

양분이용 고효율 벼 계통 개발용 유용 유전자 발굴

**Isolation of Genes Valuable for Development of
Nutrient-Efficient Transgenic Rice Plants**

연구기관
전북대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 과학기술부와 농촌진흥청이 지원하는 작물유전체기능연구사업단 “양분이용 고효율 벼 계통 개발용 유용 유전자 발굴”과제 (과제번호 CG3214)의 단계보고서로 제출합니다.

2004. 8.

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 윤 성 중

연 구 원 : 김 상 용

” : 백 소 현

” : 박 명 렬

” : Safiq Rehman

” : 이 진 우

” : 이 병 국

보고서 초록

과제관리번호	CG3214	해당단계 연구기간	2001. 7. - 2004. 6.	단계 구분	(1단계) / (총3단계)
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	작물유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명	중과제가 있을 경우에는 기재 (단위과제일 경우에는 아래 기재)			
	세부(단위)과제명	양분이용 고효율 벼 계통 개발용 유용 유전자 발굴			
연구책임자	윤성중	해당단계 참여연구원수	총 : 7 명 내부 : 1 명 외부 : 6 명	해당단계 연구비	정부: 150000천원 기업: 천원 계: 150000천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 농업생명과학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>양분이용효율(NUE) 개량에 필요한 정보와 재료를 확보하기 위하여 NUE의 특성을 조사하고 NUE관련 유전자를 탐색하여 선발된 유전자의 구조와 기능을 분석하였음. 질소, 인, 칼륨, 마그네슘, 철 등이 결핍된 조건에서 발현이 특이적으로 조절되는 전사체 분석과 역 Northern 분석을 통하여 NUE관련유전자 400여종을 선발하였음. 이중 양분수송자(PT, AMT), 지질수송단백질(LTP), 향산화효소(CAT) 등에 대한 구조와 기능 및 발현특성을 상세히 구명하였음. PT유전자의 식물체내 기능검정을 위해 형질전환 벼 계통을 개발하였으며, NUE개량용 유용유전자원으로 이용될 수 있을 것으로 기대됨. 양분조건에 대한 차별발현 조절이 확인된 기능미지 전사체중 8종에 대해 RNA전사억제에 의한 기능확인을 시도하였음. 인산결핍시 주요형질의 반응을 분석하여 NUE가 양적형질임을 입증하고 화분의 발달과 발아과정에 칼륨이 중요함을 확인하였음. 인산과 질소 결핍조건에서의 벼 전체유전체의 발현양상을 60K microarray를 이용하여 분석하여 다수 유전자의 발현억제와 소수 유전자의 발현 증가를 확인하였음. 연구결과는 NUE 개량을 위해서는 주요NUE 단일유전자를 포함한 다수 유전자의 조절이 필요함을 제시하였음.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	무기양분, 벼, 양분수송자, 양분이용효율, 유전자 발현, 유전자칩			
	영 어	Gene expression, Microarray, Mineral nutrients, Nutrient use efficiency (NUE), Rice, Transporters			

요 약 문

I. 제 목

양분이용 고효율 벼 계통 개발용 유용 유전자 발굴

II. 연구개발의 목적 및 필요성

근래의 농산물 생산기술이 다량투입에 의한 대량생산을 기조로 발전, 실행되면서 생태계의 훼손과 자원의 고갈 및 농산물의 품질저하 등의 문제점을 노출하고 있다. 이러한 문제에 대한 국내외적인 인식의 공유와 문제의 개선 방안의 모색을 통하여 저투입 지속가능 농업, 즉 친환경 농업이 현재의 고투입 다량생산 농업의 대안으로 제시되고 있다.

친환경 농업의 핵심기술은 화학 비료와 농약 등 농용자재의 저투입이며, 저투입 조건에서는 농업 생산량의 불가피한 감소가 예상된다. 한편, 인구증가와 식생활의 고급화 등으로 인구 부양에 필요한 식량에너지의 수요는 증가하는 상황이다. 따라서, 친환경 농업의 안정적이고 효과적인 실천을 위해서는 저투입 조건에 적응하는 농업자재와 기술의 개발이 필요하다. 농업 생산의 필수 생물자재는 작물품종이다. 따라서 저투입 친환경 농업환경에 적응하는 품종의 개발이 시급히 요청된다.

작물의 정상적인 성장과 발달은 필요한 영양분이 충족되어야 가능하다. 작물은 뿌리를 통하여 토양 중의 양분을 흡수 이용한다. 저투입 조건에서는 토양 중의 양분이 감소하므로 작물의 정상적 생육을 위해서는 양분이용효율(nutrient use efficiency, NUE)의 개선이 필요하다. 양분의 이용효율은 흡수, 이용, 재분배 등의 단계에 의해 결정되나 1차적으로 양분흡수효율에 의해 영향을 받는다. 양분의 흡수효율은 양분흡수에 관여하는 다양한 단백질 분자의 작용 효율에 의해 결정된다.

따라서 본 과제는 저투입 친환경 농업에 적응하는 양분이용 고효율 벼 품종의 개발에 필요한 생물유전정보와 소재의 개발을 목적으로 수행하였다. 특히 양분흡수이용에 관여하는 주요 유전자의 단리체를 확보하여 유전자의 구조와 양분조건에 따른 발현 특성을 구명하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 과제에서는 저투입 친환경 농업에 적응하는 양분이용 고효율 벼 품종의 개발에 필요한 정보와 소재를 개발하였다. 이를 위해 NUE에 관여하는 주요 유전자의 단리체를 확보하여 유전자의 구조와 양분조건에 따른 발현 특성을 조사하였다.

식물은 이동성이 없으므로 주변 환경에 대한 민감한 체내 반응의 변화를 보이며, 양분이 결핍된 조건에서는 양분흡수와 이용에 필수적인 분자를 우선적으로 생산하여 이용한다. 따라

서 본 과제에서는 벼 식물체에 양분결핍조건 처리를 하여 양분조건에 대해 차별적으로 반응하는 유전자를 탐색하고 유전자 단리체를 분리하여 구조와 기능, 발현 특성을 조사하였다.

NUE는 양적형질이므로 여러 종류의 생리반응에 의해 결정된다. 그러므로 NUE는 역할 정도가 다른 다수의 유전자의 작용의 영향을 받는다. NUE의 종합적 이해를 위해서는 유전체 전체의 발현조절 특성에 대한 이해가 필요하다. 따라서 다수 유전자의 발현조절 특성을 조사할 수 있는 microarray를 이용하여 양분조건에 대한 유전자의 반응양상을 조사하고자 시도하였다.

IV. 연구개발결과

NUE 개량에 필요한 기반 정보와 소재를 확보하기 위하여 양분조건에 특이적으로 조절되는 유전자를 탐색하여 선발한 유전자에 대한 구조와 기능검정을 실시하는 한편 양분조건에 대한 유전자원의 반응특성을 조사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. NUE관련 유전자의 구조와 발현특성

질소(N), 인(P), 칼륨, 마그네슘, 철, 그리고 모든 양분이 결핍된 조건에서 차별적 발현을 보이는 유전자전사체를 annealing control primer를 이용한 cDNA 합성과 PCR을 이용하여 탐색하였고, 인산결핍조건에서 발현이 증가하는 유전자전사체가 모아진 cDNA library 작성하였다. 차별발현 유전자전사체 단편의 서열과 발현분석, 인산특이적 cDNA library의 expressed sequence tag(EST) 분석, 그리고 reverse Northern 분석을 통하여 NUE에 관여할 가능성이 있는 후보유전자 400종 이상을 선발하였다.

후보유전자 중 phosphate transporter(PT), ammonium transporter(AMT), lipid transport protein(LPT), catalase(CAT)의 유전자 구조와 양분조건에 대한 발현 특성을 상세히 조사하였다. 총 4종의 *OsPT* 유전자(*OsPT1*, *OsPT2*, *OsPT4*, *OsPT5*)의 구조를 분석하고 효모돌연변이체의 회복능력을 검정하여 인산수송자 기능을 확인하였다. *OsPT1*은 인산결핍조건에서 뿌리에서만 발현되었고, 인산농도가 200 mM이하로 낮아질수록 발현이 증가하였다. *OsPT1*은 12시간 이내에 인산결핍에 반응하여 유전자 발현이 증가하였다. 이러한 결과로 보아 *OsPT1*은 인산결핍조건에서의 인산흡수율 증대에 기여하고 있는 것으로 판단된다.

양분결핍조건의 뿌리조직에서 특이적인 *OsLTP1*을 분리하여 구조와 발현 특성을 조사하였다. 지금까지 알려진 지상부에서 발현되는 a15, b1, b21 등의 LPT와 다르게 *OsLTP1*은 질소와 인산이 결핍된 뿌리에서 발현이 증가하였으나 지상부에서는 증가하지 않았다. *OsLTP1*은 뿌리와 양분특이성을 보이는 이례적인 유전자로서 NUE에 관여하고 있을 가능성이 높은 것으로 평가된다.

Catalase 활성은 양분결핍시 뿌리에서 양분 특이적으로 증가하였다. 특히, 인산결핍에 의해 활성이 약 3배 증가하였는데 증가의 주요인은 *Cat A*와 *Cat B* 동위효소와 유전자의 특이적 발현 증가였다. 이러한 인산결핍에 의한 catalase 활성증가는 인산 농도에 의존적

이었으며 인산농도가 200 mM 이하로 50 mM까지 낮을수록 효소활성과 유전자의 발현이 높았고 0 mM에서는 증가 정도가 낮았다. 지상부에서는 질소와 모든 양분결핍의 경우 효소활성이 약 50-80% 증가하였으며 *Cat C*의 발현이 증가하였다. 인산결핍에 의해서는 효소활성(약 20%)과 *Cat A*의 발현이 약간 증가하였다. 그러나 Ascorbate peroxidase는 양분조건에 대한 활성의 변화가 크지 않았다. 양분결핍조건에서의 catalase의 발현촉진은 catalase 및 양분연구 분야의 새로운 발견으로서 항산화효소의 양분결핍조건에서의 식물체의 성장과 저항성의 조절을 통한 양분이용효율과의 관련 가능성을 시사하고 있다.

유전자 기능을 식물체 내에서 검증하기 위하여 PT 유전자 형질전환 벼 계통(F2, 5계통)을 육성하였다. 형질전환체는 유전자의 기능확인 및 NUE개량용 유전자원으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 양분조건에 대한 차별발현 조절이 확인된 기능미지 전사체중 8종의 기능을 RNA전사억제 방법을 이용하여 확인하고자 시도하였다.

2. NUE 형질의 발현 특성

고NUE(다산벼)와 저NUE(Palawan) 품종의 주요생장반응과 인산가수분해 효소의 반응 특성을 조사 분석하여 NUE가 양적형질임을 제시하였다. 즉, 특정 단일 유전자보다는 다수의 유전자의 상가적 작용에 의해 NUE가 결정됨을 의미하는 결과를 얻었다. 또한 화분의 발달과 발아과정에 칼륨이 매우 중요한 역할을 수행함을 확인하여 각종 생리대사작용의 양분조건에 대한 종합적 반응특성이 NUE를 결정함을 제시하였다.

또한 60K rice whole genome microarray를 이용한 유전체발현 분석 결과, 양분결핍 조건에서는 다수의 유전자의 발현은 감소하나 소수의 유전자의 발현은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 양분이용효율을 개선하기 위해서는 다수유전자의 상호작용 및 발현정도의 정밀조절이 필요함을 시사하였다.

결론적으로 본 연구를 수행하여 NUE의 분자기구 이해에 필요한 정보와 주요 유전자 소재를 확보하였다. 또한 NUE에는 역할 정도가 다른 다수의 유전자들이 관여하며 NUE 개량을 위해서는 주요 단일유전자의 역할구명과 함께 다수의 NUE관련유전자의 발현조절 특성에 대한 종합적인 연구의 필요성이 제시되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 수행하여 얻은 유전자 정보와 소재는 NUE의 분자기구 이해와 고NUE 작물 품종 개량에 사용할 예정이다. 특히, 양분흡수에 관여하는 양분수송자 유전자는 형질전환을 통한 식물체내에서의 유전자 기능 검정을 통하여 작물의 양분흡수이용 효율 개량에 필요한 육종소재로 개발하여 활용할 예정이다. 또한 부영양화된 내륙수 정화에 이용가능한 환경정화용 식물체 개발에도 활용할 예정이다.

식량 생산용 작물의 양분이용효율 개량 및 환경정화용 식물체 개발의 경제성을 향상시키기 위하여 유용성이 확인된 유전자에 대하여는 산업재산권을 확보할 예정이다.

또한, 본 연구를 통하여 얻은 주요 유전자의 구조와 발현 정보를 국내외 관련 학술지에 발표하여 연구결과를 공지함으로서 관련 학문과 산업의 발전에 기여할 예정이다.

S U M M A R Y

Nutrient use efficiency (NUE) is a trait affected by multiple genetic factors. This study was conducted to isolate and characterize genes involved in NUE and understand NUE at molecular levels. About 400 putative NUE-related genes were selected by comparatively analyzing the transcripts expressed under various nutrients deficiency conditions. Detailed molecular characterizations were conducted for phosphate transporter (PT), lipid transporter protein (LTP), and catalase (CAT). Four *OsPT* clones were isolated and their structural and functional characteristics were identified through expression analyses and complementations of yeast mutants. The expression of *OsPT1* was root-specific and also highly specific to phosphorus (P) deficiency. A new *OsLTP1* gene was isolated and its root- and nutrient-stress-specific expression was demonstrated, suggesting its possible involvement in NUE. Regulation of CAT expression by mineral nutrients was clearly shown at activity, isozyme and gene expression levels. Expression of *Cat B* gene was drastically increased under P deficiency, suggesting its possible role in P use efficiency. Transgenic rice plants overexpressing PT were developed to examine the role of PT in phosphate uptake *in vivo*. RNA interference was also attempted to identify functions of unknown genes. The transgenic plants should be useful for functional identification and eventually for the improvement of NUE of rice and other crop plants. Responses of growth and acid phosphatases to P deficiency indicated the quantitative nature of NUE expression. Microarray analysis was employed to understand NUE at the whole genome level. In addition, the critical role of potassium (K) in pollen germination was suggested by the observations of specific distribution of K at the aperture area.

Overall, many genes of potential use in NUE study and improvement were obtained. Together with the genetic materials, information on NUE expression suggests the importance of major individual genes as well as minor genes in determining NUE.

C O N T E N T S

I. Outlines of research	12
II. Review of research area	13
III. Content and Results	15
1. Screening of nutrient use efficiency related genes.....	15
A. Induction of transcripts differentially expressed under nutrient deficiency	15
B. Screening of transcripts differentially expressed under nutrient deficiency	15
(1) Materials and Methods.....	15
(a) Suppressive subtraction hybridization	15
(b) Amplified transcripts using arbitrary primers and PCR.....	15
(c) Expressed sequence tages.....	17
(2) Results and Discussion.....	18
(a) Selection of suppressive subtraction hybridization clones ...	18
(b) Selection of amplified transcripts clones	22
(c) Analysis of expressed sequence tags	27
2. Characterization of nutrient use efficiency related genes	34
A. Structural and functional characterization of nutrient transporter genes	34
(1) Materials and Methods.....	34
(2) Results and Discussion	36
(a) Phosphate transporter.....	36
(b) Ammonium transporter	52
B. Expression of lipid transporter genes under nutrient stresses	56
(1) Materials and Methods.....	56
(2) Results and Discussion.....	56
C. Expression of antioxidant enzymes under nutrient stresses	60
(1) Materials and Methods.....	60
(2) Results and Discussion.....	61
D. <i>In planta</i> functional identification of genes.....	65
(1) Materials and Methods.....	65
(2) Results and Discussion.....	67
(a) Nutrient transporter gene.....	67

(b) Genes of unknown function	69
3. Characterization of nutrient use efficiency trait	72
A. Growth response to nutrient deficiency.....	72
(1) Materials and Methods.....	72
(2) Results and Discussion.....	72
B. Response of acid phosphatases to nutrient deficiency	76
(1) Materials and Methods.....	76
(2) Results and Discussion.....	76
C. Effect of nutrient on pollen development	82
(1) Materials and Methods.....	82
(2) Results and Discussion.....	82
D. Response of global gene expression to nutrient deficiency.....	85
(1) Materials and Methods.....	85
(2) Results and Discussion.....	85
IV. Research achievements and contribution.....	89
1. Achievements.....	89
2. Contribution.....	93
V. Applications of research outputs.....	95
VI. Information collected	96
VII. References.....	97

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	12
제 2 장 국내외 연구개발 현황	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	15
제 1 절 양분이용효율관련 유전자 탐색.....	15
1. 목표 유전자 발현 유도.....	15
2. 양분반응 유전자전사체 탐색	15
가. 재료 및 방법.....	15
(1) Suppressive subtraction hybridization	15
(2) 임의서열 primer 증폭 유전자전사체 탐색.....	15
(3) cDNA clone의 염기서열 분석에 의한 탐색	17
나. 결과 및 고찰.....	18
(1) Suppressive subtraction hybridization clone 선발	18
(2) 임의서열 primer 증폭 유전자전사체 분리.....	22
(3) cDNA clone의 염기서열 분석	27
제 2 절 양분이용효율관련 유전자 분리와 발현 특성.....	34
1. 양분수송자 유전자.....	34
가. 재료 및 방법.....	34
나. 결과 및 고찰.....	36
(1) 인산수송자.....	36
(2) 암모니움수송자.....	52
2. 지질수송단백질 유전자.....	56
가. 재료 및 방법.....	56
나. 결과 및 고찰.....	56
3. 항산화효소 유전자.....	60
가. 재료 및 방법.....	60
나. 결과 및 고찰.....	61
4. 유전자의 식물체 내 기능검정.....	65
가. 재료 및 방법.....	65
나. 결과 및 고찰.....	67
(1) 양분수송자 유전자 형질전환 벼 육성	67

(2) RNA억제(RNAi)에 의한 기능미지 유전자 기능 검정.....	69
제 3 절 양분이용효율 형질의 발현 특성	72
1. 양분결핍에 대한 주요 생육형질의 반응	72
가. 재료 및 방법.....	72
나. 결과 및 고찰.....	72
2. 양분결핍에 대한 Acid phosphatase의 반응.....	76
가. 재료 및 방법.....	76
나. 결과 및 고찰.....	76
3. 양분이 화분발달에 미치는 영향.....	82
가. 재료 및 방법.....	82
나. 결과 및 고찰.....	82
4. 양분결핍에 대한 전체 유전체 발현 반응.....	85
가. 재료 및 방법.....	85
나. 결과 및 고찰.....	85
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	89
제 1 절 목표의 달성도	89
제 2 절 관련분야의 기여도	93
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	95
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	96
제 7 장 참고문헌	97

제 1 장 연구개발과제의 개요

근래의 작물생산체계는 각종 자원의 다량 투입에 의한 대량생산을 기조로 하고 있다. 그러나 작물 재배에 사용한 비료 성분은 생태계 오염원으로 작용하고 있으며(김 등, 1998), 화학비료 생산에 필요한 에너지 자원과 원료도 급속히 고갈되고 있다(EFMA, 1997; FAO, 1998). 또한 OECD에서도 도쿄협약에 의거 각국이 연차적 환경기준치를 설정하여 실행할 것을 의무화하고 있다(OECD, 2001). 이에 따라 환경에 대한 부담을 경감시키고 부존자원의 이용효율을 제고시킬 수 있는 새로운 농법의 필요성이 대두되어 우리나라에서도 저투입 친환경 농법이 일부 시행되고 있다. 더우기 양분결핍으로 인해 벼 재배가 어려운 한계농지가 세계적으로 매년 증가하고 있다.

작물의 생산성과 양분이용효율(NUE, nutrient use efficiency)은 품종개량과 재배법의 개선 측면에서 종합적으로 접근할 필요가 있으나, 현재와 같이 환경보전과 에너지 절감의 설정된 기준을 충족시키면서 필요한 수준의 생산성을 유지하기 위해서는 양분 이용효율이 높은 품종의 개발이 우선적으로 필요하다.

작물의 생산성은 작물이 흡수하는 태양 에너지, 양분과 수분을 수확가능한 생산물로 전환시키는 각종 대사작용간의 상호작용과 각 대사작용의 효율성에 의해 좌우된다. 벼의 경우 질소, 인 등 주요양분은 뿌리의 생육이 왕성한 영양생장기 중에 활발히 흡수하고 생식생장기 중에는 뿌리의 노화 등으로 흡수량이 현저히 저하된다(이, 1994). 그러므로 생식생장기 중 저장기관의 생성 및 저장양분의 합성에 필요한 영양분은 많은 부분 영양기관에 저장된 양분으로 공급된다. 따라서 벼의 NUE는 1) 뿌리의 양분 흡수효율, 2) 흡수된 양분의 동화효율 그리고 3) 저장 양분의 이용효율에 관여하는 요인이 관여하여 결정된다. 그러나 이들 요인 중 양분흡수효율이 NUE의 일차적 제한 요인으로 작용하고 있다.

현재 국내외에서는 고전적, 계량적 방법에 의한 NUE관련 생리, 육종연구가 단편적으로 이루어지고 있다. 그러나 NUE관련 형질의 생리적 유전적 특성은 결국 관련 유전자의 발현조절에 의해 결정된다. 따라서 NUE, 특히 양분흡수효율에 관여하는 유전자에 대한 체계적이고 종합적인 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 NUE관련 형질개량에 필요한 기반 정보와 재료를 확보하기 위하여 양분조건에 특이적으로 조절되는 유전자를 탐색하고 선발된 유전자에 대한 구조와 기능 검정을 실시하였다. 구조와 기능이 검정된 일부 유전자에 대해서는 식물체 기능을 조사하고자 형질전환체를 작성하였다. NUE에는 다수의 유전자가 관여하므로 다수유전자를 대상으로 양분조건에 대한 발현조절 특성을 조사하여 NUE에 관여하는 유전자에 대한 생물정보학적 정보와 재료를 확보하고자 하였다.

제 2 장 국내외 연구개발 현황

1. 국내외 연구개발 현황

벼의 양분이용 효율에 관한 연구는 1980년대부터 국제미작연구소를 중심으로 주로 벼품종 개량연구가 수행되고 있으며, 우리나라에서는 1990년대 후반부터 양분흡수 및 이용효율의 품종간 차이와 유전력 평가, 그리고 관행의 육종기술을 이용한 품종선발과 개량연구가 제한적으로 수행되고 있다.

양분흡수 및 이용효율은 벼의 수량성에 크게 영향을 미치며(Inthapanya et al., 2000), 질소와 인산의 경우 흡수 및 이용효율의 유전적 변이가 비교적 커서(고, 1998; Inthapanya et al., 2000; Lafitte, 1998) 양분이용 고효율 품종육성 가능성이 비교적 높은 것으로 밝혀지고 있다(고, 1998; 박, 2000; Inthapanya et al., 2000; Tirol-Padre et al., 1996).

분자표지를 이용한 양분흡수 및 이용효율관련 QTL 지도작성 연구도 제한적으로 진행되고 있으며 질소와 인산의 흡수 및 이용과 관련된 QTL이 일부 밝혀지고 있다 (Chaubey et al., 1994; Wissuwa et al., 1998; Yamaya, 1999).

양분이용 효율과 관계가 깊은 생리적 형질들도 밝혀지고 있다. 질소 이용효율은 수확기 벧짚의 질소 함량 및 종실의 질소 함량과 높은 부의 상관성이 있다(고, 1998; Tirol-Padre et al., 1996). 또한 질소 이용효율이 높은 품종은 1수립수가 많고 조고비율이 높으며(고, 1998) 질소 흡수량과 흡수질소를 종실생산에 이용하는 비율이 높은 것으로 나타나고 있다 (Tirol-Padre et al., 1996). 따라서 양분이용 고효율 품종 육성시 양분이용 효율과 상관성이 높은 형질을 간접 선발지표로 사용하여도 비교적 높은 수준의 선발효과가 있을 것으로 평가되고 있다(고, 1996; 박, 2000).

양분이용 효율은 양분의 흡수와 체내이용 효율이 종합적으로 나타난 결과이므로 양분의 흡수효율과 생식생장기 동안의 영양기관에 저장되어 있는 양분의 재이용효율이 관여하게 된다. 그러나 양분이용 효율은 양분흡수 효율에 의해 1차적인 제한을 받게 된다. 따라서 최근 양분흡수 과정을 이해하기 위한 분자적 접근이 활발해지고 있다.

그 결과 작물의 양분흡수에 관여하는 수송자 유전자가 분리되면서 양분흡수기작의 일부가 분자수준에서 밝혀지고 있다. 이에 따라 양분수송자 유전자를 이용하여 양분흡수 효율을 개선하기 위한 분자적 접근법이 시도되고 있다(Hirsch & Sussman, 1999). 벼의 암모니아태질소 수송자와 질산태질소 수송자(Forde, 2000; Howitt et al., 2000)를 비롯하여 여타 수송자 유전자의 일부가 분리되었고, 벼 이외의 작물에서도 여러 종류의 양분수송자가 분리되고 있다 (Raghothama, 2000).

그러나 국내에서의 식물의 양분흡수 및 이용에 관한 분자생물학적 연구가 거의 진행되지 않고 있는 실정이다.

2. 문제점

현재 벼를 대상으로 수행되고 있는 양분이용 효율 증진연구는 유전자원 탐색, 유전력 검정, 교잡 및 선발을 통한 계통 육성과 같은 전통적 방법을 이용하는 연구가 주를 이루고 있으며 그나마 매우 제한적으로 진행되고 있다. 전통적 생리, 육종 연구를 통하여 양분이용 효율과 관련된 생리적 형질이 일부 알려지고 있으나, 이들 형질의 분자적 특성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

한편, 양분이용 효율은 흡수, 동화, 재이용 등의 단계에 의해 결정되므로 양분이용효율 개선을 위해서는 각 단계에 대한 종합적 연구가 필요할 것이다. 그러나 가용 연구재원과 시간적 요인을 고려하여 중요한 단계와 관련인자에 대한 선별과 심층적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한, 우리나라의 벼에 대한 식량의존도와 벼 재배에 사용되는 비료에 의한 환경오염과 훼손 문제의 심각성을 감안하여 국내에서의 벼 양분이용효율에 관한 분자수준의 연구의 활성화가 필요하다.

3. 앞으로의 전망

벼의 생육에는 질소 인을 비롯한 다량 요소와 미량 요소의 양분이 필요하다. 매년 현재 지구 인구의 1.2%에 해당하는 7천7백만명씩 증가하는 인구(UN, 2000)를 부양하기 위해서는 안정적 식량의 확보가 필요하다. 토양침식 및 과도한 경작에 의한 양분결핍으로 벼의 재배가 어려워지는 문제도양도 아시아 지역을 중심으로 매년 증가하고 있다.

작물 재배시 화학비료의 사용은 여전히 수량증대에 매우 효과적인 방법이며 아시아의 벼생산에 사용되는 화학비료량은 1992년 현재 연간 약 4,300백만톤에 달하며 매년 약 3.4%씩 증가하고 있다 (Pingali et al., 1998). 그러나 작물재배에 사용한 화학비료에 의한 환경파괴와 비료 자원의 고갈 문제의 심화 및 소득수준 향상에 의한 환경의 중요도 인식 등으로 양분이용 고효율 작물에 대한 필요성은 점점갈 것으로 전망된다. 2000년 현재 우리나라의 벼 재배시 10a당 투입되는 경영비의 약 9%가 비료대금이므로 양분이용 고효율 벼의 육성을 통하여 농가의 소득 증대에 기여가 가능하다.

따라서 본 연구는 양분의 흡수 및 이용 기작에 대한 분자수준의 이해증진과 양분이용효율 개선에 필요한 유용유전자의 확보 및 이용을 통한 양분이용 고효율 작물의 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 양분이용효율관련 유전자 탐색

벼의 양분이용 효율 개선에 이용할 유용유전자의 개발을 목적으로 양분 결핍조건에서 차별적 발현을 보이는 유전자 전사체를 탐색하였다.

1. 목표 유전자의 발현 유도

수경재배 양액 중의 양분성분을 조절함으로써 탐색 목표 유전자의 발현을 유도하였다. 질소이용 고효율 품종(다산벼)을 국제미작연구소의 표준수경재배 조건(Yoshida et al., 1976)으로 재배하고 이유기와 분얼 초기에 양분결핍처리를 실시하였다. Yoshida 용액의 조성은 다음과 같다: NaH_4NO_3 (3.6 mM), NaH_2PO_4 (0.4 mM), K_2SO_4 (1.3 mM), CaCl_2 (1.3 mM), MgSO_4 (2.0 mM), FeCl_3 (44.6 μM), H_3BO_3 (25.0 μM), MnCl_2 (11.0 μM), $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ (0.7 μM), ZnSO_4 (0.2 μM), CuSO_4 (0.2 μM), citric acid (70 μM).

이유기 유식물체를 질소(-N), 인(-P), 칼리(-K), 칼슘(-Ca), 철분(-Fe), 모든양분(TW) 결핍 배양액으로 5일간 처리하여 실험재료로 사용하였다.

분얼초기에 질소 단독 결핍처리(-N)와 모든 양분의 결핍처리(-O)를 실시하며, 결핍처리 3, 5, 7일 후에 정상(+N)과 결핍처리 식물체의 뿌리(RT)와 지상부 조직(SH)을 채취하여 실험에 이용하였다.

2. 양분반응 유전자전사체 탐색

가. 재료 및 방법

(1) Suppressive subtraction hybridization(SSH)

SSH는 Clontech(USA)사의 PCR-Select cDNA Subtraction Kit을 이용하여 제조회사의 사용설명서에 따라 실시하였다. 정상 양분조건과 모든 양분 결핍조건에서의 처리 3, 5, 7일에 채취한 재료의 mRNA를 동일 비율로 혼합하여 정상조건과 결핍조건 mRNA를 cDNA로 역전사시켜 각각 driver와 tester로 이용하여 전방향과 역방향 subtraction을 실시하였다 (Fig. 1). Subtraction한 cDNA와 subtraction하지 않은 cDNA를 cloning하여 dot-blot hybridization과 random sequencing을 실시하였다.

(2) 임의서열 primer와 RT-PCR을 이용한 유전자 전사체 탐색

질소(-N), 인(-P), 칼리(-K), 칼슘(-Ca), 철분(-Fe), 모든양분(TW) 결핍 배양액으로 5일간 처리한 이유기 벼식물체의 조직으로부터 상법에 따라 total RNA(RNA-Tri-reagent 이용, MRC, USA)와 mRNA(mRNA-Oliotex mRNA mini kit)를 준비하였다. cDNA는 GeneFishing DEG Kits(Seegene, USA)을 이용하여 실시하였으며 사용한 primer는 표 1과 같다. 차별증폭된 단편(Fig. 2)을 cloning(pGEM-T Easy Vector System 1, Promega,

USA)하였다. 임의 선발한 단리체의 Dot blot과 Northern blot을 제작하고 Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Bioscience, UK)을 이용하여 발현양상을 조사하였다.

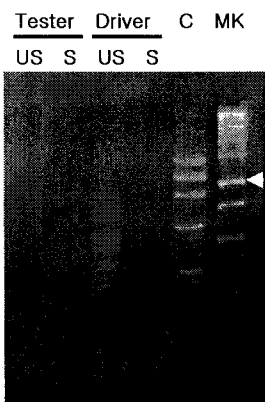


Fig. 1. A representative results from SSH. Secondary PCR products of unsubtracted (US) and subtracted (S) tester (all nutrients deficiency) and driver (control) cDNAs. C, positive control; M, 1 kb molecular weight marker. The 1 kb fragment is marked by a arrow head.

Table 1. Arbitrary ACP primers used for transcripts amplification

Primer name	Sequence	Primer name	Sequence
ACP1	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3'	ACP11	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3'
ACP2	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3'	ACP12	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3'
ACP3	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCGGAGGATG-3'	ACP13	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTTCACCGC-3'
ACP4	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3'	ACP14	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3'
ACP5	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGTGCGCTCG-3'	ACP15	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCACCGTGTG-3'
ACP6	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3'	ACP16	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGTCGACGGTG-3'
ACP7	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3'	ACP17	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCCACG-3'
ACP8	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3'	ACP18	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3'
ACP9	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3'	ACP19	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3'
ACP10	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3'	ACP20	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3'

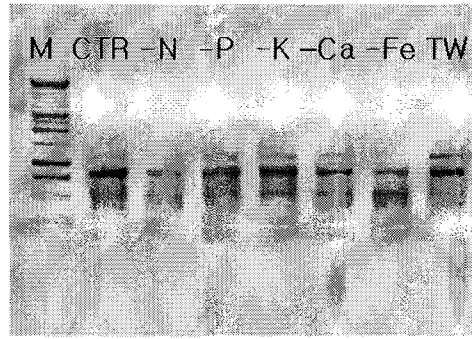


Fig 2. Representative RT-PCR products using the arbitrary primer ACP18. M: marker. CTR, control; -N, -P, -K, -Ca, -Fe and TW; nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, iron and all mineral nutrient deficiency, respectively.

(3) cDNA clone 염기서열 분석에 의한 탐색

(가) 식물재료 및 시약

동진벼 종자를 스포탁 유제(Hankooksamgong, Korea)를 이용하여 24시간 소독한 다음 흐르는 수돗물에서 약 4시간 세척하고 25°C에서 2일간 최아시킨 후 파종하였다. 재료 육성은 Yoshida수경액이 담긴 플라스틱 포트(385 × 465 × 245 mm)를 이용하여 스티로폼에 직경 15 mm의 구멍을 뚫고 플라스틱 망으로 지지한 후 포트당 80주(8 × 10)씩 육성하였으며, 매일 pH를 5.0으로 조정하고, 기포 발생기를 설치하여 뿌리에 산소 공급이 균일하도록 유도하였다. cDNA library 제작은 ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning kit (Stratagene, USA)를 이용하여 수행하였다.

(나) mRNA 분리 및 cDNA 합성

파종 후 3주간 Yoshida 양액에서 육성한 후, 인산이 제외된 Yoshida 양액에서 5일간 처리하여 얻은 재료를 재료로 사용하였다. 뿌리에서 분리된 total RNA에서 정제된 mRNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 5 µg의 mRNA를 이용하여 Stratagene (USA)의 사용법에 의해 1st strand cDNA와 2nd strand cDNA를 합성하였다. 2nd strand cDNA의 합성 여부는 alkaline buffer (30 mM NaOH, 2 mM EDTA)로 1.0% alkaline agarose gel을 만들고, Mini-Protean II (Bio-Rad, USA) 장치를 이용하여 30V에서 3시간 동안 전기영동한 후 0.5 µg/ml EtBr로 염색하여 확인하였다.

(다) cDNA ligation 및 packaging

Uni-ZAP XR vector (Stratagene, USA)에 cDNA를 ligation하기 위하여 100 ng cDNA, Uni-ZAP XR vector 및 해당 시약을 혼합한 후 4°C에서 2일간 반응시켜 Uni-ZAP XR 재조합 벡터를 만들었다. Packaging은 ligation된 DNA와 Gigapack III Gold Packaging extract (Stratagene, USA)을 섞어 상온에서 2시간 반응한 후, 500 µl SM buffer와 20 µl

chloroform을 첨가하여 반응을 종료하였다. cDNA library의 역가는 SM buffer 안의 lambda phage를 SM buffer를 이용하여 농도별로 희석하고, 그중 1 μ l와 200 μ l XL1-Blue MRF'를 섞어 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 0.5 M IPTG, 50 mg/ml X-gal이 포함된 NZY top agar에 배양액을 첨가하고 NZY agar plate에 부은 후 37°C에서 8시간 배양하여 산출하였다.

(4) 염기서열 분석, Northern blot 및 Southern blot 분석

염기서열 결정은 염기서열분석 전문회사에 의뢰하여 실시하였으며, 염기서열 결정 반응은 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 진행하였다. 결정된 염기서열의 구조적 특성은 GenBank(NCBI, USA)와 ExPASY(SIB, Switzerland)에서 제공하는 프로그램을 이용하여 분석하였다.

Total RNA는 TRI reagent(MRC, USA)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법에 의하여 분리하였다. 분리된 total RNA의 순도는 OD₂₆₀과 0.5 μ g/ml EtBr이 포함된 1.0% formaldehyde 젤에서의 전기영동 결과를 이용하여 결정하였다.

Northern 분석은 20 μ g의 total RNA를 1.0% formaldehyde 젤에서 40V로 3시간 전개하여 Southern(1975)의 방법으로 RNA를 전이시킨 nylon membrane(Hybond N⁺, Amersham, UK)을 이용하여 실시하였다. 탐침자의 제작과 잡종화 DNA의 검출은 DIG chemiluminescent nucleic acid labelling kit(Roche, Germany) 또는 AlkaPhos direct labelling and detection system(Amersham-Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 실시하였다. 잡종화 반응은 사용한 검출방법에 적합하도록 제조회사의 사용법에 따라 실시하였다. 잡종화반응 후 membranes을 상온의 2X washing(2X SSC, 0.1% SDS) 용액으로 15분간 2회, 0.1X washing(0.1X SSC, 0.1% SDS) 용액으로 68°C에서 15분간 세척한 후, 상기의 검출 kit 제조회사의 사용설명서에 따라 잡종화된 핵산분자를 검출하였다.

Genomic DNA는 Roger 등(1989)의 방법을 이용하여 추출하였다. 분리한 genomic DNA(10 μ g)를 제한효소로 처리하여 0.8% agarose gel에서 25V, 16시간 전기영동한 후, Northern-blot 분석에서 사용한 방법으로 Southern-blot 분석을 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) Suppressive subtraction hybridization(SSH) clone 선발

(가) 차별발현 유전자전사체 선발

SSH clone 약 1,200종으로 제작한 macroarray를 정상 양분조건과 양분결핍조건의 mRNA로 작성한 cDNA probe로 검색(Fig. 3)하여 각 조건에서 차별적으로 유도되는 119종과 억제 발현되는 130종의 SSH clone을 1차 선발하였다.

양분결핍처리 조건에서 선발된 SSH clone의 기능을 추정하기 위하여 선발된 clone중 53개 clone의 5'말단의 서열을 분석하였다(Table 2). 이중 양분 대사등 대사관련 clone이 14종으로 가장 많았으며 기능 미지의 clone이 12종이었다. 양분이용에 직접 관여하는 clone은 3종으로 다소 낮았는데 이는 양분 이용 효율이 대사조절과 밀접한 관계가 있음을 시사하는 결과로 생각되며 양분이용효율 개선을 위해서는 다양한 유전자의 협동적 조절이 필요할 것으로 생각된다.

<Colony-Macroarray>

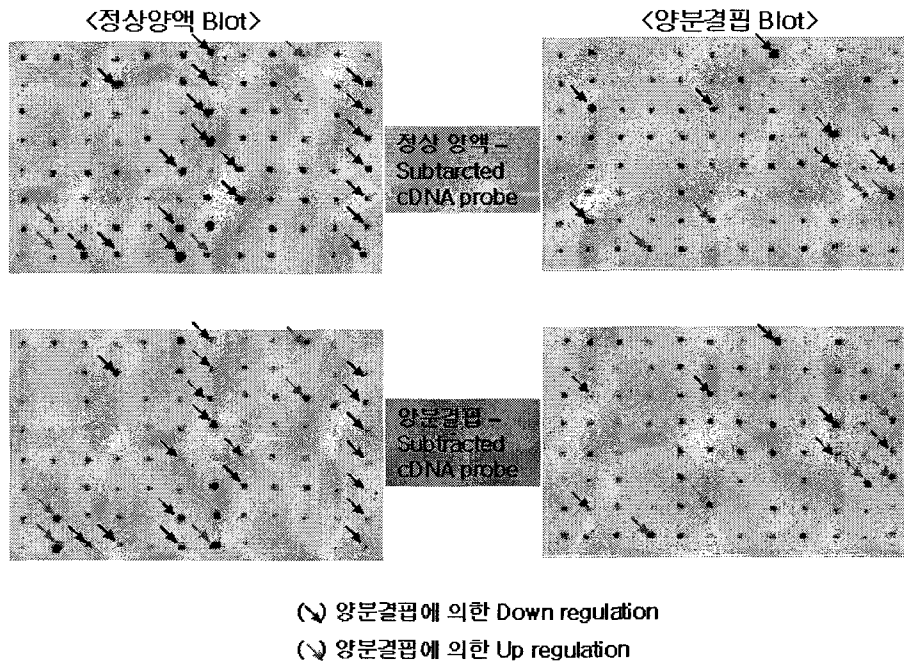


Fig. 3. Screening of SSH clones differentially expressed under different nutrients deficiency conditions.

Table 2. Rice root ESTs derived from SSH clones differentially expressed under nutrient-starved conditions

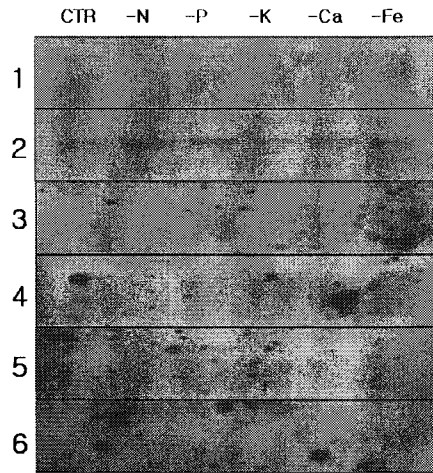
Sort	clone name	Query Length	AC No	Gene	매치 수	총상 수	대개 비율 (%)
Mineral and Organic nutrient - 3종							
T	+ C07	685	BAC01219 1	putative tubby protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	79	117	67
N	- E01	577	P31691	ATP/ADP translocator [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	169	179	94
N	- H06	664	BAB86434 1	similar to phosphate/phosphoenolpyruvate translocator protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	77	110	70
Metabolism - 14종							
T	+ A03	567	AF327055.1	alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	112	112	100
T	+ A05	493	BAB84334.1	UDP-glucuronic acid decarboxylase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	122	122	100
T	+ A11	386	AAM13693 1	endo-1,4-beta-glucanase [Triticum aestivum]	191	91	79
T	+ B02	493	AAN74829 1	Putative flavanone 3-hydroxylase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	311	151	100
T	+ B04	608	AF372831 1	hexokinase I [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	107	107	100
T	+ B12	382	NP_565863 1	putative glutamate/ornithine acetyltransferase [Arabidopsis thaliana]	28	40	70
T	+ C04	344	AB055074 1	phosphoenolpyruvate carboxylase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	94	94	100
T	+ D01	524	BAB16471 1	NADP-specific isocitrate dehydrogenas [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	89	89	100
T	+ D06	736	Q42456	aspartic protease [Oryza sativa]	157	158	99
N	+ E11	427	P31924	2207194A sucrose synthase ISOTYPE=2	128	129	99
N	+ F06	337	BAB12570.1	putative alpha-galactosidase preproprotein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	83	87	95
N	- G01	450	T00421	probable phospholipase [imported] - Arabidopsis thaliana	72	123	58
T	- D10	654	Q4245	aspartic protease [Oryza sativa]	157	158	99
N	- G11	522	BAB39281 1	putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	174	90	92
Stress/resistance -5종							
T	- A09	368	BAC07388 1	putative Rad6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	37 4	16	100
T	+ C08	561	NP_177592 1	putative AtHVA22a protein [Arabidopsis thaliana]	63	96	65
N	- F07	341	BAC56818 1	putative pathogenesis-related protein 1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	67	67	100
N	- F10	371	Q40633	type 1 rice metallothionein-like gene [Oryza sativa]	40	55	72
N	- G02	495	AAB70546 1	metallothionein-like protein [Oryza sativa]	76 3	37	63
Signal transduction/transcription/translation - 9종							
T	+ D02	642	AAL58187 1	AC027037_9 putative retinoblastoma binding protein [Oryza sativa]	66	71	92
T	+ D05	684	BAC22209 1	serine/threonine-protein kinase Mak (male germ cell-associated kinase)-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	102	110	92
T	- D09	649	AAK73147 1	AC079022_20 putative RING-H2 finger protein [Oryza sativa]	79	95	83
N	+ E05	435	AAC78104 1	HMG1 protein [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	52	88	59
N	- F04	487	T02241	acid ribosomal protein P12a [Zea mays]	62	110	56
N	+ F08	677	BAB63829 1	putative Myb factor protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	142	202	69
N	+ G08	376	BAB21218 1	putative DNA binding protein RAV2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	101	123	82
N	- H11	480	AAO48744 1	serine/threonine protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	140	142	98

N	-	H04	433	AAC78104.1	HMG1 protein [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	53	88	60
Cytoskeletal/Structure - 3종								
T	-	A12	388	BAC20797.1	contains EST AU173803(R3795)~integral membrane protein-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	105	106	99
T	-	D08	754	T03299	expansin Os-EXP3 [Oryza sativa]	76	113	67
N	-	F02	422	T02241	germin-like protein 2 [Oryza sativa]	197	98	93
Other -7종								
T	-	A07	700	BAB16471.1	P0024G09.18 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	133	133	100
T	-	C12	670	BAB16471.1	P0024G09.18 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	123	123	100
N	+	E03	599	BAC64975.1	OJ114_D06.16 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	64	118	54
N	+	G06	636	BAA90498.1	rice ESTs AA754121, AW155454, D48581 correspond to a region of the predicated gene, unknown protein [Oryza sativa]	33	34	97
N	+	G09	681	A71421	AF324722.1 AT4g15610 [Arabidopsis thaliana]	36	123	29
T	-	D07	399	AAL75899.1	At2g43020/MFL8.12 [Arabidopsis thaliana]	71	2	37
T	-	C02	205	AAK73695.1	AF362742.1 succinate dehydrogenase subunit 3 [Oryza sativa]	119	59	95
Unknown -12종								
T	-	B07	258	AAM51838.1	AC105730.12 Unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	29	66	43
T	+	B09	314	AAF05606.1	AF190770.1 EREBP-like protein [Oryza sativa]	45	45	100
T	-	B10	282	NP_771643.1	bl15003 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	19	32	59
T	-	C10	584	BAA96601.1	unnamed protein product [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	72	115	62
T	-	C11	199	NP_197366.1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	37	58	63
T	-	D12	590	BAA96601.1	unnamed protein product [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	72	115	62
N	-	E06	399	NP_564133.1	unknown [Arabidopsis thaliana]	62	104	59
N	-	E09	594	AAM93679.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	138	67	88
N	-	E12	708	AAL67123.1	AT3g06760/F3E22.10 [Arabidopsis thaliana]	50	131	38
N	+	F01	377	AAM93679.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	116	55	98
N	-	F05	377	AAM93679.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	53	55	96
N	-	F11	525	BAC07144.1	hypothetical protein~predicted by GlimmerM etc [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	46	6	20

선발된 clone중 차별발현 정도가 높은 clone에 대한 2차선발을 통하여 양분결핍조건에서 유도되는 clone 26종과 억제되는 clone 40종을 선발하였다. 이들 중 염기서열 분석에 의해 기능이 추정된 조절요소와 에너지 대사에 관여하는 Myb factor, Serine/threonine kinase(STK, 2종), Phosphate/phosphoenolpyruvate translocator(PPEPT), UDP-glucuronate decarboxylase(UDP-GD), sucrose synthase(SS) clone의 양분결핍조건에서의 발현 양상을 조사하였다..

(나) 선발된 유전자전사체의 발현 특성

Myb, STK(2종)와 PPEP, UDP-GD, SS clone의 양분결핍조건에서의 발현 양상을 Northern 분석을 통하여 조사한 결과, STK 1종 이외는 -N, -P, -K, -Ca, -Fe 조건에서의 발현이 증가하였다(Fig. 4).



Lane 1: serine/threonine-protein kinase Mak, 2: Myb factor protein, 3: UDP-glucuronic acid decarboxylase, 4: sucrose synthase, 5: phosphate/phosphoenolpyruvate translocator protein, 6: serine/threonine protein kinase

Fig. 4. Expression of STK(1 and 6), Myb, PPEPT, UDP-GD, and SS clones under various nutrients deficiency conditions. CTR, control; -N, -P, -K, -Ca, -Fe and TW; nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, iron and all mineral nutrient deficiency, respectively.

(2) 임의서열 primer 증폭 유전자전사체 분리

임의서열 primer를 이용하여 증폭된 양분조건에서 차별 발현되는 유전자전사체의 단리체 263종을 dot blot과 표지된 cDNA 전사체를 탐침으로 하여 발현 양상을 조사(역Northern dot blot)하여 1차 선별을 시도하였다(Fig. 5). 역Northern dot blot 결과 164번과 262번 clone이 대부분의 양분결핍조건에서 발현이 감소하였다. 그러나 역Northern dot blot에 의한 차별발현 체 선별효율은 극히 저조하였다. 따라서 단리체를 임의선별하여 3'서열을 결정하여 각 단리체에 해당하는 유전자를 추정하였다(Table 3).

단리체에 대한 역 Northern dot blot과 염기서열 분석결과를 바탕으로 차별발현이 예상된 25종의 전사체의 plasmid DNA를 이용하여 역 Northern blot을 실시하여(Fig. 6) 3 (unknown), 6(lipid transfer protein), 109(metallothionein), 112(unknown), 143(unknown)번 단리체 등 5종의 전사체를 선별하고, 선별된 전사체를 탐침으로 이용하여 Northern blot을 실시하였다(Fig. 7). 지질운반단백질 유전자로 추정된 전사체의 발현은 뿌리에서 질소와 인산 결핍시 발현이 현저히 증가하였다. 반면, 109와 112번 clone의 발현은 잎에서 질소 결핍시 증가하였다. 한편, 3, 109, 112 clone의 발현은 칼륨이나 칼슘결핍시 뿌리에서 감소하였다.

이상의 임의서열 primer 증폭 유전자전사체 탐색을 통한 양분반응 유전자 선별효율은 비교적 저조하였으나, 3(unknown), 6(lipid transfer protein), 109(metallothionein), 112(unknown)번 clone의 양분조건에서의 차별적 발현을 확인하였다.

Table 3. Sequences of the transcripts amplified using the arbitrary primers and differentially expressed under nutrient deficiency

Clone No.	Length	Start	AC	Gene
3	297			No hits
6	377	32	NP_922663.1	putative lipid transfer protein [Oryza sativa (japonica
9	747	32	P90519 EF1A_CRYPV	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA (EF-1-ALPHA)
11	368			No hits
13	475	29	S53126	dnaK-type molecular chaperone hsp70 - rice (fragment)
15	271			No hits
35	522			No hit
40	453	30	NP_908602.1	B1011A07.25 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
47	606			No hits
48	270			No hits
52	437	30	NP_908602.1	B1011A07.25 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
54	358	30	NP_908602.1	B1011A07.25 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
55	437	30	NP_908602.1	B1011A07.25 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
57	803	716	NP_912914.1	unnamed protein product [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
58	689	277	CAE04444.2	OSJNBa0018J19.11 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
63	451	23	NP_908699.1	putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
64	412	29	NP_908699.1	putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
73	448	29	NP_908699.1	putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
74	620	592	NP_200323.1	expressed protein [Arabidopsis thaliana]
75	580	46	XP_329092.1	hypothetical protein [Neurospora crassa]
92	692	692	P04353	Calmodulin
101	650	22	BAC20790.1	putative zinc finger POZ domain protein [Oryza sativa (japonica
103	630	32	NP_915593.1	putative beta-1,3-glucanase [Oryza sativa (japonica
105	796	22	BAC20790.1	putative zinc finger POZ domain protein [Oryza sativa (japonica
109	554	525	AAB70546.1	metallothionein-like protein [Oryza sativa]
112	653	525	AAB70546.1	metallothionein-like protein [Oryza sativa]
113	652			No hits
114	539	510	AAB70546.1	metallothionein-like protein [Oryza sativa]
115	601	2	AAP50956.1	putative allene oxide synthase [Oryza sativa (japonica
118	627	572	EAA18424.1	S-adenosylmethionine synthetase [Plasmodium yoelii yoelii]
119	675	24	CAD41525.3	OSJNBb0020011.6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
127	566	52	BAC05572.1	B1097D05.23 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
128	787	33	NP_922832.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
129	597	596	NP_922764.1	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
130	694	692	NP_922764.1	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
131	627	22	NP_922764.1	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
134	431	417	NP_199917.1	expressed protein [Arabidopsis thaliana]
143	408	47	BAC80125.1	putative beta-1,3-glucanase precursor [Oryza sativa (japonica
158	384	47	BAC80125.1	putative beta-1,3-glucanase precursor [Oryza sativa (japonica
160	366	30	BAC80125.1	putative beta-1,3-glucanase precursor [Oryza sativa (japonica
161	368	30	BAC80125.1	putative beta-1,3-glucanase precursor [Oryza sativa (japonica
162	287			No hits
173	734	39	AAS07165.1	putative symbiotic ammonium transport protein [Oryza sativa
175	305			No hits
179	725	75	AAN74829.1	Putative flavanone 3-hydroxylase [Oryza sativa (japonica
182	707	130	NP_914551.1	putative 60S acidic ribosomal protein P2A [Oryza sativa (japonica
184	504	122	NP_914551.1	putative 60S acidic ribosomal protein P2A [Oryza sativa (japonica
185	740	147	NP_914551.1	putative 60S acidic ribosomal protein P2A [Oryza sativa (japonica
192	524	22	BAC98663.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
204	579	333	AAN05491.1	Putative bHLH transcription protein [Oryza sativa (japonica
205	485	3	AAP85544.1	putative DIM-like protein [Glycine max]
208	479	29	I205208A	heat shock protein hsp70
211	254			No hits
212	323	33	AAG32475.1	putative glutathione S-transferase OsGSTF5 [Oryza sativa subsp
215	365	59	NP_919341.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
218	529	20	NP_909783.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

219	616	69	NP_917147.1	P0004A09.25 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
221	532	23	NP_909783.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
222	539	30	NP_919341.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
223	415	30	NP_919341.1	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
225	407	405	AAL67839.1	putative ubiquitin [Pinus pinaster]
230	401			No hits
235	508	28	NP_176927.1	F12A21.27 [Arabidopsis thaliana]
237	508	28	NP_176927.1	F12A21.27 [Arabidopsis thaliana]
256	566	550	NP_908744.1	putative lipase homolog [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
261	336	29	NP_565968.1	expressed protein [Arabidopsis thaliana]
262	424	393	Q42443	Thioredoxin H-type (TRX-H) (Phloem sap 13 kDa protein-1)
263	382	29	NP_565968.1	expressed protein [Arabidopsis thaliana]
264	400	29	NP_565968.1	expressed protein [Arabidopsis thaliana]

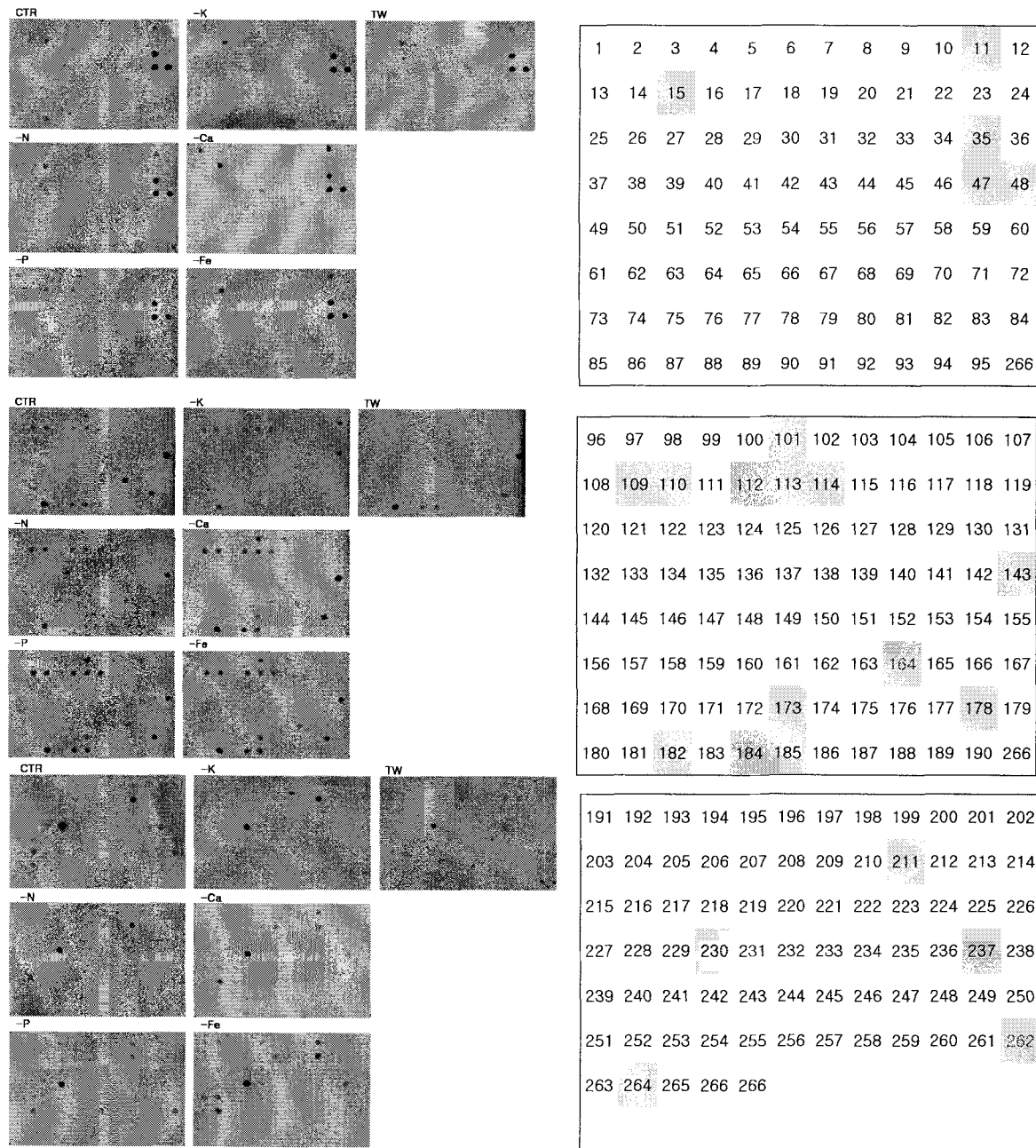


Fig 5. Reverse Northern dot blotting analysis for the differentially expressed sequences under various nutrients deficiencies. CTR, control; -N, -P, -K, -Ca, -Fe and TW; nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, iron and all mineral nutrient deficiency, respectively.

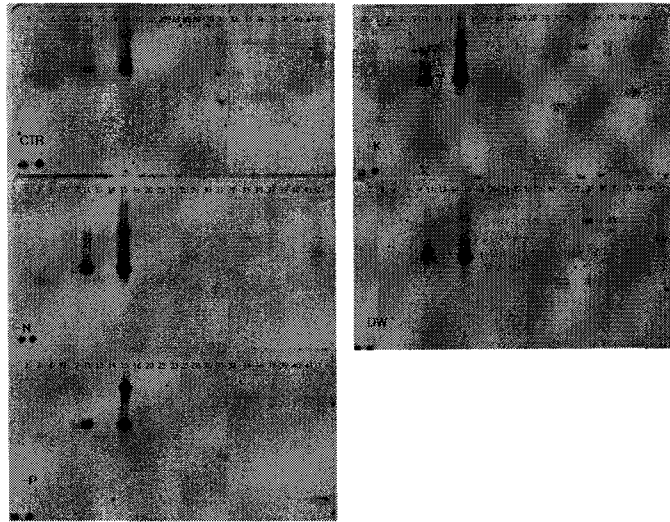


Fig. 6. Reverse Northern analysis of differentially expressed genes under various nutrients deficiencies. CTR, control; -N, -P, -K, and TW; nitrogen, phosphorus, potassium, and all mineral nutrient deficiency, respectively.

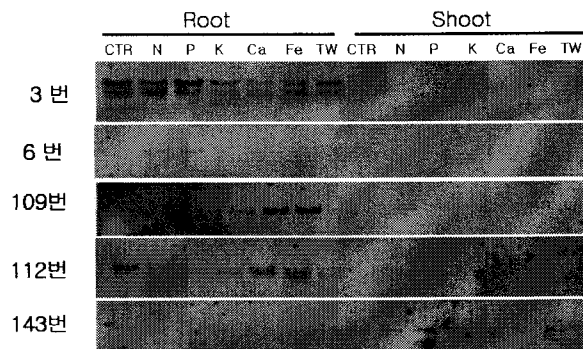


Fig 7. Northern blotting analysis of differentially expressed genes under various nutrients deficiencies. CTR, control; -N, -P, -K, -Ca, -Fe and TW; nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, iron and all mineral nutrient deficiency, respectively.

(3) cDNA clone의 염기서열 분석

인산결핍처리 이유기 벼 식물체의 뿌리에서 추출한 mRNA를 이용하여 구축한 cDNA library의 초기 역가는 약 1.2×10^5 pfu/ml, insert frequency는 70%, insert size는 평균 1.2 kb, 증폭한 library의 역가는 약 1.0×10^{10} pfu/ml이었다. Mass excision에 의해 얻은 colony 중 290 종을 선발하여 추출한 clone의 5' 말단 서열을 결정하고 염기서열과 아미노산 서열을 GenBank 유전자 서열 DB를 이용하여 분석하였다. 분석결과는 표 4와 같으며, 무기양분관련 유전자 19종, 뿌리 특이적 유전자, 9종, 유전자 발현 및 발현 조절요소 유전자 38종 등 총 253 종의 EST를 확보하였다. 기능이 추정되는 clone 중 12종(2-B3, 2-G4, 2-H2, 2-H4, 3-A5, 3-C6, 3-C8, 3-C10, 3-D12, 3-G5, 4-B2, 4-F2)은 완전한 ORF를 포함하였다.

무기양분관련 유전자 중에는 인산수송자, 암모니움수송자, 칼리수송자, 칼슘통로, 피로인산 및 유기인산 가수분해효소, 질소결핍시 유도되는 유전자, 이온통로 등의 clone이 포함되어 있다. 또한 뿌리의 근모와 근단에서 발현되는 조절요소 유전자 clone 등이 포함되어 있다. 이들 clone은 식물의 무기영양에 대한 분자수준의 이해와 양분이용효율 개량에 필요한 유용 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 유전자 탐색결과는 양분결핍처리 cDNA library clone의 염기서열 분석 방법이 초기의 양분이용효율관련 유전자 탐색에 가장 효과적임을 나타내었다.

Table 4. Rice root ESTs putatively identified by the database search

EST clone number	Length (bp)	Sequences producing significant alignments	Organism	LC*	%ID	Acc No	BD
Mineral and organic nutrition 18종							
RRMP-1-B1	880	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase isozyme 4	Spinacia oleracea	153	77	CAB43602	GB
RRMP-1-C2	792	Putative trehalose-6-phosphate phosphatase	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	53	100	BAB63762	GB
RRMP-1-D6	865	Histidine-containing phosphotransfer protein	Zea mays	82	53	BAA84993	GB
RRMP-1-H10	930	Potassium transporter HAK3p	Mesembryanthemum crystallinum	89	80	AAK53760	GB
RRMP-2-B12	665	Two-pore calcium channel	Arabidopsis thaliana	88	29	BAB55460	GB
RRMP-2-B9	864	Calcium-binding protein	Caenorhabditis elegans	56	41	NP_492837	GB
RRMP-2-C4	800	Blue copper-binding protein homolog	Triticum aestivum	107	61	AAD10251	GB
RRMP-2-C6	811	Voltage-dependent anion channel	Oryza sativa	202	92	CAC80850	GB
RRMP-2-D7	871	Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1), H ⁺ -translocating, vacuolar membrane (clone OVPI)	Oryza sativa	127	88	S72526	GB
RRMP-3-A10	852	Protein phosphatase - like	Arabidopsis thaliana	124	69	NP_568503	GB
RRMP-3-B12	858	Soluble inorganic pyrophosphatase (Pyrophosphate phospho-hydrolase)(PPase)	Zea mays	211	92	O48556	GB
RRMP-3-C9	854	Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase	Arabidopsis thaliana	150	70	NP_567742	GB
RRMP-3-D9	834	Protein phosphatase 2C	Arabidopsis thaliana	124	69	BAB84697	GB
RRMP-3-F11	553	Required for invasion and pseudohyphae formation in response to nitrogen starvation, Muc1	Saccharomyces cerevisiae	64	34	NP_012284	GB
RRMP-4-C3	877	Phosphate-induced (phi-1) protein, putative	Arabidopsis thaliana	66	53	NP_174746	GB
RRMP-4-D3	916	Histidine-containing phosphotransfer protein	Zea mays	123	89	BAA82874	GB
RRMP-4-H2	1684	Ammonium transporter 1-1	Oryza sativa	183	63	AAL05612	GB

RRMP-4-H3	1758	Phosphate transporter	Oryza sativa	344	88	AAF42956	GB
Metabolism	1835						
RRMP-1-D10	932	Probable carbonate dehydratase (EC 4.2.1.1), chloroplast	Oryza sativa	111	86	T03254	GB
RRMP-1-F3	918	Glyoxalase II	Oryza sativa	64	85	AAL14249	GB
RRMP-2-C11	922	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, cytosolyc	Oryza sativa	86	70	P08477	GB
RRMP-2-C5	904	Alcohol dehydrogenase-like protein	Arabidopsis thaliana	70	54	BAB01222	GB
RRMP-2-E4	801	Fructose-1,6-bisphosphatase	Porteresia coarctata	264	85	AAF23509	GB
RRMP-2-G9	868	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, cytosolyc	Oryza sativa	175	100	Q42977	GB
RRMP-2-H12	841	UDP- glucose 4- epimerase GEPI48 (Galactowaldenase) (UDP- galactose 4- epimerase)	Cyamopsis tetragonoloba	247	72	O65781	GB
RRMP-3-B5	845	Cyanogenic Beta-Glucosidase MolLid 1; Molecule. Cyanogenic Beta-Glucosidase, Chain Null. Ec 3.2.1.21	Trifolium repens	152	73	1CBG	GB
RRMP-3-H10	825	UDP- glucuronic acid decarboxylase	Oryza sativa (japonica cultivar- group)	215	93	BAB84333	GB
RRMP-1-H4	839	Polyphosphoinositide binding protein	Arabidopsis thaliana	133	69	NP_175980	GB
RRMP-2-B2	790	Choline kinase (EC 2.7.1.32) CK3	Glycine max	156	67	T08817	GB
RRMP-2-C1	509	Carnitine/acylcarnitine translocase-like protein	Arabidopsis thaliana	106	70	BAB08924	GB
RRMP-3-B6	857	Lipoic acid synthase (LIP1)	Arabidopsis thaliana	152	73	1CBG	GB
RRMP-3-D8	845	Phospholipase D beta 2	Oryza sativa	249	72	AAL78821	GB
RRMP-3-H7	840	Patatin-like protein	cucumber (fragment)	92	75	T10260	GB
RRMP-4-B2	830	Fatty acid alpha-oxidase	Oryza sativa	225	88	AAF64042	GB
RRMP-4-F3	896	Acetyl- CoA carboxylase	Zea mays	291	75	AAK62313	GB
RRMP-1-F10	931	Threonine 3- dehydrogenase	Deinococcus radiodurans	25	60	NP_295385	GB
RRMP-2-A2	822	Bowman Birk trypsin inhibitor	Oryza sativa	209	65	CAB88209	GB
RRMP-2-A6	832	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	Homo sapiens	232	70	XP_046457	GB
RRMP-2-D4	827	Glutamine- dependent asparagine synthetase 1	Hordeum vulgare	129	64	AAK49456	GB
RRMP-3-A7	829	Gamma- aminobutyrate transaminase subunit precursor	Arabidopsis thaliana	233	72	AAK52899	GB
RRMP-3-B9	807	Probable protein disulfide- isomerase (EC 5.3.4.1) precursor	Nicotiana tabacum	203	64	T03644	GB
RRMP-3-E11	891	Serine acetyltransferase	Allium cepa	184	80	AAF19000	GB
RRMP-3-E5	732	Glutamine synthetase shoot isozyme (Glutamate- ammonia ligase) (Clone lambda-GS28)	Oryza sativa	92	100	P14656	GB
RRMP-3-G3	812	Glycine dehydrogenase	Yersinia pestis	69	27	NP_404523	GB
RRMP-4-A3	897	Diaminopimelate decarboxylase - like protein	Arabidopsis thaliana	206	78	NP_568252	GB
RRMP-1-A6	847	Rad6	Oryza sativa (japonica cultivar- group)	142	100	BAB85469	GB
RRMP-1-D3	889	DnaJ protein homolog ZMDJ1	Zea mays	98	86	T01643	GB
RRMP-1-H9	868	Ribonuclease II RNB family protein, dis3- like	Schizosaccharomyces pombe	268	40	NP_5945107	GB
RRMP-2-H10	861	Pseudouridine synthase 1	Mus musculus	71	35	AAH21446	GB
RRMP-1-B11	910	Putative N- hydroxycinnamoyl /benzoyl transferase	Oryza sativa	119	85	CAC09504	GB
RRMP-1-H12	853	Phenylalanine ammonia- lyase	Oryza sativa (indica cultivar- group)	178	86	P53443	GB
RRMP-1-H6	865	Methylmalonyl- coA mutase	Caenorhabditis elegans	145	67	NP_497786	GB
RRMP-2-D8	840	Flavonoid 3'- hydroxylase	Pelargonium x hortorum	206	34	AAG49315	GB
RRMP-2-G10	853	Polyphenol oxidase	Malus x domestica	63	37	BAA21676	GB
RRMP-3-E4	805	Farnesylated protein ATFP6- like protein	Arabidopsis thaliana	153	50	NP_197247	GB
RRMP-4-E3	864	Flavanone 3- hydroxylase- like protein	Arabidopsis thaliana	139	63	NP_197841	GB
RRMP-4-G1	894	Nicotianamine synthase 2	Oryza sativa (indica cultivar- group)	154	89	BAB17823	GB
RRMP-1-A9	768	ATP synthase F0 subunit 6	Balanoglossus carnosus	184	29	NP_008398	GB
RRMP-1-G11	932	Aconitate hydratase, cytoplasmic (citrate hydro- lyase) (aconitase)	Cucurbita maxima	130	72	P49608	GB

RRMP-2-E5	853	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (V-ATPase A subunit)(Vacuolar proton pump alpha subunit) (V-ATPase 69 kDa subunit)	Daucus carota	107	93	P09469	GB
RRMP-2-E8	811	Transaldolase - like protein	Arabidopsis thaliana	265	80	NP_196846	GB
RRMP-2-F3	820	Vacuolar ATP synthase subunit C, putative	Arabidopsis thaliana	223	77	NP_563916	GB
RRMP-2-F9	846	Alternative oxidase	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	218	60	BAA28772	GB
RRMP-2-G4	831	Malate dehydrogenase, glyoxysomal precursor	Oryza sativa	285	83	Q42972	GB
RRMP-3-C7	706	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein (CR14)	Solanum tuberosum	123	71	P48502	GB
RRMP-3-D1	789	NAD dependent epimerase, putative	Arabidopsis thaliana	147	66	NP_189024	GB
RRMP-4-D1	797	Probable 2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (EC 4.1.2.15) 2, chloroplast	Petroselinum crispum	264	86	T14898	GB
Stress Resistance - 11							
RRMP-1-A3	827	Probable peroxidase (EC 1.11.1.7) (clone PC44)	Spinacia oleracea	160	45	T09164	GB
RRMP-1-C4	970	Heat shock cognate protein 80	Lycopersicon esculentum	80	88	P36181	GB
RRMP-1-E11	903	Putative glutathione S-transferase OsGSTU3	Oryza sativa subsp. Japonica	119	86	AAG32472	GB
RRMP-1-E3	851	Acidic pathogenesis-related protein 1a precursor	Oryza sativa	55	69	JC7330	GB
RRMP-2-F2	814	Polyamine oxidase, putative	Arabidopsis thaliana	245	44	NP_176759	GB
RRMP-2-F5	630	Metallothionein-like protein 1	Oryza sativa	57	71	Q40633	GB
RRMP-3-B8	886	Bacterial blight-resistance protein Xal	Oryza sativa	260	40	T00020	GB
RRMP-3-C11	836	Heat shock protein 91	Arabidopsis thaliana	278	70	S74252	GB
RRMP-3-C8	836	Glutathione S-transferase GST 30	Zea mays	205	55	AG34838	GB
RRMP-3-G7	877	Beta-1,3-glucanase (EC 3.2.1.-) precursor [imported]	Oryza sativa	183	54	T50563	GB
RRMP-4-D2	646	Similar to Solanum tuberosum c21A gene product encoded GB Acc Number U76610	Solanum tuberosum	50	36	AAD00255	GB
Signal transduction/transcription translation - 38							
RRMP-1-G10	909	Polyadenylate-binding protein	Triticum aestivum	120	85	T06979	GB
RRMP-1-A2	828	Putative receptor protein kinase-like protein	Oryza sativa?	252	31	BAB63567	GB
RRMP-1-C5	914	APETALA2 protein homolog HAP2	Hyacinthus orientalis	120	59	AAD22495	GB
RRMP-1-D2	822	Regulator protein ROM2	Phaseolus vulgaris	105	27	T10985	GB
RRMP-1-F5	849	Serine/threonine kinase -like protein	Arabidopsis thaliana	159	42	NP_567679	GB
RRMP-1-H7	1017	Calcium-dependent protein kinase-related kinase	Zea mays	142	84	T01694	GB
RRMP-2-C8	834	Contains similarity to ATP binding protein associated with cell differentiation gene_id K1F136	Arabidopsis thaliana	165	67	BAB10917	GB
RRMP-2-E11	871	Probable G-box binding factor 8	Oryza sativa	220	90	T03373	GB
RRMP-2-F7	858	ARG1 protein (Altered Response to Gravity)	Arabidopsis thaliana	54	51	NP_177004	GB
RRMP-2-G6	832	ESTs D41739(S4522),AU055999(S20214), AU057588(S21592) correspond to a region of the predicted gene "Similar to Sorghum bicolor serine/threonine kinase (Y12465)	Oryza sativa (japonica)	189	76	BAA96628	GB
RRMP-2-H3	832	Chaperonin gamma chain - like protein	Arabidopsis thaliana	208	74	NP_198008	GB
RRMP-3-C3	815	Photolyase/blue-light receptor (PHR2)	Arabidopsis thaliana	107	58	NP_182281	GB
RRMP-3-D5	770	LIM homeobox protein 5	Danio rerio	69	30	NP_571293	GB
RRMP-3-E2	856	Glutathione-s-transferase, putative	Arabidopsis thaliana	143	62	NP_176758	GB
RRMP-3-E8	814	Calmodulin-binding protein TCB60	Nicotiana tabacum	264	37	T03793	GB
RRMP-3-F5	1004	Protein kinase, putative	Arabidopsis thaliana	46	41	NP_177036	GB
RRMP-3-F6	882	DNA-binding protein 100K chain	Homo sapiens	53	39	S29770	GB
RRMP-3-F8	869	RNA binding protein	Elaeis oleifera	210	47	AAL76994	GB
RRMP-4-A4	822	EF-hand Calcium binding protein-like	Arabidopsis thaliana	183	84	CAC05499	GB
RRMP-4-B4	885	Brassinosteroid insensitive 1 gene (BRI1)	Arabidopsis thaliana	299	42	NP_195650	GB
RRMP-4-F1	788	Zinc finger transcription factor ZF1	Oryza sativa	209	65	AAK01713	GB
RRMP-1-A12	964	Translation elongation factor EF-1 gamma	African clawed	104	51	I51237	GB
RRMP-1-A4	857	Myb protein	Dictyostelium discoideum	66	34	AAG15274	GB
RRMP-1-D4	849	Polyadenylate-binding protein	Schizosaccharomyces pombe	34	82	NP_593377	GB
RRMP-1-E2	938	Putative dna-directed rna polymerase iii 130 kd polypeptide (ec? 2.7.7.6) ?	Schizosaccharomyces pombe	139	57	NP_593690	GB
RRMP-1-G12	848	Valyl-tRNA synthetase	Aeropyrum pernix	38	36	NP_148179	GB

RRMP-2-B7	805	RNA polymerase II transcription factor elongin subunit A (110 kDa)	Rattus norvegicus	176	26	NP_058799	GB
RRMP-2-C7	836	LEUNIG	Arabidopsis thaliana	256	55	AAG32022	GB
RRMP-2-G3	812	ESTs AU032448(S10057),C22614(S10057) Similar to Arabidopsis thaliana ASK etha gene (Y08947)	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	116	72	BAA92966	GB
RRMP-3-A3	796	Elongation factor 1 -alpha(EF-1-ALPHA)	Acrasis rosea	258	68	P14963	GB
RRMP-3-C12	834	Probable transcription factor SF3	Nicotiana tabacum	180	77	T03400	GB
RRMP-3-E6	876	Typical P-type R2R3 Myb protein	Sorghum bicolor	40	92	AAL84765	GB
RRMP-3-G2	807	Elongation factor 1 alpha	Saccharum hybrid cultivar CP72-2086	149	97	AAL79775	GB
RRMP-3-G6	891	Homeodomain - like protein	Arabidopsis thaliana	62	40	NP_195187	GB
RRMP-4-C1	873	hnRNP-like protein	Arabidopsis thaliana	240	62	NP_567753	GB
RRMP-4-G2	829	Probable methionyl-tRNA synthetase (Methionine--tRNA ligase) (MetRS)	Oryza sativa	74	90	Q9ZTS1	GB
RRMP-1-H3	849	RNA helicase - like protein	Arabidopsis thaliana	169	59	NP_567558	GB
RRMP-2-A1	594	FH protein interacting protein FIP1	Arabidopsis thaliana	128	52	NP_174141	GB
Cytoskeletal Structure - 93							
RRMP-1-F7	927	Similar to extensin-like protein	Homo sapiens	89	31	XP_063436	GB
RRMP-1-G2	845	Tubulin beta chain	Phytophthora cinnamomi	245	69	O59837	GB
RRMP-1-G4	846	Histone deacetylase HDA101	Zea mays	185	88	AAK67142	GB
RRMP-2-B3	790	Beta-expansin	Oryza sativa	211	90	AAF72989	GB
RRMP-2-B4	897	Histone H2A	Euphorbia esula	98	74	AAF65769	GB
RRMP-2-D3	816	Major surface glycoprotein-like	Arabidopsis thaliana	217	86	NP_568608	GB
RRMP-3-A6	864	AS1pha-N-acetylglucosaminidase	Arabidopsis thaliana	211	71	NP_196873	GB
RRMP-3-F10	858	Tubulin alpha-2 chain	Stylonychia lemnae	72	54	P09243	GB
RRMP-4-F2	815	Transmembrane protein	Oryza sativa	230	98	T04139	GB
Root - 5							
RRMP-2-A5	850	Root-specific protein RCc3	Oryza sativa	133	61	S53012	GB
RRMP-2-E6	843	Root-specific protein RCc3	Oryza sativa	118	66	S53012	GB
RRMP-2-H2	779	Root-specific protein RCc3	Oryza sativa	133	71	S53012	GB
RRMP-2-H4	830	Root-specific protein RCc3	Oryza sativa	133	70	S53012	GB
RRMP-3-G4	812	Root-specific protein RCc3	Oryza sativa	89	42	S53012	GB
Others - 37							
RRMP-1-F8	908	Tetracycline resistance protein.	Aeromonas salmonicida	98	96	AAA92917	GB
RRMP-1-G8	932	Proline-rich protein precursor	Arabidopsis thaliana	129	33	AAL49919	GB
RRMP-1-H11	885	EsV-1-89	Ectocarpus siliculosus virus	50	38	NP_077574	GB
RRMP-1-H8	892	Laccase	Populus balsamifera	220	60	CAA74105	GB
RRMP-2-A11	852	Subtilisin-like protein	Toxoplasma gondii	43	39	AAK94670	GB
RRMP-2-A12	966	Aquaporin	Oryza sativa	94	95	CAA11896	GB
RRMP-2-A4	819	Adenylate kinase homolog T16B249	Arabidopsis thaliana	129	44	T02575	GB
RRMP-2-A7	528	LIM homeobox protein 6	Mus musculus	46	34	NP_032526	GB
RRMP-2-B11	840	Proline-rich protein precursor	Glycine max	243	27	T06336	GB
RRMP-2-E1	851	Phytochelatin synthetase - like protein	Arabidopsis thaliana	120	66	NP_568930	GB
RRMP-2-E2	833	Similar to internalin protein, putative peptidoglycan bound protein? (LPXTG motif)	Listeria innocua	96	25	NP_469857	GB
RRMP-2-E3	784	Ribosomal protein L15	Homo sapiens	186	82	AK67641	GB
RRMP-2-F1	824	60s ribosomal protein L3	Schizosaccharomyces pombe	201	62	NP_594780	GB
RRMP-2-F6	873	Reversibly glycosylated polypeptide	Oryza sativa	256	68	AAG17438	GB
RRMP-2-G12	828	KIAA1110 protein	Homo sapiens	53	39	BAA83062	GB
RRMP-2-G2	820	MtN19-like protein	Arabidopsis thaliana	189	55	BAB10082	GB
RRMP-2-H9	859	Putative chloroplast inner envelope protein	Oryza sativa	195	99	AAG13554	GB
RRMP-3-A5	844	Proteasome subunit beta type 3 (20S proteasome alpha subunit C) (20S proteasome subunit beta-3)	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	204	99	Q9LST7	GB
RRMP-3-B2	841	Vacuolar sorting protein-like, embryogenesis protein H beta 58-like protein	Arabidopsis thaliana	135	69	NP_200165	GB
RRMP-3-C10	862	Reversibly glycosylated polypeptide	Oryza sativa	235	95	AAG17438	GB
RRMP-3-C4	880	Sec61 alpha subunit	Hordeum vulgare	108	79	AAK94784	GB
RRMP-3-C6	881	WAS protein family, member 1	Homo sapiens	70	31	AAH19019	GB

RRMP-3-D10	838	Adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit, adaptin, alphaA, clathrin-associated/assembly/adaptor protein, large, alpha 1	Homo sapiens	201	42	NP_055018	GB
RRMP-3-D11	884	Ntdin	Nicotiana tabacum	113	70	BAA88985	GB
RRMP-3-D12	848	Proteasome subunit beta type 1 (20S proteasome alpha subunit F) (20S proteasome subunit beta-6)	Oryza sativa	182	89	O64464	GB
RRMP-3-E1	835	RNA-binding protein-like	Arabidopsis thaliana	200	61	NP_200425	GB
RRMP-3-E3	821	Hemoglobin alpha-II chain	Varanus exanthematicus albicularis	88	23	P18981	GB
RRMP-3-F1	782	Retinitis pigmentosa 2 homolog	Mus musculus	129	37	NP_598430	GB
RRMP-3-F12	850	NTGP4	Nicotiana tabacum	223	48	AAD09518	GB
RRMP-3-F9	803	LEC14B like-protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	119	94	BAB84486	GB
RRMP-3-G1	854	Endo-1,4-beta-glucanase Cell	Hordeum vulgare subsp Vulgare	286	62	BAA94257	GB
RRMP-3-G5	878	Aquaporin	Oryza sativa	186	94	CAA11896	GB
RRMP-3-G9	742	TIM17	Arabidopsis thaliana	34	55	AAF03749	GB
RRMP-3-H9	821	PPR-repeat protein -like	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	244	94	BAB86412	GB
RRMP-4-B1	895	ESTs AU033170(S4339),D41681(S4339) Similar to Pisum sativum mRNA for pIAA4/5 1 (X68215)	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	103	46	BAA78739	GB
RRMP-4-E1	735	Neurotrophic factor	Macaca mulatta	24	54	AAC99782	GB
RRMP-4-H1	800	T6D22.16	Arabidopsis thaliana	195	47	AAF79837	GB
Unknown 77							
RRMP-1-A1	848	No hits found					GB
RRMP-1-A11	893	Hypothetical protein	Arabidopsis thaliana?	151	50	G71423	GB
RRMP-1-A8	845	Hypothetical protein XP_097022	Homo sapiens	79	34	XP_097022	GB
RRMP-1-B4	870	Hypothetical protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	27	81	BAB63849	GB
RRMP-1-B7	839	Putative protein	Arabidopsis thaliana	101	48	NP_191258	GB
RRMP-1-C1	798	Expressed protein	Arabidopsis thaliana	232	58	NP_564354	GB
RRMP-1-C12	828	Expressed protein	Arabidopsis thaliana	78	70	NP_563929	GB
RRMP-1-C3	863	Contains ESTs C98283(C1395),C98282(C1395)~similar to Arabidopsis thaliana chromosome 4, AT4g29480~unknown protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	120	96	AP003504	GB
RRMP-1-D1	881	Hypothetical protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	43	44	BAB16343	GB
RRMP-1-D11	959	Putative protein	Arabidopsis thaliana	95	43	AAF99740	GB
RRMP-1-E4	844	EST AU030398(E51008) corresponds to a region of the predicted gene	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	85	29	BAA96641	GB
RRMP-1-F1	835	Auxin-induced protein, putative	Arabidopsis thaliana	170	57	NP_176274	GB
RRMP-1-F2	848	Hypothetical protein	Oryza sativa	185	90	BAB69445	GB
RRMP-1-F9	936	At1g23310/F26F24_4	Arabidopsis thaliana	145	80	AAL24255	GB
RRMP-1-G1	811	Hypothetical protein T8O5 10	Arabidopsis thaliana	213	65	T05462	GB
RRMP-1-G9	941	Hypothetical 121 kDa protein pMsmaA27	Manduca sexta	99	30	Q9U516	GB
RRMP-1-H1	844	Expressed protein	Arabidopsis thaliana	162	37	NP_565672	GB
RRMP-1-H2	797	Hypothetical protein	Oryza sativa subsp Indica	244	39	AAD2755	GB
RRMP-2-A10	862	ORF 73~ECLF1	Samirine herpesvirus 2	71	40	NP_040275	GB
RRMP-2-A3	806	Hypothetical protein	Schizosaccharomyces pombe	53	41	NP_596001	GB
RRMP-2-A8	822	Y60A3A 5 p	Caenorhabditis elegans	83	27	NP_507865	GB
RRMP-2-A9	878	Expressed protein	Arabidopsis thaliana	142	56	NP_568653	GB
RRMP-2-B1	622	Contains ESTs AU031375(E61447),AU029988(E50438) ~unknown protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	73	64	BAB63823	GB

RRMP-2-B10	850	Contains EST D23070(C2134)~similar to <i>Oryza sativa</i> chromosome 10, OSJNBa0026L12.21~unknown protein	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	149	79	BAB20652	GB
RRMP-2-B5	846	AT5g13750/MXE10.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	224	49	AAK62597	GB
RRMP-2-B6	829	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	120	43	NP_564810	GB
RRMP-2-B8	812	F15H18.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	253	44	AAF26001	GB
RRMP-2-C12	857	Predicted protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69	53	NP_194929	GB
RRMP-2-C2	823	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	16	93	BAB68044	GB
RRMP-2-C3	847	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98	83	NP_565222	GB
RRMP-2-C9	845	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	202	53	NP_564972	GB
RRMP-2-D1	805	CG7649 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	68	30	AAF55088	GB
RRMP-2-D10	857	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	102	45	NP_565370	GB
RRMP-2-D11	913	Hypothetical protein~similar to <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 3,? MIL23.17	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	173	83	BAB84440	GB
RRMP-2-D12	834	EST C93513(C53164) corresponds to a region of the predicted gene~Similar to <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome II BAC F5H14genomic sequence,hypothetical protein (AC006234)	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	174	72	BAA87841	GB
RRMP-2-D2	827	ESTs AU077435(C12539),C26534(C12539) correspond to a region of the? predicted gene~hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i> (japonica? cultivar-group)	104	99	BAA83351	GB
RRMP-2-D6	922	Evidence.NAS~putative~unclassifiable	<i>Mus musculus</i>	33	48	BAB24809	GB
RRMP-2-E10	864	Hypothetical protein L23H3.30	<i>Arabidopsis thaliana</i>	221	34	T08588	GB
RRMP-2-E12	923	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	160	58	NP_564483	GB
RRMP-2-E7	945	No hits found					GB
RRMP-2-E9	858	F21B7.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	184	49	AAF86508	GB
RRMP-2-F10	765	Hypothetical protein wali7	<i>Triticum aestivum</i>	203	79	T06984	GB
RRMP-2-F12	839	At2g07350/T13E11.12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	128	69	AAK82475	GB
RRMP-2-F4	818	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96	53	NP_188861	GB
RRMP-2-F8	851	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	209	69	NP_566436	GB
RRMP-2-G1	798	Hypothetical protein A_IG002P16.9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	129	37	T01770	GB
RRMP-2-G11	882	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72	31	NP_188488	GB
RRMP-2-G7	832	Hypothetical protein 3	Yeast (<i>Saccharomyces kluyveri</i>) plasmid pSKL	104	29	S15962	GB
RRMP-2-G8	858	Hypothetical protein T1008.70	<i>Arabidopsis thaliana</i>	222	47	T48158	GB
RRMP-2-H5	836	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	262	85	AB16491	GB
RRMP-2-H6	637	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	74	29	AAL61939	GB
RRMP-2-H7	868	Y102A5C.26 p	<i>Caenorhabditis elegans</i>	134	21	NP_507297	GB
RRMP-2-H8	902	ESTs gb R30459,gb N38441 come from this gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>	163	74	AAB61100	GB
RRMP-3-A1	827	ESTs C99736(E21196),AU030984(E60527), AU030985 (E60527)correspond to a region of the predicted gene.	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	219	92	BAA90627	GB
RRMP-3-A8	860	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	180	55	NP_173829	GB
RRMP-3-B1	830	Conserved hypothetical protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	111	25	NP_594572	GB
RRMP-3-B4	876	CAA303712.1 protein	<i>Oryza sativa</i>	256	71	CAB53485	GB
RRMP-3-B7	855	AT5g09850/MYH9.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60	38	AAL25557	GB
RRMP-3-C1	872	F12A21.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	185	65	NP_564907	GB
RRMP-3-C2	884	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	151	90	AA90345	GB
RRMP-3-C5	864	ESTs AU069374(C61044),D24451(R1944), AU031820(R1944) putative protein (AL353993)	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	36	100	BAB03364	GB
RRMP-3-D2	891	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	71	30	NP_195058	GB
RRMP-3-D3	921	AT3g54020/F5K20.320	<i>Arabidopsis thaliana</i>	175	67	AAK82549	GB
RRMP-3-D6	870	Hypothetical protein F15A17.210	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25	56	T48339	GB

RRMP-3-D7	845	ESTs C97429(C60159),D22427(C11106), AU078031(E31854), D15683(C1084) hypothetical protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	248	49	BAA83564	GB
RRMP-3-E9	882	Contains EST D24276(R1622) unknown protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	241	76	BAB63798	GB
RRMP-3-F2	832	Expressed protein	Arabidopsis thaliana	104	65	NP_564513	GB
RRMP-3-F3	910	Hypothetical protein wal7	Triticum aestivum	76	71	T06984	GB
RRMP-3-F4	872	EST AU090587(C30149) unknown protein (AC002341)	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	179	93	BAA96170	GB
RRMP-3-F7	855	Hypothetical protein; 65754-64334	Arabidopsis thaliana	184	47	AAG52542	GB
RRMP-3-G8	871	CAA30379.1 protein	Oryza sativa	235	53	CAB53482	GB
RRMP-3-H1	776	Putative protein	Arabidopsis thaliana	17	82	NP_199970	GB
RRMP-3-H5	897	Hypothetical protein	Arabidopsis thaliana	208	59	AAF63119	GB
RRMP-3-H6	902	EST AU162599(R10504) unknown protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	158	71	BAB40155	GB
RRMP-4-A2	843	ESTs AU082563(S20379),D15187(C0226), AU082476(C0226), AU082563(S20379) putative RNA-binding protein (AC004561)	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	264	94	BAA95888	GB
RRMP-4-B3	852	Hypothetical protein	Methanococcus jannaschii	39	35	NP_248514	GB
RRMP-4-C2	886	Contains ESTs AU062927(C51629),AU030693(E60120). unknown protein	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	121	97	BAB39954	GB

*LC, Length compared

제 2 절 양분이용효율관련 유전자의 구조와 발현 특성

벼의 양분이용 효율 개선에 이용할 유용유전자의 개발을 목적으로 양분 결핍조건에서 차별적 발현을 보이는 유전자 전사체를 탐색하여 다수의 양분반응 유전자 전사체를 확보하였다. 확보된 유전자 단리체를 이용하여 양분수송자(phosphate transport, PT와 ammonium transporter, AMT), 지질수송단백질(lipid transport protein, LPT), 항산화효소(catalase, CAT와 ascorbate peroxidase, APX) 유전자의 구조와 기능 또는 양분조건에 따른 발현조절 특성을 상세히 조사, 분석하였다.

1. 양분수송자 유전자

가. 재료 및 방법

(1) 식물 재료

cDNA library의 제작 및 유전자 발현조사용 식물재료는 3주간 Yoshida 양액에서 재배한 후 해당 양분을 결핍처리한 재료를 이용하였다. 양분결핍처리는 N, P, K, Fe에 대해 5일간 실시하였다. 인산결핍처리의 경우 일부 시료는 처리 후 0, 12, 24, 72, 120시간에 채취하였고, 인산농도를 0, 50, 100, 200, 320 μM 로 조절하여 5일간 처리하여 이용하였다.

암모니움수송자 발현특성을 조사하기 위한 재료는 정상 양분조건에서 생육한 유묘기 벼 식물체를 5일간 무질소 조건에 처리한 다음 ① 무질소 조건 처리, ② 무질산태질소 + 30 μM 암모니움 1일 처리, ③ 무 질산태질소 + 30 μM 암모니움 3일 처리, ④ 무 질산태질소 + 100 μM 암모니움 1일 처리, ⑤ 무 질산태질소 + 100 μM 암모니움 3일 처리, ⑥ 100 μM 질산태질소 + 무암모니움 1일 처리, ⑦ 100 μM 질산태질소 + 무암모니움 3일 처리, ⑧ 정상 양분조건 1일 처리 등 질소 양분 조건이 다른 조건에서 처리하였다.

(2) cDNA library의 제작

Yoshida 양액을 이용하여 3주간 재배한 벼 유식물체에 5일간 인산결핍처리를 실시한 뿌리를 재료로 하여 Uni-ZAP cDNA library synthesis kit(Stratagene, USA)을 이용하여 제 1 절 가-(3)항과 같이 cDNA library를 제작하였다.

(3) Library 탐색

Phospahte transporter EST clone (D4629, D46042)을 이용하여 상기 (1)항의 cDNA library 1×10^5 pfu를 탐색하였다. Library의 배양, plaque transfer 등은 상법에 따라 실시하였으며, 잡종화 반응과 검출은 AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Bioscience, UK)을 이용하여 제조회사의 사용법에 따라 실시하였다.

(4) 생물정보학적 방법을 이용한 cloning

벼의 인산 수송자 유전자를 분리하기 위해 GenBank 데이터베이스 (NCBI, USA)의 염기서열을 분석하여 *OsPT2*에 대한 정방향 primer(5'-ATGGCGGGATCGCAGC-3')와 역방향 primer(5'-GTCACCTCACGTCGAGACGGC-3'), *OsPT3*의 정방향 primer(5'-ATGGCCGCGAGCTCA-3')와 역방향 primer(5'-GT GCGTTGCCT GGGTTGAC-3'),

*OsPT4*의 정방향 primer(5'-ATG GCGGGCGATCAGA TG-3')와 역방향 primer (5'-ACGGACGGCGGTGG AAT-3') 등 3쌍의 primer를 제작하였다. 제작한 primer와 genomic DNA를 이용하여 상법에 따라 PCR과 증폭DNA의 cloning을 실시하였다. PCR 반응액 25 $\mu\ell$ 의 조성은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM primer, 200 μM dNTP, 주형 DNA 10 ng 그리고 *Taq* polymerase 1 unit이었다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 반응을 거친 후, 증폭반응(94°C에서 50초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 20초)을 40회 진행하였고, 최종 신장반응은 72°C에서 7분간 수행하였다.

증폭된 DNA 단편중 인산 수송자 유전자로 예상되는 크기의 단편을 Qiaquick Gel Extraction kit(Qiagen, USA)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T Easy vector(Promega, USA)에 클로닝하여 염기서열 분석에 이용하였다.

(5) 염기서열 분석, Northern blot 및 Southern blot 분석

염기서열 결정은 염기서열분석 전문회사에 의뢰하여 실시하였으며, 염기서열 결정 반응은 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 진행하였다. 결정된 염기서열의 구조적 특성은 GenBank(NCBI, USA)와 ExPASy(SIB, Switzerland)에서 제공하는 프로그램을 이용하여 분석하였다.

Total RNA는 TRI reagent(MRC, USA)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법에 의하여 분리하였다. 분리된 total RNA의 순도는 OD₂₆₀과 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EtBr이 포함된 1.0% formaldehyde 겔에서의 전기영동 결과를 이용하여 결정하였다.

Northern 분석은 20 μg 의 total RNA를 1.0% formaldehyde 겔에서 40V로 3시간 전개하여 Southern(1975)의 방법으로 RNA를 전이시킨 nylon membrane(Hybond N⁺, Amersham, UK)을 이용하여 실시하였다. 탐침자의 제작과 잡종화 DNA의 검출은 DIG chemiluminescent nucleic acid labelling kit(Roche, Germany) 또는 AlkaPhos direct labelling and detection system(Amersham-Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 실시하였다. 잡종화 반응은 사용한 검출방법에 적합하도록 제조회사의 사용법에 따라 실시하였다. 잡종화반응 후 membranes을 상온의 2X washing(2X SSC, 0.1% SDS) 용액으로 15분간 2회, 0.1X washing(0.1X SSC, 0.1% SDS) 용액으로 68°C에서 15분간 세척한 후, 상기의 검출 kit 제조회사의 사용설명서에 따라 잡종화된 핵산분자를 검출하였다.

Genomic DNA는 Roger 등(1989)의 방법을 이용하여 추출하였다. 분리한 genomic DNA(10 μg)를 제한효소로 처리하여 0.8% agarose gel에서 25V, 16시간 전기영동한 후, Northern-blot 분석에서 사용한 방법으로 Southern-blot 분석을 실시하였다.

(6) Yeast mutant complementation

OsPTs (*OsPT1*~*OsPT4*) cDNA의 기능은 yeast mutant MB192(Osaka University, Japan)와 yeast 발현벡터인 pYE22m(Anamnart et al., 1997)을 이용하여 실시하였다. Yeast 형질전환은 Gietz 등(1995), Ito 등(1983) 및 Schiestl과 Gietz(1989)의 방법에 따라 실시하였다.

유전자발현 재조합체가 형질전환된 yeast mutant NS219를 sucrose 대신 glycerol(30 g/L)이 포함된 YNB 배지에서 배양한 후 diazo-coupling(Toh-e and Oshima, 1974)을 이용하여 repressible acid phosphatase activity를 검정하였다(Bun-ya et al., 1991). 반응 용액의 조성은 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) 10 ml에, 5 mg α -naphthylphosphate와 50 mg Fast blue salt B(o-dianisidine, 0.5% agarose)이었다. 반응액의 온도를 50°C로 낮추고 잘 자란 yeast plate 위에 부어 상온에서 굳게한 후, 30°C에서 30분간 배양하여 염색 정도를 관찰하였다.

유전자발현 재조합체가 형질전환된 yeast mutant NS219와 돌연변이 계통의 생장율은 YNB(Difco, USA)배지에 Yeast Synthetic Drop-out Medium (Sigma, USA), glycerol (30 g/L), 고농도의 인산(11 mM KH_2PO_4)을 첨가한 배지를 이용하여 측정하였다. 효모를 $\text{OD}_{600}=1.0$ 이 되도록 배양한 후 원심분리하여 수집하고 인산이 첨가되지 않은 YNB 배지를 이용하여 2회 재현탁하여 $\text{OD}_{600}=0.05$ 가 되도록 희석한 후, 저농도의 인산(110 μM KH_2PO_4) 이 첨가된 YNB 배지에서 30°C, 250rpm 조건으로 배양하며 6, 12, 18, 24시간째의 OD_{600} 를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 인산수송자 유전자

(가) 인산수송자 유전자 분리

벼의 인산수송자 EST를 탐침으로 사용하여 cDNA library를 탐색하여 2차 양성 clone 12종을 얻었다. 양성 clone중 삽입단편의 크기가 2.0 kb 3종에 대하여 염기서열을 분석하여 기존의 인산수송자와 상동성이 높은 clone을 선발하고 *OsPT1*으로 명명하였다.

인산 수송자를 표적으로 한 3쌍의 특이 primer 쌍을 이용하여 벼 genomic DNA로부터 특이적으로 증폭된 DNA 단편(Fig. 8)을 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

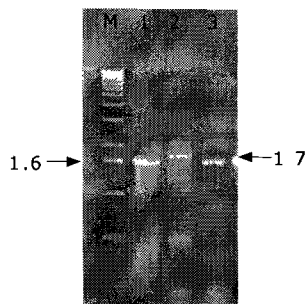


Fig. 8. DNA fragments amplified from rice genomic DNA with the primer pairs targeted at the 5'- and 3'-end of the open reading frames of the rice phosphate transporter *OsPT2* (lane 1), *OsPT3* (lane 2) and *OsPT4* (lane 3), respectively. M, 1 kb DNA marker. Arrows are indicated in kilobases.

(나) 인산수송자 서열구조

벼의 인산수송자 유전자로 예상되는 OsPT1, 2, 3, 4 clone의 염기서열과 번역된 아미노산 서열은 Fig. 9, 10, 11, 12와 같다. *OsPT1*은 1,901 bp로 nt 1~ nt 1,581에 527개의 아미노산을 암호화하는 ORF를 포함하고 있다(Fig. 9). *OsPT2*는 1,619 bp로 nt 1~ nt 1,584에 528개의 아미노산을 암호화하는 ORF를 포함하며(Fig. 10), *OsPT3*은 1,749 bp로 nt 1~ nt 1,614에 538개의 아미노산을 암호화하는 ORF를 포함하고(Fig. 11), *OsPT4*는 1,609 bp로 nt 1~ nt 1,578에 526개의 아미노산을 암호화하는 ORF를 포함하고 있다(Fig. 12).

OsPTs의 아미노산 서열의 상동성은 Table 5와 같다. OsPT1은 OsPT2와 84%의 상동성을 보이고 OsPT3, OsPT4와는 각각 74, 70%의 상동성을 갖는다. OsPT2는 OsPT3, OsPT4와 71%의 상동성을 보이고, OsPT3은 OsPT1, OsPT4와 각각 74, 71%의 상동성을 보인다. Paszkowski 등(2002)이 rice genome sequence를 분석하여 보고한 13종의 벼 인산 수송자와 비교한 결과 본 실험의 OsPT1과 OsPT2는 OsPT1, OsPT2와 각각 99%의 상동성을 나타내고, OsPT3는 OsPT4와 100%의 상동성을 OsPT4는 OsPT7과 99%의 상동성을 나타내었다.

벼 인산 수송자를 다른 식물의 인산 수송자와 비교한 결과 OsPT1은 LePT1(Liu et al., 1998a)과 73%, OsPT2와 OsPT3은 NtPT1(Baek et al., 2001a)과 각각 74, 77%, OsPT4는 StPT1(Leggewie et al., 1997)과 75%의 상동성을 나타내었다. OsPTs는 다른식물의 인산 수송자와 단백질 수준에서 69~77%의 매우 높은 상동성을 나타내고 있다(Table 5). 하지만 Na⁺/phosphate transporter(Binhui et al., 1994), sulfate transporter(Smith et al., 2001)의 뉴클레오티드, 아미노산 서열과는 상동성을 나타내지 않았다. 따라서 뉴클레오티드와 아미노산의 상동성에 근거하여 *OsPTs*는 *Arabidopsis*(Muchhal et al., 1996; Smith et al., 1997), *Medicago truncatula*(Liu et al., 1998b), 감자(Leggewie et al., 1997), 담배(Baek et al., 2001a), 토마토(Liu et al., 1998a) 등 쌍자엽 식물에서 보고된 인산 수송자와 유사한 단자엽식물 유래의 인산 수송자로 추정된다.

1	ATG GCG GGA GGG CAG CTC AAC GTG CTG AGC ACG CGC GAC CAG GCG AAG ACG CAA TGG	57
1	M A G G Q L N V L S T R D Q A K T Q W	19
58	TAC CAC TTC ATG GCG ATC GTC ATC GCC GGC ATG GGC TTC TTC ACC GAC GCC TAC GAC	114
20	Y H F M A I V I A G M G F F T D A Y D	38
115	CTC TTC TGC ATT TCC CTC GTC ACC AAG CTG CTC GGC CGC ATC TAC ACC GAC GAT	171
39	L F C I S L V T K L L G R I Y Y T D D	57
172	TCC AAG GAC ACC CCC GGC GCG CTC CCG CCC AAC GTG TCG GCC GCC GTC ACC GGC GTC	228
58	S K D T P G A L P P N V S A A V T G V	76
229	GCG CTC TGC GGC ACG CTC GCC GGC CAG CTT TTC TTC GGA TGG CTC GGC GAC AAG CTC	285
77	A L C G T L A G Q L F F G W L G D K L	95
286	GGA CGC AAG AGC GTG TAT GGT TTC ACG CTG ATT CTG ATG GTC GTG TGC TCG GTC GCG	342
96	G R K S V Y G F T L I L M V V C S V A	114
343	TCC GGG CTC TCG TTC GGG AGC TCG GCC AAG GGC GTC GTG TCT ACG CTC TGC TTC TTC	399
115	S G L S F G S S A K G V V S T L C F F	133
400	CGG TTC TGG CTC GGC TTC GGC ATC GGC GGC GAC TAC CCG CTC AGC GCC ACC ATC ATG	456
134	R F W L G F G I G G D Y P L S A T I M	152
457	TCG GAG TAC GCG AAC AAG AGG ACG CGC GGC GCC TTC ATC GCC GCC GTG TTC GCC ATG	513
153	S E Y A N K R T R G A F I A A V F A M	171
514	CAG GGG TTC GGG ATC CTC TTC GGC GCC ATC GTC GCG CTC GCG GTG TCG GCG GGG TTC	570
172	Q G F G I L F G A I V A L A V S A G F	190
571	CGG CAC GCG TAC CCG GCG CCG TCC TAC TCC GAC AAC CAC GCC GCG TCG CTC GTC CCG	627
191	R H A Y P A P S Y S D N H A A S L V P	209
628	CAG GCC GAC TAC GTG TGG CGC ATC ATC CTC ATG TTC GGC ACC GTC CCG GCG GCG CTC	684
210	Q A D Y V W R I I L M F G T V P A A L	228
685	ACC TAC TAC TGG CGG ATG AAG ATG CCC GAG ACG CGG TAC ACG GCG CTC ATC GCC	741
229	T Y Y W R M K M P E T A R Y T A L I A	247
742	CGC AAC GCG AAG CAG GCG GCG GCC GAC ATG TCC AAG GTG CTG CAC ACC CAG ATT GAG	798
248	R N A K Q A A A D M S K V L H T Q I E	266
799	GAG AGC GCG GAC CGC GCC GAG ACG GTG GCC GTC GGC GGC GAG AGC TGG GGC CTC TTC	855
267	E S A D R A E T V A V G G E S W G L F	285
856	TGG GCG CAG TTC CTG CGC CCG CAC GG CAC CTC CTC GCC ACC ACC AGC ACG TGG	912
286	S R Q F L R R H G L H L L A T T S T W	304
913	TTC CTC CTC GAC ATC GCC TTC TAC AGC CAG AAC CTG TTC CAG AAG GAC ATC TTC ACG	969
305	F L L D I A F Y S Q N L F Q K D I F S	323
970	AAG GTC GGG TGG ATC CCG CCG GCG AAG ACC ATG AAC GCG CTC GAG GAG CTC TAC CCG	1026
324	K V G W I P P A K T M N A L E E L Y R	342
1027	ATC GCC CGC GCC CAG GCG CTC ATC GCG CTC TGC GGC ACC ATC CCG GGC TAC TGG TTC	1083
343	I A R A Q A L I A L C G T I P G Y W F	361
1084	ACC GTC GCA TTC ATC GAG ATC ATG GGC AGG TTC TGG ATC CAG ATC ATG GGC TTC GCC	1140
362	T V A F I E I M G R F W I Q I M G F A	380
1141	ATG ATG ACG GCG TTC ATG CTC GGC CTC GCC ATC CCG TAC CAC CAC TGG ACG ACG CCG	1197
381	M M T A F M L G L A I P Y H H W T T P	399
1198	GGG CAC CAC ACC GGC TTC ATC GTC ATG TAC GGA TTC ACC TTC TTC TTC GCG AAC TTC	1254
400	G H H T G F I V M Y G F T F F F A N F	418
1255	GGG CCA AAC AGC ACC ACC TTC ATC GTG CCG GCG GAG ATA TAC CCG GCG CCG CTC CCG	1311
419	G P N S T T F I V P A E I Y P A R L R	437
1312	TCG ACG TGC CAC GGC ATC TCC GCC GCC GCG AAG GCC GGC GCC ATC ATC GGA GCG	1368
438	S T C H G I S A A A G K A G A I I G A	456
1369	TTC GGG TTC CTG TAC GCG GCG CAG GAC CAG CAC AAG CCC GAG CCT GGG TAC CCC AGG	1425
457	F G F L Y A A Q D Q H K P E P G Y P R	475
1426	GGG ATC GGC ATC AAG AAC GCG CTC TTC GTG CTC GCC GGC ACA AAC TTC CTC GGG ACG	1482
476	G I G I K N A L F V L A G T N F L G T	494
1483	ATC ATG ACG CTG CTC GTG CCG GAG TCC AAG GGC ACG TCG CTC GAG GTT ATC TCG CAG	1539
495	I M T L L V P E S K G T S L E V I S Q	513
1540	GAG GTC GCC GAC GGC GAC GAG GAG GCG GCC TAC CCG AAG TAA TTT GAC CGC GCG	1596
514	E V A D G D D E E A A Y P K Stop	527
1597	CGT GAT CAC GCA GGG AGT GGT TGC CGC TAA CCA TTG GTG TCA TTT TTT TTC CCC ACT	1653
1654	GTA ACA ACT CTA GTC GTC GCT TCC GGA CGA GTG GGA GTT TTT TTT TTT TGG ATA	1710
1711	AGT TGT AGA AAT TTC AAT TAG TGA CTA GTT TGT AGG AAA TGT GAG TGA AAT GTG GGT	1767
1768	ATA TGT TCT TTA AAA ATT GGT GAA CTT TTC CCT GGA TTT GAA AAA ACC GTG TAG TTT	1824
1825	TAA AAA AAA ATG CCA TGG ATA CTA GTA GTT CAG GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	1881
1882	AAA AAA AAA AAA AAA AA	1901

Fig. 9. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsPT1*.

1	ATG GCG GGA TCG CAG CTC AAC GTT TTG GTC AAG CTC GAC CAG GCT AAG ACG CAA TGG	57
1	M A G S Q L N V L V K L D Q A K T Q W	19
58	TAC CAT TTC ATG GCG ATC GTC ATC GCC GGG ATG GGG TTC TTC ACA GAC GCC TAC GAC	114
20	Y H F M A I V I A G M G F F T D A Y D	38
115	CTC TTT TGC ATC GCG CTG GTC ACC AAG CTG TTG GGT CGC CTT TAC TAC ACC GAC ATC	171
39	L F C I A L V T K L L G R L Y Y T D I	57
172	ACC AAG CCC AAC CCA GGG ACA CTC CCG CCC AAC GTG TCG TCC GCC GTC ACC GGC GTC	228
58	T K P N P G T L P P N V S S A V T G V	76
229	GCG CTC TGC GGC ACG CTC GCC GGC CAG CTC TTC TTC GGA TGG CTC GGC GAC AAG CTC	285
77	A L C G T L A G Q L F F G W L G D K L	95
286	GGC GCG AAG AGC GTC TAT GGA TTC ACG CTC ATC CTC ATG GTC GTG TGC TCC ATC GCC	342
96	G R K S V Y G F T L I L M V V C S I A	114
343	TCC GGT CTC TCG TTT GGC CAC ACG CCC AAG AGC GTG ATT GCC ACG CTC TGC TTC TTC	399
115	S G L S F G H T P K S V I A T L C F F	133
400	CGC TTC TGG CTC GGC TTC GGC ATC GGC GGC GAC TAC CCG CTC AGC GCC ACC ATC ATG	456
134	R F W L G F G I G G D Y P L S A T I M	152
457	TCG GAG TAC GCG AGC AAG AAG ACC CGC GGG GCC TTC ATC GCC GCC GTG TTC GCC ATG	513
153	S E Y A S K K T R G A F I A A V F A M	171
514	CAG GGG TTC GGG ATC CTC TTC GGC GCC ATC GTC GCG CTC GTC GTC TCG GCC GGC TTC	570
172	Q G F G I L F G A I V A L V V S A G F	190
571	CGT CAC GCG TAC CCG GCG CCG TCG TAC GCC CAG AAC CCC GCC GCG TCG CTC GCG CCG	627
191	R H A Y P A P S Y A Q N P A A S L A P	209
628	CAG GCT GAC TAC ACG TGG CGG CTC ATC CTC ATG TTC GGC ACC ATC CCG GCT GGG CTC	684
210	Q A D Y T W R L I L M F G T I P A G L	228
685	ACC TAC TAC TGG CGC ATG AAA ATG CCC GAG ACG GCG CGG TAC ACG GCG CTC GTC GCC	741
229	T Y Y W R M K M P E T A R Y T A L V A	247
742	GCG AAC GCC AAG CAG GCG GCG GCT GAC ATG TCC AAG GTG CTC CAC GCC GAG ATC GAG	798
248	R N A K Q A A A D M S K V L H A E I E	266
799	GAG CGG CCG GAG GTG GTC GAG AGC CAG GTG GTC GCC GGG GAG ACC TGG GGC CTC TTC	855
267	E R P E V V E S Q V V A G E T W G L F	285
856	TCA CGG CAG TTC ATG AAG CGA CAC GGG ATG CAC CTC CTG GCG ACC ACC AGC ACG TGG	912
286	S R Q F M K R H G M H L L A T T S T T W	304
913	TTC CTG CTC GAC ATC GCC TTC TAC AGC CAG AAC CTG TTC CAG AAG GAC ATC TTC AGC	969
305	F L L D I A F Y S Q N L F Q K D I F S	323
970	AAG GTC GGG TGG ATA CCG CCG GCG AAG ACC ATG AAC GCG CTC GAG GAA CTC TAC CCG	1026
324	K V G W I P P A K T M N A L E E L Y R	342
1027	ATC TCC CGC GCC CAG GCA CTC ATC GCA CTC TGC GGA ACC ATC CCG GGC TAC TGG TTC	1083
343	I S R A Q A L I A L C G T I P G Y W F	361
1084	ACC GTC GCC TTC ATC GAC ATC GTC GGC AGG TTC TGG ATC CAG ATC ATG GGC TTC TTC	1140
362	T V A F I D I V G R F W I Q I M G F F	380
1141	ATG ATG ACC GTG TTC ATG CTC GCG CTC GGC GTG CCC TAC GAC CAC TGG ACG CAC CCG	1197
381	M M T V F M L A L G V P Y D H W T H P	399
1198	GCG CAC CAC ACC GGC TTC GTC GTG CTC TAC GCA CTC ACC TTC TTC TTC GCC AAC TTC	1254
400	A H H T G F V V L Y A L T F F F A N F	418
1255	GGG CCC AAC AGC ACC ACC TTC ATC GTG CCG GCT GAG ATC TTC CCG GCG AGG CTC CCG	1311
419	G P N S T T F I V P A E I F P A R L R	437
1312	TCG ACG TGC CAC GGC ATC TCC GCC GCG TCC GGC AAG GCC GGC GCG ATC ATC GGC GCG	1368
438	S T C H G I S A A S G K A G A I I G A	456
1369	TTC GGG TTC CTG TAC GGT GCG CAG GAC CAG CAC AAT CCC GAC GCG GGA CAC TCC CCG	1425
457	F G F L Y A A Q D Q H N P D A G H S R	475
1426	GGC ATC GGC ATC CCG AAC GCG CTC TTC GTG CTC GCC GGC ACA AAC TTC CTC GGT ATG	1482
476	G I G I R N A L F V L A G T N F L G M	494
1483	CTC ATG ACG CTG CTG GTG CCG GAG TCC AAG GGC TTG TCG CTG GAG GAG ATG TCC AAG	1539
495	L M T L L V P E S K G L S L E E M S K	513
1540	GAC AAC GTC GTC GAC GAG ACC GCC CAA GAA GCG ATC GCC CAA GCG TGA TGT CAT AAA	1596
514	D N V V D E T A Q E A I A Q A Stop	528
1597	CAT GCC GTC TCG ACG TGA GTG AC	1619

Fig. 10. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsPT2*.

1	ATG GCC GGC GAG CTC AAG GTG CTG AAC GCG CTC GAC TCG GCG AAG ACG CAG TGG TAC	57
1	M A G E L K V L N A L D S A K T Q W Y	19
58	CAT TTC ACG GCG ATC GTG ATC GCC GGC ATG GGG TTC TTC ACC GAC GGC TAC GAC CTC	114
20	H F T A I V I A G M G F F T D A Y D L	38
115	TTC TCC ATC TCC CTC GTC ACC AAG CTG CTC GGC CGC ATC TAC TAC TTC AAC CCG GCG	171
39	F S I S L V T K L L G R I Y Y F N P A	57
172	TCC AAG AGC CCC GGC TCC CTC CCG AAC GTC TCC GGC GCC GTC AAT GGC GTC GCC	228
58	S K S P G S L P P N V S A A V N G V A	76
229	TTC TGC GGC ACC CTC GCC GGC CAG CTC TTC TTC GGT TGG CTC GGC GAC AAG ATG GGG	285
77	F C G T L A G Q L F F G W L G D K M G	95
286	GCG AAG AAG GTG TAC GGC ATG ACG CTC ATG CTC ATG GTC ATC TGC TGC CTC GCT TCC	342
96	R K K V Y G M T L M L M V I C C L A S	114
343	GGC CTC TCG TTC GGG TCG TCG GCG AAA GGC GTC ATG GCC ACG CTC TGC TTC TTC GCG	399
115	G L S F G S S A K G V M A T L C F R	133
400	TTC TGG CTC GGC TTC GGC ATC GGC GGC GAC TAC CCG CTC TCG GCG ACC ATC ATG TCG	456
134	F W L G F G I G G D Y P L S A T I M S	152
457	GAG TAC GCT AAT AAG CGC ACC CGT GGA GCG TTC ATC GCC GCC GTG TTC GCC ATG CAG	513
153	E Y A N K R T R G A F I A A V F A M Q	171
514	GGC TTC GGC AAC CTC ACC GGC GGC ATC GTG GCC ATC ATC GTG TCC GCC GCG TTC AAG	570
172	G F G N L T G G I V A I I V S A A F K	190
571	TCG CGG TTC GAC GCG CCG GCG TAC AGG GAC GAC CGG ACC GGC TCC ACC GTG CCG CAG	627
191	S R F D A P A Y R D D R T G S T V P Q	209
628	GCC GAC TAC GCG TGG CGC ATC GTG CTC ATG TTC GGC GCC ATC CCG GCG CTG CTC ACC	684
210	A D Y A W R I V L M F G A I P A L L T	228
685	TAC TAC TGG CGG ATG AAG ATG CCG GAG ACG GCG CGC TAC ACC GCG CTG GTC GCC AAG	741
229	Y Y W R M K M P E T A R Y T A L V A K	247
742	AAC GCG AAG CAG GCC GCC GCG GAC ATG ACG CAG GTG CTC AAC GTC GAG ATC GTG GAG	798
248	N A K Q A A A D M T Q V L N V E I V E	266
799	GAG CAG GAG AAG GCT GAC GAG GTC GCG CCG GAG CAG TTC GGG CTC TTC TCC CCG	855
267	E Q E K A D E V A R R E Q F G L F S R	285
856	CAG TTT TTG AGA CGC CAT GGG CGC CAC CTG CTG GGC ACG ACG GTG TGC TGG TTC GTG	912
286	Q F L R R H G R H L L G T T V C W F V	304
913	CTG GAC ATC GCC TTC TAC TCG TCG AAC CTG TTC CAG AAG GAC ATC TAC ACG GCG GTG	969
305	L D I A F Y S S N L F Q K D I Y T A V	323
970	CAG TGG CTG CCC AAG GCG GAC ACC ATG AGC GCC CTG GAG GAG ATG TTC AAG ATC TCC	1026
324	Q W L P K A D T M S A L E E M F K I S	342
1027	CGG GCA CAG ACG CTC GTG GCG CTG TGC GGC ACC ATT CCG GGC TAC TGG TTC ACT GTC	1083
343	R A Q T L V A L C G T I P G Y W F T V	361
1084	TTC TTC ATC GAC ATC ATC GGC CGC TTC GTC ATC CAG CTC GGC GGC TTC TTC TTC ATG	1140
362	F F I D I I G R F V I Q L G G F F F M	380
1141	ACG GCG TTC ATG CTC GGC CTC GCC GTG CCG TAC CAC CAC TGG ACG ACG CCG GGC AAC	1197
381	T A F M L G L A V P Y H H W T T P G N	399
1198	CAC ATC GGC TTC GTG GTC ATG TAC GCC TTC ACC TTC TTC GGC AAC TTC GGC CCC	1254
400	H I G F V V M Y A F T F F A N F G P	418
1255	AAC TCC ACG ACC TTC ATC GTG CCG GCG GAG ATC TTC CCG GCG AGG CTG CGT TCC ACC	1311
419	N S T T F I V P A E I F P A R L R S T	437
1312	TGC CAC GGC ATC TCG GCG GCG GCG GGG AAG GCC GGC GCC ATC GTC GGG TCG TTC GGG	1368
438	C H G I S A A A G K A G A I V G S F G	456
1369	TTC CTG TAC GCG GCG CAG AGC ACG GAC GCG AGC AAG ACG GAC GCC GGC TAC CCG CCG	1425
457	F L Y A A Q S T D A S K T D A G Y P P	475
1426	GGC ATC GGC GTG CGC AAC TCG CTC TTC TTC CTC GCC GGA TGC AAC GTC ATC GGG TTC	1482
476	G I G V R N S L F F L A G C N V I G F	494
1483	TTC TTC ACG TTC CTG GTG CCG GAG TCG AAG GGG AAG TCG CTG GAG GAG CTC TCC GGC	1539
495	F F T F L V P E S K G K S L E E L S G	513
1540	GAG AAC GAG GAC GAT GAC GAT GTG CCG GAA GCG CCC GCG ACG GCC GAT CAC CCG ACT	1596
514	E N E D D D D V P E A P A T A D H R T	532
1597	GCG CCG GCG CCG CCA GCT TGA TAC CCC GCG GCA AAA CCC AAA TGG TCA ATC ATC AGT	1653
533	A P A P P A Stop	538
1654	GTT TTG TTG TAA TAT ATG TGC AAT GGA TGA TTA TTC TGG TTC TGC TAG TGT ACC AAA	1710
1711	CAA AAT TAC AAA TAC TAG TCG TCA ACC CAG GCA ACG CAC	1749

Fig. 11. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsPT3*.

1	ATG GCG GGC GAT CAG ATG CAC GTG CTC TCC GCG CTG GAC AGC GCC AAG ACG CAG TGG	57
1	M A G D Q M H V L S A L D S A K T Q W	19
58	TAC CAC TTC ACC GCC ATC GTC ATC GCC GGC ATG GGC TTC TTC ACC GAC GCC TAC GAC	114
20	Y H F T A I V I A G M G F F T D A Y D	38
115	CTC TTC TGC ATC TCC CTC GTC ACC AAG CTC ATC GGC CGC GTC TAC TAC ACC GCC GAC	171
39	L F C I S L V T K L I G R V Y Y T A D	57
172	GGC GCG TCC AAG CCG GGC AGC CTG CCG CCC AAC GTC TCG GCG GCC GTG AAC GGC GTC	228
58	G A S K P G S L P P N V S A A V N G V	76
229	GCC TTC GTC GGC ACG CTC ACG GGG CAG CTC TTC TTC GGG TGG CTC GGC GAC AGG GTC	285
77	A F V G T L T G Q L F F G W L G D R V	95
286	GGC CGG AAG AGC GTC TAC GGC ATG ACG CTG CTC TTG ATG ATC ATC TGC TCC GTC GCG	342
96	G R K S V Y G M T L L L M I I C S V A	114
343	TCG GGG CTG TCG TTC GGG GAC ACG CCG ACG AGC GTC ATG GCC ACG CTC TGC TTC TTC	399
115	S G L S F G D T P T S V M A T L C F F	133
400	CGC TTC TGG CTC GGC TTC GGC ATC GGC GGC GAC TAC CCG CTC AGC GCC ACC ATC ATG	456
134	R F W L G F G I G G D Y P L S A T I M	152
457	TCG GAG TAC GCG AAC AAG CCG ACG CGG GCG TTC ATC GCC ACC GTG TTC CAG ATG	513
153	S E Y A N K R T R G A F I A A V F A M	171
514	CAG GGG TTC GGG ATC CTC GCC GGC GGC GCG GTG GCG ATC GGG ATC ACC GCG ATC TTC	570
172	Q G F G I L A G G A V A I G I T A I F	190
571	AGG AGC CGG TTC CCC GCG CCG CCG TTC GCC GCC GAC CCG GCG GGT CCC ACC CCG CCC	627
191	R S R F P A P P F A A D P A G P T P P	209
628	CAG GCC GAC TAC GTG TGG CCG CTC ATC CTC ATG TTC GGC GCG CTT CCC GCG GCG CTC	684
210	Q A D Y V W R L I L M F G A L P A A L	228
685	ACC TTC TAC TGG CCG ATG AGG ATG CCG GAG ACG GCG CCG TAC ACC GCC ATC GTC GCC	741
229	T F Y W R M R M P E T A R Y T A I V A	247
742	AAG AAC GCG GAG CCG GCC CCG GCC GAC ATG TCC AAG GTG CTC CAG GTG AAG ATC ACG	798
248	K N A E R A A A D M S K V L Q V K I T	266
799	GCG GAG CAG GCG GAG ATG GCC TCG CCG GTG GAC AAG CCC TTC ACC AGC AAG CCC TTC	855
267	A E Q A E M A S P V D K P F T S K P F	285
856	GGC CTC TTC TCC GGC GAG TTC CCG CCG CCG GGG TTC CAC CTC CTG GGC ACG ACG	912
286	G L F S G E F A R R H G F H L L G T T	304
913	TCG ACG TGG CTC CTC CTG GAC ATC GCC TAC TAC TCC CAG AAC CTG TTC CAG AAG GAC	969
305	S T W L L L D I A Y Y S Q N L F Q K D	323
970	ATC TTC AGC GCC ATC GGG TGG ATC CCG GAG GCG AAG ACG ATG AGC GCG CTG GAC GAG	1026
324	I F S A I G W I P E A K T M S A L D E	342
1027	CTG TAC CAC ATC GCG CCG CCG CAG ACG CTG ATC GCG CTG TGC GGG ACG GTG CCG GGC	1083
343	L Y H I A R A Q T L I A L C G T V P G	361
1084	TAC TGG TTC ACG GTG GCG CTG ATC GAC GTG GTC GGG CCG TTC AAG ATC CAG GCG GCG	1140
362	Y W F T V A L I D V V G R F K I Q A A	380
1141	GGG TTC TTC GTG ATG ACG GCG TTC ATG CTG GCG CTG GCG GTG CCG TAC GAC CAC TGG	1197
381	G F F V M T A F M L A L A V P Y D H W	399
1198	ACG GCG GCG GGG AAC CAG ATC GGG TTC GTG GTG CTG TAC GCG CTC ACC TTC TTC TTC	1254
400	T A A G N Q I G F V V L Y A L T F F F	418
1255	GCC AAC TTC GGG CCG AAC GCG ACG ACG TTC ATC GTG CCG GCG GAG ATA TAC CCG GCG	1311
419	A N F G P N A T T F I V P A E I Y P A	437
1312	AGG CTG CCG GCG ACG TGC CAC GGG ATA TCG GCG GCG TCG GGG AAG GTG GGC GCG ATC	1368
438	R L R A T C H G I S A A S G K V G A I	456
1369	GTC GGG TCT TTC GGG TTC CTG TAC CTG GCG CAG AGC CCC GTC CCG GCC AAG GCG GCG	1425
457	V G S F G F L Y L A Q S P V P A K A A	475
1426	GCG CAC GGC TAC CCG CCG GGC ATC GGC GTC CCG AAC TCG CTC TTC GCG CTC GCC GGC	1482
476	A H G Y P P G I G V R N S L F A L A G	494
1483	TGC AGC TTG CTC GGC TTC CTC CTC ACC TTC CTT GTG CCG GAG CCC AAG GGC AAG TCG	1539
495	C S L L G F L L T F L V P E P K G K S	513
1540	CTC GAG GAG ATG TCA CCG GAG AAC GAG GTC GGC CAG CCG TGA TCC ACC CGT TAA TTC	1596
514	L E E M S R E N E V G Q P Stop	526
1597	CAC CCG CGT CCG T	1609

Fig. 12. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsPT4*.

Table 5. Similarity of the deduced amino acid sequences of *OsPTs* to the amino acid sequences of other plant phosphate transporters

Protein	Identity (%)			
	OsPT1	OsPT2	OsPT3	OsPT4
OsPT1	100	84	74	70
OsPT2	84	100	71	71
OsPT3	74	71	100	73
OsPT4	70	71	73	100
AtPT1	72	72	74	72
AtPT2	69	71	72	73
LePT1	73	72	76	74
LePT2	73	72	74	71
NtPT1	72	74	77	74
StPT1	72	73	76	75
StPT2	71	71	71	69

AtPT1 and AtPT2, *Arabidopsis thaliana*; LePT1 and LePT2, *Lycopersicon esculentum*; NtPT1, *Nicotiana tabacum*; OsPT1, OsPT2, OsPT3 and OsPT4, *Oryza Sativa*; StPT1 and StPT2, *Solanum tuberosum*

OsPTs는 감자, 담배, 토마토, *Arabidopsis*, *M. truncatula*의 인산수송자와 계통학적 상이한 군에 속하여 인산 수송자는 단자엽식물군과 쌍자엽식물군의 2개의 군으로 분리되었다(Fig. 13). 이는 단자엽과 쌍자엽의 공통 조상 이전에 유전자가 진화적으로 분기되었을 가능성을 시사한다(Paszkowski 등, 2002).

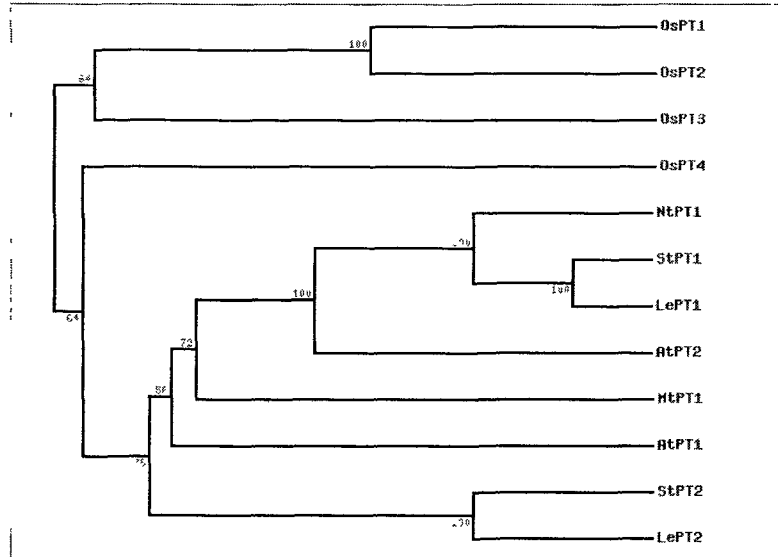


Fig. 13. Phylogenetic relationship of 12 phosphate transporters. Amino acid sequences were aligned and a parsimonious tree was constructed using the Phylip program of GeneBee. Bootstrap support values are indicated above the branch lines. Abbreviations for the sequences are *Oryza Sativa* (OsPT1, OsPT2, OsPT3 and OsPT4), *Arabidopsis thaliana* (AtPT1 and AtPT2), *Lycopersicon esculentum* (LePT1 and LePT2), *Medicago truncatula* (MtPT1), *Nicotiana tabacum* (NtPT1) and *Solanum tuberosum* (StPT1 and StPT2) transporters, respectively.

며 인산 수송자 단백질은 12 membrane-spanning domains (MSDs)을 포함하는 전형적인 막단백질의 구조적 특성을 보였다 (Fig. 14 and 15). OsPTs의 12개 소수성 영역은 NtPT1(Baek et al., 2001a)과 동일하며 평균 hydropathy 지수가 1.3 보다 큰 17~21개의 아미노산으로 구성 되어 있고(Kyte and Doolittle, 1982), 중앙의 친수성 영역(hydrophilic domain)을 중심으로 6개의 N-terminal domains과 6개의 C-terminal domains으로 구분된다. OsPTs 아미노산 서열은 다른 식물의 인산수송자와 마찬가지로 인산화와 당화 부위를 포함하며, 인산화의 공통영역 [ST]-×-[RK]는 OsPT1, OsPT2 및 OsPT4는 239~241 위치에, OsPT3은 238~240 위치에 protein kinase C 인산화 부위로 존재한다. 또한 인산화의 공통영역 [ST]-×(2)-[DE]는 OsPT1, OsPT2는 421~424, OsPT3은 419~422, OsPT4는 423~426 위치에 casien kinase II 인산화 부위로 존재하고, 공통영역 N-{P}-[ST]-{P}인 N-당화 부위

는 OsPT1, OsPT2는 507~510, OsPT3은 513~516, OsPT4는 509~512 위치에 존재한다. 이들 인산화 부위와 N-당화 부위는 그림 19에서 비교한 모든 인산 수송자에서 완전하게 보존되어 있다(Muchhal et al., 1996; Leggewie et al., 1997; Smith et al., 1997; Liu et al., 1998a; Baek et al., 2001a).

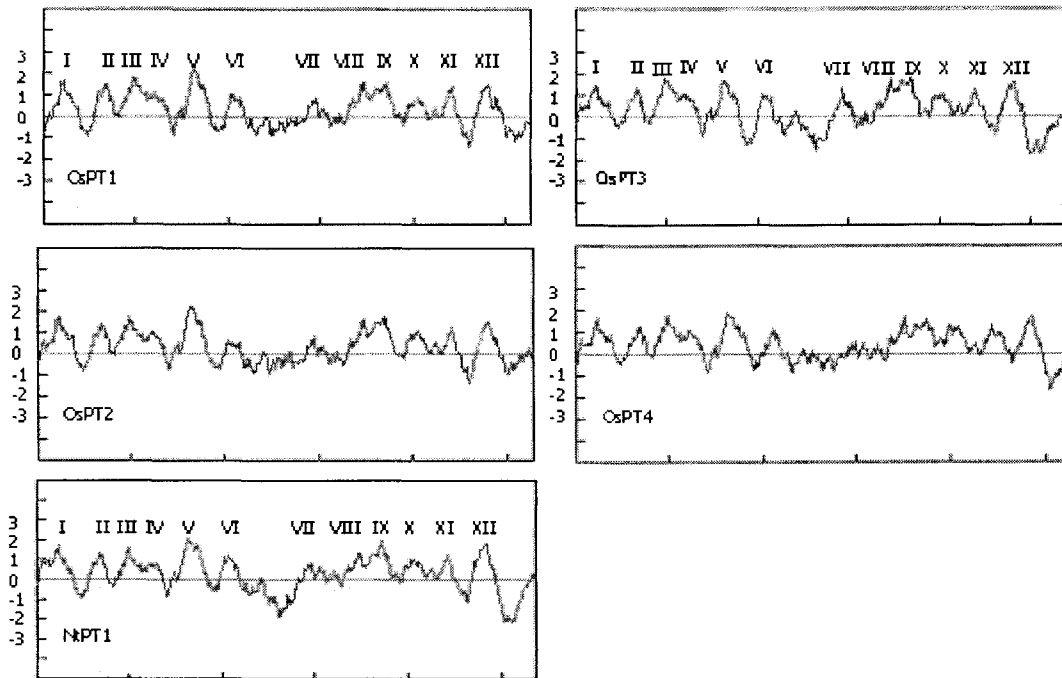


Fig. 14. Hydrophobicity profiles of OsPTs (OsPT1, OsPT2, OsPT3 and OsPT4) and NtPT1 (Baek et al., 2001a). Hydropathy values for a window of 21 residues were calculated by TopPred (Claros and von Heijne, 1994) using algorithms of Kyte and Doolittle (1982). Hydrophobic regions correspond to the positive index numbers. The roman numerals refer to putative membrane-spanning domains.

I

II

OsPT1 MAGGQLNVLSTRDQAKTOWYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYTDSKQTPGALPPNVSAAVTGVALCGTLAGQLFFGW 90
OsPT2 MAGSQLNVLVKLDQAKTOWYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCIALVTKLLGR IYYTDTKPNPGTLPPNVSSAVTGVALCGTLAGQLFFGW 90
OsPT3 MAG-ELKVLNALSADAKTOWYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYFNPAKSPGSLPPNVSAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 89
OsPT4 MAGDQMHVLSALDSADAKTOWYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKL IGRVYTTADGASKPGSLPPNVSAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 90
NtPT1 MAKDQLQVLNALSADAKTQLYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYHHDGAPKPGTLPPNVSAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 90
StPT1 MAN-DLQVLNALSADAKTQLYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYHHDNALKPGSLPPNVSAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 89
LePT1 MAN-DLQVLNALSADAKTQLYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYHHDGALKPGSLPPNVSAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 89
AtPT1 MAEQQLGVLKALDSADAKTQLYHFMAIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYFNPEKSPGSLPPHVAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 90
AtPT2 MAREQLQVLNALSADAKTQLYHFMAI IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYHVEGAQKPGTLPPNVSAAVNGVAFVGLTLAGQLFFGW 90
MtPT1 MSG-ELGVLNALSADAKTQLYHFTTIV IAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGR IYYTEPNPTRPGTLPPSAQSAVTGVALVGLTLAGQLFFGW 89

III

IV

OsPT1 LGDKLGRKSVYGF TLLM VVCSVASGLSFGSSAKGVVSTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGFGLFGA 180
OsPT2 LGDKLGRKSVYGF TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYASKKTRGAFIAAVFAMQGFGLFGA 180
OsPT3 LGDKMGRKKVYGM TLLM VVCSIASGLSFGSSAKGVVSTLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGFGLTGG 179
OsPT4 LGDKMGRKKVYGM TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGFGLAGG 180
NtPT1 LGDKMGRKKVYGM TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGFGLAGG 180
StPT1 LGDKMGRKKVYGM TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGFGLAGG 179
LePT1 LGDKMGRKKVYGM TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGFGLAGG 179
AtPT1 LGDKLGRKSVYGF TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGFGLAGG 180
AtPT2 LGDKLGRKSVYGM TLLM VVCSIASGLSFGHTPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFVSAVAMQGFGLMAGG 180
MtPT1 LGDKLGRKSVYGF TLLM VVCSVGSGLSFGSSPKSVIATLCFFRFWLGFGIGGDYPLSATIMSEYANKKTRGAFIAAVFAMQGFGLGGG 179

V

VI

OsPT1 IVALAVSAGFRHAYPAPSYSNDHAAS-LVPQADYVWR IILMFGTVPALTYWRHMKMPETARYTAL IARNAKQAAADM SKVLHTQIEESA 269
OsPT2 IVALVVSAGFRHAYPAPSYAQNPAAS-LAPQADYVWR IILMFGTIPAGLTYWRHMKMPETARYTAL IARNAKQAAADM SKVLHAEIEERP 269
OsPT3 IVALIIVSAAFKSRFPADAPAYRDRGTS-TVPQADYVWR IILMFGAIPALLTYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNAKQAAADM TQVNLNVEIEEEQ 268
OsPT4 AVAIGITAIIFRSRFPAPPAADPAGP-TPPQADYVWR IILMFGALPAALTYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNAERAAAADM SKVLQVKITAEQ 269
NtPT1 MVAI IIVSAAFKGAFFAPQTYQTDPLGS-TVQADYVWR IILMFGAIPAAITYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNLKQAADM SKVLQVQIEEEQ 269
StPT1 MVAI IIVSAAFKGAFFAPAYEVDALAS-TVQADYVWR IILMFGAIPAGLTYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNLKQAADM SKVLQVEIEAEP 268
LePT1 MVAI IIVSAAFKGAFFAPAYEVDIGS-TVPQADYVWR IILMFGAIPAGLTYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNLKQAADM SKVLQVEIEAEP 268
AtPT1 FVALAVSSIFDKKFPAPTYAVNRALS-TPPQVQYIWR IILMFGALPAALTYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNIKQATADM SKVLQTDIELEE 269
AtPT2 IFAI IIVSAFAEFKSPAYADALGS-TIPQADYVWR IILMAGAIPAAITYWRHMKMPETARYTAL IAVAKDAKQAADM SKVLQVEIEPEQ 269
MtPT1 IVALIVASIFDHKHYKPTFEENPATSILVPQDYVWR IILMFGALPAALTYWRHMKMPETARYTAL IAVAKNAKQAAADM SKVLQVEIEVEE 269

VII

VIII

OsPT1 DRAETV---AVGGESWGLFSRQFLRRHGLHLLATTSTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSKVGI PPAKTMNALEELYR IARAQALIALCGTIP 357
OsPT2 EVVESQVVAG---ETWGLFSRQFMKRHGMHLLATTSTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSKVGI PPAKTMNALEELYR ISRAQALIALCGTIP 357
OsPT3 EKADAVARRE---QFGLFSRQFLRRHGRHLLGTTVCWFVLDIAFYSSNLFQKDI YTAVQNLPKADTMSALEEMFK ISRAQTLVALCGTIP 355
OsPT4 EMASPVDPKPFSTKPFGLFSGEFARRHGFLHLLGTTSTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPEAKTMSALDELYH IARAQTLIALCGTVP 359
NtPT1 EKVENVSQNT-RNEFGLFSKEFLRRHGLHLLGTASTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPPAQTMMNALEEVYK IARAQTLIALCSTVP 358
StPT1 EKVGAISEAKGANEFGLFSKEFLRRHGLHLLGTASTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPPAQTMMNALEEVYK IARAQTLIALCSTVP 358
LePT1 EKVTAISEAKGANDFGLFKEFLRRHGLHLLGTASTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPPAQTMMNALEEVYK IARAQTLIALCSTVP 358
AtPT1 -RVEDDVKDP-RQNYGLFSKEFLRRHGLHLLGTTSTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPKAATMNATHEVFR IARAQTLIALCSTVP 357
AtPT2 QKLEEISKEK-SKAFGLFSKEFMSRHGLHLLGTTSTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPPAQSMNAIQEVFK IARAQTLIALCSTVP 358
MtPT1 EKVQKMTSDK-RNSYGLFSKQFAARHGLALFGTCTWFLLDIAFYQNLFQKDI FSAIGW IPPAKEMNAIHEVYK IARAQTLIALCSTVP 358

IX	X		
<u>OsPT1</u>	<u>GYWFTVAF</u> E MGRFW Q MGFAMMTAF MGLA PYHHWTT PGHHTGF VMYGFTEFFANFGPNSTTF VPAAE YPARLRSTCHG SAAA	447	
<u>OsPT2</u>	<u>GYWFTVAF</u> D VGRFW Q MGFMMTVF MGLAVPYDHWTHPAHHTGFVLYALTEFFANFGPNSTTF VPAAE YPARLRSTCHG SAAS	447	
<u>OsPT3</u>	<u>GYWFTVFF</u> D I GRFV QLGGFFMTAF MGLAVPYHHWTT PGNH GFVVMYAFTEFFANFGPNSTTF VPAAE YPARLRSTCHG SAAA	445	
<u>OsPT4</u>	<u>GYWFTVAL</u> D VVGRFK QAAGFFVMTAF MGLAVPYDHWTAAGNQ GFVLYALTEFFANFGPNATTF VPAAE YPARLRATCHG SAAS	449	
<u>NtPT1</u>	<u>GYWFTVFF</u> D K GRFA QLMGFFMTVFMFALA PYHHWTLKDNR GFV MYSLTEFFANFGPNATTFVVPAAE YPARLRSTCHG SAAA	448	
<u>StPT1</u>	<u>GYWFTVAF</u> D R GRFA QLMGFFMTVFMFALA PYHHWTLKDNR GFVVMYSLTEFFANFGPNATTFVVPAAE YPARLRSTCHG SAAA	448	
<u>LePT1</u>	<u>GYWFTVAF</u> D K GRFA QLMGFFMTVFMFALA PYHHWTLKDNR GFVVMYSFTTEFFANFGPNATTFVVPAAE YPARLRSTCHG SAAA	448	
<u>AtPT1</u>	<u>GYWFTVAF</u> D T GRFK QLMGFFMTVFMFA IAFPNHW KPENR GFVVMYSLTEFFANLGNATTF VPAAE YPARLRSTCHG SAAA	447	
<u>AtPT2</u>	<u>GYWFTVAF</u> D V GRFA QMMGFFMTVFMFALA IYPYHWHK ENR GFV MYSLTEFFANFGPNATTFVVPAAE YPARFRSTCHG SAAS	448	
<u>MtPT1</u>	<u>GYWFTVAF</u> D H MGRFA QMMGFFMTVFMFLA I PYDHW SKEENR GFVVMYSLTEFFSNFGPNAATFVVPAAE YPARLRSTCHG SAAA	448	
XI	XII		
<u>OsPT1</u>	<u>GKAGA</u> I GAFGLYAAQ ---DQHKPEPGYPRG I G KNALFVLAGTNFLGT <u>MTLLV</u> VPESKGTSL EV SQEVA GDDEEAAYPK -----	527	
<u>OsPT2</u>	<u>GKAGA</u> I GAFGLYAAQ ---DQHNP DAGHSRG I G RNALFVLAGTNFLGM <u>MTLLV</u> VPESKGLSLEEMSKONV VDETAQEA I AQA -----	528	
<u>OsPT3</u>	<u>GKAGA</u> I VGSFGLYAAQ STDASKTDAGYPPG I G VRNSLFFLAGCNV I G FFFTE L VPESKGSLEELSGENEDDDVPEAPATADHRTAP ApPA	538	
<u>OsPT4</u>	<u>GKVA</u> I VGSFGLYLAQ SPVPAKAAAGYPPG I G VRNSLFFLAGCSLLG L L FTE L VPPEPKGSLEEMSRNEV GQP -----	526	
<u>NtPT1</u>	<u>GKAGAM</u> I GAFGLYAAQ PDRKKADAGY PAG I G VRNSL V L GCVN FLGM FTE L VPESKGSLEEMSRNEGEEESGTE MKNS -GRTVPV ---	537	
<u>StPT1</u>	<u>GKAGAM</u> V GAFGLYAAQ PDKKTDAGYPPG I G VRNSL V L GCVN FLGM FTE L VPESNGK SLEEMSRNEGEEETVAEM RATSGRTV LF -KF	537	
<u>LePT1</u>	<u>GKAGAM</u> V GAFGLYAAQ PDKTDAGYPPG I G VRNSL V L GCVN FLGM FTE L VPESNGK SLEELSRNEGEEETVAE IRATSGRTV PV ---	537	
<u>AtPT1</u>	<u>GKAGA</u> I GAFGLYAAQ NQDKAKVDAGYPPG I G VKNSL V L GVLN F G M FTE L VPPEPKGSLEELSGEAEVSHDEK -----	525	
<u>AtPT2</u>	<u>GKLGAM</u> V GAFGLYLAQ NPDKDKTDAGYPPG I G VRNSL V L GVVN FLG I L FTE L VPESKGSLEEMSGENEDNEN ----SNNDSRTVP I -V	532	
<u>MtPT1</u>	<u>GKAGA</u> I V GAFGLYAAQ SKDPTKDKGYPTG I G I KNSL I M LGV I N FVGM L CTLLV VPESKGSLEELSGENEGEGAEATEQEGPRFENVA ----	537	

Fig. 15. Alignments of amino acid sequences of OsPTs to *Arabidopsis thaliana* (AtPT1 and AtPT2), *Lycopersicon esculentum* (LePT1), *Medicago truncatula* (MtPT1), *Nicotiana tabacum* (NtPT1) and *Solanum tuberosum* (StPT1) phosphate transporter sequences. The membrane-spanning domains of OsPTs as predicted by TopPred (Claros and von Heijne, 1994) are underlined and their numbering is indicated by roman numerals (I-XII). The solid line-boxed sequences are consensus sites for protein kinase C (238 or 239), the broken line-boxed sequences are consensus sites for N-glycosylation (419, 421 or 423), and solid line-boxed and shaded sequences are consensus sites for casein kinase II (507 or 513). Numbers in the parenthesis are the amino acid positions numbered on OsPTs sequence.

(다) 인산수송자 기능 확인

유전자의 기능은 해당 기능이 결여된 돌연변이 계통을 이용하여 확인할 수 있다. 인산수송자가 결여된 돌연변이주 MB192는 고농도의 인산 배양액에서도 인산 흡수가 저해된다. 반면, repressible acid phosphatase(rAPase)의 활성은 정상 yeast의 rAPase 활성이 억제되는 고농도의 인산 배지에서도 활성이 매우 높다. 즉 인산수송자의 기능회복에 의해 세포내 인산농도가 증가하면 rAPase의 활성은 억제될 수 있음을 의미한다. 따라서 rAPase 활성을 염색하는 diazo-coupling 반응을 이용하여 yeast에서 발현된 식물 인산 수송자의 기능을 확인할 수 있다.

MB192 대조세포와 MB192에 *OsPTs*가 도입된 재조합 벡터인 YOsPTs를 형질전환한 세포를 고농도의 인산(11 mM KH_2PO_4)이 첨가된 배지에 배양하여 diazo-coupling 염색한 결과, 대조세포에서만 적색 염색이 되고 YOsPTs 세포는 모두 염색이 되지 않았다. 이는 인산수송 시스템이 결여된 돌연변이주 MB192의 인산 수송 시스템이 *OsPTs*의 발현에 의해 인산흡수 기능이 회복된 결과라 할 수 있다(Fig. 16).

저농도 인산(110 μM KH_2PO_4)이 첨가된 배지에서 대조세포와 YOsPTs 세포의 성장량을 조사한 결과, YOsPTs 세포 모두 대조세포에 비해 평균 3배 정도 생장이 빨랐고, 그중 *OsPT1*이 도입된 세포가 다른 벼 인산 수송자가 도입된 세포에 비해 약 15% 높은 성장율을 나타내었다(Fig. 17). 돌연변이주 NS219를 이용한 저농도 인산(110 μM KH_2PO_4) 조건에서의 성장을 비교 실험에서 *Arabidopsis AtPT1* (Muchhal 등, 1996)와 담배의 *NtPT1*(Baek 등, 2001)은 돌연변이주의 성장을 각각 약 2.5배와 3배 촉진시켰다. 결론적으로 yeast내에서 *OsPTs*에서 발현된 단백질이 인산 수송자로 작용하여 인산 수송자 돌연변이 yeast가 인산을 정상적으로 흡수하도록 하여 rAPase의 활성을 억제하고 저인산 조건에서 yeast의 성장을 빠르게 하였다. 따라서 *OsPTs*는 정상적인 인산 수송 단백질을 합성하는 완전한 유전자라 할 수 있다.



Fig. 16. Acid phosphatase activity tests were conducted with yeast mutant strain, MB 192 (E) and transformants of YOsPT1 (A), YOsPT2 (B), YOsPT3 (C) and YOsPT4 (D). Cells were grown on YNB medium-high-phosphate (11 mM) plates for 4 days before staining for acid phosphatase activity. The red color indicates the presence of acid phosphatase activity.

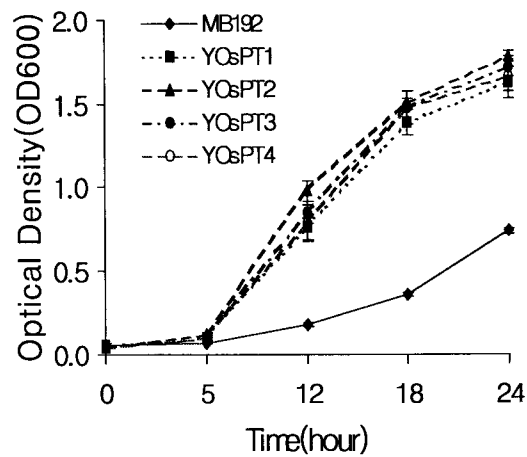


Fig. 17. Growth of mutant strain MB192 compared with transformants of YOsPT1, YOsPT2, YOsPT3 and YOsPT4 in YNB medium-low phosphate (110 μ M).

(라) 인산수송자의 발현

*OsPT1*은 320 μM 인산 처리구의 잎과 뿌리에서는 발현되지 않으나, 인산 결핍시 뿌리에서만 발현되었다(Fig. 18A). 또한 N, P, K, Fe 각각의 무기이온 결핍조건에서 *OsPT1*은 인산이 결핍된 뿌리에서 강하게 발현되고, N과 Fe 결핍조건에서는 매우 낮은 수준으로 발현이 유도되나 K 결핍에 의해서는 발현이 유도되지 않았다(Fig. 18B). 인산 결핍조건에서 *OsPT1*은 인산 결핍처리 12시간 후부터 발현이 유도되기 시작하여 시간이 경과할수록 발현량이 증가하여 인산 결핍 5일째에 최고에 달하였다(Fig. 18C). *OsPT1*의 발현은 인산의 첨가량이 증가할수록 감소하였으며, 200 μM 의 인산 농도에서 발현이 급격히 줄어들었고, 320 μM 인산 농도에서는 발현되지 않았다(Fig. 18D).

토마토의 인산수송자 *LePT2*는 인산 결핍 뿌리에서만 발현되고, N, K 등 다른 무기이온 결핍조건에서는 발현되지 않으며 인산 결핍 5일째에 발현이 가장 높고, 250 μM 의 인산 농도에서는 발현되지 않는다(Liu et al., 1998). 이상의 *OsPT1*의 발현 양상은 *OsPT1*이 인산 결핍시 뿌리에서 발현하는 고친화성 인산 수송자의 유전자임을 나타낸다.

(4) 벼 인산수송자 유전자의 유전체내 조성

OsPT1, *OsPT2*, *OsPT3*, *OsPT4* 상호간에는 높은 상동성이 존재하므로 각 유전자의 전체 염기서열을 탐침으로 사용하여 Southern blot을 실시한 경우에는 모든 clone에서 10-13개의 단편이 유사한 양상으로 나타났다(Fig. 19). 이는 벼 유전체에 다수의 인산수송자 유전자가 균으로 존재함을 의미한다.

벼 인산 수송자 동위형간에 상동성이 낮은 C-말단 부위의 100bp 정도의 서열을 이용하여 동위형 특이적 탐침자를 제작하여 인산 수송자의 구성을 조사한 결과, 동위형 특이적인 band 양상을 나타내었다(Fig. 20).

Paszowski 등(2002)은 벼 유전체 염기서열을 분석하여 13종의 인산 수송자를 보고하였으며, *Arabidopsis*(Muchhal et al., 1996), 담배(Baek et al., 2001a; Kai et al., 2002), 토마토(Liu et al., 1998a), 감자(Leggewie et al., 1997)에서도 2~4종의 동위형 인산 수송자로 구성된 유전자군이 존재하는 것으로 보고되었다. 이러한 유전자 조성은 식물이 다수의 동위형 인산 수송자의 특이적 조절을 통하여 인산의 흡수와 이용 과정을 조절할 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

*OsPT1*의 인산농도에 대한 민감한 반응은 당해 유전자의 발현을 조절하는 조성자의 작용 결과라 할 수 있다. 따라서, 인산 고친화도 수송자와 promoter의 인산에 대한 반응 특성은 저농도 인산에서의 인산이용 효율 증대를 통한 친환경농법 적응형 품종 개발 가능성을 제시하고 있다.

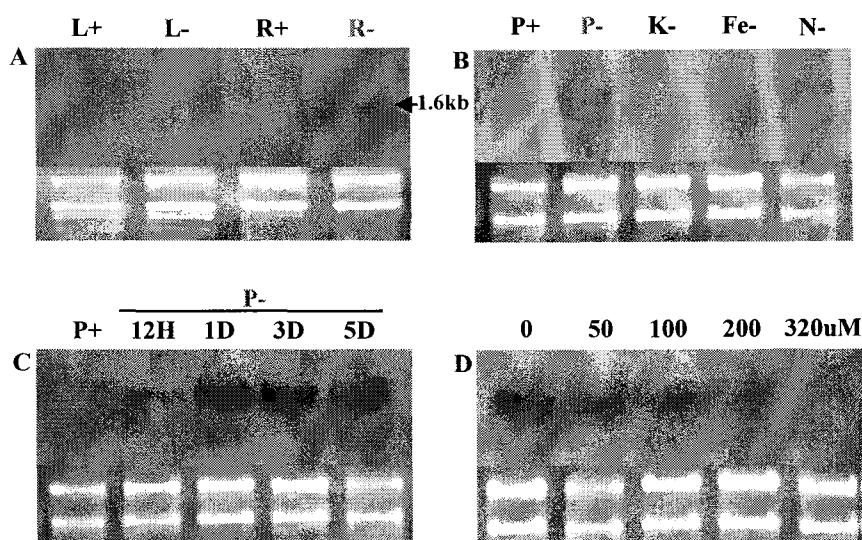


Fig. 18. Expression patterns of *OsPT1*. **A**, Total RNAs from leaves (L) or roots (R) of rice plants grown in the hydroponic solution containing 320 uM (+) or no phosphate (-) were hybridized with the alkaline phosphatase-labeled *OsPT1* probe. **B**, Effect of different nutrient starvation on the expression of *OsPT1*. The roots of rice plants were grown in the hydroponic solution containing 320 uM phosphate (P+), no phosphate (P-), no potassium (K-), no iron (Fe-) or no nitrogen (N-), respectively. **C**, Expression in roots grown in the hydroponic solution containing 0 (P-) or 320 uM Pi (P+). Pi starvation was imposed for 12h (12H), 1, 3, and 5 day (D), respectively. **D**, Effect of different concentration of Pi on the expression of *OsPT1*. The roots of rice plants were grown in the hydroponic solution containing different concentrations of Pi for 5 d.

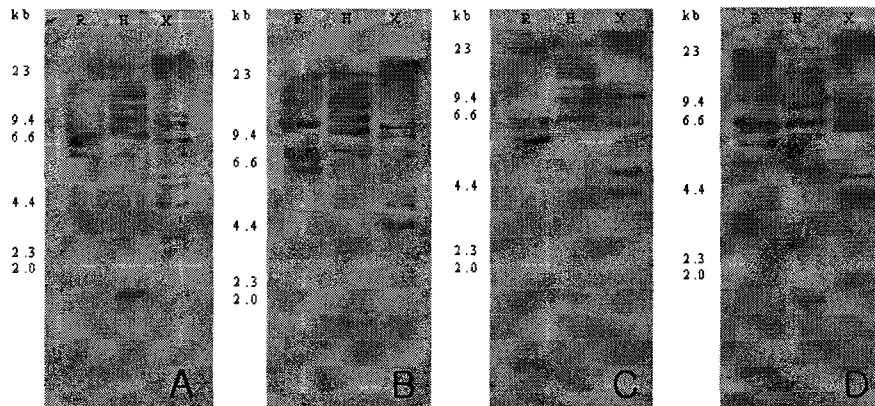


Fig. 19. Southern-blot analyses of *OsPT1* (A), *OsPT2* (B), *OsPT3* (C), and *OsPT4* (D) with rice genomic DNA digested with the restriction enzyme, *EcoR* I (R), *Hind* III (H) or *Xba* I (X). After hybridization the membrane was washed in a primary wash buffer (2 M urea, 0.1% SDS, 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.2% blocking reagent) at 70°C for 20 min.

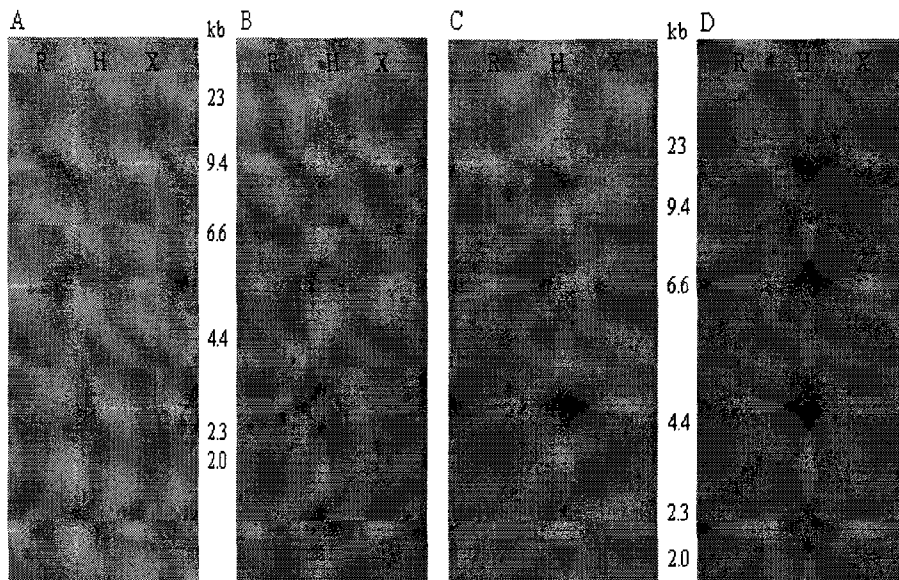


Fig. 20. Southern-blot analysis of rice genomic DNA digested with *EcoR* I (R), *Hind* III (H) or *Xba* I (X). Blots were hybridized with *OsPT1*- (A), *OsPT2*- (B), *OsPT3*- (C), and *OsPT4*-specific (D) DNA fragments.

(2) 암모니움수송자 유전자

(가) 암모니움수송자의 구조

암모니움 수송자(*OsAMT1-CB*) clone은 1687개의 염기로 구성되어 있으며 하나의 532개의 아미노산으로 되어 있는 단백질을 지령하는 ORF로 구성되어 있다. 번역된 아미노산 서열은 전형적인 막단백질의 특성인 transmembrane domain을 포함하고 있다(Howitt et al., 2000; Fig. 21). *OsAMT1-CB*는 *OsAMT1-1*과 99%의 높은 상동성을 보였다. 단자엽식물군과 쌍자엽식물군의 AMT는 유전적으로 서로 다른 연관군에 속하였으며, 단자엽식물군의 AMT는 3종의 아군으로 분화되어 있다(Fig. 22). 벼에서도 4종 이상의 AMT가 존재하여 화학형이 다른 질소 양분의 조건에 따라 AMT 및 Nitrate transporter(NT)의 발현의 다양한 조절이 가능하여 질소성분의 흡수이용을 조절하는 것으로 생각된다(Suenaga et al., 2003).

(나) 암모니아수송자의 발현

*OsAMT1-CB*의 유전자의 발현 조절 특성을 조사하기 위하여 정상 양분조건에서 생육한 유묘기 벼식물체를 5일간 무질소 조건에 처리한 다음 ① 무질소 조건 처리, ② 무질산태질소 + 30 μ M 암모니움 1일 처리, ③ 무 질산태질소 + 30 μ M 암모니움 3일 처리, ④ 무 질산태질소 + 100 μ M 암모니움 1일 처리, ⑤ 무 질산태질소 + 100 μ M 암모니움 3일 처리, ⑥ 100 μ M 질산태질소 + 무암모니움 1일 처리, ⑦ 100 μ M 질산태질소 + 무암모니움 3일 처리, ⑧ 정상 양분 조건 1일 처리 등 질소 양분 조건이 다른 조건에서 처리하였다. *OsAMT1-CB*의 발현은 잎보다는 뿌리에서 높았으며, 암모니아태 또는 질산태 질소 중 어느 형태의 질소에 의해서도 발현이 유도되었다(Fig. 23). 세균의 경우에는 적어도 4개 이상의 단백질로 구성된 global nitrogen regulation system에 의해 암모니움 수송자 유전자의 발현이 조절된다(Howitt et al., 2000).

다수의 *OsAMT*동위유전자의 존재와 본 연구에서의 양분조건에 대한 *OsAMT* 발현조절 결과는 *OsAMT* 발현이 복합적 인자들에 의하여 조절될 가능성을 시사하고 있다.

A

1	AG	AGA	GGA	GGG	TTT	GGT	GAG	GGA	GGG	AGG	AAG	ATG	GCG	ACG	TGC	GCG	47
1												M	A	T	C	A	5
48	GCG	GAC	CTG	GCG	CCG	CTG	CTG	GGG	CCG	GTG	GCG	GCG	AAC	GCG	ACG	GAC	95
6	A	D	L	A	P	L	L	G	P	V	A	A	N	A	T	D	21
96	TAC	CTG	TGC	AAC	CGG	TTC	GCC	GAC	ACG	ACG	TCG	GCG	GTG	GAC	GCG	ACG	143
22	Y	L	C	N	R	F	A	D	T	T	S	A	V	D	A	T	37
144	TAC	CTG	CTC	TTC	TCG	GCG	TAC	CTC	GTG	TTC	GCC	ATG	CAG	CTC	GGG	TTC	191
38	Y	L	L	F	S	A	Y	L	V	F	A	M	Q	L	G	F	53
192	GCG	ATG	CTC	TGC	GCC	GGG	TCG	GTG	GCC	AAG	AAC	ACG	ACG	ATG	AAC	ATC	239
54	A	M	L	C	A	G	S	V	R	A	K	N	T	M	N	I	69
240	ATG	CTC	ACC	AAC	GTG	CTC	GAC	GCC	GCG	GCC	GGG	GCG	CTC	TTC	TAC	TAC	287
70	M	L	T	N	V	L	D	A	A	G	A	L	F	Y	Y		85
288	CTC	TTC	GCC	TTC	GCC	TTC	GCC	TTC	GCC	ACG	CCG	TCC	AAC	GGC	TTC	ATC	335
86	L	F	G	F	A	F	A	F	G	T	P	S	N	G	F	I	101
336	GGG	AAG	CAG	TTC	TTC	GGC	CTC	AAG	CAC	ATG	CCG	CAG	ACC	GGG	TTC	GAC	383
102	G	K	Q	F	F	G	L	K	H	M	P	Q	T	G	F	D	117
384	TAC	GAC	TTC	TTC	CTC	TTC	CAG	TGG	GCC	TTC	GCC	ATC	GCC	GCC	GCC	GGG	431
118	Y	D	F	F	L	F	Q	W	A	F	A	I	A	A	A	G	133
432	ATC	ACG	TCG	GGC	TCC	ATC	GCC	GAG	AGG	ACG	CAG	TTC	GTC	GCC	TAC	CTC	479
134	I	T	S	G	S	I	A	E	R	T	Q	F	V	A	Y	L	149
480	ATC	TAC	TCC	GCC	TTC	CTC	ACC	GGG	TTC	GTC	TAC	CCG	GTG	GTG	TCC	CAC	527
150	I	Y	S	A	F	L	T	G	F	V	Y	P	V	V	S	H	165
528	TGG	ATC	TGG	TCC	GCC	GAT	GGG	TGG	GCC	TCT	GCC	TCC	CGC	ACG	TCC	GGG	575
166	W	I	W	S	A	D	G	W	A	S	A	S	R	T	S	G	181
576	CCT	CTG	CTG	TTC	GGC	TCC	GGT	GTC	ATC	GAC	TTC	GCC	GGC	TCC	GGC	GTC	623
182	P	L	L	F	G	S	G	V	I	D	F	A	G	S	G	V	197
624	GTC	CAC	ATG	GTC	GGC	GGT	GTC	GCC	GGC	CTC	TGG	GGC	GCG	CTC	ATC	GAG	671
198	V	H	M	V	G	G	V	A	G	L	W	G	A	L	I	E	213
672	GGC	CCC	CGC	ATC	GGG	AGG	TTC	GAC	CAC	GCC	GGC	CGA	TCG	GTG	GCG	CTC	719
214	G	P	R	I	G	R	F	D	H	A	G	R	S	V	A	L	229
720	AAG	GGC	CAC	AGC	GCG	TCG	CTC	GTC	GTG	CTT	GGC	ACC	TTC	CTG	CTG	TGG	767
230	K	G	H	S	A	S	L	V	V	L	G	T	F	L	L	W	245
768	TTC	GGC	TGG	TAC	GGA	TTC	AAC	CCC	GGG	TCG	TCC	ACC	ACC	ATC	CTC	AAG	815
246	F	G	W	Y	G	F	N	P	G	S	T	T	I	L	C	K	261
816	ACG	TAC	GGC	CCG	GCC	GGC	GGC	ATC	AAC	GGG	CAG	TGG	TCC	GGG	GTC	GGC	863
262	T	Y	G	P	A	G	G	I	N	G	Q	W	S	G	V	G	277
864	CGC	ACC	GCC	GTG	ACG	ACC	CTG	GCC	GGC	AGC	GTG	GCG	GCG	CTC	ACC		911
278	R	T	A	V	T	T	T	L	A	G	S	V	A	A	L	T	293
912	ACG	CTG	TTC	GGG	AAG	CGG	CTC	CAG	ACG	GGG	CAC	TGG	AAC	GTG	GTC	GAC	959
294	T	L	F	G	K	R	L	Q	T	G	H	W	N	V	V	D	309
960	GTC	TGC	AAC	GGC	CTC	CTC	GGC	GGG	TTC	GCC	GCC	ATC	ACC	GCC	GGG	TGC	1007
310	V	C	N	G	L	L	G	G	F	A	A	I	T	A	G	C	325
1008	AGC	GTC	GTC	GAC	CCG	TGG	GCC	GCG	ATC	TGC	GGG	TTC	GTC	TCG	GCG		1055
326	S	V	V	D	P	W	A	A	I	I	C	G	F	V	S	A	341
1056	TGG	GTG	CTC	ATC	GGC	CTC	AAC	GCG	CTC	GCC	GCG	CGC	CTC	AAG	TTC	GAC	1103
342	W	V	L	I	G	L	N	A	L	A	A	R	L	K	F	D	357
1104	GAC	CCG	CTC	GAG	GCC	GCC	CAG	CTC	CAC	GGC	GGG	TGC	GGC	GCG	TGG	GGG	1151
358	D	P	L	E	A	A	Q	L	H	G	G	C	G	A	W	G	373
1152	ATC	CTC	TTC	ACC	GCG	CTC	TTC	GCG	AGG	CAG	AAG	TAC	GTC	GAG	GAG	ATC	1199
374	I	L	F	T	A	L	F	A	R	Q	K	Y	V	E	E	I	389
1200	TAC	GGC	GCC	GGC	CGG	CCG	TAC	GGC	CTG	TTC	ATG	GGC	GGC	GGC	GGC	AAG	1247
390	Y	G	A	G	R	P	Y	G	L	F	M	G	G	G	G	K	405
1248	CTG	CTC	GCC	GCG	CAC	GTC	ATC	CAG	ATC	CTG	GTC	ATC	TTC	GGG	TGG	GTC	1295
406	L	L	A	A	H	V	I	Q	I	L	V	I	F	G	W	V	421
1296	AGC	TGC	ACC	ATG	GGA	CCT	CTC	TTC	TAC	GGG	CTC	AAG	AAG	CTC	GGC	CTG	1343
422	S	C	T	M	G	P	L	F	Y	G	L	K	K	L	G	L	437
1344	CTC	CGC	ATC	TCC	GCC	GAG	GAC	GAG	ACG	TCC	GGC	ATG	GAC	CTG	ACA	CGG	1391
438	L	R	I	S	A	E	D	E	T	S	G	M	D	L	T	R	453
1392	CAC	GGC	GGG	TTC	GCG	TAC	GTC	TAC	CAC	GAC	GAG	GAC	GAG	CAC	GAC	AAG	1439
454	H	G	G	F	A	Y	V	Y	H	D	E	D	E	H	D	K	469
1440	TCT	GGG	GTT	GGT	GGG	TTC	ATG	CTC	CGG	TCC	GCG	CAG	ACC	GCG	GTC	GAG	1487
470	S	G	V	G	G	F	M	L	R	S	A	Q	T	R	V	E	485
1488	CCG	GCG	GCG	GCC	GGC	TGC	CTC	CAA	CAG	CAA	CAA	CCA	AGT	GTA	ACC	AAT	1535
486	P	A	A	A	G	C	L	Q	Q	Q	Q	P	S	V	T	N	501
1536	CCA	GAA	CGA	ACG	ACG	TCA	CAG	CGA	AGG	AAG	AAA	TCA	CGG	GTT	TCT	CTC	1583
502	P	E	R	T	T	S	Q	R	R	K	K	S	R	V	S	L	517
1584	CCT	CTC	CGA	TCT	CGA	TGC	TCA	CGT	CAT	AAA	TTT	GAT	CCC	CAT	ATT	TGA	1631
518	P	L	R	S	R	S	S	R	H	K	F	D	P	H	I		532
1632	TTG	CCA	GTT	TCT	GTT	TGG	GCC	AAA	TGC	TTT	TGC	CGC	TCT	CTC	TGG	TGT	1679
1680	TGC	AAG	AC														1687

B

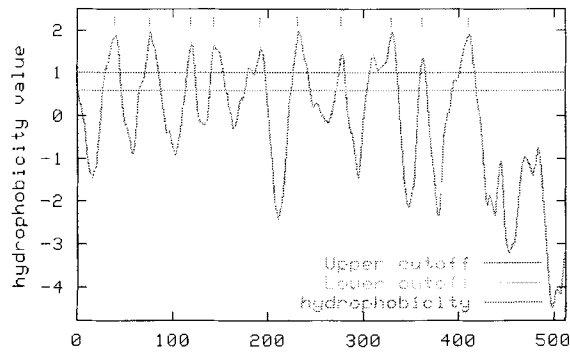


Fig. 21. A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsAMT1* cDNA clone. B. Hydrophobicity of polypeptide deduced from *OsAMT1* cDNA.

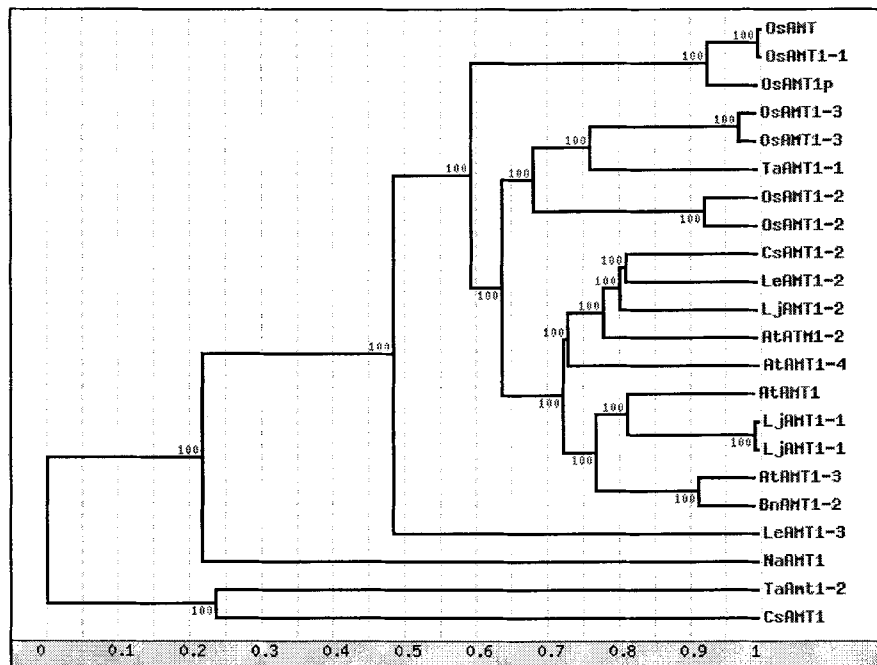


Fig. 22. Phylogenetic relationship among the plant ammonium transporters.

OsAMT: *Oryza sativa* AMT, TaAMT: *Triticum aestivum* AMT, CsAMT: *Camellia sinensis* var. *sinensis* AMT, LeAMT: *Lycopersicon esculentum* AMT, AtAMT: *Arabidopsis thaliana* AMT, LjAMT: *Lotus japonicus* AMT, BnAMT: *Brassica napus* AMT, NaAMT: *Nepenthes alata* AMT, CsAMT1: *Cucumis sativus*.

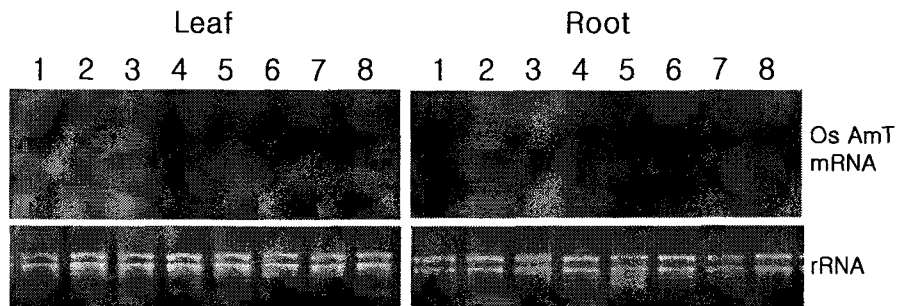


Fig. 23. Expression of *OsAMTI-CB* mRNA in the leaves and roots of young rice seedlings under various nitrogen conditions. Seedlings treated with solution with no nitrogen for 5 day were returned to solutions containing 1, no nitrate and 30 μ M ammonium for 3 day; 2, no nitrate and 30 μ M ammonium for 1 day; 3, no nitrate and ammonium for 1 day; 4, no nitrate and 100 μ M ammonium for 1 day; 5, no nitrate and 100 μ M ammonium for 3 day; 6, 100 μ M nitrate and no ammonium for 1 day; 7, 100 μ M nitrate and no ammonium for 3 day, and 100 μ M nitrate and 100 μ M ammonium for 1 day, respectively. Ethidium bromide-stained rRNA bands as an indicator of equal loading.

2. 지질수송단백질 유전자

양분조건에 차별적 발현반응을 보이는 유전자전사체 탐색을 통하여 양분조건에 특이적 발현을 보이는 지질수송자단백질(LTP) 전사체를 분리하였다. 유전자전사체 clone을 이용하여 완전한 LTP cDNA clone을 분리하여 그 분자구조와 양분조건과 호르몬에 대한 발현 특성을 조사하였다.

가. 재료 및 방법

cDNA 단리체의 분리와 분자구조 및 발현조절 특성 조사는 제 2 절 1-가항과 동일한 재료와 방법을 이용하여 실시하였다. 서로 다른 지질수송자단백질(LTP) 유전자의 발현 양상을 비교하기 위하여 RT-PCR을 사용하였다. Total RNA 5ug를 cDNA synthesis kit(TaKaRa, Japan)을 이용하여 Primary strand cDNA로 합성한 뒤 Purification kit(Qiagen, USA)를 이용하여 정제하였다 정제된 Primary strand cDNA를 주형으로 사용하여 94°C 5분간 변성시킨 뒤, 변성(94°C 45초), 결합(50°C 45초), 신장(72°C 45초) 등 3단계를 1회로 하는 증폭반응을 22회 반복하고 마지막에 72°C에서 5분간 신장반응을 시켰다.

식물체에 대한 호르몬 및 생물적 비생물적 장애 처리는 200 mM NaCl, 10 mM Salicylic acid(SA), 10 uM Abscisic acid(ABA), 2.5% (w/v) yeast extract 조건으로 5일간 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

LTP로 예상되는 유전자전사체 clone을 탐침으로 이용하여 cDNA library로부터 2종의 LTP clone을 분리하였으며, 그중 하나인 OsLTP1의 구조와 발현 특성을 상세히 조사하였다. OsLTP1 cDNA clone은 710개의 염기로 구성되어 있으며 132개의 아미노산을 지령하는 단일 ORF를 포함하고 있다(Fig. 24). OsLTP1에는 N-말단에 21개 아미노산으로 구성된 신호펩티드가 존재하고, 성숙 펩티드에 8개의 cysteine이 보존되어 있어 식물의 LTP에서 발견되는 공통적 구조를 공유하고 있다(Fig. 24; Kader, 1996).

OsLTP1은 벼에서 알려져 있는 LTP유형 중 Class II에 유사하였으나 염기서열과 아미노산 서열은 60-80% 정도의 낮은 상동성을 보였다(Fig. 25). 특히 염기서열의 경우 3'부분이 유사군에 관계없이 변이가 심하였다. OsLTP1단백질의 3차구조는 지질분자의 결합에 적합한 유연한 소수성 터널구조가 존재하고 있음을 보여준다(Fig. 26).

OsLTP1은 뿌리와 양분결핍조건에 특이적으로 발현되는 등 기지의 3종의 LTP와 매우 다른 발현 특성을 보였다(Fig. 27, 28). 벼에는 적어도 3-5종의 소규모 LTP유전자군이 존재하며 이들의 발현은 유전자의 종류에 따라 조직, 호르몬, 환경장애 조건에 대한 발현반응이 매우 다르다(Vignols et al., 1997). OsLTP1과 가장 상동성이 높은 Class II에 속하는 OsLTPa15는 물론 각각 I군과 III군에 속하는 b1과 b21은 잎에서 발현되나 뿌리에서는 거의 발현되지 않았다(Fig. 27). 특히, OsLTP1은 질소와 인산결핍조건의 뿌리에서의 발현이 현저히 증가하였으나 잎에서는 증가하지 않았다. 호르몬(ABA와 SA)과 염, 효모추출액의 처리에 의해서는 잎에서 염에 의한 약간의 발현증가를 제외하고는 뿌리와 잎에서 발현이 증가하지 않았다(Fig. 28).

LTP는 약 9 kD 정도의 염기성 단백질로 식물체내 함량이 매우 높다. LTP는 지질의 막간 이동 활성이 있어 막의 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 다양한 형태의 LTP가 조사되면서 LTP가 cutin 형성, 배 발생, 병저항성, 공생, 환경장애에 대한 적응에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다(Ge et al., 2003; Kader, 1996). 그러나 양분이용에 관련된 LTP는 아직 보고된 바 없으며 본 연구의 결과는 *OsLTP1*의 양분이용관련 작용성을 제시하는 새로운 발견이다.

1	ACG AGG CAA GCA GCA GCA AGC TCG AGC TAC TAG CTA GCT ACA CTA GCT	48
49	CGA TTA GTT GCA GCA ATG GCG GCG AAG GCG GCG CTT GTG CTG GCG GTG	96
1	M A A K A A L V L A V	11
97	AGC CTC CTG GTG GTG GCC ATG GCC GTG GCC TGC CCG GAC TGC CCT TCG	144
12	S L L V V A M A V A C P D C P S	27
145	CCG AAG CCA CCG GCG CCG AGG CCG AAG CCG CCG ACG CCT CAC TAC GGC	192
28	P K P P A P R P K P P T P H Y G	43
193	GGC GGG TCG TCG TGC CCG CGC GAC GCG CTG AAG CTG CAC GTG TGC GCC	240
44	G G S S C P R D A L K L H V C A	59
241	AAC GTG CTG GGC CTC GTC AAG GCC AAG GTC GGC GCC GTG TCG CCG TAC	288
60	N V L G L V K A K V G A V S P Y	75
289	GAG CCC TGC TGC TCG CTG CTC GAC GGC CTC GTC GAC CTC GAC GCC GCC	336
76	E P C C S L L D G L V D L D A A	91
337	GTC TGC CTC TGC ACC GCC ATC AAG GCC AAC GTG CTG GGC ATC AAG CTC	384
92	V C L C T A I K A N V L G I K L	107
385	AAC CTC CCC ATC GAC CTC AGC CTC ATC CTC AAC AAC TGC GGC AAG ATC	432
108	N L P I D L S L I L N N C G K I	123
433	TGC CCA TCC GAC TAC CAG TGC GTG CAC TAG ATC GAG ATC TAG AGA GCT	480
124	C P S D Y Q C V H	132
481	AGT GTT GCA CTT GAT CAC TCC ATG GCT GGG AGT ACC GTA TCT TCA TGT	528
529	TGT TTT TAC CCC CAA TAT CTT GAT GTG TTG TTA ATT TCT TGC TTT TTT	576
577	TTT CTT TTG ATT CTA TGG TTC GTG ATC CGT TGG TAG CGC TAT GAT CAT	624
625	TGT ATT TTT TTT TGT TTC TCA TGA TTT GTT ATA GTT TCG TCA ATA AAA	672
673	TGG AAA TGT ATT TTT TGT CGC ATA AAA AAA AAA AA	710

Fig. 24. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *OsLTP1* cDNA clone.

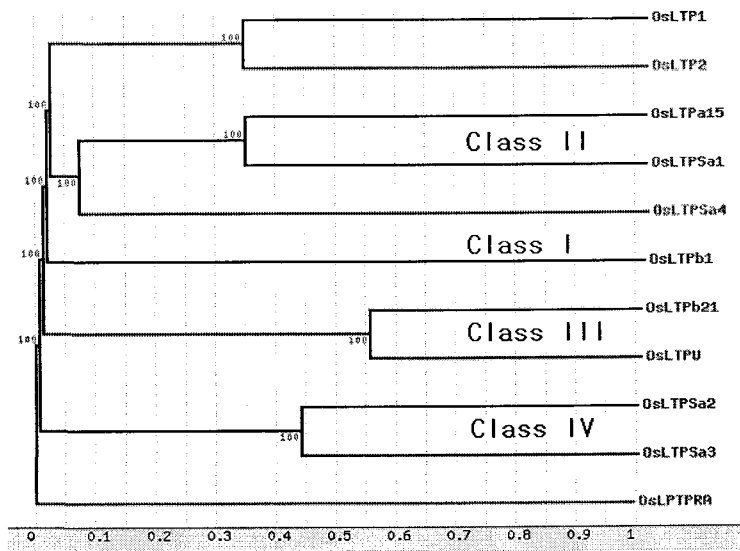


Fig. 25. Comparisons of *OsLTP1* with other known rice LTPs.

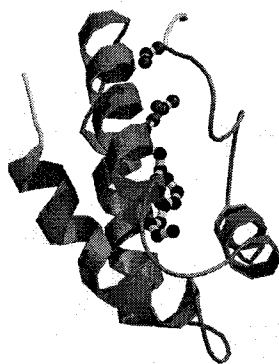


Fig. 26. A proposed 3-D structure of *OsLTP1* protein.

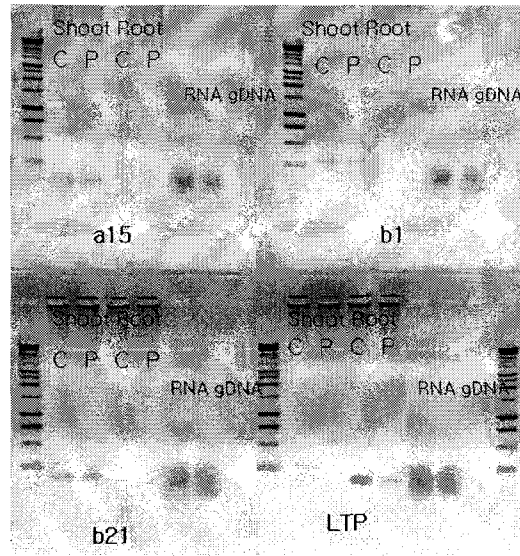


Fig. 27. Comparisons of rice LPT gene expression in response to phosphorus(P) deficiency. C, control. Non-reverse-transcribed RNA (RNA) and genomic DNA (gDNA) controls, respectively. a15; *OsLTP1a15*, b1; *OsLTP1b1*, b21; *OsLTP1b21*, LTP; *OsLTP1*, respectively.

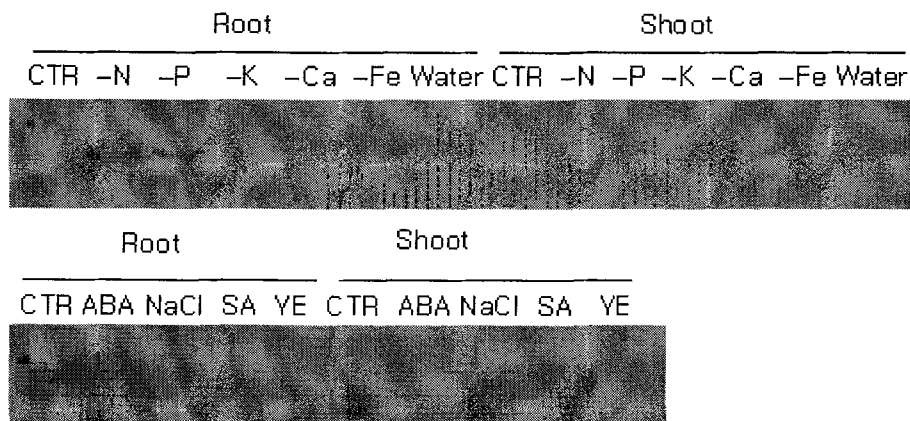


Fig. 28. Expression of *OsLPT1* in response to nutrient deficiency, hormones, and biotic and abiotic stresses. CTR, control; -N, -P, -K, -Ca, -Fe and Water; nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, iron and all mineral nutrient deficiency, respectively. ABA, abscisic acid; SA, salicylic acid, YE, yeast extract, respectively.

3. 항산화효소 유전자

양분조건에 차별적 발현반응을 보이는 유전자전사체 탐색을 통하여 양분조건에 특이적 발현을 보이는 catalase(CAT)와 ascorbate peroxidase(APX)전사체를 분리하였다. 항산화효소는 환경장애 저항성과 관련이 있는 것으로 알려져 있으나 양분에 대한 반응은 알려져 있지 않다. 따라서 양분조건에 대한 CAT과 APX의 효소활성, 동위효소 및 유전자 발현 양상을 조사, 분석하여 양분결핍조건에서의 이들 효소의 역할을 구명하고자 하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 식물 재료

벼 식물체의 재배와 양분결핍처리는 제2절-1-가-(1)항과 같이 실시하였다.

(2) Northern blot 분석

유전자발현 조사를 위한 Northern 분석은 제2절-1-가-(5)항과 같이 실시하였다. Catalase isoform A, B, C에 특이적인 probe는 isoform 특이적 primer(Iwamoto et al., 2000)를 사용하여 벼 mRNA를 역전사하여 얻은 cDNA를 주형으로 증폭한 단편을 사용하였다. 증폭한 단편의 염기서열을 결정하여 isoform 특이적 probe를 확인하였다.

(3) 효소활성 검정

Catalase(E.C. 1.11.1.6; CAT)와 ascorbate peroxidase(E.C. 1.11.1.11 ; APX) 활성측정용 단백질은 100 mM sodium phosphate(pH 7.8), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM PMSF, 10mg/ml PVPP가 포함된 추출용액을 이용하여 추출하였다. APX의 분석을 위해서는 추출용액에 5 mM ascorbate를 첨가하였다. 시료균질액을 4°C에서 16000 g로 20분간 원심분리 하였고, 상정액에 즉시 glycerol(40%, v/v)을 첨가하여 활성측정에 사용하였다(Aderson et al., 1995).

전체 CAT 활성은 Beers와Sizer의 방법(1952)에 따라 H₂O₂의 이화작용을 240 nm에서 측정하여 검정하였다. 반응용액의 조성은 50 mM potassium phosphate(pH 6.9)와 100 mM H₂O₂였다. 반응은 효소추출액의 첨가에 의해 시작하였다. 전체 APX 활성은 Nakano and Asada(1981)의 방법에 따라 ascorbate가 산화되어 감소되는 양을 290 nm에서 측정하여 검정하였다. 반응용액의 조성은 50 mM potassium phosphate(pH 7.5)와 0.5 mM ascorbate, 0.1 mM EDTA이었다. 반응은 0.2 mM H₂O₂ 첨가에 의해 시작하였다.

CAT isozymes은 10% glycerol을 첨가한 nondenaturing polyacrylamide gel(7% T)을 이용하여 4°C에서 80V로 22시간동안 분리하였다. 5X loading buffer에는 60 mM DTT를 첨가하였다. 동위효소 활성은 3.27 mM H₂O₂에 25분간 침지한 후, 물로 세척한 다음 1%(w/v) potassium ferricyanide, 1%(w/v) ferric chloride 용액에서 염색하였다(Woodbury et al., 1971). APX isozymes은 10% glycerol을 첨가한 nondenaturing polyacrylamide gel(10% T, 3% C)을 이용하여 4°C에서 220V로 6시간동안 분리하여 Mittler 와 Zilinskas(1993)의 방법에 따라 염색하였다. Gel을 반응액 1(20% methanol, 200 mM glycine, 25 mM trizma base, 0.1% sodium dodecyl sulfate)에서 20분동안 배양 후, 반응액 2(50 mM sodium phosphate(pH 7.0), 2 mM ascorbate)를 10분마다 교환하며

30분간 전처리하였다. 그 후 반응액 3(50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0), 4 mM ascorbate, 2mM H₂O₂)에서 20분간 배양하고, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 간단히 세척하였다. Gel을 염색용액(50 mM sodium phosphate(pH 7.8), 28 mM N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine(TEMED), 2.45 mM NBT)을 이용하여 염색하였고, 10% acetic acid 30분간 침지하여 고정하였다.

나. 결과 및 고찰

벼 뿌리의 CAT 활성은 양분조건에 특이적으로 반응하여 변화하였다. CAT 활성은 인, 칼리 및 모든 양분결핍조건에서는 각각, 3, 1.5 및 2배 정도 증가하였다. 그러나 질소 칼슘, 철분의 결핍에 의해서는 활성이 약 50% 감소하였다.

이러한 활성의 변화는 동위효소의 발현양상과 높은 상관을 보였다. 효소활성이 증가한 처리에서는 뿌리특이적인 동위효소인 CAT B의 발현이 증가하였다. 특히, 인산결핍조건에서는 다양한 조직에서의 발현을 보이는 CAT A의 동위효소가 현저히 증가하였다(Fig. 29). 이러한 양분특이적 효소활성의 변화는 잎에서는 관찰되지 않았다.

양분특이적 동위효소의 발현 양상은 유전자의 발현과 정의 상관을 보였다. 인산결핍조건에서는 *Cat-A* 유전자의 발현이 현저히 증가하였으며, 인산, 칼리, 모든양분 결핍조건에서는 *Cat-A* 유전자의 발현이 증가하였다(Fig. 29).

인산결핍조건에 대한 CAT 활성 반응은 인산농도와 결핍시기의 영향을 받았다. 인산결핍 처리 시기가 5일까지 증가할수록 활성은 직선적으로 증가하였으며, 인산농도가 50 mM인 조건에서 활성이 가장 높았다(Fig. 30). 이러한 처리시기와 농도에 대한 활성 변화는 동위효소와 유전자의 발현 조절에 의해 나타났다(Fig. 30). 이러한 결과는 인산부족 조건에서 CAT 유전자의 전사가 촉진되며, 전사 촉진 정도는 동위효소에 따라 다름을 의미한다.

APX 효소활성은 양분조건에 따라 크게 변하지 않았다. APX 활성은 인결핍에 의해 약 20% 증가하였으나 칼리결핍에 의해서는 약 20% 감소하였다. 다른 양분의 결핍에 의해서는 효소활성이 거의 변화하지 않았다. 효소활성이 변하지 않은 것과 같이 동위효소 및 유전자의 발현도 거의 변하지 않았다(Fig. 31).

이상의 양분조건에 대한 CAT와 APX의 활성, 동위효소 및 유전자 발현 결과는 양분조건에 대한 항산화효소의 반응이 현저히 다름을 의미한다. 항산화 효소 중 CAT와 같이 양분조건에 특이적인 반응을 보이는 효소는 양분부족 조건에서의 식물의 저항성을 증진시킴으로써 양분이용효율을 간접적으로 증진시키는 역할을 수행할 수 있을 것으로 추정된다.

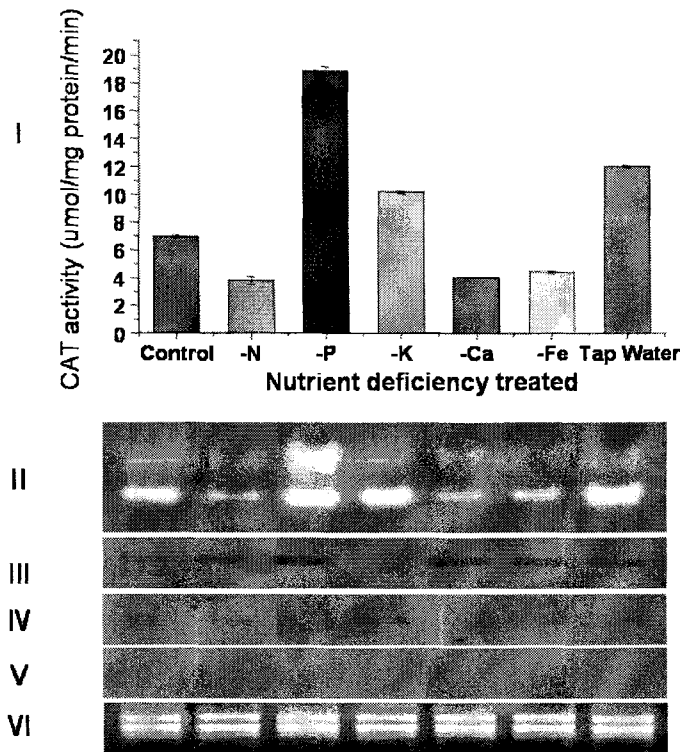


Fig. 29. Effects of nutrients on the activities (I), isozymes (II) and transcripts (III IV and V) of CAT in the root of rice seedlings at the 3rd leaf stage. *Cat-A* (III), *Cat-B* (IV) and *Cat-C* gene (V), respectively. VI: rRNA. Seedlings were grown in the solution deprived of the specific nutrients for 5 days.

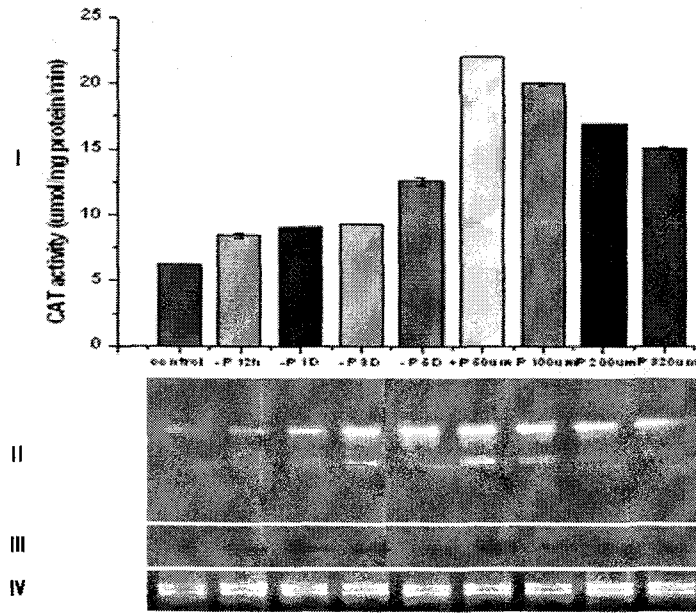


Fig. 30. Effects of phosphorus deprivation on the activities (I), isozymes (II) and *Cat-B* mRNA transcripts (III) of CAT in the root of rice seedlings at the tillering stage. The plants were grown in the solution deprived of phosphorus for 0.5, 1, 3 and 5 d, respectively. Some plants were grown for 5 d in the solution containing phosphorus at 50, 100, 200 and 320 μ M, respectively.

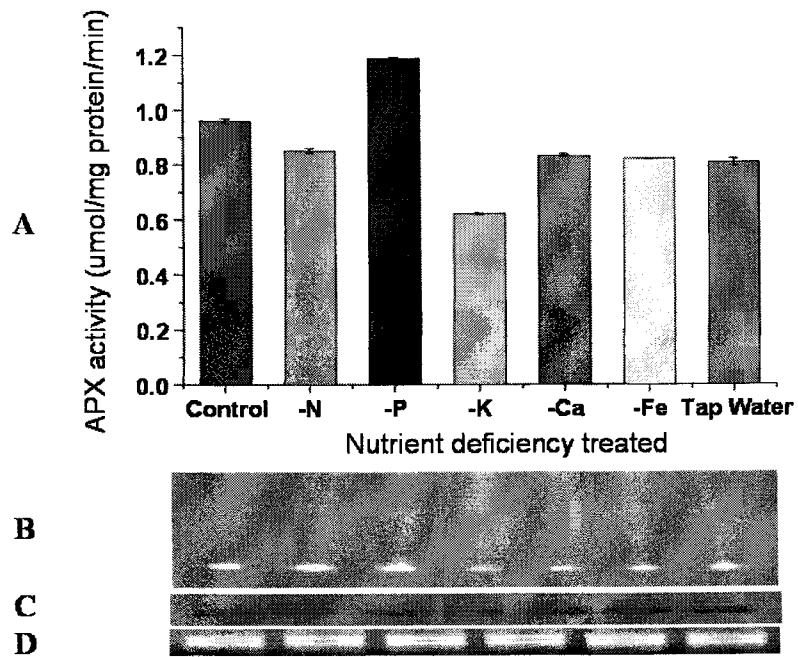


Fig. 31. Effect of nutrient deficiency on APX activity, isozyme and gene expression in rice roots. A: APX activities, B: APX isozymes, C: *APX-A* mRNA, D: rRNA.

4. 유전자의 식물체내 기능 검증

유전자의 식물체내에서의 기능은 해당 유전자 발현의 촉진 또는 억제에 따른 식물체의 반응을 조사, 분석하여 확인할 수 있다. NUE는 다단계의 반응에 의해 영향을 받으나 1차적으로 양분흡수단계의 영향을 받는다. 본 연구를 통하여 유전자 소재가 확보되고 그 발현기작이 조사된 양분흡수 유전자 중 인산수송자의 발현을 촉진하여 유전자의 양분흡수기능개선 효과를 확인하고자 형질전환식물체 개발하였다. 또한 NUE관련 유전자의 탐색을 통하여 다수의 기능미지 유전자가 선발되었다. 이들 기능미지 유전자 중 8종의 기능을 RNA억제 방법을 이용하여 확인하고자 시도하였다.

가. 재료 및 방법

(가) 캘러스 유기

성숙종자의 영을 제거하고 2% sodium hypochlorite (100 ul Tween 20 첨가)에 50분간 교반하여 표면 살균하고 멸균수로 5회 이상 세척한 후, Table 6의 N₆ (Chu et al., 1975) callus 유도 배지에 15립씩 치상하였다. 25℃, 암조건에서 4주간 배양한 후 단단하면서도 잘부스러지는 callus를 분리하여 다시 N₆ callus 유도배지에 옮겨 4일간 25℃, 암조건에서 전 배양하여 형질전환에 이용하였다.

(나) *Agrobacterium*을 이용한 형질전환

pGA-NtPT 유전자 재조합체가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404를 4 mg/L tetracycline이 포함된 AB(Table 6) 액체배지에서 28℃, 암조건으로 72시간 동안 진탕배양(250 rpm)하였다. *Agrobacterium* 배양액을 원심분리하여 수확한 후 100 µM acetosyringone이 첨가된 AAM (Table 6) 액체배지에 4배 희석한 후 4일간 전배양한 callus에 30분간 접종하였다. *Agrobacterium*을 접종한 callus는 N₆ co-culture 배지에 치상하여 21℃, 암조건에서 3일간 공동배양하였다. 형질전환된 callus를 1차 선발하기 위하여 공동배양한 캘러스를 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 멸균수를 이용하여 5회 이상 세척하여 아그로박테리움을 제거한 후, 선발배지(Table 6)에 캘러스를 옮기고 25℃, 암조건에서 30일간 배양하였다. 1차 선발배지에서 생존한 callus를 재선발하기 위하여 항생제 농도가 높은 2차 선발배지(Table 6)에 옮긴 후 다시 2주간 25℃, 암조건에서 배양하고, 2차 선발배지에서 활발하게 증식하는 callus 만을 재분화배지에 옮겨 25℃, 명조건에서 연속조명으로 배양하였다. 분화된 식물체를 뿌리 유기배지에 옮겨 식물체를 건전하게 하고, 식물체를 포트에 이식하여 온실에서 순화시킨 후 특성을 검증하였다.

Table 6. Media used for tissue culture and transformation of rice

Medium	Composition
N ₆ callus induction	N ₆ ¹ salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 g/L casamino acid, 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L phytigel, pH 5.6
AB medium	3 g/L K ₂ HPO ₄ , 1 g/L NaH ₂ PO ₄ , 1 g/L NH ₄ Cl, 0.15 g/L KCl, 0.2 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.012 g/L CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.025 g/L FeSO ₄ ·7H ₂ O, 5 g/L glucose, 4 mg/L tetracycline, pH 7.0
AAM medium	AA ² salts and amino acids, MS vitamin, 68.5 g/L sucrose, 36 g/L glucose, 0.5 g/L casamino acid, 20 mg/L acetosyringone, pH 5.2
N ₆ co-culture	N ₆ ¹ salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 g/L casamino acid, 10 g/L glucose, 20 mg/L acetosyringone, 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L phytigel, pH 5.2
First selection	N ₆ ¹ salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 g/L casamino acid, 40 mg/L hygromycin B, 250 mg/L cefotaxime, 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L phytigel, pH 5.6
Second selection	N ₆ ¹ salts and vitamins, 20 g/L sucrose, 30 g/L sorbitol, 2 g/L casamino acid, 50 mg/L hygromycin B, 250 mg/L cefotaxime, 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BAP, 2 g/L phytigel, pH 5.6
Regeneration medium	MS ³ salts and vitamins, 40 g/L sucrose, 20 g/L sorbitol, 125 mg/L cefotaxime, 0.1 mg/L NAA, 2.0 mg/L kinetin, 12 g/L agar, pH 5.6
Root induction	MS ³ salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 125 mg/L cefotaxime, 2 g/L phytigel, pH 5.6

¹Chu et al., 1975; ²Toriyama and Hinata, 1985; ³Murashege and Skoog, 1962

(다) 유전자 재조합체의 작성

고친화도 인산수송자의 촉진발현에 의한 양분흡수를 향상기능을 조사하고자 NtPT1 유전자 발현 재조합체를 아래와 같이 제작하였다(Fig. 32).

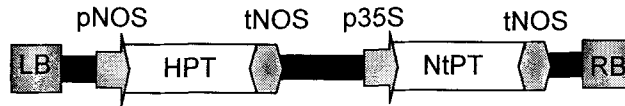


Fig. 32. Partial structure of the binary vector containing NtPT1 expression cassette, pGA-NtPT. Abbreviations used are: pNOS, nopaline synthase promoter; HPT, hygromycin phosphotransferase gene; tNOS, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; p35S, CaMV35S promoter; NtPT1, *Nicotiana tabacum* phosphate transporter, RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border.

나. 결과 및 고찰

(1) 양분수송자 유전자 형질전환 벼 육성

CaMV35S promoter에 의해 발현이 조절되는 pGA-NtPT1를 *Agrobacterium*을 이용하여 벼에 형질전환시킨 다음 유전자가 삽입된 벼 T0 형질전환체 5계통을 선발하였다 (Fig. 33). T0 계통을 자식시켜 T1세대를 진전시켰으며 T1세대에서의 NtPT1 발현양상을 Northern 분석을 통하여 분석하였다 (Fig. 33).

Northern 결과를 기준으로 유전자 발현이 우수한 6개체를 선발하여 T2세대 계통을 육성하고 있다. T2 세대 개체의 transgene-homozygous 및 heterozygous 유전자형을 이용하여 형질전환 개체의 인산 흡수 및 이용효율을 검정할 수 있을 것으로 생각된다.

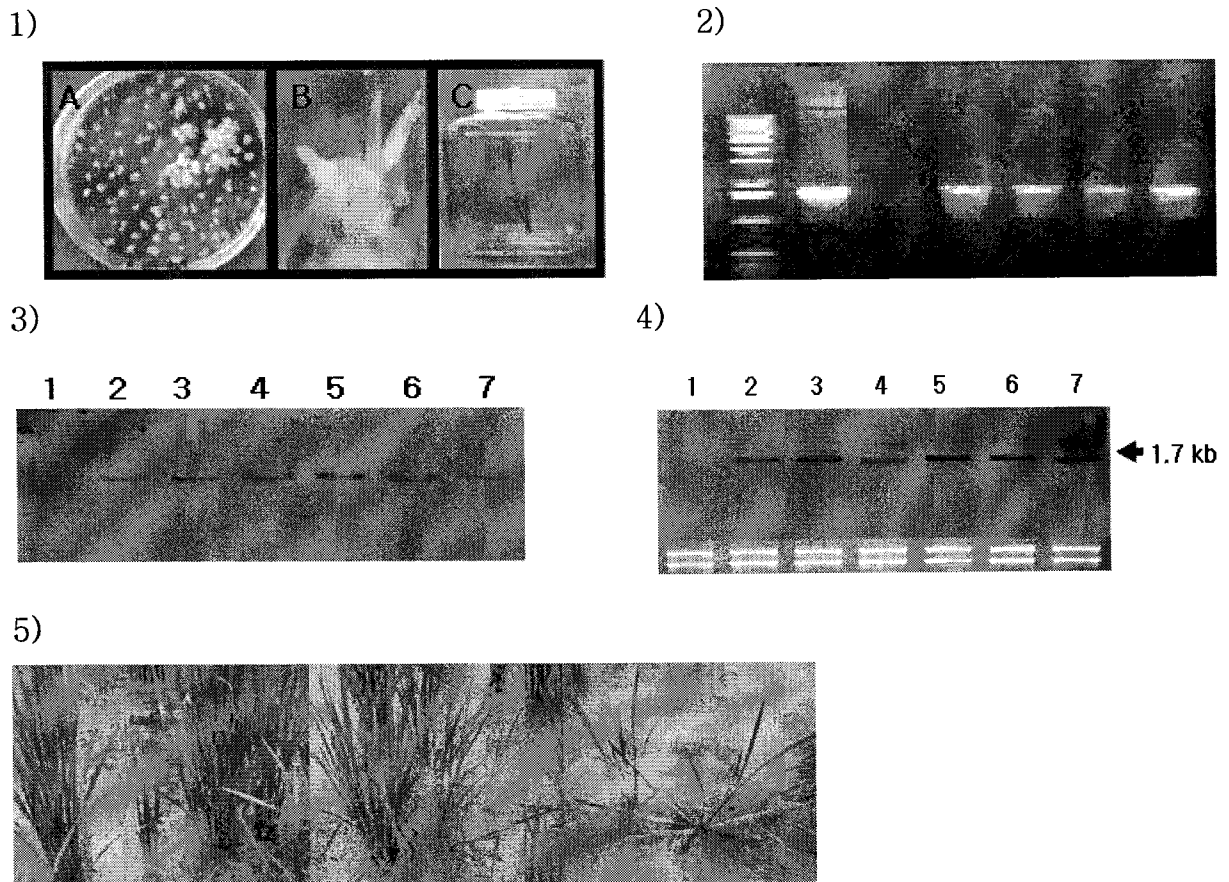


Fig. 33. Development of transgenic rice plants expressing NtPT1 to test the role of PT in P uptake and phosphate use efficiency. 1) Transformation and regeneration of transgenic rice plants. 2) PCR analysis of NtPT1 cDNA in *To* transgenic plants. 3 and 4) DNA and RNA gel blot analysis of *T1* progeny in the transgenic rice. Lane 1, nontransgenic plant; lane 2 to 7, transgenic plants transformed with pGA-NtPT. An ethidium bromide-stained gel picture indicating uniform loading and integrity of RNA samples is shown at the bottom. 5) Normal and abnormal phenotypes of some *T1* plants.

(2) RNA억제(RNAi)에 의한 기능미지 유전자 기능 검증

양분조건에 특이적인 반응을 보인 기능미지의 유전자전사체의 기능을 확인하기 위하여 8종의 유전자전사체 clone에 대하여 RNAi 방법을 시도하였다.

(가) RNAi 발현 재조합체의 제작

RNAi 발현 재조합체는 ds RNA vector인 pMCG 161(ChromDB, USA, Fig. 34)을 사용하였다. 기능미지 유전자전사체인 1A1 1B4 1C3 1D1 1E4 1F2 1H2 2C2의 염기서열을 결정하고, 재조합체 작성에 필요한 제한효소자리가 포함된 각 clone에 특이적인 primer를 제작하였다(Table 7). Primer를 이용하여 각 clone의 plasmid DNA로부터 증폭된 단편(Fig. 35)을 상법에 따라 TA cloning vector에 cloning하였다. 각 clone의 plasmid DNA를 제한효소를 절단하여 pMCG 161에 삽입하여 RNAi 재조합체를 만들고 벼 형질전환에 사용하였다.

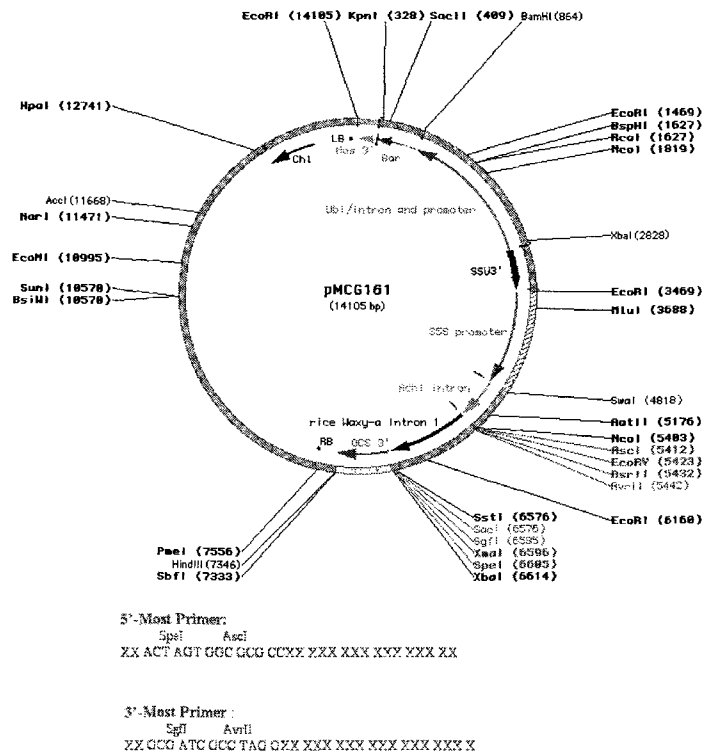


Fig. 34. Map of pMCG161 vector

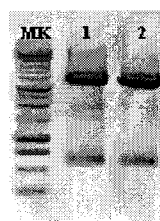
Table 7. Primer sequences specific for the cloning of the selected unknown clones into the dsRNA vector

Primer name	Sequence (5' to 3')
1A1-F	CCACTAGTGGCGCGCCATAATGGCTTCCGCCGTGGTG
1A1-R	TGGCGATCGCCGGTCCGCGTCCTCACGTCAGCTACCC
1B4-F	CAACTAGTGGCGCGCCTTGGTCCGGCTGGATTGATTGA
1B4-R	GGGCGATCGCCGGTCCGAGAAGGTGGATGACAGGGGTA
1C3-F	CCACTAGTGGCGCGCCGAGGCTGGCGCAGCTACGGTC
1C3-R	GAGCGATCGCCGGTCCGGGGGTGCAACGATTGGACATC
1D1-F	TGACTAGTGGCGCGCCCGCTCCGCCCCGCCCTCCGCT
1D1-R	GGGCGATCGCCGGTCCGAGGAGAACTTAAATAAATATT
1E4-F	TGACTAGTGGCGCGCCTCATTTGCTCAGTGCTCCGTTT
1E4-R	CCGCGATCGCCGGTCCGAAGGGTATGATGGATCTGATG
1F2-F	GTACTAGTGGCGCGCCTAGTGGAAACAGCAAACCTGG
1F2-R	CAGCGATCGCCGGTCCGGACCTTCTGAAATAAGGTTTA
1H2-F	GAACTAGTGGCGCGCCTTATCAAACCAGGAAATGCAT
1H2-R	TTGCGATCGCCGGTCCGAAGTCCGTAATGCGTCAGCCA
2C2-F	GCACTAGTGGCGCGCCATCATCTCTGGCGTTCTTGTCT
2C2-R	GGGCGATCGCCGGTCCGGGCGGTGACCGATAATCAGCC

A. Amplification of target sequences



B. Cloning into dsRNA vector



Lane 1: Rsr II+ASC I, 2: Spe I+AsiS I

Fig. 35. Amplification of RNAi target sequences using the target-sequence specific primer pairs (A) and cloning their amplified fragments into the dsRNA vector (B). 1A1, 1B4, 1C3, 1D1, 1E4, 1F2, 1H2, and 2C2: expressed sequence clones of unknown functions.

(나) 벼의 형질전환

벼의 조직배양 및 형질전환은 제2장-4-가-(1)항과 동일하게 실시하였다. 대상 clone에 따라 연구의 진척도가 다르나 현재 1종의 clone에 대한 형질전환을 실시하고 있다.

정상적인 RNA억제 식물체를 아직 얻지 못하였으나, RNA억제 형질전환체는 유전자기능 확인에 유용하게 사용될 수 있을 것을 기대된다.

제 3 절 양분이용효율 형질의 발현 특성

NUE는 양적형질로서 형질의 발현에 다양한 요인이 관여하게 된다. 따라서 NUE 개량을 위해서는 다수 요인의 조절기작에 관련된 정보가 필요하다. 양분조건에 대한 NUE관련 주요 형질의 반응을 성장분석, 효소반응 분석 및 global gene expression 분석을 통하여 NUE의 발현 특성에 관한 정보를 확보하고자 하였다.

1. 양분조건에 대한 주요 생육형질의 반응

가. 재료 및 방법

공시품종의 양분처리 조건에 대한 생장 반응 특성을 조사하기 위하여 다산, 소비, Palawan 품종의 유묘를 정상 영양액으로 수경재배하였다. 수경재배 및 양분결핍처리는 제 1절-1항과 같이 실시하였다. 과종 후 약 30일 성장한 유묘를 인산결핍 처리하여 처리 후 3, 7, 14, 21일에 생장형질을 작물시험장 조사기준에 의해 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 인산결핍 조건에서의 생장 특성

과종 후 30일 묘의 생육경과에 따른 지상부 생체중의 증가는 소비벼와 다산벼가 Palawan보다 빨랐다. Palawan은 인산 결핍처리 3일 이후에는 결핍처리 식물체의 지상부 생체중이 정상 식물체의 경우보다 높은 특성을 나타내었다. 식물체 생체중에 대한 뿌리 생체중의 비율은 초기에는 소비벼가 낮았고 다산과 Palawan이 비슷하였으나 21일 경과 이후에는 다산벼가 가장 낮았다(Fig. 36).

지상부 생체중당 단백질 함량은 처리 7일 이후에 전반적으로 감소하는 경향이었고, 다산벼와 소비벼는 인산 결핍처리에 의해 단백질 함량이 증가하였으나, Palawan은 처리 14일까지 감소하였다(Fig. 37). 뿌리의 생체중당 단백질 함량은 처리 3-7일에는 Palawan이 높았으나 이후에는 다산이 높았다. 단백질 함량은 인산처리에 의해 감소하는 경향이였다. 뿌리 생체중당 분비 단백질 함량은 시기와 품종에 따라 경향이 일정하지 않았으며 모든 품종에서 인산결핍처리에 의해 현저히 감소하였다(Fig. 37).

잎의 엽록소 함량과 뿌리의 anthocyanin함량은 인산 결핍처리에 따라 품종 특이적 반응을 보였다. 엽록소와 anthocyanin 함량은 인산결핍에 의해 다산벼와 소비벼에서는 증가한 반면, Palawan에서는 감소하였다(Fig. 38).

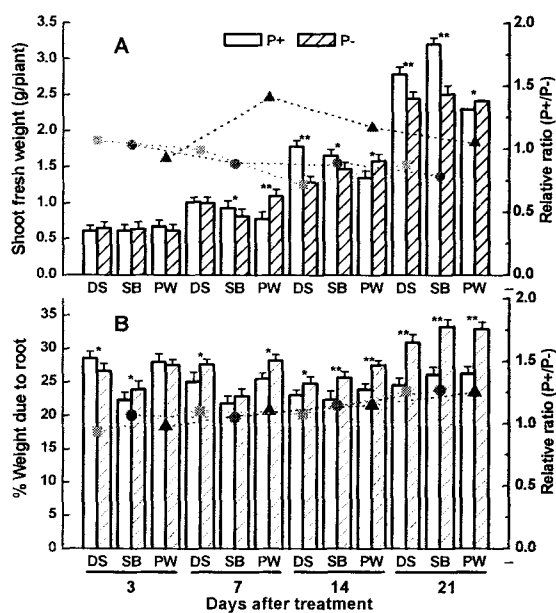


Fig. 36. The responses of shoot weight (A) and percent weight due to root (B) to P deprivation. The relative values of shoot weight in P-deprived plants compared to P-sufficient plants (P-/P+ ratio) for Dasan (■), Sobi (●), and Palawan (▲) are as indicated. Three-week-old seedlings were grown for the additional days as indicated in the standard (P+) or P-free (P-) solutions. * and **: the paired means of the P+ and P- treatments are significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

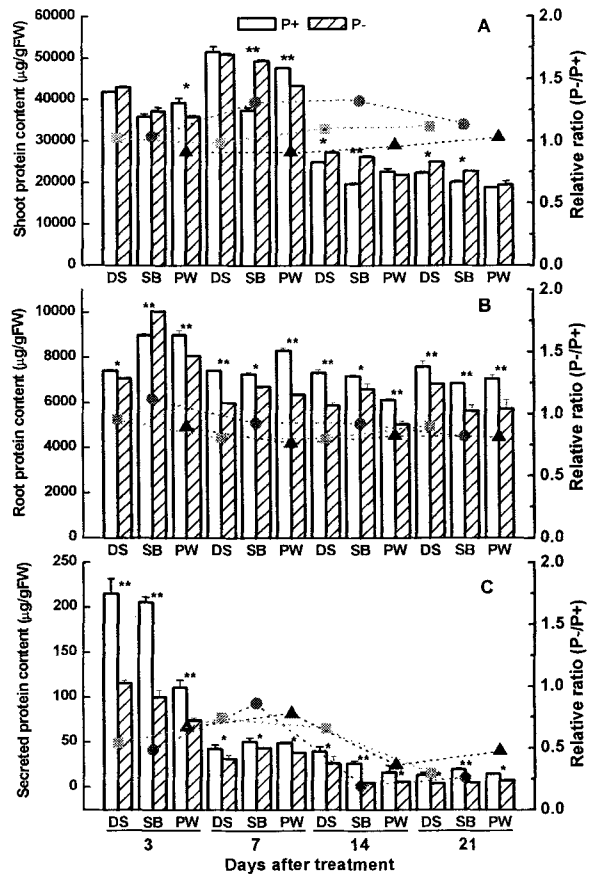


Fig. 37. The responses of contents of shoot protein (A), root protein (B), and protein secreted from roots (C) to P deprivation. The relative values of P-deprived plants compared to P-sufficient plants (P-/P+ ratio) for Dasan (■), Sobi (●), and Palawan (▲) are as indicated. Three-week-old seedlings were grown for the additional days as indicated in the standard (P+) or P-free (P-) solutions. * and **: the paired means of the P+ and P- treatments are significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

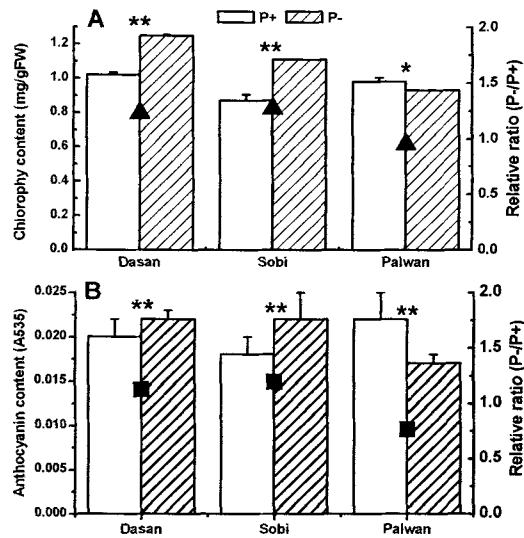


Fig. 38. The responses of contents of chlorophyll in leaves (A) and anthocyanin in roots (B) to P deprivation. The relative values of P-deprived plants compared to P-sufficient plants (P-/P+ ratio) for chlorophyll (▲) and anthocyanin (■) are as indicated. Three-week-old seedlings were grown for the additional days as indicated in the standard (P+) or P-free (P-) solutions. * and **: the paired means of the P+ and P- treatments are significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

인산결핍시 성장감소는 일반적인 현상이나 본 연구의 Palawan의 지상부 생체중이 21동안의 인산결핍에 의해서도 감소하지 않은 것은 인산결핍에 대한 유전자원의 반응이 상이함을 나타낸다. 인산의 흡수, 저장 및 재이용과정이 인산이용효율에 영향을 미치므로 Palawan에서 관찰된 결과는 인산의 재이용 단계의 차이에 의한 것으로 생각된다 (Inthapanya et al., 2000; Wissuwa and Ae, 2001).

인산결핍조건에서 다산은 소비보다 더 많은 단백질을 뿌리로부터 분비하였는데, 이러한 근분비 단백질량의 품종간 차이는 양분흡수과정에서 근분비물질의 역할과 관련하여 흥미로운 결과이다. 양분결핍조건에서 뿌리로부터의 근분비량의 변화는 결핍기간과 작물종에 따라 다르다. 옥수수의 경우 단기적 인산결핍에 의해서는 근분비단백질량의 변화가 크지 않은 것으로 알려져 있다(Yun and Kaeppler, 2001).

엽록소와 anthocyanin 함량은 인산결핍조건에서 증가하는 것이 일반적이거나 (Bergmann, 1992; Halsted and Lynch, 1996; Yun and Kaeppler, 2001) 본 연구의 결과는 인산부족조건에서 이들 색소분자의 함량변화가 품종에 따라 크게 다를 수 있음을 나타내었다.

이상의 결과는 인산결핍조건에서의 인산이용효율의 유전적 변이가 존재함을 의미한다. 따라서 인산이용효율과 관련된 주요 요인의 구명과 이를 활용한 벼 인산이용효율 개선 연구가 필요하리라 생각된다.

2. 양분조건에 대한 Acid phosphatase의 반응

가. 재료 및 방법

공시품종의 양분처리 조건에 대한 생장 반응 특성을 조사하기 위하여 다산, 소비, Palawan 품종의 유묘를 정상 영양액으로 수정재배하였다. 수정재배와 양분결핍처리는 제1절-1항과 같이 실시하였다. 파종 후 약 30일 성장한 유묘를 인산결핍처리하여 처리 후 3, 7, 14, 21일에 acid phosphatase(APase)의 활성과 동위효소 발현 양상을 조사하였다. APase 활성은 *p*-nitrophenol phosphate를 기질로 사용하여 측정하였으며 지상부와 뿌리 조직 내 활성과 뿌리에서 분비되는 효소의 활성을 측정하였다(Yun and Kaepler, 2001). 분비효소의 활성은 페니실린(0.025%)을 포함하는 수용액에 뿌리를 30-60분간 배양 한 후 배양액 중의 효소활성을 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

인산결핍 조건에 대한 뿌리에서 분비되는 APase 활성반응의 차이는 주로 경시적인 반응의 차이가 컸다. 뿌리 생체중당 효소활성은 품종간에 뚜렷한 차이가 없이 인산결핍에 의해 증가하는 경향이었으나 대조처리에 대한 증가비율은 소비벼에서 가장 컸다(Fig. 39A). 단백질당 효소활성은 인산결핍에 의해 현저히 처리 14일 이후부터 증가하였으며 대조에 대한 증가 정도는 다산벼에서 높은 경향이였다(Fig. 39A).

벼 식물체의 뿌리조직 내부에 존재하는 APase 활성을 조사하였다. 뿌리 조직내에 존재하는 효소활성은 다산벼가 소비벼나 Palawan 보다 2배 이상 높았다. 인산 결핍처리에 의해 뿌리 조직내 APase 활성은 약간 증가하였으며 증가 정도는 품종 간에 유사하였다(Fig. 40A, B). 인산결핍에 의한 식물뿌리에서의 APase 활성증가 현상은 벼, 토마토, 콩 등 다수의 식물에서 관찰되었다(Tadano and Sakai, 1991).

벼 식물체의 잎 조직 내부에 존재하는 APase 활성도 조사하였다. 잎 조직내에 존재하는 효소활성은 다산벼나 Palawan 보다 소비벼가 낮았다. 인산 결핍처리에 의해 잎 조직내 APase 활성은 처리 3일에는 약간 증가하였으나 7일 이후에는 오히려 감소하였으며 증가 또는 감소 정도는 품종간에 유사하였다(Fig. 41A, B). 이러한 APase의 유형 및 조직에 따른 반응 특성은 옥수수 등에서 관찰된 결과와 유사하다(Yun and Kaepler, 2001).

인산 결핍처리에 대한 공시품종의 APase 동위효소 반응을 native gel을 이용한 활성염색을 통하여 조사하였다. 모든 공시품종의 뿌리와 잎에는 저분자량 동위효소가 3종 존재하였다. 그러나 고분자량 동위효소는 품종에 따라 현저히 다른 양상을 보였다. 뿌리의 경우 고분자량 major isoform이 다산벼에 2종, Palawan 1종 존재하였으나 소비벼에는 존재하지 않았다. 인산 결핍처리에 대한 동위효소의 반응은 주로 정상인산 조건에서 존재하는 동위형이 양적으로 약간 증가하는 변화이며, 질적 반응은 소비벼에서 21일 인산결핍 처리후 고분자량 동위효소 1종이 약하게 유도되는 반응 이외의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 42).

인산결핍조건에서 근분비형 APases의 발현 증가는 여러 식물에서 관찰되었다(Tadano and Sakai, 1991). 그러나 APase 발현양은 작물종에 따라 큰 차이를 보이며 Lupin과 토마토는 근분비형 APase 활성이 매우 높다(Tadano and Sakai, 1991; Watt

and Evans, 1999; Miller *et al.*, 2001). 벼, 밀, 옥수수 등 단자엽 식물은 근분비형 APase 활성이 낮은 편이다(Tadano and Sakai, 1991; Yun and Kaeppler, 2001).

본 연구의 결과는 인산결핍시 APase 활성의 조직간 및 품종간 차이가 존재함을 나타낸다. 뿌리의 조직내 APase와 분비형 APase 활성은 다산이 다른 품종보다 높았다. 특히 분비형 APase의 품종간 차이는 매우 컸다. 다산의 높은 활성은 2종의 주요 동위효소의 인산결핍조건에서의 현저한 증가에 의해 나타났다. 따라서 APase활성의 품종간 차이는 당해효소의 동위형의 발현 양상과 정도에 의해 나타난다고 할 수 있다.

세포내 APase는 인산의 재이용(Smyth and Chevalier, 1984; Duff *et al.*, 1994)과 분비형 APase는 유기태 인산의 흡수와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Goldstein *et al.*, 1989; Lefevre *et al.*, 1990). 그러므로 세포내 APase와 분비형 APase활성의 증가는 인산의 흡수와 이용효율을 증가시키는데 기여할 수 있다. 그러나 콩의 인산결핍지에의 적응성과 APase 활성간에는 관계가 없는 것으로 보고되었다(Yan *et al.*, 2001). 하지만 인산이용효율이 흡수, 저장, 재이용단계에 의해 결정되므로 APase가 인산의 흡수와 재분배에 기여할 가능성은 배제할 수 없을 것으로 생각된다(Duff *et al.*, 1994; Marschner, 1995).

본 연구의 결과는 단기적 인산결핍시 인산결핍에 대한 APase의 활성변화 정도는 품종에 따라 큰 차이를 보이나 절대적인 APase 활성은 크게 다르지 않은 것으로 나타났다. 따라서, APase의 역할에 대한 평가를 위해서는 항시적 APase 활성과 유도적 APase 활성의 조직 및 품종간 차이가 뚜렷한 재료의 탐색과 이용이 필요할 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과는 인산 수준에 대한 APase의 반응이 체내의 인산수준을 나타내는 일종의 품종적 반응 특성으로 인산이용 효율과의 관련성 여부에 대한 분자수준에서의 연구의 필요성을 제시하고 있다.

이상의 인산결핍에 대한 양분이용 효율이 다른 공시품종 반응은 양분조건에 대한 품종별 생육특성 및 생리화학적 반응에 차이가 있으며, 벼의 양분이용효율을 증진을 위해서는 이러한 품종별 반응양상의 차이에 대한 분자수준에서의 정보를 확보해야 할 것으로 판단된다

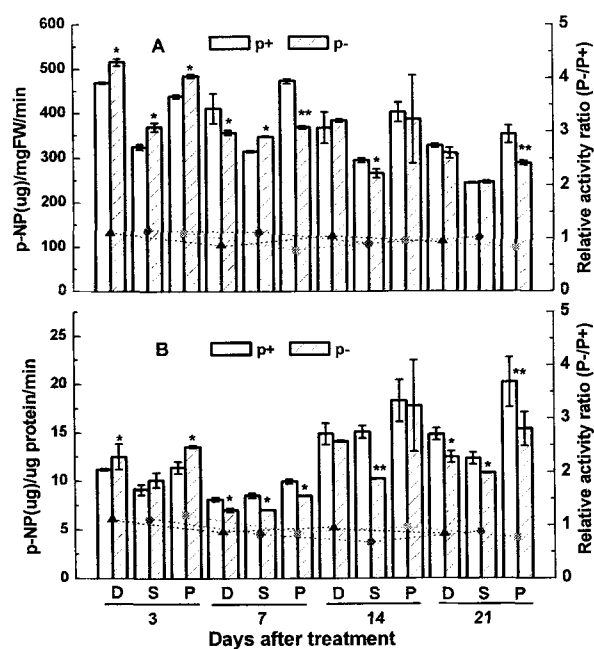


Fig. 39. Response of secretory acid phosphatase activity to phosphorus deprivation in roots. Enzyme activity was expressed on root fresh weight (A) and total secreted protein bases (B). The relative values of P-deprived plants to that of P-sufficient plants (P-/P+ ratio) for Dasan (■), Sobi (●), and Palawan (▲) are indicated. Three-wk old seedlings were grown for the additional days as indicated, in the standard (P+) or P-free (P-) solution. * and **: the paired means of P+ and P- treatment are significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

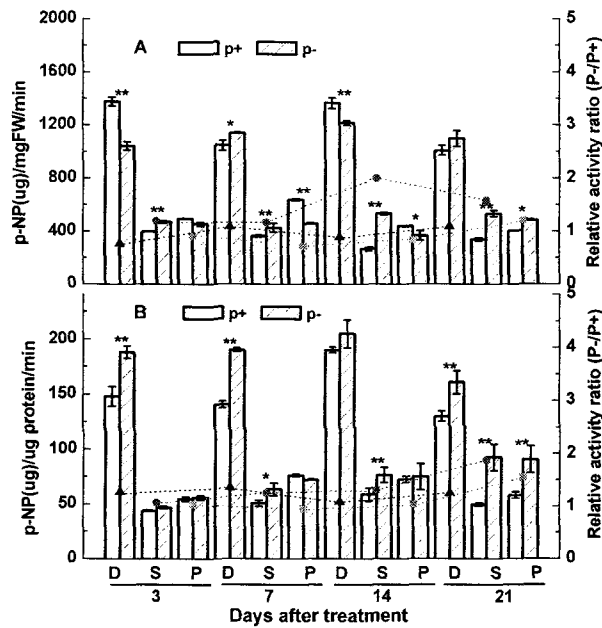


Fig. 40. Response of intracellular acid phosphatase in roots to phosphorus deprivation. Enzyme activity was expressed in unit fresh weight (A) and unit protein basis (B). The relative values of P-deprived plants to that of P-sufficient plants (P-/P+ ratio) for Dasan (■), Sobi (●), and Palawan (▲) are indicated. Three-wk old seedlings were grown for the additional days as indicated, in the standard (P+) or P-free (P-) solution. * and **: the paired means of P+ and P- treatment are significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

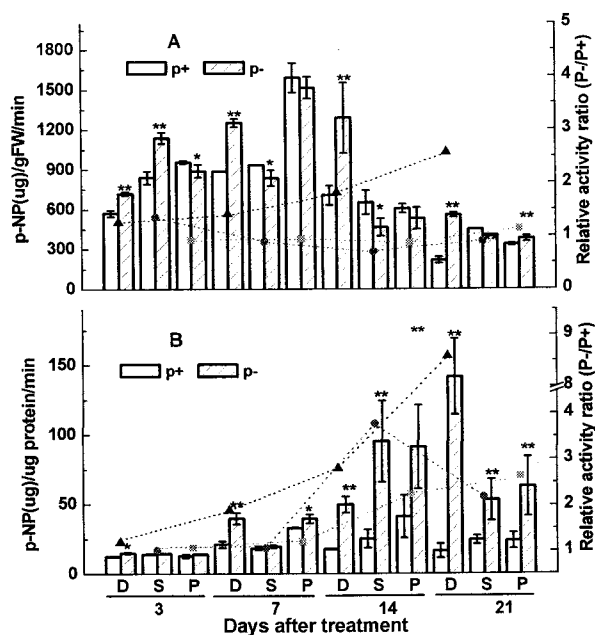


Fig. 41. Response of intracellular acid phosphatase in shoots to phosphorus deprivation. Enzyme activity was expressed in unit fresh weight (A) and unit protein basis (B). The relative values of P-deprived plants to that of P-sufficient plants (P-/P+ ratio) for Dasan (■), Sobi (●), and Palawan (▲) are indicated. Three-wk old seedlings were grown for the additional days as indicated, in the standard (P+) or P-free (P-) solution. * and **: the paired means of P+ and P- treatment are significantly different at P<0.05 and P<0.01, respectively.

3. 양분이 화분발달에 미치는 영향

화분의 발아와 수정은 작물의 수량과 밀접한 관계가 있다. 따라서 화분의 정상적인 발아는 수량결정에 영향을 미칠 수 있는 과정이다. 화분발아의 첫 단계는 수분의 흡수이다. 따라서 본 연구에서는 양분이 생식생장에 미치는 영향에 대한 실험의 일환으로 화분발아 초기 수분흡수에 미치는 양분의 영향을 조사, 분석하였다.

가. 재료 및 방법

보리(cv. 백동)의 이삭 중앙 소수로부터 화분을 채취하여 즉시 실험에 사용하였다. 화분의 팽창과정과 팽창속도는 CCD camera가 부착된 광학현미경과 PTI system (Photon Technology International, South Brunswick, NJ, USA)을 이용하여 측정하였다. 화상분석은 Multicap and Videotizer LT(Darim Vision Co., Taejeon, South Korea)을 이용하였다. 저속화상분석을 이용하여 화분의 흡수와 팽창속도, 화분막의 수분전도도를 환산하였다.

화분 벽에 존재하는 칼륨(K)은 Macallum(1905)의 방법을 이용하여 염색하였으며 화분을 가볍게 눌러 외벽과 세포질을 분리하여 K의 존재 위치를 확인하였다. Energy dispersive X-ray analysis(EDX)가 부착된 전자현미경 (SEM, JEOL JSM-6400)을 이용하여 K의 화분벽 내 분포양상을 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

CCD camera 동영상상을 이용하여 측정한 화분의 흡수 및 팽창속도는 약 1/1000초에 해당하였다(Fig. 43). 이러한 급속한 화분의 흡수 팽창은 기존의 수분에서 수시간까지의 다양한 보고와 매우 다르다(Cresti et al., 1977; Matsui et al., 2000).

수분의 흡수는 화분 외벽에 존재하는 공극에 의해 이루어지며, 급속한 화분팽창의 동력은 삼투압 구배 형성 능력이 있는 원소에 의해 가능할 것이라는 가정하에 화분의 외벽 공극에 존재하는 무기성분의 분포를 측정하였다. 그 결과 K가 공극주위와 공극에 연결된 세포질 부위에 특이적으로 존재함을 발견하였다(Fig. 44). 화분벽의 삼투압 구배를 형성하는 요인은 이온과 당류 등 다양하게 존재할 수 있으나 K는 신속한 삼투조절 요소로 알려져 있다(Fisher, 1971; Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1996). 또한 공변세포 내외부로 수분의 이동은 K에 의해 조절된다(Moore et al., 1995). 따라서 K의 공극 주위와 공극에 연결된 세포질에의 특이적 존재는 K가 화분의 수분흡수와 팽창에 관여하고 있을 가능성을 나타낸다.

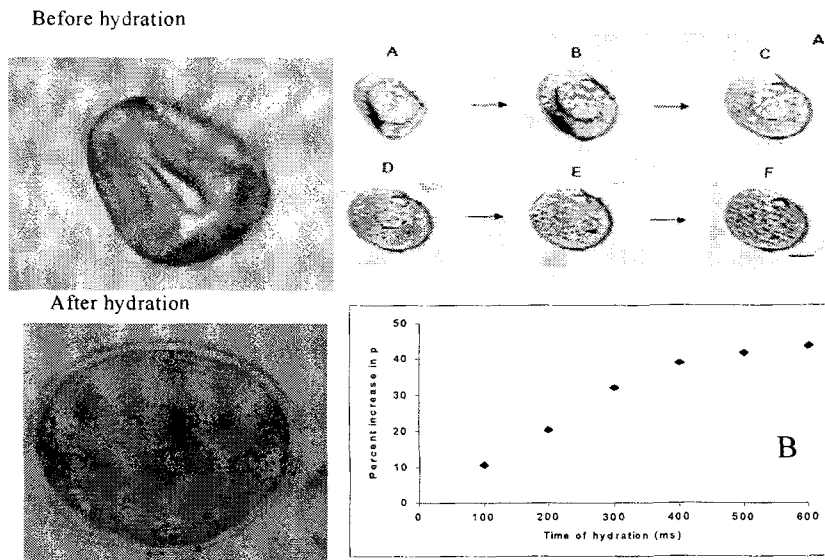


Fig. 43. Barley pollen before and after hydration with distilled water. (A) Images of barley (*H. vulgare*) pollen at various stages of swelling. These images (A, B, C, D, E, F) were captured by CCD camera after hydration. Pollen wall fully stretched after 300-400ms while cytoplasmic material (inner circle) swelled to maximum size in 600ms. (B) Pollen size as a function of time at various stages upon hydration, compared to fresh barley pollen.

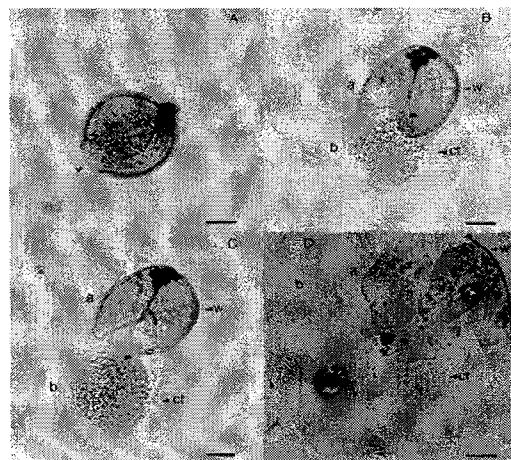


Fig. 44. Pollen stained with Macallum's solution. Arrowhead indicates the K staining (black stain). Potassium is concentrated in the aperture area of pollen. Barley pollen at various stages of splitting. Notice the K stains at the wall of aperture area (w) and cytoplasm (ct) adjacent to the aperture (A) arrowhead indicates the initiation of pollen breakage (B) just before separation (a) Outer wall (w) and (b) cytoplasm (ct)

(C) at separated stage (a) outer wall (w) (b) cytoplasm (ct) (D) pollen was crushed with bit heavy force to make clear the K stained at aperture and cytoplasmic area attached with aperture. Details of K crystals at the aperture area of (a) outer wall (w) (b) cytoplasm (ct). It shows that the central area (lid like making structure) was probably the part of cytoplasm, which was displaced from aperture with cytoplasm during breaking of pollen. It was fully stained with K.

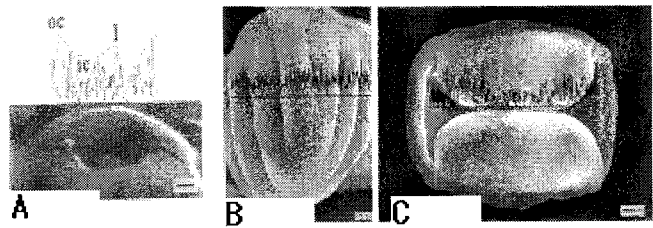


Fig. 45. The EDX spectrum of the aperture/furrow area of (A) barley (B) sesame and (C) pine pollen. Lines show the chart of K peak after X-ray beam was passed across the aperture/furrow and pollen aperture/furrow is shown below the chart of K traces. Higher peaks indicate the concentrated areas of K at the furrow (f) areas of while lower peaks were observed between furrows.

화분벽에 존재하는 K는 화분발달시 화분간극(locular fluid)에 축적될 것으로 예상된다. 화분간극내 K 분포양상을 세포학적 방법으로 측정하기 어려우므로 EDX분석을 통하여 측정하였다. K는 건조한 화분과 수화된 화분의 간극부위에 분포하였다(Fig. 45). 신속한 삼투조절제인 K가 화분간극과 그에 연결된 세포질에 집중적으로 분포한다는 사실은 K가 화분의 흡수 팽창에 중요한 역할을 수행하고 있을 가능성 의미한다. 더욱이 K는 화분관의 신장에 필요한 필수영양소로 이용된다. 또한 화분관의 신장과 함께 세포질 부피도 신속하게 증가하므로 더 많은 수분이 필요하게 된다. 따라서 화분의 간극에 특이적으로 존재하는 K는 화분의 흡수 및 화분관 신장에 필수적인 삼투조절요소와 영양분으로서의 복합적 기능을 갖는 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구의 결과는 K가 화분발아와 화분관의 신장에 매우 중요함을 의미한다.

4. 양분조건에 대한 유전체 발현 반응

최근 벼 전체유전체 microarray의 이용이 가능하게 되어 양적형질인 NUE에 관련된 유전자의 양분조건에 따른 반응 양상을 대규모로 조사하여 NUE관련 형질의 분자적 조절 특성의 이해에 필요한 기초 정보를 확보하고자 하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 식물 재료

양분조건에 대한 유전체 발현 반응을 조사하기 위한 재료와 방법은 제2절-1-가항과 같이 실시하였다.

(2) cDNA 합성 및 Cy-Dye labelling

질소와 인산결핍 뿌리시료로부터 Tri-reagent(MRC, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였고 mRNA는 Oliotex mRNA mini kit을 이용하여 정제하였다. 정제된 mRNA의 cDNA합성과 형광분자 표지는 CyScribe Post-Labelling Kit(Amersham Bioscience, UK)을 이용하여 제조회사의 사용방법에 준하여 실시하였다.

(3) Hybridization

Hybridization은 CyScribe Post-Labelling Kit의 Hybridization buffer를 이용하여 Cy-Dye labelling cDNA probe를 준비하여 Slide와 cover slip사이에 주입하고 Slide를 Hybridization chamber에 장착하고, chamber를 42°C waterbath에 16시간 배양하여 실시하였다. Hybridization을 마친후 Slide의 1차세척은 55°C의 1X SSC, 0.2%(w/v) SDS washing buffer로 10분 동안 상온에서 rotary shaker를 이용하여 실시하였다. Cover slips은 위 washing buffer에 slide를 완전히 담군 후 제거하였다. 2차세척은 55°C의 0.1X SSC, 0.2%(w/v) SDS washing buffer로 10분동안 2회 실시하였다. 이어 55°C의 0.1X SSC washing buffer로 상온에서 1분동안 2회 세척하고, 초순수로 10초간 처리하였다. Slide를 원심분리기를 이용하여 건조시킨 후 분석에 사용하였다.

(4) Scanning 및 결과분석

Slide Scanning은 ArrayWoRx Biochip Reader-Standard(AppliedPrecision, USA)를 이용하여 실시하였으며, Image analysis와 Data mining은 Imagen 5.0 and Genesight 3.2 (BioDiscovery, USA)를 이용하여 실시하였다. Microarray hybridization과 결과분석은 3회 반복하였다. 반복 결과를 상호 비교 검토하여 2배 이상의 재현적인 발현의 증가 또는 감소를 보이는 유전자를 선발하였다.

Slide의 scanning을 통하여 얻은 spot의 Cy-Dye에 대한 intensity를 이용하여 spot image의 grid를 조정하였다. Empty spot를 제거하고 error spot을 표시하여 각 spot 값에서 background값을 제거하여 표준화한 후 log값을 구였다. 각 Cy-Dye의 log값을 이용하여 Cy-5/Cy-3 ratio 구하여 처리에 의한 유전자의 발현 정도를 추정하였다.

2) 결과 및 고찰

벼 60K microarray를 이용하여 인산결핍시 유전자의 반응 양상을 조사하였다. 잡종화반응을 완료한 이후 microarray의 영상은 Fig. 46과 같았으며, 표준화 후 각 유전자의 발현

양상은 Fig. 47과 같았다. 인산결핍처리 시료를 이용하여 3회 반복한 Microarray 분석에서 재현적인 유전자 발현의 증가 또는 감소를 보인 유전자는 각각 3종과 21종으로 그 수가 매우 적었다(Table 8).

발현이 증가한 유전자는 모두 기능미지의 EST clone이었다. 발현이 감소한 유전자중 기능이 추정된 유전자는 Myb factor, HSP104, S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, Leucyl-tRNA synthetase, Copine 등으로 양분이용에 직접 관여하지 않는 유전자가 대부분이었다.

Microarray 분석결과와 반복간 큰 변이는 microarray분석 기술의 초기정립단계에서 예상되는 실험절차상의 오류에 기인한 바 큰 것으로 예상되며, 따라서 현재의 microarray 분석결과와 신뢰성이 매우 낮은 것으로 추정된다. 질소결핍처리 시료에 대해서는 1회의 microarray 분석을 실시하였으나 위에서 지적한 결과의 신뢰성 문제로 결과를 제시하지 않았다.

Microarray 분석결과는 양분결핍에 의해 다수의 유전자의 발현이 변화하며 억제되는 유전자가 촉진되는 유전자보다 매우 많음을 나타낸다. 즉, 양분이용효율의 결정에는 다수의 유전자가 관여하고 있으며, 이들 유전자 중 일부는 발현의 억제조절을 통하여 NUE 향상에 기여하고 있는 것으로 해석된다. 따라서 양분결핍조건에서 발현이 촉진되는 유전자뿐만 아니라 억제되는 유전자의 양분조건에 대한 유전자발현 조절특성을 상세히 조사하여 NUE의 개괄적 이해와 이를 토대로 한 NUE 개량 전략의 수립이 필요할 것으로 생각된다.

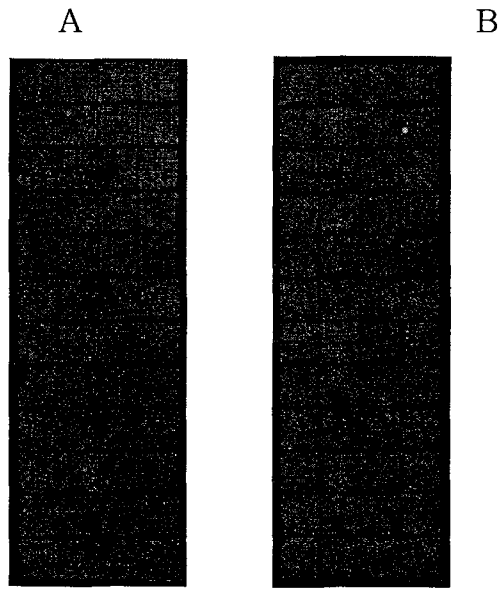


Fig.46. Image of Rice 60K Oligomeric DNA Microarray. A; A slide B: B slide.

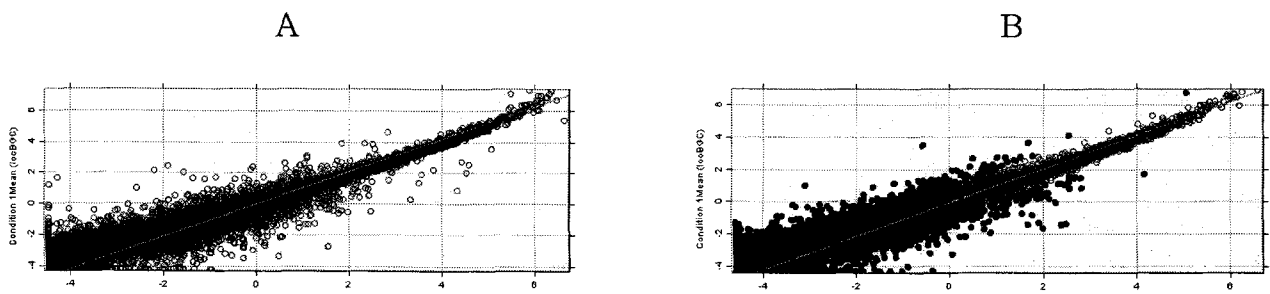


Fig. 47. Expression profiles of 60K probes in rice seedlings under P deficiency., A; A slide B: B slide.

Table 8. Rice genes differentially expressed under phosphorus deficiency

Differential expression level*		Spot position	Annotation	Accession Number	
Rep 1	Rep 2				
-2.22095	-2.47677	A01040126	Annotation unknown		
-2.12277	-2.47261	A01040324	Annotation unknown		
-3.33938	-2.43914	A01030112	EST clone of unknown function		CB647545
-1.98802	-2.40254	A01040202	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases		AU055983
-3.82678	-2.39111	A08042326	EST clone of unknown function		AU100965
-1.94371	-2.05849	B10012218	Annotation unknown		
-2.59	-2.0573	A01040125	EST clone of unknown function		CB636049
-3.05953	-1.95419	A01040117	EST clone of unknown function		CB670466
-3.67016	-1.80081	A08041726	Predicted metal-binding protein	AK102917.1	
-2.5047	-1.78523	A01041520	A Unnamed protein	AK061171.1	CB647214
-2.45649	-1.73492	A09040226	Similar to S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase		CA753046
-3.7664	-1.67917	A01041926	A Calmodulin-binding protein	AK107123.1	CA762181
-3.74187	-1.61974	A04021013	A Receptor-like protein kinase, contains lectin domains	AK064541.1	
-3.29865	-1.49145	A01040410	Leucyl-tRNA synthetase		CB676414
-3.01401	-1.48389	B12021205	Annotation unknown		
-2.7705	-1.44832	A01030216	Annotation unknown		
-3.14453	-1.43699	A01040103	Transcription factor, Myb superfamily		CB643957
-2.96591	-1.40616	A01030205	EST clone of unknown function		AU083409
-3.19052	-1.31965	B11032325	Annotation unknown		
-6.88731	-1.22882	A02011114	Annotation unknown		
-3.5436	-1.2108	A01030117	Copine		CB618200
3.346993	1.303107	A01030203	EST clone of unknown function	AK062897.1	AU172780
2.812639	1.626689	B07012311	EST clone of unknown function	CB676113	
2.095136	2.419103	A06010817	EST clone of unknown function	AK110295.1	AU067920

* LogCy-5/LogCy-3.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

본연구의 최종 목표는 양분이용효율관련 유용유전자 3종과 D/B 가능 EST 5종 개발을 개발하는 한편, 연구결과를 특허(국내 1건, 국외 1건) 및 논문발표(국외 저널 2편, 국내저널 1))를 통하여 공지함으로서 관련 연구분야와 학문발전에 기여하고자 하였다. 연구결과 인산수송자 유전자 4종, 암모니움수송자 1종 및 지질수송단백질 유전자 2종 등 총 7종의 양분이용효율관련 유용유전자를 개발하였다. 연구결과를 활용하여 국내 특허 1건을 등록하였고 연구논문을 총 3편 발표(SCI 2, 국내 1)하였다. 총괄적으로 연구목표의 약 90%를 달성한 것으로 평가된다.

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점과 목표의 달성도

가. 1차년도

(1) 연구목표

1차년도에는 양분조건에 특이적으로 유도 또는 억제되는 유망 후보유전자의 선발을 주 목표로 하여 연구를 수행하였으며 세부연구목표는 아래 표와 같았다.

년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (2001-2002)	○ 특이적 유도, 억제 유전자 탐색	15	- 양분처리 재료 확보 (5) - 양분처리에 대한 품종의 반응 조사 (5) - 유도 또는 억제 유전자 탐색 (5)
	○ 양분조건별 cDNA library 제작	15	- 양분(-N, -P, -All)조건별 cDNA library 제작 (15)
	○ 일부 clone의 random sequencing	10	- 일부 clone의 random sequencing (5) - 생물정보학적 분석 (5)
	○ 발현조절특성 및 기능 검정	10	- Southern, Northern 분석 (5) - 이중발현 및 돌연변이체 complementation(5)
	○ 유망 후보유전자 확보	45	- 유망 후보 유전자 15종 확보 여부

(2) 연구목표 달성도

1차년도의 연구목표 달성도는 아래 표와 같다.

계획서상 1차년도 연구내용	추진 실적	달성도(%)
-특이적 유도, 억제 유전자 탐색	특이적 유도, 억제 유전자 탐색	70
-양분조건별 cDNA library 제작	양분조건별 cDNA library 제작	70
-일부 clone의 random sequencing	Random sequencing	100
-발현조절특성 및 기능 검정	인산 및 암모니움 수송자 유전자의 발현 특성 검정	90
-1차년도 최종목표: 양분 흡수 및 이용효율 관련 유망 후보 유전자 및 EST 개발	유망 후보 유전자 및 EST 250종 이상 개발	100

나. 2차년도

(1) 연구목표

2차년도에는 양분조건에 특이적으로 유도 또는 억제되는 유용 유전자를 발굴하여 기능을 검증하는 것을 주 목표로 하여 연구를 수행하였으며 세부연구목표는 아래 표와 같았다.

년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
2차년도 (2002-2003)	○ 특이적 유도, 억제 유전자 분석	20	양분조건에 특이적으로 촉진 또는 억제되는 SSH clone 80종 이상 선발 (20)
	○ EST 개발	15	양분조건에 특이적으로 촉진 또는 억제되는 SSH clone 50종 이상의 EST (10)
	○ 식물체내 발현 특성 조사	20	선발된 유전자 10종의 식물체내에서의 양분조건에 대한 발현 특성 조사 (20)
	○ 기능 검증	20	Mutant complementation (10) RNAi (10)
		15	인산수송자 고발현 변이 T1 5 계통 선발 및 유전자 발현 특성 분석 (15)

(2) 연구목표 달성도

2차년도의 연구목표 달성도는 아래 표와 같다.

계획서상 2차년도 연구내용	추진 실적	달성도(%)
- 특이적 유도, 억제 유전자 분석	양분조건에 특이적으로 유도 또는 억제되는 clone 분석	100
- EST 개발	양분 특이적 발현 EST 60여종 개발	100
- 식물체내 발현 특성 조사	양분 특이적 유전자 (6종)	70
	해당과정, 에너지 대사 유전자 (15종)	100
- 유전자 기능 검증	OsPT 4종 mutant complementation	90
	8종의 기능미지 유전자에 대한 RNAi 실시	80
	인산수송자 유전자 형질전환 T1 세대 5계통 개발	100
- 2차년도 최종목표: 양분 흡수 및 이용 효율 관련 유망 후보 유전자(5종) 및 인산이용 효율 변이 계통 개발 (논문 1, 특허 1)	양분 특이적 유망 유전자와 EST 개발. 인산수송자 유전자 형질전환 변이 계통 개발 (논문 2, 특허 1)	90

다 3차년도

(1) 연구목표

3차년도에는 양분처리 조건에 특이적으로 유도 또는 억제되는 유용 유전자를 발굴하여 기능을 검정하는 것을 주요 목표로 하여 연구를 수행하였으며 세부연구목표는 아래와 같다.

년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
3차년도 (2003. 7~2004. 6)	○ 특이적 유도, 억제 유전자의 발현 검정	10	- Microarray 이용 (10)
	○ 유전자의 기능 검정	30	- 효모돌연변이체 보완(15) - RNAi (15)
	○ 유전자의 구조 분석	10	- Sequencing (5) - 생물정보학적 분석 (5)
	○ 식물체내 양분조건에 대한 발현조절특성 검정	20	- 양분조건 처리 (5) - Northern 분석 (15)
	○ 유망 유전자 확보	30	- 유망 유전자 3종 확보 여부

(2) 연구목표 달성도

3차년도의 연구목표 달성도는 아래 표와 같다.

계획서상 2차년도 연구내용	추진 실적	달성도(%)
-Microarray이용 특이적 유도, 억제 유전자의 발현 검정	Microarray를 이용하여 질소 및 인산 결핍에 대한 유전자 발현 검정	80
-유전자의 기능 검정	RNAi 재조합체 작성 및 형질전환	70
	PT 형질전환체 세대 진전	100
	효모돌연변이체를 이용한 OsPT기능 검정 보완	100
-유전자의 구조 분석	인 및 질소결핍에 특이적으로 유도되는 LTP 2종의 유전자 구조 분석	100
-유전자의 발현 분석	LTP 2종의 조직, 양분, 호르몬 및 생물적 및 비생물적 장애 처리에 대한 발현 특성 분석	100
-3차년도 최종목표: (논문 2, 특허 1)	양분특이적 유망 유전자와 EST 5종 개발. 인산수송자 유전자 형질전환 벼 T2 5계통 개발 (논문 1, 특허 0)	90

제 2 절 관련분야에의 기여도

양분은 작물생육에 필수적인 원소이며 작물 재배시 양분의 관리기술은 영농의 성패를 좌우하는 매우 중요한 기술 중의 하나이다. 반면, 과다하게 시용된 양분은 토양과 내륙수의 부영양화에 의한 오염의 주요원인으로서 토양 및 내륙수에 유입되는 양분의 절감 및 오염된 지역에서의 양분제거 기술은 환경산업의 중추적 기술이다. 이들 기술은 식물의 양분 흡수와 이용에 대한 정보와 관련 소재를 기반으로 발전 가능하다.

따라서 본 연구를 수행하여 얻은 양분이용관련 유전정보와 소재는 분자영양학과 환경학 등의 학문과 관련 산업의 발전에 기여할 수 있을 것으로 평가된다. 특히, 인산과 암모니움수송자유전자의 양분조건에 대한 발현정보는 양분흡수과정의 분자기작에 대한 이해를 증진시키는 중요한 자료이며, 양분이용 고효율 식물 개발에 필요한 필수정보와 소재의 제공에 기여하였다.

또한, 양분이용효율의 양적발현 특성에 대한 정보는 양분관련 산업 소재 및 기술의 개발에 식물의 성장과 발달에 관여하는 인자들의 종합적 고려가 필요함을 제시하였다. 즉, 양분관련 연구에 있어서 주요 단일유전자뿐만 아니라 다수의 미동유전자에 대한 고려가 필요함을 제시하여 양분관련 연구개발의 전략적 기초를 제공한 것으로 평가된다.

따라서 본 연구수행과정에서 개발된 유전자 소재와 이들의 이용관련기술은 국내의 미흡한 양분관련 연구와 기술개발의 발전에 크게 기여한 것으로 평가된다.

본 연구결과의 관련 학문 및 산업발전에서의 구체적인 기여실적을 아래에 요약하였다.

1. SCI 등재 논문

Lim J-H, I-M Chung, SS Ryu, MR Park, SJ Yun. 2003. Differential responses of rice acid phosphatase activities and isoforms to phosphorus deprivation. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36(4): 597-602.

Rehman, S, ES Rha, M Ashraf, KJ Lee, SJ Yun, YG Kwak, JK Kim. 2004. Does barley (*Hordeum vulgare* L.) pollen swell in fractions of a second? *Plant Science* 167: 137-142.

Morsy M, AM Almutairi, SJ Yun, BG De los Reyes. 2004. Characterization of OsLti6a and OsLti6b, two chilling stress-regulated rice (*Oryza sativa* L.) genes encoding low molecular weight membrane proteins. *Gene* (accepted).

2. SCI 비등재 논문

Park, MR, Y-D Kim, K-Y Kim, S-H Baek, SJ Yun. 2003. Growth, protein and pigment content in rice seedlings under phosphorus deprivation condition. *Kor. J. Crop Sci.* 48(2): pp 103-107.

3. 학술회의 발표

Baek, SH, NH Yoo, IS Kwon, SJ Yun. 2001. Molecular cloning of a rice phosphate transporter cDNA. The 15th plant biotechnology symposium. Kor. Soc. Bot. August 9-10, 2001. Pohan, Korea

Yun, SJ, HR Choi, ME Park, JH Lim, SH Baek, KY Kim. 2002. Response of rice growth and acid phosphatases under phosphorus deficiency. 2002 Spring Scientific Meeting of the Biochemical Society of the Republic of Korea, May 16-17, 2002,

Seoul, Korea. p252.

Baek, SH, MR Park, HS Kim, SJ Yun. 2002. Isolation and characterization of a rice phosphate transporter cDNA. 2002 Annual Meeting, KSMB, Oct. 17-18. Seoul. p292.

Park, MR, MH Park, KY Kim, SH Baek, B de los Ryes, SJ Yun. 2003. Mineral Nutrient Responsive Genes in *Oryza sativa* L. 2003 Annual Meeting, ASA-CSSA-SSSA, Nov. 2-6, 2003. Denver, CO, USA. p. 328

4. 특허

Yun, SJ, S-H Baek. Phosphate transporter gene from tobacco. Korean Patent 20030401007 (등록 2003/09/25).

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 수행하여 개발한 인산수송자 유전자를 이용하여 다음과 같은 연구개발을 추가적으로 수행할 예정이다.

1. 뿌리 및 양분특이적 발현 promoter의 개발

OsPT1은 인결핍조건에서 뿌리에서 특이적으로 발현되므로 OsPT1의 발현을 조절하는 promoter를 분리하여 이의 구조와 조절 특성을 파악하여 유용 promoter로 개발할 예정이다.

2. 인산흡수고효율 작물 및 환경정화 식물 개발

모든 식물은 인산을 필수원소로 사용한다. 따라서 본 연구를 통하여 개발한 인산수송자유전자의 식물체내 형질전환 및 발현조절을 통하여 인산흡수고효율 작물 및 환경정화 식물을 개발할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구수행 중에 국제 방문연구를 수행하여 다음과 같은 자료와 정보를 입수하였다.

1. 환경장애 저항성관련 단일 유전자 cDNA microarray

본 연구와 관련성이 있는 환경장애 저항성에 관한 연구를 수행하는 Dr. Benildo G. de los Reyes(현재 University of Maine, Orono, USA 근무, 방문연구 당시 University of Arkansas, Fayetteville, USA)와의 협력 연구를 통하여 환경장애 저항성관련 단일 유전자 3,000종을 이용하여 cDNA microarray 제작에 참여하여 microarray를 입수하였고, microarray 분석기술을 습득하였다.

또한 환경장애 저항성 연구 분야에서는 다수의 관련 유전자의 상호작용 체계에 대한 종합 정밀 분석에 주력하고 있으며, microarray를 이용한 연구가 필수적임을 확인하였다. 또한 생물정보학적 기법을 이용한 환경장애 저항성관련 주요 유전자의 promoter 개발 기술과 정보를 확보하였다.

2. 인산이용관련 유전자원 수집

인산이용효율에 관한 연구를 집중적으로 수행하는 Dr. Carroll Vance(University of Minnesota, St. Paul, USA)와의 협력연구를 통하여 양분이용에 관련된 유전자를 제공받았으며, 양분이용관련 유전자 promoter 개발 연구현황과 기술 및 in situ hybridization 기술에 대한 정보를 입수하였다.

제 7 장 참고문헌

- 고희중. 1998. 질소이용효율 향상을 위한 벼 생산기술 및 품종개발. 농림부농림수산기술관리센터 보고서.
- 김충국, 서종호, 김동휘. 1998. 논에서 시비질소의 환경오염 및 이용효율 분석. 농촌진흥청 작물시험장 시험연구 보고서(작물편). pp34-39.
- 박종택. 2000. 질소 무시용 재배조건에서 벼 수량관련형질의 유전과 선발효과. 서울대학교 대학원 박사학위논문.
- 이은웅. 1994. 수도작. 향문사
- Anamnat, S., Tomita, T., Fukui, F., Fujimori, K., Harashima, S., Yamada, Y. and Oshima, Y. 1997. The P-OLE1 gene of *Pichia angusta* encodes a $\Delta 9$ -fatty acid desaturase and complements the ole1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 184: 299-306.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K. and Stewart, C.R. 1995. Change in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109 :1247-1257
- Anthony S. and Harlan H.V., 1920., Germination of barley pollen. *J. Agric. Res.* 18 :525 - 539.
- Baek, S. H., Chung, I. M. and Yun, S. J. 2001. Molecular cloning and characterization of tobacco leaf cDNA encoding a phosphate transporter. *Mol. Cells* 11(1):1-6
- Bergmann, W. 1992. Nutritional disorders of plants: Development, visual and analytical diagnosis. Gustav Fischer Verlag. Jena.
- Binhui, N., Rosteck, P. R., Jr. Nadi, N. S. and Paul, S. M. 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain specific Na^{+} -dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5607-5611.
- Bun-ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. and Oshima, Y. 1991. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell Biol.* 11: 3229-3238.
- Chaubey C. N., Senadhira, D., Gregorio G. B. 1994. Genetic analysis of tolerance for phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 89:313-317
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y. and Bi, F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin.* 18: 659-668.
- Cooper, B., Eckert, D., Andon, N. L., Yates, J. R. and Haynes, P. A. 2003. Investigative proteomics: identification of an unknown plant virus from infected plants using mass spectrometry *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 14:736-741
- Cresti, M., Pacini, E., Ciampolini, F. and Sarfatti, G. 1977. Germination and early tube development in vitro of *Lycopersicon peruvianum* pollen. Ultrastructural features.

- Planta 136:239 - 247.
- Duff, S. M. G., Sarath G. and Plaxton, W. C. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* 90:791-800.
- EFMA. 1997. Fertilizer forecast.
- Fageria, N. K., Morais, O. P., Baligar, V. C. and Wright, R. J. 1988. Response of rice cultivars to phosphorus supply on an oxisol. *Fert. Res.* 16:195-206.
- FAO. 1998. FAOSTAT database.
- Fischer, R.A. 1971. Role of potassium in stomatal opening in the leaf of *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 47:555 - 558.
- Fischer, W. N., Andre, B., Rrentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breikreuz, K. and Frommer, W. B., 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Sci.* 3:188-195.
- Forde, B. G. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:219-235.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 11: 355-360.
- Ge X., Chen, J., Li, N., Lin, Y., Sun, C. and Cao, K. 2003. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J Biochem Mol Biol.* 36(6):603-607.
- Golestein, A., Baertlein, D. and McDaiel, R. 1988. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* 87:711-715.
- Halsted, M. and Lynch, J. 1996. Phosphorus responses of C3 and C4 species. *J. Exp. Bot.* 47:497-505.
- Heslop-Harrison, Y. and Heslop-Harrison, J.S. 1996. Lodicule function and filament extension in the grasses: potassium ion movement and tissue specialization. *Ann. Bot.* 77:573 - 582.
- Hirsch, R. E. and Sussman, M. R. 1999. Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. *TIBTECH* 17:356-361.
- Howitt, S. M. and Udvardi, M. K. 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465:152-170.
- Inthapanya, P., Sipaseuth, P., Sihavong, V., Sihathep, M., Chanphengsay, S., Fukai and Basnayake, J. 2000. Genotype differences in nutrient uptake and utilization for grain yield production of rainfed lowland rice under fertilised and non-fertilised conditions. *Field Crops Res.* 65:57-68.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- Iwamoto M., Higo, H. and Kenichi H. 2000. Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5' -flanking region of *CatA* is not sufficient for circadian

- control. *Plant Sci.* 151:39-46
- Kader, J. C., Soufleri, I. A., Vergnolle, C. and Miginiac, E. 1996. Germination-specific lipid transfer protein cDNAs in *Brassica napus* L., *Planta*, 199:229-237
- Kai, M., Masuda, Y., Kikuchi, Y., Osaka, M. and Tadano, T. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from *Catharanthus roseus* which is highly homologous with phosphate transporter. *Soil Sci. Plant Nutr.* 83: 227-235.
- Leggewie, G., Willmitzer, L. and Riesmeier, J. W. 1997. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9: 381-392.
- Liu, C., Muchhal, U. S., Uthappa, M., Kononowicz, A. K. and Raghothama, K. G. 1998a. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol.* 116: 91-99.
- Liu, H., Trieu, A. T., Blaylock, L. A. and Harrison, M. J. 1998b. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 14-22.
- Lafitte, H. R. 1998. Research opportunities to improve nutrient-use efficiency in rice cropping systems. *Field Crops Research* 56:223-236.
- Lange, H. W., Shropshire, Jr. and Hohr, H. 1971. An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* 47:649-655.
- Lefebvre, D. D., Duff, S., Fife, M. G., Julien-Inalsing, C. and Plaxton, W. C. 1990. Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* 93:504-511.
- Ma, Z., Bielenberg, D. G., Brown, K. M. and Lynch, J. P. 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24:459-467.
- Macallum, A.G. 1905. On the distribution of potassium in animal and vegetable cells. *J. Physiol.* 18:95 - 128.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. Cambridge. 889p.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed., Academic Press, London.
- Matsui, T., Omasa, K. and Horie, T. 2000. Rapid swelling of pollen grains in the dehiscent anther of two-rowed barley (*Hordeum distichum* L. emend. Lam.). *Ann. Bot.* 85:345 - 350.
- Miller, S. S., Liu, J., Allan, D. L., Menzhuber, C. J., Fedorova, M. and Vance, C. P. 2001. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiol.* 127, 594-606.

- Mittler, R., B.A. Zilinskas. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* 212 : 540-546
- Moore, R., W.D. Clark, K.R. Stern. 1995. *Botany*, Wm. C. Brown Publishers, Boston, USA,
- Muchhal, U. S., Pardo, J. M. and Raghothama, K. G. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10519-10523.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nakano, Y., and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 22 : 867-880
- OECD. 2001. OECD environment strategy for the first decade of the 21st century.
- Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C. and Briggs, S. P. 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13324-13329.
- Pingali, P.L, Hossain, M., Pandey, S. and Price, L. L. 1998. Economics of nutrient management in Asia rice system: Towards increasing knowledge intensity. *Field Crops Research* 56:157-176.
- Raghothama, K. G. 2000. Phosphate transporter and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:182-187.
- Roger, S. O. and Bendich, A. J. 1989. Extraction of DNA from plant tissues; in *Plant Molecular Biology Manual*, Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A., and Verma, D. P. S. (eds.), pp. A6: 1-10.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J. and Peñarrubia, L. 2003. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 51:577-587
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acid as carrier. *Curr. Genetics* 16: 339-346.
- Singh, U., Ladha, J. K., Castillo, E. G., Punzalan, G., Tirol-Padre, A. and Duqueza, M. 1998. Genotypic variation in nitrogen use efficiency in medium and long duration rice. *Field Crops Research* 58:35-53.
- Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Ealing, P. M. and Clarkson, D. T. 1995. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9373-9377.
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Dong, B. and Delhaize, E. 1997. The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J.* 11: 83-92.
- Smyth, D. A. and Chevalier, P. 1984. Increases in phosphate and α -glucosidase activities in wheat seedlings in response to phosphorus-deficient growth. *J. Plant*

- Nutr. 7:1221-1231.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Suenaga, A., Moriya, K., Sonoda, Y., Ikeda, A., Von Wiren, N., Hayakawa, T., Yamaguchi, J. and Yamaya, T. 2003. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant Cell Physiol.* 44(2):206-11
- Tadano, T. and Sakai, H. 1991 Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37: 129-140.
- Toh-e A, and Oshima, Y. 1974. Characterization of a dominant, constitutive mutation, *PHO0*, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 120: 608-617.
- Toriyame, K. and Hinata, K. 1985. Cellsuspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41: 179-183.
- Tirol-Padre, A., Ladha, J. K., Singh, U., Laureles, E., Punzalan, G. and Akita, S. 1996. Grain yield performance of rice genotypes at suboptimal levels of soil N as affected by N uptake and utilization efficiency. *Field Crop Research* 46:127-143.
- UN. 2001. World population prospects. The 2000 revision.
- Uhde-Stone, C., Zinn, K. E., Ramirez-Yáñez, M., Li, A., Vance, C. P. and Allan, D. L. 2003. Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, 131:1064-1079
- Watt, M. and Evans, J. R. 1999. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol.* 121:317-324.
- Wissuwa, M. and Ae, N. 2001. Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. *Plant Breeding* 120:43-48.
- Wissuwa, M, Yano, M. and Ae, N. 1998. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.*97:777-783.
- Woodbury, W., A.K. Spencer, and M.A. Stahmann. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44 : 301-305
- Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N. and Oshima, Y. 1989. Mode of expression of the positive regulatory genes *PHO2* and *PHO4* of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 217: 31- 39.
- Yamaya T. 1999. Nitrogen recycling and utilization in rice. In Proc. of the international symposium on nitrogen and carbon utilization in plants: Molecular approaches for the improvement of productivity. GonryoKailan, Sendai, Japan. pp11-12.
- Yan, X., Liao, H., Trull M. C., Beebe, S. E. and Lynch, J. 2001. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in

- common bean. *Plant Physiol.* 125:1901-1911.
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H. and Gomez, K. A. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Research Institute. Philippines. 83p.
- Yun, S.J. and Kaeppler. S. M. 2001. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant Soil* 237:109-115.