

Zinc finger RING-H2 protein관련 *Ac/Ds*전이인자 삽입 변이체 *Oszinc626* 유전자의 특성 분석

박슬아¹, 정유진¹, 안병욱¹, 윤도원¹, 지현소¹, 박용환¹, 은무영¹, 서석철¹, 이순열², 이명철^{1*}
¹농업생명공학연구원 세포유전과, ²한경대학교 응용생물과학과

Characterization of *Oszinc626*, knock-out in zinc finger RING-H2 protein gene, in *Ac/Ds* mutant lines of rice (*Oryza sativar* L.)

Seul-Ah Park¹, Yu-Jin Jung¹, Byung-Ohg Ahn¹, Doh-Won Yun¹, Hyeon-So Ji¹, Yong-Hwan Park¹,
Moo-Young Eun¹, Seok-Cheol Suh¹, Soon-Youl Lee², and Myung-Chul Lee^{1*}

¹Cell and Genetics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon, 441-707, Korea

²Major in Bioengineering, Hankyong National University, Anseong, 456-749, Korea

ABSTRACT *Ac/Ds* mutant lines of this study were transgenic rice plants, each of which harbored the maize transposable element *Ds* together with a GUS coding sequence under the control of a promoterless (*Ds*-GUS). We selected the mutants that were GUS expressed lines, because the GUS positive lines will be useful for identifying gene function in rice. One of these mutants was identified knock-out at *Oszinc626* (NP_001049991) gene, encoding a RING-H2 zinc-finger protein, by *Ds* insertion. In this mutant, while primary root development is normal, secondary root development from lateral root was very poor and seed development was incomplete compare with normal plant. RING zinc-finger proteins play important roles in the regulation of development in a variety of organisms. In the plant kingdom, a few genes encoding RING zinc-finger proteins have been documented with visible effects on plant growth and development. The consensus of the RING-H2 (C3-H2-C3 type) domain for this group of protein is Cys-X₂-Cys-X₂₈-Cys-X-His-X₂-His-X₂-Cys-X₁₄-Cys-X₂-Cys. *Oszinc626* encodes a predicted protein product of 445 amino acids residues with a molecular mass of 49 kDa, with a RING-zinc-finger motif located at the extreme end of the C-terminus. RT-PCR analysis indicated that the expression of *Oszinc626* gene was induced by IAA, cold, dehydration, high-salinity and abscisic acid, but not by 2,4-D, and the transcription of *Oszinc626* gene accumulated primarily in rice immature seeds, root meristem and shoots. The gene accumulation patterns were corresponded with GUS expression.

서 론

RING (Really Interesting New Gene) finger motif는 1991년 Freemont 등에 의해 인간에서 처음 분리되어 유전자 특성이

처음 보고 된 이래 식물, 동물 및 바이러스를 포함한 다양한 생물에서 이와 유사한 유전자들이 알려졌다 (Freemont PS. 2000). 이들 유전자의 일반적인 특성은 ORF 내에 cysteine 배열이 많이 존재하고, cysteine과 histidine의 결합 형태에 따라 C3-H-C4과 C3-H2-C3으로 대별되며, 다시 RING-V, RING-D, RING-S/T, RING-G 및 RING-C2 등의 변형된 상태로 존재한다 (Ruqiang and Qingshun 2003, Sophia L. et al.

*Corresponding author Tel 031-299-1691 Fax 031-299-1672

E-mail: mclee@rda.go.kr

2005). 그 중에서 RING zinc finger 단백질은 zinc binding 영역을 가지며, 4개 또는 3개의 cysteine과 histidine에 의해 4면체로 연결된 X자 연결구조 (cross-brace system)를 가진 RING-domain (RING-D)분자에 의하여 두 개의 Zn(아연)원자가 연결되어 있다 (Borden and Freemont, 1996, Saurin et al. 1996). 지금까지 식물에서 알려진 zinc finger 단백질 관련 유전자들의 대부분은 C3-H2-C3 형태의 *Arabidopsis* 유래로 유전자의 이름은 그 기능에 따라 각각 달리 명명되어 지고 있으며 유전자의 다양한 기능들이 보고 되고 있다 (Jensen RB. 1998, Lechner et al. 2002). 이 중에서 암 조건에서 형태형성을 하는데 억제물질로의 기능을 가지는 *COP1* (Constitutively photomorphogenic 1) 유전자는 RING finger domain이 N-말단에 존재하며, domain의 역할은 유전자의 산물을 핵세포질 내의 분배를 조정하고 보고되었으며 (McNellius et al. 1994), *ATL* (*Arabidopsis toxicosen levadura 2*) 유전자는 RING finger domain이 polypeptide 중앙에 존재하며 그 기능은 단백질을 암호화하는 초기반응에 관여하는 것이 보고되었으며 (Martinez-Garcia et al. 1996), *BRH1* (Brassinosteroid-responsive RING-H2) 유전자는 RING finger domain이 C-말단 영역에 존재하며, 그 기능은 식물 병원균에 의해 유도되어 병원성관련 유전자로서의 역할 (Molnar et al. 2002) 등이 알려져 있다. 또한 유전자 발현 pattern에 따라 *A-RZF* (*Arabidopsis* RING zinc finger) 유전자는 종자 발달과정의 초기단계, *Sinat5* (*Sinat5* Seven in absentia homolog 5) 유전자는 측근의 발달시기, *RHA2b* (RING-H2 finger protein 2b) 유전자는 꽃 형태형성과정의 화분관에서 높게 발현 등이 보고되었다 (Deng et al. 1992, Thomas 1993, Goldberg et al. 1994, Meinke 1994;1995, Zou and Taylor 1997, Chaudhury et al. 2001, Lechner et al. 2002).

최근 들어 애기장대 및 벼의 구조유전체 완성에 따라 후속 연구로 많은 연구자들에 의해 식물의 기능유전체연구에 대한 연구가 급속히 진행되고 있으며 insertional mutagenesis (Frankel et al. 1985), Antisense suppression (Takayama et al. 1990), Activation tagging (Hayashi et al. 1992), 및 Proteomics (Wilkins et al. 1996) 등 reverse genetic 방법이 널리 사용되고 있다. 기능유전체 연구 중 retrotransposon을 이용한 T-DNA 나 *Ac/Ds*와 같은 knock-out mutant집단의 연구는 변이 유전자의 표현형을 바로 추적할 수 있는 장점으로 가장 많이 쓰이고 있는 방법 중의 하나로, 특히 promoterless (*transposon*-GUS) 조절 하에 만들어진 전이인자 삽입변이체는 유전자 내로 삽입되어 단백질 발현의 reading frame이 맞을 경우 GUS가 발

현되어 knock-out 유전자의 발현 부위 및 발현 pattern 분석을 통하여 그 유전자의 기능을 예측 할 수 있는 장점이 있다. 한 등 (1999)은 벼 기능유전자 탐색을 위해 옥수수에서 알려진 *Ac/Ds* system을 벼에 적용하여 *Ac/Ds* 삽입 형질변이 계통을 육성하여 몇몇 주요 기능유전자를 분리하여 보고하였다 (Kim et al. 2004, Park et al. 2006, Park et al. 2007).

본 연구에서 한 등(1999)에 의해 작성된 벼의 *Ac/Ds* 돌연변이집단을 이용하여 후대 계통 들에 대한 대량 GUS 발현 분석을 통한 knock-out유전자의 기능을 밝히고자 수행한 결과 뿌리 생장점 및 수분 후 종자에서 강하게 GUS가 발현하는 변이체를 선발하여 유전자의 분리 및 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 GUS 발현 변이체 선발

본 연구에서는 1999년부터 농촌진흥청 세포유전과에서 육성하고 있는 옥수수 유래 *Ac/Ds* 전이인자를 동진 벼 (*japonica*)에 형질전환 하여 얻어진 *Ac/Ds* 삽입 변이계통을 이용하였다 (Han et al. 2002, Kim et al. 2004). *Ds* 삽입 변이체의 종자를 파종하여 2~3엽기 식물의 잎, 줄기 및 뿌리 절편을 대상으로 GUS 활성의 조직화학적 분석을 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 실시하였다. 각각의 조직을 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronide (X-Gluc)가 포함된 용액에 37°C에서 16시간 반응시킨 후, 70% 알코올 용액으로 염록소를 탈색한 후, 해부현미경으로 관찰하였다.

선발 *Ds* 삽입 변이계통에서 유전자 분리

Ac/Ds 삽입 계통으로부터 *Ds* 삽입여부 및 부위 해석을 위해 Southern blot, PCR 및 FST (flanking sequence tag) 분석은 Han (2002) 및 Kim 등 (2002; 2004)이 보고한 방법에 의해 수행하였다.

유전자 분리를 위한 Fc626 primer는 forward; 5'-ATGGAT CCTAATGAACCTTGCTGG-3'와 reverse; 5'-TCAGGCTTTC GGCTGTTGACGATC-3'를 각각 사용하였고, PCR을 위한 온도조건은 94°C 1분, 61°C 40초, 72°C 1분으로 30 Cycles하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 증폭산물을 확인한 후, Gel Extraction Kit (solgent)에 의해 증폭한 DNA를 분리 정제한 후, pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning하였다.

DNA 염기서열 결정 및 유전자 동정

분리한 유전자의 염기배열을 결정하기 위하여 pGEM T-easy vector에 존재하는 sp6 및 T7 primer를 이용하여 DNA 염기배열을 결정하였다. 얻어진 DNA 염기서열 정보는 Gramene (<http://www.gramene.org/>)을 통하여 벼 전체 염기서열 정보와 상동성 비교에 의하여 염색체 위치 및 knock-out 유전자를 결정한 후 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통하여 다른 유전자들과 유사성을 비교 분석하였으며, 유전자 염기배열 정보로부터 얻은 아미노산 서열에 대한 alignment, homology 비교분석은 Lasergene 7 (Version 7.0, DNASTAR Inc.)을 사용하였다.

RT-PCR에 의한 유전자 발현분석

선발한 *Ds* 삽입 변이 식물체로부터 분리한 유전자의 발현 양상을 알기 위해 RT-PCR 분석을 하였다. RT-PCR는 동진 벼의 14일 잎, 선발한 *Ds* 삽입 변이체 및 250 mM NaCl, 4°C cold, 100 μM ABA, 100 μM IAA, 0.1 mg/L 2,4-D 등 처리한 식물 조직에서 분석하였다. Total RNA 추출은 Intronbio (Korea)사에서 제공하는 plant RNA extraction kit를 사용하여 reagent와 함께 제공되는 실험방법에 따라 수행하였다. RT-PCR분석은 Intronbio사에서 제공하는 one-step RT-PCR kit를 사용하여 이와 함께 제공되는 실험방법에 따라 수행하였다. RT-PCR를 위한 primer는 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 3'-UTR부위에서 fw; 5'-AAGTGTGGCTTATGCGAGAG-3'와 rv; 5'-TGCTTCTTAAAACGGTTTCG-3'를 각각 제작하였다. RT-PCR의 온도조건은 45°C에서 30분, 94°C에서 5분간 역 전사반응을 하고, 94°C에서 20초, 61°C에서 40초, 72°C에서 1분의 단계로 40회 반복하여 실시하고, 72°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 발현 정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

선발 변이계통의 표현형 분석

동진 벼 *Ac/Ds* 삽입 변이 21,000계통에 대한 GUS 발현분석을 통하여 선발된 돌연변이체 중 종자의 크기 및 발육이 불량한 계통으로, 후대 유전분석을 통한 식물체의 표현형을 관찰한 결과 식물체의 신장과 발육이 저조하고, 결실 후 종

자의 발달이 정상식물체에 비해 매우 불량한 개체로 녹색을 띤 미숙종자를 보였다 (Figure 1). 따라서 선발한 계통은 single copy의 *Ds* 전이인자가 삽입된 knock-out 변이체로 변이 유전자에 의해 Fig. 1과 같은 표현형을 보인 것으로 예상되어, 이를 이용해 유전자의 분리 및 발현연구에 이용하였다.

선발 변이 계통으로부터 유전자 분리 및 구조분석

선발한 *Ac/Ds* 삽입 변이 계통으로부터 FST (flanking sequence tag) 분석한 결과 *Ds* 전이인자가 3번 염색체 zinc finger RING-H2 유전자의 첫 번째 exon 부위에 삽입되어 있음을 확인하였으며 (Figure 2-A) tagging된 zinc finger RING-H2 단백질 관련 유전자 발현분석을 위해 RT-PCR 분석한 결과 대조구는 강한 발현을 보였으나, *Ds* 삽입 변이체에서는 전혀 발현되지 않았다 (Figure 2-B). 유전자의 분리를 위해 동진벼의 cDNA로부터 Fc626 primers를 이용하여 PCR 분석 및 염기배열을 분석한 결과 1338bp의 zinc finger RING-H2 단백질 관련 유전자로서 분자량이 49 kDa이며, 445개의 아미노산으로 구성되어 있는 것으로 *Oszinc626*로 명명하였다 (Figure 2-C). 또한 *Oszinc626* 유전자는 지금까지 알려진 indica 품종 벼 (*Oryza sativa* L.), 유럽종 포도 (*Vitis vinifera*), 감자 (*Solanum demissum*)등과의 아미노산 레벨에서 각각 99%, 66%, 49%의 상동성을 보였다. 또한 RING finger domain 영역의 alignment 분석한 결과 *Oszinc626* 유전자는 다른 생물에서 분리되어 보고된 유전자와 상동성이 일치하는 것으로 나

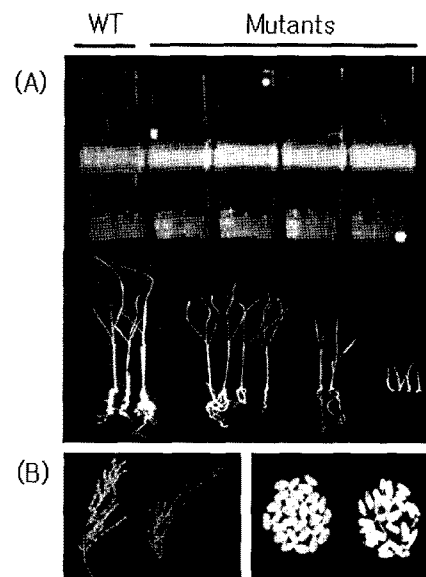


Figure 1. Phenotypes of the wild type and mutants plants. Comparison of (A) shoots length and (B) seed development.

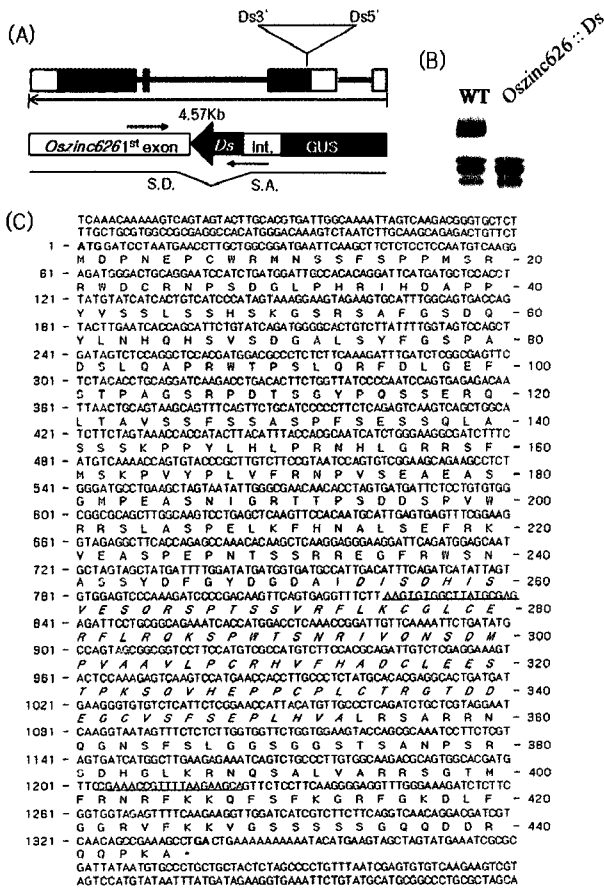


Figure 2. Transcript analysis of *Oszinc626::Ds*. (A) Genomic structure of *Oszinc626* showing the position of the trap *Ds* element. Exons are represented by boxes and introns by lines. The arrows correspond to inserted site. The putative splicing donor (S.D.) and acceptor sites (S.A.) are indicated by the bent arrow. (B) RT-PCR analysis of *Oszinc626* mRNA. Total RNA was extracted from the roots of wild-type and *Oszinc626::Ds* plants. (C) Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Oszinc626*. The specific primers are underlined with bold lines and The RING-H2 finger motif is in italic.

타났다 (Figure 3-A). 즉 *Oszinc626* 유전자는 RING-H2 (C3-H2-C3 형태) 영역에 Cys-X₂Cys-X₂₈-Cys-X-His-X₂-His-X₂-Cys-X₁₄-Cys-X₂-Cys의 구조로 이루어져 있으며 (Figure 3-B), 이러한 단백질 구조를 갖는 RING 관련 유전자에 관한 그 특이적 기능은 벼에서 보고 되어 있지 않고 있다 (Xiuhong et al. 2008). 따라서 본 연구에서 얻어진 *Oszinc626* 유전자는 RING motif 영역이 C-terminus에 위치해있는 것으로 미루어 볼 때, 지금까지 알려진 유전자와 다른 기능을 하고 있을 가능성이 있음을 시사하고 있다.

선발 변이계통의 Genotyping과 GUS 발현 분석

Figure 1과 같은 표현형을 보인 변이체 중 homo 계통을

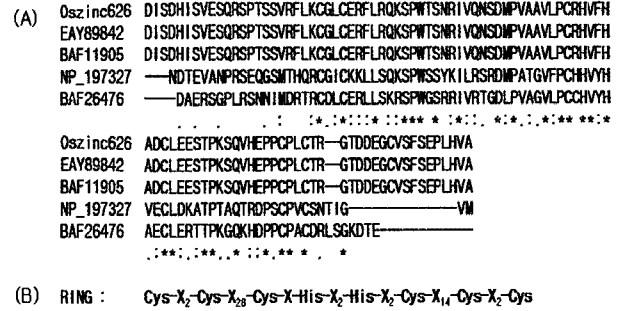


Figure 3. Sequence alignment of RING-H2 finger motifs from different proteins. (A) Multiple sequence alignment of some RING finger motifs by the homology search. Identical and conserved residues in all aligned sequences are indicated by asterisks(*) and dots(.), respectively. (B) The Cys/His residues forming the two zinc-binding sites.

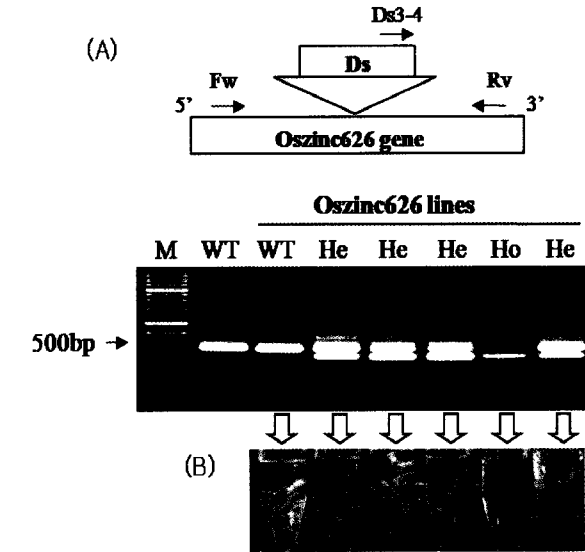


Figure 4. Analysis of (A) Genotype and (B) Activity of promoterless GUS gene in *Oszinc626::Ds* mutant. The PCR analysis used three primers, *Oszinc626* full genome and 3' region in *Ds* primers.

선발하기 위해 *Oszinc626* 유전자 영역 및 *Ds* 전이인자 영역을 이용하여 genotype PCR분석한 결과 wild type에는 500 bp 크기의 단일 band, hetero type에는 500 bp와 400bp 크기의 두 개의 band 그리고 homo type에서는 400 bp 크기의 단일 밴드를 얻어 homo 개체를 선발하였다 (Figure 4-A). Genotype 이 확인된 각각 개체들의 뿌리를 이용하여 GUS 활성 분석한 결과 400 bp크기의 단일밴드가 나온 개체에서는 GUS의 활성이 뿌리 전체에 강하게 발현하였으며, wild type과 hetero type의 개체와 현저하게 구분 할 수 있었다 (Figure 4-B). 이 결과 *Ds* 전이인자에 의해 *Oszinc626* 유전자가 knock-out된 개체에서만 GUS 발현이 되었음을 알 수 있었다.

***Oszinc626* 유전자의 copy 수 및 발현 분석**

벼 계통 상에서 *Oszinc626* 유전자의 copy 수를 알아보기 위해 동진 벼 잎을 채취해서 cDNA의 염기서열 중 벼의 다른 zinc-finger protein과 상동성이 낮은 3'말단 500 bp의 특정 염기서열부위를 probe로 하여 Southern blot 분석한 결과 사용된 4개의 제한효소에서 모두 single band로 보였다 (Figure 5-A).

벼의 기관별 *Oszinc626* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위해 해당유전자의 특이 primer를 작성하고 RT-PCR을 수행한 결과 잎을 제외하고 종자, 줄기 및 뿌리에서 높게 발현됨을 알 수 있었다 (Figure 5-B). 따라서 *Oszinc626* 유전자는 벼 계통 내에 single copy로 존재하며 조직 별 GUS 발현분석 및 RT-PCR을 통한 기관별 발현 양상으로 보아 기관분화와 관련한 성장점에 주로 발현하는 유전자로 종자의 발육 및 식물생장에 관여하는 유전자로 생각된다.

GUS 활성분석을 통한 *Oszinc626* 유전자 promoter 해석

Oszinc626 유전자가 knock-out된 *Ds* 삽입 변이 계통을 이용하여 꽃 조직에서 GUS 발현 양상을 관찰한 결과 꽃밥, 수술세포 및 외피의 inner layer에서 강한 발현을 보였다 (Figure 6). 따라서 *Oszinc626* 유전자 promoter는 수분 수정 시 직접적으

로 영향을 미치는 꽃밥 및 수술에서 강하게 발현을 조절하며, 종자 형성 시 종자의 크기에 영향을 주는 외피의 inner layer 발현에도 관여함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 한 등 (1999)이 *Ac/Ds* system을 이용한 유용 유전자의 분리 및 유전자 promoter 기능해석 등과도 일치하는 결과를 얻었다.

식물 성장조절물질 및 환경 stress 변화에 따른 *Oszinc626* 발현 분석

Oszinc626 유전자에 *Ds* 전이인자가 삽입된 돌연변이체에서 종자의 발달 및 식물 성장에서 크게 관여하고 있다고 생각된다. 따라서 식물생장에 영향을 주는 성장조절물질 중 옥신 (Auxin)의 일종인 IAA 및 2,4-D 처리 후 *Oszinc626* 유전자의 발현 정도를 살펴본 결과 IAA 처리구에서는 대조구와 거의 유사한 발현량을 보였으나, 기관 및 조직을 탈 분화시키는 2,4-D 처리구에서 대조구에 비해 강한 발현양상을 보였다 (Figure 5-A). 또한 환경 stress 변화에 따른 *Oszinc626* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해 250 mM NaCl, 4°C cold 그리고 100 μM ABA를 시간대별로 처리하여 지상부의 발현량을 분석한 결과 식물체가 환경스트레스를 받는 시간

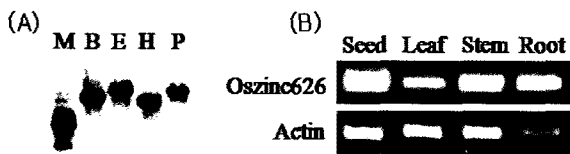


Figure 5. (A) Southern blot analysis with *Oszinc626* about wild type rice. The 3' region specific to *Oszinc626* gene was used as a probe. Restriction enzymes used were as follows; M:molecular marker, B:*Bam*HI, E:*Eco*RI, H:*Hind*III, P:*Pst* I. (B) Specific expression of *OsZincR626* in rice different organs.

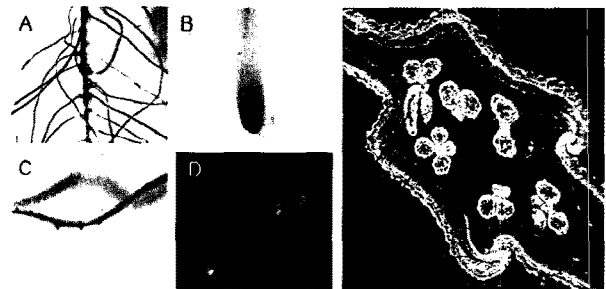


Figure 6. Histochemical analysis GUS activity in *Oszinc626::Ds* mutant. A: Whole root B: Seminal root tip, C: Lateral root, D: Stamen and pistil in seed, E: Paraffin block section of pollen in flower.

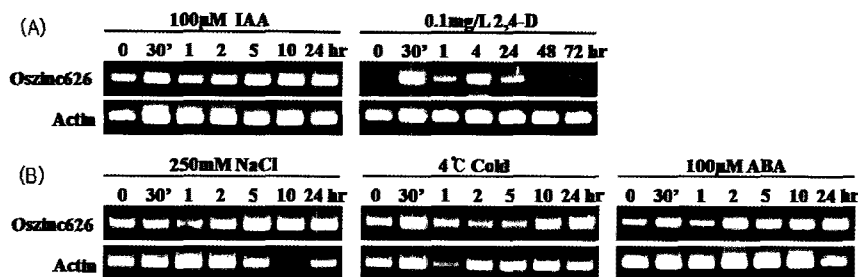


Figure 7. Quantitative RT-PCR analysis under various conditions. The *OsZincR626* gene expression in response to (A) 100 μM IAA, 0.1 mg/L 2,4-D and (B) 250 mM NaCl, low temperatures (4°C), 100 μM ABA for the indicated amount of time in 14 days old seedlings, respectively.

이 길어질수록 유전자의 발현 정도가 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 5-B). 염해 스트레스는 NaCl에서 유래되어지는 Na^+ 와 Cl^- 이온 농도가 원인이 되어 세포 내에 Ca^{2+} 이온의 증가를 초래하게 되고, 순간적으로 변화된 세포질내의 Ca^{2+} 이온농도는 second messenger로서 작용하여, 세포의 스트레스에 대한 신호전달체계를 활성화하고 세포내의 염해 스트레스 적응에 관여하는 K^+ 이온의 유입과 K^+/Na^+ 관계를 조절하게 된다 (Mendoza et al. 1994, Knight et al. 1997, Yun 2005). ABA는 식물의 비생물학적 스트레스 (abiotic stress)에서 중요한 역할을 하는 식물 호르몬으로서 스트레스 반응에 관여하는 유전자들의 발현 조절을 매개하는 것으로 알려져 있다 (Xiong et al. 2003).

따라서 *Oszinc626* 유전자가 ABA 및 염 스트레스를 받은 동진벼의 잎에서 시간이 지날수록 발현량이 증가하는 것으로 미루어 볼 때, 환경 stress을 받은 식물체는 유전자의 발현량이 증가되어 식물이 정상적으로 어느 시기까지 유지되도록 하는 생장 관련 분자기구를 갖고 있을 것으로 추정되나, 이는 해당유전자를 이용한 과발현 형질전환체 육성 및 분석을 통하여 검증하여야 할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 동진벼 유래의 *Ac/Ds* 삽입변이집단의 GUS 분석을 통하여 뿌리 및 미숙종자에서 강하게 GUS 가 발현한 개체를 선발하여 FST (flanking sequence tag) 분석 한 결과 *Ds* 전이인자가 3번 염색체 zinc finger RING-H2 관련 *Oszinc626* 유전자의 첫 번째 exon 부위에 single copy로 삽입되어 있었으며, 선발변이체는 뿌리 및 종자 발달이 정상인 동진벼에 비해 매우 낮은 것으로 나타났다. *Oszinc626* 유전자는 RING-H2 type (C3-H2-C3)으로 Cys-X₂-Cys-X₂₈-Cys-X-His-X₂-His-X₂-Cys-X₁₄-Cys-X₂-Cys배열이 C-terminus 가장 말단에 위치하며, 49 kDa의 분자량을 가지고 있다. 또한 Southern blot 분석에서 *Oszinc626* 유전자는 벼 게놈상에 single copy로 존재하였다.

RT-PCR을 통한 돌연변이 유전자의 발현분석 결과 250 mM의 염과, 4°C 저온등과 같은 abiotic stress에 의해 발현이 증가함을 보였고, 호르몬처리에 있어서 ABA와 IAA 의 식물호르몬을 처리했을 경우 24시간까지 계속해서 발현량이 증가하는 것을 보이는 반면, 2,4-D 처리의 경우 30분 후에 발현이 일시적으로 증가되었으나 이후 발현이 급속히 감소한 것을 보였다. 벼의 조직 별 발현 검정에서 미성숙한 종자, 뿌리 분열조직 및 싹초 등 주로 생장점 부위에서 강하게 발

현되는 것을 보임에 따라 *Oszinc626* 유전자의 경우 식물의 생장에 관여하는 주동 유전자의 하나로 판단된다.

사 사

본 연구는 농업생명공학연구원 (NIAB-1010) 및 작물 기능유전체 사업단(CG171) 의 지원에 의해서 수행된 과제임.

인용문헌

- Borden KLB, Freemont PS, (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* 6: 395-401
- Chaudhury AM, Koltunow A, Payne T, Luo M, Tucker MR, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Control of early seed development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 677-699
- Chin HG., Choe MS, Lee SH, Park SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC, Choi HC, Cho MJ, Han CD (1999) Molecular Analysis of Rice Plants Harboring an *Ac/Ds* Transposable Element-Mediated Gene Trapping System. *Plant J* 19: 615-624
- Deng XW, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA, Quail PH (1992) COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G β homologous domain. *Cell* 71: 791-801
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J (1991) A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64: 483-484
- Freemont PS (2000) Ubiquitination: RING for destruction? *Curr Biol* 10: R84-R87
- Goldberg RB, De Paiva G, Yadegari R (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614
- Han CD, Chin HG., Choe MS, Lee SH, Park SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC, Choi HC, Cho MJ (1999) Molecular Analysis of Rice Plants Harboring an *Ac/Ds* Transposable Element-Mediated Gene Trapping System. *Plant J*. 19: 615-624
- Han CD (2002) Rice functional genomics by transposon mutagenesis. *Asia Pacific Biotech News* 6: 930-935
- Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, Schell J, Walden, R (1992) Phytohormone-independent division of tobacco protoplast-derived cells. *Science* 258: 1350-3
- Hiei Y, Ohta T, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282
- Himmelbach A, Grill E (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 6: 470-479
- Jensen RB, Jensen KL, Jespersen HM, Skriver K (1998) Widespread occurrence of a highly conserved RING-H2

- zinc finger motif in the model plant *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 436: 283-287
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405
- Kim CM, Je BI, Piao HL, Park SJ, Kim JM, Chon NS, Sun B, Park SH, Park JY, Lee EJ, Chung WS, Lee KH, Lee YS, Lee JJ, Won YJ, Yi GH, Nam MH, Cha YS, Yun DW, Eun MY, Han CD (2002) Reprogramming of the activity of *Ac/Ds* transposon family during plant regeneration in rice. Mol Cell 14: 231-237
- Kim CM, Piao HL, Park SJ, Chon NS, Je BI, Sun B, Park SH, Park JY, Lee EJ, Kim MJ, Chung WS, Lee KH, Lee YS, Lee JJ, Won YJ, Yi GH, Nam MH, Cha YS, Yun DW, Eun MY, Han CD (2004) Rapid, large-scale generation of *Ds* transposant lines and analysis of the *Ds* insertion sites in rice. Plant J 39: 252-263
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. Plant J 12: 1067-1078
- Lechner E, Goloubinoff P, Genschik P, Shen WH (2002) A gene trap *Dissociation* insertion line, associated with a RING-H2 finger gene, shows tissue specific and developmental regulated expression of gene in *Arabidopsis*. Gene 290: 63-71
- Martínez-García M, Garcidueñas-Piña C, Guzmán P (1996) Gene isolation in *Arabidopsis thaliana* by conditional overexpression of cDNAs toxic to *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel early response zinc-finger gene. Mol Gen Genet 252: 587-596
- McNellis TW, Arnim AGv, Deng XW (1994) Overexpression of *Arabidopsis COP1* results in partial suppression of light-mediated development: evidence for a light-inactivable repressor of photomorphogenesis. Plant Cell 6: 1391-400
- Meinke DW (1994) Seed development in *Arabidopsis thaliana*. In: Meyerowitz EM, Somerville CR (eds), *Arabidopsis*, Vol. 27, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 253-295
- Meinke DW (1995) Molecular genetics of plant embryogenesis. Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol 46: 369-394
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 269: 8792-8796
- Molnár G, Bancos S, Nagy F, Szkeres M (2002) Characterization of *BRH1*, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. Planta 215: 127-133
- Park SJ, Piao HL, Xuan YH, Park SH, Je BI, Kim CM, Lee EJ, Park SH, Ryu BC, Lee KH, Lee GH, Nam MH, Yeo JS, Lee MC, Yun DW, Eun MY, Han CD (2006) Analysis of Intragenic *Ds* Transpositions and Excision Events Generating Novel Allelic Variation in Rice. Mol Cells 21: 284-293
- Park SH, Kim CM, Je BI, Park SH, Park SJ, Piao HL, Xuan Y, Choe MS, Satoh K, Kikuchi S, Lee KH, Cha YS, Ahn BO, Ji HS, Yun DW, Lee MC, Suh SC, Eun MY, Han CD (2007) A *Ds*-insertion mutant of *OSH6* (*Oriza sativa* homeobox 6) exhibits outgrowth of vestigial leaf-like structures, bracts, in rice. Planta 227: 1-12
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. Plant Cell Rep. 15: 727-730
- Ruqiang X, Qingshun QL (2003) A RING-H2 zinc-finger protein gene *RIE1* is essential for seed development in *Arabidopsis*. Plant molecular biology 53: 27-50
- Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freemont PS (1996) Does this have a familiar RING? Trends Biochem Sci 21: 208-214
- Stone SL, Hauksdóttir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J (2005) Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. Plant Physiol 137: 13-30
- Takayama KM, Inouye M (1990). Antisense RNA. Cut Rev Biochem molec Biol 25: 155-184 and 306
- Thomas TL (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. Plant Cell 5: 1401-1410
- Wayne F, Terry AP, Naomi R, Jack L, Rajan TV (1985) Retroviral insertional mutagenesis of a target allele in a heterozygous murine cell line. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6600-6604
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev 13: 19-50
- Xiong L, Zhu JK (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. Plant Physiol 133: 29-36
- Xiuhong Y, Chao S, Yuanlei H, Zhongping L (2008) Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant *Artemisia desertorum*. J Biosci. 33: 103-112
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. Ed3, The International Rice Research Institute Press, Manila
- Yun DJ (2005) Molecular mechanism of plant adaptation to high salinity. Korean J Plant Biotechnol 32: 1-14
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plant. Annu Rev Plant Biol 53: 247-273
- Zou J, Taylor DC (1997) Cloning and molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* RING zinc finger gene expressed preferentially during seed development. Gene 196: 291-295