

리포트 시스템을 이용한 살리실산 생합성 유전자 *SID2*의 발현 해석

홍미주, 정미선, 이지영, 김 훈, 정재철, 신명철, 자알알리, 박보경, 최원균, 윤대진*
경상대학교 대학원 응용생명과학부

Characterization of *SID2* that is required for the production of salicylic acid by using β -*GLUCURONIDASE* and *LUCIFERASE* reporter system in *Arabidopsis*

Mi Ju Hong, Mi Sun Cheong, Jiyoung Lee, Hun Kim, Jae Cheol Jeong, Mingzhe Shen, Zahir Ali,
Bo Kyung Park, Wonkyun Choi, and Dae-Jin Yun*

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

ABSTRACT Salicylic acid (SA) is a phytohormone that is related to plant defense mechanism. The SA accumulation is triggered by abiotic and biotic stresses. SA acts as a signal molecular compound mediating systemic acquired resistance and hypersensitive response in plant. Although the role of SA has been studied extensively, an understanding of the SA regulatory mechanism is still lacking in plants. In order to comprehend SA regulatory mechanism, we have been transformed with a *SID2* promoter:*GUS::LUC* fusion construct into *siz1-2* mutant and wild plant (Col-0). *SIZ1* encodes SUMO E3 ligase and negatively regulates SA accumulation in plants. *SID2* (*SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2*) is a crucial enzyme of SA biosynthesis. The *Arabidopsis* *SID2* gene encodes isochorismate synthase (ICS) that controls SA level by conversion of chorismate to isochorismate. We compared the regulation of *SID2* in wild-type and *siz1-2* transgenic plants that express *SID2* promoter:*GUS::LUC* constructs respectively. The expressions of β -*GLUCURONIDASE* and *LUCIFERASE* were higher in *siz1-2* transgenic plant without any stress treatment. *SID2* promoter:*GUS::LUC/siz1-2* transgenic plant will be used as a starting material for isolation of *siz1-2* suppressor mutants and genes involved in SA-mediated stress signaling pathway.

서 론

식물의 발달과 성장 그리고 자기방어의 모든 대사는 식물 호르몬에 의하여 조절 된다 (Pancheva et al. 1996; Rajjou et al. 2006). 살리실산 (Salicylic acid, SA)는 식물 호르몬 중의 하나로써 고등식물의 병저항성 기작에서 중요한 역할을 하

는 천연 페놀 화합물이며 다양한 종류의 병원균으로 인해 유도되어 생성 된다 (Raskin 1992; Janda et al. 2003). 이 화합물은 병원균 뿐 만아니라 식물이 자외선, 오존, H₂O₂, 고온 스트레스, 저온 스트레스에 노출 되었을 때에도 생성되어 식물체의 방어 대사를 원활하게 하게 해 준다 (Janda et al. 1999; Mackerness 2000; Scott et al. 2004; Larkindale et al. 2005; Holuigue et al. 2007; Strawn et al. 2007). 이와 같이 SA는 식물의 발달 및 성장, 병충해 저항성, 대사변화에 매우 중요한 역할을 하는 조절인자로서 SA에 대한 총체적인 연구가 활발히 진행되고 있다.

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

식물이 생물학, 비 생물학적 스트레스에 노출되면 식물 조직 내 SA 생합성이 유도되어, SA가 축적되게 된다. SA의 생합성 경로는 크게 2가지로 나누어지는데 (Jyoti 2003), 첫 번째 경로는 phenylalanine ammonia lyase (PAL)이 chorismate로부터 파생된 phenylalanine을 SA로 합성하는 경로로써 담배에서는 Figure 1A에서와 같이 PAL의 활성화에 의해 SA가 합성되어 진다 (Yalpani et al. 1994). 또 다른 경로는 SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 (SID2)에 의하여 암호화되어진 isochorismate synthase (ICS)가 SA의 전구체인 chorismate를 isochorismate로 변화시켜 SA를 합성하는 경로이다. 애기장대의 경우 SID2 유전자에 이상이 있는 sid2-2 돌연변이체는 병원균을 처리해도 야생형과는 달리 SA의 축적이 일어나지 않는 것으로 알려져 있다 (Wildermuth et al. 2001).

애기장대의 경우 저항성 유전자 (resistance gene)들이 병원균을 인지하게 되며 ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY (EDS1), PHYTOALEXIN DEFICIENT4 (PAD4)가 SA 합성에서 가장 중요한 효소인 SID2를 활성화시켜 SA를 합성하게 한다. 합성된 SA는 방어 유전자들의 발현을 증가시키는 전사 인자 (transcription factor)인 NPR1을 활성화시켜 방어 유전자들을 발현시킴으로써 병원체가 침입한 부위가 급격히

고사하는 과민 반응 (Hypersensitive response, HR) 그리고 병원균이 감염되지 않은 나머지 부위에서도 병원체에 대한 저항성을 얻게 되는 획득저항성 (Systemic Acquired Resistance, SAR)을 일으켜 방어 대사가 활발히 일어나게 한다 (Figure 1B; Jyoti 2003; Durrant and Dong 2004). 또한 식물체에 오존, H₂O₂, 자외선 등의 산화 스트레스가 오게 되면 식물체 내에 SA가 축적되며 reactive oxygen species (ROS)가 증가된다.

증가된 SA는 세포내의 redox state를 조절하며 방어 유전자들을 발현 시키는 것으로 알려져 있다 (Chen et al. 1993; Leon et al. 1995; Sharma et al. 1996; Dat et al. 1998; Surplus et al. 1998). 그러나 식물의 다양한 방어기작에 관계되는 SA의 중요성에 비해 SA의 합성과 신호전달을 유도하는 관련 유전자들의 상호관계에 대한 이해가 많이 부족하다. 우리는 선행연구를 통하여, SUMO E3 ligase를 암호화하고 있는 SIZ1 유전자가 SA 생합성을 억제한다는 사실을 밝혔다 (Lee et al. 2007). 즉, SIZ1에 T-DNA가 삽입된 siz1-2 돌연변이체는 스트레스가 없는 조건에서 SA를 대량으로 축적하며, SA 생합성 효소인 SID2 발현 및 PR 유전자를 비롯한 생체 방어 유전자의 발현이 현저히 증가된다는 사실을 알아내었다. 또한 이로 인해 병원균에 높은 저항성을 가진다는 사실도 밝

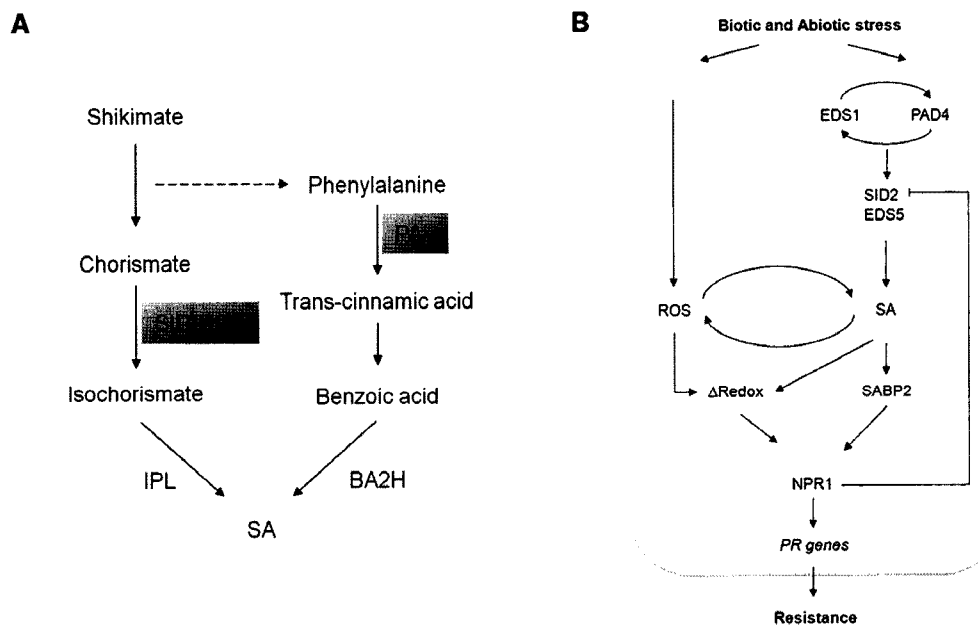


Figure 1. SA plays a major role in plant defense. A. The biosynthesis of SA in plants. The shikimate pathway is a main route providing chorismate in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* SID2, isochorismate synthase (ICS), controls SA level by conversion of chorismate to isochorismate and roles a crucial step of SA biosynthesis. B. The SA signaling pathway. Physiological responses and pathogen -activated signal stimulate the synthesis of SA. SA activates expression of the pathogenesis-related (PR) genes. Plants represent SA-mediated resistance, SAR and HR. The SID2 and EDS5 genes appear to be directly involved in the SA signaling pathway.

했다 (Lee et al. 2007).

본 연구에서는 SA의 합성과 신호전달 연구를 위해 *SID2* promoter에 β -GLUCURONIDASE (*GUS*)와 *LUCIFERASE* (*LUC*) 리포트 유전자들을 연결시킨 construct를 야생형과 *siz1-2* 돌연변이체에 도입하여 *SID2*의 발현 조절을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 생육 조건

pGL1300 vector와 pGL1300 vector에 *SID2* promoter를 넣은 construct을 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 전기충격요법으로 형질 전환하였다. 형질 전환된 GV3101을 6주된 애기장대 야생형 (*Arabidopsis thaliana*, Columbia-0)와 *siz1-2* 돌연변이체 (SALK_065397)에 Floral dipping (Bent 2006)을 통하여 형질 전환하여 1세대 형질전환 식물체 (T₁)에서 Hygromycin (30 mg)에 저항성을 보이는 형질전환 식물체만을 선별하여 식물의 재료를 준비하였다. 애기장대의 종자를 70% 에탄올을 사용하여 표면을 멸균한 후, 5% NaOCl에 10분에서 15분 동안 처리하여 소독하고 멸균수를 이용하여 종자의 표면에 NaOCl이 묻어있지 않도록 7번 씻어 주었다. 식물 배지는 MS salt, 2% sucrose, 1.2% agar (pH 5.7)가 들어간 것을 사용하였다. 식물을 발아시키기 전, 4°C에서 암 상태로 4일 동안 춘화처리를 하였다. 식물 배양실 내의 온도는 22±2°C, 빛 양은 long day조건 (낮 16 시간, 밤 8 시간)으로 조정된 것을 사용하였다.

SID2 promoter:*GUS*::*LUC* 벡터 구축

-1862bp ~ +301 bp의 *SID2* promoter 부위를 애기장대의 genomic DNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 수행하여 얻었다. 이때 forward primer에 *Kpn* I 제한 효소 site를 넣어준 5'-CTCGGTACCTATCTAAATCAACTAACGT-3'와 reverse primer로써 *Hind*III 제한 효소 site를 넣어준 5'-TCTAAGCTTAGCAGTCATAGTCCTTGTCTCC-3'를 사용하였다. PCR조건은 95°C에서 먼저 5분 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분 20초씩 30번 반복 반응시킨 후, 72°C에서 10분 마지막 반응을 시켰다. 이 PCR 생성물을 *Kpn* I, *Hind*III 제한효소로 자른 후 앞의 것과 동일한 제한효소로 자른 pGL1300 vector와 함께 T4 ligase로 4°C에서 12시간 반응시켰다.

형질전환 식물체의 확인을 위한 diagnostic PCR

pGL1300 vector와 *SID2* promoter:*GUS*::*LUC*가 들어간 형질전환 식물체 확인을 위하여 forward primer1 (F1), 5'-TTTAGTGGGCCCTGCTAC-3'; reverse primer1 (R1), 5'-TGCCCAACCTTTCGGTATAAAGA CTT-3'; forward primer2 (F2), 5'-AAAGTGTGGGTCAATAATAATCAGGAAG-3'; reverse primer2 (R2), 5'-CAGTAAAGTAGAACGGTTTGTGTGTT-3'; forward primer3 (F3), 5'-TGTACACGTTGTACATC TCATCTA-3'; reverse primer3 (R3), 5'-GTATTTGTCAATCAGAGTGCTTTGG-3'을 설계하여 대조군으로써 *E. coli*로부터 정제한 플라스미드와 형질전환 식물체의 genomic DNA를 가지고 위의 primer들을 각각 짝지어 PCR 반응을 시켰다. PCR 조건은 95°C에서 먼저 5분 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 40초씩 30번 반복 반응시킨 후, 72°C에서 10분 마지막 반응을 시킨 후에 1% agarose gel에 전기 영동하였다.

형질전환 식물체에서 *SID2* promoter에 의해 조절 받는 *GUS* 발현 확인을 위한 *GUS* histochemical assay.

식물배지에서 키운 7일된 형질전환 식물체를 6 wall plate에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.2% triton X-100, 5 mM Ferrocyanide, 5 mM Ferricyanide, 2 mM X-gluc로 구성된 *GUS* staining 용액에 식물 조직이 다치지 않게 식물을 채취하여 식물이 용액에 완전히 잠기도록 넣는다. *GUS*의 기질인 X-gluc는 빛에 약하기 때문에 알루미늄 호일로 plate를 암 상태로 만들어준 후 37°C에서 배양한다. 다음날 *GUS* staining 용액을 제거하고 에탄올 농도를 25%, 50% 70%, 95%로 낮은 농도부터 높은 농도의 에탄올을 실온상태에서 처리하여 *GUS* staining 부위가 잘 보일 수 있도록 엽록소의 색을 빼준다 (Jefferson 1987). 그리고 현미경을 이용하여 형질전환 식물체들의 조직을 관찰하였다.

형질전환 식물체에서 *SID2* promoter에 의해 조절받는 *GUS*의 발현 확인을 위한 MUG fluorescent assay.

흙에서 키운 14일된 T₂세대의 Vector/WT, *SID2* promoter/WT, Vector/*siz1-2*, *SID2* promoter/*siz1-2* 각각의 30개의 독립적인 형질전환식물체의 잎을 따서 열린 상태에서 곱게 간 후 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1%

triton X-100, 10 mM β-mecapthanol으로 조성된 GUS extraction buffer를 100 μl 넣어서 단백질을 뽑은 후 bradford 용액을 이용하여 파장 595 nm로 정량을 한 다음 10 μg 단백질을 GUS의 기질인 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) 1 mM과 반응부피 100 μl 되게 나머지 부피는 GUS extraction buffer로 채우고 37°C에서 40분간 반응 시킨 후 0.2 M Na₂CO₃로 조성된 stop 용액을 동량으로 넣어준다. 검은색으로 된 불투명한 96 well plate (NUNC, DK)에 각 샘플 당 100 μl 동일 양으로 분주하여 1420 multilabel counter (PerkinElmer life science)로 GUS의 활성을 측정하였다 (Gallagher SR 1992).

형질전환 식물체에서 SID2 promoter에 의해 조절 받는 LUCIFERASE의 발현정도 확인을 위한 Luciferase imaging system.

식물배지에서 키운 10일된 식물체에 0.01% Triton X-100에 녹인 1 mM Luciferin을 뿌린 후 10분 동안 암반응을 시킨다. Andor MCD program을 이용하여 Charge Coupled Device (CCD) 카메라 (ANDOR technology, UK)로 5분간 노출시켜 찍는다. 이때 카메라 센서의 온도는 -55°C로 유지하여 빛의 산란을 최소화 시켜준다 (Ishitani et al 1997).

형질전환 식물체에서 SID2 promoter에 의해 조절 받는 LUCIFERASE의 발현정도 확인을 위한 Luciferase assay system.

흙에서 키운 14일된 T₂세대의 Vector/WT, SID2 promoter/WT, Vector/siz1-2, SID2 promoter/siz1-2 각각의 30개의 독립적인 형질전환 식물체의 잎을 따서 얼린 상태에서 곱게 간 후 GUS extraction buffer를 100 μL 넣어서 단백질을 뽑은 후 bradford 용액을 이용하여 파장 595 nm로 정량을 한 다음 Luciferase assay system (Promega)을 사용하였다. 2 μg 단백질을 1회분의 Luciferin이 분주된 E-tubu에 넣어서 20/20th Luminometer (Turner Biosystems, CA)로 LUC의 활성을 측정하였다 (Yoo et al. 2005).

결 과

SID2 유전자 조절 연구를 위한 형질전환 식물체의 구축

siz1-2는 T-DNA 삽입으로 인해 SUMO E3 ligase의 기능을 상실하였으며 SA 합성 효소 발현과 SA에 반응하는 저항성

유전자들의 발현이 높은 돌연변이체이다. 애기장대 야생형과 비교하였을 때 스트레스가 없는 상태에서도 높은 SA 축적을 보이는 siz1-2 돌연변이체에서 SA 합성 조절에 주요하게 작용하는 SID2의 발현이 어떻게 조절 되는지 알아보기 위하여 리포트 유전자들로서 GUS와 LUC를 가지고 있는 pGL1300 vector를 이용하였다. SID2 promoter (-1862bp ~ +301bp)를 pGL1300 vector 리포트 유전자의 상단에 넣어 GUS와 LUC가 SID2 promoter 조절을 받게 만든 construct를 야생형과 siz1-2 돌연변이체에 형질 전환하여 Vector/WT, SID2 promoter:Gus::Luc/WT, Vector/siz1-2, SID2 promoter:Gus::Luc/siz1-2, 네 가지 형질전환 식물체를 구축하였다 (Figure 2A).

pGL1300 vector는 식물체에서 hygromycin 저항성을 가지기 때문에 T₀ 식물의 종자를 받아 hygromycin이 첨가된 식물 배지 파종하여 형질전환 식물체를 선별하였다. 선별된 형질전환 식물체를 확인하기 위해 형질전환 식물체의 잎 조직에서부터 genomic DNA를 추출하여 SID2 promoter primer F1과 vector GUS부위의 primer R1를 이용하여 Diagnostic PCR을 수행하였다. 그리고 선별되어진 식물에서 리포트 유전자가 이상 없이 들어가 있는지 확인하기 위하여 GUS는 F2, R2 primer를 사용하였으며 LUC는 F3, R3 primer로 쌍을 지어 diagnostic PCR을 수행하였다. 대조군으로써 E. coli에서 분리한 vector와 SID2 promoter:GUS::LUC 플라스미드를 동일한 primer들을 사용하여 같은 조건에서 PCR을 반응시켰다.

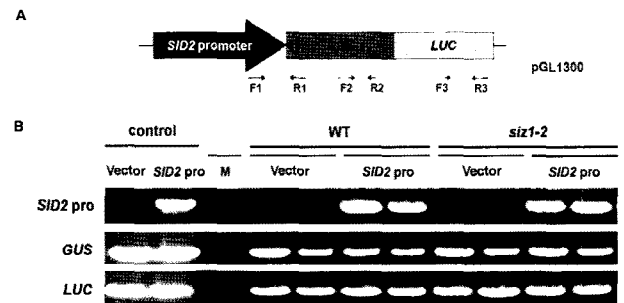


Figure 2. The construction of SID2 promoter:GUS::LUCIFERASE. A. Diagrammatic representation of the SID2 promoter:GUS::LUC construct. The -1862 to +301 SID2 promoter was inserted into a plant transformation vector containing the GUS and LUC. The expression of GUS and LUC are controlled by SID2 promoter. Vector and construct transformed into WT (Columbia-0) and siz1-2 plants. B. The diagnostic PCR analysis of construct in WT and siz1-2 genome. Genomic DNA was extracted from T1 plants. M (size marker). Plasmid from E. coli (positive control). The PCR products were from SID2 promoter using F1 and R1 primers, GUS using F2 and R2 primers, and LUC using F3 and R3 primers.

PCR 생성물을 agarose gel에 전기영동 하였을 때 형질전환 식물체의 genomic DNA를 주형으로 사용한 PCR 생성물과 크기가 일치하며 또한 염기서열 분석을 통하여 동일한 생성물임을 알 수가 있었다. 그리고 *SID2* promoter 부위에 결합하는 primer F1과 vector 부위에 결합하는 R1를 사용하여 PCR을 반응시킨 결과 vector만 들어가 있는 형질전환 식물체에서는 PCR 생성물이 생성되지 않으며 *SID2* promoter:*GUS*::*LUC* construct가 삽입된 형질전환 식물체에서는 PCR 생성물이 나오는 것을 통하여 vector만 들어간 형질전환 식물체와 *SID2* promoter가 들어간 형질전환 식물체를 구별할 수 있었다. 이러한 결과를 보았을 때 각각의 construct가 온전히 삽입된 형질전환 식물체를 확보하였음을 확인할 수 있었다 (Figure 2B).

야생형과 *siz1-2* 돌연변이체에서 *SID2* promoter에 의한 *GUS* 발현 조절

하나의 형질전환 식물체에 여러 copy의 construct가 들어가서 부가적인 영향을 주는 형질전환 식물체를 배제하기 위하여 Southern blot을 수행하였다. 형질전환 식물체 2세대에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 blot을 만들었으며, vector 내에 존재하는 *GUS* 부위를 probe로 사용하여 1 copy의 construct만 존재하는 형질전환 식물체를 선별하였다. 선별

된 형질전환 식물체를 사용하여 야생형과 *siz1-2*에서의 *SID2*의 조절이 어떻게 되는지 알아보았다. 첫 번째로 *GUS*의 발현을 통하여 *SID2*가 식물체의 어떤 조직에서 발현이 많이 되는지를 스트레스가 없는 조건에서 7일된 형질전환 식물체를 이용하여 *GUS* histochemical assay 수행하였다. *GUS*의 발현은 *SID2* promoter:*GUS*::*LUC/siz1-2* 형질전환 식물체에서 *SID2* promoter:*GUS*::*LUC/WT*에 비해 잎과 배측에서 높게 나타났다 (Figure 3A). 두 번째로 *SID2* promoter에 의해 조절 받아 발현되는 *GUS*의 정도를 정량화시켜 비교하기 위하여 *MUG* assay를 수행하였다. *MUG*는 *GUS*의 기질로써 *GUS*를 처리하게 되면 발광을 하게 되는 데 이 발광 정도를 1420 multilabel counter를 이용하여 측정함으로써 *GUS*의 발현 정도를 알 수 있다. 14일된 T₂ 식물체 중 30개의 독립적인 식물체의 잎에서부터 단백질을 추출하였다. *GUS*의 활성화 정도가 *GUS* histochemical assay와 동일하게 *SID2* promoter:*GUS*::*LUC/siz1-2* 형질전환 식물체에서 *SID2* promoter:*GUS*::*LUC/WT*에 비해 약 8배 값이 증가하였다 (Figure 3B).

야생형과 *siz1-2* 돌연변이체에서 *SID2* promoter에 의한 *LUCIFERASE* 발현 조절

pGL1300은 *GUS* 이하에 반딧불이에서 온 *LUCIFERASE* 유전자를 가지고 있다. 이 *LUC*에 기질인 곤충 luciferin을 처

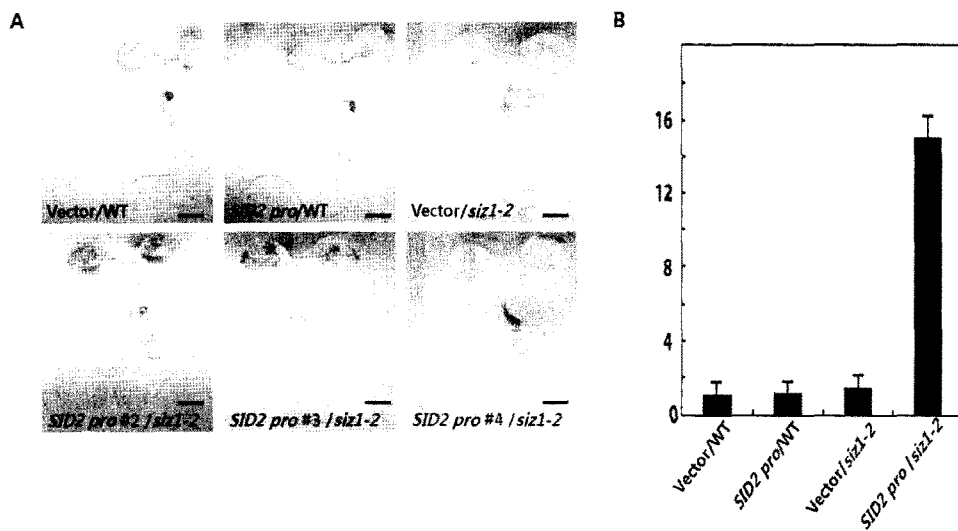


Figure 3. The analysis of *GUS* expression in WT and *siz1-2* plants. *SID2* pro/*siz1-2* transgenic lines exhibited higher activity of *GUS*. A. *GUS* histochemical assay. *GUS* expression was assayed histochemical with X-Glu using 7-day-old T₂ plant (scale bar, 0.2 mm). B. Fluorescent assay. T₀ determine the *GUS* activity, total protein was extracted from 14-day-old T₂ plants. 10 µg of protein was reacted to 1 mM *MUG*. Each bar represents the average of fluorometric value from 30 seedlings. Error bars indicate standard errors.

리하게 되면 LUC에 의하여 oxyluciferin으로 바뀌면서 빛을 낸다. 발광의 정도에 따라 LUC 유전자의 발현 정도를 알 수 있다. *SID2 promoter::GUS::LUC* 형질전환 식물체에서 LUC의 발현은 앞서 *GUS*와 함께 *SID2 promoter*에 의해 조절 받는다. 각각의 형질전환 식물체에서 LUC의 발현이 어떻게 차이가 나는지 보기 위하여 첫 번째로 10일된 T₂ 식물체에 luciferin을 처리한 후 CCD 카메라로 생체발광 이미지를 촬영하였다 (Figure 4A). 그 결과 *SID2 promoter::GUS::LUC/siz1-2* 형질전환 식물체들에서 높은 발광을 보이는 이미지를 보였다. 두 번째로 *SID2 promoter*에 의해 조절 받아 발현되는 LUC의 정도를 정량화시켜 비교하기 위하여 luciferase assay를 수행하였다 (Figure 4B). 14일된 T₂ 식물체 중 30개의 독립적인 식물체의 잎에서부터 단백질을 추출하여 luciferin과 반응 시켜 20/20th luminometer를 이용하여 발광 정도를 측정하였다.

GUS 발현 결과와 유사하게 *SID2 promoter::GUS::LUC/siz1-2* 형질전환 식물체의 LUC의 활성이 *SID2 promoter::GUS::LUC/WT*에 비해 40배 정도 높게 나타났다.

고 찰

식물 호르몬 중의 하나인 SA는 병충해, 자외선, 고온 스

트레스, 그리고 저온 스트레스에 관계되어 저항성을 보이게 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 SA의 중요성 때문에 여러 분야에서 다양한 연구가 수행되고 있지만 아직까지 SA를 이해하고 실용하는 데에는 부족한 점이 많다. 지금까지 밝혀진 SA의 신호전달은 앞에서 서술한 바와 같이 생물학적, 비 생물학적 스트레스가 왔을 때, 이들 신호를 인지하여 식물의 반응 기작을 조절한다는 것이다. 모델 식물인 애기장대는 SA 합성에서 *SID2* 유전자에 의해서 SA가 식물체에서 합성 되어 SA 신호 전달을 일으키거나 합성된다. 합성된 SA는 식물체내의 redox level을 조절함으로써, SA 의존적 방어 유전자들을 발현시켜, 결과적으로 식물체가 방어력을 가질 수 있게 한다. SA를 연구하기 위하여 본 논문에서는 *siz1-2* 돌연변이체에서의 *SID2*의 발현 조절을 야생형과 비교하여 연구를 하였다.

*siz1-2*는 스트레스가 없는 조건에서도 SA 축적이 야생형에 비해 높게 일어나며 병 저항성에도 뛰어난 표현형을 보이는 *SIZ1* knock out 돌연변이체이다. 먼저 *SID2 promoter::GUS::LUC* construct를 *siz1-2* 돌연변이체와 야생형에 형질전환시켜 형질전환 식물체를 구축하였다. 이렇게 구축된 형질전환 식물체들에서 *SID2 promoter*에 의해 조절 받는 리포트 유전자인 *GUS*와 *LUC*의 발현을 확인해 보았다. *SID2 promoter::GUS::LUC/siz1-2*에서 리포트 유전자들인 *GUS*와

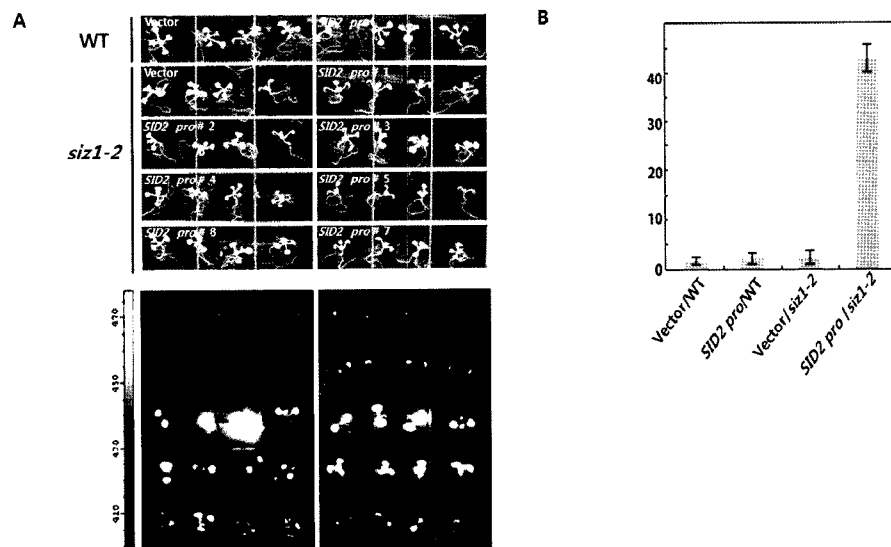


Figure 4. The analysis of LUC expression in WT and *siz1-2* plants. *SID2 pro/siz1-2* transgenic lines exhibited higher light intensity (LUC activity). A. The luminescence image. Bright-field, upper panel; intensity scale and luminescence image, lower panel. It was used 10-day-old seedlings of T₂ plants. The color scale on the left shows the luminescence intensity from dark blue (lowest) to white (highest). B. Luciferase assay. Luciferin was incubated with 2 µg crude protein from 14-day-old T₂ plants and then activity was measured by luminometers. Each bar represents the average of the luminescence intensity from 30 seedlings. Error bar indicates standard errors.

*LUC*의 발현을 Vector/WT, *SID2 promoter::Gus::Luc*/WT, Vector/*siz1-2*와 비교했을 때 높은 발현을 보였다 (Figure 3, 4). 이것으로 보아 *siz1-2* 돌연변이체가 SA 축적과 방어 유전자들의 발현이 높고 병저항성에도 야생형에 비해 강한 표현형을 가지는 데에는 SA 합성 효소인 *SID2*의 발현이 높게 조절됨으로써 식물체 내의 SA 기작이 자극되기 때문인 것을 *SID2 promoter*에 의해 조절 받는 *GUS*와 *LUC*의 발현으로 확인 할 수 있었다. 지금까지 특정 유전자 발현을 관찰할 때에는 *GUS* 또는 *LUC* 중 하나만 리포트 유전자로 사용해 왔다. 본 논문에서는 2개의 리포트 유전자들이 융합된 시스템을 이용하여 두 리포트 유전자들이 융합된 시스템에서도 *GUS*와 *LUC* 발현 양상이 동일하다는 결과를 얻음으로써 이 시스템을 리포트 유전자를 이용한 분석에 이용할 수 있었다. 그리고 더 나아가서는 이 형질전환 식물체를 이용하여 돌연변이체를 만들어 *GUS* 또는 *LUC*의 발현이 달라지는 식물체를 찾아 연구 한다면 아직까지 밝혀지지 않은 많은 SA 조절 인자들을 찾아낼 수 있다는 점에서 흥미로운 연구라고 생각되어진다.

적 요

SA는 천연 페놀 화합물로서 식물체가 생성하는 호르몬 중의 하나이다. SA는 특히 병저항성, 생물학적, 비생물학적 스트레스로 인해 합성이 촉진되며 식물 방어 기작을 일으킨다고 알려져 있다. 식물의 방어 기작은 바로 식물에서 얻어지는 생산량에 영향을 미치기 때문에 SA에 대한 연구가 많이 되어져 왔다. 하지만 SA를 이해하기에는 아직까지 많은 연구가 필요 되어 지고 있다. 따라서 본 연구는 애기장대에서 SA 생합성하는데 중요한 효소인 *SID2*가 병저항성이 강한 *siz1-2* 돌연변이체와 야생형에서 어떠한 조절의 차이를 보이는지를 *SID2 promoter*에 의해서 조절되는 *GUS*와 *LUC*를 가진 각각의 형질전환 식물체를 통하여 관찰하였다. *GUS*의 발현을 GUS histochemical assay, GUS enzyme assay 그리고 *LUC*의 발현을 CCD 카메라를 이용한 이미지 촬영과 Luciferase enzyme assay 수행한 결과, *siz1-2*를 사용한 형질전환 식물체에서 야생형에 비해 발현이 높게 일어났다. 이것을 바탕으로 SA에 반응하는 유전자들의 발현이 *siz1-2* 돌연변이체에서는 높은 이유가 *SID2*의 발현이 높게 조절 받기 때문이라는 것을 *SID2 promoter::GUS::LUC/siz1-2* 형질전환 식물체를 통해 알 수 있었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오 그린 21사업 (grant# 2007 0301034030) 및 환경 생명과학 국가 핵심 연구 센터 연구비 (grant# R15-2003-012-01002-0) 지원에 의한 결과로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Bent A (2006) Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. *Methods Mol Biol* 343: 87-103
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by SA. *Science* 262: 1883-1886
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* 116: 1351-1357
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42: 185-209
- Gallagher SR (1992) GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego
- Holuig L, Salinas P, Blanco F, Garretton V (2007) Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. Hayat S, Ahmad A. (eds), *Salicylic Acid - A Plant Hormone*, Springer, Netherland pp 197-246
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK (1997) Genetic Analysis of Osmotic and Cold Stress Signal Transduction in Arabidopsis: Interactions and Convergence of Abscisic Acid-Dependent and Abscisic Acid-Independent Pathways. *Plant Cell* 9: 1935-1949
- Janda T, Szalai G, Tari I, Pa'ldi E (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effects of chilling injury in maize plants. *Planta* 208: 175-180
- Jefferson R (1987) Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Reporter* 5: 387-405
- Jyoti Shah (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 365-371
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E (2005) Heat Stress Phenotypes of Arabidopsis Mutants Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition of Thermotolerance. *Plant Physiol* 138: 882-897
- Lee JY, Nam JS, Park HC, Na G, Miura K, Jin JB, Yoo CY, Baek D, Kim DH, Jeong JC, Kim D, Lee SY, David E, Tesfaye M, Qingqiu G, Shisong M, Hans J. Bohnert, Kwak SS, Bressan LA, Hasegawa PM, Yun DJ (2007)

- Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant Journal* 49: 79-90
- Leon J, Lawton MA, Raskin I (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 108: 1673-1678
- Mackerness SAH (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280-20 nm) stress: What are the key regulators? *Plant Growth Regulation* 32: 27-29
- Pancheva TV, Popova LP, Uzunova J (1996) Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Plant Physiol* 149: 57-63
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D (2006) Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on *Arabidopsis* Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *Plant Physiology* 141: 910-923
- Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 439-463
- Scott IM, Clarke SM, Wood JE, Mur LA (2004) Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 1040-1049
- Sharma YK, Leon J, Raskin KR (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5099-5104
- Strawn MA, Marr SK, Inoue K, Inada N, Zubieta C, Wildermuth MC (2007) *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J Biol Chem* 282: 5919-5933
- Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B, Mackerness SAH (1998) Ultraviolet-B -induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell and Environment* 21: 685-694
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565
- Yalpani N, Enyedi AJ, Leon J, Raskin I (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogen-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 372-376
- Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo WD, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun DJ (2005) Direct Interaction of a Divergent CaM Isoform and the Transcription Factor, MYB2, Enhances Salt Tolerance in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280: 3697-3706

(접수일자 2008년 7월 21일, 수리일자 2008년 8월 4일)