

프로테오믹 분석법에 의한 벼 줄기에서 발현하는 고온 스트레스 관련 단백질 및 저분자량 Heat Shock Protein의 분리 동정

이동기¹ · 김경희¹ · 김용구¹ · 이기원^{1,2} · 이상훈² · 이병현^{1*}

Identification of Heat Stress-related Proteins and Low Molecular Weight HSP Expressed in Stem Tissues of Rice Plants by Proteomic Analysis

Dong-Gi Lee¹, Kyung-Hee Kim¹, Yong-Gu Kim¹, Ki-Won Lee^{1,2}, Sang-Hoon Lee² and Byung-Hyun Lee¹

ABSTRACT

In order to investigate rice stem proteome in response to heat stress, rice plants were subjected to heat treatment at 42°C and total soluble proteins were extracted from stem tissues, and were fractionated with 15% PEG (poly ethylene glycol) and separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE). After staining of 2-DE gels, 46 of differentially expressed proteins were extracted, digested by trypsin, and subjected to matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis. Proteins were identified through database search by using peptide mass fingerprints. Among them, 10 proteins were successfully identified. Seven proteins were up- and 3 proteins were down-regulated, respectively. These proteins are involved in energy and metabolism, redox homeostasis, and mitochondrial small heat shock proteins. The identification of some novel proteins in the heat stress response provides new insights that can lead to a better understanding of the molecular basis of heat-sensitivity in plants, and also useful to molecular breeding of thermotolerant forage crops.

(**Key words** : Heat stress, Molecular breeding, MALDI-TOF, Proteome)

I 서 론

최근 온실가스 축적량의 증가로 인해 지구 온도가 점진적으로 상승하고 있다 (Easterling 등, 1997). 식물에 있어서 고온 스트레스는 식물체의 성장 및 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 환경요인 중 하나이다 (Peng 등, 2004; Lin

등, 2005). 특히 우리나라의 경우 한지형 목초나 잔디의 도입 품종들은 여름철 고온에 대한 적응성이 약해, 성장 장애를 입는 하고현상에 쉽게 노출되어 수량감소와 품질저하의 가장 큰 원인으로 작용하고 있다. 고온 스트레스는 세포내의 다양한 대사에 관여하는 분자들을 교란시키거나 파괴할 뿐만 아니라, 세포 내의 정상

¹ 경상대학교 응용생명과학부 동물생명과학과 (Dept. of Animal Biosciences, IALS, PMBBRC, Division of Applied Life Sciences (BK21), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

² 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea)

Corresponding author: Byung-Hyun Lee, IALS, PMBBRC, Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel: 055-772-1882, E-mail: hyun@gnu.ac.kr

적인 유전자들의 전사 및 단백질로의 번역과정의 효율을 심각하게 저하시키는 원인으로 작용한다(Kim 등, 2002). 그러나 아직까지 식물에 있어서 고온스트레스에 대한 조절기작은 다른 온도 스트레스, 즉 저온 스트레스에 비해 잘 밝혀져 있지 않다. 따라서 우리나라와 같이 한지형 목초에 있어서 빈발하는 하고현상에 대해 내성을 가지는 신품종 목초를 개발하기 위해서는 고온 스트레스에 관여하는 유전자들의 동정, 이들 유전자들의 고온스트레스에 대한 발현조절 기작 및 적응기작 등을 이해하는 것이 필수적이라 할 수 있다. 최근 형질전환기법을 통하여 고온 스트레스 내성 작물을 개발하고자 한 연구가 몇몇 보고되고 있으나, 아직까지 실용화할 수 있는 정도의 결과는 보고되지 않고 있다(Wahid 등, 2007).

프로테오믹스는 단백질 수준에서 유전자 발현에 대한 특성을 파악하고, 외부환경의 변화에 따른 단백질 발현에 대한 정보를 획득할 수 있는 새로운 기술로서 단백질 발현, 발현 후 수식 및 발현단백질의 기능해명에 유용한 기술이라 할 수 있다(Pandy와 Mann 2000). 이러한 프로테오믹스 분석은 이차원전기영동(2-DE)을 통하여 특정 조건에 따라 다르게 발현되는 단백질을 전하와 분자량에 따라 분리한 후 각각의 단백질을 질량분석기로 분석하여 아미노산 서열을 결정하고 이를 바탕으로 단백질 또는 genome database를 bioinformatics tool로 찾아 단백질의 정체를 확인하는 과정으로 구성된다(Rabilloud, 2002). 따라서 식물에 있어서 고온 스트레스 환경 하에서 차별적 발현을 보이는 단백질들을 프로테오믹스 분석을 통하여 동정함으로써 고온 스트레스 조건 하에서 실제적으로 기능하는 유전자를 효율적으로 동정하는 것이 가능할 것이다. 또한 이와 같이 실제로 고온 스트레스 하에서 직접 working 하고 있는 유전자를 분리하여 내하고성이 약한 목초에 도입하게 되면 내하고성이 증가 된 목초의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

우리나라에 있어서 벼는 가장 중요한 식량작물로 재배되어 왔으며, 최근에는 가축 사료용 품종의 개발도 활발히 진행되고 있다. 또한 벼는 게놈연구에 있어서 화분과식물의 모델식물로 많이 이용되고 있어서 최근에는 전체 게놈의 염기서열이 밝혀져 genome database가 잘 갖추어져 있다. 따라서 genome database 정보가 많이 축적되어있는 벼를 모델로 하여 프로테오믹스 분석을 실시하면 고온 특이적인 유전자를 쉽게 동정할 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 고온재해 저항성 신품종 개발에 효율적으로 활용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 벼의 줄기에 있어서 고온 스트레스 특이적인 발현을 보이는 단백질을 이차원전기영동으로 분리한 후, MALDI-TOF MS를 이용하여 동정함으로써 고온 스트레스 관련 유전자들을 확보하고 이들 유전자들을 이용하여 내하고성 목초 또는 사료작물 신품종 개발을 위한 유용유전자를 확보하고자 수행하였다.

II 재료 및 방법

1. 식물재료 및 고온처리

고온관련 단백질 분석을 위한 재료로는 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Dongjin-byeo)를 사용하였다(see Lee 등, 2007). 벼 종자를 스포탁 유제(Samgong, Korea)를 사용하여 12~16시간 표면살균 후 증류수로 충분히 세정한 후 2일간 28°C 암 조건에서 발아를 유도하였다. 발아시킨 종자는 tray 위에 균일하게 파종하여 28°C 28 h 16 h light/8 h dark, 15,000 lux, 상대습도 50~60% 조건으로 growth chamber에서 재배하였다(Nakamura 등, 1993). Growth chamber에서 2주간 생육시킨 유묘를 42°C, 습도 60%에서 12 및 24시간 동안 고온처리한 후(see Lee 등, 2007), 줄기부분의 시료를 채취하여 액체질소로 동결시킨 후 -80°C | 보관 하였다.

2. Total soluble protein의 추출

고온처리 후 약 1g의 줄기 시료조직을 채취하여 액체질소로 완전히 파쇄한 후 10 mL의 단백질 추출 buffer [0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, 2% NP-40, 20 mM MgCl₂, 4% β-mercaptoethanol] (NP-40 buffer)를 첨가하여 균질화한 후 12,000 rpm으로 4°C |서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하였다 (Kim 등, 2001).

3. PEG fractionation 및 phenol 추출

추출한 total soluble protein의 PEG (poly ethylene glycol) fractionation은 Lee 등 (2007)의 방법에 준하여 실시하였다. 15% PEG fractionation한 상등액 (supernatant) 분획은 acetone으로 침전시켜 회수한 후 1차원 전기영동 buffer인 rehydration buffer에 용해시키고 Lowry 방법을 이용하여 단백질 농도를 결정하였다 (Lowry 등, 1951).

4. 이차원 전기영동 (2-DE)과 이미지 분석

Acetone으로 침전시켜 회수한 150 μg의 단백질을 reswelling buffer (8M urea, 1% CHAPS, 0.5% IPG buffer pH 4-7, 20 mM DTT, BPB)에 용해시킨 후, IPG strip pH 4-7에 12시간동안 rehydration 시키면서 loading한 다음, IPGphor를 이용하여 47500 Vh로 등전점 전기영동을 실시하였다. 일차원 전기영동이 끝난 IPG strip은 equilibration buffer (50 mM of Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, and a trace of bromophenol blue)에서 평형시킨 후 12% SDS-PAGE를 실시하였다.

이차원 전기영동이 끝난 gel의 silver staining은 Blum 등 (1987)의 방법에 준하여 실시하였으며, Colloidal Coomassie Blue 염색은 전기영동이 끝난 gel을 Neuhoff 등 (1988)의 방법에 준하여 실시한 후, 특이적인 단백질을 gel에서 잘

라내어 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 동정에 사용하였다. 염색이 끝난 gel은 GS-800 densitometer scanner (Bio-Rad)로 scan한 뒤 전용 이미지 분석 프로그램인 PDQuest (Bio-Rad, Ver. 7.2)를 이용하여 비교 분석 하였다.

5. 단백질 동정

차별적 발현을 보인 단백질 spot은 잘라내어 Lee 등 (2007)의 방법에 준하여 전처리한 후 trypsin으로 in-gel digestion하여 절단된 peptide를 추출하였다. 단백질 동정은 MALDI-TOF MS 방식인 VoyagerTM-DE STR을 사용해 분석하였고, Standard solution에 사용된 peptide는 Sigma에서 구입한 Bradykinin, Neurotensin을 이용하였다. Database 검색은 Protein prospector (<http://prospector.ucsf.edu>)를 이용하였으며, 단백질 sequence database는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)를 이용하였다 (Lee 등, 2007).

III 결과 및 고찰

고온처리한 벼의 단백질 발현 양상을 분석하기 위하여 42°C의 고온처리를 한 벼의 줄기 조직으로부터 분리된 total soluble 단백질을 15% PEG로 fractionation하여 상등액 분획의 단백질을 이차원전기영동한 후, colloidal CBB 염색을 실시한 결과, 다양한 차별적 발현을 보이는 단백질 spot들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 대부분의 변화를 보인 단백질 spot들은 고온처리시간에 따라 점진적인 증가 또는 감소하는 경향을 나타내었다. 이들 이차원 전기영동 gel을 PDQuest software를 이용하여 대조구와 비교한 결과 24개의 단백질 spot이 고온 스트레스 처리에 의해 증가하였고, 22개의 단백질 spot이 감소하여 총 46개의 단백질 spot이 차별적 발현을 보였다 (Fig. 2). 이들 각각의 단백질 spot들의 발현정도의 차이를 PDQuest software를

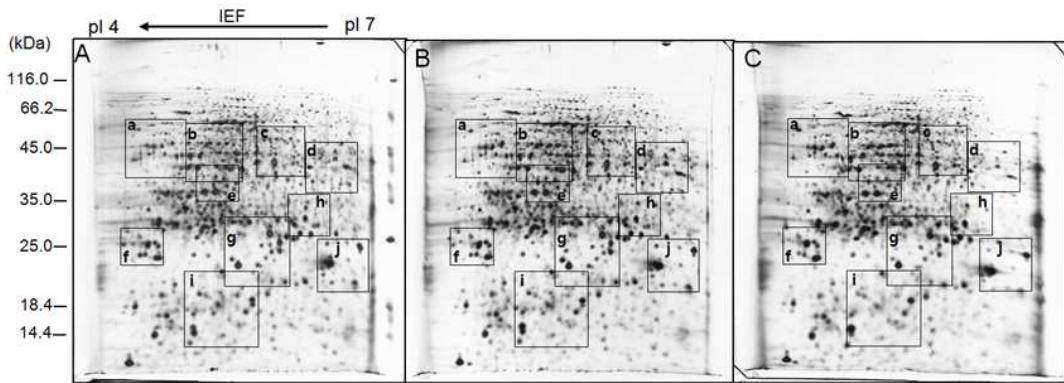


Fig. 1. A 2-DE analysis of rice stem proteins in response to heat stress. A, B and C shows the 2-DE gel patterns of the PEG fractionated supernatant protein samples prepared from the control (25°C), 12 h, and 24 h heat-treated (42°C) stems, respectively. Heat-responsive proteins were located in the boxed areas (a-j).

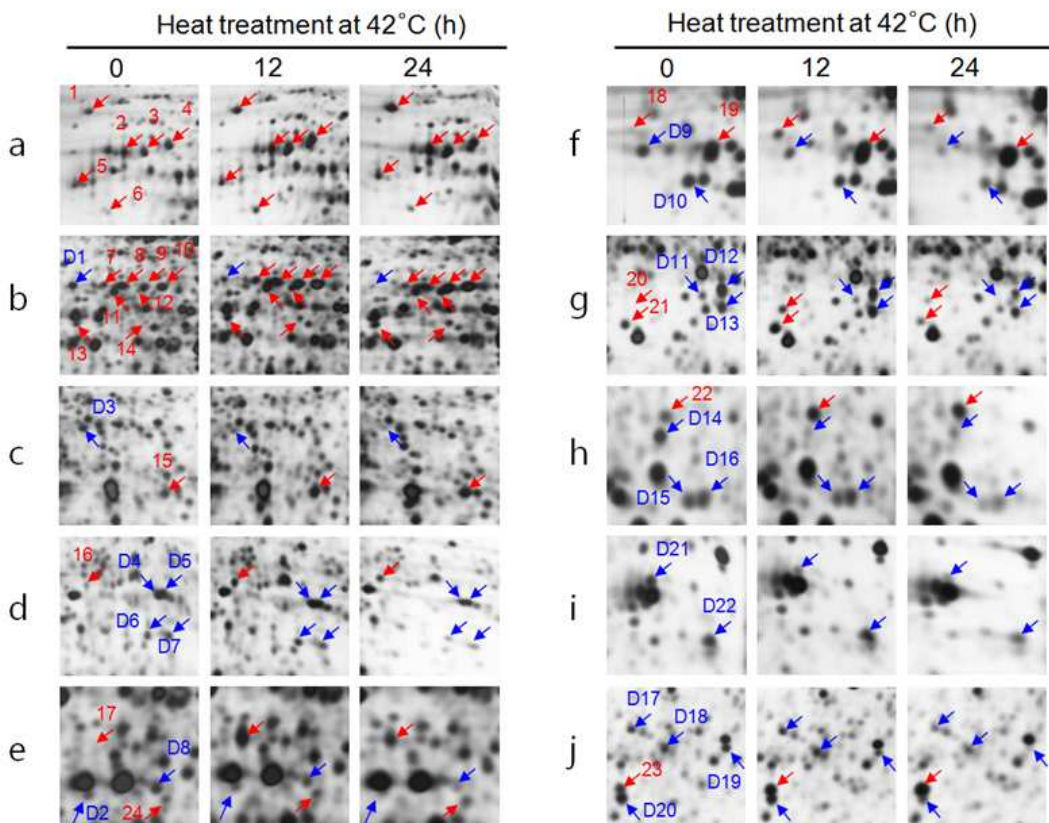


Fig. 2. Close-up views of the differentially expressed proteins identified from the PEG-fractionated supernatant samples. Arrow showing proteins increased (red arrows) or decreased (blue arrows) in response to heat stress.

이용하여 대조구와 비교한 결과, 42°C 고온처리 후 발현정도가 대조구에 비해 최소한 2배 이상 증가 또는 감소하는 경향을 나타내었으며, spot 20과 21의 경우 고온 처리 후 12시간째에 일시적으로 증가하다가 24시간째에 감소하는 발현양식을 보이기도 하였다 (Fig. 3).

이와 같이 고온처리 후의 발현양이 2배 이상 증가 또는 감소하는 단백질 spot들을 gel에서 잘라내어 trypsin 처리 후 in-gel digestion 과정을 거쳐 추출된 peptides를 MALDI-TOF MS 분석을 실시하고 database를 통해 단백질을 동정하였다. 그 결과 42°C 고온 처리 후 점진적으로 발현양이 증가된 24개의 단백질 spot 중에서 7개의 단백질 spot이 동정되었으며, 감소된 22개의 단백질 spot 중에서 3개의 단백질 spot이 동정되었다. 최종적으로 동정되어진 단백질들의 종류와 기능을 표 1에 나타낸 바와 같다 (Table 1).

동정되어진 단백질을 그 기능별로 분류해 보면 세포내 에너지 및 대사관련 단백질로서 phosphoribulokinase (PRK, spot D2), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase, spot 9) 및 thiamine

biosynthesis protein (spot 17)가 동정되어졌다. Thiamine (vitamine B1)은 세포 내의 다양한 대사과정에 관여하는 transketolase and pyruvate dehydrogenase 등의 여러 가지 효소들의 활성화에 필수적인 cofactor로 작용하고 있다 (Jacob 등, 1991). 따라서 스트레스 조건 하에서 많이 필요로 하는 thiamine을 생합성하기 위해 thiamine biosynthesis protein이 발현이 증가된 것으로 추측된다. Phosphoribulokinase (PRK)는 5탄당 인산회로에서 핵심 단계인 ribulose-5-phosphate를 ATP-dependent phosphorylation을 통해 ribulose-1,5-phosphate로 촉매하는 기능을 수행한다 (Gibson 등, 1990). 이와 같이 고온 스트레스 조건 하에서 UGPase의 발현이 변화된다는 보고가 Ferreira 등 (2006)의 연구결과에서도 보고된 바 있다. UGPase는 sucrose 또는 세포벽성분의 생합성 과정에서 필수적인 전구체인 UDP-glucose의 생합성 및 pyrophosphorolysis에 관여하는 효소단백질이다 (Ciereszko 등, 2001). 이와 같이 고온을 비롯한 다양한 환경 스트레스에 의해 UGPase 발현이 증가되는 것이 보고된 바 있다 (Meng 등, 2007).

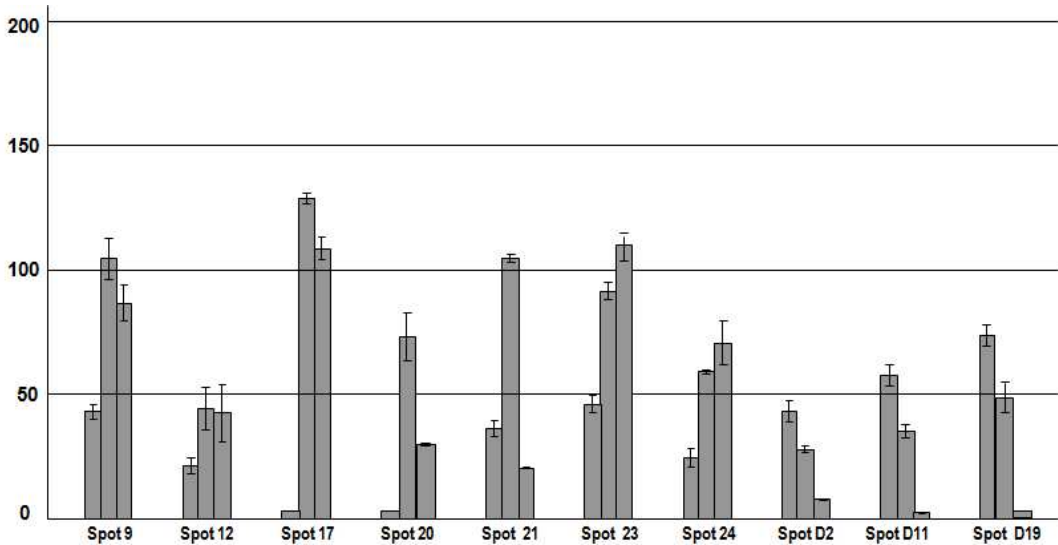


Fig. 3. The expression level of up- and down-regulated proteins compared to those of controls in figures 1 and 2. The intensities of up- and down-regulated protein spots (indicated) were measured using a densitometer software (Bio-Rad) and compared to those of the control.

Table 1. The identification of differentially responsive proteins in the PEG supernatant fraction of rice stem tissues, during heat treatment at 42°C, with MALDI-TOF analysis

Spot no./ Protein change	PM ^{a)}	SC (%) ^{b)}	Mr(Da)/pI	Protein name identified	Species	Accession no. in NCBI database
9/up	13	20	60.5/5.4	UGPase	Rice	BAB69069
12/up	7	23	50.0/5.6	Chloroplast translation EF-Tu	Rice	AAF15312
17/up	13	31	35.0/5.2	Thiamine biosynthesis protein	Rice	XP_478512
20/up	8	28	26.0/6.4	Putative mitochondrial low molecular weight HSP	Rice	XP_467890
21/up	8	46	26.5/6.3	DHAR	Rice	AAV44199
23/up	4	27	16.5/5.0	Thioredoxin h type	Rice	XP_476912
24/up	5	25	29.0/5.4	Putative GST	Rice	NP_922478
D2/down	11	31	42.5/5.0	PRK precursor	Rice	XP_467296
D11/down	7	25	35.0/4.8	Putative peroxidase	Rice	BAD52613
D19/down	4	20	17.5/5.7	Putative SOD[Cu-Zn] chloroplast precursor	Rice	XP_483791

^{a)} PM, number of peptides matched.

^{b)} SC, sequence coverage by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF MS.

동정되어진 단백질 중 redox homeostasis에 관여하는 단백질로서 dehydroascorbate reductase (spot 21, DHAR), thioredoxin h (spot 23), GST (spot 24), Peroxidase (spot D11), 및 superoxide dismutase (SOD) chloroplast precursors (spot D19) 가 동정되었다. DHAR은 ascorbate cycle에서 필수적인 핵심 효소이다. Ascorbate의 항산화 활성은 glutathione을 이용하여 dehydroascorbate를 ascorbate로 재환원시키는 반응을 촉매하는 DHAR의 활성에 좌우된다. 또한 다양한 산화스트레스 하에서 DHAR의 활성이 증가된다는 보고가 Urano 등 (2000)에 의해 보고된 바 있다. Thioredoxin h은 peroxiredoxin, methionine sulfoxide reductase, 및 glutathione reductase 등과 같이 항산화에 관여하는 효소들에게 전자 공여체로서 기능함으로써 세포내 산화환원준위를 광범위하게 조절하는 기능을 가진 단백질이다 (Gelhaye 등, 2005). 따라서 고온 스트레스 하에서 thioredoxin h는 세포내 산화환원반응을 촉매함으로써 세포를 보호하는 기능을 담당할

것으로 추측된다. 식물의 GST는 multigene families로 code되어있는 다양한 종류의 GST isozymes을 가지고 있다. 그러나 이들 각각의 기능에 대해서는 아직까지 많이 밝혀져 있지 않다. 지금까지의 보고에 따르면 다양한 종류의 GST가 다양한 종류의 환경 스트레스에 의해 발현이 조절되는 것으로 보고되고 있으며, 그 중에서도 고온이나 저온과 같은 온도 스트레스에 의해 발현이 증가되는 것으로 보고된 바 있다 (Gronwald 등, 1998). 이러한 결과는 GST가 고온 스트레스로 인해 발생하는 ROS에 의한 지질과산화물의 무독화 과정 등에 관여하는 것으로 추측된다. CuZnSOD는 일반적으로 세포질이나 엽록체에 존재하는 효소로서 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는 핵심역할을 담당하고 있다. 본 실험에서 CuZn SOD는 고온 스트레스에 의해 그 발현이 감소하였다. 이와 같이 산화스트레스나 고온 스트레스에 의해 SOD 발현이 감소한 결과가 Sweetlove 등 (2002) 과 Shin 등 (2005) 등에 의해서도 보고된 바

있다 이러한 결과는 SOD가 온도 스트레스에 대해서 다양하고 복잡한 발현기구를 가지고 있거나 isoform에 따라 각각 서로 다르게 조절되고 있을 가능성을 나타낸다.

한편 heat shock protein (HSP)으로는 미토콘드리아에 존재하는 저분자량 (small) HSP가 동정되어졌다 (spot 20). 이 미토콘드리아 small HSP는 고온 처리한 잎의 프로테옴 분석에서도 동정되었으며, 발현양 자체는 고온처리한 잎의 경우가 높게 나타났다 (Lee 등, 2007). HSP는 스트레스 조건 하에서 단백질 변성을 방지하거나 변성된 단백질의 재생에 관여함으로써 세포를 보호하는 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 특히 식물의 경우 다양한 종류의 저분자량 small HSP가 multigene family로 code되어져 있으며 5가지의 group으로 분류된다. 본 연구에서 미토콘드리아에 존재하는 small HSP는 고온 특이적으로 발현이 급격히 유도되었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 미토콘드리아 small HSP도 다른 기관에 존재하는 small HSP와 마찬가지로 고온 스트레스 하에서 미토콘드리아 내의 단백질들의 변성 방지 또는 변성된 단백질들의 재생에 있어서 중요한 기능을 담당함으로써 세포를 보호하는 것으로 추측된다. 지금까지 미토콘드리아 small HSP를 과발현시킴으로써 식물체의 고온내성이 증가되었다고 보고된 바 있다 (Sanmiya 등, 2004). 따라서 이 단백질 유전자를 분리하여 내열성이 약하여 하고현상이 빈발하고 있는 국내재배 목초 품종에 도입하게 되면 내하고성 목초개발이 가능해질 것이다.

IV 요약

프로테오믹스 기법을 이용하여 벼 고온 스트레스 관련 단백질을 분리 동정하기 위하여 42 °C |서 고온처리한 벼의 줄기로부터 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질로부터 Rubisco 단백질을 제거하기 위해 15% PEG fractionation을

실시한 후 상등액 분획의 단백질을 이차원전기영동한 후, CBB 염색을 통해 차별적 발현을 보이는 단백질을 분석하였다. 총 46개의 단백질 spot이 발현양에 변화를 보였으며, 그 중 24개의 단백질이 고온 스트레스에 의해 발현이 증가되었으며, 22개의 단백질이 감소하는 발현양상을 나타내었다. 이들 단백질을 MALDI-TOF MS와 database를 통해 동정한 결과 에너지 대사관련 단백질, 산화—환 관련 단백질 및 저분자량 small HSP 등, 10개의 단백질이 동정되었다. 이들 동정된 단백질들은 식물의 고온 스트레스에 대한 적응기작을 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것이며, 특히 미토콘드리아 small HSP는 프로테옴 분석법에 의해 최초로 동정되었으며, 금후 내하고성 목초 분자육종에 활용될 수 있는 좋은 유전자로 판단된다.

V 사 사

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2008-313-F00065).

VI 인용 문헌

1. Ciereszko, I., H. Johansson, V. Hurry and L.A. Kleczkowi. 2001. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of Arabidopsis. *Planta* 212:598-605.
2. Easterling, D.R., B. Horton, P.D. Jones and T.C. Peterson. 1997. Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science* 277:364-367.
3. Ferreira, S., K. Hjerno, M. Larsen and G. Wingsle. 2006. Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. *Ann. Bot.* 98: 361-377.
4. Gelhaye, E., N. Rouhier, N. Navrot and J.P. Jacquot. 2005. The plant thioredoxin system. *Cell*

- Mol. Life Sci. 62:24-35.
5. Gibson, J.L., J.H. Chen, P.A. Tower and F.R. Tabita. 1990. The form II fructose 1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase genes form part of a large operon in *Rhodobacter sphaeroides*: Primary structure and insertional mutagenesis analysis. *Biochemistry* 29:8085-8093.
 6. Gronwald, J.W. and K.L. Plaisance. 1998. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiol.* 117:877-892.
 7. Jacob-Wilk, D., E.E. Goldschmidt, J. Riov and A. Sadka. 1997. Induction of a Citrus gene highly homologous to plant and yeast thi genes involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation. *Plant Mol. Biol.* 35:661-666.
 8. Kim, H.J., E.J. Song and K.J. Lee. 2002. Proteomic analysis of protein phosphorylations in heat shock response and thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 277:21193-23207.
 9. Kim, S.T., K.S. Cho, Y.S. Jang and K.Y. Kang. 2001. Two-dimensional electrophoresis analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis.* 22: 2103-2109.
 10. Lee, D.G., N. Ahsan, S.H. Lee, K.Y. Kang, J.D. Bahk, I.J. Lee and B.H. Lee. 2007. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7:3369-3383.
 11. Lin, S.K., M.C. Chang, Y.G. Tsai and H.S. Lur. 2005. Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. *Proteomics* 5:2140-2156.
 12. Lowry, O.H., J.N. Rosebrough, A.I. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 13. Meng, M., M. Geisler, H. Johansson and E.J. Mellerowicz. 2007. Differential tissue/organ-dependent expression of two sucrose- and cold-responsive genes for UDP-glucose pyrophosphorylase in *Populus*. *Gene* 389:186-195.
 14. Nakamura, N. 1993. An illustrative model of instabilities in meridionally and vertically sheared flows. *J. Atmos. Sci.* 50:357-375.
 15. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels include isoelectric focusing gels with clear background at nonogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9:255-262.
 16. Pandey, A. and M. Mann. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.
 17. Peng, S., J. Huang, J.E. Sheehy and R.M. Visperas. 2004. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9971-9975.
 18. Rabilloud, T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis on proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountain. *Proteomics* 2:3-10.
 19. Sanmiya, K., K. Suzuki, Y. Egawa and M. Shono. 2004. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Lett.* 557:265-268.
 20. Shin, S.Y., H.S. Lee, S.Y. Kwon and S.T. Kwon. 2005. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of *Manihot esculenta*. *Plant Physiol. Biochem.* 43:55-60.
 21. Sweetlove, L.J., J.L. Heazlewood, V. Herald and R. Holtzapffel. 2002. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *Plant J.* 32:891-904.
 22. Urano, J., T. Nakagawa, Y. Maki and T. Masumura. 2000. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett.* 466: 107-111.
 23. Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf and M.R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ Exp Bot* 61:199-223.
- (접수일: 2011년 3월 7일, 수정일 1차: 2011년 4월 12일, 수정일 2차: 2011년 4월 21일, 게재확정일: 2011년 4월 28일)