

T0007663

G0VP1200628648

최 종
연구 보고서

Yeast two hybrid와 SRS를 이용한
식물바이러스인자 표적 발굴 및 응용

고 려 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Yeast two hybrid와 SRS를 이용한 식물바이러스인자 표적 발굴 및 응용”에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 07 월 14 일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 백 경 화

연 구 원 : 김 민 정

연 구 원 : 김 기 정

연 구 원 : 최 수 복

연 구 원 : 한 상 재

연 구 원 : 김 화 란

요 약 문

I. 제 목

Yeast two hybrid와 SRS를 이용한 식물바이러스인자 표적 발굴 및 응용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

물체는 외부로부터의 병원체 공격에 다양한 조절유전자와 이에 상응하는 effector 유전자들로 구성되는 여러 경로의 신호전달체계를 통하여 대응한다. 지난 몇 년 동안 이와 관련된 많은 방어관련 유전자가 밝혀졌고 특히 *Arabidopsis*에서 얻어진 돌연변이체를 이용한 유전적분석방법이 이런 유전자들의 기능 탐구에 많은 기여를 하였다. 그러나 아직도 전체 식물-병원균상호작용과정을 통합적으로 설명할 수 있는 모델은 정립이 되어 있지 못하다. 따라서, 본 연구에서는 식물바이러스와 상호 작용하는 식물인자를 탐색하고 선발된 인자를 형질 전환 식물로 제작하여 병 발생 기작을 검증함으로써 병 저항성 식물 개발의 발판을 마련하는 것을 최종목표로 하고 있다. 이를 위해 본 연구에서는 yeast two-hybrid system과 더 나아가 yeast two hybrid system의 단점을 보완한, 단백질이 modification되어 있는 상태에서도 상대 상호 작용하는 단백질을 찾을 수 있는 SOS recruitment system (SRS)을 이용하여 우선 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*, CMV)의 1a가 interaction을 하는 host factor를 분리해 내고, 분리해 낸 유전자들을 종합적으로 분석하여 바이러스의 replication을 이해하고, 이를 바탕으로 바이러스의 replication을 저해하는 작물체를 만들 수 있는 근거를 마련하고자 한다. CMV의 경우 기존에 마땅히 알려진 저항성 유전자내지는 CMV replication 관련 유전자 source가 알려져 있지 않기 때문에 상기 방법을 적용하는 것이 유용할 전망이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) CMV의 replicase와 상호 작용하는 인자 선발을 위한 system 구축
- 2) 구축된 system을 이용하여 CMV 병 발생과 관련되는 상호작용 인자선발
- 3) 선발된 유전자들에 대한 다양한 분자 생물학적 분석
- 4) 모델 식물인 *Arabidopsis plant*에 형질 전환하여 선발된 유전자들에 대한 기능 예측
- 5) 실용작물에의 도입으로 분자유종 중간 모본 획득 및 신규기능 부여

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자를 선발하기 위한 yeast two-hybrid와 SRS system을 구축하여 44개의 유전자를 분리하였다. 분리된 유전자 중 4개에 대하여 담배, *Arabidopsis*에서 5개의 full-length cDNA clones (*NtTLP1*, *Tcoi1*, *Tcoi2*, *AtCOIK*, *Tsip1*)을 찾았으며 유전자 특성을 연구 하였다. 그리고 이 중 3개의 유전자를 GenBank에 등록하였다. ; *NtTLP1* (AY745249), *Tcoi1* (AY391749)와 *Tcoi2* (DQ202472).

- 분리된 CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 중 2개가 특성 연구를 거쳐 형질 전환 모델 식물에서의 바이러스복제 변이 테스트를 위해 선발되었다. 2종의 형질 전환 모델 식물체에서의 항바이러스 테스트 결과, *NtTLP1* 유전자가 항바이러스성을 증가시킴을 확인 할 수 있었고 *Tcoi1*은 CMV 1a 단백질의 메틸화를 유도하여 바이러스 증식에 도움을 줌을 확인하였다.

- 항바이러스에 관여하는 유전자인 *NtTLP1*은 모델 작물인 담배와 유용 작물인 토마토의 형질 전환에 이용되었고, 바이러스 증식에 관여하는 *Tcoi1*은 담배의 형질 전환에 이용되었다. 또한 바이러스 증식에 관여 할 것으로 예상 되는 *AtCOIK*는 *Arabidopsis*의 형질 전환에 이용되었다. 형질 전환 담배는 *NtTLP1*에 대하여 센스 라인 5종과 안티센스 라인 5종, *Tcoi1*에 대하여 센스 라인 7종과 안티센스 라인 7종을 얻었으며 이 중 RT-PCR 또는 western blotting을 통해, 도입된 유전자가 과발현 또는 발현이 저해 되는 *NtTLP1* 센스 라인 2종과 안티센스 라인 1종, *Tcoi1* 센스 라인 5종과 안티센스 라인 5종을 얻었다. 또한 *NtTLP1*에 대하여 센스 라인 12종과 안티센스 라인 3종의 형질 전환 토마토를 얻었으며 *AtCOIK*가 과발현 되는 28종의 *Arabidopsis* 형질전환체를 얻었다.

- CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 연구와 이로부터 습득된 연구 기술의 응용을 통해 3건의 SCI 등재 국제 학술지에 발표하였으며 3건의 특허 출원을 하였다. 게재되었거나 예정인 3건의 논문 및 특허 출원은 다음과 같다;

-저널

- ① Plant Mol. Biol (2005), 59(6):981-94
- ② Biochem Biophys Res Commun. (2006), (1):228-35
- ③ J of General Virology (2006) in press

-특허 출원

- ① 니코티아나 타바킴으로부터 분리한 *NtTLP1*을 포함한 오이모자이크바이러스에 대한 항바이러스제 (출원번호: 10-2005-0033667)
- ② 오이모자이크 바이러스 증식 관련 단백질과 상호작용 하는 신규한 메틸트랜스퍼라제 유전자 (출원번호: 10-2006-0052210)
- ③ 오이모자이크 바이러스 증식 관련 단백질과 상호작용 하는 신규한 인산화효소 유전자 (출원번호: 10-2006-0052212)

SUMMARY

The cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV) is a member of the family *Bromoviridae*. Unlike most plant viruses, CMV has a very broad host range and the replication is membrane associated. The CMV-encoded 1a protein has been implicated to play a role in replication of the viral genome along with 2a and one or more host factors. To identify the host cell factors interacting with CMV 1a, we used the yeast two-hybrid system using tobacco cDNA library. Initially fourteen candidate genes were isolated. Among the candidate genes, three *Nicotiana tabacum* *thaumatin-like protein 1* (*NtTLP1*), *Tcoi1* (*Tobacco CMV 1a interacting protein 1*) and *Tcoi2* (*Tobacco CMV 1a interacting protein 2*) were selected for further study.

NtTLP1 is homologous to the plant *TLP* gene encoding a member of the PR-5 group of PR proteins. The recombinant GST-NtTLP1 protein, which was expressed and purified in *E. coli*, bound tightly to CMV 1a *in vitro*. *In planta* interaction was also verified via co-immunoprecipitation. Additionally, NtTLP1 specifically interacted with the CMV movement-related proteins, movement protein (MP) and coat protein (CP), in yeast. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed that the expression of *NtTLP1* increased as the result of CMV inoculation.

We have identified a novel methyltransferase that interacts with the CMV 1a protein and designated as *Tcoi1*. Consistent with this observation, bacterially expressed and purified recombinant GST-Tcoi1 protein bound tightly to CMV 1a *in vitro* and GST-Tcoi1 directly methylated the two separated domain of CMV 1a; methyltransferase (MT) domain and helicase (Hel) domain. RT-PCR analysis showed that the expression of *Tcoi1* was increased by CMV inoculation. The *Tcoi1* antisense transgenic plants showed reduced accumulation of CMV RNA 3. These results suggest that *Tcoi1* controls CMV propagation through an

interaction with the CMV 1a protein.

One of the cDNA clones encoded a protein homologous to the *Arabidopsis* putative protein kinase and was designated *Tcoi2*. *Tcoi2* specifically interacted with MT domain of CMV 1a protein in yeast cell. *In vitro* analyses using recombinant proteins showed that *Tcoi2* also specifically interacted with CMV 1a MT domain. *Tcoi2* did not have autophosphorylation activity but phosphorylated CMV 1a MT domain. Analysis of the subcellular localization of the *Tcoi2* fused to GFP demonstrated that it is targeted to the endoplasmic reticulum (ER). These results suggest *Tcoi2* as a novel host factor that is capable of interacting and phosphorylating MT domain of CMV 1a protein.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY.....	2
CONTENTS.....	7
Chapter 1. The Outline of Research.....	11
Section 1. The aim of research	11
1. Technical aspects.....	11
2. Economic and industrial aspects.....	12
3. Social and culture aspects.....	13
Section 2. The need for research.....	14
Chapter 2. Current Technical Status and Problem Analysis.....	15
Section 1. The outside technical status.....	15
Section 2. The inside technical status.....	16
Chapter 3. The Results of Research.....	17
Section 1. Introduction.....	17
Section 2. Isolation of host factors interacting with CMV replicase by using yeasttwo-hybrid system and Sos recruitment system.....	18
Section 3. Characterization of host factors intercting with CMV replicase.....	24
1. NtTLP1.....	24
2. Tcoil.....	34
3. Tcoi2.....	43
4. AtcoiK.....	51

5. Tsipl.....	55
Section 4. Generation of Transgenic Plants Including Useful Crops.....	57
1. Tobacco.....	57
2. Tomato.....	58
3. Arabidopsis.....	59
Section 5. Molecular Analysis of Interacting Partners.....	61
1. <i>NtTLP1</i> and CMV replication.....	61
2. <i>NtTLP1</i> and TMV replication.....	62
3. <i>Tcoi1</i> and CMV replication.....	63
4. <i>Tcoi1</i> and CMV infectivity.....	64
Chapter 4. The Research Goal Accomplishment and Contributions to the Related Research Field.....	66
Section 1. Research Goal Accomplishment.....	66
Section 2. Contributions to the related research field.....	66
Chapter 5. Utilization of Research Products.....	68
Chapter 6. Collection of Useful Information.....	69
Chapter 7. References.....	72

목 차

제 출 문.....	1
요 약 문.....	2
I. 제 목.....	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성.....	2
III. 연구개발 내용 및 범위.....	2
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의.....	3
SUMMARY.....	5
CONTENTS.....	7
목 차.....	9
제 1 장 연구개발과제의 개요.....	11
제 1 절 연구개발의 목적.....	11
1. 기술적 측면.....	11
2. 경제·산업적 측면.....	12
3. 사회·문화적 측면.....	13
제 2 절. 연구 개발의 필요성 및 범위.....	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	15
제 1 절 국외 연구 기술 현황.....	15
제 2 절 국내 연구 기술 현황.....	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	17
제 1 절 서설.....	17
제 2 절 Yeast two hybrid와 SRS 체제에 CMV replicase 적용으로 상호작용 식 물표적유전자 발굴.....	18
1. CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자를 선별하기 위한 yeast	

two-hybrid와 SRS system 구축.....	18
2. CMV replicase 단백질들의 상호작용인자 선발을 위한 library construction.....	20
3. CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 선발.....	21
제 3 절 CMV replicase 상호작용 표적유전자의 발현 및 기능분석.....	24
1. NtTLP1.....	24
2. Tcoi1.....	34
3. Tcoi2.....	43
4. AtcoiK.....	51
5. Tsipl.....	55
제 4 절 형질전환 식물체의 개발.....	57
1. 담배.....	57
2. 토마토.....	58
3. <i>Arabidopsis</i>	59
제 5 절 선발된 유전자와 CMV replicase 간의 상관관계 규명.....	61
1. <i>NtTLP1</i> 유전자와 CMV replication 간의 상관관계.....	61
2. <i>NtTLP1</i> 유전자와 TMV replication 간의 상관관계.....	62
3. <i>Tcoi1</i> 유전자와 CMV replication 간의 상관관계.....	63
4. <i>Tcoi1</i> 유전자와 CMV infectivity 간의 상관관계.....	64
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	66
제 1 절 목표달성도.....	66
제 2 절 관련분야에의 기여도.....	66
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	68
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	69
제 7 장 참고문헌.....	72

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

1. 기술적 측면

식물체는 외부로부터의 병원체 공격에 다양한 조절유전자와 이에 상응하는 effector 유전자들로 구성되는 여러 경로의 신호전달체계를 통하여 대응한다. 지난 몇 년 동안 이와 관련된 많은 방어관련 유전자가 밝혀졌고 특히 *Arabidopsis*에서 얻어진 돌연변이체를 이용한 유전적분석방법이 이런 유전자들의 기능 탐구에 많은 기여를 하였다. 그러나 아직도 전체 식물-병원균상호작용과정을 통합적으로 설명할 수 있는 모델은 정립이 되어 있지 못하다. 우선 커다란 이유는 첫 번째로, 표현형분석만으로 특정한 유전자를 특정한 신호전달 pathway에 지정을 하기가 어렵다는 것이고 두 번째는, 최근에 microarray등을 통해 쏟아져 나오는 data를 기존의 conventional방법으로 다 처리하기가 불가능하다는 점이다. 본 연구에서는 식물바이러스와 상호 작용하는 식물인자를 탐색하고 선발된 인자를 형질 전환 식물로 제작하여 병 발생 기작을 검증함으로써 병 저항성 식물 개발의 발판을 마련하는 것을 최종목표로 하고 있다. 즉, 식물바이러스의 복제, 전파를 담당하는 유전자의 산물과 상호 작용하는 식물유래 인자를 유전자수준에서 찾아내고, 이들의 식물체 내에서의 유전적 단계에서의 작용 및 바이러스와의 상호작용을 이해하여 신호전달체계를 심도 있게 파악하고 이를 바탕으로 더 나아가 병 저항성 유용작물 생산의 발판을 만들어 내는 것이다. 이를 위한 기본적인 아이디어는 병원균 유래 단백질과 식물유래 단백질과의 긴밀한 상호작용을 밝히는 것이다. 지구상의 거의 모든 주요 생명 현상에 있어서 protein-protein interaction은 필수적이라 할 수 있다. 그러므로, 어떤 특정 단백질의 작용을 이해하고 특히 신호전달체계 파악을 위해서는 상호작용을 할 것이라 추정되는 단백질을 연구하는 것이 매우 중요한 일이라 할 수 있다. 이러한 것들을 생각해 보면, 식물체에 바이러스가 감염하는데 있어서 바이러스의 특성상 바이러스가 생산해 내는 단백질이 host에 존재하는 어

면 factor들과 상호작용을 하여 바이러스의 기주 특이성, 이동, 증식 등을 결정할 것이라 생각된다. 본 연구의 대상인 오이 모자이크 바이러스 (*Cucumber mosaic virus*; CMV)는 Bromoviridae에 속하는 cucumovirus group의 type member로서 1916년에 오이와 머스크멜론의 병원체로서 처음 보고된 이래 식물 바이러스 중에서 가장 숙주 범위가 넓고 (약1,000여종의 식물체에 감염) 특이하게 segmented genome (RNAs1, 2, 3 and subgenomic RNA4, RNA4A)을 이루고 있는 바이러스이다. 이중 RNA1이 encoding하고 있는 1a 단백질은 sequence 분석 결과 N-terminal부분은 methyltransferase domain을, C-terminal부분은 helicase domain을 coding하는 것으로 나타났다. 이 1a 단백질은 바이러스의 replication에 관여할 것으로 여겨지고, cellular protein과 complex를 이룰 것으로 생각되어지고 있다. 또 RNA2가 encoding 하고 있는 2a 단백질은 전형적인 RNA-dependent RNA polymerase로써 CMV의 replication에 주요한 역할을 할 것이라 추정되고 있다. 그러나, 이런 식물 바이러스 단백질들과 상호 작용하는 인자에 대한 구체적인 보고는 많지 않은 실정이다. 그러므로, 바이러스 단백질과 상호 작용하는 인자들을 선별하게 된다면, 그 인자들은 바이러스증식, 병 발생, 나아가 식물 병 저항성 기작에 어떻게 관여하는지 복잡한 회로를 푸는 중요한 단서가 될 전망이다. 따라서, 본 연구에서는 yeast two-hybrid system과 더 나아가 yeast two-hybrid system의 단점을 보완한, 단백질이 modification되어 있는 상태에서도 상대 상호 작용하는 단백질을 찾을 수 있는 SOS recruitment system (SRS)을 이용하여 우선 CMV의 1a 및 2a가 interaction을 하는 host factor를 분리해 내고, 분리해 낸 유전자들을 종합적으로 분석하여 바이러스의 replication을 이해하고, 이를 바탕으로 바이러스의 replication을 저해하는 작물체를 만들 수 있는 근거를 마련하고자 한다. CMV의 경우 기존에 마땅히 알려진 저항성 유전자내지는 source가 알려져 있지 않기 때문에 상기 방법을 적용하는 것이 유용할 전망이다.

2. 경제·산업적 측면

미래의 생명공학산업은 막강한 부의 가치를 지니고 있고 벌써 국내제약, 의약계통은 막대한 loyalty를 지불하고 있는 형편이다. 이러한 상황에서 외래 농산물의 대량 저가 유입은 농가소득경제에 막대한 영향을 미치고 영세성의 국내 종자 생산업체의 생존을 위협하는 수위까지 와있다. 실제로 이미 많은 국내종묘회사들이 다국적 기업화 된 상태이다. 따라서 국제적인 경쟁력을 가지려면 고부가가치 작물, 고수확 작물 및 그 종자의 개발이 필수적이다. 특히, 일본의 장기신용은행과 미국의 Sheet

사는 농업과 식품분야의 생물제품이 2000년대의 생물공학산물의 주축을 이룰 것으로 예측하고 있다 (농업 85.5 - 2,187억\$, 식품 126,6억\$). 이러한 상황에 맞추어 보면 고품질, 고부가가치의 주요 원예작물의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 1999년 말 이후로 쌀 시장의 완전개방, 지적재산권의 보호 등 더 이상 외국농산물에 대한 방패막이가 없고 완전한 개방의 시대로 접어들 전망이다. 이러한 때에 농업분야에도 신 경영개념을 도입하여 고효율, 고부가가치의 농작물을 개발하는 것이 시급하다.

- 과학 선진국에서는 이미 여러 작물에 대한 유전자지도를 바탕으로 병 관련 특이적 유전자의 분리 및 식물의 병 저항성 기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 식물의 이차대사산물 및 식물방어관련 유전자를 분리하여 기능분석 및 발현분석에 관한 연구가 지속적으로 수행되고 있다.

- 유전자 조작기술에 의한 새로운 품종의 개발에 관한 연구는 고부가가치, 생산성 향상 및 노동력 절감 등 미래지향적 농업발달에 일익을 담당할 수 있을 것이다.

- 새로운 기능을 갖는 작물의 유전자 및 이를 이용한 활용기술 개발 또 지적 재산권 화에 국제적으로 경쟁이 치열해지고 있다.

- 식물고유기능의 유전자 확보 및 이용기술이 21세기 농업에 주된 부가가치를 지니는 자원으로 활용될 것이 예측된다.

- 21세기의 농업경쟁력은 우수한 유전자원, 고유기능의 유전자, 그리고 이들의 지적 재산권 확보가 가장 중요한 요소로 등장할 것으로 예측된다.

3. 사회·문화적 측면

개방시대를 맞아 우리 농업이 해결해야 할 많은 과제가 있지만 유전자 조작 기술에 의한 신품종개발 및 유용물질 대량생산연구는 원예작물의 품종 개발을 통한 고부가가치화, 생산성 향상, 노동성 절감 등 농촌 및 농업 기반 보전에 일익을 담당할 수 있다. 또한, 신품종창출을 통한 신소재개발 핵심공동기반기술의 국내기반구축과 국내 개발신소재의 국제시장진출을 통한 기술 신 한국인으로서의 자긍심을 견지할 수 있다. 부가가치가 높은 농작물의 개발을 이루기 위해서는 유용물질 생산 작물의 가능성이나 농작물에 피해를 주는 virus 방어체계를 탐구할 수 있는 등의 생명 공학적 연구가 필요하다. 이는 현재와 같은 상황 하에서 수동적인 방어의 자세에서 현상을 유지하려는 것보다 장래를 위한 투자라는 좀 더 능동적인 자세로의 변환을 의미한다. 침체된 사회에 생명과학 기술의 개발이라는 21세기 고부가가치 미래 산업에 확대 투자하는 것은 오히려 현재의 위기를 극복할 수 있는 기회로 삼게 되는 사회적 가치의 공감대를 형성하게 될 것이다.

제 2 절. 연구개발의 필요성 및 범위

식물체는 외부로부터의 병원체 공격에 다양한 조절유전자와 이에 상응하는 effector 유전자들로 구성되는 여러 경로의 신호전달체계를 통하여 대응한다. 지난 몇 년 동안 이와 관련된 많은 방어관련 유전자가 밝혀졌고 특히 *Arabidopsis*에서 얻어진 돌연변이체를 이용한 유전적분석방법이 이런 유전자들의 기능 탐구에 많은 기여를 하였다. 그러나 아직도 전체 식물-병원균상호작용과정을 통합적으로 설명할 수 있는 모델은 정립이 되어 있지 못하다. 우선 커다란 이유는 첫 번째로, 표현형분석만으로 특정한 유전자를 특정한 신호전달 pathway에 지정을 하기가 어렵다는 것이고 두 번째는, 최근에 microarray등을 통해 쏟아져 나오는 data를 기존의 conventional방법으로 다 처리하기가 불가능하다는 점이다. 본 연구에서는 식물바이러스와 상호 작용하는 식물인자를 탐색하여 바이러스 병발현 및 병저항성 작용기작을 연구하기 위하여 그와 관련 된 유전자들을 확인하고 이들을 분리 하여 그 기능을 밝혀내고자 하였다. 이를 위하여 yeast two hybrid system과 더 나아가 yeast two hybrid system의 단점을 보완한, 단백질이 modification되어 있는 상태에서도 상대 상호 작용하는 단백질을 찾을 수 있는 SOS Recruitment system (SRS)을 이용하여 우선 기존에 마땅히 알려진 저항성유전자내지는 source가 알려져 있지 않는 CMV와 interaction을 하는 host factor를 분리해 내고, 분리해 낸 유전자들을 종합적으로 분석하여 바이러스의 replication을 이해하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국외 연구 기술 현황

GMO 재배면적의 증가는 급속도로 증가하고 있고, GMO의 재배 국가수도 6개국에서 13개국으로 늘어났고 2002년도에는 GMO작물의 유해없는 풍작도 보고 되었다[Source: Clive James, Global review of commercialized transgenic crops, ISAAA, 2002].

또한 미국 National Science Foundation (NSF)에서는 2010 Project에 초기 4년간 \$43.8 million에 달하는 돈을 총28개의 과제를 선정하여 지급할 야심 찬 계획을 시작하였다. 이 2010 Project의 목적은 postgenomics의 시대에 걸맞게 *Arabidopsis*의 25,000여개 유전자의 기능을 향후 10년에 걸쳐 다 밝혀내겠다는 것이다 [Source: <http://www.nsf.gov/bio/pubs/awards/2010fy01.html>]. 즉, 식물분야의 biotechnology 가능성을 충분히 인식하고 이제는 유전자의 기능을 밝히는데 총력을 기울이겠다는 것이다.

한편 식물의 병저항성기작 측면에서는 각종 질병의 침투과정과 receptor 등 신호전달 과정의 분자생물학적 연구가 활발하다. 이러한 연구 분야는 특히 *Arabidopsis*와 벼의 genome sequencing에 따른 분자계놈분석에 힘입어, 각종 작물의 저항성유전자군 (R gene cluster)들이 속속 mapping되는 등 획기적인 발전이 거듭되고 있다. 세계유수의 연구기관 뿐 아니라 다수의 종자 및 생명공학회사들도 이러한 추세에 따라 genomics 연구에 과감한 투자를 감행하고 있으며, 궁극적으로 주요작물의 병저항성유전자의 지적소유권을 확보하기 위해 이미 치열한 경쟁을 벌이고 있다.

최근 연구가 활발한 세계적 research group으로는 다음을 들 수 있다.

- (1) Roger Beachy (Donald Danforth Plant Science Center, St Louis, MO, USA): 1986년 최초로 담배모자이크바이러스 피복단백질의 cDNA를 담배에 형질전환 함으로써 바이러스저항성식물체를 개발. 현재 분자생물학적인 방법으로 식물에 바이러스저항성을 부여하는 연구와 담배모자이크바이러스의 이동기작규명 등에 주력.
- (2) Xinnian Dong (Duke University, Durham, North Carolina, USA): 병원성 세균에 대한 식물 방어 기작 연구, 특히 SA (Salicylic acid)와 유전학을 통한 SAR (Systemic acquired resistance) 조절 인자 연구에 초점.
- (3) Jeff Dangl (The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North

Carolina, USA): 병원균과 식물 방어 기작과 병 발생 반응과의 관계 규명 및 식물 병 저항성 반응에서 cell death의 의미 연구.

(4) David Baulcombe (Sainsbury Laboratory, Norwich, UK): 감자바이러스X(potato virus X, PVX)를 이용한 벡터개발 및 gene silencing에 의한 바이러스저항성기작의 규명에 주력.

(5) Greg Martin (Cornell Univ., Ithaca, NY, USA): 토마토의 bacterial speck disease 저항성유전자인 Pto를 map-based cloning방법으로 최초로 클로닝. Pto와 interaction하는 protein을 yeast two hybrid system을 이용하여 발견함으로써 식물병저항성의 신호전달경로 연구에 공헌.

제 2 절. 국내 연구 기술 현황

1980년 이후 시작된 한국의 유전공학 분야는 그간 괄목할만한 성장을 보였다. 그러나 식물분야에서는 특히 기초연구의 부재와 형질전환방법 및 활용유전자의 고유성 결여로 인해 산업화와 직접 연결될 수 없는 취약성을 갖고 있었다. 병저항성 및 환경내성, 혹은 병원체 인식과 신호전달과정에 관여하는 것으로 알려진 유용유전자의 분리, 특성규명 및 발현양상에 대한 연구는 현재 일천한 상태이다. 그러나 국내에서도 대학 및 연구소의 몇몇 실험실에서 관련연구를 수행하고 있어 기반은 마련된 상태라 할 수 있다. 선진국과 비교할 때 국내의 관련산업은 최근에는 벤처기업이 등장하고 있지만 중소기업인 종묘산업이 주종을 이루고 있고 최근에는 외국의 종묘회사들이 이들을 합병함으로써 산업구조가 취약한 상황이다. 우리나라는 채소작물 등에서 이미 상당한 수준의 육종기술과 유전자원을 확보하고 있으나, 농업적으로 주요한 환경내성, 내병성 등의 유전자 분리개발 및 품종육성은 미흡한 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 서설

물체는 외부로부터의 병원체 공격에 다양한 조절유전자와 이에 상응하는 effector 유전자들로 구성되는 여러 경로의 신호전달체계를 통하여 대응한다. 그러나 아직도 전체 식물-병원균상호작용과정을 통합적으로 설명할 수 있는 모델은 정립이 되어 있지 못하다. 따라서, 본 연구의 목적은 식물바이러스와 상호 작용하는 식물인자를 탐색하고 선발된 인자를 형질 전환 식물로 제작하여 병 발생 기작을 검증함으로써 병 저항성 식물 개발의 발판을 마련하고자 하는데 있다. 이에 따라, 본 연구에서는 yeast two-hybrid system과 SOS recruitment system (SRS)을 구축하였고 이를 이용하여 CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 44개의 유전자를 분리하였다.

분리된 유전자 중 4개에 대하여 담배, *Arabidopsis*에서 5개의 full-length cDNA clones (*NtTLP1*, *Tcoil*, *Tcoil2*, *AtCoiK*, *Tsip1*)를 찾았으며 유전자 특성을 연구 하였다. 분리된 CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 중 2개가 특성 연구를 거쳐 형질 전환 모델 식물에서의 항바이러스 부여 테스트를 위해 선발되었다. 2종의 형질 전환 모델 식물체에서의 항바이러스 테스트 결과, *NtTLP1* 유전자가 항바이러스를 증가시킴을 확인할 수 있었고 *Tcoil*은 CMV 1a 단백질의 메틸화를 유도하여 바이러스 증식에 도움을 줌을 확인하였다.

항바이러스에 관여하는 유전자인 *NtTLP1*은 모델 작물인 담배와 유용 작물인 상치 및 토마토의 형질 전환에 이용되었고, 바이러스 증식에 관여하는 *Tcoil*은 담배의 형질 전환에 이용되었다. 또한 바이러스 증식에 관여 할 것으로 예상 되는 *AtCOIK*는 *Arabidopsis*의 형질 전환에 이용되었다. 형질 전환 담배는 *NtTLP1*에 대하여 센스 라인 5종과 안티센스 라인 5종, *Tcoil*에 대하여 센스 라인 7종과 안티센스 라인 7종을 얻었으며 이 중 RT-PCR 또는 western blotting을 통해, 도입된 유전자가 과발현 또는 발현이 저해 되는 *NtTLP1* 센스 라인 2종과 안티센스 라인 1종, *Tcoil* 센스 라인 5종과 안티센스 라인 5종을 얻었다. 또한 *NtTLP1*에 대하여 센스 라인 12종과 안티센스 라인 3종의 형질 전환 토마토를 얻었으며 *AtCOIK*가 과발현 되는 28종의 *Arabidopsis* 형질 전환체를 얻었다.

제 2 절. Yeast two hybrid와 SRS 체제를 이용하여 CMV replicase와 상호작용 식물표적유전자 발굴

1. CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자를 선별하기 위한 yeast two-hybrid와 SRS 구축

① yeast two-hybrid system 구축

- 본 연구에서 bait 로 사용하기 위한 CMV replication에 관여하는 단백질인 1a 단백질과 2a 단백질을 각각 pAS2-1의 *Bam*HI site에 연결시켰다.



Figure 1. Construction of pAS2-1/1a and pAs2-1/2a.

lane 1 : 1kb ladder, lane 2 : linearized pAS2-1 by *Bam*HI

lane 3 : PCR product of 1a, lane 4 : PCR product of 2a

- positive control과 negative control set를 *Saccharomyces cerevisiae* HF7C cell에 transformation시킨 후 β -galactosidase assay를 행하여 system이 안정하게 작용하는지 관찰하였다.

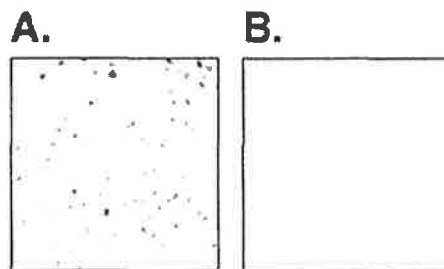


Figure 2. Colony-lift filter assay. The blue spots indicate β -galactosidase activity that turned on the X-gal substrate. A. The yeast strain HF7C containing the plasmids pVA3-1 and pTD1-1 were used as a positive control. B. pACT2 and pAS2-1 as the unfused plasmid were used as a negative control.

② SRS 구축

- 본 연구에서 bait 로 사용하기 위한 CMV replication에 관여하는 단백질인 2a 단백질을 pSOS의 *Bam*HI site에 연결시켰다.



Figure 3. Construction of pSOS/2a.

lane 1 : 1kb ladder, lane 2 : linearized pSOS by *Bam*HI, lane 3 : PCR product of 2a

- positive control과 negative control set를 *Saccharomyces cerevisiae* HF7C cell에 transformation 시킨 후 25°C에서 37°C로 온도 shift를 통하여 system이 안정하게 작용하는지 관찰하였다. Glucose 배지에서는 모든 yeast가 자라게 되지만 Galactose 배지에서는 yeast의 cell growth signal pathway를 activation 시키는 positive control만 자라게 된다.

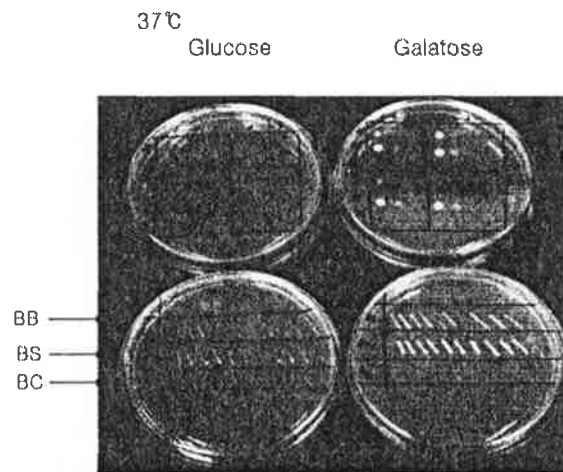


Figure 4. Growth test of the control plasmids at 37°C.

BB: The yeast strain *cdc25* containing the plasmids pSos MAFB and pMyr MAFB were used as a positive control. BS: pSos MAFB and pMyr SB as the unfused plasmid were used as another positive control. BC: pSos MAFB and pMyr Lamin C were used as a negative control.

2. CMV replicase 단백질들의 상호작용인자 선발을 위한 library construction.

Nicotiana tabacum NC82에 CMV-Kor를 감염시킨 후 3일째 되는 날 잎을 따서 mRNA를 분리해낸 다음 *XhoI* linker가 연결된 oligo dT를 primer로 하여 reverse transcriptase를 사용해 first cDNA strand를 합성하였다. RNase H를 처리하여 RNA를 partial digestion 시키고 DNA polymerase를 이용해 second strand를 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 size fractionation 후 ethidium bromide plate assay를 통하여 양을 측정 한 후 DNA binding domain을 가지고 있는 pACT2의 *EcoRI*, *XhoI* site에 연결시켰다. Ligation된 DNA는 electroporation으로 *E. coli*에 도

입시킨 후 propagation하여 일부는 DNA preparation에 사용하고 일부는 Glycerol을 25% 로 섞어 -80℃에 보관 하였다.

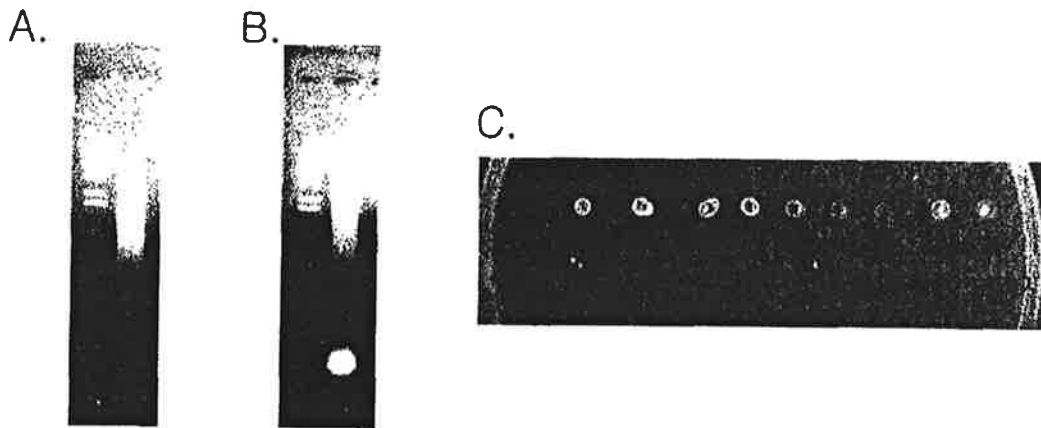


Figure 5. Generation of cDNA inserts.

- A. Synthesized first-strand cDNA. B. Synthesized second-strand cDNA.
C. Ethidium bromide plate assay.

3. CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 선발.

① CMV 1a 단백질과 상호 작용하는 인자 선발

-CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 선발하기 위하여 CMV 1a 단백질을 bait로 하여 yeast two-hybrid system을 이용하여 cDNA library를 탐색하였다. 그 결과 1a 단백질과 상호 작용하는 368개의 positive yeast line을 얻었고 이 yeast에서 plasmid DNA를 추출하여 PCR을 통해 fragment를 T-vector에 cloning 한 후 *E. coli* 균주에 retransformation한 다음 yeast에 재도입하여 CMV 1a와 상호작용을 확인 하여 최종적으로 14개의 positive yeast line을 얻었다. 14개의 positive yeast로부터 추출한 DNA를 automatic sequencer (ABI PRISM™ 310, Perkin Elmer)를 사용해 DNA 염기서열을 결정하고 Gene bank의 sequence와 비교하여 homology 및 그 기능을 추론하였다.

Table 1. Summary of the cDNA fragments interacting with CMV 1a in *Nicotiana tabacum* cv. NC 82 by yeast two-hybrid screening.

Probable protein or function	Isolations
Putative methyltransferase (Synechocystis)	3 → <i>Tcoi1</i>
F1521.1 protein (Arabidopsis)	1 (<i>Tobacco CMV 1a interacting protein 1</i>)
Thaumatococin-like protein (Tobacco)	2 → <i>NiTLPI</i>
RUBISCO small subunit (Tobacco)	2 (<i>Nicotiana tabacum thaumatococin-like protein 1</i>)
T4B 21.6 protein (Arabidopsis)	1
Serine protease (Arabidopsis)	1
Tsi1-interacting protein (Tobacco)	1
S-ribonuclease binding protein (Petunia)	2
Thioredoxin-like protein (Potato)	2
Hypothetical protein RI (Potato)	1
Putative xloglucan endotrans-glycosylase (Arabidopsis)	1
Cytochrome B6-F complex iron-sulfur subunit (Tobacco)	2
Putative tyrosine protein kinase (Arabidopsis)	1 → <i>Tcoi2</i>
Unknown (Arabidopsis)	1 (<i>Tobacco CMV 1a interacting protein 2</i>)

② CMV 2a 단백질과 상호 작용하는 인자 선발

-CMV replicase 단백질들과 상호 작용하는 인자 선발하기 위하여 CMV 2a 단백질을 bait로 하여 SRS를 이용하여 cDNA library를 탐색하였다. 그 결과 2a 단백질과 상호 작용하는 31개의 positive yeast line을 얻었고 이 yeast에서 plasmid DNA를 추출하여 PCR을 통해 fragment를 T-vector에 cloning 한 후 *E. coli* 균주에 retransformation한 다음 automatic sequencer (ABI PRISM™ 310, Perkin Elmer)를 사용해 DNA 염기서열을 결정하고 Gene bank의 sequence와 비교하여 homology 및 그 기능을 추론하였다.

Table 2. Summary of the cDNA fragments interacting with CMV 2a in *Arabidopsis* by Sos recruitment system screening.

No.	locus	gene
# 1-1	At1g74050	60s ribosomal protein L6
# 8-1	At4g30930	50s ribosomal protein L21
# 12-1	At1g31330	Photosystem I reaction center subunit II
# 13-1	At1g29930	Chlorophyll A-B binding protein 2
# 14-1	At3g16640	MGL6.19 TCTP, translationally controlled tumor protein
# 15	At1g29930	Chlorophyll A-B binding protein 2
# 17	At5g38430	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (Rubisco small subunit 1B)
# 22	At1g11545	Xyloglucan :xyloglucosyl transferase
# 26	At5g38430	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (Rubisco small subunit 1B)
# 29	At1g29930	Chlorophyll A-B binding protein 2
# 30	At1g47530	Ripening-responsive protein
# 31	At3g54890	Chlorophyll A-B binding protein

No.	locus	gene
# 33	At5g54770	Thiazole biosynthetic enzyme
# 36	At3g16370	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
# 41	At5g38410	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B
# 44	At5g24650	Mitochondrial import inner membrane translocase
# 45	At4g37930	Glycine hydroxymethyltransferase
# 46	At1g25275	Expressed protein
# 48	At5g4650	Mitochondrial import inner membrane translocase
# 52	At4g28750	Photosystem I reaction center subunit IV
# 53	At2g30570	Photosystem II reaction center w(Psbw)protein
# 55	At5g64060	No apical meristem (NAM) family protein similar to NAC1
# 56	At2g29080	FtSH protease
# 57	At3g47470 At3g47640	Chlorophyll A-B binding protein4 SMC2-like protein

# 58	At4g37440	Expressed protein
# 59	At5g42980	Thioredoxin H-type 3
# 62	At1g31330	Photosystem I reaction center subunit III family protein
# 64	At2g05100	Chlorophyll A-B binding protein/LHC II type
# 65	At1g15820	Chlorophyll A-B binding protein
# 66	At1g64230	Ubiquitin-conjugating enzyme
# 68	At5g16400	Thioredoxin

제 3 절. CMV replicase 상호작용 표적유전자의 발현 및 기능분석

1. *NtTLP1*

① *NtTLP1*의 분리

-CMV 병증은 다른 바이러스 입자뿐만 아니라 숙주 인자와 1a의 상호작용에 의해 조절되는 것으로 제안되어졌다. CMV 1a 단백질과 상호작용하는 식물체 숙주 인자를 동정하기 위해서 우리는 CMV가 감염된 식물체 앞에서 추출한 RNA를 사용하여, yeast GAL4 activation domain expression vector에 tobacco cDNA library를 구축하였다. 이 library는 bait로써 full-length CMV 1a 유전자를 이용하여서 screen하였다. 1.5×10^6 transformants에서 368 colony가 Leu, Trp, His결핍배지에서 자라났다. 이 368개 clone은 re-transformation을 하고 colony-lift filter assay를 실시했다. 14 clone이 β -galactosidase activity를 보이는 것을 관찰했다. 이들 14개 clone의 시퀀스분석은 이들 clone 중에 2개가 PR 단백질의 PR-5 그룹에 한구성체를 코딩하는 식물체 TLP 유전자에 유사성을 가졌다. *NtTLP1*으로 언급할 이 유전자는 다른 TLP의 성격과 비교했을 때, 21개의 secretion signal peptide를 갖는 226 아미노산으로 899 bp를 갖고 있었다. Southern blot 분석은 *NtTLP1*이 아마도 tobacco 유전체상에서 작은 유전자 family로써 존재한다는 것을 보여주었다. 또한 예상되는 단백질의 분자량은 24.6 KDa이고 isoelectric point는 5.3으로 나타났다 (GenBank accession number AY745249).

CMV1a와 *NtTLP1*사이의 상호작용은 추가적인 plasmid combination을 사용함으로써 증명하였고, GAL4 DNA-binding 또는 activation domain에 융합한 여러 constructs를 사용하여 직접적인 상호작용을 확인해 보았다. (Table 3). pAS2-1 :: CMV1a (bait)나 pACT2:: *NtTLP1* (prey) plasmid는 *HIS* 또는 *lacZ* reporter 유전자에서 활성화되지 않았다. plasmid를 GAL4 DNA-binding domain이나 GAL4 activation domain를 담고 있는 parent plasmid와 co-transformation 하였을 때, *NtTLP1* (pACT2::*NtTLP1*에서 발현됨)은 GAL4 DNA-binding domain 그 자체와는 상호작용하지 않았고, CMV1a (pAS2-1::CMV1a에 발현됨) GAL4 activation domain과 상호작용하지 않는 것을 확인하였다. CMV1a

protein은 methyltransferase domain과 helicase domain으로 추측되는 2개의 기능적인 domain을 갖고 있다. NtTLP1과 상호작용하는 CMV1a의 domain이 어떤 것인지 확인하기 위해, 각 domain을 GAL4 binding domain에 붙였다. NtTLP1은 methyltransferase domain을 코딩하고 CMV-MT와 상호작용하였고, CMV 1a protein의 아미노산 1-456영역이 CMV-MT으로 CMV-Hel도 마찬가지로 CMV1a protein의 646-993 아미노산 영역을 갖고 있다. 이러한 결과는 기질로 ONPG를 사용한 정량적인 β -galactosidase assay에서 다시 확인 하였다. CMV1a와 NtTLP1 유전자의 co-transformant의 β -galactosidase 활성도는 positive control에 대해서 74%정도 였다. CMV-Hel과 NtTLP1 또는 CMV-MT과 NtTLP1의 co-transformants는 CMV1a와 NtTLP1 co-transformants와 유사한 β -galactosidase 활성도를 보였다 (Table 3). 그러므로, NtTLP1은 yeast에서 full-length CMV1a과 CMV1a protein의 두 domain 모두와 강한 상호작용을 보여주었다.

Table 3. Interaction of NtTLP1 and CMV 1a in yeast cells.

GAL4 BD ^a Vector	GAL4 AD ^b Vector	His	β -Galactosidase activity ^f
pAS2-1::CMV 1a	- ^c	-	-
- ^c	pACT2::NtTLP1	-	-
pAS2-1::CMV 1a	pACT2	-	-
pAS2-1	pACT2::NtTLP1	-	-
pAS2-1::CMV 1a	pACT2::NtTLP1	+	+
pAS2-1::CMV 1a-MT ^d	pACT2::NtTLP1	+	+
pAS2-1::CMV 1a-Hel ^e	pACT2::NtTLP1	+	+
			115.3 \pm 3.8
			108.5 \pm 4.1
			105.6 \pm 2.7

^a BD, binding domain
^b AD, activation domain
^c No coexpressed vector
^d Methyltransferase domain of CMV 1a protein
^e Helicase domain of CMV 1a protein
^f The colony-lift filter assay and liquid culture assay using o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as substrate

② *In vivo*에서의 CMV1a와 NtTLP1간의 직접적인 상호작용.

-CMV1a와 NtTLP1간의 단백질-단백질 상호작용을 증명하기 위해서 *in vitro*에서 binding assay를 수행하였다. 첫째로, NtTLP1의 coding 영역은 glutathione S-transferase (GST) fusion protein으로 NtTLP1 단백질을 발현시키기 위해서 bacterial expression plasmid로 subclone하였다. Figure 6A에서 보이듯이, 재조합된 GST-NtTLP1의 예상되는 크기를 갖는 52KDa의 polypeptide가 affinity chromatography를 통해서 정제하였다. Binding assay를 하기 때문에, CMV1a는 cell-free translation system을 사용하여 *in vitro*에서 합성하였다. CMV2a는 yeast cell에서 NtTLP2과 상호작용하지 않는데 (Figure 9), negative control로 *in vitro*에서 역시 합성하였다. ³⁵S-Met-labeled polypeptide 합성의 각개은 확인하였고, GST-NtTLP1 fusion 단백질과 incubation을 실시하였다 (Figure 6B, 6C). 이 혼합물은 낮은 온도에서 glutathione-agarose beads와 함께 incubation 후 bead로부터 추출해 내어 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과 GST-NtTLP1 fusion protein이 CMV1a protien과 *in vitro* 상에서도 상호작용한다는 것을 알 수 있다 (Figure 6C, lane 2). 반대로, GST control 단백질과 CMV1a polypeptide의 혼합물 (Figure 6C, lane 1) 또는 GST-NtTLP1과 CMV2a polypeptide에서는 뚜렷한 상호작용을 관찰할 수 없었다 (Figure 6C, lane3). 이러한 결과는 yeast two-hybrid screening의 결과와 마찬가지로 NtTLP1이 명확하게 *in vitro*에서 CMV1a와 직접적으로 상호작용함을 확인할 수 있었다.

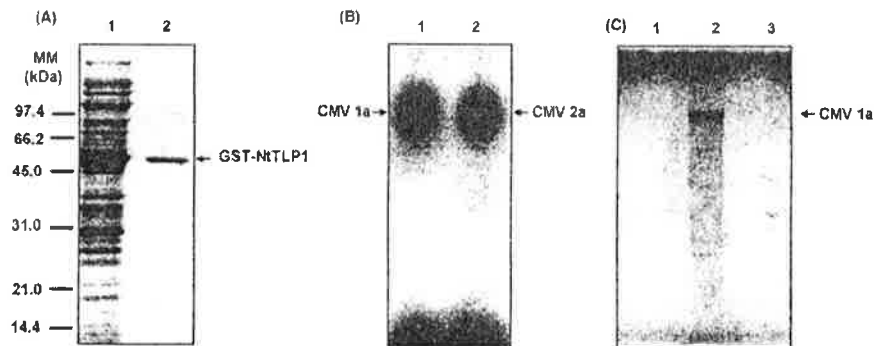


Figure 6. *In vitro* interaction test of recombinant NtTLP1 protein and the CMV 1a protein.

(A) The purification of recombinant GST-NtTLP1 protein via affinity

chromatography. Protein expression was induced in *E. coli* that was transformed with the GST expression plasmid. Recombinant GST-NtTLP1 protein, purified on glutathione-agarose beads, was run on SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, bacterial lysate lane 2, purified GST-NtTLP1 fusion protein (5 μ g). Arrowheads indicates the position of purified recombinant GST-NtTLP1 Proteins (~ 52 kDa). (B) *In vitro* translation product confirmation of CMV 1a and CMV 2a. 5 μ l of 35 S-Met-labeled CMV 1a (97 kDa, lane 1) or CMV 2a (97 kDa, lane 2) was subjected to SDS-PAGE and proteins were visualized by autoradiography. (C) *In vitro* binding assay of NtTLP1 and the CMV 1a protein. GST-NtTLP1 protein was incubated with *in vitro* translated, 35 S-Met-labeled CMV 1a or CMV 2a in the presence of glutathione-agarose beads. Precipitates from the binding mixture were subjected to SDS-PAGE and proteins were visualized by autoradiography. Lane 1, CMV 1a (97 kDa) incubated with GST protein; lane 2, CMV 1a incubated with GST-NtTLP1; lane 3, CMV 2a incubated with GST-NtTLP1.

③ *In planta*에서의 CMV1a와 NtTLP1간의 직접적인 상호작용.

-CMV1a와 NtTLP1간의 상호작용은 이 연구에서 *in planta*에서 증명하였다. NtTLP1과 CMV1a간의 상호작용은 co-transformed *Arabidopsis* protoplasts를 사용하는 co-immunoprecipitation 실험을 통해서 증명하였다. NtTLP1은 *green fluorescent protein* (GFP) 유전자에 fusion하였고, CMV1a는 *hemagglutinin* (HA) epitopes로 tagged 되었다 (Figure 7). Co-transformed *Arabidopsis* protoplasts를 homogenizing한 후에, 그 추출물을 poly anti-HA antibody로 pull down하였다. 그 pellet은 PBS buffer로 씻어주고, polyclonal GFP antibody로 develop한 immunoblot을 통해서 분석하였다. Figure 7A에 lane3에서 보는 것과 같이 재조합한 NtTLP1::GFP의 크기로 예상되는 곳인 50.0 kDa에서 분자량 band가 나타났다. NtTLP1::GFP나 또는 GFP와 CMV1a::HA를 가지는 plasmid로 transformation한 *Arabidopsis* protoplast에서 추출한 lane1이나 lane2는 특별한 상호작용을 찾을 수 없었다. Control 실험으로, HA-tagged CMV1a의 올바른 합성은 polyclonal HA antibody로 얻어진 development에서 immunoblot을 통해서 증명하였다 (Figure 7B, lane2, lane3). 추가적으로, 우리는 anti-HA serum이 NtTLP1::GFP만을 침전시키지 않는다는 것을 증명하였다 (Figure 7B, lane1). 이러한 결과는 NtTLP1과 CMV1a가 식물체내에서도 단백질 복합체를 형성한다는 것을 가리킨다.

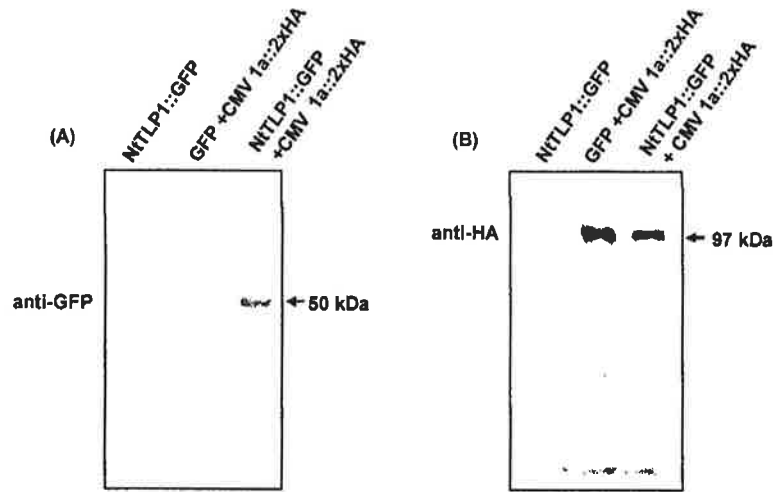


Figure 7. *In planta* interaction test of NtTLP1::GFP and CMV 1a::2xHA.

Arabidopsis protoplasts were co-transformed with plasmids that express the genes encoding the GFP and CMV 1a::2xHA (lane 2) or NtTLP1::GFP and CMV 1a::2xHA (lane 3). The plasmid that expresses the gene encoding the NtTLP1::GFP was transformed as a control (lane 1). Immunoprecipitation of the protoplast extract was performed with anti-HA antiserum. The immunoprecipitated proteins were subjected to immunoblot analysis with anti-GFP (A) or anti-HA (B) antibody.

④ NtTLP1의 세포내 위치.

-Secretion signal peptide의 존재는 acidic TLP가 extracellular space로 secretion 됨을 추측할 수 있다. 또한 일반적으로 acidic TLP는 extracellular space로 이동하는 경향이 있다고 한다 (Bednarek et al., 1990). ProtComp program사용한 computer 분석에서 NtTLP1은 extracellular space (score= 2.7)이고, cytosol (score = 2.5)로 이동할 것으로 나타났다. NtTLP1의 세포내 위치를 조사하기 위해, fusion gene NtTLP1::GFP, *Arabidopsis* secretory low molecular weight phospholipase A2 (*AtsPLA2β::GFP*) 또는 GFP를 갖는 plasmid는 particle bombardment로 onion epidermal cell에 transformation시켰다 (Itaya et al., 1997). *AtsPLA2β::GFP*는 secretabel control marker로 사용하였다(Lee et al., 2003). 유전자 발현은 GFP marker의 녹색형광으로 나타났고, 형광현미경에서 관찰하였다. Transient한 발현을 한 후에, NtTLP1::GFP fusion protein은 형광은 주로

식물체 세포의 periphery와 intracellular space에 보였다(Figure 8A-(c)). 반면에 control AtsPLA2 β ::GFP 또는 GFP는 주로 periphery나 cytosol에 각각 나타났다(Figure 8A-(a), (b)). Cytoplasm과 cell wall 둘 사이의 위치를 구분하기 위해서 onion epidermal cell에 0.8 M mannitol을 처리하였다. 이러한 처리는 plasmolysis를 가속화시키고, cell wall 이 변함없이 남아있는 반면에 plasma membrane이 안으로 떨어져 나오게 된다. 원형질이 분리된 세포에서 NtTLP1::GFP 형광은 여전히 cell의 periphery에 남아 있었고, 역시 cytoplasm에 존재하였다(Figure 8B-(c)). 반대로, control AtsPLA2 β ::GFP는 cell 내부를 통해서 축적되어진 것을 발견하였다(Figure 8B-(a), (b)). *In vivo* NtTLP1 localization은 *Arabidopsis* protoplast에서 다시 확인하였다(Figure 8C) NtTLP::GFP fusion product는 cell 내부로 축적되었고, 이것은 protein이 cytosol로 퍼지게 된다는 것을 가리킨다. 이러한 결과는 NtTLP1이 cytosol로 위치하게 될 것이라는 것과 이것 중에 일부는 cell 외부나 cell wall로 분비된다는 것을 제시하는 것이다.

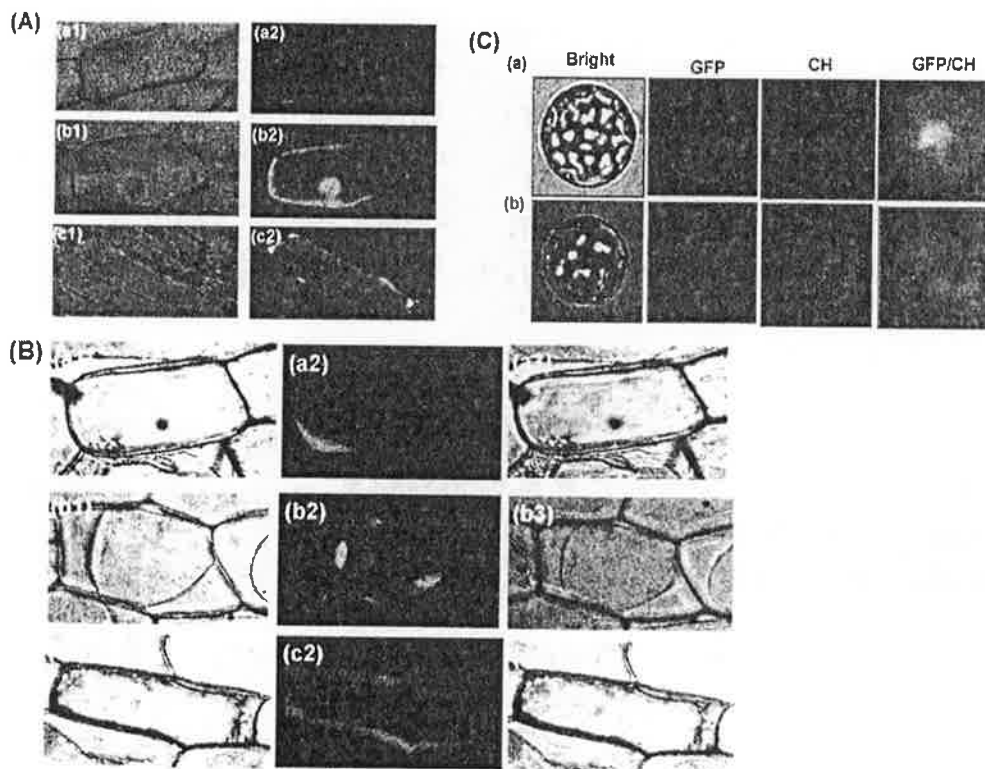


Figure 8. Subcellular localization of NtTLP1::GFP in onion cells and *Arabidopsis*.

(A) Subcellular localization of NtTLP1::GFP in onion cells. The plasmids that express the genes encoding the AtsPLA₂β::GFP (a1, a2), GFP (b1, b2) and NtTLP1::GFP fusion proteins (c1, c2) were introduced into the onion cells via biolistic gene bombardment. The photographs were taken after 36 h in a bright field for the morphology observation of the cell (a1, b1, c1) and in a dark field for the localization examination of the green fluorescence (a2, b2, c2). (B) The localization of NtTLP1::GFP in plasmolyzed onion cells. The plasmids that express the genes encoding the AtsPLA₂β::GFP (a1, a2, a3), GFP (b1, b2, b3) and NtTLP1::GFP fusion proteins (c1, c2, c3) were introduced into the onion cells via biolistic gene bombardment. The photographs were taken after 36 h in a bright field (a1, b1, c1) and in a dark field (a2, b2, c2) and in combination (a3, b3, c3). Green fluorescence indicates the presence of AtsPLA₂β::GFP, GFP or NtTLP1::GFP. (C) Subcellular localization of NtTLP1::GFP in *Arabidopsis*. The plasmids that express the gene encoding the GFP (a) or NtTLP1::GFP fusion proteins (b) were transiently introduced into the *Arabidopsis* protoplasts. Expressions of the introduced genes were examined with a fluorescence microscope after 24 h. The first panel shows the light microscope results. The second panel shows the GFP images. The third panel shows the chlorophyll (CH) and the last panel shows overlap of GFP (green) and CH (red).

⑤ CMV-encoded protein과 3종류의 TLP간의 상호작용 경향.

-TLP는 매우 acidic한 것에서 basic한 pH값을 보인다 (3.4-12 범위). 그러므로, TLP는 산성, 중성, 염기성 TLP가 존재한다. 이 3가지 종류는 단백질 수준으로 tobacco에서 동정되어졌다 (Koiwa et al., 1994). 다양한 TLP의 물리화화학적 특징에 따르면, 이들의 세포내 위치는 다르다. 일반적으로 extracellular TLP는 산성의 경향이고, vacuolar TLP는 보통 염기성이다. TLP의 어떤 종류가 CMV1a와 상호작용하는지를 결정하기 위해서, 우리는 *N. tabacum*에서 *osmotin*(basic, GenBank accession number M29279)와 *osmotin-like protein 1*(OLP1, neutral, GenBank accession number M64081)유전자를 얻었고, CMV1a protein과 상호작용하는가를 확인하기 위해 *GAL4* activation domain에 fusion시켰다. 추가적으로, 바이러스 복제와 이동에 TLP의 잠재적인 역할을 확인하기 위해서, 우리는 CMV-encoded 단백질인 RNA-dependent RNA polymerase 2a, CP, MP를 yeast two-hybrid에서 이들 3가지 종류의 TLP가 상호작용할 수 있는가를 결정하는 것을 시도하였다 (Figure 9A). NtTLP1은 CMV1a protein과 상호작용할 뿐만 아니라, CP, MP와도 상호작용한다. 하지만, CMV2a와는 상호작용하지 않는다. Osmotin과 OLP1의 경우, 둘다 CMV1a와 상호작용하였지만, 다른 viral protein과는 상호작용하지 않았다. 이러한 결과는 기질로 ONPG를 사용한 정량적인 β-galactosidase assay로 다시 확인하였다.

*CMV1a*와 *NtTLP1* 유전자의 co-transformant의 β -galactocidase의 활성도는 positive control에 비해 74%정도였다. 반대로, *CMV1a*와 *OLP1* 또는 *CMV1a*와 osmotin co-transformants의 β -galactocidase의 활성도는 positive control에 비해 각각 32%, 28%를 보였다. *CMV-MP*와 *NtTLP1* 또는 *CMV-CP*와 *NtTLP1* co-transformants는 positive control에 비해서 각각 37%, 33%를 보였다 (Figure 9B). 게다가, *CMV1a*와 2a protein의 정량적인 상호작용은 positive control만큼이나 강하게 나타났다. *CMV* protein이 *NtTLP1*의 binding site를 공유하는지 안하는 지를 증명하기 위해서 yeast three-hybrid assay는 pBridge vector system을 사용하여 실행하였다. Figure 9C에서 보는 것 같이, *NtTLP1*, *CMV1a* 그리고 *CP* 사이의 상호작용은 다시 확인 할 수 있었다. 반면에 *MP*는 이 실험 system에서 *NtTLP1*과 *CMV1a*와 같이 복합체를 형성하지는 못했다. Yeast three-hybrid 분석결과는 *CMV1a* protein과 *MP*가 *NtTLP1*에 같은 binding site를 갖는 것 같고 있을지 모르며, *CP*는 *CMV1a*와 binding site를 공유하지는 않는 것 같다. 추가적으로, *CMV 1a*와 *PR*의 상호작용의 가능성을 수행하기 위해서, 우리는 *CMV1a*와 *PR-1*, *PR-2*의 상호작용을 확인하였다. *PR-1*이나 *PR-2*나 *CMV1a*와 상호작용하지 않음을 알 수 있었다 (Figure 9C-(g) and (h)). 우리는 *TLP*와 *CMV* protein의 상호작용이 *CMV*-specific한 것인 지를 확인하였다. Yeast two-hybrid를 사용하여서 *TLPs*와 *TMV replicase protein* 또는 *TMV-CP*로 상호작용 실험을 수행하였다. *TLPs* 모두는 *TMV replicase* 또는 *TMV-CP*와 상호작용하지 않았다. 이러한 결과는 *NtTLP1*이 *CMV* viral protein에 특징적으로 binding하고, 이것이 multiplication뿐만 아니라 *CMV*의 이동의 속도와 범위에 영향을 미칠지도 모른다는 것을 시사한다.

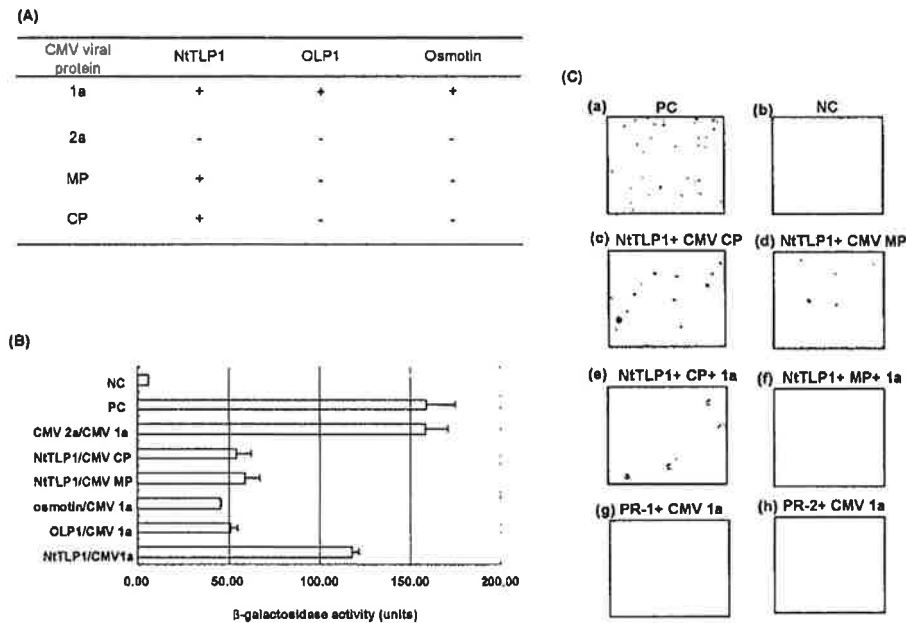


Figure 9. Interactions of TLPs and CMV viral proteins in yeast cells.

(A) Colony-lift filter β -galactosidase assays. +, blue colonies resulting from positive β -galactosidase activity; and -, white colonies resulting from negative β -galactosidase activity. (B) Quantitative liquid assays quantization of β -galactosidase activity using *o*-nitrophenyl- β -D galactopyranoside as substrate. Error bars indicate the standard deviation for each sample. (C) Interaction analysis of NtTLP1 and CMV movement-related proteins using yeast-three hybrid system and CMV 1a and other PRs using yeast two-hybrid system. Colony-lift filter β -galactosidase assays were carried out in order to test the interactions of NtTLP1 with the CMV movement-related proteins, CP or MP and CMV 1a with PR-1 or PR-2. The yeast strain, Y187, was co-transformed as indicated at the top of each (c), (d), (e), (f), (g) or (h) box. The co-transformants of the pVA3-1 and pTD1-1 plasmids served as a positive control (a), and the empty plasmids, pACT2 and pAS2-1, served as a negative control (b). The blue spots indicated positive β -galactosidase activity.

⑥ CMV 접종시에 TLP의 발현양상.

-전체 RNA를 CMV접종한 잎과 같은 시간에 mock접종한 잎에서 추출하였다. Mock 접종은 Carborundum으로 문지르는 것으로 나타나는 wounding-induced TLP

유전자 발현의 가능성을 배제하기 위해서다. RNA sample은 역전사에 따르는 genomic DNA 오염을 제거하기 위해서 DNaseI으로 처리하였다. mRNA 수준은 각 유전자에 대한 특별한 primer를 사용하여 real-time RT-PCR에 의해 정량했다. *Tublin* 유전자는 다른 sample의 기준을 잡기 위해 housekeeping gene으로써 사용되었다. Figure 10A에서 보듯이, 우리는 mock 접종한 식물체에서 TLP 유전자의 뚜렷한 축적이 없음을 확인하였다. *NtTLP1* 전사체는 CMV 접종 후 5일에서 가장 높았으며, 1일의 끝에서 높아지기 시작했다. 조금의 변동이 있음에서, 유사한 유전자 발현양상은 *osmotin*과 *OLP1*에서 관찰하였다. 둘의 경우에서, 전사체는 1일에 증가하였고, 유전자 발현 수준은 CMV 접종5일에서 거의 변화 없이 남아 있었다. 이러한 우리의 결과는 3가지 종류의 TLP가 CMV 감염에 반응하여 축적되어진다는 것을 가리킨다.

CMV viral 유전자의 축적은 역시 CMV RNA의 보존된 3' 끝의 축적을 통해서 역시 평가 하였다. 그리고 *PR-1*과 *PR-2*의 전사체 수준은 기준에 CMV에 민감한 반응하는 동안 축적된다는 보고에 따라 이 둘 유전자도 평가하였다. Figure 10B에서 보듯이, *PR-1*과 *PR-2* 전사체 모두 1일째 끝에서 축적되었고, CMV 감염후 5일째 가장 높았다.

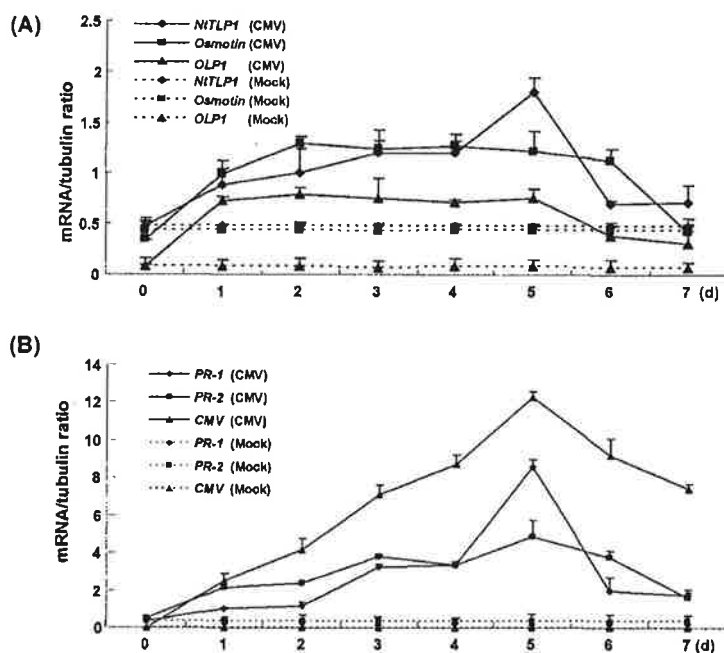


Figure 10. Real-time quantitative RT-PCR analysis of three different kinds of

TLP genes upon CMV-Kor inoculation.

The mRNA expression of *TLPs* (A), *PR-1*, *PR-2* and *CMV* (B) at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days after inoculation (DAI) along with the mock-inoculation with the same time course was monitored. Gene expression was measured by using real-time quantitative RT-PCR. Values are shown as the expression amount of each gene to the corresponding *tubulin* gene \pm SEM. Each RNA sample was run in triplicate and repeated four times of each independent CMV inoculation.

2. *Tcoi1*

① *Tcoi1*의 분리

-Yeast two-hybrid system을 이용하여 CMV 1a 단백질과 상호 작용하는 것으로 선발된 유전자들의 염기 서열 분석 결과 3개의 클론이 유전자의 크기는 달랐지만 동일한 유전자의 cDNA임을 알 수 있었다. 이 유전자를 *Tcoi1* (Tobacco CMV 1a interacting protein 1)이라고 명명하고 further study를 실시 하였다. 이 3개의 클론이 포함하고 있는 cDNA 중 크기가 900 bp로 가장 큰 cDNA를 유전자를 이용하여 CMV 유래의 여러 단백질과의 상호작용 여부를 확인 해 보았다. *Tcoi1*은 autocatalytic activity를 갖고 있지 않았으며 CMV 1a의 methyl-transferase domain (MT) 과 Helicase domain (Hel) 모두와 yeast cell내에서 상호작용 함을 확인 할 수 있었다 (Figure 11). 뿐만 아니라 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 substrate로 하여 quantitative β -galactosidase assays를 실시 해 본 결과 CMV 1a과 *Tcoi1*과의 상호작용은 positive control의 44% 수준이었으며 CMV-MT와의 상호작용은 51% 수준으로 아주 강하게 상호작용 함을 알 수 있었다.

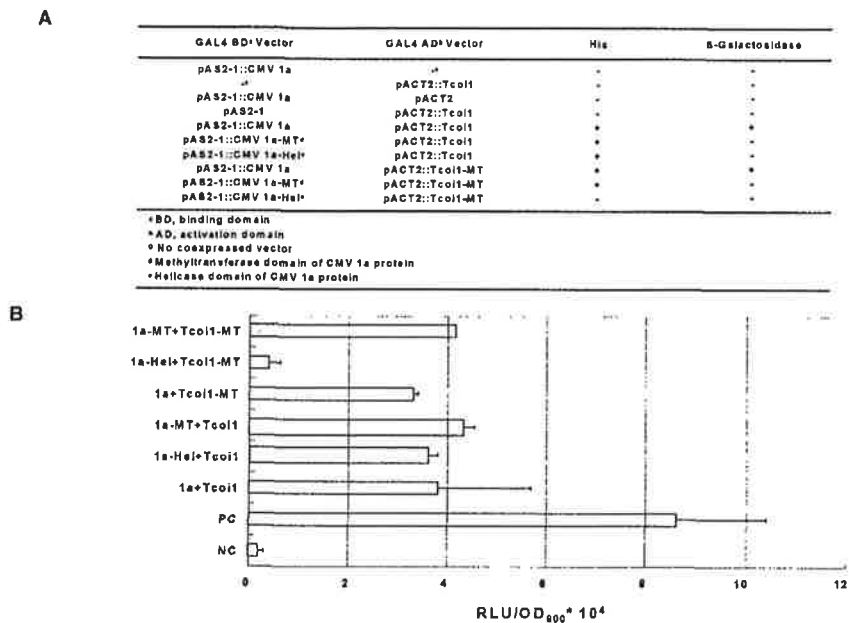


Figure 11. Interactions of Tco11 and CMV viral proteins in yeast cells.

(A) Colony-lift filter β -galactosidase assays. +, blue colonies resulting from positive β -galactosidase activity; and -, white colonies resulting from negative β -galactosidase activity.

(B) Quantitative liquid assays quantization of β -galactosidase activity using ONPG as substrate. Error bars indicate the standard deviation for each sample.

② Full length *Tco11* cDNA의 분리와 유전자 특성 연구

-Yeast two-hybrid system을 이용하여 분리된 900 bp fragment를 probe로 이용하여 λ -GEM11 담배 cDNA libraries를 screening 하였다. 그 결과 2개의 plaques를 isolation 하였고 염기 서열 분석 결과 yeast two-hybrid system을 이용하여 분리된 900 bp fragment와 동일한 염기 서열을 포함하고 있는 것을 확인 할 수 있었으며 이는 900 bp fragment에서 N-terminal 부위에 456 nucleotides의 coding region을 추가적으로 포함하고 있었다. 이 결과를 확인 하기 위하여 5'과 3'의 *Tco11* gene specific primer를 이용하여 *N.tabacum* poly (A)-containing RNA로부터 합성한 cDNA를 주형으로 PCR 실시함으로써 λ -GEM11 담배 cDNA libraries를 screening으로 분리된 cDNA가 full length *Tco11* cDNA임을 확인 하였다. Full length

(B) Alignment of the predicted amino acid sequence of *Tcoil* with other UbiE-like C-methyltransferases family members. Sequences from *E. coli*, *S. cerevisiae*, *L. donovani* and *B. subtilis* are compared. The alignments were generated from DNASTar MegAlign by using the PAM 250 table and the Jotun Hein method. The shaded residues match the consensus within two distance units.

(C) A phylogenetic tree showing the predicted evolutionary relationship of *Tcoil* with other UbiE-like C-methyltransferases family members.

③ *Tcoil* 유전자의 genomic organization과 tissue-specific expression 관찰

-Full-length *Tcoil*를 probe로 해서 Southern blot analysis를 실시 해 본 결과 담배 genome 상에 *Tcoil* 이 4-5개의 copy 수로 small gene family를 이루고 있음을 알 수 있었다 (Figure 13B). 또한 *Tcoil* 유전자의 기관 별 발현 정도를 확인 해 본 결과 줄기와 잎에서는 발현을 하나 꽃과 뿌리에서는 발현 되지 않는 유전자임을 알 수 있었다.

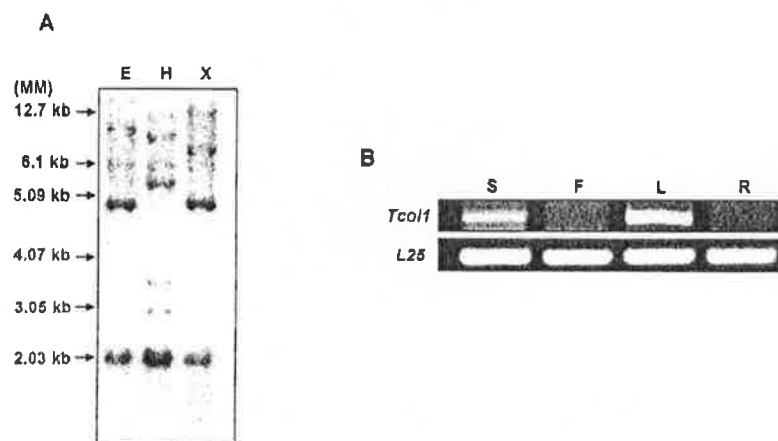


Figure 13. Southern blot analysis and comparison of *Tcoil* expression in different organs.

(A) Tobacco genomic DNA was digested with *EcoRI* (E), *HindIII* (H), or *XbaI* (X), and separated on 0.8% agarose gel. After transfer to a Nytran Plus membrane, the blot was hybridized with ^{32}P -labeled full-length *Tcoil* cDNA probe under medium stringency. Autoradiograms were visualized with a

Fuji-BAS 2500 phosphor image analyzer. DNA size standards (MM) are shown at left.

(B) Accumulation of *Tcoil* transcripts in different organs. Lanes: S (stem); F (flower); L (leaves) R (root). The transcripts level of ribosomal protein *L25* was detected as internal standard for cDNA quantity evaluation.

④ CMV 처리에 대한 *Tcoil* 유전자의 발현 양상 관찰

-CMV 처리에 대해 *Tcoil* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위하여 6엽기 된 담배 잎에 CMV를 처리 후 RNA를 분리 하여 *Tcoil* 유전자 specific primer set을 이용하여 RT-PCR을 실시 하였다. 또한 wounding에 의한 *Tcoil* 유전자의 발현 변화를 확인하기 위하여 virus inoculation buffer에 carborundum 만 첨가 하여 담배 잎에 문질러 준 후 (mock) RNA를 분리 하여 상기 한 방법대로 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 Figure 14에서 보여 지듯이 mock 처리에 대해서는 *Tcoil* 유전자의 발현 양상이 변화가 없음을 확인 할 수 있었고 CMV 처리에 대해서는 *Tcoil* 유전자 발현이 CMV 처리 1일부터 증가하기 시작하여 2일까지 지속 되다가 일째부터 감소하기 시작함을 확인 할 수 있었다. CMV 처리에 대한 control로 CMV RNAs의 conserved 부분인 3' end specific primer set를 이용하여 CMV RNA level과 기존에 CMV 처리에 의해 발현 양상이 증가하는 것으로 보고되어진 *PR-1* (Whitham et al., 2003) 유전자의 발현 양상도 함께 관찰 해 보았다. 그리고 주형으로 쓰여진 cDNAs의 internal standard로 ribosomal protein *L25*의 발현 정도를 비교 해 보았다. 이 결과를 통하여 *Tcoil* 유전자는 CMV 감염에 의하여 그 유전자 발현이 증가함을 확인 할 수 있었다.

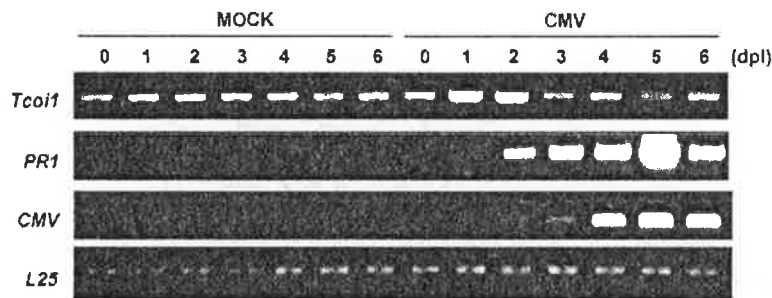


Figure 14. RT-PCR analysis of *Tcoil* genes upon CMV-Kor inoculation.

Total RNA was extracted from leaf tissues at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 day post inoculation (dpi). Tissue was isolated from the leaves of either CMV- or mock-inoculated plants. cDNAs were synthesized from the total RNAs, and RT-PCR was conducted with gene-specific primers. The conserved 3' end of CMV RNAs and *PR-1* were detected as a positive control for CMV inoculation. As internal standard for cDNA quantity evaluation, the level of *L25* was monitored.

⑤ Tcoil 단백질의 deletion constructs를 이용한 CMV 1a와의 상호작용에 필요한 부위 분석

-Tcoil이 CMV 1a 단백질과의 상호작용에 필요한 부위를 규명하기 위하여 Tcoil의 N-말단과 C-말단 부위가 deletion된 constructs를 만들어 이를 prey로 하여 yeast two-hybrid system에서 full-length CMV 1a와의 상호작용 여부를 확인 해 보았다 (Figure 15A). 그 결과 Tcoil의 MT domain이 deletion된 Tcoild2과 Tcoild3은 CMV 1a와 상호작용 하지 않았고 Tcoild1과 Tcoil-MT은 CMV 1a와 상호작용 함을 확인 할 수 있었다. 이는 CMV 1a와의 상호작용에 Tcoil의 MT domain이 중요함을 시사하고 있다.

또한 CMV 1a와의 상호작용에 Tcoil의 MT domain이 중요한 가를 재확인하기 위하여 S-transferase (GST) pull-down assay 방법을 이용하여 *in vitro* 상에서의 Tcoil과 CMV 1a와의 상호작용을 확인 해 보았다. 먼저 Tcoil의 N-말단과 C-말단 부위가 deletion된 constructs를 GST 단백질과 fusion 후 *E. coli* 에서 발현을 유도 하여 분리 후 eukaryotic *in vitro* translation system을 이용하여 ³⁵S-Met로 labeling 된 1a 단백질과 함께 섞은 후 GST pull-down assay를 실시하였다. 그 결과 GST::Tcoil, GST::Tcoild1과 ST::Tcoil-MT fusion proteins은 CMV 1a 단백질과 상호작용 함을 확인 할 수 있었으나 GST control protein, GST::Tcoild2, 또는 GST::Tcoild3 는 CMV 1a 단백질과 상호작용 하지 않음을 확인 할 수 있었다. (Figure 15B, lanes 1, 4, and 5). 이 결과를 통하여 *in vitro* 상에서도 Tcoil의 MT domain이 CMV 1a 단백질과의 상호작용에 중요함을 확인 할 수 있었다. 또한 Tcoil과의 상호작용에 있어 CMV 1a 단백질의 어떤 부분이 중요한 지를 확인 하기 위하여 분리 된 GST::Tcoil fusion protein과 eukaryotic *in vitro* translation system 을 이용하여 ³⁵S-Met로 labeling 된 CMV 1a-MT 단백질과 CMV 1a-Hel 단백질을 이용하여 GST pull-down assay를 실시하였다. 그 결과 yeast에서 확인 했던 결과와 마찬가지로 두 domain 모두 full-length Tcoil과 상호작용 함을 확인 할 수 있었다 (Figure 15C, lane 1).

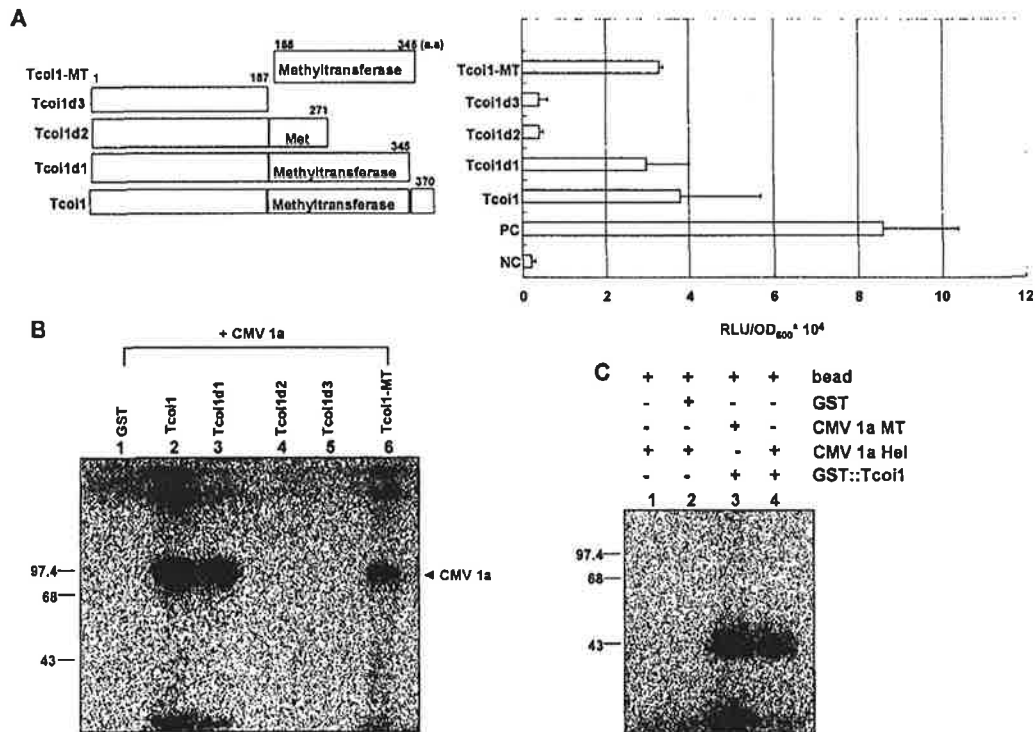


Figure 15. Identification the region of Tcoil that is necessary for the interaction with CMV 1a protein and *in vitro* interaction analysis.

(A) The interaction analysis between different parts of Tcoil and CMV 1a protein in the yeast two-hybrid system. The names of the truncated clones and the each locus of amino acids were indicated at the left and upper, respectively. The interaction strength was scored by liquid assays using ONPG as substrate.

(B) *In vitro* GST pull down assay of the GST conjugated truncated clones of Tcoil and *in vitro* translated CMV 1a protein. ³⁵S-Met-labeled CMV 1a was incubated with 10 µg of GST (negative control), GST::Tcoil, GST::Tcoil1d1, GST::Tcoil1d2, GST::Tcoil1d3 or GST::Tcoil1-MT in the presence of glutathione-agarose beads. Precipitates from the binding mixture were subjected to SDS-PAGE and proteins were visualized by autoradiography.

(C) *In vitro* GST pull down assay of the GST::Tcoil and *in vitro* translated CMV 1a MT or CMV 1a Hel. Lanes: only GST::Tcoil; GST and ³⁵S-Met-labeled CMV 1a Hel; GST::Tcoil and ³⁵S-Met-labeled CMV 1a MT; GST::Tcoil and ³⁵S-Met-labeled CMV 1a Hel.

⑥ Tcoil 단백질의 methyltransferase activity 관찰

-Tcoil 단백질의 C-말단 부위에 methyltransferase domain을 갖고 있고 CMV 1a 단백질과 상호작용을 함을 관찰 할 수 있었기 때문에 Tcoil 단백질이 methyltransferase activity를 갖는지, 또한 Tcoil 단백질이 CMV 1a 단백질과 상호작용 하여 methylation을 유발 할 수 있는지 확인 해 보고자 하였다. 이를 위하여 GST::CMV 1a MT과 CMV 1a Hel, GST::CMV 2a를 제작하여 *E. coli* 에서 발현 및 분리하여 분리 된 GST::Tcoil과 methyl group donor로 [³H] S-adenosylmethionine (AdoMet)를 PBS [pH 7.4] buffer와 섞은 후 상온에서 24 시간 반응을 유도 하였다. 그 결과 CMV 1a MT와 Hel 모두 Tcoil 단백질에 의해 methylation이 일어 났음을 확인 할 수 있었다 (Figure 16, lanes 5 and 6). 이에 반해 yeast two-hybrid assay에서 Tcoil이 CMV 2a와는 상호작용 하지 않음이 확인 된 바와 같이 Tcoil에 의해 CMV 2a 단백질의 methylation은 유도 되지 않음을 확인 할 수 있었다 (Figure 16, lane 7).

Control 실험으로 GST protein은 GST-CMV 1a MT, CMV 1a Hel domain 및 CMV 2a에 methylation을 유발 하지 않음을 확인 할 수 있었다 (Figure 16, lanes 2, 3 and 4). 또한 GST::Tcoil, GST::CMV 1a MT, CMV 1a Hel 모두 auto-methyltransferase activity가 없음을 확인 했다 (Figure 16, lanes 8 and 9). 이 실험의 positive control은 기존에 보고 된 protein arginine methyltransferases (PRMT)과 RNA-binding proteins을 사용하였다 (Figure 16, lanes 1). 이 결과를 통하여 Tcoil은 methyltransferase activity를 가지며 CMV 1a 단백질에 methylation을 유발함을 확인 할 수 있었다.

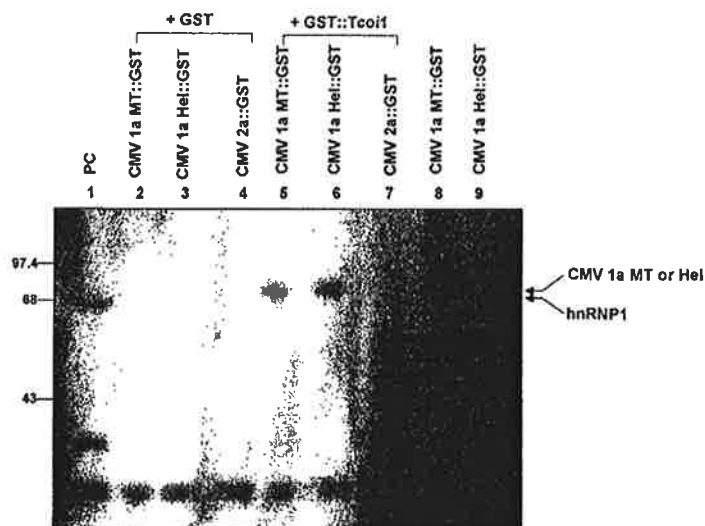


Figure 16. Methylation of the CMV 1a MT domain and CMV 1a Hel domain by purified Tcoil.

The protein methyltransferase assay was carried out with same amounts (10 µg) of purified proteins as indicated combination in the presence of 0.25 µCi of [³H]SAM. Lanes: PRMT1 and hnRNP1 (as positive control (PC)); GST and GST::CMV 1a MT; GST and GST::CMV 1a Hel; GST and GST::CMV 2a; GST::Tcoil and the GST::CMV 1a MT GST::Tcoil and GST::CMV 1a Hel GST::Tcoil and GST::CMV 2a; only GST::CMV 1a MT; only GST::CMV 1a Hel. The reaction products were separated by SDS-10% PAGE and visualized by autoradiography. The hnRNA1 (59 kDa), GST::CMV 1a MT (77 kDa) and GST::CMV 1a Hel (65 kDa) bands are indicated by arrows. Molecular size markers are indicated at the left (in kilodaltons).

⑦ 세포 내에서의 Tcoil 단백질 발현 위치 관찰

-식물 세포내에서의 Tcoil 단백질의 *in vivo* Tcoil localization을 확인하기 위하여 full length *Tcoil* cDNA에 termination codon을 제거 후 N-말단 부위에 fluorescent protein (GFP)과 융합 후 *Arabidopsis* protoplasts에 transformation 유도 를 하였다. GFP protein과 Tcoil::GFP 융합 단백질의 localization을 확인 해 본 결 과 Tcoil::GFP과 GFP 모두 세포 내 세포질에서 발현 되고 있음을 확인 할 수 있었 다 (Figure 17).

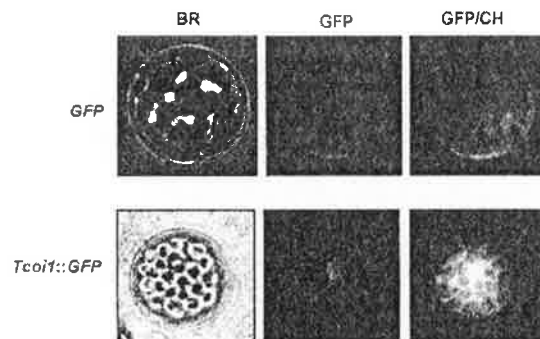


Figure 17. Subcellular localization of *Tcoil::GFP* in *Arabidopsis* protoplasts.

The control GFP (upper) or *Tcoil::GFP* fusion (lower) construct was transformed into the *Arabidopsis* protoplasts. Expressions of the introduced genes were examined after 24 h using a fluorescence microscope. The left panel shows light

microscope result. And the right panel show overlap of GFP (green) and chlorophyll (CH) (red).

⑧ BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)을 이용한 Tcoil 단백질과 CMV 1a 단백질 간의 *in planta* 상호작용 확인

-FRET과는 달리 donor로서 형광물질이 아닌 발광물질 (luminescent material)을 이용하여 두 분자 사이의 상호작용을 확인 할 수 있는 BRET을 이용하여 Tcoil 단백질과 CMV 1a 단백질 간의 상호작용을 식물 세포내에서 관찰하기 위하여 yellow fluorescence protein (YFP)에 Tcoil, Tcoil_{d3}, Tcoil-MT를 fusion하여 *Arabidopsis* protoplast에 transformation 후 그 발현을 관찰 하였다 (Figure 18). 또한 CMV 1a는 Bright Renilla luciferase (BRRL)에 fusion 하여 Tcoil::YFP, Tcoil_{d3}::YFP, Tcoil-MT::YFP와 함께 *Arabidopsis* protoplast에 co-transformation 후 BRET 반응을 관찰하였다. 그 결과 yeast two-hybrid system 및 *in vitro* 상에서 확인했던 바와 같이 Tcoil::YFP과 Tcoil-MT::YFP은 CMV 1a::BRRL과 상호작용 하여 BRET 반응이 일어나나 Tcoil의 MT domain이 deletion 된 Tcoil_{d3}::YFP은 CMV 1a::BRRL과 상호작용 하지 못함을 확인 할 수 있었다 (Figure 18).

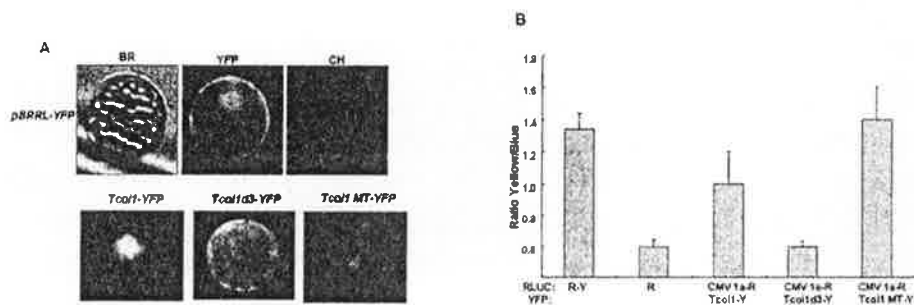


Figure 18. BRET experiment between Tcoil and CMV 1a.

(A) Tcoil::YFP, Tcoil_{d3}::YFP, Tcoil-MT::YFP and pBRRL-YFP (as a positive control) expression conformation in the *Arabidopsis* protoplast.

(B) BRET graph showing interaction of CMV1a::BRRL with Tcoil::YFP or Tcoil-MT::YFP. CMV 1a::BRRL with Tcoil_{d3}::YFP does not show BRET.

3. Tcoi2

① Yeast two-hybrid screening을 통한 *Tco2*의 분리.

-CMV에 감염된 잎에서 뽑아낸 RNA와 yeast GAL4 activation domain (AD) expression vector를 가지고 tobacco cDNA library를 구축했다. CMV 1a protein과 상호작용하는 plant host factor를 분리하기 위하여 cDNA library를 full-length CMV 1a를 가지고 screening했다. Screening된 1.5×10^6 개의 독립적인 clone들로부터 368개의 positive clone들을 동정했다. 이 368개의 clone들을 가지고 re-transformation과 colony-lift assay를 수행한 결과 14개의 clone들이 β -galactosidase activity를 나타내었다. 이 14가지의 clone들을 가지고 sequence analysis를 수행한 결과 novel putative kinase protein을 암호화하고 있다고 생각되어지는 밝혀지지 않은 한 개의 clone을 찾아냈다. 이 cDNA insert를 *Tcoi2* (Tobacco CMV 1a interacting protein 2)로 명명했으며, 특성을 밝히는 과정을 수행했다.

CMV 1a와 *Tcoi2*와의 상호작용은 추가적인 plasmid combination의 이용하여 확인되어졌고, HIS3와 *LacZ* reporter gene들과의 자발적인 활성여부, GAL4 DNA-binding domain (BD) 또는 GAL4 AD와의 직접적인 상호작용 가능성 여부, 암호화된 GAL4 fusion protein (Table 4)의 강한 발현에 의해서 야기되는 잠재적인 인공산물의 생성 여부를 시험하기 위하여 구축되어졌다. pAS2-1::CMV 1a(bait)와 pACT2::Tcoi2(pre) 모두 다 HIS3 or lacZ reporter gene과 단독으로는 활성을 나타내지는 않았다. *Tcoi2* (pACT::Tcoi2에서 발현된)는 GAL4 BD 그 자체와는 상호작용하지 않았지만, CMV 1a (pAS2-1::CMV 1a에서 발현된)는 GAL4 AD와 그 plasmid가 GAL4 BD 또는 GAL4 AD를 가지고 있는 parent plasmid와 co-transformation 할 때 상호작용 하는 것이 관찰되었다. CMV 1a protein은 putative methyltransferase domain(MT)과 putative helicase domain (Hel)이라는 두 개의 functional domain을 가지고 있다. 어떤 CMV 1a domain이 *Tcoi2*와 상호작용 하는 시험하기 위하여, 각각의 domain을 GAL4 BD와 결합시켰다. *Tcoi2*는 CMV MT (aa 1 to 456)와는 상호작용하는 것이 관찰되었지만, CMV Hel (aa 646 to 993)은 상호작용하지 못하는 것이 관찰 되었다. 다음으로 *Tcoi2*와 2a, MP, CP와 같은 다른 CMV encoded protein과의 상호작용도 시험했다. *Tcoi2*는 다른 CMV-encoded protein들과는 상호작용하지 않았다. 이러한 결과들은 *Tcoi2* CMV 1a의 MT를 통해서 특이적으로 상호작용한다는 것을 보여준다.

Table 4. Interaction test of Tcoi2 and CMV 1a in yeast cells.

GAL4 BD ^a Vector	GAL4 AD ^b Vector	His	β-Galactosidase activity ^f
pAS2-1::CMV 1a	- ^c	-	-
- ^c	pACT2::Tcoi2	-	-
pAS2-1::CMV 1a	pACT2	-	-
pAS2-1	pACT2::Tcoi2	-	-
pAS2-1::CMV 1a	pACT2::Tcoi2	+	+
pAS2-1::CMV 1a-MT ^d	pACT2::Tcoi2	+	+
pAS2-1::CMV 1a-Hel ^e	pACT2::Tcoi2	-	-

^a BD, binding domain
^b AD, activation domain
^c No coexpressed vector
^d Methyltransferase domain of CMV 1a protein
^e Helicase domain of CMV 1a protein
^f The colony-lift filter assay and liquid culture assay using o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside as substrate

② *Tcoi2*의 sequence analysis와 genomic DNA gel blot analysis.

-Full-length cDNA clone들의 분리를 위하여 5×10^4 개의 clone들이 yeast two-hybrid screening에서 얻어진 random-primed ³²P-labeled cDNA fragment를 probe로 사용하여 cDNA library로부터 screening 되어졌다. 그 결과로 571개의 아미노산 잔기 단백질을 암호화하고 있는 1,995bp의 cDNA가 밝혀졌다. Position-specific iterative Basic Local Alignment Search Tool (PSI-BLAST)를 이용하여 *Tcoi2*의 165에서 435번째 아미노산 잔기 사이에 tyrosine protein kinase를 포함하고 있는 kinase domain을 가지고 있다는 것을 예견할 수 있었다(Figure 18). Homology search를 통해서 예견되어진 그것의 염기서열이 *Arabidopsis thaliana*의 putative kinase(71%)와 *Oryza sativa*의 putative receptor kinase(57%)에서 매우 높은 일치율을 보인다는 것을 알 수 있었다 (Figure 19). Tobacco gene으로서의 *Tcoi2*를 검증하기 위하여, total genomic DNA를 분리해서 *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*의 3가지 제한효소로 digestion시켰다. 그 DNA를 agarose gel상에서 분리시켰고, 그 blot을 medium stringency상태하에서 *Tcoi2* ORF에 특이적인 방사능 표지된 probe와 혼성체화 시켰다. Figure 18에서 볼 수 있는 것처럼 *Tcoi2*와 혼성체화 된 두 개의 DNA 단편들은 tobacco genome안에 복제된 *Tcoi2*와 사한 염기서열이 존재한다는 것을 나타낸다.

A

TAAGATACCACGCT 15
 ATG CTG ACT TAT GAA AGA TTT TGG AAA AAG AAG GTG CCT CTC AAT AGA ACG 66
 M L T Y E R F W K K K V P L N R T 17
 ATG TTT GGG GAT TAT GAA GTG ATG CAC ATT ATC TAT CCA GGG CTG CCT TCT 117
 M F G D Y E V M H I I Y P G L P S 34
 TCT CCT CCA TCT GGC ATT GAT TCT GGT AAT GGT CCA ACT GGA AGT GCT GTC 108
 S P P S G I D S G N G P T G S A V 51
 AAT CAA CAA TTC CCT ATT ACT GCT GAT TTT GTA AAC AAG AGT CAC ACA ATG 219
 N Q Q F R I T A D F V N K S Q R M 58
 ACT CGC GCA GTC ATT TTT CTC ATT GCT TCA CCA GCA TTA GTA CTC TTG GTG 270
 S P R V I F L I A S S A L V L L V 85
 GTA TGC TGT GGT CCA GTA CTT GTC TTA AAA TGC AGG AGG ACT GGC GCA 321
 V C C G A L V V L L K C R R T G R 102
 CGC TCA AAT GCT GTT GGT CCA GTG TTT ACA CCA TCT ATG CAC AAG ACA TGT 372
 P S N A V G P V F T P S M H K R S 119
 GGT AAG GAA ATT GGG TCG ACA ATA TCA AGT ACC CGC ACT AGT TCA ACA TCG 126
 G K G I G S T I S S S P T S S T S 433
 ATT TCT CTC ATT TCT GCT ATG CCT GCT TCT ATC TCT GTC AAA ACA TTT 474
 I S L I S A M P A S I L S V K T F 153
 AGC CTT GCG GAG CTT GAG AGG ACA ACT GAC AAG TTT AGT TTA AAA AGG GTT 525
 E L V R N G S V E S H L H G R D G 255
 T L A E L E R A T D K P S L K R V 170
 TTA GGT GAA GGA GGA TTT GGA GCT GTT TAT CAT GGT ATC TTA GAA GAC AAG 576
 L G E G G F G R V Y H G I L E D R 184
 ACA GAA GTT GCG GTC AAM GTA CTG ACT AGG GAT AAC CAA AAT GGA GAT GCT 627
 T E V A V K V L T R D N Q N G D R 204
 GAA TTT AIT GCT GAA GGT GAG ATG CTA AGC GGA TTG CAT CAC GGT AAC CTG 678
 E P I A E V E M L S R L H R N L 221
 GTG AAA TTA ATT GGT ATA TGC AGT GAA GAG GCG ACT CGC AGC TTG GTA TAT 729
 V K L I G I C S E B E R T R S L V Y 238
 GAA CTT GTT CCG AAC GGT AGT GTG GAG TCT CAT TTG CAT GGA AGA GAG GGG 780
 E L V R N G S V E S H L H G R D G 255
 AGA AAA GAG CCA CTT GAT TGG GAT GTG AGG TTG AAA ATT GCT CTT GGT GCT 831
 P K P L D W D V R L V I A L C A 272
 CGG AGA GCA CTA GCT TAC CTT CAT GAA GAT TCT AAT CCT GCT GTA ATT EAT 882
 L A Y L H E D S N P R V I J H 289
 CCT GAT TTT AAA CCG AGC AAT GTT TTG TTA GAA GAT GAC TTG ACG CGC AAC 933
 R D F K A S N V L L E D D F T P K 306
 GTT GCA GAT TTT GCG TTA CCA AGG GAA CCA ACC GAA GGA AGT CAC CAC ATA 984
 V A D F G L A R E A T E E G S H H I 323
 TCT ACA ACA GTC ATG GCA ACT TTT GGG TAT GTT GCT CCT GAA TAT GCA ATG 1035
 S T R V M G T P G Y V A P E Y A M 340
 ACC GGA CAC CTA CTT GTT AAA AGT GAT GTG TAT AGT TAT GGA GTT GTA TTA 1088
 T G R L L V K S D V Y S Y G V V L 357

TTG GAC CTT CTC TCC GGA AGA AAA CCT GTG GAC ATG TCT CAA CCT CCT GCA 1137
 L E L L S G R K P V D M S Q P P G 374
 GAA GAA AAC CTG GTA ACT TGG GCG CCA CCT CTT CTG ACC ACT AGA GAA GGT 1188
 E E N L V T W A R P L L T T R E G 391
 TTG GAG CAA CTT GTC GAT CTT TTT TTG GCT GCA AGC TAT GAC TTT GAT GAT 1239
 L E Q L V D P S L A G S Y D F D D 408
 ATG GCA AAG GTG CCT GCC ATT GCT TCA ATG TGC GTT CAC CCG GAG GTG ACT 1290
 N A K V A A I A S M C V H P E V T 425
 CAA AGG CCA TTT ATG GGA GAA GTG GTG CAA GCT CTC AAA CTA ATT TAT AAT 1341
 Q R P P M G E V V Q A L K L I Y N 442
 GAC AAT GAT GAA ACT TCT GCT GAT GGA TGT ACC CAG AAG GAG TCT TCT CTG 1392
 D N D E T C A D G C S Q K E S S L 459
 CCA GAT TCA GAT TTC AAA GGT GTC CCT TCC GAT AGC AGT TGG TGG AAT GCT 1443
 P D S D F K G V P S D S S W W N A 476
 GGT GGG GTT ACA CCA AGA TTA ACA TAT GGA CAA GGC TCC ACT TTC ATG ACC 1494
 G G V T P R L T Y G Q A S T F N T 490
 ATG GAT TAC AGT TCT GGT CCG CTT GAA GAG TTC GAA AAC AGA CCG TTT TCA 1545
 N D Y S S G P L E B E F E N R P F S 510
 GCT TCA AGT TTT AAT CTT GGT GGA GGG GGG GTT TTA ACA ATA AGC CAC GGT 1596
 A S S F N L G G G A G L T I S H G 527
 AAC AGA TCA GGT CTT TTG AGG ACT GTA AGG AGT AAA CCT GCT CTC TAT AGG 1647
 N R S G P L R T V R S K P A L Y R 544
 TTA AGG GCG AGT ATG AGT GAA CAC GGT GCA CTT CTT CCA ACA CAT GAT TGG 1698
 L R G S N S E H G A L L P R H D W 561
 AGG GAT GCG ACC AAT TAT GAT CCT TCT TTT TAG AGT GAT TTT GAT TAC GAT 1754
 R D G T N Y D A S Y 571
 CCGAGGCGCTTCTATTGGGAAAAAGATGGTCTCCGGGTAGATTAGGAGTTTGAATTCGGG 581
 CTGTATCCCTGGAGAGTGGACTAACCTCTCAATTTGGTAATCTACACTATTATTATAGACAG 1888
 GAAGATAACAGCACCTCCTCTGTATATGCTGCAATTAACCTTTTCTTATGCTCAATATGG 1955
 GATTGGACTACTGCTTCTTAAAAAAMAAAAA 1995

B

129	S S F T S S I T S I D L I S A M P E A S I L S V K T F T L A K L	Tco12
313	L S A H S S G S Q S D S L M S H A T C A L L S V K T F L L S L L	Arabidopsis
300	V S R V S S A S A S H S H T V A L T T I A K L G S L G S L G A	Oryza
159	E L A T D R K F S L K R V L G E G G F G R V Y M D I L E S L A T	Tco12
343	E K A T D R K F S L K R V L G E G G F G R V Y M D I L E S L A T	Arabidopsis
310	E K A T D R K F S L K R V L G E G G F G R V Y M D I L E S L A T	Oryza
189	F V A V K L L T R D N Q M D R E F I A C V E H L S R L H H	Tco12
373	F V A V K L L T R D N Q M D R E F I A C V E H L S R L H H	Arabidopsis
368	F T T A V V L T R D N Q M D R E F I A C V E H L S R L H H	Oryza
219	N N L V K L I G I C L A K I G L A T A L S Y E L V A N G S E V S	Tco12
403	N N L V K L I G I C L A K I G L A T A L S Y E L V A N G S E V S	Arabidopsis
398	N N L V K L I G I C L A K I G L A T A L S Y E L V A N G S E V S	Oryza
749	L L H D R L G R L K F L D W D V R L K I A L C A A R G L A Y	Tco12
433	L L H D R L G R L K F L D W D V R L K I A L C A A R G L A Y	Arabidopsis
428	L L H D R L G R L K F L D W D V R L K I A L C A A R G L A Y	Oryza
279	L N E D S N P R V I H R D F K A S N V L L E D D F T P K V A	Tco12
458	L N E D S N P R V I H R D F K A S N V L L E D D F T P K V A	Arabidopsis
458	L N E D S N P R V I H R D F K A S N V L L E D D F T P K V A	Oryza
305	D F G L A R E A T E G S L H I S T R V M G T F G Y V A F E Y	Tco12
486	D F G L A R E A T E G S L H I S T R V M G T F G Y V A F E Y	Arabidopsis
483	D F G L A R E A T E G S L H I S T R V M G T F G Y V A F E Y	Oryza
339	A M T G H L L V K S D V Y S Y G V L L E L L S G R K P V D	Tco12
518	A M T G H L L V K S D V Y S Y G V L L E L L S G R K P V D	Arabidopsis
518	A M T G H L L V K S D V Y S Y G V L L E L L S G R K P V D	Oryza
349	H S Q P F G E E N L V T H A R P L L T T R G L C Q L V D R	Tco12
548	H S Q P F G E E N L V T H A R P L L T T R G L C Q L V D R	Arabidopsis
548	H S Q P F G E E N L V T H A R P L L T T R G L C Q L V D R	Oryza
395	G A A G S Y L D T D M A K V A I A S M C V N F I E V L I G R D	Tco12
578	G A A G S Y L D T D M A K V A I A S M C V N F I E V L I G R D	Arabidopsis
573	G A A G S Y L D T D M A K V A I A S M C V N F I E V L I G R D	Oryza
429	F H G E V V Q A L K L I Y N D A D E T C G G D Y C S N D S S	Tco12
608	F H G E V V Q A L K L I Y N D A D E T C G G D Y C S N D S S	Arabidopsis
608	F H G E V V Q A L K L I Y N D A D E T C G G D Y C S N D S S	Oryza
459	L P D S L D F K S - - V - - F S D S G W N N A G G V T P R L	Tco12
638	V E D A A D E G D L A - - E S A S M M N - - - L L E L L	Arabidopsis
638	C D Q Y N M Y H D A L L D S D G L M H - - - R S N F	Oryza
484	T - - T H Q A S T I - - - H T H D Y S S O P L E K F E R R T	Tco12
663	A - - V C G A R S L - - - T T M D Y S G O L R D M E H E R L	Arabidopsis
665	S G F F O N H N F L P V I T H E Y S G O R T E G A R D P R F	Oryza
510	F A S S F H L D G A G L T I S N O N R S O P L E T V R S K	Tco12
683	F A S S F P R V L G L T I L - - - F H R S O P L R P M L S R	Arabidopsis
695	A L L T G G H A Q S F A L L - - - Q U E R S N L I M H K K K L	Oryza
540	P A L L K L K R S H E C G A - L L F R H D H R D O T N Y D	Tco12
715	R H F L R L G S R S C F G C P S S L M L D S G - - - N	Arabidopsis
721	A K Y R I S L R S F L E R H D - - - D K - - - - - - - - -	Oryza

C

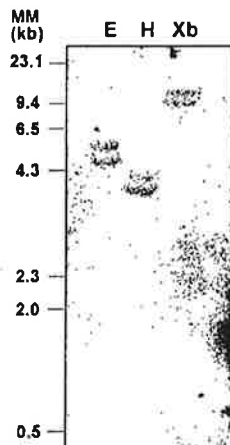


Figure 19. Sequence analysis of the *Tcoi2* cDNA clone and genomic DNA gel blot analysis. (A) Nucleotide and predicted amino acid sequences of *Tcoi2*(GenBank accession number DQ202472). Asterisk shows the termination codon. The region corresponding to the kinase domain is boxed. (B) Comparison of the predicted amino acid sequence of *Tcoi2* with a putative kinase of *Arabidopsis thaliana*(GenBank accession number AAM91792) and PERK1 of *Oryza sativa* (GenBank accession number XP468388). Identical amino acids (consensus from a minimum of three sequences) are boxed. (C) Genomic DNA gel blot analysis. Tobacco genomic DNA was digested with *EcoRI* (E), *HindIII* (H), or *XbaI* (Xb), and separated on 0.8% agarose gel. After transferred to a Nytran Plus membrane, the blot was hybridized with ³²P-labeled full-length *Tcoi2* cDNA probe under medium stringency. Autoradiograms were visualized with a Fuji-BAS 2500 phosphor image analyzer. DNA size standards (MM) are shown at left.

③ *In vitro* binding analysis.

CMV 1a와 *Tcoi2*와의 protein-protein interaction을 검증하기 위해서, binding assay를 *in vitro*에서 수행했다. 먼저, *Tcoi2*의 coding region을 glutathion S-transferase (GST) fusion protein과 같이 발현시키기 위해서 bacterial expression plasmid에 subcloning하였고 그런 다음 그 재조합 protein들을 glutathione-agarose chromatography를 이용하여 정제하였다. Figure 19A에서 볼 수 있듯이, 거의 90kDa 크기의 GST-*Tcoi2* protein을 얻어졌다. binding assay를 위하여, ³⁵S-Met-label된 CMV 1a MT가 cell-free translation system을 이용하여 *in vitro*상에서 생합성되었다. ³⁵S-Met-label된 CMV 1a Hel과 CMV 2a 또한 yeast cell 내에서 그것들이 상호작용하지 않을 때 negative control로써 보기위해 *in vitro*상에서 생합성 되었다. 각각의 ³⁵S-Met-label된 polypeptide synthesis는 확인하였고 그런 다음에 GST-*Tcoi2* fusion protein과 함께 배양했다. 그 배양액은 낮은 온도에서 glutathione-agarose bead와 상호작용 할 수 있게 했고, 그 bead 추출물을 SDS-PAGE를 이용하여 분석했다. glutathione-agarose bead에 걸리진 추출된 GST-*Tcoi2* fusion protein은 SDS gel에 용해된 band에 의해서 볼 수 있는 것과 같이 CMV 1a MT polypeptide와 복합체로 형성되어졌다는 것이 밝혀졌다 (Figure 20B, lane 5). 반대로 CMV 1a MT 또는 CMV 1a Hel polypeptide를 GST control protein과 배양했을 때는 상호작용하지 않음이 관찰 되었다 (Figure 20, lanes 2 and 3). 이러한 결과들은 *Tcoi2*와 CMV 1a MT간의 분자 내에서의 결합이 *in vitro*상에서 효과적으로 일어나는 것을 분명히 보여주고 있다.

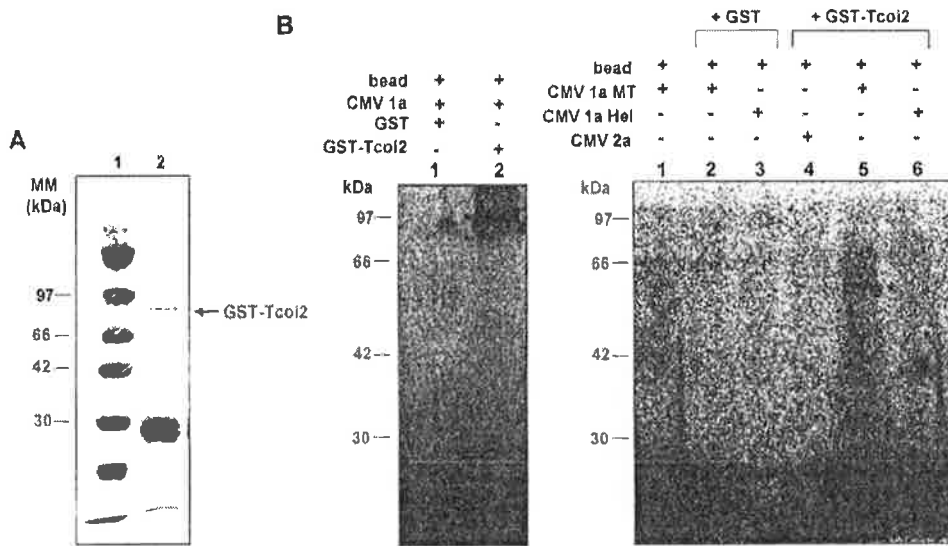
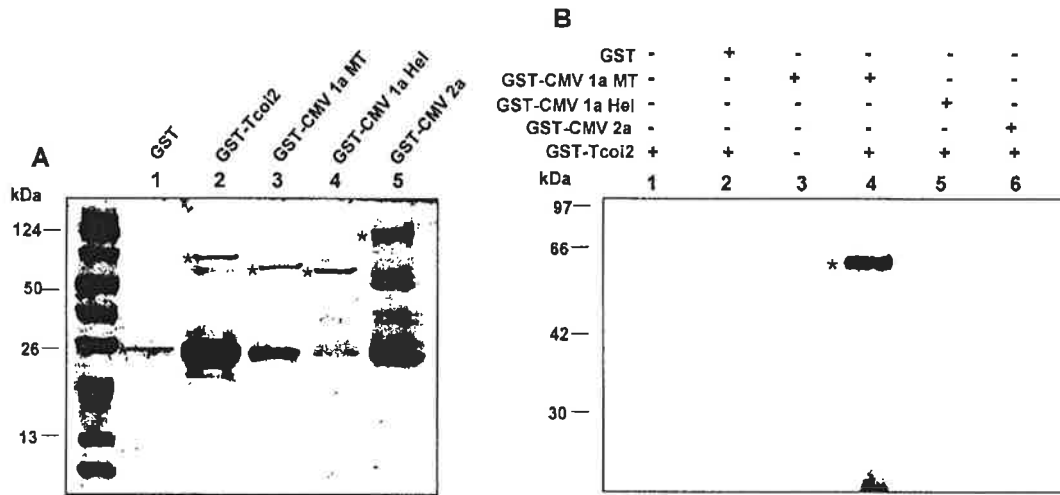


Figure 20. *In vitro* interaction test of recombinant Tcoi2 protein and the CMV protein. (A) The purification of recombinant GST-Tcoi2 protein via affinity chromatography. Protein expression was induced in *E. coli* that was transformed with the GST expression plasmid. Recombinant GST-Tcoi2 protein, purified on glutathione-agarose beads, was run on SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, protein molecular weight maker lane 2, purified GST-Tcoi2 fusion protein (5 μ g). Arrowhead indicates the position of purified recombinant GST-Tcoi2 proteins (~ 90 kDa). (B) *In vitro* binding assay of Tcoi2 and the CMV 1a protein (i) or CMV 1a MT protein (ii). GST-Tcoi2 protein was incubated with *in vitro* translated, 35 S-Met-labeled CMV 1a, CMV 1a MT, CMV 1a Hel or CMV 2a in the presence of glutathione-agarose beads. As a control, GST was incubated with 35 S-Met-labeled CMV 1a, CMV 1a MT or CMV 1a Hel. Precipitates from the binding mixture were subjected to SDS-PAGE and proteins were visualized by autoradiography. Asterisks on the autoradiogram indicate the position of the 35 S-Met-labeled CMV 1a (97 kDa) or CMV 1a MT (50 kDa).

④ Tcoi2의 kinase activity.

-Tcoi2가 protein kinase activity를 가지고 있는지 여부를 시험하기 위해서, 정

제된 GST-Tcoi2 fusion protein을 이용하여 in vitro 상에서 kinase assay를 수행하였다. 이 assay를 위해서, GST-CMV 1a MT, GST-CMV 1a Hel 그리고, GST-CMV 2a protein들을 glutha-thione-agarose chromatography를 통해서 정제했고, phosphorylation 반응을 위한 기질로서 사용하였다 (Figure 21A). Figure 20B에서 볼 수 있듯이, *E.coli*에서 생합성 된 다음 정제되어진 GST-Tcoi2는 autophosphorylation activity를 가지고 있지 않았고 (Figure 21B, lane 1), GST control protein(lane 2), GST-CMV 1a Hel (lane 5)뿐만 아니라 GST-CMV 2a(lane 6)를 인산화하지 못했다. 하지만, GST-Tcoi2는 재조합 GST-CMV 1a MT를 매우 효과적으로 인산화했다(lane 4). 이러한 data들은 Tcoi2가 CMV 1a MT protein을 특이적으로 인산화 할 수 있다는 것을 암시한다.



⑤ Tcoi2의 세포내의 위치.

-Tcoi2의 세포내 위치를 조사하기 위하여, 대조구로 green fluorescence protein (GFP)을 가지고 있는 텅빈 plasmid 그 자체와 Tcoi2::GFP fusion gene을 *Arabidopsis*에서 준비된 protoplast에 polyethylene glycol-mediate transformation을 이용하여 transfection 시켰다. 형광신호들은 24시간 배양 후에 현미경으로 관찰했다. Figure 22A에서 볼 수 있듯이, Tcoi2::GFP는 핵 주위를 둘러싸고 있는 액포와 같은 곳에서 희미한 형광이 처음 위치했다. 형광 신호는 작고, 크기가 일정하지 않은 분산된 세포질 조각들과 세포질에서 규칙적으로 분포되는 것과는 대조적으로 세포내에서 불규칙적으로 관찰되었다.

위에서 기술한바와 같이, Tcoi2의 위치에서 나타난 형광 신호들의 그물 모양의 경향은 소포체 (ER)에서의 분포와 유사했다. Tcoi2가 ER과 결합되는지 여부를 결정하기 위해서, ER maker로써 ER luminal binding protein (Bip)를 이용하여 subcellular co-localization test를 수행했다. 이 assay를 위해서, Bip가 red fluorescent protein (RFP)와 tagging되었고, 그런 다음 그 plasmid는 Tcoi2::GFP를 운반하는 plasmid와 *Arabidopsis*에 co-transfection 되었다. Bip는 전에 보고되었던 것과 유사하게 핵 주변부에 위치되었는데, 핵을 둘러싼 작은 집단이 보였고, 세포질과 형광체들 내부에서는 분산되어 있었으며 (Mas, and Beachy,1999), Tcoi2::GFP는 Bip::RFP와 완벽하게 겹쳐졌다(Figure 22B). 따라서, 적어도 일정 부분의 탐지되어진 Tcoi2::GFP는 ER과 결합한다는 결론을 내렸다 (yellow in merged image).

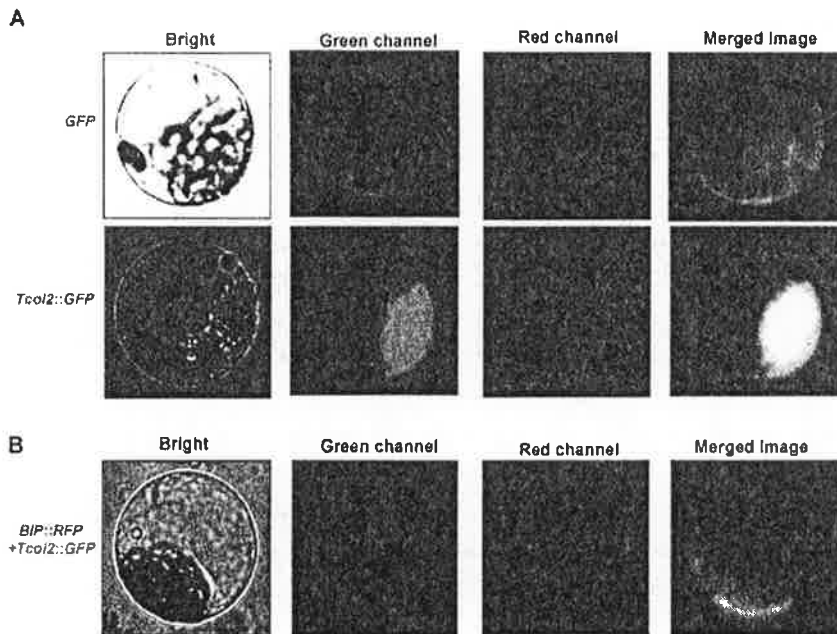


Figure 22. Subcellular localization of Tcoi2::GFP in *Arabidopsis*. (A) Subcellular localization of GFP control and GFP-fused Tcoi2 in *Arabidopsis* protoplasts. The first panel shows the bright field image. The second panel shows the GFP images. The third panel shows the chlorophyll (CH) and the last panel shows overlap of GFP (green) and CH (red). (B) Subcellular co-localization of Bip::RFP with Tcoi2::GFP in *Arabidopsis* protoplasts. Expressions of the introduced genes were examined at 24h after transformation. The first panel shows the bright field image. The second panel shows the GFP images. The third panel shows the RFP images and the merged images in fourth panel represent digital superimpositions of red and green signals in which areas of fluorescence co-localization appear yellow.

4. *AtCOIK*

① *AtCOIK*의 분리

-담배에서 CMV 1a 단백질과 상호작용 하는 것으로 분리한 *Tcoi2*와 가장 유사한 sequence homology를 갖는 *Arabidopsis* 유전자를 *AtCOIK*라고 명명하고 *Arabidopsis*의 cDNA를 주형으로 하여 *AtCOIK* specific primer set인 *AtcoikS* (5'-ACGGATCCCCATGTTTTCCAGTAGCGCCAG-3')과 *AtCOIKAS* (5'-ACGGA TCCCGAGCCAGTCACCATTGCCGGAC-3')로 full length *AtCOIK*를 분리하였다. 분리 한 full length *AtCOIK*를 yeast two-hybrid vector에 cloning 후 CMV 1a 단백질과의 상호작용을 확인 해 보았다. 그 결과 담배 *Tcoi2*의 결과와 같이 *AtCOIK*가 CMV 1a 단백질과 상호작용 함을 확인 할 수 있었다 (Figure 23).

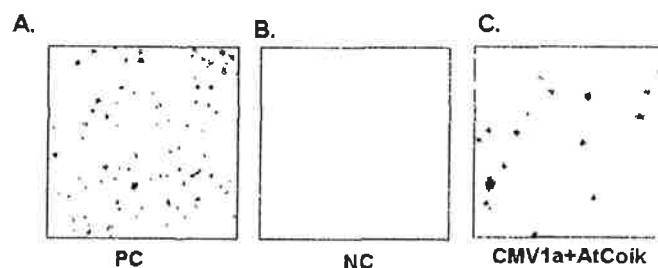


Figure 23. Colony-lift filter β -galactosidase assays. A. Positive control. B. Negative control. C. *AtCoiK* and CMV 1a. The blue spots indicate β -galactosidase activity that utilized the X-gal substrate.

② *AtCOIK* 유전자의 genomic organization과 tissue-specific expression 관찰

-Full-length *AtCOIK*를 probe로 해서 CMV에 대하여 susceptible ecotype인 Col-0와 resistance ecotype인 C24을 이용하여 Southern blot analysis를 실시 해 본 결과 이 두 가지 ecotype genome 상에 *AtCOIK*가 1 copy로 존재하고 있음을 알 수 있었다 (Figure 24). 또한 *AtCOIK* 유전자의 기관 별 발현 정도를 확인 해 본 결과 꽃과 뿌리, 잎, hypocotyl에서 모두 발현 되나 silique에서는 발현 되지 않는 유전자임을 알 수 있었다. 또한 *AtCOIK*는 Col-0와 C24 ecotype 모두에서 발현 되고 있는 유전자임도 확인 할 수 있었다 (Figure 24).

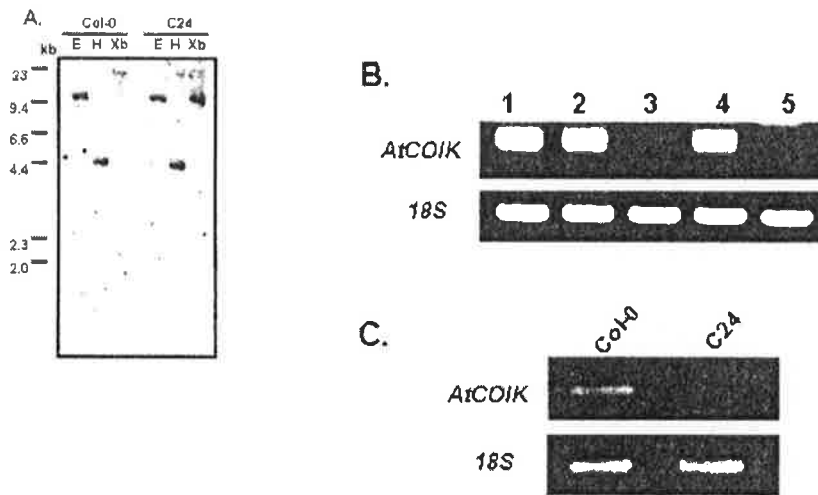


Figure 24. Southern blot analysis and comparison of *AtCOIK* expression in different organs.

(A) *Arabidopsis* genomic DNA of ecotype Col-0 and C24 were digested with *EcoRI* (E), *HindIII* (H), or *XbaI* (X), and separated on 0.8% agarose gel. After transfer to a Nytran Plus membrane, the blot was hybridized with ^{32}P -labeled full-length *AtCOIK* cDNA probe under medium stringency. Autoradiograms were visualized with a Fuji-BAS 2500 phosphor image analyzer. DNA size standards (MM) are shown at left.

(B) Accumulation of *AtCOIK* transcripts in different organs. Lane 1, flower; lane 2, root; lane 3, leaf; lane 4, hypocotyl; lane 5, silique. The transcripts level of ribosomal protein *18S* was detected as internal standard for cDNA quantity evaluation.

(C) Accumulation of *AtCOIK* in *Arabidopsis* Col-0 or C24 ecotype. Equal amounts of total RNA were used as templates in RT-PCR with appropriate specific primers to *AtCOIK*. The RT-PCR products were separated by agarose gel electrophoresis.

③ CMV 처리에 대한 *AtCOIK* 유전자의 발현 양상 관찰

-CMV 처리에 대해 *AtCOIK* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위하여 3주간 키운 Col-0와 C24 각각의 잎에 CMV를 처리 후 RNA를 분리 하여 *AtCOIK* 유전자 specific primer set을 이용하여 RT-PCR을 실시 하였다. 또한 wounding에 의한 *AtCOIK* 유전자의 발현 변화를 확인 하기 위하여 virus inoculation buffer에 carborundum 만 첨가 하여 담배 잎에 문질러 준 후 (mock) RNA를 분리 하여 상기 한 방법대로 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 Figure 25에서 보여 지듯이 mock 처리에 대해서는 *AtCOIK* 유전자의 발현 양상이 변화가 없음을 확인 할 수 있었고 Col-0에서는 CMV 처리에 대해서는 *AtCOIK* 유전자 발현이 CMV 처리 2일 부터 증가하기 시작하여 4일까지 지속 됨을 확인 할 수 있었다. 그 반면 C24에서는 CMV 처리에 대해서는 *AtCOIK* 유전자 발현이 변화가 없음을 확인 할 수 있었다. 그리고 주형으로 쓰여진 cDNA의 internal standard로 18S 의 발현 정도를 비교 해 보았다. 이 결과를 통하여 *AtCOIK* 유전자는 CMV 감염에 대하여 susceptible ecotype인 Col-0에서만 그 유전자 발현이 증가함을 확인 할 수 있었다.

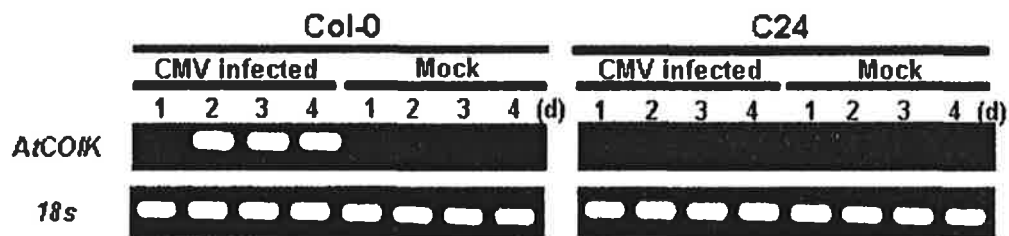


Figure 25. RT-PCR analysis of *AtcoiK* gene upon CMV-Kor inoculation.

Total RNA was extracted from leaf tissues at 1, 2, 3, and 4 day post inoculation (dpi). Tissue was isolated from the leaves of either CMV- or mock-inoculated *Arabidopsis* ecotype Col-0 or C24. cDNAs were synthesized from the total RNAs, and RT-PCR was conducted with gene-specific primers. As internal

standard for cDNA quantity evaluation, the level of *18S* was monitored.

④ 여러 호르몬 처리에 대한 *AtCO1K* 유전자의 발현 양상 관찰

-여러 호르몬 처리 및 abiotic stress 대해 *AtCO1K* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위하여 3주간 키운 Col-0 잎에 NaCl, ABA, BAP, IBA 또는 GA를 처리 후 RNA를 분리 하여 *AtCO1K* 유전자 specific primer set을 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 Figure 26에서 보여 지듯이 이러한 호르몬 및 abiotic stress 처리에 대해서는 *AtCO1K* 유전자의 발현 양상이 변화가 없음을 확인 할 수 있었다.

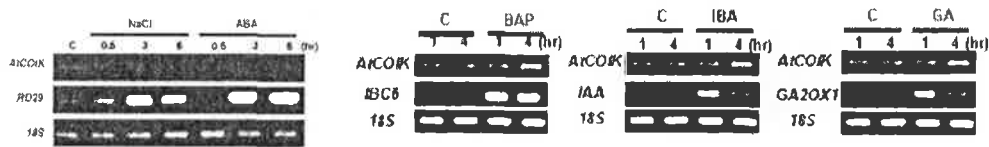


Figure 26. RT-PCR analysis of *AtCO1K* gene upon abiotic stresses or various hormone..

The rd29A was used as a positive control for the NaCl or ABA treatment. IBC6, IAA or GA2OX1 was used as a positive control for the BAP, IBA or GA treatment. Treatments are as follows: C, no treatment; NaCl, 200 mM; ABA, 100 μ M; BAP, 50 μ M; IBA, 50 μ M; GA, 50 μ M.

⑤ 세포 내에서의 *AtCO1K* 단백질 발현 위치 관찰

-식물 세포내에서의 *AtCO1K* 단백질의 *in vivo* localization을 확인하기 위하여 full length *AtCO1K* cDNA에 termination codon을 제거 후 N-말단 부위에 red fluorescent protein (RFP)과 융합 후 *Arabidopsis* protoplasts에 transformation 유도를 하였다. RFP protein과 *AtCO1K*::RFP 융합 단백질의 localization을 확인 해 본 결과 *AtCO1K*::RFP는 ER에서 발현되고 있음을 확인 할 수 있었고 이는 ER marker 인 BIP::GFP와 co-transformation시 *AtCO1K*::RFP와 BIP::GFP가 co-localization 됨을 확인 함으로써 *AtCO1K*가 ER에서 발현 됨을 재확인 할 수 있었다 (Figure 27).

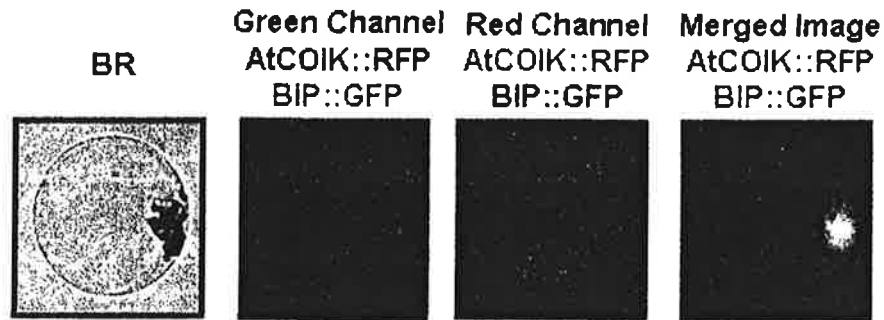


Figure 27. Subcellular localization of *AtCOIK::RFP* in *Arabidopsis* protoplasts.

The ER localization marker *BIP::GFP* and *AtCOIK::RFP* fusion construct were co-transformed into the *Arabidopsis* protoplasts. Expressions of the introduced genes were examined after 24 h using a fluorescence microscope. Colocalization is indicated by yellow where the green and red colors are superimposed.

5. *Tsip1*

① *Tsip1*의 분리

-Yeast two-hybrid system을 이용하여 CMV 1a 단백질과 상호 작용하는 것으로 선발된 유전자들의 염기 서열 분석 결과 1개의 클론이 기존에 *Tsi1* 단백질과 상호작용 하는 것으로 분리된 *Tsip1* 유전자의 cDNA임을 알 수 있었다. cDNA를 유전자를 이용하여 CMV 유래의 여러 단백질과의 상호작용 여부를 확인 해 보았다. *Tsip1*은 CMV 1a 뿐만 아니라 CMV 2a, movement protein (MP)와도 yeast cell 내에서 상호작용함을 확인 할 수 있었다 (Figure 28).

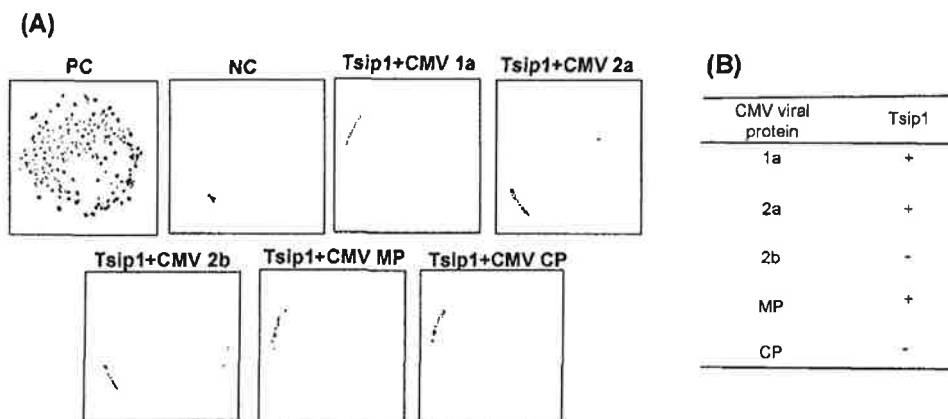


Figure 28. Interactions of Tsipl and CMV viral proteins in yeast cells.

(A) Colony-lift filter β -galactosidase assays. +, blue colonies resulting from positive β -galactosidase activity; and -, white colonies resulting from negative β -galactosidase activity (B) Summary of the interaction analysis. The yeast strain, Y187, was co-transformed as indicated at the top of each box. The co-transformants of the pVA3-1 and pTD1-1 plasmids served as a positive control and the empty plasmids, pACT2 and pAS2-1, served as a negative control. The blue spots indicated positive β -galactosidase activity.

② 세포 내에서의 Tsipl 단백질 발현 위치 관찰

식물 세포내에서의 Tsipl 단백질의 *in vivo* Tsipl localization을 확인하기 위하여 full length Tsipl cDNA에 termination codon을 제거 후 N-말단 부위에 green fluorescent protein (GFP)과 융합 후 tobacco protoplasts에 transformation 유도를 하였다. GFP protein과 Tsipl::GFP 융합 단백질의 localization을 확인 해 본 결과 Tsipl::GFP은 chloroplast surface에서 발현 되고 있음을 확인 할 수 있었고 세포질 발현으로 이미 알려져 있는 GFP는 세포질에서 발현 되고 있음을 확인 할 수 있었다 (Figure 29).

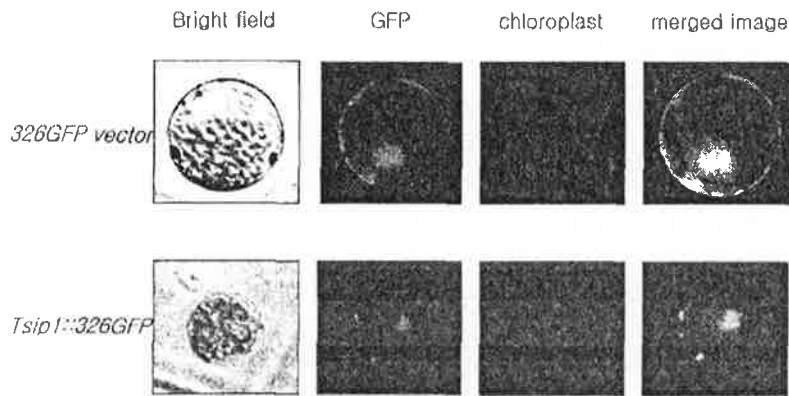


Figure 29. Subcellular localization of Tsipl::GFP in Arabidopsisprotoplasts.

The control GFP (upper) or Tsipl::GFP fusion (lower) construct was transformed into the tobacco protoplasts. Expressions of the introduced genes were examined after 24 h using a fluorescence microscope. The leftpanel shows light microscope result. And the right panel show overlap of GFP (green) and chlorophyll (CH) (red).

제 4 절 형질전환 식물체의 개발

1. 담배 형질전환 식물체

① NtTLP

-식물체 내에서의 NtTLP1 단백질의 기능을 분석하기 위하여 sense, antisense-oriented *NtTLP1* 형질 전환 담배를 제작하였다. T2 세대로 계대를 내린 후 RT-PCR 방법을 통하여 RNA level에서 *NtTLP1* 유전자의 발현 양상을 확인 하고 western blotting을 통하여 protein level에서의 *NtTLP1* 유전자의 발현 양상도 확인 하였다. Figure 30에서 제시 한 바와 같이 sense-oriented *NtTLP1* 형질 전환 담배에서는 *NtTLP1* 유전자의 발현 양상이 wild type 보다 현저한 증가되어 있고, antisense-oriented *NtTLP1* 형질 전환 담배에서는 그 발현이 감소 되었음을 확인 할 수 있었다.

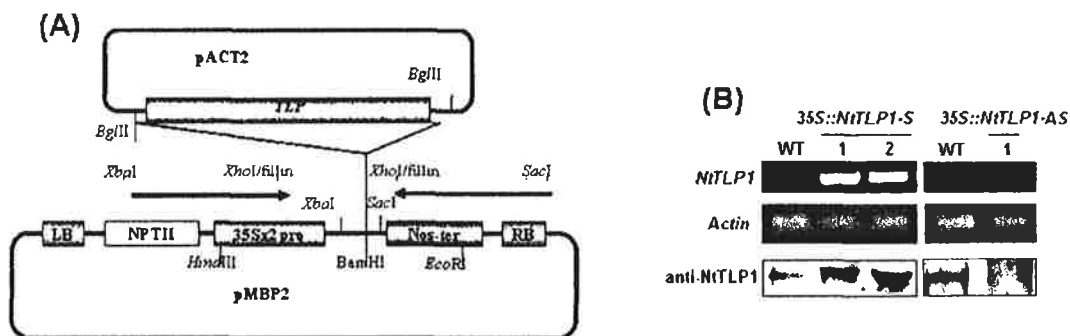


Figure 30. Construction of *TLP* gene expression vector (A) and expression of *TLP* gene in transgenic tobacco plants. (A) Schematic diagram of pMBPT2-*TLP*. *TLP*, the coding sequence of the *TLP* gene; 35Sx2 Pro, the promoter sequence of the califlower mosaic virus 35S transcript; NPTII, coding sequence of the neomycin phosphotransferase II gene; Nos-ter, the terminator sequence of nopaline synthase gene. (B) (a) RT-PCR analysis of the transgenic T1 tobacco plants compared to the control plant. Ethidium bromide staining of RT-PCR-amplified 18S from the same reverse-transcribed RNAs was used as a control for cDNA synthesis. (b) Western blot analysis of the transgenic T1 plants. For western blot analysis, extracted proteins (20 μ g) from the leaves of transgenic plants, control plant. Three repeated western blot analysis was

carried out.

② *Tcoi1*

-식물체 내에서의 *Tcoi1* 단백질의 기능을 분석하기 위하여 sense, antisense-oriented *Tcoi1* 형질 전환 담배를 제작하였다. T2 세대로 계대를 내린 후 RT-PCR 방법을 통하여 RNA level에서 *Tcoi1* 유전자의 발현 양상을 확인 하였다. 그 결과 sense-oriented *NtTLP1* 형질전환 담배에서는 *Tcoi1* 유전자의 발현 양상이 wild type 보다 현저한 증가되어 있고, antisense-oriented *Tcoi1* 형질 전환 담배에서는 그 발현이 감소되었음을 확인 할 수 있었다 (Figure 31).

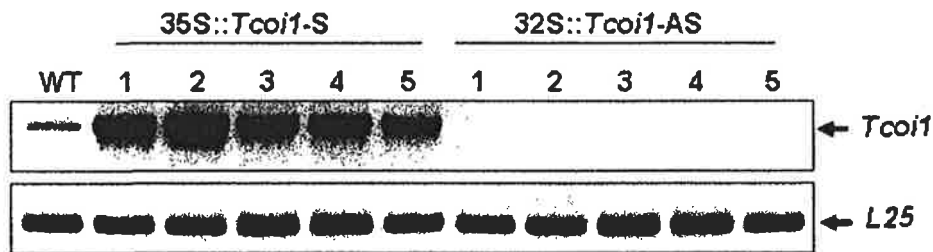


Figure 31. Expression of *Tcoi1* gene in transgenic tobacco plants

RT-PCR of the transgenic T₁ tobacco plants compared to the nontransformed control plant. As internal standard for cDNA quantity, the level of *L25* transcript was also monitored.

2. *NtTLP1* 토마토 형질 전환 식물체

-모델 식물인 담배에서 *NtTLP1* 유전자가 과발현 또는 억제 되는 형질전환 식물체를 만든 것에 나아가 유용 작물인 토마토에 sense, antisense-oriented *NtTLP1* 형질 전환 식물체를 제작하였다. Kanamycin selection media에서 우선적으로 선별된 T1 세대를 35S primer 와 *NtTLP1* 유전자 specific primer를 이용한 PCR를 통해 재차 선발하는 과정을 거쳐 *NtTLP1*이 과발현 또는 억제 되는 형질 전환 토마토를 만들었다 (Figure 32, 33).

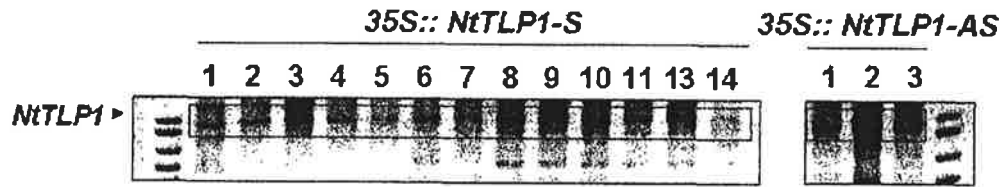


Figure 32. Genetic screening of transformants by PCR: Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants.

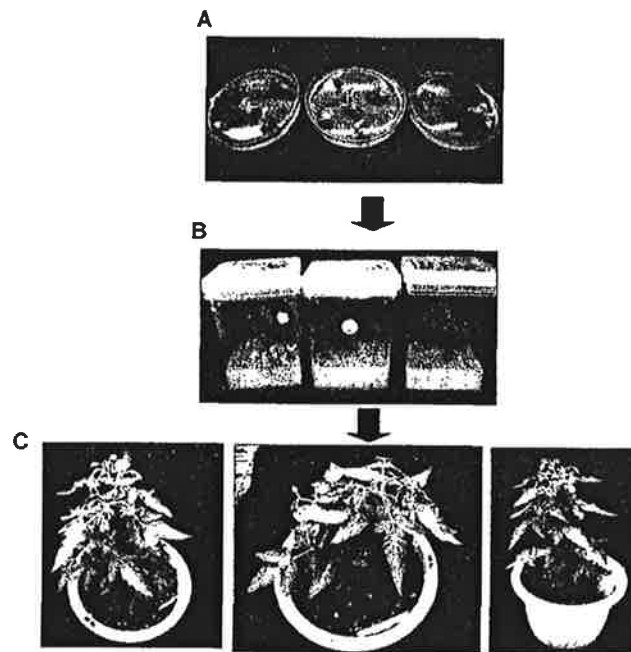


Figure 33. Selected transgenic tomatoes.

(A) Soot media.

(B) Root media.

(C) Adult transgenic tomatoes.

3. *Arabidopsis* 형질 전환체

-*AtCOIK* 유전자가 과발현되는 *Arabidopsis* 형질전환 식물체를 제작하였다. Kanamycin selection media에서 우선적으로 선별된 T1 세대를 35S primer 와 *AtCOIK* 유전자 specific primer를 이용한 PCR를 통해 재차 선별하는 과정을 거쳐 *AtCOIK*이 과발현 되는 형질 전환 *Arabidopsis* 를 만들었다 (Figure 34).

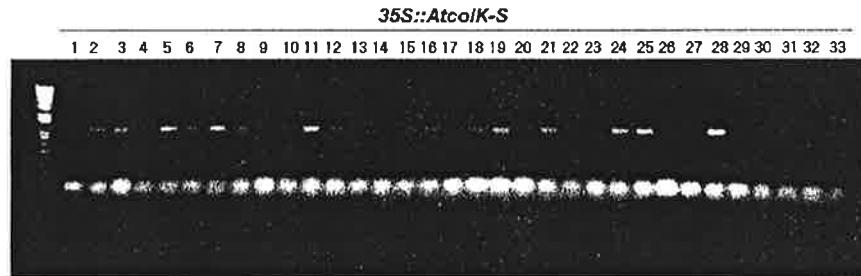


Figure 34. Genetic screening of transformants by PCR: Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants.

제 5 절 선발된 유전자와 CMV replicase 간의 상관관계 규명

1. *NtTLP1* 유전자와 CMV replication 간의 상관관계

-*NtTLP1*이 과다발현 되거나 발현이 저해 되는 형질 전환 담배에서 실제 CMV replication에 어떤 영향을 주는가를 알아보기 위해 식물에 CMV-Kor를 처리하여 CMV의 accumulation을 조사하였다. 우선 coat proteins (CP)의 accumulation pattern을 CMV 처리 잎과 그 상엽으로 나누어 dot ELISA tests를 통하여 조사하였다, 그 결과 *NtTLP1*의 발현이 저해 되는 형질 전환 담배에서는 CP의 accumulation이 wild type 담배와 비슷한 수준으로 나타났다. 그에 반해 과다발현 되는 형질 전환체에서는 wild type 담배 보다 CP의 accumulation이 처리 잎과 상엽에서 모두 9-38% 정도 감소됨을 확인 할 수 있었다. 부가적으로 CMV specific probe를 이용하여 Northern blotting을 통하여 CMV RNA accumulation정도를 비교해 보았다. 그 결과 *NtTLP1*이 과다발현 되는 형질 전환 담배에서 CMV RNA accumulation이 wild type 담배에 비해 4-23% 정도 감소됨을 확인 할 수 있었다. 이는 *NtTLP1*의 지속적인 과발현은 CMV proliferation을 저해함을 시사하고 있다 (Figure 35).

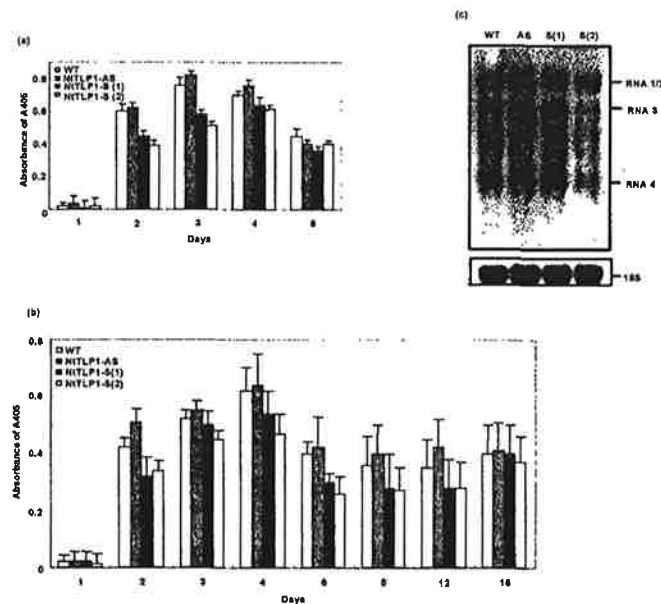


Figure 35. Expression of the *NtTLP1* gene in transgenic tobacco plants and with or without CMV inoculation.

(A) The accumulation of CMV-Kor CP in inoculated leaves. Values shown are the absorbance (at 405 nm) of the transgenic T1 plants, along with the control plants, via indirect ELISA using anti-CMV IgG (3 $\mu\text{g/ml}$) on different days after inoculation. The mean number of three experiments was shown on the graph.

(B) The accumulation of CMV-Kor CP in the uninoculated upper leaves.

(C) Accumulation of CMV RNA in transgenic and control plants. RNA was isolated from the leaves at 6 DAI with CMV. Position of RNA 1, RNA 2, RNA 3 and RNA 4 are indicated. To verify that similar amounts of RNA were loaded into each lane, the parallel detection of 18S rRNA was carried out.

2. *NtTLP1* 유전자와 TMV replication 간의 상관관계

*NtTLP1*의 지속적인 과발현은 CMV proliferation을 저해함을 볼 수 있었는데 *NtTLP1*이 과다발현이 다른 바이러스의 증식에는 어떤 영향을 주는지를 알아보기 위하여 식물에 TMV를 처리 후 HR lesion formation 수와 크기를 비교하였다. 그 결과 *NtTLP1*이 과다발현 되는 형질전환 식물체에 서 wild type 식물체에 비교하여 HR lesion formation 수 뿐 아니라 크기도 현저히 감소되었음을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 *NtTLP1*의 지속적인 과발현은 CMV 뿐 아니라 TMV의 proliferation도 저해함을 확인 할 수 있었다 (Figure 36).

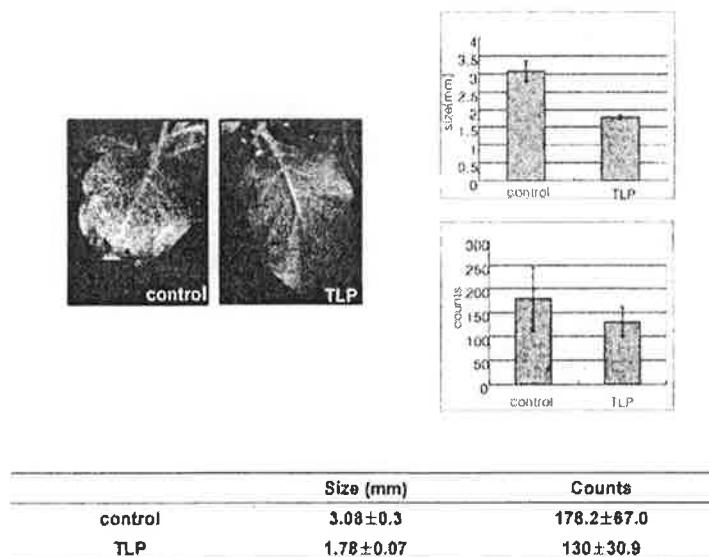


Figure 36. Comparison of HR lesion formation after TMV inoculation between control plants and NtTLP1 transgenic T₂ plants.

3. *Tcoi1* 유전자와 CMV replication 간의 상관관계

-*Tcoi1*이 과다발현 되거나 발현이 저해 되는 형질 전환 담배에서 실제 CMV replication에 어떤 영향을 주는가를 알아보기 위해 식물에 CMV-Kor를 처리하여 CMV RNA의 accumulation을 CMV RNA specific primer sets를 이용하여 CMV 처리 잎과 그 상엽으로 나누어 RT-PCR로 조사하였다. 그 결과 처리 잎에서는 형질 전환 식물체에서의 CMV RNA의 accumulation이 wild type 식물체와 별 차이가 없었다. 이에 반해 *Tcoi1*이 저해 되는 경우 CMV 처리 7일째에도 상엽에서 CMV RNA accumulation이 없는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 37). 뿐만 아니라 *Tcoi1*의 발현이 저해 되는 형질 전환 담배에서는 CMV 처리 9일 후에도 CMV 병징이 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다 (Figure 38). 이는 *Tcoi1*이 CMV의 상엽으로의 이동을 조절하는 단백질임을 시사한다.

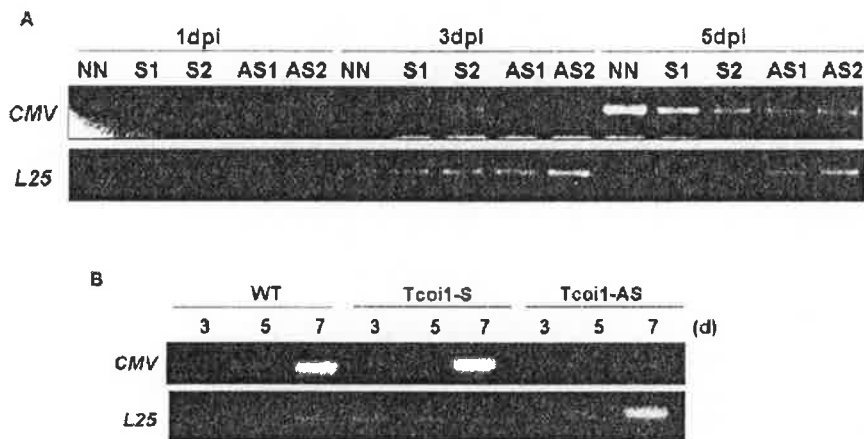


Figure 37. The accumulations of the CMV RNA 3 in wild type control and transgenic plants.

(A) and (B) The comparison of the accumulation level of CMV RNA 3 in inoculated leaves (A) in uninoculated upper leaves (B). The CMV RNA 3 accumulations of the transgenic T₁ plants along with the control plants were monitored by RT-PCR using CMV RNA 3 specific primer sets at different days after inoculation.



Figure 38. The comparisios of CMV symptoms in wild type control and transgenic plants at the 9 days after CMV inoculation.

4. *Tcoi1* 유전자와 CMV infectivity간의 상관관계

-*Tcoi1*이 과다발현 되거나 발현이 저해 되는 형질 전환 담배에서 분리한 CMV가 바이러스 infectivity에 영향을 받았는가를 알아보기 위해 wild-type 뿐 아니라 형질 전환 식물에 CMV-Kor를 처리하고 3일 후 식물체의 잎을 갈아서 다시 wild-type의 담배 잎에 접종하였다. 이후에 1, 3, 5일 째에 CMV-CP specific antibody를 이용하여 ELISA assay를 실시하였다. 그 결과 형질전환 식물체에서 분리한 CMV는 wild-type의 식물체에서 분리한 CMV와 유사한 infectivity level을 보임을 알 수 있었다. 이는 *Tcoi1*에 의한 CMV 1a 단백질의 메틸화는 바이러스 infectivity에는 영향을 주지 않음을 시사한다 (Figure 39).

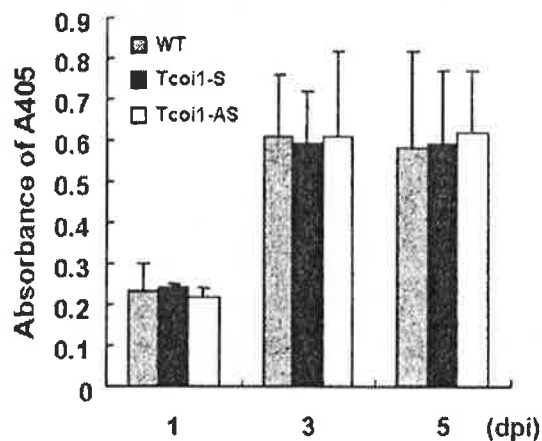


Figure 39. Infectivity comparison of CMV particles purified from CMV-infected wild type control and transgenic plants.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구 분	연구 개발 목표	달성도
1차년도 (2003)	-Yeast two hybrid와 SRS 체제에 CMV replicase 적용으로 상호 작용 식물표적유전자 발굴	100 %
2차년도 (2004)	-CMV replicase 상호작용 표적유전자의 발현 및 기능분석	100 %
3차년도 (2005)	-형질전환 식물체 (토마토, Arabidopsis) 의 개발 -선발된 유전자와 CMV replicase 간의 상관관계 규명	100 %

제 2 절 관련분야에의 기여도

1.. 기술적 측면

- 식물체바이러스단백질과 상호 작용하는 식물체의 host factor를 유전자수준에서 찾아내어 식물체내에서의 바이러스감염경로를 신호전달측면에서 규명
- *in vivo* study를 통해 host range결정인자를 추론
- *in vitro* study를 통해 1a, 2a 및 기타 protein등의 특정 domain을 추정
- 형질 전환체 개발에 따른 신품종 창출 기반마련
- 식물 병원체에 대한 저항성을 가진 형질전환 원예작물개발의 기초가 되는 연구성과 창출
- 고유유전자 확보로 특허획득 및 유전자원의 확대
- 다양한 병원체에 대한 식물방어기작 및 이에 연관된 신호전달체계의 규명의 기반마련
- 환경친화적, 미래지향적 농업 발달에 기여
- 식물세포의 병원체에 의한 사멸기작 연구로 타생물체의 세포사멸 및 생체방어

관련 기작 이해증진에 기여

- 분자식물병리학 분야의 국제경쟁력 향상 및 인력양성에 기여

2. 경제 · 산업적 측면

- 고부가가치, 고품질 작물 생산으로 소득증대 기반 마련
- 내병성 작물 개발에 따른 환경친화형 농산물 생산에 의한 농가소득 증대 기반 마련
- 우수종자개발 및 종자수출로 국익 증대 기반 마련
- 유용유전자의 특허화 및 고급기술의 지적재산권화로 국가경쟁력 확보 및 기술 우위 점유
- 생명과학 응용제품 시장의 급속확대에 대처할 차세대 산업육성
- 분자유종기술의 개발에 따른 육종 효율 증진
- 농약사용절감에 따른 환경보전으로 국민건강 보호 및 증진

3. 농업실용성 측면

- ‘데이터 농업’은 정보 기술을 이용하여 전면적으로 농업 발전을 추진하고 농촌의 지속적인 발전을 유지하며 농업 현대화를 건설하는데 과학적 기술 역할을 할 것으로 기대하고 있다. 본 연구의 결과로 획득한 정보들은 식물병저항성 관련 데이터 구축에 밑바탕이 될 수 있으며 ‘데이터 농업’ 및 관련 기술의 발전은 점차적으로 경험 의존을 위주로 한 전통적인 농업이 신 기술에 의존하는 현대화된 산업으로 바뀌는데 이바지 할 수 있으며, 농촌의 생산력을 부단히 증가시키고 농업과 농촌의 경제 결구를 조정하는데 중요한 의미를 부여 할 수 있으리라 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

-본 연구과제에서 취득한 유용유전자는 분석을 마친 것은 이미 우수한 논문으로 출간되었거나 출간 예정에 있어 바이오강국의 기틀을 마련하는데 이바지하였고 이들에 대한 특허도 출원하여 지적재산권을 확보해 놓은 상태이다. 이러한 결과들은 향후 식물바이러스와 식물의 상호작용을 연구하는데 있어 보다 더 심도 깊은 연구의 초석을 제공함은 물론이고 지적재산권은 적극 활용될 계획이다.

-따라서 보다 더 한차원 높은 단계의 연구를 위해서는 본 연구과제에서 취득한 정보를 바탕으로 추가연구가 필요할 전망이다. 또한 바이러스저항성작물로 유용성이 판단될 시 품종화와 기업화도 적극 추진할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

-바이러스와 RNAi 방어 시스템

Double-strand RNA (dsRNA)는 수많은 생물체에서의 특정 유전자를 silencing하는 신호이다. 이러한 현상은 *Caenorhabditis elegans*에서 처음 발견되었다. dsRNA를 선충에 넣으면 이에 상응하는 유전자의 산물이 선충의 세포나 F1 세대에서도 보이지 않는다는 것이다 (Fire et al. 1998). 이러한 **RNA interference (RNAi)**는 *C. elegans*의 많은 다른 유전자들에게도 작용함이 밝혀졌다. 또한 dsRNA가 식물에 있어서도 특정 유전자의 발현을 억제 할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Vionnet et al. 1998; Waterhouse et al. 1998). 식물체내의 RNAi 반응 동안, 바이러스-기주 상호반응은 매우 복잡하고 다양해서 기초적인 수준에서만 이해되고 있었다. 일반적으로, 식물들은 다양한 생물학적 역할을 수행하는 복합적이면서 다중적인 RNA silencing 경로 대사를 가지고 있다 (Baulcombe, 2004). 이러한 경로들은 식물 유전자들의 발현 조절 및 바이러스의 축적의 조절 기전등을 포함한다. RNAi 과정에서 기주 자신의 유전자 발현을 조절시키는 기능의 단백질들이 또 다른 기주 유전자들에 깊이 관여하고 있기 때문에 바이러스 축적을 조절하는 RNAi 경로대사의 분석과정은 매우 복잡하다. 게다가 이러한 기주 방어 시스템에 대응하는 바이러스 단백질들의 발현 (예: RNA silencing suppressor)을 통해 바이러스들은 스스로 이런 기주 RNAi 에 의한 식물방어를 극복할 수 있다. 이후 이러한 바이러스들과 RNAi 경로 대상에 관한 연구들은 급속히 진전이 되었으며 이런 일련의 자세한 과정은, 최근 활발하게 발표된 논문들에서 찾아볼 수 있다. (Baulcombe 2004; Ding et al., 2004).

RNA silencing 대사 과정은 목표 RNA의 인식과 그 뒤이은 목표 RNA를 분해하는 것이다. 이 과정은 식물체내에서 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp 혹은 RDR이라고 명명), RNase-III-type dicer-like endonuclease, Argonaute 와 같은 RNA-induced silencing complex들을 포함하여 여러단계의 효소 반응의 경로 대사를 통해, 최종적으로 목표 RNA를 DEAD box helicase (SDE3: Baulcombe, 2004) 와 같은 RNA-induced silencing complex 활성을 담당하는 단백질들과 결합시키게 된다. 이러한 단백질들의 대부분은 유전자 집단으로 구성되며, 이러한 유전자 집단들의 구성들의 다양성은 식물체들을 시시각각 변화되는 조건들 (예를 들면, 식물 발달, 바이러스 침입에 대한 방어)에 대해서 최적의 반응을 나타낼 수 있는 원동력으로 작용할

수 있다. 최근에 자연적인 혹은 RNA silencing에 관여하는 유전자들에 대해 인위적인 식물 knockout 돌연변이체들의 제작과 바이러스 감염 시 그러한 knockout 돌연변이체내에서의 loss-of function에 기인한 형질의 변화를 통해 RNA silencing mechanism을 파악하는 연구에 관한 내용들이 보고되었다. 이러한 연구 방법으로, Arabidopsis의 DCL2가 TCV에 대한 방어에 필수적이라는 것이 밝혀졌다 (Xie et al., 2004). Arabidopsis의 SDE3는 *Cucumber mosaic virus* (CMV)에 대한 방어에 관여하지만 *Tobacco rattle virus* (TRV: Dalmay et al., 2001)에는 관여하지 않는다. RDR의 경우, 담배 RDR1이 TMV와 PVX에 대한 방어에 필요할 뿐만 아니라, Arabidopsis의 유사 단백질 homolog는 *Turnip vein clearing virus* (TVCV)와 TRV에 대한 방어에도 관련되어 있다 (Lartey et al., 1993; Yu et al., 2003). 흥미롭게도, *Nicotiana benthamiana*는 자연적인 RDR1 돌연변이체임이 알려지게 되었다. *Medicago truncatula*에서 유래된 RDR1 ortholog의 형질 전환된 *N. benthamiana* 식물은 TMV, TVCV 및 *Sunn hemp mosaic virus* (SHMV) 등에 대해서 감수성을 보였으나, CMV 및 PVX에는 감수성을 보이지 않았다 (Yang et al., 2004). 유사하게도 RDR6는 Arabidopsis에서 CMV의 방어에 요구되어지나, *Turnip mosaic virus* (TuMV), TVCV, TCV 및 TRV에 대한 방어에는 필수적이지 않았다 (Dalmay et al., 2000). 이와같은 결과로 특이적인 RDR들은 다른 바이러스들을 인식하는 것으로 사료된다. 즉, RDR1은 tobamovirus들과 TRV에 대한 방어에 관여하나 RDR6는 CMV에 대한 방어에 관여하는 것으로 생각된다.

Schwach 등 (2005)은 *N. benthamiana*에서 RDR6가 Y satellite RNA의 존재 하에 PVX, Potato virus Y, CMV의 감염의 저해에 요구되어지나, Y satellite RNA가 없을 때는 TMV, TRV, TCV 및 CMV의 감염에 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 밝혀졌다. PVX의 감염동안, RDR6는 바이러스의 전신감염 (meristem 부위 포함)을 방해하지만, 바이러스들의 국부 감염은 방해하지 못하였다. 식물 접목 실험을 통해 RDR6가 세포내에 silencing signal의 전신 이동에 깊이 관여하고 있음을 증명하였다. 이런 연구들의 결과들을 바탕으로 short-interfering RNAs (siRNAs)의 생성으로 인한 silencing signal을 바탕으로 이중쇄상의 RNA 전구물질이 합성되며, 이러한 이중쇄상의 RNA의 전구물질에 의해, 바이러스의 침입 부위에서 목표 바이러스에 대한 즉각적인 silencing 반응의 유도를 예시 할 수 있다. 또한 RDR6가 PVX의 cell-to-cell 이동을 방해하지 못함을 관찰했는데 이것은 RDR6들과 같은 단백질고 이루어지는 식물체내의 RNAi 경로 대사 과정이 바이러스들의 세포내 및 세포간 이동에 영향을 주는 것이 아니라는 것을 의미한다. Liu 등 (2005)은 다양한 강도의 silencing suppression 기능을 나타낼 수 있는 TMV의 126 kDa의 돌연변이체들을 이용한 연구에서, 바이러스의 silencing suppressor의 활성이 바이러스들의 세포간 이동성 능력을 바꿀 수 없음을 보여주었다. 초기에, 그런 RNA suppressor의 활성과 바이러스들의 세포간 이동성에 관한 관계없음이 *Peanut clump peculovirus*의

P15의 연구에 의해 제시되었다 (Dunoyer et al., 2002). 그러나 바이러스 RNA의 세포간 이동시의 이동결합체 또는 세포 내 이동시의 이동결합체에 직접적으로 RNA silencing mechanism이 바이러스 이동에 영향을 미칠 것인지는 아직 미해결 과제이다.

제 7 장 참고문헌

- Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Bednarek, S.Y., Wilkins, T.A., Dombrowski, J.E. and Raikhel, N.V. 1990. A carboxyl-terminal propeptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *Plant Cell* 2: 1145-1155.
- Beffa, R.S., Hofer, R.M., Thomas, M. and Meins, F. 1996. Decreased Susceptibility to viral disease of [beta]-1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant cell* 8: 1001-1011.
- Boccard, F. and Baulcombe, D.C. 1993. Mutational analysis of *cis*-acting sequences and gene function in RNA 3 of *Cucumber mosaic virus*. *Virology* 193: 563-578.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17: 6739-6746.
- Bucher, G.L., Tarina, C., Heinlein, M., Di Serio, F., Meins, F. and Iglesias, V.A. 2001. Local expression of enzymatically active class I beta-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J.* 28: 361-369.
- Canto, T., Prior, D.A., Hellwald, K.H., Oparka, K.J. and Palukaitis, P. 1997. Characterization of *Cucumber mosaic virus*. *Virology* 237: 237-248.
- Carrington, J.C. and Whitham, S.A. 1998. Viral invasion and host defense: Strategies and counter-strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 336-341.
- Cornelissen, B.J.C., Hooft van Huijsduijnen, R.A.M. and Bol, J.F. 1986. A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature* 321:531 - 532.
- Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Pesca, M., Vitale, A. and Denecke, J. 1998. BiP and Calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 10: 813-824.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 20: 2069-2077.

- Davis, S.J. and Viestra, R.D. 1996. Soluble derivatives of green fluorescent protein (GFP) for use in *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World* 3: 43-48.
- Davis, S.J. and Viestra, R.D. 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 36: 521-528.
- Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P. and Lucas, W.J. 1995. *Cucumber mosaic virus* 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology* 207: 345-353.
- Ding, S.W., Anderson, B.J., Haase, H.R. and Symons, R.H. 1994. New overlapping gene encoded by the *Cucumber mosaic virus* genome. *Virology* 198: 593-601.
- Ding, S.W., Li, H., Lu, R., Li, F. and Li, W.X. 2004. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* 102: 109-115.
- Edwardson, J. R. and R. G. Christie. 1991. *Cucumoviruses*. CRC Handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Raton, Fla. 293-319.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Diiver, S.E. and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Ceanorhaditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T. and Chory, J. 2000. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* 123: 1247-1256.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. 1988. A novel super family of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235: 16-24.
- Grenier, J., Potvin, C., Trudel, J. and Asselin, A. 1999. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1, 3-glucans. *Plant J.* 19: 473-480.
- Habili, N. and Symons, R.H. 1989. Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Res.* 17: 9543-9555.
- Hayes, R.J. and Buck, K.W. 1990. Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63: 363-368.
- Hodgman, T.C. 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333:

22-23.

- Itaya, A., Hickman, H., Bao, Y., Nelson, R. and Ding, B. 1997. Cell-to-cell trafficking of *Cucumber mosaic virus* movement protein: green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant J.* 12: 1223-1230.
- Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W. and Hwang, I. 2001. A new dynamin-like protein, ADL6, is involved from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1511-1526.
- Kim, S.H., Palukaitis, P. and Park, Y.I. 2002. Phosphorylation of *Cucumber mosaic virus* RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J.* 21: 2292-2300.
- Kim, S.J., Cho, H.S., You, J.S., Kwon, S.Y., Park, E.K. and Paek, K.H. 1996. Complete nucleotide sequence and phylogenetic classification of the RNA 3 from *Cucumber mosaic virus* (CMV) strain: Kor. *Mol. Cells* 6: 190-196.
- King, G.J., Turner, V.A., Hussey, C.E., Wuterle, E.S. and Lee, S.M. 1988. Isolation and characterization of a tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. *Plant Mol. Biol.* 10:401 - 412.
- Koiwa, H., Sato, F. and Yamada, Y. 1994. Characterization of accumulation of tobacco PR-5 proteins by IEF-immunoblot analysis. *Plant Cell Physiol.* 35: 821-827.
- Kwon, C.S., Paek, K.H. and Chung W.I. 1996. Full-length cDNA cloning and nucleotide sequence analysis of *Cucumber mosaic virus* (Strain Kor) RNA 2. *J. Plant Biol.* 39: 265-271.
- Lee, H.Y., Bahn, S.C., Kang, Y.M., Lee, K.H., Kim, H.J., Noh, E.K., Palta, J.P., Shin, J.S. and Ryu, S.B. 2003. Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1990-2002.
- Linthorst, H.J., Meuwissen, R.L., Kauffmann, S. and Bol, J.F. 1989. Constitutive expression of pathogenesis-related PR-1, GRP and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1: 285-291.
- Malehorn, D.E., Borgmeyer, J.R., Smith, C.E. and Shah, D.M. 1994. Characterization and expression of an antifungal *zeamatin-like protein* (ZIP)

- gene from *Zea mays*. *Plant Physiol.* 106: 1471-1481.
- Menu-Bouaouiche, L., Vriet, C., Peumans, W.J., Barre, A., Van Damme, E.J. and Rouge, P. 2003. A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie.* 85: 123-131.
- Min, K., Ha, S.C., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Yun, D.J. and Kim, K.K. 2004. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins* 54: 170-173.
- Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S. and Kubo, S. 1988. Inoculation with RNAs 12*Cucumber mosaic virus* induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* 69: 2695-2700.
- O'Reilly, E.K., Wang, Z., French, R. and Kao, C.C. 1998. Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *J. Virol.* 72: 7160-7169.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 41: 281-348.
- Palukaitis, P. and Garcia-Arenal F. 2003. *Cucumoviruses*. *Adv. Virus Res.* 62: 241-323.
- Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S. and Blanco-Labra, A. 1987. A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. *Nature* 327:432 - 434.
- Rozanov, M.N., Koonin, E.V. and Gorbalenya, A.E. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73: 2129-2134.
- Schwinghamer, M.W. and Symons, R.H. 1975. Fractionation of *Cucumber mosaic virus* RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system. *Virology* 63: 252-262.
- Shin, R., Park, C.J., An, J.M. and Paek, K.H. 2003. A novel TMV-induced hot pepper cell wall protein gene (*CaTin2*) is associated with virus-specific hypersensitive response pathway. *Plant Mol. Biol.* 51: 687-701.
- Singh, N.K., Nelson, D.E., Kuhn, D., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1989. Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol.* 90:1096 - 1101.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. and Takanami, Y. 1991.

- Functional analysis of deletion mutants of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 using an *in vitro* transcription system. *Virology* 183: 106-113.
- Van der Wel, H., Van Soest, T.C., Royers, E.C. 1975. Crystallization and crystal data of thaumatin I, a sweet-tasting protein from *Thaumatococcus daniellii* benth. *FEBS Lett.* 6:316 - 317.
- Wang, H. and Ng, T.B. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61: 1-6.
- Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X. and Hou, Y.M. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 33:
- Woloshuk, C.P., Meulenhoff, J.S., Sela-Buurlage, M., Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3: 619-628.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacoben, S.E. and Carrington, J.C. 2004. Genetic and functional diversi-function of small RNA pathways in plants. *PLoS. Biology.* 2: 642-652.
- Xu, P., Blancaflor, E.B. and Roossinck, M.J. 2003. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with Cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 467-476.
- Ye, X.Y., Wang, H.X. and Ng, T.B. 1999. First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263:1002 - 1013
- Yang, S.J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.H. and Nelson, R.S. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6297-6302.
- Yun, D.J., Ibeas, J.I., Lee, H., Coca, M.A., Narasimhan, M.L., Uesono, Y., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. and Bressan, R.A. 1998. Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. *Mol. Cell* 1: 807-817.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Plant Biol.* 53:247 - 273.