

애기장대 AtSIZ3 변이형의 온도 및 건조 스트레스에 대한 반응과 유전자 발현

권순태*, 정형진, Paul Hasegawa¹
안동대학교 생명자원과학부, ¹퍼듀대학교 원예학과

Gene Expression and Response of *Arabidopsis* AtSIZ3 Mutants to Temperature and Drought Stress

Kwon, Soon-Tae*, Hyung Jin Jeong and P.M. Hasegawa¹

Dept. of Biological Resources, Andong Nat'l Univ., Andong, 760-749, Korea
¹Dept. of Horticulture, Purdue University, IN47907-2010, USA

Abstract - This study was carried out to understand the effect of low temperature(4°C), heat shock(37°C) and drought stresses on the growth and gene expression of *Arabidopsis* AtSIZ3(at1g08910) mutants. The seedling growth of SIZ3-mutants were markedly inhibited by the treatment of heat shock or chilling stresses. However, there was no significant differences between wild type and SIZ3-mutants in seedling fresh weight. As compared to wild type plants, SIZ3-mutants showed 63.9% inhibition of seedling fresh weight by the treatment of 10 days drought stress, suggesting that SIZ3 is involved in the resistance of *Arabidopsis* to drought stress. Base on RT-PCR analysis, expression of SIZ3 mRNA in the wild type showed 20% inhibition by chilling stress, 3.7 and 4.5 fold increase by the treatment of heat shock or drought stresses, respectively.

Key words - Chilling, Heat shock, Drought stress, Mutants, Gene expressing

서 언

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 AtSIZ3 유전자는 단백질의 인산화, 메틸화, 아세틸화 등에 관여하며, 유전자의 번역 후(post-translation modification)에 나타나는 단백질간의 결합을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Freiman and Tijan, 2003; Kurepa *et al.*, 2003; Mahajan *et al.*, 1997). 이 유전자는 식물체내에서 다양한 형태로 존재하며 일부 유전자 들은 식물의 개화조절(Jin *et al.*, 2005), 저온 및 내동성, 인산결핍(Miura *et al.*, 2005) 및 염분장해(Hasegawa *et al.*, 2000) 등과 같은 비생물적 스트레스에 대한 내성을 발휘하는 것으로 알려져 있다.

식물은 이동성이 거의 없으므로 생존과정에 직면하는 여러 종류의 환경스트레스를 회피하는 능력이 동물에 비해 현저히 떨어지므로, 대부분의 식물은 저온, 고온 및 건조해

와 같은 스트레스에 스스로 내성을 발휘할 수 있는 다양한 방어기작을 발달시켜 왔다. 따라서 식물은 스트레스에 대한 내성 유전자를 갖지 않으면 불량한 환경조건에서 도태될 수밖에 없는 특성을 지니고 있다(Abe *et al.*, 1997; Bohnert and Jensen; 1996). 최근 식물의 스트레스에 대한 반응이나 방어기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 식물의 스트레스와 관련된 많은 유전자들이 탐색되고 그 기능이 밝혀지고 있다(Hasegawa *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2001). 식물스트레스에 대한 내성을 가진 유전자는 궁극적으로 식물이나 작물에 미치는 환경 스트레스에 저항성을 부여하는데 유용한 유전자원으로 활용될 수 있다.

본 연구는 식물의 환경 스트레스에 내성을 발휘하는 것으로 알려진 AtSIZ3 유전자 중 아직 그 기능이 명확히 밝혀지지 않은 AtSIZ3를 유전자를 대상으로 온도 및 건조스트레스에 대한 내성 정도를 파악하여, 궁극적으로 식물의 환경스트레스 저항성 유전자를 탐색하기 위한 시도로 수행되

*교신저자(E-mail) : skwon@andong.ac.kr

었다. 본 연구를 위해 AtSIZ3 유전자 중 각각 다른 3 위치에 T-DNA가 삽입된 애기장대 변이형에 저온, 고온 및 건조 스트레스를 처리하여, 변이형의 성장반응과 유전자 발현 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

AtSIZ3 변이형의 선발

AtSIZ3(at1g08910)는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 첫 번째 염색체 중 염기서열이 2,856,230~2,860,819 bp 사이에 존재하는 유전자로 genomic DNA의 크기는 4,589 bp이다(Fig. 1). 변이형은 유전자의 각각 다른 3개 위치에 T-DNA가 삽입된 것으로 미국의 Purdue 대학교 원예학과로부터 종자를 분양 받았다. 3 종류의 변이형 식물체 종자를 각각 100개씩을 다른 포트에 재배하면서 T-DNA가 삽입된 부분의 DNA 염기서열을 바탕으로 제작한 양방향 primer로 PCR을 실시하여, T-DNA의 삽입위치가 명확하게 나타나는 식물체 1개체만을 선발하여 이를 다시 증식하여 실험 재료로 사용하였다.

온도 및 건조 스트레스 처리

온도스트레스는 고온(37°C)과 저온(4°C)처리로 구분하였다. 고온처리를 위해 9 cm petridish에 MS배지(Murashige and Skoog, 1962)를 20 mL을 채운 후 petridish를 4개 부분으로 나누어 야생형(Columbia-0, Col0) 1종과 변이형 3종(siz3-1, siz3-2, siz3-3)의 종자를 3 × 3 mm 간격으로 파종하였다. 25°C 광 상태에서 1주일간 발아생장시킨 후 37°C에 24시간 및 48시간동안 노출시켰다. 저온처리를 위해 6 × 6 cm 사각 포트에 상토를 채운 후 포트당 100립의 종자를 파종하여, 25°C 유리온실에서 2주간 생장시킨 후 4°C 저온 생장상에서 10일 및 20일간 처리하였다. 건조처리는 식물체를 저온처리와 동일한 조건으로 생장시킨 후 10일간 수분공급을 중단하였다. 고온, 저온 및 건조처리를 한 후 식물체의 생체중을 측정하였다.

유전자 발현 분석

유전자 발현은 RT-PCR 방법으로 분석하였다. RNA 추출을 위해 고온, 저온 및 건조 스트레스에 노출된 식물체를 즉시 회수하여 액체질소에 냉동시켰다. 냉동된 식물체는 막자사발에 마쇄한 후 총 RNA 추출하였다. cDNA 제작을

위해 총 RNA로부터 Poly(A)⁺RNA를 분리하였으며, AtSIZ3 cDNA의 개시암호와 종결암호부위의 염기서열을 바탕으로 각각 20염기의 양방향 primer를 제작한 후 RT-PCR을 실시하였다. 합성된 PCR 산물은 전기영동에 의해 발현정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

AtSIZ3 유전자 특성

AtSIZ3(At1g08910) 유전자는 애기장대의 1번 염색체 2,856,230~2,860,819 bp 사이에 존재하는 유전자로 16개의 intron과 17개의 exon으로 구성되어 있다. 이 유전자의 genomic DNA는 4,589bp이며, cDNA의 open reading frame은 2,283bp이다(Fig. 1). 변이형의 T-DNA 삽입위치를 보면, siz3-1(Salk 062195)은 첫째 intron 2,856,409~2,856,444 bp 위치에, siz3-2(Salk 083748)는 세 번째 exon 2,856,587~2,856,655 bp 위치에, siz3-3(Salk 738 B09)은 12번째 intron 2,856,587~2,856,655 bp 위치에 있다. RT-PCR에 의해 야생형(Col0)과 세 종류 변이형의 AtSIZ3 유전자의 mRNA 전사여부를 조사한 결과 야생형에만 발현이 관찰되고 변이형에는 전혀 나타나지 않았다(Fig. 1).

변이형 세 종류 모두에서 RT-PCR에 의한 유전자의 발현이 전혀 되지 않은 것으로 보아 본 실험에 사용된 3종류의 변이형은 AtSIZ3(At1g08910) 유전자의 기능이 완전히 상실된 것으로 추정된다. 애기장대 전체 genome에는 여러 종류의 SIZ 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있으나(Miura et al., 2005), 본 연구에서는 At1g08910 유전자의 변이형을 대상으로 지속적인 실험을 수행한다.

저온 및 고온 스트레스에 대한 반응

AtSIZ3 변이형 3종과 야생형을 동일한 petridish에 파종하여 37°C의 고온을 처리한 결과 처리시간이 24시간에서 48시간으로 길어질수록 생체중의 감소가 나타나지만 야생형(Col0)과 변이형(siz3-1~3)간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2).

무처리 조건(25°C)에서 유묘의 생체중을 보면, 야생형(Col0)은 petridish 당 1127 mg, 변이형인 siz3-1은 1,110 mg, siz3-2는 1,091 mg, siz3-3은 1,156 mg으로, SIZ3 유전자의 발현이 전혀 되지 않는 AtSIZ3 변이형과 유전자의 발현이 정상적으로 이루어지는 야생형 간에 유묘의 생체중에

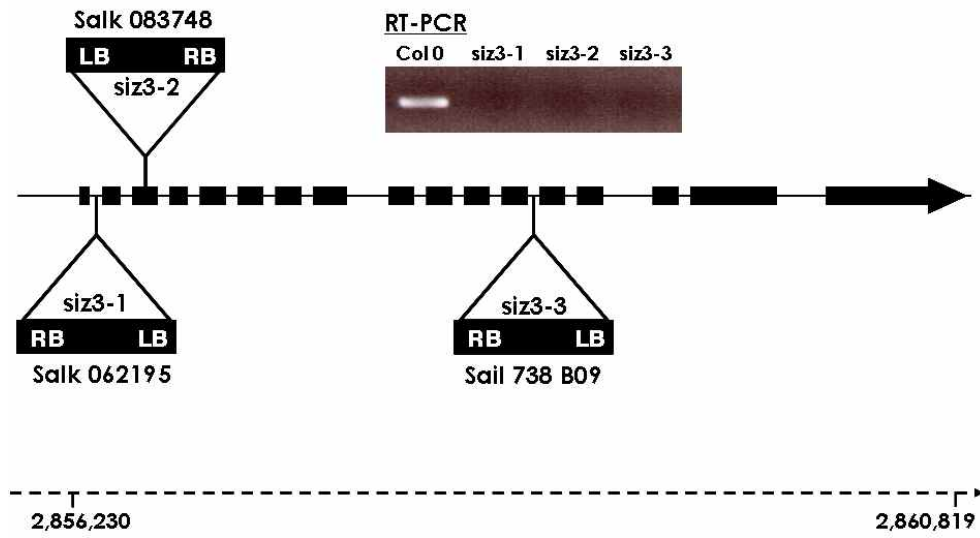


Fig. 1. T-DNA insertion map of AtSIZ3 mutants and RT-PCR of *siz3* mRNA. AtSIZ3 possesses 17 exons and 16 introns with 2,283 bp open reading frame.

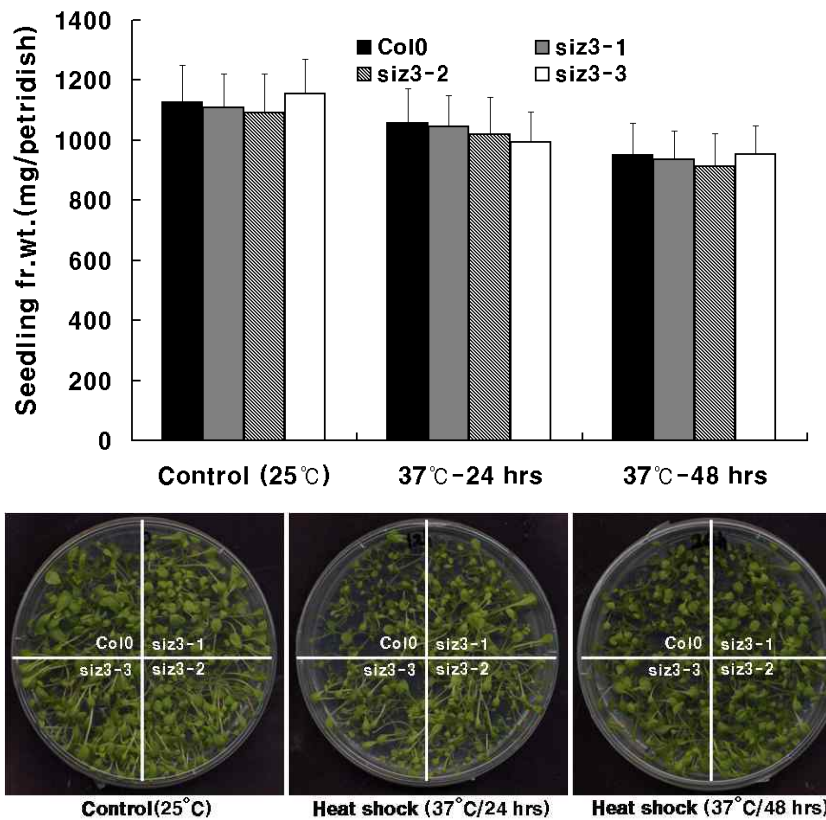


Fig. 2. Seedling growth of AtSIZ3 mutants treated with heat shock (37°C) treatment. Seedlings were germinated on MS medium for one week and exposed to heat shock for 24 and 48 hours. Seedling fresh weight was determined at one week after treatment.

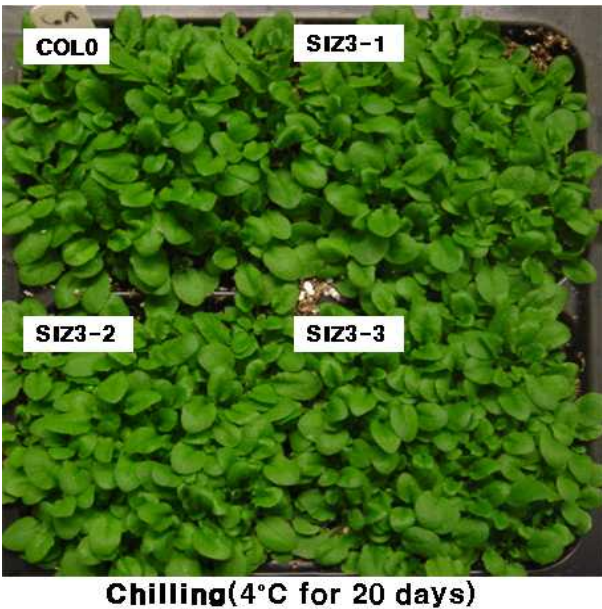
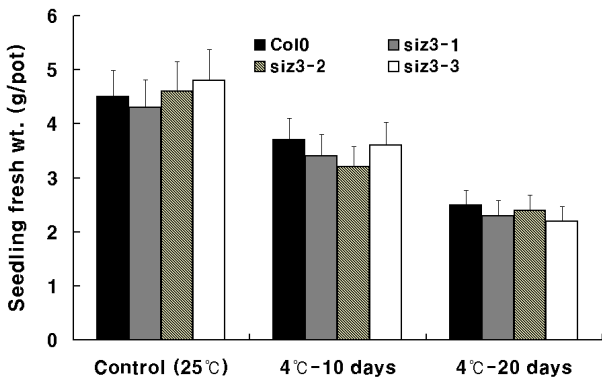


Fig. 3. Seedling growth of AtSIZ3 mutants as affected by low temperature (4°C) treatment. Seedlings were germinated on pot for two weeks, and exposed to 4°C for 10 and 20 days.

유의한 차이를 보이지 않았다. 성장과정 중에 관찰한 야생형과 변이형의 잎의 형태, 초장 및 꽃의 모양 등을 비교한 결과 뚜렷한 차이는 없었으며, 정상적인 식물생장 환경 하에서는 두 식물체의 형태가 유사한 것으로 나타났다(자료 미제시).

AtSIZ 유전자는 SUMO(small ubiquitin modifier) 단백질의 조절에 의해 생체내에서 여러 종류의 단백질들 간에 상호 결합하는 현상, 일명 ‘sumoylation’을 나타내는 유전자로 알려져 있다(Miura *et al.*, 2005). Sumoylation은 주로 열충격(heat shock), H₂O₂, EtOH, canavanine 처리와 같은 다양한 스트레스에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다(Kurepa *et al.*, 2003). 한편 이 현상은 식물

의 병원균 반응, ABA 신호전달, 개화, 인산결핍 반응과 같은 생리현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어 있다(Kurepa *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2005). 본 실험에서는 고온을 처리한 변이형과 야생형 간에 유묘의 생체중에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

저온처리에 대한 애기장대의 성장반응은 야생형과 변이형 모두 처리기간이 길어질수록 유묘의 생장억제를 나타내었으나, 야생형과 변이형 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 20일간의 저온처리에서 야생형(Col0)은 44.4%, 변이형인 siz3-1은 46.5%, siz3-2는 47.8%, siz3-3는 54.2%의 생육억제를 보이지만 변이형간이나 야생형 간에 뚜렷한 차이가 없었다.

AtSIZ 유전자 중 AtSIZ1-변이형은 저온처리에 대해 감수성 반응을 보이며, 야생형에서 SIZ1 유전자는 식물의 저온저항성 및 내동성을 나타내는 중요한 유전자로 보고되어 있다(Miura *et al.*, 2005). AtSIZ1와는 달리 본 실험에 사용된 AtSIZ3 유전자 변이형은 저온뿐만 아니라 고온처리에 대한 민감성을 전혀 보이지 않았다.

건조스트레스 반응

온도처리에 대한 애기장대의 성장반응과는 달리 AtSIZ3 변이형은 야생형과 현저한 반응차이를 보였다(Fig. 4).

10일간의 건조처리 후 측정된 유묘의 생체중을 보면 야생형(Col0)이 꽃트당 3.5 g인 반면 변이형인 siz3-1은 1.2 g, siz3-2는 1.4 g 및 siz3-3은 1.3 g을 보여 야생형에 비해 평균 62.9%의 생육억제를 보였다. 한편 10일간의 건조처리 후 식물체에 다시 물을 공급하면 야생형은 100% 생존하나 변이종은 모든 개체가 고사한 것으로 나타났다. 따라서 10일간의 건조처리 시 야생형은 아직 영구위조점에 도달하지 않는 내성을 보이거나, 변이종은 동일한 건조처리에 대해 재생이 불가능한 위조상태에 도달하여 건조처리에 대한 현저한 감수성을 보였다.

이 실험의 결과로 보면 AtSIZ3 유전자는 식물의 건조스트레스에 중요한 역할을 하는 유전자인 것으로 판단된다. 식물이 건조스트레스에 대한 내성을 나타내는 기작은 잎의 기공개폐에 의한 수분유실을 방지하는 정도와 뿌리의 수분 흡수 능력에 의존하며, 이는 내생호르몬인 ABA의 생합성 능력과 정의 상관성이 있는 것으로 알려져 있다(Bohnert and Jensen, 1996; Abe *et al.*, 1997). 한편 식물의 건조 내성은 염분에 대한 식물의 감수성에도 큰 영향을 미치는

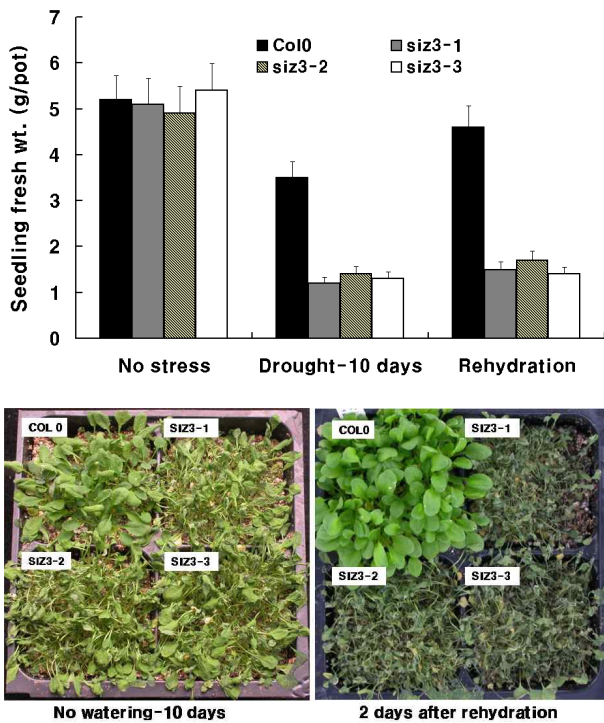


Fig. 4. Seedling growth of AtSIZ3 mutants treated with drought treatment. Seedlings were germinated on the pot for two weeks, and exposed to no watering stress for 10 days.

것으로 알려져 있으며 이와 관련된 많은 유전자들이 밝혀진바 있다(Hasegawa *et al.*, 2005).

유전자 발현

애기장대의 야생형과 변이형의 유묘에 저온(4°C), 고온(37°C) 및 건조처리를 한 후 총 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 실시하였다(Fig. 5).

세 종류의 변이형은 어떠한 처리에서도 유전자 발현이 되지 않은 것으로 나타났으나, 야생형은 무처리 뿐만 아니라 저온, 고온, 건조 처리 모두에서 PCR 산물이 나타났다. 야생형의 AtSIZ3 유전자의 발현정도를 보면 4°C의 저온처리는 무처리를 1로 보았을 때 0.8정도를 나타내어 20%정도 발현이 감소하는 반면, 37°C 고온처리에서는 3.7배, 건조처리에서는 4.5배 정도가 증가하였다.

고온처리는 AtSIZ 유전자의 작용에 의해 생체내 단백질의 sumoylation을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Miura *et al.*, 2005). 본 실험에서는 AtSIZ3 변이형들이 고온에 대한 생장의 저항성이나 감수성을 나타내지는 않았지만 야생형에서 이 유전자의 발현이 무처리에 비해 3.7배가 증가

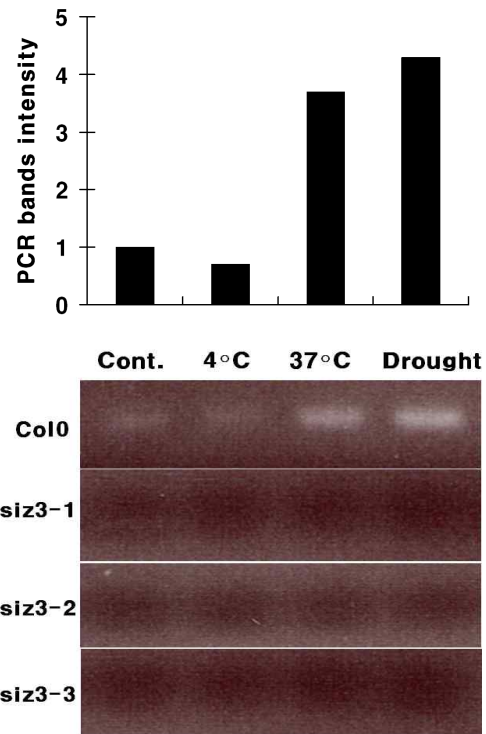


Fig. 5. RT-PCR of AtSIZ3 mutants treated with chilling (4°C), heat shock (37°C), drought. Intensity of RT-PCR products (upper) is based on wild type (Col0). Seedlings were exposed to 4°C for 10 days, 37°C for 24 hours or drought stress for 10 days.

하여, 생체내의 sumoylation의 증가와 깊은 관련이 있을 것으로 추정된다. 한편 건조처리에서는 본 실험에서 처리한 스트레스 중 가장 강한 유전자 발현을 보여, 이것이 유묘생장 실험에서 야생형이 변이형보다 저항성을 보인 것과 관련이 있을 것으로 사료된다.

이 실험에서 나타난 생장반응과 유전자 발현의 결과를 종합하면, AtSIZ3 유전자는 애기장대의 저온, 고온 등의 온도에 대한 내성이나 감수성을 보이지 않은 반면, 건조 스트레스에 대해서는 강한 저항성을 담당하는 유전자인 것으로 판단된다. 건조저항성은 작물의 재배에 있어서 아주 중요한 요인의 하나이다. 특히 지구온난화와 기상이변 및 사막화 등으로 인한 식물 생태계의 위협이 더욱 증가하는 시점에 건조저항성 유전자를 감수성식물에 도입하는 것은 식물과 작물의 보호에 획기적인 전기가 될 것으로 사료된다. 현재 AtSIZ3 유전자의 cloning이 진행 중이며, 이 유전자의 분자생물학적인 내성기작을 위해 건조 감수성 식물에의 형질전환을 시도할 예정이다.

적 요

애기장대의 AtSIZ3(At1g08910) 유전자에 T-DNA를 삽입한 세 종류의 변이형에 저온(4°C), 고온(37°C) 및 건조스트레스를 처리하여 유묘의 성장반응과 유전자 발현을 조사하였다. 저온과 고온처리에 의해서는 야생형과 변이형간에 유묘생장에 유의한 차이를 보이지 않았다. 야생형과 변이형 식물체에 10일간의 건조스트레스를 처리하면 야생형은 재 관수에 의해 모든 식물체가 재생하였으나 변이형은 모두 고사하였고, 10일간의 건조처리로 변이형은 야생형에 비해 유묘생장이 평균 62.9%가 억제되는 것으로 나타났다. 야생형에서 AtSIZ3 유전자는 4°C의 저온처리에서 무처리를 보다 20%정도 발현이 감소하는 반면, 37°C 고온처리에서는 3.7배, 건조처리에서는 4.5배가 증가하였다. 이 결과로 보아 AtSIZ3 유전자는 식물의 건조내성과 밀접한 연관이 있을 것으로 판단된다.

인용문헌

Abe, H., K.Y. Shinozaki, T. Urano, T. Iwasaki, D. Hosokawa, and K. Shinozaki. 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859-58.

Bohnert, H.J. and R.G. Jensen. 1996. Strategies for engineering

water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14: 89-97.

Freiman, K.A. and R. Tijan. 2003. Regulating the regulators: Lysine modification make their mark. *Cell* 112:11-17.

Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, J.K. Zhu, and H.J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.

Jin, J.B., H. Bae, S.J. Kim, Y.H. Jin, C.H. Goh, D.H. Kim, Y.J. Lee, Y.C. Tse, L. Jiang, and I. Hwang. 2003. The *Arabidopsis* dynamic-like proteins ADL1C and ADL1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis. *Plant Cell* 15:2357-2569.

Kurepa, J., J.M. Walker, J. Smalle, M.M. Gosinl, S.J. Davis, T.L. Durham, D.Y. Sung, and R.D. Vierstra. 2003. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.* 278:6862-6872.

Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace, and F. Melchior. 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanGP2. *Cell* 88:97-107.

Miura, K., A. Rus, A. Sharkhuu, S. Yokoi, A.S. Karthikeyan, K.G. Raghothama, D. Baek, Y.D. Koo, J.B. Jin, R.A. Bressan, D.J. Yoon, and P.M. Hasegawa. 2005. The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:7760-7765.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15, 473-479.

(접수일 2009.9.1; 수락일 2009.12.28)