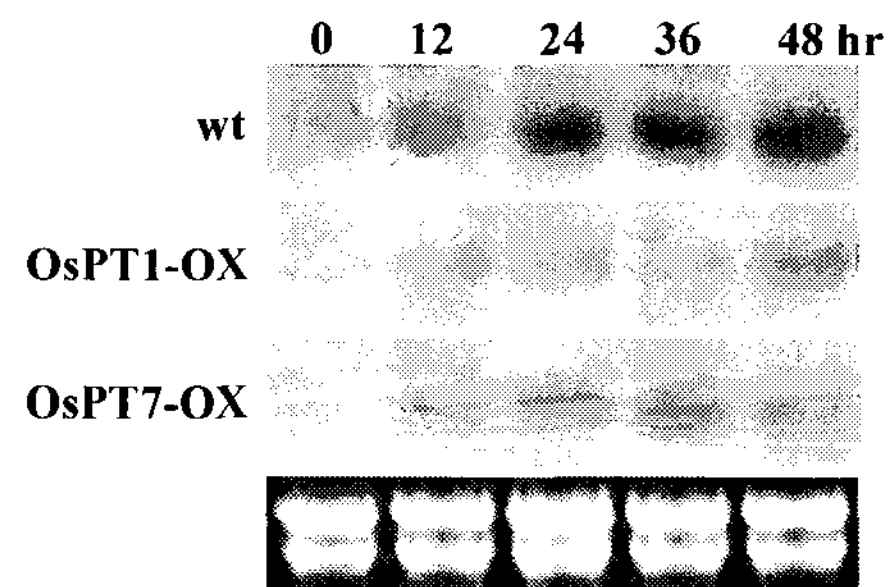


Fig. 4. Expression of *AtPT1* gene of *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing *OsPT1* and *OsPT7* during phosphate starvation. Total RNAs were isolated from seedlings of the transgenic plants overexpressing *OsPT1* (A) and *OsPT7* (B) and wild-type Col-0 that were cultured in the phosphate-deficient B5 media (35 μM) for indicated time points and were subjected to RNA gel blot analysis using <sup>32</sup>P-labeled *AtPT1* specific DNA sequences as probe. Equal loading of RNA (10 μg) in each lane was confirmed by pre-staining the gel with ethidium bromide (lower; rRNA).

과적으로 인산 부족 현상을 극복한다는 것이다. 물론 발현량의 차이에 의한 결과를 완전히 배제할 수는 없지만, 이러한 기능적 차이는 아마도 이들 단백질에 내재되어 있는 조직 특이적 활성도의 차이에서 기인했을 가능성이 있다. 벼에서 이들 유전자들의 인산 결핍에 대한 유도성과 발현조직의 차이 (unpublished data)는 이러한 가설이 설득력을 가지는 증거이다. 따라서 단자엽에서 개발된 고친화성 인산 운반체 유전자를 이용하여 인산 결핍에 의한 피해가 많은 쌍자엽인 발작물에 응용하기 위해서는 쌍자엽 모델 식물체인 애기장대에서 효과를 먼저 확인하고 *OsPT7*과 같은 효과적인 유전자를 이용하는 것이 바람직하다.

## 요 약

본 연구는 공개된 벼의 유전체 정보를 이용하여서 벼에 존재하는 13 종의 고친화성 인산 운반체 유전자들 중에서 다른 식물 종에서 분리되고 잘 연구된 고친화성 운반체 유전자들과의 아미노산 서열이 유사한 9 종의 *OsPT* 유전자들(*OsPT1*, *OsPT2*, *OsPT3*, *OsPT4*, *OsPT5*, *OsPT6*, *OsPT7*, *OsPT8*, *OsPT12*)을 그룹1로, 유사성이 낮은 나머지 4종의 *OsPT* 유전자들(*OsPT9*, *OsPT10*, *OsPT11*, *OsPT13*)을 그룹2로 세분하였다. 그리고 쌍자엽 모델 식물체인 애기장대를 이용해서 전형적인 고친화성 인산 운반체 유전자 군에 속하는 *OsPT1*과 *OsPT7* 유전자의 기능 분석을 시도하였다. *OsPT1* 유전자를 과발현하는 형질전환체의 생육이 모본에 비교해서 약 30% 증가하는 결과를 보였다. 그러나 발현정도가 낮은 두 종의 형질전환체들의 생육은 모본과 비슷하였다. 또한 *OsPT7* 유전자를 과발현하는 형질전환체의 생육도 *OsPT7* 유전자의 발현량에 비례해서 증가하는 양상을 보였으며 발현이 가장 높은 T-4 line은 생육이 약 2배 증가하였다. 이러한 결과는 단자엽 식물 유래의 *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 쌍자엽 식물체에서도 고친화성 인산 운반체의 기능을 정상적으로 수행한다는 것을 의미한다. 또한 형질전환체와 모본의 생육 차이에 대한 분자생물학적 해석을 위해서, 애기장대에서 체내 인산 농도 상태를 간접적으로 보여주는 좋은 지시 유전자의 기능을 하는 인산 결핍에 특이적으로 발현하는 유전자인 *AtPT1* 유전자의 발현량을 조사하였다. *OsPT1*와 *OsPT7* 유전자가 과발현하는 형질전환체에서 인산 결핍에 따른 *AtPT1* 유전자의 발현이 모본에 비해서 현저히 약하게 유도된다는 결과는 형질전환체가 인산 부족에 의한 스트레스가 적다는 것을 간접적으로 보여주는 좋은 증거다. 그 결과로 이들 형질전환체는 모본인 야생형에 비해서 인산 결핍 조건에서도 생육이 좋은 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 논문은 2005학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제)

에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

1. Clough, S. J. and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
2. Drissner, D., G. Kunze, N. Callewaert, P. Gehrig, M. Tamassloukht, T. Boller, G. Felix, N. Amrhein and M. Bucher. 2007. Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* **318**, 265-268.
3. Kwon, T., Y. Jung, S. J. Jeong, Y. B. Yi and J. Nam. 2007. *AtERF11* is a positive regulator for disease resistance against a bacterial pathogen, *Pseudomonas syringae*, in *Arabidopsis thaliana*. *K. J. Life Sci.* **17**, 135-240.
4. Muchhal, U. S., J. M. Pardo and K. G. Raghothama. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10519-10623.
5. Muchhal, U. S. and K. G. Raghothama. 1999. transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 5868-5872.
6. Nagy, R., V. Karandashov, V. Chanue, K. Kalinkevich, M. Tamamloukht, G. Xu, A. A. Levy, N. Amrhein and M. Bucher. 2005. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transporter in solanaceous species. *Plant J.* **42**, 236-250.
7. Navarro, F. J., F. Machin, Y. Martin and J. M. Siverio. 2006. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 13268-13274.
8. Paszkowski, U., S. Kroken, C. Roux and S. P. Briggs. 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 13324-13329.
9. Porier, Y. and M. Bucher. 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In Somerville, C. R. and E. M. Meyerowitz (eds.), *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi:10.1199/tab.0009, www.aspb/publications/arabidopsis/.
10. Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 665-693.
11. Raghothama, K. G. 2000. Phosphate transporter and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 182-187.
12. Rausch, C. and M. Bucher. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transporter in plants. *Planta*. **216**, 23-37.
13. Rausch, C., P. Daram, S. Brunner, J. Jansa, M. Lalol, G. Leggewie, N. Amrhein and M. Bucher. 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**, 462-466.