

## Salt Stress Responses of an Alanine Aminotransferase Knock-out Mutant of Rice (*Oryza sativa* L.)

Kyoung-nam Im and Chin Bum Lee\*

Department of molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received February 20, 2013 / Revised April 24, 2013 / Accepted April 25, 2013

An *AlaAT* knock-out mutant (*alaat*) of rice (*Oryza sativa* L.) was isolated from T-DNA tagging lines and the genotypes of its progeny were determined with *AlaAT1*-specific primers. The *alaat* phenotypes showed decreased growth and grain yield when compared with control plants. The activity of *AlaAT1* in the mutant plants was practically undetectable. The responses of *alaat* plants to growth under salt stress were compared with those of control plants by measuring chlorophyll fluorescence and the activities and mRNA expression of antioxidant enzymes. All abiotic stresses tested (salt, drought, and chilling) caused a similar decrease in chlorophyll fluorescence in both *alaat* and wild type plants. The activity of peroxidase (POX), an antioxidant enzyme, decreased following salt treatment of *alaat* plants, while control plant showed an increased activity. The mRNA levels for *cAPX* (cytosolic ascorbate peroxidase), *POX2*, and *AlaAT* were determined by RT-PCR following salt stress. No *AlaAT1* mRNA was detected in *alaat* plants. The *POX2* mRNA showed a slightly increased level in the wild type but was not detected in *alaat* plants, in agreement with the activity assays. The levels of *cAPX* mRNA were greatly increased in both the wild type and *alaat* plants. The salt stress effects on rice plant growth are therefore proposed to reflect a loss of function of *AlaAT*, which alters the activity and synthesis of antioxidant enzymes (especially peroxidases), rather than a direct effect on photosynthesis.

**Key words** : Alanine aminotransferase, Peroxidase, ascorbate peroxidase, salt stress, chlorophyll fluorescence

### 서 론

Alanine aminotransferase (AlaAT)는 동·식물뿐 아니라 세균에 이르기까지 넓게 분포되어 있는 효소로 식물의 잎, 뿌리 및 꽃 기관 등 거의 모든 식물의 조직에서 그 활성을 보이며 (Igarashi et al., 2003), 주로 아미노기 전이반응을 가역적으로 촉매하여 알라닌과 2-옥소글루타르산을 피루브산과 글루탐산으로 전환시킨다[8, 20, 33]. 이로써 AlaAT (EC 2.6.1.2)는 탄소와 질소 대사 모두에서 식물 대사의 핵심적인 역할을 수행한다. *AlaAT*는 애기장대[26], 강낭콩[28] 등 많은 식물에서 *AlaAT*를 암호화하는 4개의 유전자를 내포하고 있다. 그 중 둘은 *AlaAT*를 암호화하는 *AlaAT1*와 *AlaAT2*로 아직 상세히 특징지어져 있지 않지만, *AlaAT1*은 시토플라스마에 존재하고, *AlaAT2*는 미토콘드리아에 위치하는 것으로 알려져 있으며, glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) 활성을 갖지 않는다[24]. 한편 나머지 둘은 *AlaAT* 활성과 GGAT 활성을

모두 가지는 GGAT (EC 2.6.1.4)를 암호화 하는 *GGAT1*과 *GGAT2*로 주로 페록시솜에 위치하여 광호흡 대사에 관여한다 [10, 17, 24].

*AlaAT*는 생물적 및 비생물적 여러 환경 요인에 식물이 노출되었을 때 그 활성이 조절 받는다[32]. 특히 대부분 식물의 뿌리에서 저산소 혹은 무산소 상태에서 당의 발효 과정이 진행되는 동안 *AlaAT* 유전자의 발현이 촉진되어 L-알라닌이 비교적 많이 생성된다[9, 13, 27, 28]. *AlaAT1*은 저산소에 주로 뿌리에서 유도되며, *AlaAT2*와 GGAT는 영향을 받지 않고, GGAT중 GGAT1은 광의존적 발현을 보이며 광호흡과 밀접한 관련이 있는 것으로 최근 보고된 바 있다[20]. 한편 애기장대의 T-DNA 돌연변이체와 보리의 *AlaAT* 과다발현체를 이용한 연구에서 *AlaAT1*이 주된 *AlaAT* isozyme임을 보여주었다[26]. 저산소외에도 질소원의 고갈 역시 *AlaAT*의 활성에 지대한 영향을 미치며[30], 다양한 질소원에 대해 *AlaAT*는 질소 동화에 효율적으로 작용함이 제시되었다[20, 27-29]. 이와 같이 *AlaAT*에 대한 연구는 주로 저산소 및 질소원에 국한하여 이루어져 왔다.

식물은 자연에서 빛, 수분 그리고 온도 등과 같은 다양한 환경 요인에 의해 지속적으로 영향을 받는다. 특히, 고염에 의해 야기되는 수분 스트레스 및 독성 이온의 축적은 식물에 가장 광범위하게 영향을 주는 요인 중 하나이다. 또한 식물은 건조, 고염, 저온을 포함하는 대부분의 환경 스트레스에 대한

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1525, Fax : +82-51-890-1521

E-mail : cblee@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

공통된 반응으로 singlet oxygen, superoxide, hydrogen peroxide와 같은 활성산소종(ROS)의 생성에 따라 식물의 생장 및 생산성의 저하를 가져온다[1, 14]. 이와 같이 식물이 이들 스트레스에 노출되면 새로이 유도되는 유전자 발현의 변화 등으로 환경 조건에 순화 및 적응하게 된다.

본 연구는 *AlaAT* 유전자에 T-DNA가 삽입된 벼 돌연변이체를 이용하여 *AlaAT*의 기능을 상실하였을 때 생장 및 생산성에 어떤 영향을 미치고, 또한 고염 스트레스에 노출되었을 때 그 반응을 조사하여 *AlaAT*의 기능을 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 스트레스 처리

실험 재료는 포항공과대학 생명과학연구소에서 분양 받은 1C-128-12 돌연변이 개체와 호남 종묘시험장에서 공급 받은 벼 종자(*Oryza sativa* L. cv. Dongjin)를 대조구로 사용하였다. 벼 종자는 2% sodium hypochlorite로 30분간 소독한 후 물로 10-15회 세척하였다. 세척한 종자를 300×250×25 (mm)의 plate에 거즈를 놓고 골고루 뿌린 후, 15~20 mm 정도의 액아가 발생할 때까지 30℃ 항온조에서 3일간 발아시켰다. 발아된 벼 종자를 수도용 상토가 담겨있는 화분에 옮겨 심은 후 광 : 암주기(14 : 10 hr)로 26℃, 200 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>에서 20여 일간 생장 시킨 유식물을 노토양으로 옮겨 자연광 하에서 90여 일간 키운 뒤 실험에 사용하였다.

90일간 온실에서 생장한 1C-128-12 개체와 wild type (Dongjin) 벼 잎을 절단하여 각각의 스트레스에 대한 시료로 사용하였다. 염 처리는 300 mM의 NaCl 함유된 0.1% Hoagland 용액을 사용하여 24시간 처리하였다. 건조 처리는 절단한 잎을 1500×20(mm) 패트리디쉬에 넣고 25℃에서 24시간 처리하였다[4]. 저온 스트레스는 0.1% Hoagland 용액에 절단한 잎을 띄워 4℃에서 24시간 처리하였다[22].

#### T-DNA가 삽입된 유전자의 동정

pGA2707 vector가 삽입된 아그로박테리아를 감염시켜 형질전환 된 1C-128-12 돌연변이 개체에서 약 0.2 g 잎을 채취하여 MM301 Mixer Mill (Retsch, Hann, Germany)로 마쇄한 후, genomic DNA를 추출하였다[5]. 추출된 DNA는 *pstI*로 절단하여 T4 ligase로 ligation한 후 IPCR을 수행하였다. 첫 번째 IPCR (95℃ 1분, 54℃ 1분, 72℃ 2분, 35 반복)은 primer

242R과 hph4R (Table 1)를 이용하여 수행하였고, 첫 번째 PCR 산물을 이용한 두 번째 IPCR (95℃ 30초, 55℃ 1분, 72℃ 2분, 35 반복)은 primer DA2R과 hph1R (Table 1)을 이용하여 수행하였다[15, 18, 19]. 2차 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 후 GeneClean II kit (Q-Biogene, Carlsbad, CA)로 DNA를 분리하여 서열 분석을 하였다.

#### Genotype 및 phenotype 분석

1C-128-12 돌연변이 개체의 서열 분석을 통해 alanine aminotransferase (*AlaAT*) 유전자에 T-DNA가 삽입되었음을 확인하였으며, 유전자형을 분석하기 위해 genomic DNA를 추출하였다. *AlaAT* 서열에 특이적 primer를 제작하고 PCR (95℃ 1분, 58℃ 1분, 72℃ 2분, 35 반복)를 수행하여 1.2% agarose gel에서 전기영동 한 후 염기서열 분석하였으며, 야외 온실에서 90여 일간 키운 1C-128-12 돌연변이 개체의 생장, 잎의 크기, 종자 크기 등을 대조구와 비교하였다.

#### 엽록소 형광 분석

엽록소에서 방출되는 형광은 Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech; U.K.)와 pulse amplitude modulation fluorometer (PAM-2000, Walz GmbH, Effeltrich, Germany)를 사용하여 측정하였다. 형광을 유도하기 전, 엽 절편을 30분간 암 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 최소형광값(initial fluorescence, Fo)은 0.1 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>을 처리하여 측정하였고, 최대형광값(maximal fluorescence, Fm)은 700 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>의 포화광으로 측정하여, 최대형광변이값(variable fluorescence, Fv)을 Fm - Fo로 구하였다. 이에 따라 광화학반응에 대한 광계 II 양자수율의 최대치로 Fv/Fm 값을 구하였다[16, 21].

#### 효소 활성 측정

*AlaAT* 활성측정을 위하여 잎 1g을 4℃에서 완충용액(50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DDT) 5 ml을 사용하여 마쇄한 후, 10,000× g에서 20분간 원심분리하여 효소를 추출하였다. 10 mM L-alanine, 5 mM oxoglutarate, 0.1 mM NADH를 포함한 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에 5 units lactate dehydrogenase (700 units/mg)와 효소추출액 50 μl를 첨가하여 최종 volume 3 ml을 30℃에서 30분간 incubation 시킨 후, 효소 활성은 spectrophotometer (shimazu U.V 2501)를 이용

Table 1. IPCR primer sequence

	Direction	Name	Sequence
1st	Right	242R	5'-TTGGGGTTTCTACAGGACGTAAC-3'
	Left	hph4R	5'-CCATGTAGTGTATTGACCGATTTC-3'
2nd	Right	DA2R	5'-CAAGTTAGTCATGTAATTAGCCAC-3'
	Left	hph1R	5'-TCGTCTGGCTAAGATCGGCCGCA-3'

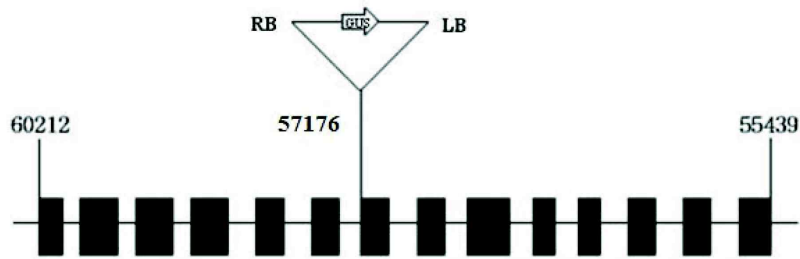


Fig. 1. Diagram showing the gene structure of Alanine aminotransferase (*AlaAT*) and the position of the T-DNA.

하여 340 nm에서 30초 마다 측정하였다[31].

POX 활성측정을 위해 잎 1 g을 효소추출액(50 mM KPi buffer pH 7.0, 1% Triton X-100, 7 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) 3 ml에 넣어 마쇄한 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 간 원심 분리하여 추출하였다. 효소추출액 100  $\mu$ l, 0.3 mM guaiacol 10  $\mu$ l에 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30  $\mu$ l (최종 농도 0.1 mM), 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 첨가하여 최종 volume 3ml를 spectrophotometer (shimazu U.V 2501) 436 nm에서 3분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 활성은 1 mol의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 1 mol의 guaiacol을 산화시켜 최종적으로 guaiacol 탈 수소 산물형성에 의한 흡광도 변화로 나타내며  $\epsilon_{436nm}=6.39$  cm<sup>2</sup>/ $\mu$ M로 계산하였다[2].

#### RT-PCR 분석

대조구 및 스트레스 처리구의 total RNA는 Tri reagent (Molecular Research Center, USA)를 이용하여 추출하였다. cDNA 합성은 Total RNA 3  $\mu$ l, 5x RT buffer 5  $\mu$ l, 2 mM dNTP mix 2  $\mu$ l, oligo dT (500  $\mu$ g/ml) 1  $\mu$ l, RNase inhibitor (40 u/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 10분 incubation한 후 RTase (200 u/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 1.5 hr 동안 incubation 하여 합성했다. RT-PCR은 합성된 cDNA (5  $\mu$ g/ $\mu$ l)와 *AlaAT*, cytosolic APX (NCBI, D40423)와 POX2에 특이적으로 작용하는 sense primer와 GUS primer를 각각 사용하여 PCR (95°C에서 1분, 58에서 1분, 72°C에서 2분 동안 30 cycle)를 수행하여 1.2 (w/v)% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

#### 결과 및 고찰

##### T-DNA 삽입 유전자 분석

동진 벼에 pGA2707 vector를 이용하여 T-DNA가 삽입된 돌연변이체(1C-128-12)의 genomic DNA를 추출하여 *pstI*으로 특정부위를 절단하고 이어서 IPCR를 수행한 후, 서열분석을 하였다. 서열 분석을 한 결과 벼의 3번 염색체 57,176 염기 서열부터 역방향으로 *AlaAT*의 6번째 엑손에 1,007개의 염기가 삽입되었다(Fig. 1). T-DNA가 삽입된 *AlaAT*의 분석된 염기

서열을 아미노산 서열로 전환하여 동정한 결과,  $\alpha$ *AlaAT*1의 경우 252개의 아미노산 서열 중 251개가 일치하여 99.6%의 상동성을 보였으며,  $\alpha$ *AlaAT*2는 82%, *pmAlaAT*와는 85%, 그리고 *atAlaAT*와는 83%의 상동성을 보였다(Fig. 2). 이 결과로 1C-128-12는 T-DNA가 3번 염색체의  $\alpha$ *AlaAT*1에 삽입되어 cytosolic *AlaAT*의 기능이 상실된 돌연변이체일 것으로 여겨진다[24].

##### *AlaAT* 돌연변이체의 생장

T-DNA가 삽입된 *AlaAT* knock-out mutant (*alaa*t) line의 유전자형은 *AlaAT* 유전자 서열분석에 따라 특이한 primer인 P1 primer (5'-CTAGGTCATCAGAGCGAACG-3')와 P2 primer (5'-TCAGCATCCCTAGCACTTCA-3'), 그리고 T-DNA 내의 GUS primer인 P3 primer (5'-CAAGTTAGTCATGTAATTAGCCAC-3')를 사용하여 PCR을 수행하여 조사하였다(Fig. 3A). PCR 후 전기영동 결과 T1 개체 중 4, 7번 개체는 homozygote, 5번 개체는 wild 그리고 2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15번 개체는 hetero로 분석되었다(Fig. 3B). 이에 따라 *alaa*t에 관한 실험은 4, 7번과 같은 homozygote 개체를 이용하여 대조구와 비교분석하였다.

*AlaAT*는 탄소와 질소 대사 모두에서 식물 대사의 핵심적인 역할을 수행한다고 보고되었다[20, 33]. 본 실험 결과 역시 *AlaAT*의 생장 및 종자 생성 등을 대조구와 비교한 결과 분얼의 수, 잎 생장 그리고 줄기 생장에서 대조구보다 현저히 떨어지는 생장률을 보였다. 돌연변이 개체의 분얼 수는 9개로 대조구에 비해 약 1/2 정도이고, 잎과 줄기의 생장은 대조구의 1/2 내지 2/3로 매우 저조한 생장을 보였다(Fig. 4A). 종자 역시 *alaa*t의 경우 대부분이 속이 비어있었고, 대조구에 비해 크기가 작았다(Fig. 4B). 이와 같은 결과는 *AlaAT*의 기능이 상실된 *alaa*t는 기본적으로 대사에 장애를 가져와 생장에 영향을 가져온 것으로 사료된다.

##### *AlaAT* 효소활성

식물 세포에서 *AlaAT*는 피루브산을 알라닌으로 전환시킨다. 일반적으로 *AlaAT*의 활성은 뿌리 조직에서 무산소 상태일 때 유도되는 것으로 알려져 있으며[12], 녹색 잎 조직에는 주로

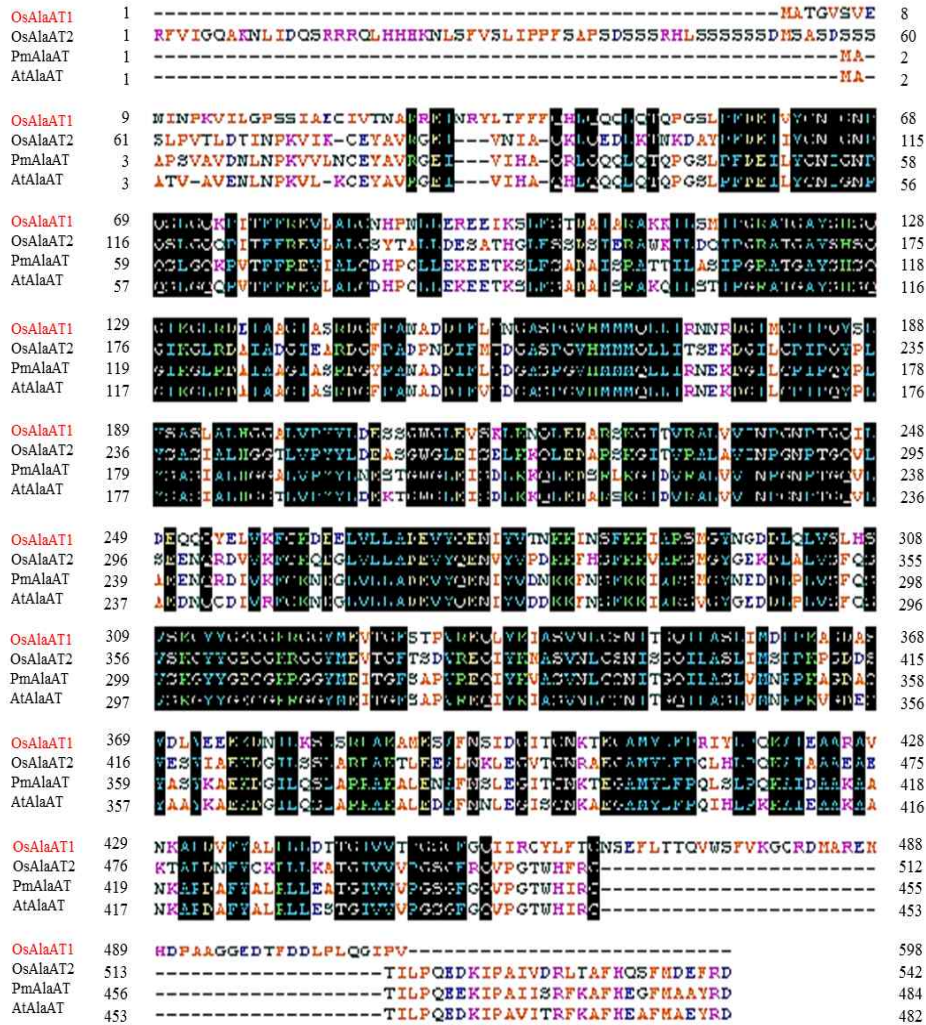


Fig. 2. Sequence alignment of the most highly conserved region of the *OsAlaAT1* homologues. The alignment was done using 'Genetyx'.

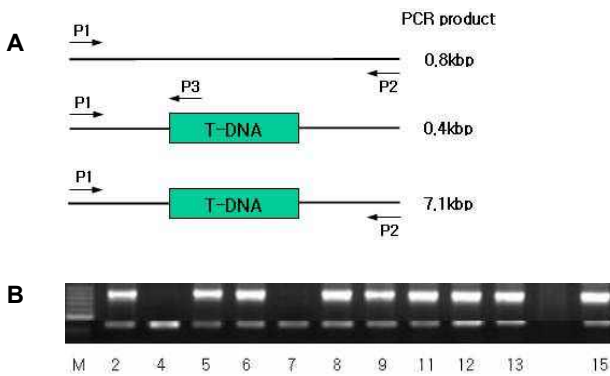


Fig. 3. The Comparison of *AlaAT* knock-out mutant genotype and GUS expression. (A) Schematic diagrams of genotyping; P1, forward primer in *AlaAT*; P2, reverse primer in *AlaAT*; P3, forward primer in T-DNA. (B) Eleven plants at T1 generation were showed their genotype by P1 and P2 primers (upper panel), or P1 and P3 primers (lower panel).

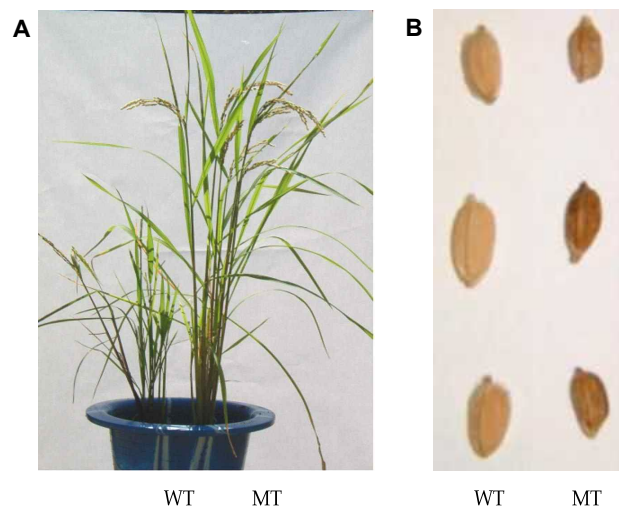


Fig. 4. Phenotypes of growth(A) and seed (B) in *alaat* and wild type.

미소체에 그 활성이 나타남이 보고된 바 있다[3]. 본 실험에서는 *AlaAT* 유전자가 T-DNA 삽입에 의해 깨어졌음에 따라 돌연변이체의 *AlaAT*의 활성이 잎 조직에서 어떻게 나타나는가를 보기 위하여 효소 활성을 측정하였다. 애기장대의 T-DNA 돌연변이체와 보리의 *AlaAT* 과다발현체를 이용한 연구에서 *AlaAT1*이 주된 *AlaAT* isozyme임을 보고된 바 있다[26]. Fig. 5의 결과에서 보듯이 대조구의 활성에 비하여 *alaat*에서는 거의 활성을 보이지 않았다(Fig. 5), 이와 같은 결과는 Fig. 2의 결과와 함께 T-DNA가 cytosolic *AlaAT* 유전자인 *csAlaAT1*에 삽입되어 *AlaAT*의 기능을 상실한 것으로 볼 수 있다.

**엽록소 형광 변화**

식물은 여러 가지 스트레스에 의해 유전자 발현 양상의 변화와 대사활동에 변화를 주어 성장과 생산에 영향을 미친다[6, 23]. 일반적으로 엽록소의 함량, 잎의 두께, 엽령에 따라 다소 차이는 있으나, 식물이 스트레스에 노출되면 광계II의 광화학적 활성이 저해되고 엽록소 a의 형광 kinetics가 변화되므로 형광값은 스트레스의 지표로 이용될 수 있다. *AlaAT*의 기능을 상실하였을 때 다양한 스트레스에 어떻게 적응하는지를 조사하기 위하여 90일간 재배한 *alaat*에 대하여 고염, 저온 및 건조 스트레스에 대한 광합성 효율의 변화를 엽록소 형광으로 대조구와 비교 측정하였다.

F<sub>0</sub>(초기 형광 값)의 변화는 24시간 고염, 건조 및 저온 처리 시 대조구나 *alaat* 모두에서 시간이 지남에 따라 F<sub>0</sub>의 증가를 보여주었으며(Fig. 6A), 광합성적 전자전달 능력의 척도로 PS II의 양자수율과 직접적으로 연관되어 있는 Fv/Fm 값은 대조구나 *alaat* 모두에서 동일하게 감소하는 양상을 보여주었다(Fig. 6B). Fv/Fm의 감소는 스트레스 처리 시 광계II의 광산화 엽록소-단백질 복합체의 손상에 의한 F<sub>0</sub>의 증가나 광계II 복합체의 손상에 의한 Fv (가변 형광값)의 감소 때문이다. 그러나 대조구와 *alaat*의 비교에서 성장의 경우는 큰 차이(Fig. 4)를 보여 주었으나, 스트레스에 대한 F<sub>0</sub> 및 Fv/Fm 값의 상대적인

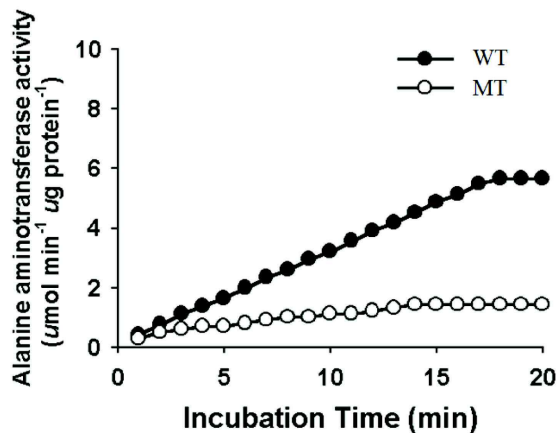


Fig. 5. *AlaAT* activities of wild type and *alaat* mutant.

차이를 보여주지 못하였다. 최근 GGAT 중 GGAT1은 광의존적 발현을 보이며 광호흡과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다[20]. 따라서 *alaat*의 *AlaAT* 불활성이 광합성능의 변화에 영향을 미치지 보다는 광호흡과 같은 다른 대사에 영향을 미쳐 성장에 관여할 가능성을 보여준다.

**POD의 활성측정 및 RT-PCR 분석**

식물은 다양한 스트레스에 의해 유전자 발현 양상의 변화를 가져올 뿐만 아니라 대사활동에 장애를 받아 성장과 생산에 영향을 받는다[6, 25]. Lee 등[23]은 고염 스트레스에 식물이 처했을 때 많은 항산화 효소들이 유도되는 것을 보고한 바 있다. 또한 스트레스에 의한 광합성능의 감소는 광계의 활성 저하에 따라 들뜬 에너지 처리능력이 저해되고, 이어서 활성산소의 생성을 촉진하는 산화적 스트레스를 유도한다고 보고된 바 있다[7]. 고염, 건조 및 저온 스트레스에서는 Fv/Fm이 감소하는 것(Fig. 6B)으로 보아 대조구와 *alaat* 둘 다 노화가 진행되고 있다고 볼 수 있다[11]. 본 연구에서는 *AlaAT*의 기능이 상실되었을 때 고염 스트레스에서 항산화 효소 중 하나인 peroxidase (POX)의 활성 변화 및 RT-PCR을 통해 발현 변화를 ascorbate peroxidase (APX)와 함께 조사하였다. NaCl을 처리하지 않은 무처리구에서의 POX 활성은 *alaat*에서 대조구의 60% 정도의 활성을 보였으며, NaCl 300 mM 처리 시 대조구에서는 무처리구에 비해 POD의 활성이 증가하나, *alaat*에서는 무처리구 보다 오히려 POD의 활성의 감소를 보였다(Fig. 7).

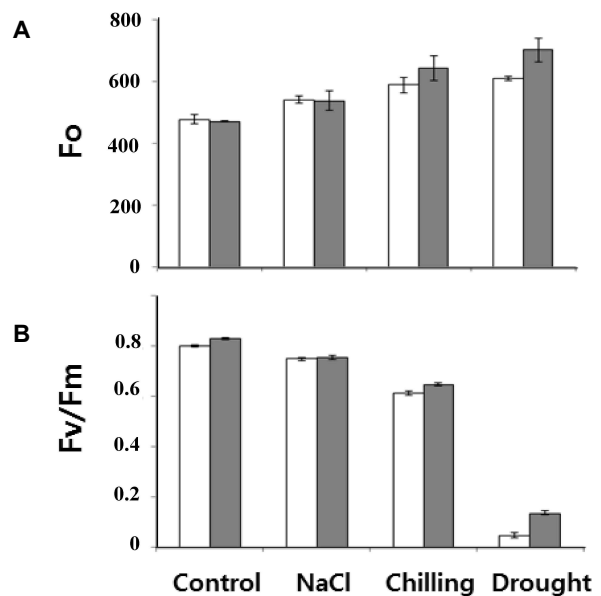


Fig. 6. (A) Changes of minimal fluorescence, F<sub>0</sub> in detached leaves of rice exposed to salt, chilling and drought stresses. (B) Changes of photochemical quantum yield, Fv/Fm in detached leaves of rice exposed to salt, chilling and drought stresses.

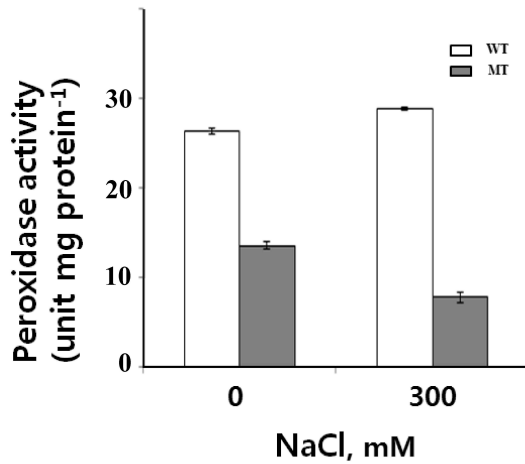


Fig. 7. POX activities of wild type (WT) and *alaat* mutant (MT) upon salt stress.

이 같은 결과는 AlaAT 기능의 상실이 대사장애를 일으킬 뿐만 아니라 항산화 효소 중 하나인 POD의 활성을 저해함으로써 생장의 억제(Fig. 4)에 기인할 것으로 생각할 수 있다.

또한 RT-PCR의 결과에서도 대조구에 비해 POD의 발현이 *alaat*에서는 고염 처리에서 거의 나타나지 않은 반면, 식물의 시토플, 스트로마, 틸라코이드, 미소체에 존재하면서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하는 또 다른 항산화 효소인 APX[1]의 경우 대조구나 *alaat* 모두 고염처리에서 크게 증가하는 동일한 양상을 보여주었다(Fig. 8). 또한 AlaAT mRNA 수준은 *alaat*에서는 AlaAT 활성(Fig. 5)에서 나타난 결과와 마찬가지로 거의 검출되지 않았으나 대조구에서는 큰 폭으로 증가 하였다(Fig. 8). 이는 고염 스트레스가 AlaAT의 발현을 촉진시킬 수 있음을 보여준다. 또한 cAPX 역시 고염 스트레스에 의해 발현이 촉진될 수 있음을 보여주나 AlaAT와는 무관함을 보여준다. POX2는 고염 처리 시 식물체내 생성이 증대되는 활성산소를 제거하기 위해 그 활성이 증가한다. 대조구에서 POX2 활성은 고염 처리 시 증가하였으나, *alaat*에서는 오히려 그 활성이 감소(Fig. 7)하였을 뿐 아니라, RNA 발현에서도 거의 검출되지 않았다(Fig. 8). 이는 AlaAT의 기능 결핍이 POX2의 발현에 영향을 미친다고 할 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합해 보면, AlaAT의 기능이 상실된 벼 돌연변이체는 생장의 저해뿐 아니라 생산성의 감소를 초래하였는데, 고염 스트레스에 대해 엽록소 형광 지표를 통한 광합성능의 변화는 대조구와 차이를 보이지 않았으며, 항산화 효소, 특히 POX의 활성 및 합성을 크게 감소시켰다. 따라서 벼 유식물에서 AlaAT 유전자 기능의 상실은 광합성능의 변화에 기인하기 보다는 광호흡이나 항산화 효소, 특히 POX 활성 및 합성의 저해와 같은 다른 대사에 영향을 미쳐 성장 및 생산성의 저하에 관여할 가능성을 보여준다.

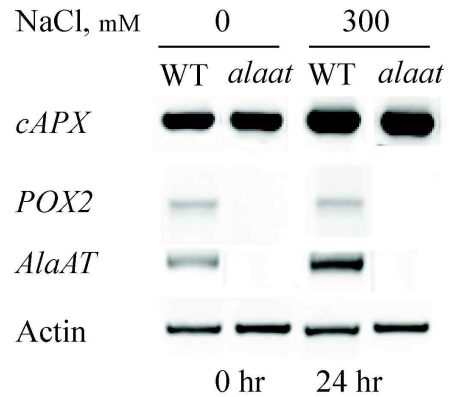


Fig. 8. Expression pattern of cytosolic APX, POX2 and AlaAT in wild type and *alaat* by salt treatment.

### 감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(2012R1A1A2007226)과 동의대학교 교내학술지원(2011AA102)으로 수행된 것임.

### References

- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant Physiol* **85**, 235-241.
- Bergmeyer, H. G. 1974. Methods of enzymatic analysis. pp. 2246-2248, 2th eds., Academic Press, New York.
- Biekmann, S. and Feierabend, J. 1982. Subcellular distribution, multiple forms and development of glutamate-pyruvate (glyoxylate) aminotransferase in plant tissues. *Mol Cell Res* **721**, 268-279.
- Chen, B. J., Wang, Y., Hu, Y. L., Wu, Q. and Li, Z. P. 2005. Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia*. *Plant Sci* **168**, 493-500.
- Chen, D. H. and Roland, P. C. 1999. A rapid DNA mini-preparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol Bio Reporter* **17**, 53-57.
- Choi, H. I., Kang, J. Y., Sohn, H. K. and Kim, S. Y. 2002. Development of stress-tolerant crop plants. *J Plant Biotech* **4**, 53-58.
- Choi, S. M., Jeong, S. W., Jeong, W. J., Kwon, S. Y., Chow, W. S. and Park, Y. I. 2002. Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light. *Planta* **216**, 315-324.
- Dumitru, I. F., Iordachescu, D. and Niculescu, S. 1970. L-Alanine: 2-oxoglutarate-aminotransferase chromatographic purification and crystallization of the enzyme from seeds of *Glycine hispida* var Cheepeura.. *Rev Roum Biochim* **7**, 31-44.
- Edwards, M. R., Gilroy, F. V., Jimenez, B. M. and O'Sullivan, W. J. 1989. Alanine is a major end product of metabolism

- by *Giardia lamblia* a proton nuclear magnetic resonance study. *Mol Biochem Parasitol* **37**, 19-26.
10. Fukao, Y., Hayashi, M. and Nishimura, M. 2002. Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **43**, 689-696.
  11. Genty, B., Briantais, J. and Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim et Biophys Acta* **990**, 87-92.
  12. Good, A. G. and Crosby, W. L. 1989. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol* **90**, 1305-1309.
  13. Good, A. G. and Muench, D. G. 1993. Long-term anaerobic metabolism in root tissue (metabolic products of pyruvate metabolism). *Plant Physiol* **101**, 1163-1168.
  14. Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B. A. and Ben-Hayyim, G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta* **203**, 460-469.
  15. Han, J. J. and An, J. 2003. Flower-preferential poly(A) binding (PAB) protein gene from rice. *Plant Sci* **165**, 103-112.
  16. Horton, P. and Hague, A. 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts, IV, Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim et Biophys Acta* **932**, 107-1153.
  17. Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. and Ohsumi, C. 2003. Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. *Plant J* **33**, 975-987.
  18. Jeong, D. H. An, S. Kang, H. G., Moon, S., Han, J. J., Park, S., Lee, H. S., An, K. and An, G. 2002. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol* **130**, 1636-1644.
  19. Jung, K. H., Hur, J., Ryu, C. H., Choi, Y., Chung, Y. Y., Miyao, A., Hirochika, H. and An, G. 2003. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol* **44**, 463-472.
  20. Kendziorek, M., Paszkowski, A. and Zagdan'ska, B. 2012. Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Cell Rep* **31**, 1105-1117.
  21. Lee, C. B., Rees, D. and Horton, P. 1990. Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the green alga *Dunaliella*. *Photosyn Res* **24**, 167-173.
  22. Lee, C. S., Kim, J. Y., Kim, S. H., Kim, S. J., Kang, L., Han, S. K., Choi, H. S., Jeong, D. H., An, G. H. and Kim, S. R. 2004. Trapping and characterization of cold-responsive genes from T-DNA tagging lines in rice. *Plant Sci* **166**, 69-79.
  23. Lee, D. H., Kim, Y. S. and Lee, C. B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* **158**, 737-745.
  24. Liepman, A. H. and Olsen, L. J. 2003. Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**, 215-227.
  25. Menezes-Benavente, L., Teixeira, F. K., Kamei, C. L. A. and Margis-Pinheiro, M. 2004. Salt stress altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* **166**, 323-331.
  26. Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K. P. and Good, A. G. 2007. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **49**, 1108-1121.
  27. Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R. and van Dongen, J. T. 2010. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**, 1501-1513.
  28. Rocha, M., Sodek, L., Licausi, F., Hameed, M. W., Dornelas, M. C. and van Dongen, J. T. 2010. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. *Amino Acids* **39**, 1043-1053.
  29. Shrawat, M., Carroll, R. T., DePauw, M., Taylor, G. J. and Good, A. G. 2008. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of *alanine aminotransferase*. *Plant Biotech J* **6**, 722-732.
  30. Son, D., Kobe, A. and Sugiyama, T. 1992. Nitrogen dependent regulation of the gene for alanine aminotransferase which is involved in the C4 pathway of *Panicum miliaceum*. *Plant Cell Physiol* **33**, 507-509.
  31. Sousa, C. A. F. and Sodek, L. 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environ Exp Bot* **50**, 1-8.
  32. Subbaiah, C. and Sachs, M. 2003. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Ann Bot* **90**, 119-127.
  33. Wilson, D. G., King, K. W. and Burris, R. H. 1954. Transaminase reactions in plants. *J Biol Chem* **208**, 863-874.

---

초록 : 알라닌 아미노기전이효소가 상실된 벼(*Oryza sativa* L.) 돌연변이체의 고염 스트레스에 대한 반응

임경남 · 이진범\*

(동의대학교 분자생물학과)

T-DNA가 표지된 집단에서 *AlaAT* 유전자가 깨어진 돌연변이체(*alaat*)를 분리하고, *AlaAt1* 특이 프라이머를 이용하여 유전자형을 결정하였다. *Alaat*의 표현형은 대조구와 비교해서 생장의 감소를 보였고, 종자 역시 작고 생산성의 감소를 보였다. 돌연변이체의 *AlaAT* 활성은 거의 검출되지 않았다. 고염 스트레스 하에서 *alaat*의 반응을 엽록소 형광과 항산화 효소들의 활성 및 RT-PCR을 이용하여 대조구와 비교하였다. 고염, 건조 및 저온과 같은 모든 비생물적 스트레스에 대한 *Fv/Fm*은 대조구와 *alaat* 둘 다 감소를 보였으며, 비생물적 스트레스에 대한 엽록소 형광은 거의 유사하였다. 항산화 효소인 peroxidase (POX)의 활성은 고염 스트레스에 의해 대조구는 증가하나 *alaat*에서는 오히려 감소하였다. RT-PCR에 의한 *cAPX*, *POX* 및 *AlaAT* mRNA의 수준을 분석한 결과, 효소 활성과 마찬가지로 *AlaAt* mRNA는 *alaat*에서 나타나지 않았고, *POX2* mRNA는 대조구는 약간의 증가를 보이나 *alaat*는 거의 검출할 수 없었다. *cAPX* mRNA는 대조구와 *alaat* 모두 고염 스트레스에 의해 크게 증가하였다. 이 같은 결과는 *AlaAT* 유전자 기능의 상실은 염 스트레스 하에서 벼 식물의 생장에 대해 광합성능 보다는 항산화 효소, 특히 *POX* 활성 및 합성을 변화시킬 수 있음을 제안한다.