

발간등록번호

11-1543000-000238-01

UV 스트레스 신호전달기작에 관여하는 CUL4-based E3
ligase (CRL4)들의 동정

(Identification of CUL4-based E3 ligases (CRL4s) involved
in UV stress signal transduction pathway)

부산대학교

농림수산식품부

최 종 보 고 서

UV 스트레스 신호전달기작에 관여하는 CUL4-based E3
ligase (CRL4)들의 동정

(Identification of CUL4-based E3 ligases (CRL4s) involved
in UV stress signal transduction pathway)

부산대학교

이 재 훈

농림수산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “UV 스트레스 신호전달기작에 관여하는 CUL4-based E3 ligase (CRL4)들의 동정” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 11 월 11 일

주관연구기관명 : 부산대학교

주관연구책임자 : 이재훈

세부연구책임자 : 이재훈

연 구 원 : 류보영

연 구 원 : 송은영

연 구 원 : 김상훈

연 구 원 : 김민지

요 약 문

I. 제 목

UV 스트레스 신호 전달 기작에 관여하는 CUL4-based E3 ligase (CRL4)들의 동정

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 식물의 주요 환경 스트레스로 대두되고 있는 UV 스트레스 신호 전달 기작을 규명하는데 있음. 특히 ubiquitination에 의해 매개되는 단백질 안정성 조절의 측면에서 해당 신호 전달의 조절 기작을 고찰하고자 함. 연구 수행을 통해 산출되는 결과는 궁극적으로 UV 스트레스에 의해 내성을 보이는 유용 기능 작물의 생산에 응용될 것이며, 이를 통해 농업 발전에 공헌할 것으로 기대됨.

III. 연구개발 내용 및 범위

상기 연구 목적을 달성하기 위해, ubiquitination 과정의 주요 효소로 작용하는 애기장대 cullin4-based E3 ligase (CRL4)의 기질 수용체 중 UV 스트레스 신호 전달에 관여하는 유전자를 동정하고 이의 역할을 규명하고자 함. 연구는 다음과 같이 진행됨.

1. UV 스트레스 신호 전달에 관여하는 CRL4 기질 수용체 관련 돌연변이체 (*dhu*) 및 유전자 (*DHU*) 선별
2. DHU1-3와 CRL4 adaptor인 DDB1과의 결합 여부 확인
3. UV 신호 전달 과정시 DHUs의 상세 작용 기작 규명
4. UV 스트레스 내성 식물 제작

IV. 연구개발결과

본 연구과제의 수행 결과는 다음과 같음.

1. 3종류의 애기장대 CRL4 기질 수용체 관련 돌연변이체 (*dhu*)가 UV-B 조사시 야생종에 비해 과민반응 (hypersensitivity)을 보이는 것을 확인함.
2. 상기 돌연변이체와 관련된 유전자 (*DHU1*, *DHU2*, *DHU3*) 확보.
3. DHU1-3가 CRL4의 기질 수용체로 작용함을 확인함.
4. *DHUs*의 UV-B에 의한 inducibility를 확인함.
5. *dhu*에서 UV-B 반응 유전자인 *CHS*, *HY5*의 전사량이 UV-B 조사시 과다축적됨을 확인함.
6. *dhu*에서 UV-B 반응 유전자인 *HY5*의 단백질량이 UV-B 조사시 과다축적됨을 확인함.
7. UV 스트레스에 내성을 보이는 애기장대 제작을 위해 *DHUs*의 전사량이 조절된 형질전환체 제작 중.
8. 연구 결과의 신속하고 효율적인 산출을 위해, CRL4의 adaptor인 DDB1a와 가장 강한 interaction을 보이는 DHU3에 보다 초점을 맞추어 세부 작용 기작을 추적 중.

9. *dhu3*의 UV-B specific hypersensitivity 여부를 검증하기 위해 red, far-red, blue, white, dark상에서의 성장 정도를 야생종과 비교한 결과 *dhu3*의 형질은 UV-B specific 함을 검증.
10. UV 신호 전달 과정시 *DHU3*의 상세 작용 기작 규명을 위해 UV-B 조사시 야생종과 *dhu3* 간의 발현 유전자의 차이를 DNA chip analysis를 통해 확인 중.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제의 수행동안 ‘4건의 국내, 국제 학회 발표, 1건의 정기 간행물 발행, 4명의 연구 인력 양성, 1건의 SCI 국제 저널 (Plant Cell, Five-Year Impact Factor: 10.125)로의 논문 submit & review 과정 진행’의 활용실적을 산출하였음. 산출되는 연구 결과는 UV 스트레스 신호 전달 규명에 일조하고 UV에 대한 식물의 반응성을 변화시킬 수 있는 (저항성을 증가시킬 수 있는) 유전 자원 확보에 기여할 것으로 기대됨. 이는 궁극적으로 농업적 부가가치가 뛰어난 스트레스 내성 작물 제작에 공헌할 것이라 사료됨.

SUMMARY

(영문요약문)

Recently, there has been a significant increase in the amount of UV that passes through the ozone layer. This has made UV a serious environmental stress for plants. Therefore, to further understand UV-mediated signal transduction pathway in plants is very important to generate the useful crops tolerant to UV stress. To investigate the possible involvement of Cullin4-RING E3 ligase complex (CRL4) in UV-B mediated signaling, we screened T-DNA insertion mutants of CRL4 substrate receptors (DWD) which exhibit the altered pattern in response to UV-B. Mutants in three DWD genes, *DHU1*, *DHU2* and *DHU3* (DWD hypersensitive to UV-B), exhibited UV-B-hypersensitive phenotypes, implying they are involved in UV-B signaling. All DHUs interacted with DDB1a, the adaptor of CRL4 complex, confirming they play a role as the substrate receptor in CRL4 complex. Under the application of UV-B, all *dhu* mutants showed the decreased hypocotyl growth compared to wild type. Moreover, two UV-B responsive genes such as *CHS* and *HY5* were hyper-induced in *dhu* mutants in response to UV-B treatment, implying the negative role of *DHUs* in UV-B mediated signaling. For more detailed studies, we especially focused on the biological role of *DHU3* in UV-B mediated signal transduction pathway in *Arabidopsis*. The transcripts of *DHU3* are increased by UV-B, confirming that *DHU3* plays a role in UV-B signaling in *Arabidopsis*. For further understanding its role in the signaling, the overall comparisons of transcription profiles between wild-type and *dhu3* under the UV-B treatment are in progress. Also, *Arabidopsis* transgenic lines that exhibit UV-B tolerance are being generated.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of research project -----	7
Chapter 2. Domestic and foreign researchs related to the project -----	11
Chapter 3. Results -----	13
Chapter 4. Goal achievement and contribution to the related field -----	22
Chapter 5. Research products and the plans of their application -----	24
Chapter 6. Scientific informations related to the topic from abroad -----	26
Chapter 7. Equipments and facilities for the research -----	26
Chapter 8. References -----	27

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	13
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	22
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	24
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	26
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	26
제 8 장	참고문헌 -----	27

본 문

제 1 장 연구개발과제의 개요 (Overview of research project)

1절. 연구개발의 목적

1. 식물의 성장, 발달동안 접하게 되는 주요 환경 스트레스 중 하나인 UV 스트레스 신호 전달과 관련된 단백질들의 분해 조절 기작 고찰을 통해, 관련 신호 전달 과정을 충분히 이해하고 이를 기반으로 UV 스트레스에 대한 내성을 확립한 유용 작물을 제작하는 데 있음.
2. 상기 목적을 수행하기 위한 구체적인 방법으로, UV 스트레스 신호 전달 과정에 관여하는 CRL4의 기질 수용체를 선별, 분석하고 생체 내 작용 기작을 규명함으로써 관련 신호 전달 기작을 상세히 이해하고자 함.
3. 상기 연구는 UV 스트레스에 대한 저항성이 증가된 유용 작물 산출에 응용될 것으로 기대됨. 이는 생장률 및 생산성이 개선된 기능성 식용, 약용, 에너지 작물의 산출에 크게 기여하고 농가 소득 증대에 기여할 것으로 사료됨.

2절. 연구개발의 필요성 및 범위

1. 식물은 성장동안 환경으로부터의 다양한 생물학적, 비생물학적 스트레스를 경험하며, 이에 내성을 나타내기 위한 자체 조절 시스템을 구축함 (Bohnert et al., 2006).
가. 이 중 비생물학적 스트레스로는 고온, 저온 등의 온도 변화로부터 유래되는 스트레스, 물부족 스트레스, 고염 스트레스, UV 스트레스 등이 있음.
2. 비생물학적 스트레스 중, UV 스트레스는 식물 성장을 저해하는 주요 환경 스트레스로 최근 들어 급격히 대두되고 있음.
가. UV는 파장에 따라 UV-A, UV-B, UV-C로 구성됨 (그림 1).

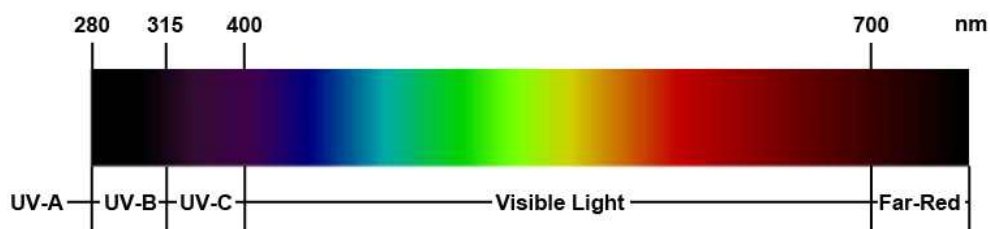


그림 1. UV의 종류와 파장.

- (1) 이 중 UV-B는 식물의 성장과 관련하여 가장 중요한 영향을 끼치는 것으로 보고됨

(Heijde and Ulm R, 2012).

나. 최근들어 환경 오염으로부터 야기된 오존층의 감소에 의해 지구상에 도달하는 UV의 양이 증가

(1) 1997~2001의 기간동안 오존층은 1980년대의 평균 오존층에 비해 3~6% 감소하였음. 이러한 오존층 파괴에 의해 지구 표면에 도달하는 UV-B 량은 1980년대 이래 6~14% 증가하고 있으며, 그 결과 증가된 UV-B는 작물내의 엽록소 함량 감소를 통한 광합성량 감소에 영향을 미치고 작물 생산량의 급격한 감소를 야기시킴 (UNEP, 2002; Kakani, 2003). 이는 UV-B가 농가 피해 증가 및 소득 감소의 주원인이 될 수 있음을 의미함.

(2) 그 결과, 식물을 위협하는 주요 스트레스로서 UV 스트레스가 강력하게 대두됨.

(3) 관련 스트레스 기작의 이해 및 이러한 스트레스 극복 과정을 이해하기 위한 연구는 식물 성장률 증대 및 스트레스 내성 식물 개발을 위해 필수적임.

다. 다른 비생물학적 스트레스와 비교할 때 식물의 UV 스트레스에 대한 연구는 전세계적으로 크게 미흡한 실정이며, 특히 관련 신호 전달 기작은 현재까지 정립되지 않은 실정임.

(1) UV-B를 high fluence rate로 조사시 DNA damage, ROS (reactive oxygen species) generation 등을 유발하는 스트레스로 작용하여 결국 식물의 necrosis를 유발함 (Jenkins, 2009; Heijde and Ulm R, 2012).

(2) UV-B를 low fluence rate로 조사시, UV에 의한 스트레스를 극복하기 위한 신호로 작용하여 wound/defense signaling 과정의 activation 및 DNA damage recovery를 위한 신호 전달 기작을 가동시킴 (Jenkins, 2009; Heijde and Ulm R, 2012).

3. 단백질 분해 조절 기작은 식물의 환경 스트레스에 대한 대응을 위하여 가장 효율적인 기작임.

가. 스트레스에 대한 내성을 위하여 관련 과정에 필요한 유전자의 전사량을 증가시키는 방법과 내성 관련 단백질의 안정성을 조절하는 방법이 있음.

나. 내성 관련 단백질의 안정성을 조절하는 post-translational modification의 경우 외부 스트레스 자극에 대한 빠른 대응을 가능케 한다는 면에서 보다 효율적일 것으로 판단됨.

다. Post-translational modification의 대표적인 조절 방식으로 ubiquitination의 중요성이 대두됨.

4. 유비퀴티네이션 (ubiquitination) 기작 및 역할 (그림 2)

가. 진핵생물에 특화된 대표적인 post-translational modification 조절 기작

나. 8 kDa의 작은 단백질로 구성된 유비퀴틴 (ubiquitin)이 기질에 부착되는 과정을 유비퀴티네이션이라 하며 부착되는 유비퀴틴의 개수에 따라 monoubiquitination과 polyubiquitination으로 나뉨.

다. 유비퀴틴이 사슬을 이루어 기질에 부착되는 polyubiquitination은 해당 기질이 26S proteasome 복합체를 통해 분해될 수 있도록 규정짓는 표식으로서 역할을 함.

라. 세 종류의 효소인 E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme),

E3 (ubiquitin ligase) 들의 연속적인 과정을 통해 이루어짐 (Vierstra, 2009).

- 마. E3 효소의 경우, E1, E2에 비해 최소 35배 이상의 다양성을 보유하고 있으며, 기질 특이성을 결정짓는 주효소로 알려져 있음.
- 바. E3 ligase는 single-subunit E3 ligase와 cullin-based E3 ligase (CRL)로 나뉘어지는데, 이 중 CRL에 대한 연구는 그 중요성에도 불구하고 상대적으로 크게 미흡한 실정임.

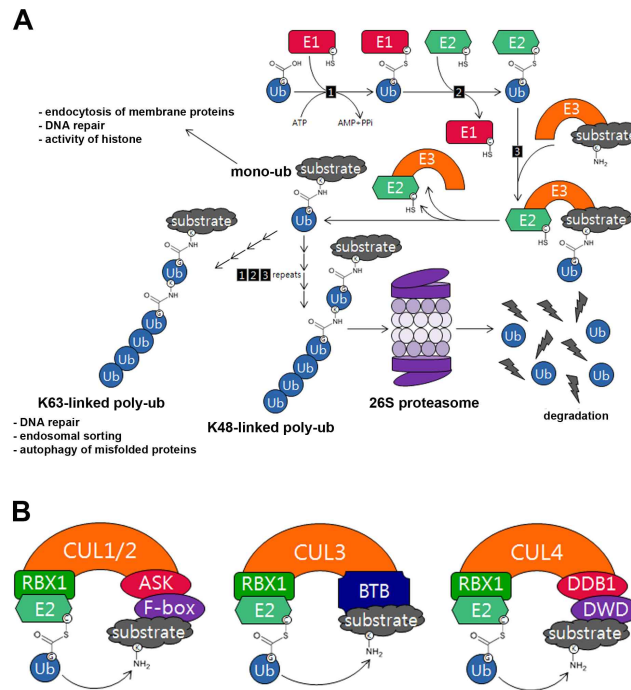


그림 2. Ubiquitination 과정과 E3 ligase 단백질. (A) Polyubiquitination 과정의 개요. (B) 식물의 Cullin-based E3 ligases (from Seo et al., 2012).

5. 유비퀴티네이션 (ubiquitination)의 중요성

- 가. 동물에서 신경퇴행성 질환 치료, 암 정복 등과 같은 의학적 치료분야에 응용 가능한 분야로 각광받고 있으며, 이러한 중요성으로 인하여 현재 전세계적으로 가장 활발히 연구되는 생물학 분야임.
- 나. 식물 호르몬의 신호 전달, 스트레스 신호 전달, 발생 과정 등 다방면에 걸쳐 광범위하게 관여하고 있음이 보고됨 (Smalle and Vierstra, 2004).

6. Cullin4-based E3 ligase (CRL4) 연구 개발의 필요성

- 가. CRL중, CRL4 관련 연구는 상대적으로 미흡한 실정임. 이에 보고된 연구 결과가 타 분야에 비해 크게 부족하며, 활발한 연구 진행이 강력히 요구되고 있음.
- (1) CRL4의 기질 특이성을 결정하는 기질 수용체는 16개의 아미노산으로 이루어진 DWD 도메인을 공통적으로 보유하고 있음 (Angers et al., 2006; He et al., 2006; Higa et al.,

2006; Jin et al., 2006).

(2) 본 연구책임자의 선행 연구를 통해 애기장대와 벼에 각각 119개, 110개의 CRL4 기질 수용체 (DWD 혹은 DACF 단백질)가 존재함을 보고함 (Lee et al., 2008).

나. 식물 CRL4 기질 수용체와 환경 스트레스와의 기능적 연계성에 대한 선행연구

(1) 가뭄 스트레스 및 ABA 신호 전달에 관여하는 CRL4 기질 수용체가 본 연구책임자에 의해 보고됨 (Lee et al., 2010; Lee et al., 2011).

다. CRL4 연구 결과의 타작물로의 응용 가능성

(1) 애기장대의 CRL4 기질 수용체는 약 74% 이상의 벼 orthologue를 보유하고 있음. 또한, 본 연구진은 진행중인 타연구를 통해 가뭄 저항성을 위한 CRL4 기질 수용체의 기능이 애기장대와 벼에서 유사함을 확인하였음. 이는 CRL4의 전체적인 기능이 다른 식물 종들간에 유사하게 보존되고 있을 가능성을 제시하므로, 애기장대의 연구 결과를 다른 작물에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 판단됨 (Lee et al., 2008).

라. 상기 정보에 기반하여 본 연구팀은 애기장대를 연구대상으로 하여, UV-B 신호전달 기작에 관여하는 CRL4의 기질 수용체를 동정하고 이들의 생체내 및 해당 신호전달 과정에서의 역할을 규명하고자 함.

7. UV 스트레스 신호 전달 기작과 CRL4에 의해 매개되는 ubiquitination 조절 기작간의 연관성은 그 중요성에도 불구하고 연구 진행이 매우 더딘 상황임. 본 연구진이 수행하고자 하는 연구는 UV 스트레스 내성 식물 제작에 매우 유용할 것으로 사료되며 작물 생산량 증대에 크게 도움이 될 것으로 생각됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황 (Domestic and foreign researchs related to the project)

1절. 국내 기술개발 현황

1. UV 신호 전달 기작 관련된 국내 기술개발현황은 본 연구팀을 제외하고는 매우 미흡한 실정임. 그러므로 본 연구팀의 제안된 연구주제를 통한 결과 산출 및 기술 개발은 향후 관련 분야의 연구를 주도할 수 있을 것으로 사료됨.

2절. 국외 기술개발 현황

1. 현재까지 식물에서 연구된 UV 신호 전달 기작 관련 국외 기술개발현황은 다음과 같음.

가. UV-B 신호 전달의 positive regulator로서 UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8)이 보고됨.

- (1) UVR8은 UV 조사시 핵으로 이동 후, chromatin 지역에서 HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5) 및 HY5 HOMOLOG (HYH)와 같은 전사 조절 인자의 recruit에 관여하며 이를 통해 UV 반응을 위한 유전자 발현에 관여함 (Brown et al., 2005; Cloix and Jenkins, 2008) (그림 3).

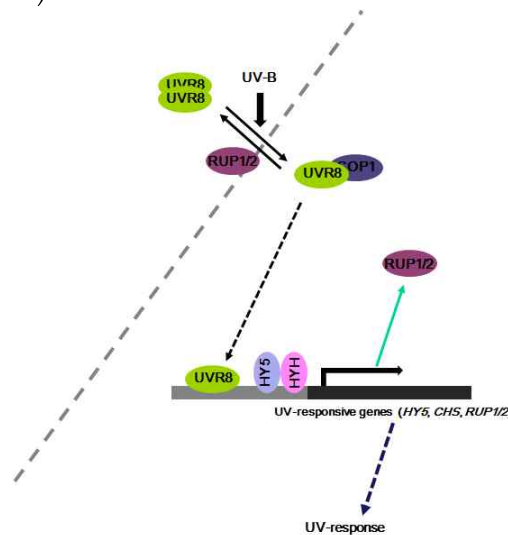


그림 3. UV-B 신호 전달 기작의 개요 (modified from Heijde and Ulm, 2012).

- (2) UVR8은 또한 RING finger E3 ubiquitin ligase인 CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)과 결합하여 하위 단계로 UV 신호를 전달함 (Favory et al., 2009; Oravecz et al., 2006).
- (3) 최근들어 UVR8이 UV-B의 수용체로서 보고되었으며, UV-B를 인지하는 UVR8의 구조적 메카니즘이 보고됨 (Christie et al., 2012; Wu et al., 2012).
- (4) REPRESSOR OF UV-B PHOTOMORPHOGENESIS1 (RUP1)과 RUP2가 UVR8과 상호

작용하는 negative regulator로 알려져 있음 (Gruber et al., 2010).

(5) RUP1/2는 UVR8의 redimerization을 유도함으로써, UVR8이 positive regulator로 작용하는 COP1과 interaction 하는 것을 억제함 (Heijde and Ulm, 2013).

(6) UV-B가 CUL4-DDB1과 연계되어 있던 COP1-SPA E3 복합체의 유리를 촉진하고, 이러한 COP1-SPA가 새로운 UVR8-COP1-SPA 거대복합체를 형성함으로써 COP1의 UV-B 하에서의 새로운 기능을 부여받게 됨이 보고 (Huang et al, 2013).

나. UV 반응에 관여하는 것으로 알려진 Cockayne Syndrome type-A (CSA) 및 Damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)의 식물 homologue가 보고되었으며, 이들이 식물 UV-B 반응에 관여함이 보고됨 (Biedermann and Hellmann, 2010; Zhang et al., 2010).

3절. 연구 개시시점과 종료시점에서의 연구 개발과 발전 정도 비교

상기 기술한 바와 같이 연구 수행 기간동안 RUP1/2의 UV-B 신호 전달 기작에서의 역할과 COP1-SPA의 상세 작용 기작에 대한 연구결과가 스위스와 미국의 그룹에서 각각 보고됨. 특히 COP1-SPA의 CRL4 복합체와의 연관성 보고는 본 연구 주제에서 탐구하고자 하는 UV-B에서의 CRL4 기질 수용체의 연구의 질적 향상을 위해 도움이 되는 연구자료로 활용될 것으로 기대됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 (Results)

1절. 수행한 주 연구내용

1. 연구기간동안 수행된 주 연구내용은 아래와 같음

- 가. UV 스트레스 하에서 성장률의 변화를 보이는 애기장대의 CRL4 기질 수용체 (DWD 혹은 DCAF) 돌연변이체 (*dhu*) 및 해당 유전자 (*DHU*) 분리
- 나. 상기 돌연변이체 및 해당 유전자의 동정
- 다. 상기 유전자의 UV-B 신호전달 기작에서의 역할 규명
- 라. 상기 유전자의 발현량 조절을 통한 UV 스트레스 내성 형질 전환체 제작 중

2절. 본 연구의 성공적 수행을 위한 선행 연구

- 1. 본 연구진은 선행 연구를 통해 119개의 DWD 및 DCAF 후보 단백질들이 애기장대에 존재하며 이들이 CRL4의 기질 수용체로서 기능을 하고 있음을 보고함 (Lee et al., 2008) (그림 4).

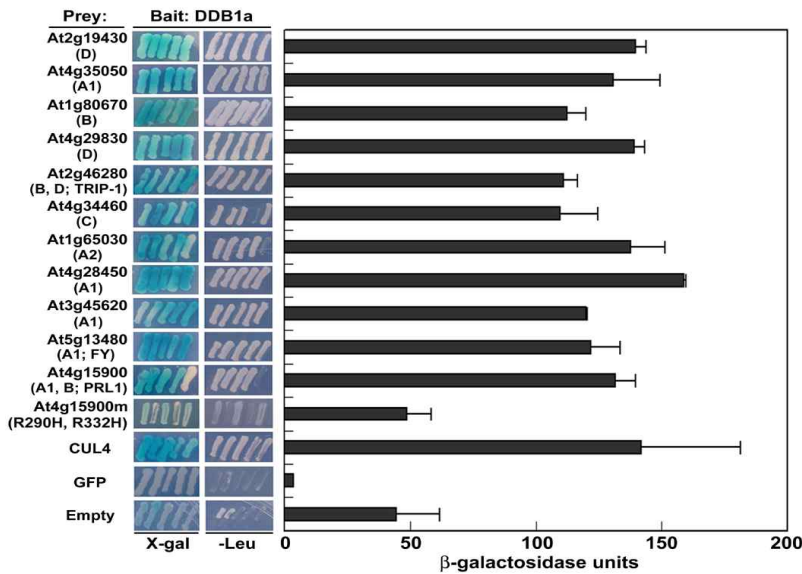


그림 4. CRL4의 adaptor인 DDB1a와 직접 결합하는 CRL4 대표 기질 수용체들.

- 2. 본 연구진은 선행 연구를 통해, 119개의 DWD 및 DCAF 후보 단백질에 해당하는 T-DNA 돌연변이체를 Arabidopsis Biological Research Center (ABRC)로부터 확보하였음. 이를 기반으로 야생종과 비교시 UV-B 신호전달과정이 변화된 돌연변이체를 찾고자 스크리닝 과정을 수행하였음.

3절. 세부적인 연구내용 및 결과

1. UV 스트레스 신호 전달에 관여하는 CRL4 기질 수용체 관련 돌연변이체 (*dhu*) 및 유전자 (*DHU*) 선별

가. 상기 T-DNA 돌연변이체 중 74개의 DWD (DCAF) 유전자에 해당하는 돌연변이체는 homozygous T-DNA 삽입 돌연변이체이거나 이미 기능적 소실이 확인된 돌연변이체임.

나. 본 연구진은 상기 돌연변이체를 이용하여 UV하에서 증가된 감수성 형질을 보이는 3종의 DWD (DCAF) T-DNA 삽입 돌연변이체를 확보하였고 이들을 각각 DHU (DWD hypersensitive to UV-B) 1, 2, 3이라 명명함 (그림 5).

(1) *DHU1-3* 유전자의 AGI (Arabidopsis Gene ID)는 다음과 같음.

DHU1, At5g27570; *DHU2*, At1g29320; *DHU3*, At4g34280

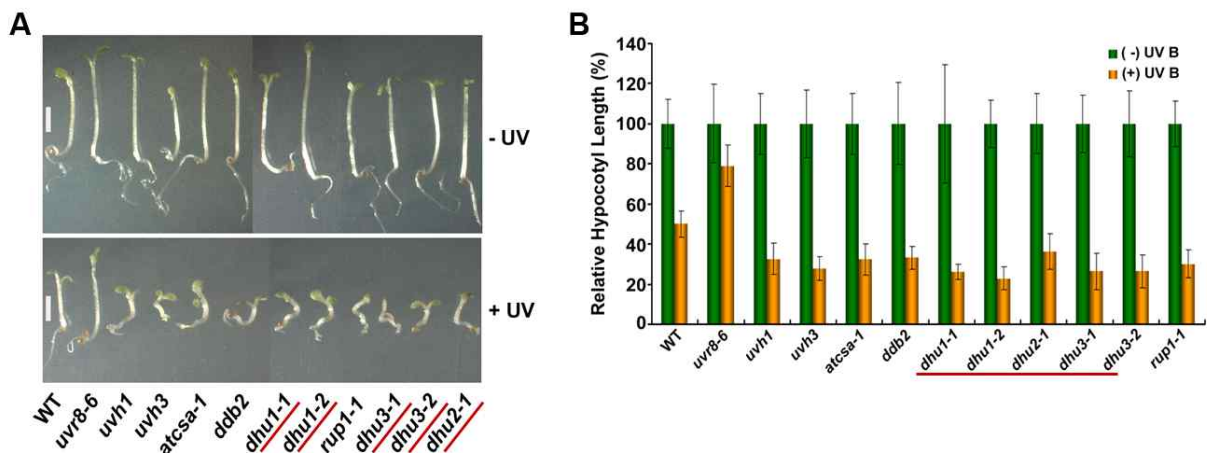


그림 5. UV에 대해 증가된 감수성을 보이는 *dhu* 돌연변이체들. 본 연구에 사용되는 *dhu1*, *dhu2*, *dhu3* 돌연변이체들은 붉은색 밑줄로 표기되어 있음. *uvr8-6*는 UV 비감수성 형질을 보이는 것으로 보고된 돌연변이체이며, *uvh1*, *uvh3*, *atcsa-1*, *ddb2*, *rup1-1*은 UV에 의해 증가된 감수성을 보이는 것으로 보고된 돌연변이체임.

2. DHU1-3와 CRL4 adaptor인 DDB1과의 결합 여부 확인

가. CRL4 adaptor인 DDB1과의 결합 여부는 DHU1-3가 CRL4의 기질 수용체로서 역할을 할 수 있는지의 여부를 판단하는 주요 근거로 사용됨 (Lee et al., 2008).

나. 그림 6에서 보듯 세 단백질 모두가 애기장대 DDB1의 family 중 하나인 DDB1a와 직접적인 결합을 할 수 있음을 검증함. 이는 선별 단백질이 UV 신호 전달 기작에서 신호 전달 단백질의 분해에 관여하고 있을 가능성을 강하게 암시하며 해당 연구의 대상으로 높은 가치를 보유하고 있음을 나타냄.

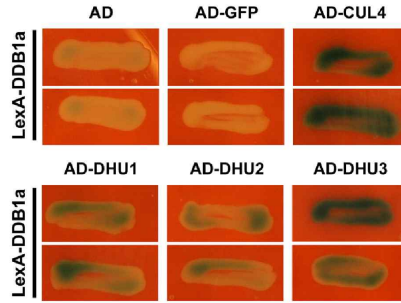


그림 6. CUL4 adaptor와 직접 결합하는 DHU1-3.

다. DDB1과 DHU1-3간의 식물체 내에서의 association 여부는 상기 단백질들의 CUL4 기질 수용체로서의 역할을 추가로 검증해 줄 수 있음. 현재 DHUs-MYC과 FLAG-DDB1이 동시에 발현되는 형질전환 식물체를 제작 및 확보 중이며, co-immunoprecipitation assay (co-IP)를 통해 DHU와 DDB1간의 생체내 interaction 여부를 조사중에 있음.

3. UV 신호 전달 과정시 DHUs의 상세 작용 기작 규명

가. DHUs의 UV-B에 의한 inducibility 여부 확인

- (1) *DHUs* 유전자의 UV-B 신호전달 기작 참여여부를 파악하기 위해, *DHUs*의 UV-B에 의한 inducibility 여부를 Q-PCR을 통해 확인 (그림 7).
- (2) *DHU3*의 경우 UV-B에 의한 inducibility 확인.

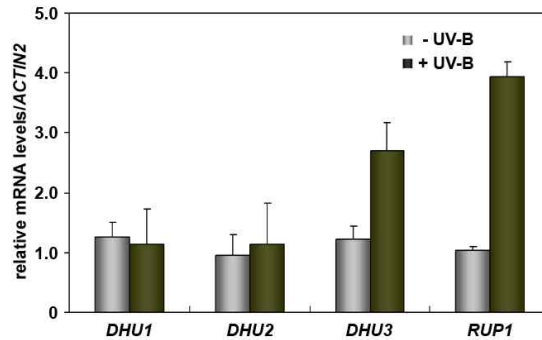


그림 7. UV-B에 의한 *DHUs*의 inducibility 여부 확인.

나. UV 신호전달의 주 조절 단백질인 UVR8과의 연관성 탐구

(1) DHUs과 UVR8간의 결합 여부 조사

(가) DHUs는 단백질 분해에 관여하며 UV 반응의 negative regulator이므로, 관련 반응의 positive regulator 분해에 관여할 가능성이 있음. 이에 대표적인 기질 후보 단백질인 UVR8과 DHUs 간의 결합 여부를 yeast two hybrid를 통해 확인함.

(나) 그림 8에서 보는바와 같이 DHUs는 UVR8과 interaction 하지 않음.

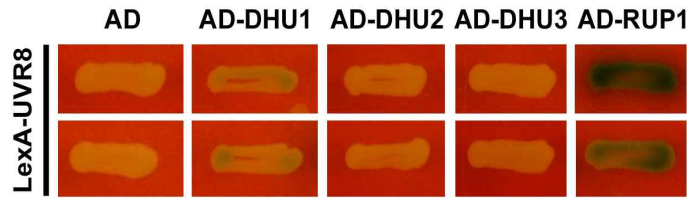


그림 8. UV-B 수용체인 UVR8과 DHUs간의 yeast two hybrid assay.

(다) 더욱이 DHU 유전자의 소실은 UVR8 단백질량에 아무런 변화를 주지 못함 (그림 9).

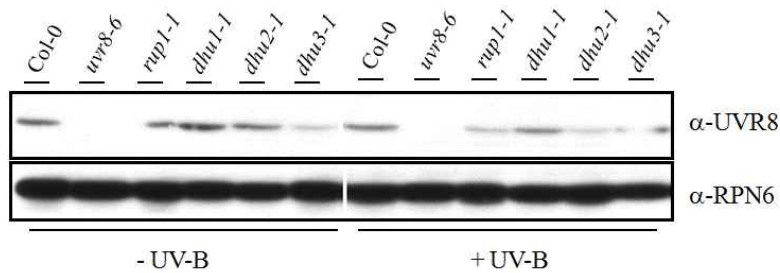


그림 9. UV-B 수용체인 UVR8과 DHUs간의 yeast two hybrid assay.

(라) 상기의 결과를 통해 DHUs의 기질로서 UVR8이 기능하지 않으며, UVR8이 DHUs의 조절하에 있지 않음을 검증함.

다. *dhu* 돌연변이체내에서의 UV-B responsive 유전자 발현 양상 조사

- (1) UV-B 신호전달 기작에서의 DHUs의 역할을 보다 상세히 규명하기 위해, UV-B 조사 후 야생종과 *dhu* 간에 UV-B responsive 유전자 발현 양상을 Q-PCR을 통해 비교함.
- (2) UV-B 신호전달 기작의 positive regulator로서 알려진 *HY5*와 *CHS*를 대표적인 UV-B responsive 유전자로 선정하고 이들의 발현 양상을 확인함 (그림 10, 11).
- (3) 그림 10, 11에서 보는바와 같이 UV-B 조사시 *HY5*와 *CHS*의 발현량이 *dhu*에서 더 증가함을 알 수 있음.
- (4) DHUs 단백질은 UV-B 신호전달 하에서 negative regulator로서 작용하며, DHUs의 역할은 *HY5*, *CHS* 유전자 발현의 상위에서 이루어지고, 해당 유전자의 발현 억제에 관여함을 알 수 있음.

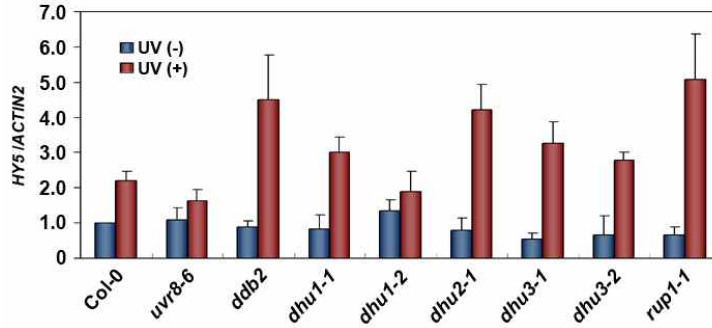


그림 10. *dhu*에서 관찰되는 UV-B에 의한 *HY5*의 hyper-induction.

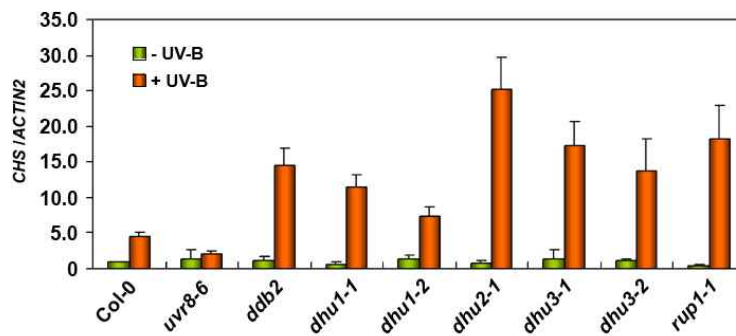


그림 11. *dhu*에서 관찰되는 UV-B에 의한 *CHS*의 hyper-induction.

라. *dhu* 돌연변이체내에서의 *HY5* 단백질 축적 양상 조사

- (1) UV-B 신호전달 기작에서의 DHUs의 역할을 보다 상세히 규명하기 위해, UV-B 조사 후 야생종과 *dhu* 간에 *HY5* 단백질 축적 양상을 western blot을 통해 비교함 (그림 12).
- (2) 그림 12에서 보는바와 같이 UV-B 조사시 *HY5*의 단백질 축적량이 *dhu*에서 더 증가함을 알 수 있음.
- (3) DHUs 단백질이 UV-B 조사시에 *HY5* 단백질의 축적을 억제하고 있음을 알 수 있으며, 이러한 작용이 최소한 부분적으로 UV-B에 대한 *dhu*의 증가된 감수성에 영향을 미침을 알 수 있음.
- (4) *CHS* 및 향후 DNA chip 결과를 통해 얻어지는 신호 전달 단백질 등의 축적량 여부를 tag protein을 이용한 형질 전좌체 제작 및 확보된 향체를 통하여 조사할 예정임.

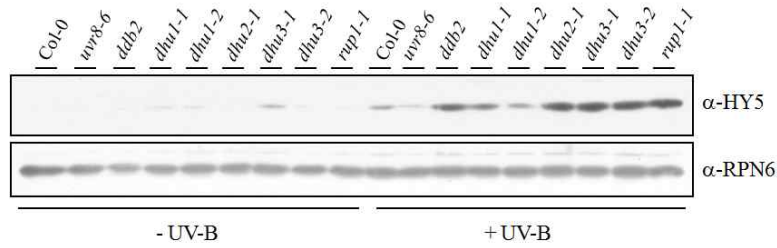


그림 12. *dhu*에서 관찰되는 UV-B에 의한 HY5의 hyper-accumulation.

4. UV 스트레스 내성 식물 제작

가. DHUs의 과다발현체 제작

(1) 상기 *dhu* 돌연변이체들은 UV에 의해 증가된 감수성을 보유하고 있음. 이는 해당 유전자들의 과다 발현체가 UV 스트레스에 내성을 보일 가능성을 제시함.

(가) 상기 co-IP를 위해 제작중인 FLAG-DDB1 background하에서의 DHUs-MYC 과다 발현체가 대상이 될 수 있음. 그러므로 이들의 UV 저항성 여부를 향후 고찰.

나. DHUs homologue의 형질 전환체 제작을 통한 UV 스트레스 내성 작물 구축

(1) DHU1, 2의 경우 최소 69% 이상의 아미노산 유사성을 보이는 homologue가 rice에 존재하며, DHU3의 경우 최소 67% 이상의 아미노산 유사성을 보이는 homologue가 soybean, poplar 등에 존재함. 이는 해당 유전자가 식물 종간에 유사한 기능을 보유할 가능성이 높음을 암시하므로, 연구 결과를 작물로 응용하는 것이 수월할 것으로 판단됨.

다. 본 연구 과제의 기간이 1년인 점을 감안하여, 현재 UV 스트레스 저항성 애기장대 제작에 치중하고 있음. 상기 연구 결과를 기반으로 향후 UV 스트레스 저항성 작물 제작에 적용할 예정임.

5. DHU3에 대한 보다 세부적인 작용기작 추적

가. 연구 결과의 신속하고 효율적인 산출을 위해, CRL4의 adaptor인 DDB1a와 가장 강한 interaction을 보이는 DHU3에 보다 초점을 맞추어 세부 작용 기작을 추적 중.

나. *DHU3* 유전자 구조 및 *dhu3-1*, *dhu3-2*의 *DHU3* 발현량은 다음과 같음 (그림 13).

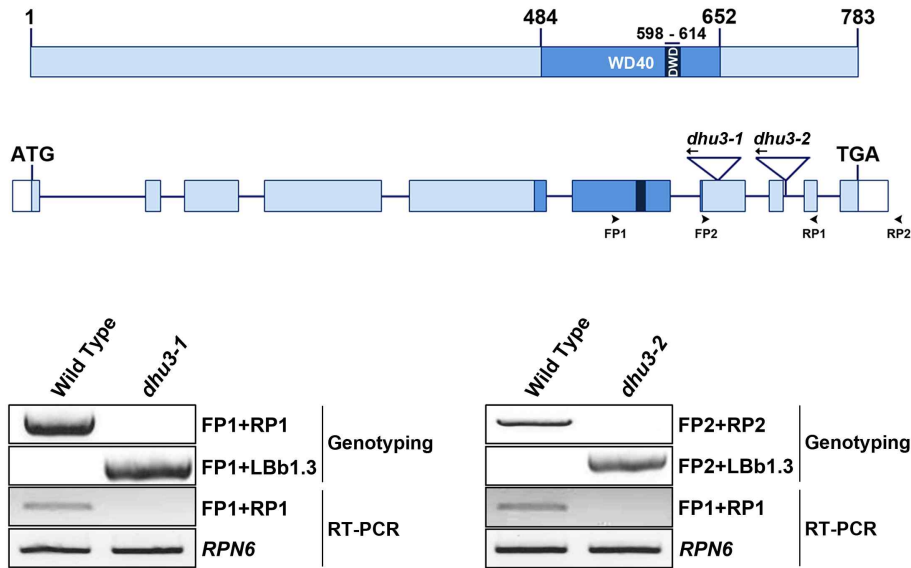


그림 13. DHU3의 구조 조사 및 *dhu3*에서의 *DHU3* 유전자 발현 여부 확인.

다. *dhu3*의 UV-B specific hypersensitivity 여부를 검증하기 위해 red, far-red, blue, white, dark상에서의 성장 정도를 야생종과 비교한 결과 *dhu3*의 형질은 UV-B specific 함을 검증 (그림 14).

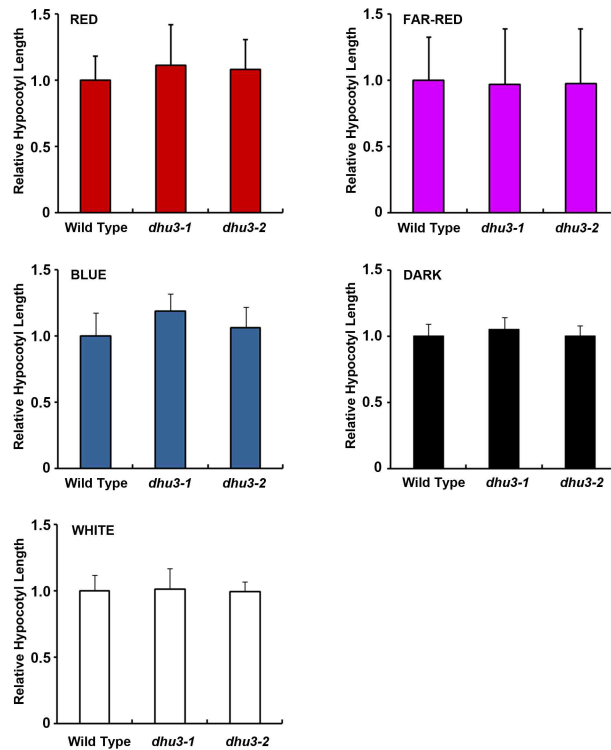


그림 14. 다양한 빛 조사시 야생종과 *dhu3*간의 형질 비교.

라. UV 신호 전달 과정시 *DHU3*의 상세 작용 기작 규명을 위해 UV-B 조사시 야생종과 *dhu3* 간의 발현 유전자의 차이를 DNA chip analysis를 통해 확인 중.

- (1) 관련 분석을 통해 얻어지는 자료가 *DHU* 유전자의 소실을 통해 변화되는 단백질의 정보를 직접적으로 제공해주지는 못함.
- (2) 그럼에도 불구하고 protein chip 혹은 2D 분석을 통해 얻어지는 실험적 artifact에 비해 chip analysis를 통해 얻어지는 실험적 오류의 확률이 기술적 특성상 더 낮을 것으로 예상되어 이러한 분석 기법을 선택함.
- (3) 상기 분석을 통해 얻어지는 유전자 발현 차이에 대한 카테고리화를 통해 단백질 안정성에 영향을 받을 가능성이 높은 인자들 (상기 유전자들의 발현을 조절하는 전사조절 인자 등)을 예측할 수 있음.
- (4) 후보자 단백질들의 안정성 조사는 tag과의 융합을 통한 형질전환체 제작 및 상용화된 해당 항체, *in vitro* cell free degradation assay 등을 통해 수행될 수 있음.

4절. 연구 방법

■ 연구 수행을 위해 요구되는 세부 연구 방법을 아래에 기술함.

1. UV-B 처리

가. $1.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (혹은 필요에 따라 $3.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)의 constant UV-B 조사하에서 7일간 키운 애기장대 유묘의 형태적 차이를 통해 *dhu* 돌연변이체를 선별하였음. $1.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에 비해 $3.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 UV-B를 조사시 하배축의 성장이 보다 더 억제되는 것을 확인함으로써 본 실험의 조건이 연구를 위해 적절함을 확인함.

나. UV-B 조사를 위해 TL/20W/12RS lamp (broad band, Philips)와 295 nm (+ UV-B) & 320 nm (- UV-B) Long Pass Filter (Edmund optics)를 사용하였음.

나. UV 신호 전달 조절자들의 단백질 축적량, mRNA 발현량의 차이를 조사하기 위해 동일한 조건을 사용

2. *DHUs*의 과다 발현체 제작

가. 35S CaMV promoter를 보유한 식물 형질전환용 벡터에 유전자를 도입

나. 해당 construct를 제작한 후, *Agrobacterium* strain인 GV3101을 이용하여 애기장대에 형질 전환

3. Yeast two hybrid를 통한 기질 후보 단백질과 DHU간의 상호결합 여부 분석

가. LexA system (Clontech)을 사용함.

- (1) Bait로 DHU1-3을, prey로 기질 후보 단백질을 사용함.

4. Immunoblot analysis

가. DHU 상세작용 기작 규명을 위해 UVR8, HY5 등의 단백질 수준을 조사함.

- (1) 관련 항체는 Dr. Xing Wang Deng 연구팀 (Yale University)으로부터 제공받음.

나. Internal control을 위해 RPN6 항체를 사용함 (Lee et al., 2011).

5. RT-PCR 및 real-time PCR

가. DHU 상세작용 기작 규명을 위해 야생종 및 *dhu* 내의 다양한 고온 스트레스 신호 관련 유전자의 발현 양상을 확인

(1) 1st strand cDNA 합성을 위해 MMLV-reverse transcriptase를 사용함.

(2) Real-time PCR은 SYBR Green mixture를 사용함.

(3) Internal control로 *actin2* 유전자를 사용함.

나. real-time PCR (Q-PCR)을 위해 Rotor-Gene Q model (Qiagen)을 사용함.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 (Goal achievement and contribution to the related field)

1절. 목표달성도

세부 연구 목표	비중 (%)	달성도 (%)	비고
UV 스트레스 신호 전달에 관여하는 CRL4 기질 수용체 관련 돌연변이체 (<i>dhu</i>) 및 유전자 (<i>DHU</i>) 선별	25	25	- <i>dhu</i> 및 <i>DHU</i> 분리 후 이들이 실제 UV-B 신호전달기작에 관여함을 검증.
DHU1-3와 CRL4 adaptor인 DDB1과의 결합 여부 확인	25	20	- Yeast two hybrid를 통한 검증. <i>In vivo</i> co-IP를 통한 추가 검증이 요구되며 현재 관련 형질 전환체 선별 중.
UV 신호 전달 과정시 DHUs의 상세 작용 기작 규명	25	20	- <i>dhu</i> 내에서의 UV-responsive 유전자 발현 양상 추적. - <i>dhu</i> 내에서의 HY5 단백질 축적 양상 추적. - 이는 현재 준비 중인 microarray data를 통해 보다 자세히 고찰 될 예정. - DHUs와 UVR8간의 연관성 여부 조사. - <i>dhu3</i> 의 UV-B 특이성 검증.
UV 스트레스 내성 식물 제작	25	10	- 현재 관련 형질 전환체 선별 중. - 선별 후 UV 스트레스에 대한 내성 조사 예정.
합계	100	75	

2절. 관련분야에의 기여도

1. 교육 분야 및 관련 학문 분야의 지식 업데이트

가. 단백질 안정성 조절 기작 및 환경 스트레스 신호 전달 기작과 관련된 지식의 업데이트에 공헌

나. 상기 업데이트를 통해, 타연구자들의 연구 수행을 위한 지식적 배경과 피교육자들의 지적 기반 강화

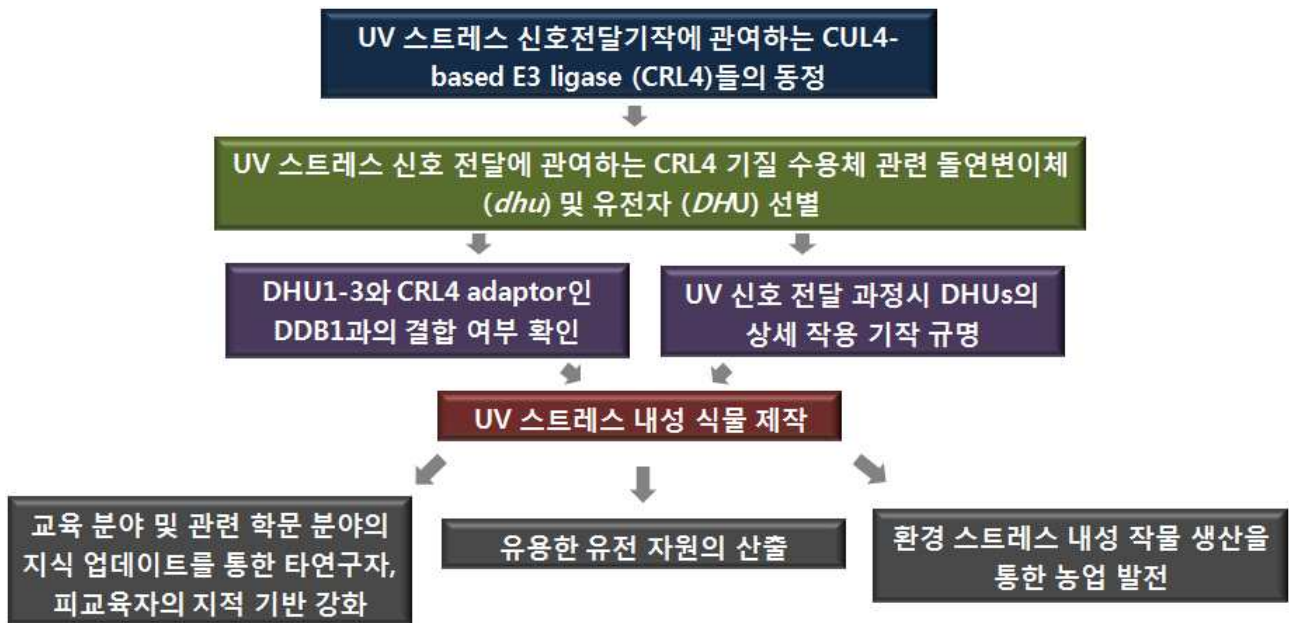
2. 관련 산업 분야의 해당 유전 자원 활용 가능성

가. 본 연구 과제의 적용을 통해 산출될 것으로 기대되는 UV 스트레스 내성 유용 작물은 농

가의 소득 증대를 위한 유전적 자원으로써 활용될 수 있음.

3. 관련 분야의 기술 발전 가속화

가. 상기 관련 학문 분야의 지식 업데이트와 유용 작물 생산을 통한 산업화로의 기여는, 환경 스트레스 내성 식물 산출을 통한 작물 생산량 증대와 관련된 농업 기술 발전에 크게 기여할 것으로 사료됨.



제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 (Research products and the plans of their application)

1절. 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

1. UV 스트레스 내성 유용 작물 개발을 통한 농업 분야로의 응용

가. UV 스트레스 내성 유용 유전자의 작물별 orthologue 선별 및 이의 발현량 조절을 통한 해당 작물의 UV 스트레스 내성화

- (1) 생장률이 개선된 약용 및 식량 작물 (고추 등)의 유전자원을 제공하고 이의 실용화를 통해 유용 약재, 과일, 곡물의 안정적 확보에 공헌
- (2) 생장률이 개선된 바이오 에너지 작물 (poplar 등)의 유전자원을 제공하고 이의 실용화를 통해 바이오 연료 생산량 증가에 공헌
- (3) 생장률이 개선된 원예 작물의 유전자원을 제공하고 이의 실용화를 통해 해당 작물의 질적 향상에 공헌
- (4) 상기 농업 분야로의 효율적이고 신속한 응용을 위해 종자회사와의 공동 연구를 통한 산업화가 고려될 수 있음

2절. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

1. 연구 분야 관련 지식 업데이트를 통한 교육 효과

가. 관련 분야 생명과학 지식의 질적 강화

- (1) 진핵생물의 post-translational modification 과정에 대한 지식 업데이트를 통해 피교육자의 해당 분야 지식 강화
- (2) 식물의 UV 스트레스 신호 전달 기작 과정에 대한 지식 업데이트를 통해 피교육자의 해당 분야 지식 강화
- (3) 환경 스트레스 신호 전달 과정에 관여하는 CRL 복합체들의 전체적인 기능적 네트워크 규명을 통한 피교육자의 해당 분야 지식 강화
- (4) 상기 언급한 학문 분야는 식물학, 나아가 생명과학의 핫이슈로 대두되고 있는 분야임. 이러한 분야에 대한 피교육자의 지식 강화는 예비 생명과학자들의 잠재적 연구 역량 강화라는 긍정적인 측면으로 이루어질 수 있음.

3절. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

1. 논문 확보 계획

가. 본 연구과제의 수행동안, 해당 연구과제와 관련하여 사사된 1건의 논문이 해당 분야 최고 저널인 The Plant Cell 잡지에 제출되었음 (Five-Year Impact Factor: 10.125). 현재

revision 과정이 진행중이며, 이로부터 산출되는 논문은 높은 연구가치를 가진 연구 결과일 것으로 기대됨.

2. 특허 확보 계획

가. *dhu* 돌연변이체 및 DHU 유전자원 관련 작물형질전환체의 UV-B 스트레스 내성 여부가 검증된다면 특허 출원으로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

4절. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1. 추가연구로의 활용

가. 본 연구과제의 수행 기간은 총 1년으로서 완성도 높은 연구 결과를 산출하기에는 시간적 제약이 있음. 이에 계획서상에 제시한 산업화를 통한 기대효과를 충분히 충족시키는데 다소 미흡하였음. 그러나, 본 연구를 통해 산출된 연구 결과를 기반으로 하여 보다 long-term project에 해당 하는 연구 (예를 들어 구체화된 UV 내성 유용 작물의 제작 및 상용화)를 진행할 수 있을 것으로 기대됨. 또한 보고중인 유전 자원과 기존의 UV 신호전달 관련 유전 자원과의 cross (예를 들어 double mutant 제작/복합적인 형질 전환체 제작 등)을 통해 한층 기능이 강화된 UV 내성 식물을 제작할 수 있을 것으로 기대됨.

나. 본 연구 대상인 CRL4는 본 연구를 통한 UV-B 관련 뿐 아니라, 효모 및 사람 등에서 세포 분열 과정을 포함한 다양한 세포 현상과 관련되어 있다는 보고가 있으므로, 이와 관련된 연구에도 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

2. 타연구로의 활용

가. Ubiquitination이 진핵생물에 공통적으로 존재하는 조절 기작이며, CRL4 복합체의 기능이 진핵생물간에 유사함을 감안할 때, 식물 뿐 아니라 동물 분야의 관련 생물학적 지식 강화에도 공헌할 것으로 기대됨.

나. 즉, 의학 분야로의 응용을 통해 ubiquitination과 관련된 신경퇴행성질환, 암 질병의 치료법 및 예방법 개발에 공헌할 것으로 기대됨.

3. UV-B와 CRL4의 기작을 응용하여 환경 바이오마커로 사용할 수 있을 것으로 기대됨.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 (Scientific informations related to the topic from abroad)

- 앞서 언급한바와 같이 식물의 UV-B 신호전달 과정과 관련된 최신 논문 및 CRL4 기질 수용체에 관련된 최신 논문이 수집되었음. 해당되는 논문은 다음과 같음.

Brown et al., 2005; Cloix and Jenkins, 2008; Heijde and Ulm, 2012; Favory et al., 2009; Oravecz et al., 2006; Christie et al., 2012; Wu et al., 2012; Biedermann and Hellmann, 2010; Zhang et al., 2010; Gruber et al., 2010; Angers et al., 2006; He et al., 2006; Higa et al., 2006; Jin et al., 2006; Lee et al., 2008; Lee et al., 2010; Lee et al., 2011; Jackson S, Xiong Y, 2009; Guo et al., 2013.

제 7 장 연구시설·장비 현황 (Equipments and facilities for the research)

- 해당사항 없음.

제 8 장 참고문헌 (References)

- Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, Zheng N (2006) Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 443: 590 - 593.
- Biedermann S, Hellmann H (2010) The DDB1a interacting proteins ATCSA-1 and DDB2 are critical factors for UV-B tolerance and genomic integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 62: 404-415.
- Bohnert HJ, Gong Q, Li P, Ma S (2006) Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - Getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 180-188.
- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 18225-18230.
- Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, Kelly SM, Hothorn M, Smith BO, Hitomi K, Jenkins GI, Getzoff ED (2012) Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* 335: 1492-1496.
- Cloix C, Jenkins GI (2008) Interaction of the *Arabidopsis* UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. *Mol. Plant* 1: 118-128.
- Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravec A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, Seidlitz HK, Nagy F, Ulm R. (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 28: 591-601.
- Gruber H, Heijde M, Heller W, Albert A, Seidlitz HK, Ulm R. (2010) Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 20132-20137.
- Guo L, Nezames CD, Sheng L, Deng X, Wei N (2013) Cullin-RING ubiquitin ligase family in plant abiotic stress pathways. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 21-30.
- He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y (2006) DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4 - ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* 20: 2949 - 2954.
- Heijde M, Ulm R (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 17: 230-237.
- Heijde M, Ulm R (2013) Reversion of the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110: 1113-1118.
- Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H (2006) CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat.*

Cell Biol. 8: 1277 - 1283.

- Huang X, Ouyang X, Yang P, Lau OS, Chen L, Wei N, Deng XW (2013) Conversion from CUL4-based COP1-SPA E3 apparatus to UVR8-COP1-SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110: 16669-16674.
- Jackson S, Xiong Y (2009) CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. Trends Biochem. Sci. 34: 562-570.
- Jenkins GI (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. Annu. Rev. Plant Biol. 60: 407-431.
- Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC (2006) A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. Mol. Cell 23: 709 - 721.
- V.G Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, Sailaja K (2003) Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. Agricultural and Forest Meteorology 120: 191-218.
- Lee JH, Terzaghi W, Deng XW (2011) DWA3, an Arabidopsis DWD protein, acts as a negative regulator in ABA signal transduction. Plant Sci. 180: 352-357.
- Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW (2008) Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. Plant Cell 20: 152-167.
- Lee JH, Yoon HJ, Terzaghi W, Martinez C, Dai M, Li J, Byun MO, Deng XW (2010) DWA1 and DWA2, two Arabidopsis DWD protein components of CUL4-based E3 ligases, act together as negative regulators in ABA signal transduction. Plant Cell 22: 1716-1732.
- Oravecz A, Baumann A, Máté Z, Brzezinska A, Molinier J, Oakeley EJ, Adám E, Schäfer E, Nagy F, Ulm R (2006) CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. Plant Cell 18: 1975-1990.
- Seo KI, Song E, Chung S, Lee JH (2012) Roles of various Cullin-RING E3 ligases involved in hormonal and stress responses in plants. J. Plant Biol. 55: 421-428.
- Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 55: 555 - 590.
- UNEP (2002) Executive Summary. Final of UNEP/WMO Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002. Prepared by the Scientific Assessment Panel of the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. UNEP, Nairobi (released 23 August 2002).
- Vierstra RD (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 110: 385-397.
- Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P, Deng H, Wang J, Deng

X, Shi Y (2012) Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484: 214-219.

Zhang C, Guo H, Zhang J, Guo G, Schumaker KS, Guo Y (2010) Arabidopsis cockayne syndrome A-like proteins 1A and 1B form a complex with CULLIN4 and damage DNA binding protein 1A and regulate the response to UV irradiation. *Plant Cell* 22: 2353-2369.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업 (신진연구자지원사업)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업 (신진연구자지원사업)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.