

벼 종자에서 액포막 aquaporin (tonoplast intrinsic protein) 유전자의 발현과 기능

허선미 · 이인숙 · 김범기 · 신영섭 · 이강섭 · 김돌이 · 변명옥 · 김동현 · 윤인선

Functional implications of gene expression analysis from rice tonoplast intrinsic proteins during seed germination and development

Sun Mi Huh · In Sook Lee · Beom Gi Kim · Young Seop Shin · Gang Seop Lee · Dool Yi Kim · Dong Hern Kim · Myung Ok Byun · In Sun Yoon

Received: 18 October 2010 / Accepted: 2 November 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Rice seed maturation and germination involve drastic changes in water and nutrient transport, in which tonoplast aquaporins may play an important role. In the present study, gene expression profiles of 10 tonoplast intrinsic proteins (TIP) from rice were investigated by RT-PCR during seed development and germination. *OsTIP3;1* and *OsTIP3;2* were specifically expressed in mature seeds. Their transcript level rapidly decreased after onset of seed germination and gene expression was induced by ABA treatment. In contrast, expression of *OsTIP2;1* and *OsTIP4;3* was not seed specific as transcripts were found in vegetative tissues as well. Their respective transcript levels decreased at an early stage of seed development, whereas they increased at a later stage of seed germination and elongation of embryonic roots and shoots. When seed germination was inhibited by various stress conditions and ABA, expression of *OsTIP2;1* and *OsTIP4;3* was completely suppressed. In contrast, the expression level of *OsTIP2;2* rapidly increased

after seed imbibition and the transcript level was maintained under conditions inhibiting seed germination. These results implicate that tissue specific and developmental transcriptional regulation of *OsTIPs* in rice seeds depends on their specific function. In addition, *OsTIPs* can be discriminated by different potential phosphorylation and methylation sites in their protein structures. *OsTIP3;1* and *OsTIP3;2* possess unique phosphorylation signatures at their N-terminal domain, loop B and loop E, respectively. *OsTIP2;1* and *OsTIP4;3* have a potential methylation site at their N-terminal domain. This suggests that activity of specific tonoplast aquaporins may be regulated by post-translational modification as well as by transcriptional control.

서론

Aquaporin은 23-31 kDa 크기로 6개의 막내재성 (transmembrane) 도메인을 가진 단백질로 박테리아, 식물 그리고 동물에 폭 넓게 존재한다 (Maurel et al. 2008). 식물에서 최초 aquaporin 은 애기장대에서 분리된 γ -TIP (*AtTIP1;1*)이며, 지금까지 여러 가지 식물에서 다양한 종류의 aquaporin이 분리되어 그 기능에 대한 연구들이 진행되어져 왔다. Aquaporin 유전자는 애기장대에서는 35개, 벼에서는 33개가 존재하는 것으로 알려져 있으며 동물에 비해 많은 aquaporin을 갖고 있는 것으로 보아 훨씬 다양한 기능을 수행할 것으로 생각되어진다 (Maurel et al. 2008). Aquaporin 단백질은 기능과 구조에 따라 4개의 그룹, 즉 PIP (plamamembrane intrinsic proteins), TIP (tonoplast intrinsic proteins), NIP (nodule 26-like

S. M. Huh · I. S. Lee · B. G. Kim · D. Y. Kim · D. H. Kim · M. O. Byun · I. S. Yoon (✉)
농촌진흥청 국립농업과학원 신작물개발과
(Bio-crops development Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-857, Korea)
e-mail: isyoon@rda.go.kr

Y. S. Shin
농촌진흥청 국립식량과학원 답작과
(Rice research Division, National Institute of Crop Science, Suwon 441-857, RDA, Korea)

G. S. Lee
농촌진흥청 국립농업과학원 유전자분석개발과
(Genomics Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-857, Korea)

intrinsic proteins) 그리고 SIP (small and basic intrinsic proteins)로 나누어진다 (Sakurai et al. 2005). PIP 그룹은 세포막에, TIP 그룹은 액포막에, NIP 그룹은 세포막 혹은 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에, SIP는 소포체막에 존재하는 것으로 알려지고 있다 (Kaldenhoff et al. 2007).

Aquaporin은 세포막을 통한 물의 선택적 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며 aquaporin과 관련된 물 수송은 세포 길이생장, 종자 발아 그리고 삼투조절과정에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다 (Gomes et al. 2009). 건조 등 스트레스 조건에서 aquaporin (PIP)의 활성이 옥수수의 잎의 성장율과 뿌리의 수분 수송능 (hydraulic conductivity)과 밀접히 연관되어 있으며 (Hazenz et al. 2006; Parent et al. 2009), 벼의 *OsPIP2;7*은 세포의 수분균형을 유지시켜, 저온스트레스 저항성을 증진시킨다고 보고되었다 (Li et al. 2008b). 또한 목화의 섬유조직 (fiber) 세포가 신장할 때 *GhPIP1-2*와 *Gh γ -TIP1*의 발현이 증가하여 세포 팽창에 필요한 빠른 물 수송을 유지시키는데 중요한 기능을 한다고 알려져 있다 (Liu et al. 2008). 애기장대의 γ -TIP는 자라는 뿌리 조직과 유묘의 줄기에서 발현이 증가하여 세포 성장에 관여한다고 보고된 바 있다 (Ludevid et al. 1992). 한편 최근의 보고들은 aquaporin이 물뿐만 아니라 글라이세롤, 우레아, 암모니아, 이산화탄소, 영양소, 중금속 등과 같은 다양한 물질들의 세포 내 이동에 관련한다는 것을 보여준다 (Liu et al. 2003; Niemietz and Tyerman 2000; Jahn et al. 2004; Boursia et al. 2005; Tournaire-Roux et al. 2003; Hanba et al. 2004). 이는 aquaporin이 단순히 물 통로로서의 기능만이 아닌 다양한 역할을 수행하고 있음을 의미하는 것이다. AtTIP2;1과 AtTIP2;3은 액포막에서 메틸화-NH₂와 NH₃를 수송하여 암모늄을 액포내에 구획화하는 역할을 담당하고 있다 (Loqué et al. 2005). 콩의 GmNod26은 NH₃ 수송의 역할을 담당하여 질소 고정과 연관되어 있으며 담배의 NtAQP1은 CO₂ 수송과 연관되어 있다 (Maurel 2007; Flexas et al. 2006; Uehlein et al. 2003). 애기장대 AtTIP1;1가 손실되었을 경우 엽록체로부터 탄화수소화합물 배출이 감소되고 유조직 내 액포의 탄화수소화합물 농도 감소가 유도되는데 이는 AtTIP1;1가 탄소 분포 조절에 관여한다는 것을 시사한다 (Ma et al. 2004). 또한 AtTIP1;1과 AtTIP1;2가 H₂O₂ 이동에 관여하여 스트레스 신호전달과 반응 기작에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다 (Bienert et al. 2007). NIP 계열의 aquaporin인 귀리 HvNIP2;1은 붕소 (boron)를 배출하는 기능이 있다는 것이 최근 알려졌으며 (Schnurbusch et al. 2010), 벼의 Lsi1

(OsNIP2;1)은 뿌리의 비소 (arsenite) 배출에 관여한다 (Zao et al. 2010). 이런 결과들은 NIP 계열의 aquaporin이 식물의 중금속 독성 제거에 이용되고 있다는 것을 보여준다.

Aquaporin의 활성은 환경 자극뿐만 아니라 발달상의 신호에 의해 조절되어지며, 특히 유전자발현 수준뿐만 아니라, 인산화 (phosphorylation), 수소이온화 (protonation), 메틸화 (methylation) 같은 단백질의 전사 후 조절 기작 (post-translational regulation)에 의해서 활성이 조절된다고 알려져 있다 (Chaumont et al. 2005; Maurel et al. 1995; Santoni et al. 2006; Törnroth-Horsefield et al. 2006). 시금치 SoPIP2;1의 경우 C-말단에 위치한 2개의 serine 잔기 (Ser 115와 Ser 274)가 탈인산화되어지면서 그 채널의 통로가 닫혀지는 기작이 규명된 바 있다 (Johansson et al. 1998). 대두에서 종자 특이 α -TIP의 인산화가 수분흡수 활성을 조절한다고 보고된 바 있으며 (Maurel et al. 1995), N-말단의 serine 잔기 (Ser 7)가 CDPK에 의해서 인산화된다는 것을 *in vitro*에서 증명한 바 있다 (Daniels et al. 2005). 또한 세포질의 pH가 낮아지면 PIP 활성이 저해되는데, 애기장대 AtPIP2;2의 경우 잘 보존된 histidine 잔기 (His 197)의 수소이온화가 관련되어 있음이 보고되었다 (Tournaire-Roux et al. 2003). X-선 결정구조분석 결과는 시금치 SoPIP2;1의 통로가 열려 있을 때 histidine 잔기 (His 193)에 수소이온화가 되면 수송통로가 닫힌다는 것을 보여준다 (Törnroth-Horsefield et al. 2006). 토양의 pH 변화에 의한 aquaporin 활성 억제는 뿌리의 물 수송을 제한하는 요인이 되므로 농업적으로 중요한 의미를 가진다. 인산화나 수소이온화에도, 애기장대의 AtPIP2;2에서 lysine 잔기 (Lys 3)와 glutamic acid 잔기 (Glu 6)가 메틸화됨이 확인되었는데, 단백질의 분해나 세포 내 분포를 조절할 것으로 제안된 바 있다 (Santoni et al. 2006). 이처럼 다양한 단백질 수식화에 의한 aquaporin 활성 조절은 식물이 환경자극 변화에 능동적으로 대처하여 식물체내의 수분 균형을 유지하는데 매우 중요한 기능을 담당하는 것으로 생각된다.

종자발아는 수분 흡수로부터 시작되며, 종자의 발아가 진행되는 동안 종피, 배유, 배반, 배 등 특정 조직에서 수분의 흡수와 이동이 선택적으로 일어나게 된다 (Gao et al. 1999). 애기장대의 종자가 발아할 때 PIP, TIP 등 다양한 종류의 aquaporin 유전자 발현이 변화하며 aquaporin 활성을 억제하면 종자발아에 따른 종피의 균열, 어린 싹의 돌출 등이 저해된다 (Vander Willigen et al. 2006). 이는 aquaporin이 종자발아에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 애기장대 이외에도 벼, 완두, 유채에서 종자발아와 연관된

PIP 계열 aquaporin 유전자가 보고된 바 있다 (Gao et al. 1999; Liu et al. 2007). 벼에서 종자 발아를 유발하는 산화 질소 (NO)를 처리하면 *OsPIP1;1*, *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3*와 *OsPIP2;8*의 발현이 유도되므로, 다양한 PIP가 종자 발아에 관여함을 알 수 있다 (Liu et al. 2007). 완두의 종피에서 발현되는 aquaporin 유전자 분석에 의하면, *PsPIP1;1*은 완두 종자의 초기 침윤 과정에 관여하며 *PsPIP2;1*과 함께 종피에서 배 (embryo)로 물을 전달하는 기능을 한다고 제안되었다 (Schuurmans et al. 2003). PIP 계열 aquaporin 외에 TIP 역시 종자의 발달 혹은 발아와 연관되어 있는 것으로 보인다. 대두, 애기장대 등 여러 식물에서 α -TIP는 주요 종자특이 단백질로 알려져 있으며, 물과 대사물질 수송의 기능을 담당할 것으로 제안되고 있다 (Johnson et al. 1989). 최근 형광기법을 이용하여 애기장대의 AtTIP3;1가 종자성숙기와 발아 초기 단계의 배 (embryo)에서 발견된다고 보고된 바 있다 (Gattolin et al. 2010). 벼에는 10개의 TIP 유전자가 있으며 유전자 발현의 조직 특이성과 환경 스트레스에 대한 반응, 활성 등이 일부 보고된 바 있으나 (Sakurai et al. 2005; Li et al. 2008), 구조와 기능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 이 논문에서는 벼 유전자 발현분석을 통하여 종자발달과 발아와 연관된 *OsTIP*를 구분하였고, 단백질의 구조 비교분석을 통해 활성 조절 기작의 차이점에 대한 가능성을 논의하였다.

재료 및 방법

벼 종자 발아와 스트레스 처리 및 재배

벼 (*Oryza sativa* L. Japonica cv. Dongin) 종자를 표면소독한 후 완충액 (50 mM potassium phosphate)이 들어있는 원형배양접시 (petridish)에 넣고 암조건, 30°C에서 1-3일간 발아시켰다. 저온 스트레스는 20°C에서 처리하였으며, 150 mM NaCl 혹은 3 μ M ABA가 포함된 완충액에서 각 시간 별로 발아시킨 벼 종자의 배 (embryo)를 적출하여 유전자 발현을 조사하였다. 벼 유묘기 단계의 유전자 발현을 조사하기 위하여 표면 소독한 종자를 1/2 MS 배지에 치상하여, 28°C 배양실에서 암조건 혹은 명조건 (16L: 8D)에서 2주간 키운 뒤 줄기와 뿌리에서 각각 RNA를 분리하였다. 종자발달 단계의 유전자 발현을 조사하기 위하여 포장 조건에서 출수기를 기준으로 성숙 단계별로 종자를 채취하였다.

Table 1 Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR analysis

Name	Sequence of oligonucleotides (5'-3')	Size (mer)
TIP1;1Fr	TGGTGCTGGAGATCGTCAT	19
TIP1;1Re	TAAACGGTTGGATCGGAGTC	20
TIP1;2Fr	CGTCTGCTCCCAGTCTCAAT	20
TIP1;2Re	CAAGGACGTGAAGAACGACA	20
TIP2;1Fr	TGCTCCTCCTCAAGTTTGT	20
TIP2;1Re	TATGAGCCGATGAACACGTC	20
TIP2;2Fr	GCTTCGATGACTCCTTCAGC	20
TIP2;2Re	TGGGCGATCCAGTAGAAGAC	20
TIP3;1Fr	GAGGCACCACTGGGTGTACT	20
TIP3;1Re	TCCGAGTAACCAACCAACAA	20
TIP3;2Fr	GCTGCTCGAGGTCGTCAT	18
TIP3;2Re	TGCAGGTGCTATGATTCAGC	20
TIP4;1Fr	CCTTCGTCTTCGCTTCACC	20
TIP4;1Re	CTATCCCTGAGCCCAGAGTG	20
TIP4;2Fr	GCCACATCACGCTCTTCC	18
TIP4;2Re	ACCCAGTAGACCCAGTGGTG	20
TIP4;3Fr	GCTCACCTTCTCCCTCCTCT	20
TIP4;3Re	AGAAGTCGCCGTCATTCTTA	20
TIP5;1Fr	CGTACTTCGCCGAGTTCTTC	20
TIP5;1Re	GCGGAGATGTAGTGGAGGAC	20

RNA 추출과 RT-PCR

벼 종자를 액체 질소에 잘 간 후 TLE 완충액 (0.2 M Tris, 0.1 M LiCl, 5 mM EDTA, pH 8.2)으로 전분을 침전 시킨 후 상등액에서 TRIZOL 용액 (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 5 μ g에서 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer를 이용해 역전사효소 (SuperScript III, Invitrogen)로 50°C에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 희석하여 PCR 반응에 사용하였다. 벼의 엑포막 aquaporin (TIP) 유전자 10종의 염기서열에 대한 특이 primer를 제작하였고 (Table 1), 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 5분, 30 cycles (94°C 30초, 57°C 30초, 72°C 40초) 그리고 72°C 7분으로 반응 시켰다. 벼 *actin* 유전자 (OSJNBa0078A17.12)의 발현을 대조군으로 사용하였다.

TIPs 단백질 구조분석

벼의 TIP의 아미노산 서열을 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)을 이용해 비교 분석하였고, 단백질 계통 분석은 ClustalW/Treeview program (<http://align.genome.jp/sit-bin/>)

clustalw)을 이용하여 작성하였다. 인산화가 일어날 수 있는 잔기를 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)를 이용하여 예측하였다.

결 과

벼 OsTIP 단백질의 계통 분석

벼와 애기장대의 전체 TIP 단백질의 아미노산 서열을 ClustalW2로 분석한 결과 크게 4개의 그룹으로 분류 되었다 (Fig. 1). 그룹 I은 콩의 α -TIP, AtTIP3;1, OsTIP3;1 그리고 OsTIP3;2가 속한 그룹으로 대부분 α -TIP의 특성을 나타낸다. α -TIP는 종자에서 특이적으로 발현되며 단백질 저장 액포막에 다량으로 존재한다. OsTIP3;1는 AtTIP3;1과 64%의 상동성을 보였으며 OsTIP3;2는 AtTIP3;1과 54%의 상동성을 보였다. 그룹 II는 AtTIP1;1, OsTIP1;1과 OsTIP5;1을 포함하고 있으며 OsTIP1;1는 AtTIP1;1와 80%의 상동성을 보이고 있다. 애기장대 AtTIP1;1은 γ -TIP으로 분류되며, γ -TIP는 영양생장 조직에서 발현되는 특징을 나타낸다. 그룹 III은 OsTIP2;1과 AtTIP2;2가 속해 있으며 이들은 77%의 상동성을 보이고 있다. 그룹 IV는 OsTIP4;3과 AtTIP4;1을 포함하고 있으며 59%의 상동성을 보였다. OsTIP2;1은 OsTIP3;1, OsTIP3;2와 각각 49%, 44%의 상동성을 보였으며 OsTIP4;3 또한 이들과 각각 46%, 43%의 상동성을 나타냈다.

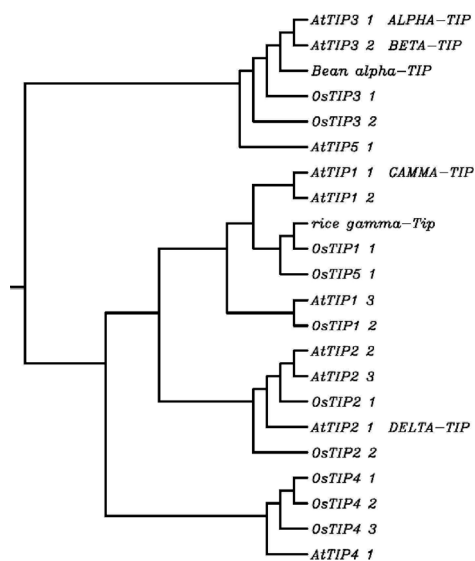


Fig. 1 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of rice and Arabidopsis TIPs. Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences was performed using ClustalW/Treeview program (<http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>)

종자 발아에 따른 OsTIP 유전자의 발현 양상 변화

벼의 종자발아는 수분 흡수로부터 시작되며, 종자의 발아가 진행되는 동안 종피, 배유, 배반, 배 등 특정 조직에서 수분의 흡수와 이동이 선택적으로 일어나게 된다. Figure 2A는 30°C에서 벼 종자의 발아 단계를 보여주는 사진이다. 발아 후 24시간에 어린 싹의 돌출이 관찰되며 72시간에 어린 뿌리와 줄기의 신장이 활발해진다. 본 연구에서는 발아하는 배에서 TIP 계열 유전자 10종의 발현 kinetics를 RT-PCR 방법으로 비교 분석하였다. Figure 2B는 벼 종자발아 단계에 따라서 TIP 유전자 발현이 차등적으로 조절되고 있음을 뚜렷이 보여준다. 다섯 종류의 TIP 유전자 (*OsTIP1;1*, *OsTIP2;1*, *OsTIP2;2*, *OsTIP4;3* 및 *OsTIP5;1*)가 종자발아가 진행됨에 따라 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였다. *OsTIP1;2*, *OsTIP2;2*와 *OsTIP5;1* 유전자는 어린 싹의 돌출이 시작되기 전인 발아 24시간 이내에 발현이 증가되므로 초기 수분흡수에 관여할 가능성을 시사한다. *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*은 48시간 이후에 발현이 유도되는 것으로 보아 발아 후 빠르게 진행되는 어린 줄기와 뿌리 조직의 성장에 관여할 가능성이 크다. 반면 *OsTIP1;2*, *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2* 유전자는 종자발아 초기단계에서 유전자 발현이 급격히 사라지는 특이한 양상을 보였으며

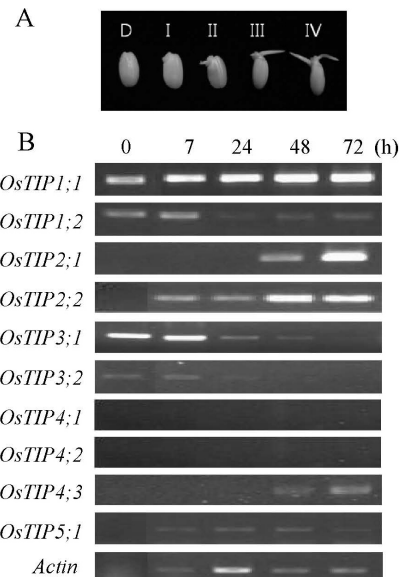


Fig. 2 Expression of *OsTIP* genes during seed germination (A) Photographs of rice seeds at different germination stages at 30°C. D, 0 hr; I and II, 0-24 hr; III 24-48 hr; IV, 48-72 hr (B) RT-PCR analysis of changes in the *OsTIP* transcripts levels in rice seed embryos during germination. Rice seeds were germinated at 30°C for the indicated time period. Seed embryos were excised and total RNAs were extracted and used for RT-PCR analysis. *Actin* was used as a control

로, 유전자 발현이 증가하는 TIP 그룹과는 전혀 다른 기능을 수행할 것으로 예측된다. *OsTIP4;1*와 *OsTIP42* 유전자는 발아가 진행되는 모든 시기에 거의 발현되지 않았다.

종자발아의 억제와 *OsTIP* 유전자의 발현 양상 변화

저온, 염 조건 등 환경스트레스와 ABA는 벼의 종자 발아를 크게 억제하는 것으로 알려져 있다. Figure 3A는 20°C 저온, 150 mM NaCl 및 3 μM ABA 처리에 의해 발아가 저해된 종자를 각각 보여주는 사진이다. 수분흡수에 의한 배유의 팽창과 어린 싹의 돌출 등 물리적 과정이 부분적으로 진행되는 것에 비해 어린 줄기와 뿌리의 생장 과정은 완전히 저해되었으며, 이런 결과는 스트레스에 따라 종자발아 억제 양상이 차이가 난다는 것으로 보여준다. 이처럼 종자발아가 억제된 조건에서 배에서 TIP 유전자군의 발현을 조사하였다. 정상 조건에서 종자발아 후기에 유전자 발현이 크게 유도되었던 *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*의 경우, 종자발아가 억제되는 모든 조건에서 유전자 발현이 완전히 사라지는 것으로 알 수 있었다 (Fig. 3B). 그러나 *OsTIP1;1*과 *OsTIP2;2*는 발아가 억제되는 조건에서도 여전히 유전자 발현이 종자 침윤 후 시간에 따라 증가하는 양상을 유지하는 특징을 보였다. *OsTIP5;1*은 NaCl 조건에서는 유전자 발현이 완전히 억제되었으나, ABA 혹은 저온처리 조건에서는 침윤 후 48-72시간에 발현이 유

도된다는 것을 알 수 있었다. 종자 발아 시 유전자 발현이 빠르게 사라지는 *OsTIP1;2*, *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2* 유전자는 모두 특이하게도 ABA에 의해서 발현이 유도되는 특징을 보였다 (Fig. 3B). 한편 저온 및 염 스트레스 조건에서 이들 유전자 발현은 침윤 후 발현이 감소하는 양상을 보였으나, 정상조건에 비교해서 감소 kinetics가 뚜렷이 느려졌음을 알 수 있다. 이런 결과로부터 *OsTIP* 유전자군을 종자발아와 연관하여 크게 3개의 소그룹으로 나눌 수 있으며, 각 유전자는 특정 종자발아생리와 연관되어 차등적으로 유전자 발현수준에서 기능이 조절되고 있을 것으로 추정된다. Li 등은 (2008) *OsTIP1;2*가 4주된 벼의 줄기와 뿌리에서 NaCl 혹은 ABA 처리에 의해 발현이 일시적으로 크게 유도되는 것을 보고하였는데, 이는 *OsTIP1;2*의 기능이 종자발아에 한정되지 않다는 것을 시사한다.

OsTIP 유전자의 조직별 발현 양상

*OsTIP2;1*와 *OsTIP4;3*이 종자발아 후기에 발현이 유도되며, 발아가 저해되는 다양한 조건에서 공통적으로 유전자 발현이 억제된다는 결과 (Fig. 2B, Fig. 3B)로부터, 이들 유전자가 어린 줄기와 뿌리 조직의 빠른 생장에 관여할 가능성을 보여주었다. Figure 4는 *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3* 유전자가 발아하는 종자뿐만 아니라 영양기관인 유묘의 줄기와 뿌리에서도 사실상 발현되고 있다는 것을 보여준다. 특히 *OsTIP2;1*은 뿌리에서 매우 강한 발현을 보였으므로, 뿌리의 생장 조절 기능에 대한 향후 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편 종자발아가 시작되면서 유전자 발현이 급격히 억제되었던 *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2* 유전자는 뿌리와 줄기에서 전혀 발현되지 않는 특징을 보였으므로 종자 특이적인 기능을 수행할 것으로 추정된다

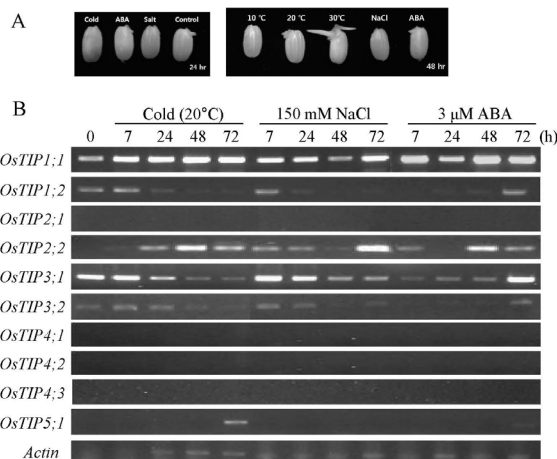


Fig. 3 Changes in the expression level of *OsTIP* genes in germinating seeds under stress conditions. (A) Photographs of rice seeds germinated under various stress conditions or in the presence of ABA. (B) RT-PCR analysis of changes in the *OsTIP* transcripts levels in germination rice seeds under various stress conditions or ABA treatment. Seeds were germinated at 20°C, or incubated in a buffer containing 150 mM NaCl or 3 μM ABA. Total RNAs were extracted from seed embryos and used for RT-PCR analysis. *Actin* was used as a control

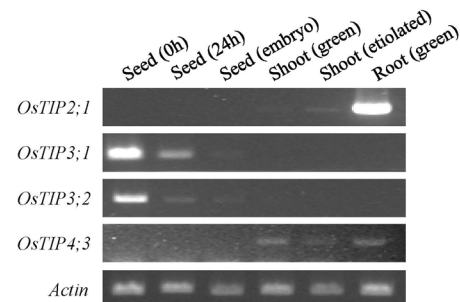


Fig. 4 Expression of *OsTIP* genes in various tissues. Total RNAs were extracted from various tissues and used for RT-PCR analysis. *Actin* was used as a control. Seed (0 hr), dry seeds; Seed (24 hr) and Seed (embryo), 24 hr germinating seeds; Shoot (green) and Root, two-week grown green seedlings; Shoot (etiolated): ten-day grown seedlings under dark condition

(Fig. 4). Sakura 등은 (2005) 벼의 aquaporin 유전자군이 조직특이적 발현양상을 보이며, *OsPIP2* 계열 유전자와 *OsTIP2;1*가 벼의 뿌리의 물 수송과 연관된 발현양상을 보인다고 보고한 바 있다.

종자 발달에 따른 *OsTIP* 유전자 발현 양상 변화

종자발아와 마찬가지로 종자의 성숙단계에서도 급격한 수분변화가 수반된다. 종자 발달과 연관된 *OsTIP* 유전자 발현 양상을 분석하기 위하여 포장에서 출수 후 시간 경과에 따라 종자를 채취하여 RNA를 분리하고, RT-PCR을 수행하였다. Figure 5에서 *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*가 미성숙 종자에서는 전혀 발현되지 않다가 25 DAH와 45 DAH에서 급격히 발현이 증가하였는데, 이는 이들 유전자가 종자가 성숙되는 과정에서 발현되는 유전자임을 시사한다.

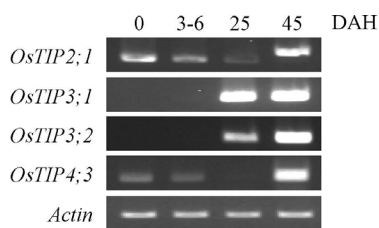


Fig. 5 Changes in the expression of *OsTIPs* genes during rice seed development. Rice was planted in the paddy field and heading date was checked. Seeds were harvested at different stages after heading (DAH) as indicated. Total RNAs were extracted from whole seeds and used for RT-PCR analysis. *Actin* was used as a control (DAH: Day after Heading)

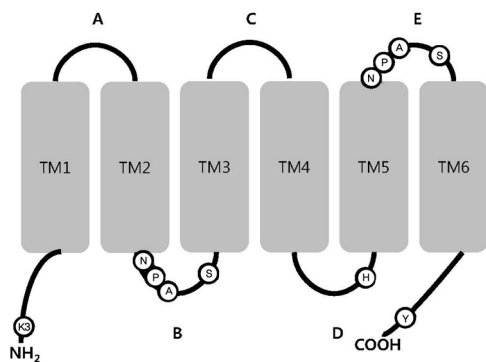


Fig. 6 Schematic diagram of *OsTIP* protein structure. The figure shows the six transmembrane segments (TM1-TM6), 5 connecting loops (A-E), N-terminal domain and C-terminal domain. Highly conserved potential phosphorylation sites (serine, S) and NPA [Asparagine(N)-Proline(P)-Alanine(A)] motives in loop B and loop E were indicated. The C-terminal tyrosine (Y) residue is a potential phosphorylation site predicted by NetPhos 2.0 Server. Putative protonation site (Histidine, H) in loop D or methylation site (Lysine, K) in N-terminal domain were found in several *OsTIPs* and indicated

이와 반대로 *OsTIP 2;1*과 *OsTIP43*은 25 DAH까지 유전자 발현이 점차 감소하다가 45 DAH에 갑자기 증가되었다 (Fig. 5). 그러나 45 DAH에서 발현된 *OsTIP2;1* 전사체의 경우 다른 시기에 발현된 전사체보다 크기가 크게 나타난 것으로 보아, 비정상적인 유전자 발현기구가 작용하고 있다고 추정된다. RT-PCR 분석과 동일한 RNA 재료를 이용한 microarray 분석 (Agilent rice 44K oligo chip) 결과에서 *OsTIP2;1*과 *OsTIP43*의 유전자 발현이 45 DAH에서도 지속적으로 감소하는 것으로 나타났으므로 (결과 미제시), 이들은 종자가 성숙되면서 사라지는 유전자인 것으로 판단된다.

OsTIP 단백질의 인산화 잔기 비교 분석

*OsTIP2;1/OsTIP4;3*과 *OsTIP3;1/OsTIP3;2*이 종자발아와 발달 단계에서 서로 상반적으로 발현이 조절된다는 실험결과 (Fig. 2B, Fig. 4)로부터 이들 단백질의 기능이 다르다는 것을 추정할 수 있다. 단백질의 구조적 차이를 분석하기 위해 Figure 7에서 *OsTIP* 단백질들의 아미노산 서열을 비교하고, 인산화가 일어날 수 있는 잔기를 NetPhos 2.0 Server를 이용하여 예측하였다. Aquaporin, 특히 PIP는 다양한 식물에서 인산화 단백질로 확인되었으며, 인산화에 의해 활성이 조절되는 것으로 잘 알려져 있다 (Niittyta et al. 2007; Nyblom et al. 2009; Amezcua-Romero et al. 2010; Kline et al. 2010). 시금치의 *SoPIP2;1*의 경우 C-말단에 위치한 2개의 serine 잔기 (Ser 115와 Ser 274)가 탈인산화되어지면서 그 채널의 통로가 닫혀지는 기작이 규명된바 있다 (Johansson et al. 1998). PIP와는 달리 TIP의 인산화 조절에 대해서는 많이 알려져 있지 않으나, 대두에서 종자특이 α -TIP의 인산화가 수분흡수 활성을 조절한다고 보고된바 있으며 (Maurel et al. 1995), *PvTIP3;1* (α -TIP)의 N-말단의 Ser 7이 CDPK에 의해서 인산화된다는 것을 *in vitro*에서 증명한 바 있다 (Daniels and Yeager 2005). 또한 최근 인산화 프로테오믹스 분석에서 *OsTIP1;1*, *OsTIP2;2*이 인산화 단백질로 확인된 바 있다 (Whiteman et al. 2008). 이런 보고들은 TIP의 활성 역시 인산화에 의해 조절될 가능성을 시사한다.

아미노산 서열에서 유추되는 *OsTIP* 단백질의 transmembrane topology를 분석하였을 때, PIP와 마찬가지로 잘 보존된 6개의 막 도메인과 5개의 연결 루프 (A-E)로 구성되어 있음을 알 수 있다. 벼 TIP 단백질의 대표 모식도를 Figure 6에 표시하였다. N-말단과 C-말단, B와 D 루프는 항상 세포



Fig. 7 Alignment of the amino acid sequences of OsTIP proteins. The amino acid sequences of OsTIPs were aligned by using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) and potential phosphorylation sites were predicted by NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). The six conserved transmembrane segments were marked as bold letters. The asterisks (*) indicate conserved residues among all OsTIPs. The highly conserved two NPA (Asparagine-Proline-Alanine) motives were indicated as dashed boxes. Amino acid residues of potential phosphorylation sites (serine, threonine, tyrosine) were boxed. The N-terminal potential methylation sites (Lys) were indicated as circled letter. The potential protonation His residue in the loop D of OsTIP3;1 was marked as a bold letter

질 쪽으로, A/C/E 루프는 액포내로 단백질의 방향이 예측되었다. 그러나 *OsTIP1;2*의 경우 다른 TIP와는 달리 막에서 단백질의 방향이 반대인 것으로 예측되었는데 (결과 미제시), 기능과 구조에 대한 추가 분석이 필요할 것으로 생각된다. 벽의 모든 TIP에서 aquaporin의 개폐에 중요한 역할을 하는 NPA motif가 loop B와 loop E에 잘 보존되어

있었으며, 특히 loop B의 인산화 잔기 (Ser 혹은 Thr) 가 완벽하게 보존되어 있었다 (Fig. 6, Fig. 7 화살표). 그러나 OsTIP3;1과 OsTIP3;2의 경우 다른 OsTIP과 달리 loop B의 인산화 motif가 RX(X)S/T의 형태로 존재하였으며 (Fig. 7), loop E의 인산화 Ser 잔기가 보존되어 있지 않는 특징을 보였으므로, 인산화 조절 기작이 다를 것으로 예측되었다. 애기장대 (*AtPIP2;1*), 옥수수 (*ZmPIP2;1*, *ZmPIP2;6*), 시금치 (*SoPIP2;1*)의 PIP 단백질은 C-말단에 두 개의 인산화 Ser 잔기가 잘 보존되어 있으며, C-말단의 인산화가 PIP 단백질의 세포막 분포를 조절한다고 보고된 바 있다 (Prak et al. 2008). 그러나 OsTIP 단백질의 C-말단에는 이와 유사한 인산화 Ser 잔기가 발견되지 않았으며, 대신 인산화 Tyr 잔기가 *OsTIP1;1*, *OsTIP5;1*, *OsTIP2;1*, *OsTIP3;1*, *OsTIP3;2*에서 각각 예측되었다 (Fig. 7). 한편 OsTIP 단백질의 N-말단에서 다양한 인산화 잔기가 예측되었으므로, N-말단이 주요 인산화 부위일 것으로 추측된다. 콩의 종자특이 α -TIP인 *PvTIP3;1*의 경우 N-말단에서 RXXS/T motif인 Ser 7이 인산화되며 물 수송 활성을 조절한다고 제안되었다 (Maurel et al. 1995; Daniels and Yeager 2005). *OsTIP3;1*의 경우 이와 유사한 N-말단 인산화 motif (RRFT₁₃) 외에도, 시금치 *SoPIP2;1*에서 pH에 의한 활성조절에 관여한다고 알려진 (Tournaire-Roux et al. 2003; Tornroth-Horsefield et al. 2006) D loop의 His 잔기 (*OsTIP3;1*의 H175) 잔기가 발견되었으므로 (Fig. 7), 그 기능을 조사할 필요가 있다고 생각된다. 종자 발아 후반부에 발현되어 줄기와 뿌리의 생장에 관여하는 것으로 생각되는 *OsTIP2;1*와 *OsTIP4;3*은 N-말단에 애기장대 *AtPIP2;1*에서 알려진 메틸화 (methylation) Lys 3 잔기 (Santoni et al. 2006)가 특이적으로 발견되었으므로 그 기능 확인이 필요하다. 한편 종자 발아시 유전자 발현 패턴의 차이를 보였던 *OsTIP2;1*와 *OsTIP2;2*를 비교하였을 때, *OsTIP2;2* 단백질의 N-말단에는 *OsTIP2;1*에 존재하는 인산화 Ser 잔기와 메틸화 Lys 잔기가 결실된 특징을 보였다.

고찰

벼에서 종자 발달과 발아는 수분과 영양분 함량의 급격한 변화를 수반하는 복합적인 과정으로, 다양한 수송단백질들이 관여한다. 동물, 미생물, 식물 등 거의 모든 세포에서 수분통로로 알려진 aquaporin은 다양한 종류의 막 단백질로 구성되어 있으며, 그 중 TIP는 식물에만 존재하는 액포막 단백질이다. Aquaporin은 물 이외에도 무기염

이나 수소 이온 이동에 관여하고 있음이 최근 보고되어 (Gerbeau et al. 1999; Liu et al. 2003; Jahn et al. 2004), aquaporin의 기능이 단순한 물 수송에 한정되지 않고 다양하다는 것을 시사한다. 성숙종자의 배, 배유와 호분층에는 다양한 형태의 단백질 저장 액포 (protein storage vacuole, PSV)가 발달되어 있다. 사실상 대두, 애기장대 등 여러 식물에서 TIP는 주요 종자특이 단백질로 알려져 있으며, 물과 대사물질 수송의 기능을 담당할 것으로 제안되고 있다 (Johnson et al. 1990). Ludevid 등은 (1992) 애기장대에서 α -TIP이 종자특이적인 PSV에 위치하고 있는 반면, γ -TIP는 잎, 뿌리, 줄기 등 영양기관에서 주로 발견되며, 두 종류의 TIP의 구조와 기능이 다르다는 것을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 벼 종자의 성숙과 발아과정에서 유전자 발현이 상반적으로 조절되는 *OsTIP*를 뚜렷이 구분할 수 있었다. *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*는 종자의 성숙기에 유전자 발현이 급증하였다가 종자가 발아하면서 전사체가 완전히 사라지며, 줄기와 뿌리 등 영양기관에서 발견되지 않는 특징을 보였다 (Fig. 2B, Fig. 3B, Fig. 4). 단백질 계통 분석 결과는 *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*가 애기장대의 α -TIP과 유사성이 높다는 것을 보여준다 (Fig. 1).

뿐만 아니라 ABA가 있는 조건에서 종자의 배에서 유전자 발현이 유도되었다 (Fig. 3B). 이런 결과들은 *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*이 종자 특이적으로 발현되는 TIP로서 ABA에 의해서 조절되는 종자발달에 중요한 기능을 수행할 가능성을 강하게 시사하는 것이다. 최근 형광기법을 이용한 연구결과는 애기장대 종자성숙과 발아 초기단계의 배에서 오직 α -TIP만이 존재하고 있음을 보여준다 (Hunter et al. 2007). 성숙종자의 배에서 α -TIP이 PSV에 위치하고 있다가, 종자발아가 진행되어 떡잎이 자라기 시작함에 따라 액포의 급격한 재구성이 일어나면서 PSV가 사라지고 소화성 액포 (lytic vacuole, LV)로 전환되면서 γ -TIP과 δ -TIP으로 대체된다고 보고되었다 (Hunter et al. 2007). 이와 마찬가지로 *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*도 PSV와 연관된 종자특이적 기능을 수행할 것으로 예측된다. Li 등은 (2008) *OsTIP3;2*가 물 수송 기능보다는 glycerol 수송활성이 더 높은 것에 주목하면서 종자성숙기에 세포삼투조절과 액포 성숙 과정에 작용한다고 제안한 바 있다.

세포의 수분통로인 aquaporin은 특히 식물세포의 팽창에 매우 중요하다. 액포막에 존재하는 TIP로 인해 물이 액포 내로 빠르게 유입될 수 있으며 따라서 세포의 팽창과 형태유지에 필요한 압력 (turgor)이 유지된다. *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*은 성장하는 영양조직의 세포 팽창에 필요한

수분 포텐셜을 유지하는 기능을 하는 것으로 생각된다. 본 연구결과에서 *OsTIP2;1*와 *OsTIP4;3*이 어린 싹의 생장이 활발해지는 발아 후기에 유전자 발현이 유도되기 시작한 반면 (Fig. 2B), 발아가 억제되는 다양한 조건에서는 전혀 전사체가 나타나지 않았으며 (Fig. 3B), 또한 종자가 아닌 줄기와 뿌리 등 영양기관에서 유전자가 발현된다는 사실 (Fig. 4)이 이를 뒷받침해준다. 특히 *OsTIP2;1*은 줄기보다는 뿌리에서 발현이 강한 특징을 보였으므로 뿌리 생장과 연관된 고유 기능이 있다고 추정된다 (Fig. 4). Sakurai 등은 (2005) PIP외에도 *OsTIP2;1*의 유전자 발현이 벼 뿌리에서 일주기 리듬으로 변하는 물 수송 변이와 연관되어 있다고 보고한 바 있다. 식물의 γ -TIP은 액포막에서 주로 물만 선택적으로 수송하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Maurel et al. 1993). 애기장대 γ -TIP은 주로 영양기관에서 발현되며 특히 발생중인 뿌리의 신장대와 성숙대에서 강하게 발현되지만 뿌리골무와 성장점에서는 나타나지 않는다 (Hunter et al. 2007). 옥수수 γ -TIP의 일종인 *ZmTIP1*은 줄기와 뿌리, 화기에서 분열조직 및 어리고 빠르게 성장하는 조직에서 많이 발현되어, 세포팽창에 필요한 수분을 액포내로 빠르게 유입하는 기능을 한다고 보고되었다 (Chaumont et al. 1998). Li 등은 (2008) *OsTIP4;3*이 뿌리보다는 줄기에 선택적으로 발현된다고 보고한 바 있다.

이런 결과들을 고려할 때 *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*이 γ -TIP의 일종으로 각각 줄기와 뿌리에서 선택적으로 발현되어 빠른 성장을 유발하는 주요인자라고 제안할 수 있다. 식물세포에서 액포는 기능적으로 구분되는 다양한 형태로 존재할 것으로 예측되고 있다 (Zouhar and Rojo 2009). 줄기/잎과 뿌리의 세포에서 서로 다른 종류의 액포가 발달하는지는 아직 정확히 알려져 있지 않으나, 이처럼 조직과 발생단계에 따라 특이적인 *OsTIP* 유전자가 선택적으로 발현된다는 사실은 이들 단백질의 구조와 기능이 다르다는 것을 시사한다. 또한 *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*이 뿌리와 줄기의 성장을 촉진하거나, 스트레스 조건에서 뿌리의 수분흡수를 조절하는데 생명공학적으로 이용될 가능성이 있는지 추가 연구가 필요할 것이다. 한편 종자발아 후기에 발현하는 *OsTIP2;1*과 달리 *OsTIP2;2*은 종자 침윤 후 7시간 이내에 빠르게 유전자 발현이 증가하기 시작하며 (Fig. 2B), 저온, 염, ABA 등 어린 싹의 발아가 완전히 억제되는 조건에서도 유전자 발현이 여전히 유지되는 특징을 보였으므로 (Fig. 3B), 서로 다른 기능을 할 것으로 추정된다. *OsTIP2;2*은 물 수송 활성이 매우 높으며, 조직

특이성이 낮은 것으로 보고된 바 있으나 (Sakurai et al. 2005; Li et al. 2008), 종자 발아 초기에 어떤 기능을 하는지는 알려진 바가 없다. 종자를 침윤하면 배를 둘러싼 조직 근처로 빠른 물 흡수가 일어나는데 이때 *OsTIP2;2*이 주요 기능을 할 가능성이 있다고 사료된다.

따라서 벼의 종자발아과정에서 *OsTIP 2;1*, *OsTIP4;3*와 *OsTIP 2;2*의 역할이 각각 다르다는 것을 예측할 수 있다. *OsTIP2;2*는 종자의 발아 초기 수분 흡수 단계에 관여하고 있으며 *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*는 발아 후반부에 식물체의 뿌리와 줄기 조직의 성장과 관련되어 있는 것으로 보인다. 이들이 수분 이외에도 종자 발아과정에서 가수분해되는 다양한 물질 수송에도 관여하는지 연구가 필요하다. Chaumont 등은 (2005) 서로 다른 종류의 aquaporin monomer가 이성집합체 (heteromers)를 구성하여 수분통로를 형성한다고 제시한 바 있다. 이를 바탕으로 발현 양상에서 동일한 양상을 보이는 *OsTIP3;1/OsTIP3;2* 또는 *OsTIP2;1/OsTIP4;3*간의 heteromer 형성 가능성을 조사해 볼 필요가 있다.

이상 살펴본 바에 따르면 벼의 종자 발달과 발아단계에 따라 서로 다른 종류의 TIP가 특이적으로 발현되어 고유 기능을 수행하는 것으로 생각된다. 최근 연구결과들은 식물의 aquaporin이 각각 기능에 적합한 고유 활성과 조절 기작에 맞도록 다양한 구조를 형성하고 있다는 것을 시사한다. Aquaporin은 tetramer로 구성되어 있으며, 각 monomer가 구멍을 형성하고 있다. X선 결정 모델에 따르면 aquaporin monomer는 6개의 막 도메인과 5개의 연결 루프 (A-E)로 구성되어 있다. 본 연구의 단백질 topology 분석을 통해 벼의 TIP 역시 유사한 기본구조를 형성하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6). Aquaporin은 다양한 환경자극에 반응해서 물과 물질의 수송이 효율적으로 일어날 수 있도록 활성이 조절되는 것으로 보고되었다.

특히 인산화는 다양한 종류의 aquaporin 단백질의 구멍 개폐 (gating)을 조절하는 주요 기작으로 알려졌다 (Maurel 2007). 종자 특이적인 α -TIP가 인산화 단백질이라는 것은 오래전부터 알려진 사실이며, 최근의 인산화 프로테옴 연구는 식물의 PIP나 TIP가 ABA, 염, 가뭄 등 환경 자극에 의해 인산화 수준이 변하는 단백질이라는 것을 보여준다 (Prack et al. 2008; Whiteman et al. 2008; Hsu et al. 2009; Kline et al. 2010). 가뭄 스트레스 조건에서 시금치의 aquaporin (SoPIP2;1)은 C-말단에 위치한 2개의 serine 잔기 (Ser 115와 Ser 274)가 탈인산화되어지면서 닫혀진다 (Johansson et al. 1998). Prak 등은 (2008) 염 스트레스에 의해 AtPIP2;1의

C-말단에 다중 (multiple) 인산화가 일어나는데, 그 중 Ser 283의 인산화가 AtPIP2;1 단백질이 세포막으로 이동하는데 반드시 필요하다고 보고한 바 있다. 이런 결과들은 aquaporin의 인산화가 단백질의 활성과 세포내 분포를 조절하는 주요인자라는 것을 보여준다. 본 연구에서 벼 TIP 계열 단백질간에 예측되는 인산화 잔기가 뚜렷한 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 7).

특히 NPA motif가 보전된 loop B와 loop E에서 종자 특이적으로 발현되는 *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*의 인산화 잔기 양상이 다른 TIP 그룹과 차이를 보였다. *OsTIP3;1*과 *OsTIP3;2*은 loop B에서 CDPK/CRK의 인식부위로 알려진 (Vlad et al. 2008) RXXS/T 혹은 RXS/T 서열이 특이적으로 발견된 반면, loop E의 NPA 근처 인산화 Ser 잔기가 존재하지 않았다. 이런 결과들은 인산화에 의한 *OsTIP3* 계열 단백질의 개폐조절 기작이 다르거나, 서로 다른 종류의 인산화 효소가 관여할 것임을 시사하는 것이다. 또한 *OsTIP* 그룹간에 N-말단에서 예측되는 인산화 잔기가 차이를 보여서 (Fig. 7), 조절 기작이 서로 많이 다를 것으로 추측된다. 인산화 잔기 이외에도 PIP의 활성조절에 관여할 가능성이 높은 것으로 보고된 D loop의 수소이온화 (protonation) histidine 잔기가 *OsTIP3;1*에서만 발견되었고, N-말단의 메틸화 (methylation) lysine 잔기가 *OsTIP4* 그룹과 *OsTIP2;3*에서만 발견된다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 7). 이런 결과는 *OsTIP* 각 그룹 특이적인 활성 조절작용이 있음을 시사한다. 따라서 *OsTIP*의 단백질 수식에 의한 활성조절 기작이 매우 다양하며 특이적인 기능과 밀접히 연관되어 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 밝혀진 *OsTIP*가 종자의 발달과 발아과정에서 어떤 기능을 수행하며 환경과 발달 자극에 의해 어떻게 특이적으로 활성이 조절되는지에 대한 지속적인 연구가 필요하다.

적 요

종자 발달과 발아는 수분과 양분 함량의 급격한 변화를 수반하는 복합적인 과정이다. 본 연구에서는 유전자 발현과 단백질 구조 비교 분석을 통해 벼 종자의 발아와 발달과정에 관여하는 액포막 aquaporin (tonoplast intrinsic protein)을 규명하였다. *OsTIP3;1*, *OsTIP3;2*는 종자 특이적인 TIP로 종자가 성숙되는 시기에 발현되었다가, 종자가 발아하면서 전사체가 사라지는 양상을 보였으며, ABA 처리에 의해 발현이 유도되었다. 단백질 구조 예측 결과로부터 *OsTIP3;1*, *OsTIP3;2*가 단백질의 N-말단, B와 E loop

에 다른 TIP와 뚜렷이 구분되는 인산화 잔기 특징을 확인하였다. *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3*은 종자가 발달하는 과정에서 유전자 발현이 감소하였다가, 종자 발아 후기에 뿌리와 배축의 신장이 활발한 시기에 발현이 급증하였다. 특히 *OsTIP2;1*은 뿌리에서 강한 발현을 보였으므로, 뿌리 성장에 필요한 팽압 공급에 중요한 기능을 할 것으로 제안된다. *OsTIP2;1*과 *OsTIP4;3* 단백질의 N-말단에는 특징적으로 메틸화 (methylation) 가능성이 높은 아미노산 잔기가 예측되었다. *OsTIP2;2*는 *OsTIP2;1*과는 달리 종자 침윤 후 7시간 이내에 발현이 빠르게 유도되며, 발아가 억제되는 조건에서도 유전자 발현이 유지되는 것으로 보아 종자의 초기 수화 과정에 관여할 것으로 추측된다. *OsTIP2;2* 단백질의 N-말단에는 *OsTIP2;1*에 존재하는 인산화 Ser 잔기와 메틸화 잔기가 결실된 특징을 보였다. 이런 결과들은 벼 종자의 발달과 발아 과정에서 나타나는 액포의 종류와 기능에 따라 서로 다른 TIP가 선택적으로 유전자 발현수준에서 조절되며, 인산화, 메틸화 등 단백질 수식에 의한 활성조절 기작 역시 매우 다르다는 것을 시사한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 시험연구사업 (과제번호 PJ006684 및 PJ006758) 연구비와 국립농업과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Amezcuca-Romero JC, Pantoja O, Vera-Estrella R (2010) Ser 123 is essential for the water channel activity of McPIP 2;1 from *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Biol Chem* 285:16739-16747
- Bewley JD (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066
- Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282:1183-1192
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 139:790-805
- Bouton S, Viau L, Lelièvre E, Limami AM (2005) A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1) revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH) is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. *J Exp Bot* 56:825-832
- Chaumont F, Barrieu F, Herman EM, Chrispeels MJ (1998) Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol* 117:1143-1152
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 97:749-764
- Daniels MJ, Yeager M (2005) Phosphorylation of aquaporin PvTIP3;1 defined by mass spectrometry and molecular modeling. *Biochemistry* 44:14443-14454
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant J* 48:427-439
- Gao YP, Young L, Bonham-Smith P, Gusta LV (1999) Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Mol Biol* 40:635-644
- Gerbeau P, Güçlü J, Ripoche P, Maurel C (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* 18:577-587
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta* 1788:1213-1228
- Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol*. 62:305-323
- Hanba YT, Shibasaki M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I, Katsuhara M (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 45:521-529
- Hunter PR, Craddock CP, Di Benedetto S, Roberts LM, Frigerio L (2007) Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol* 145:1371-1382
- Jahn TP, Møller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kuhlbrandt, Schjoerring JK (2004) Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett* 574:31-36
- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by

- phosphorylation. *Plant Cell* 10:451-459
- Johnson KD, Herman EM, Chrispeels MJ (1989) An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiol* 91:1006-1013
- Johnson KD, Hofte H, Chrispeels MJ (1990) An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). *Plant Cell* 2:525-532
- Kaldenhoff R, Bertl A, Otto B, Moshelion M, Uehlein N (2007) Characterization of plant aquaporins. *Methods Enzymol* 428:505-531
- Kline KG, Barrett-Wilt GA, Sussman MR (2010) In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107:15986-15991
- Li GW, Zhang MH, Cai WM, Sun WN, Su WA (2008a) Characterization of OsPIP2;7, a water channel protein in rice. *Plant Cell Physiol* 49:1851-1858
- Li GW, Peng YH, Yu X, Zhang MH, Cai WM, Sun WN, Su WA (2008b) Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. *J Plant Physiol* 165:1879-1888
- Liu D, Tu L, Wang L, Li Y, Zhu L, Zhang X (2008) Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in elongating cotton fibers. *Plant Cell Rep* 27:1385-1394
- Liu HY, Yu X, Cui DY, Sun MH, Sun WN, Tang ZC, Kwak SS, Su WA (2007) The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Res* 17:638-649
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, von Wirén N (2003) Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133:1220-1228
- Liu Q, Umeda M, Uchimiya H (1994) Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol Biol* 26:2003-2007
- Loqué D, Ludewig U, Yuan L, von Wirén N (2005) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol* 137:671-680
- Ludevid D, Hofte H, Himelblau E, Chrispeels MJ (1992) The Expression Pattern of the Tonoplast Intrinsic Protein gamma-TIP in Arabidopsis thaliana Is Correlated with Cell Enlargement. *Plant Physiol* 100:1633-1639
- Ma S, Quist TM, Ulanov A, Joly R, Bohnert HJ (2004) Loss of TIP1;1 aquaporin in Arabidopsis leads to cell and plant death. *Plant J* 40:845-859
- Maurel C (2007) Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett* 581:2227-2236
- Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. *EMBO J* 14:3028-3035
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes. *EMBO J* 12:2241-2247
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595-624
- Niemietz CM, Tyerman SD (2000) Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett* 465:110-114
- Niittyla T, Fuglsang AT, Palmgren MG, Frommer WB, Schulze WX (2007) Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics* 6:1711-1726
- Nyblom M, Frick A, Wang Y, Ekvall M, Hallgren K, Hedfalk K, Neutze R, Tajkhorshid E, Tornroth-Horsefield S (2009) Structural and functional analysis of SoPIP2;1 mutants adds insight into plant aquaporin gating. *J Mol Biol* 387:653-668
- Parent B, Hachez C, Redondo E, Simonneau T, Chaumont F, Tardieu F (2009) Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiol* 149:2000-2012
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V (2008) Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics* 7:1019-1030
- Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M (2008) Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant Cell Physiol* 49:30-39
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 46:1568-1577
- Schnurbusch T, Hayes J, Hrmova M, Baumann U, Ramesh SA, Tyerman SD, Langridge P, Sutton T (2010) Boron toxicity tolerance in barley through reduced expression of the multifunctional aquaporin HvNIP2;1. *Plant Physiol* 153:1706-1715
- Schuermans JA, van Dongen JT, Rutjens BP, Boonman A, Pieterse CM, Borstlap AC (2003) Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. *Plant Mol Biol* 53:633-645
- Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D,

- Maurel C (2006) Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochem J* 400:189-197
- Takahashi H, Rai M, Kitagawa T, Morita S, Masumura T, Tanaka K (2004) Differential localization of tonoplast intrinsic proteins on the membrane of protein body Type II and aleurone grain in rice seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1728-1736
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439:688-694
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425:393-397
- Uehlein N, Lovisollo C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425:734-737
- Vlad F, Turk BE, Peynot P, Leung J, Merlot S (2008) A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates. *Plant J* 55:104-117
- Whiteman SA, Nuhse TS, Ashford DA, Sanders D, Maathuis FJ (2008) A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *Plant J* 56:146-156
- Zhao FJ, Ago Y, Mitani N, Li RY, Su YH, Yamaji N, McGrath SP, Ma JF (2010) The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *New Phytol* 186:392-399
- Zouhar J, Rojo E (2009) Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Curr Opin Plant Biol* 12:677-684