

115081-2

RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한
내건성 식물 개발 최종보고서

2018

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(√) / 공개(√), 비공개()

발간등록번호

11-1543000-002235-01

RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한 내건성 식물 개발 최종보고서

2018. 3. 29.

주관연구기관 / 부산대학교 산학협력단

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한 내건성 식물 개발'(연구개발 기간 : 2015. 12. ~ 2017. 12.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

주관연구기관명 : 부산대학교 산학협력단 (윤석영)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)



29.

주관연구기관책임자: 이 재 훈
협동연구기관책임자:
참여기관책임자:

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제 고유 번호	115081-2	해당 단계 연구 기간	2015. 12. 18 - 2017. 12. 17	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	중사업명	농림축산식품 연구개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한 내건성 식물 개발			
연구책임자	이재훈	해당단계 참여연구원 수	총: 4 명 내부: 4 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 100,000천원 민간: 천원 계: 100,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 4 명 내부: 4 명 외부: 명	총 연구개발 비	정부: 100,000천원 민간: 천원 계: 100,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	부산대학교 생물교육과			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	○ 일반과제 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음
-------------------------	---

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특 허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기 탁 번호	JPB 59:223-230 BBRC 491:285-290 GENG 40:233-241										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 본 연구를 통해 유비퀴티네이션 매개 내건성 과정에 관여하는 애기장대/벼의 유용 유전자원을 획득하고 이들의 세부 작용 기작을 규명함.
- 본 연구는 유용 내건성 작물 산출을 위한 이론적 기반 확립 및 해당 작물의 상품화를 통한 농업 분야로의 응용에 공헌할 것으로 기대됨.
- 본 연구를 통해 1편의 SCI 저널, 2편의 SCIE 저널을 게재하였으며, 추가로 5건의 학술 발표 및 4건의 연구인력양성 성과를 산출하였음. 상기 성과는 목표를 초과하여 달성되었음.

보고서 면수

26

요약문

연구의 목적 및 내용	<p>본 연구의 목적은 식물의 내건성 구현에 기능적으로 관여하는 RING E3 ubiquitin ligase 유전자를 동정하고 이들의 생체 내 세부 작용 기작 이해를 통해, 물부족 스트레스로부터 내건성 반응까지의 일련의 과정을 통합적으로 규명하는데 있음. 또한 해당 유용 유전자 베타 orthologue의 발현량 변화를 통한 내건성 베타 작물을 구축함으로써 생산성이 증가된 베타를 확립하고 베타의 작물재배 지역을 확충하고자 함.</p> <p>본 연구를 통해 산출하고자 하는 연구성과의 주요 개발 내용은 아래와 같음.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 내건성 증진에 관련된 유용 애기장대 유전자, 돌연변이 선별 및 해당 유전자의 생체 내 상세 기능 규명 <ol style="list-style-type: none"> (1) 앱시스산/물부족 스트레스에 의해 전사량의 증가를 보이는 RING 유전자 선별 (2) 해당 선별 RING 유전자의 돌연변이체 확보 및 증식 (3) 해당 돌연변이체 중 앱시스산 처리에 의해 변화된 감수성을 보이는 돌연변이체 선별 (4) <i>RIA1</i> complementation 형질전환체 제작 (5) <i>RIA1</i> 돌연변이체의 앱시스산 과다 감수성, 내건성 형질 확인 (6) <i>RIA1</i> 유전자의 발현 양상 탐색 (7) <i>RIA1</i>의 RING E3 ligase 활성 확인 (8) 야생종과 <i>ria1</i> 간의 expression profiling 조사를 통한 <i>RIA1</i>의 내건성 기작에서의 상세 기능 조사 (9) <i>RIA1</i> 단백질의 기질 동정 2. <i>RIA1</i> 베타 orthologue 유전자(<i>OsRIA1</i>)의 베타 형질전환체에 대한 내건성 형질 탐색 및 애기장대 기질 유전자 베타 작물 도입을 통한 형질전환체 제작 <ol style="list-style-type: none"> (1) <i>AtRIA1</i>의 베타 orthologue 선별 (2) <i>OsRIA1</i>의 발현량 조절을 통한 애기장대 형질전환체 제작 및 내건성 탐색 (3) <i>OsRIA1</i>의 발현량 조절을 통한 베타 형질전환체 제작 및 내건성 탐색 				
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> 1. 내건성 형질을 획득한 애기장대 유용 유전자 및 돌연변이체 확보 2. 내건성 형질을 획득한 베타 유용 유전자 및 형질전환체 확보 3. 식물의 유비퀴티네이션 매개 내건성 기작에 대한 이해 4. 유용 내건성 작물 산출을 위한 이론적 기반 확립 5. 1편의 SCI 저널 2편의 SCI 급 저널 게재 6. 5건의 학술 발표 및 4건의 연구인력양성 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 학문·기술적 측면의 기대성과 <ol style="list-style-type: none"> (1) 생명 공학 제반 지식 및 관련 기술의 업데이트 <ul style="list-style-type: none"> - 내건성 기작의 상세 이해 - 유비퀴티네이션과 연계된 번역 후 변형 과정의 이해 (2) 연구 경쟁력 강화 <ul style="list-style-type: none"> - 산출된 연구 내용의 저명 학술지로의 게재를 통한 연구 위상 제고 및 연구 경쟁력 강화 2. 경제·산업적 측면의 기대성과 <ol style="list-style-type: none"> (1) 고부가가치의 내건성 작물 발굴 및 상품화를 통한 농업 분야로의 응용 <ul style="list-style-type: none"> - 물부족 스트레스에 의해 야기되는 화분 발달 저해를 완화시킴으로써 수확량을 증가시키고 이를 통해 곡물의 안정적 확보에 공헌 - 척박한 환경에서의 작물 생존률을 증가시킴으로써 작물의 생산량 증가에 공헌 - 상급 공헌을 통한 국내 농가소득 증대 및 국제 농업 시장에서의 유리한 위치 확보 				
국문핵심어 (5개 이내)	번역 후 변형과정	내건성	RING	애기장대	베타

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 연구수행내용 및 성과	9
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	20
4. 연구개발성과의 활용 계획 등	22
붙임. 참고 문헌	23

<별첨> 주관연구기관의 자체평가 의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 식물의 내건성 구현에 기능적으로 관여하는 RING E3 ubiquitin ligase 유전자를 동정하고 이들의 생체 내 세부 작용 기작 이해를 통해, 물부족 스트레스로부터 내건성 반응까지의 일련의 과정을 통합적으로 규명함.
- 해당 유용 유전자 벼 orthologue의 발현량 변화를 통한 내건성 벼 작물을 구축함으로써 생산성이 증가된 벼를 확립하고 벼의 작물재배 지역을 확충하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

- 내건성 기작(물부족 스트레스 저항성 기작) 연구의 필요성
 - ▷ 기상청 발표에 따르면, 국내에서는 5-7년 주기로 극심한 가뭄과 물부족 현상이 발생함. 특히 인구밀도 대비 연평균 강수량은 부족한 실정이며, 강수량의 여름 집중으로 인해 타계절의 물부족 현상은 심각한 상황임.
 - ▷ 물부족 스트레스는 전세계 약 50% 농경지의 작물 생산성 감소에 직접적 영향을 미치기 때문에 농업 분야에서 연구되어야 할 주 환경 스트레스로서 지목되어 옴.
 - ▷ 국내 제 1의 식량 작물인 벼의 경우, 물부족 스트레스는 이삭 성숙시기에 화분 발달 저해 등을 통해 수확량을 감소시키는 주원인으로 작용함.
 - ▷ 이에 식량 작물의 수확효율 증대 및 재배 지역 증가를 위해 내건성 기작의 연구는 매우 중요함.
 - ▷ 식물 호르몬 앱시스산 (ABA)은 내건성 증진에 관여하며, 생체 내 내건성 신호 전달과 앱시스산 신호 전달은 서로 연계되어 있음. 이에 내건성 기작 연구를 위해 앱시스산 신호 전달에 대한 규명은 필수적으로 병행되어야 함 (그림 1, 2) (Hubbard et al., 2010).

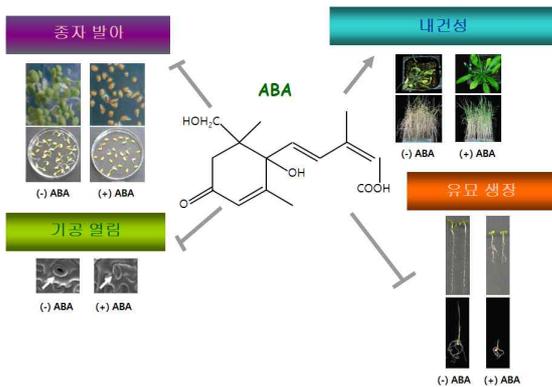


그림 1. 앱시스산의 생체 내 역할

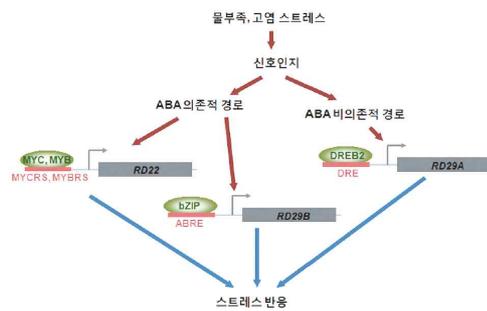


그림 2. 앱시스산 매개 내건성 기작

- 유비퀴티네이션 조절 과정에 대한 연구의 필요성
 - ▷ 내건성 반응을 위하여 작용하는 단백질은 해당 유전자의 전사량을 조절하는 전사조절 과정(transcriptional regulation) 및 단백질의 활성/수명을 조절하는 번역 후 변형 과정

(post-translational modification)을 통해 생성/소멸될 수 있음.

- ▷ 물부족 스트레스에 대한 빠른 반응에는 번역 후 변형 과정이 보다 효과적임.
- ▷ 번역 후 변형 과정 중, 단백질의 수명을 조절하는 방식으로서의 유비퀴티네이션 (ubiquitination) 기작은 가장 효율적이며 신속한 과정으로서 활발히 연구되고 있음.
- ▷ 물부족 스트레스 시 내건성 기작에 방해가 되는 음성 조절자의 신속한 분해는 스트레스에 대한 빠른 대응을 가능케 할 수 있음.
- ▷ 유비퀴티네이션 기작(Seo et al., 2012)

- 유비퀴티네이션은 76개의 아미노산으로 구성된 유비퀴틴(ubiquitin) 단백질이 대상 기질에 순차적으로 사슬을 이루어 결합하는 과정을 의미하며, 유비퀴티네이션 된 단백질은 26S proteasome 복합체를 통해 분해됨. 그러므로, 유비퀴틴은 분해 대상 단백질을 지정하는 딱지(tag)로서의 역할을 함(그림 3).
- 유비퀴티네이션은 E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin ligase) 효소의 순차적 과정을 통해 이루어짐(그림 3).
- 애기장대의 경우 2개의 E1, 약 40개의 E2가 존재하는 반면, E3 효소의 경우 약 1,400개가 존재하며, 이 중 E3 효소가 분해할 대상 단백질을 결정하는 주효소로 역할을 함.
- E3 ligase는 복합체 구성 유무에 따라 single-subunit E3 ligase와 cullin-based E3 ligase (CRL)로 분류됨(그림 4).

: single-subunit E3 ligase는 보유한 도메인의 종류에 따라 HECT, RING, U-box로 분류됨. 이 중 RING E3는 460개 이상의 가장 큰 종류를 이루고 있으며, 그 개수의 방대함으로 인해 관련 연구의 진행이 아직 크게 미흡한 실정임.

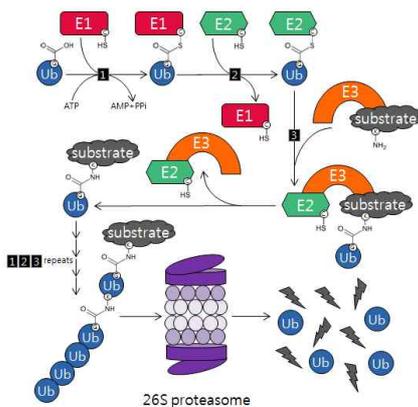


그림 3. 유비퀴티네이션 작용 기작

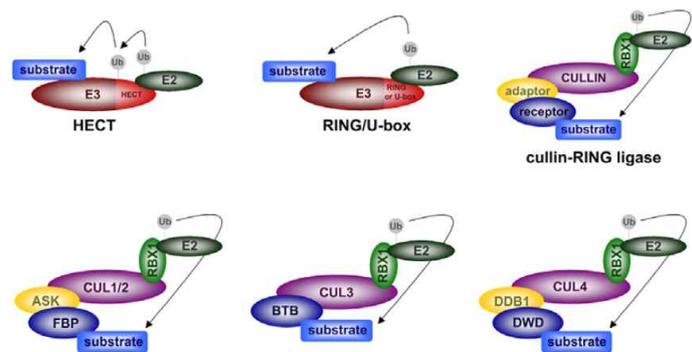


그림 4. E3 ubiquitin ligase의 종류 및 작용 기작

□ 내건성 관련 E3 ligase 연구를 통한 결과 산출은 유용 작물인 벼로의 높은 응용 가능성을 내포함.

- ▷ 본 연구 대상 단백질인 RING E3 ligase의 경우 역시 애기장대 유전자 및 해당 벼 orthologuen 간의 기능적 유사성에 대한 다수의 연구 결과가 제시되고 있음. 이는 RING에 의해 매개되는 유비퀴티네이션 과정이 두 식물종간에 기능적으로 보존되어 있음을 보여주며, 이에 E3 ligase의 애기장대 연구 결과가 벼 작물에 효과적으로 응용될 수 있음을 보여줌(Gao et al., 2011; Zhang et al., 2007).

1-3. 연구개발 범위

- 본 연구는 주요 모델 식물 중 하나인 애기장대를 대상으로 개시되었음. 연구 수행을 통해 애기장대의 내건성 관련 유용 유전자를 분리하고 해당 단백질의 생체 내 세부 작용 기작을 규명한 후, 산출된 결과를 기반으로 유용 작물인 벼에 적용함.
- 본 연구의 목적인 'RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한 내건성 식물 개발'을 위해 유전학, 분자생물학, 생화학, 식물생리학 등의 다양한 기법을 사용함. 광범위한 연구 접근 방식을 통해 내건성 식물 개발의 목적에 부합하는 유의미한 양질의 연구 결과를 산출하고자 함.

1-4. 국내외 기술개발 현황

가. 국내 연구 현황

- 내건성 기작에 관한 다수의 연구가 국내에서 진행되고 있으나, 이를 유비퀴티네이션과 연관지어 수행하는 연구는 활발하지 않음.
- 물부족 스트레스 기작을 조절하는 RING 매개 유비퀴티네이션 관련 국내 연구는 연세대학교 김우택 교수 연구팀, 중앙대학교 이성철 교수 연구팀 등에 의해 주도적으로 진행되고 있음.
- 내건성에 관여하는 RING 단백질에 대한 최근의 국내 대표적 연구는 다음과 같음.
 - ▷ 고추의 RING E3 ligase인 CaDIR1이 앱시스산 매개 내건성 과정을 조절함을 보고(Joo et al., 2017)
 - ▷ 고추의 RING E3 ligase인 CaAIRF1이 CaADIP1 탈인산화 효소 분해를 통해 내건성 과정에 관여함을 보고(Lim et al., 2017)
 - ▷ 애기장대 AtATL78의 내건성 조절 과정이 ROS 신호 전달 과정을 매개함으로써 이루어짐을 보고(Suh et al., 2016)
 - ▷ 벼의 RING E3 ligase인 OsCTR1이 내건성 과정의 양성 조절자로서 기능함을 보고(Lim et al., 2014)
 - ▷ 애기장대 AtATL78의 기능 억제가 내건성 감소를 야기함을 보고(Kim and Kim, 2013)

나. 국외 연구 현황

- 내건성과 관련된 유비퀴티네이션 연구는 UC Davis의 Judy Callis 연구팀, Rockefeller University의 Nam-Hai Chua 연구팀 등에 의해 주로 진행됨.
- Drought, ABA, rice를 검색어로 하여 'PubMed' 검색 결과, 전체 263건의 논문 중 121건이 2014년 이후의 논문임을 알 수 있는데, 이는 본 연구 내용을 통해 적용하고자 하는 '앱시스산에 의해 매개되는 내건성 관련 벼'의 연구가 최근 들어 급증하고 있음을 보여준다 할 수 있음.
- Drought, ABA, rice, E3를 검색어로 하여 'PubMed' 검색시에 8건의 논문이 검색되는데 이는 앱시스산에 의해 매개되는 내건성 관련 벼의 연구 중 E3 ligase에 의한 유비퀴티네이션 연구가 상대적으로 미흡함을 보여주고 있음. 본 연구의 최종 대상 식물이 벼임을 감안할 때, 상기 결과는 본 제안연구의 독창성과 높은 가치 및 잠재성을 보여준다 할 수 있

음.

- 내건성에 관여하는 RING 단백질에 대한 최근의 국외 대표적 연구는 다음과 같음.
 - ▷ 벼의 RING E3 ligase인 DHS가 전사조절인자인 ROC4의 분해를 통해 내건성 과정에 관여함을 보고(Wang et al., 2017)
 - ▷ 애기장대 RING E3 ligase인 ZmXericol가 앱시스산 항상성 조절을 통해 내건성 과정에 관여함을 보고(Brugière et al., 2017)
 - ▷ 애기장대의 RZFP34/CHYR1가 SnRK2.6-매개 인산화를 통해 기공 개폐 및 내건성 과정을 조절함을 보고(Ding et al., 2015)
 - ▷ 애기장대 내건성에 관여하는 RING E3 ligase인 SDIR1의 기질 동정 및 상세 기능 규명 (Zhang et al., 2015)
 - ▷ 애기장대 RING E3 ligase인 NERF가 *NFYA5* 발현 증가를 통해 내건성 과정에 관여함을 보고(Gao et al., 2015)
- 내건성 기작의 많은 부분이 앱시스산에 의해 매개됨에 근거하여, 본 연구 대상 유전자의 생체 내 기능 탐색은 본 유전자가 앱시스산 매개 내건성 기작의 어느 위치에서 기존에 알려진 어떠한 생체 조절 물질과 반응하여 이루어지는지에 초점을 맞추어 연구되어짐.

2. 연구수행내용 및 성과

■ 유용 결과 산출을 위해 수행된 연구 내용 및 결과는 아래와 같음.

1. 내건성 증진에 관련된 유용 애기장대 유전자, 돌연변이 선별 및 해당 유전자의 생체 내 상세 기능 규명

(1) 앱시스산/물부족 스트레스에 의해 전사량의 증가를 보이는 RING 유전자 선별

- ▷ 내건성과 연계된 RING 유전자 선별을 위해, 총 469개의 애기장대 RING 유전자를 대상으로 앱시스산/물부족 스트레스에 의해 2배 이상의 전사량 증가를 보이는 RING 유전자 확보(유전자 발현량 차이는 AtGenExpress Visualization Tool (AVT)의 microarray data에 의거)(Kilian et al., 2007)
- ▷ 각 25종, 19종의 RING 유전자가 앱시스산, 물부족 스트레스에 의해 전사량의 증가를 보임.
- ▷ 이 중 8종의 유전자가 두 처리구에 의해 동일하게 전사량 증가를 보임.

(2) 해당 선별 RING 유전자의 돌연변이체 확보 및 증식

- ▷ 상기 44종의 유전자에 해당하는 T-DNA 삽입 돌연변이체를 Arabidopsis Biological Research Center (ABRC)로부터 확보, 증식하고 이들의 앱시스산 감수성을 추적함.

(3) 해당 돌연변이체 중 앱시스산 처리에 의해 변화된 감수성을 보이는 돌연변이체 선별

- ▷ 선별 돌연변이체 중, 한 종류 유전자의 T-DNA 삽입 돌연변이체가 앱시스산에 의해 증가된 감수성을 보임을 확인하고 본 유전자를 *RIA1* (*RING Induced by ABA1*)이라 명명한 후, 연구를 수행함(그림 5).

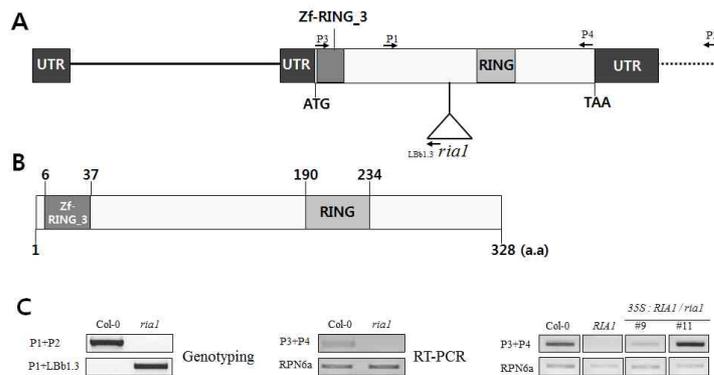


그림 5. 애기장대 *RIA1* (*AtRIA1*) 유전자, 단백질 구조 및 기능소실돌연변이체(*rial1*)의 선별

(4) *RIA1* complementation 형질전환체 제작

- ▷ *RIA1* 돌연변이체의 경우 homozygous T-DNA 삽입 돌연변이체가 1종류만 존재
 - 관찰된 형질이 부가적인 위치로 삽입된 T-DNA로부터의 효과일 가능성을 배제하기 위해 *rial1* 내 *RIA1* 유전자가 과발현되는 complementation line을 제작함(그림 5,6).

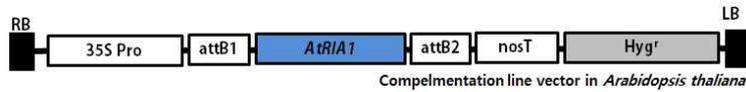


그림 6. *RIA1* complementation 형질전환체용 벡터의 구조

(5) *RIA1* 돌연변이체의 앱시스산 과다 감수성, 내건성 형질 확인

- ▷ *ria1*의 앱시스산 과다감수성 확인(자엽 성장률)(그림 7)
 - 앱시스산 처리에 대한 *ria1* 자엽 성장의 과다 억제 확인
 - *RIA1* complementation 형질전환체의 앱시스산 감수성이 야생종 수준으로 회복됨을 확인
- ▷ *ria1*의 앱시스산 과다감수성 확인(발아율)(그림 8)
 - 앱시스산 처리에 의한 발아율을 야생종과 비교한 결과 *ria1*의 발아가 야생종에 비해 지연되는 것을 확인
 - *RIA1* complementation 형질전환체의 앱시스산 감수성이 야생종 수준으로 회복됨을 확인
- ▷ *RIA1* 단백질이 앱시스산 매개 발아 과정 억제를 위한 음성 조절자로 작용함을 확인
- ▷ *ria1*의 앱시스산 과다감수성 형질은 *RIA1* 유전자의 기능 소실로부터 유래되었음을 검증

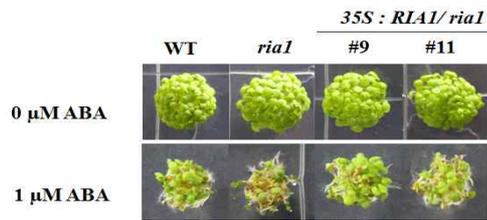


그림 7. 앱시스산 처리에 의한 *ria1* 자엽 성장의 과다 억제

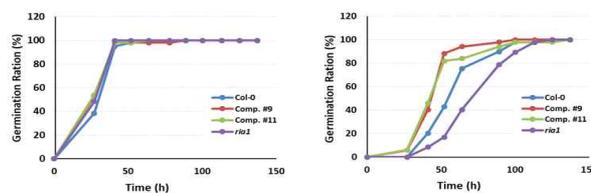


그림 8. 앱시스산 처리에 의한 *ria1*의 발아 지연 확인

- ▷ *ria1*의 앱시스산 증가된 내건성 확인(그림 9)
 - 앱시스산 처리에 의한 기공 개폐도를 야생종과 비교한 결과 *ria1*의 기공 직경이 야생종에 비해 작은 것을 확인
 - 앱시스산 처리에 의한 수분 소실율을 야생종과 비교한 결과 *ria1*의 수분 소실율이 야생종에 비해 감소함을 확인
 - 야생종과 비교시 *ria1*이 물부족 스트레스에 대해 증가된 내건성을 보임을 확인
- ▷ *RIA1* 단백질이 앱시스산 매개 내건성 과정의 음성 조절자로 작용함을 확인

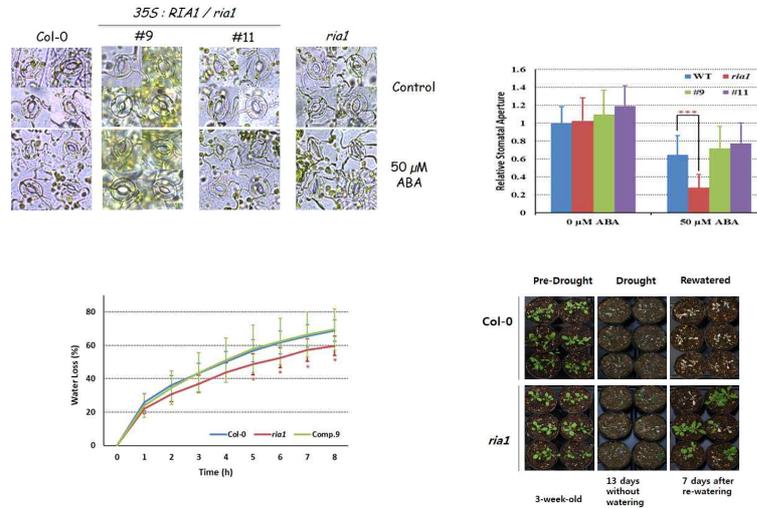


그림 9. RIA1의 기능 소실에 따른 내건성 형질 증가

(6) *RIA1* 유전자의 발현 양상 탐색

- ▷ 해당 유전자의 앱시스산/물부족 스트레스와의 기능적 연관성을 알아보기 위해 앱시스산 처리, 앱시스산에 의해 유도되는 osmotic stress (mannitol 처리), salt stress (NaCl 처리), 물부족 스트레스 처리 등에 의한 *RIA1* 유전자의 발현 양상을 조사(그림 10)
 - 상기 4종류의 처리에 의해 *RIA1* 유전자의 발현량이 공통적으로 증가함을 확인
 - *RIA1* 유전자가 앱시스산 신호 및 물부족 스트레스 신호 전달 과정에서 그 기능을 수행할 수 있음을 확인함.
- ▷ 해당 유전자와 다양한 식물 호르몬 신호전달과정간의 기능적 연관성을 알아보기 위해 ABA, GA, cytokinin, JA, auxin, ethylene, BR 등의 다양한 식물 호르몬을 처리한 후 *RIA1* 유전자의 발현 양상을 조사(그림 10)
 - GA, cytokinin (kinetin), JA (MeJA)에 의해 유의미한 발현량 증가가 일어남을 확인
 - *RIA1*의 세포 내 기능은 앱시스산 뿐 아니라 GA, cytokinin, JA 신호전달 과정에도 부가적으로 연계될 가능성이 높음을 암시
- ▷ 해당 유전자의 조직별 기능 연계성을 알아보기 위해 다양한 식물 조직내 *RIA1* 유전자의 발현량을 탐색(그림 10)
 - 타조직에 비해 dry seed에서 *RIA1* 발현량의 급격한 증가가 관찰됨.
 - dry seed 조직은 앱시스산의 과도한 축적이 일어나는 조직으로 보고됨. 해당 결과는 *RIA1* 유전자의 앱시스산 발현량 유도 양상과 일치하며, *RIA1*이 앱시스산 신호전달 과정에서 기능함을 검증하는 결과로 사료됨.

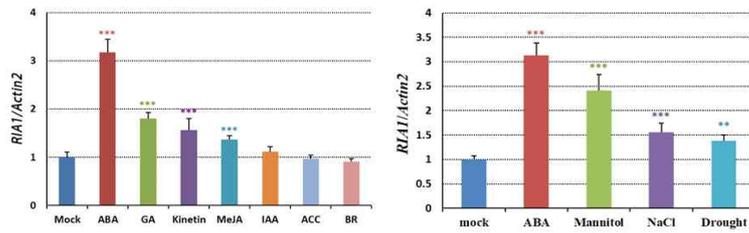


그림 10. 조직별, 호르몬 처리, 앱시스산 관련 처리에 의한 RIA1의 발현 양상

(7) RIA1의 RING E3 ligase 활성 확인(그림 11)

▷ RIA1 단백질이 보유한 RING 도메인이 실제로 E3 ligase 활성화에 관여하는지를 탐색하기 위해 RIA1 단백질을 대상으로 *in vitro* ubiquitination assay를 실시하고, 해당 활성을 검증함(그림 11).

- RIA1이 특정 신호전달 단백질의 분해에 관여할 수 있음을 확인함. 대상 단백질은 앱시스산 신호 과정의 양성 조절자일 것으로 기대됨.

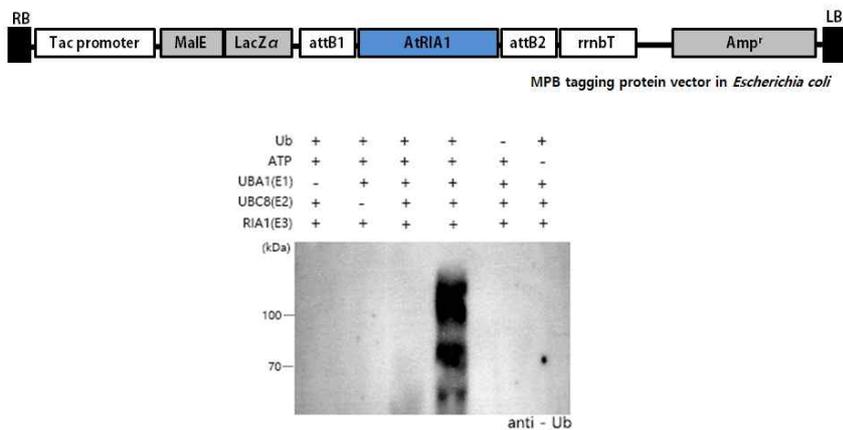


그림 11. RIA1의 RING E3 ligase 활성 검증

(8) 야생종과 *ria1* 간의 expression profiling 조사를 통한 RIA1의 내건성 기작에서의 상세 기능 조사

▷ RIA1이 앱시스산/물부족 스트레스 신호 과정의 어느 지점에서 기능을 수행하는지를 알아볼 필요성이 있음.

- 해당 규명을 위해 microarray 분석법을 통한 야생종과 *ria1* 간의 expression profiling 조사를 수행하고 validation 과정을 수행함.
- 야생종과 비교시 RIA1의 기능 소실로 인해 2배 이상 증가되는 1956 종의 유전자를 확보(Table 1)
- 상기 유전자의 약 12%가 앱시스산에 의해 3배 이상 발현량이 증가
 - : RIA1의 기능 소실로 인해 상향 조절된 유전자의 다수가 앱시스산에 의해 상향 조절됨을 AVT를 통해 확인
 - : *ria1*의 앱시스산 과다 감수성 형질 및 앱시스산 매개 내건성 과정의 음성조절자로서의 RIA1 역할과 맥락을 같이 함.

- 해당 연구의 접근은 RING 관련 유전자와 내건성 관련 pathway 사이의 인과관계를 규명하는데 일조할 것으로 예상됨.
- 리스트에 해당되는 다수 유전자의 validation Q-PCR 실험을 통해 데이터의 재연성을 확인(그림 12)

Table 1. *ria1*-specific 유전자 리스트 확보 및 앱시스산 반응성 여부 탐색

Upregulated genes in <i>ria1</i> ^a		
Total number of genes	1956	
The number of genes upregulated by ABA	More than five times ^b	More than three times ^b
	152 (7.8%)	227 (11.6%)
The number of genes downregulated by ABA	More than five times ^b	More than three times ^b
	25 (1.3%)	66 (3.4%)

a Genes that produce the fold induction of more than 2.0 times in *ria1* compared to wild type.
b Fold change of gene expression by ABA, according to AtGenExpress Visualization Tool (AVT).

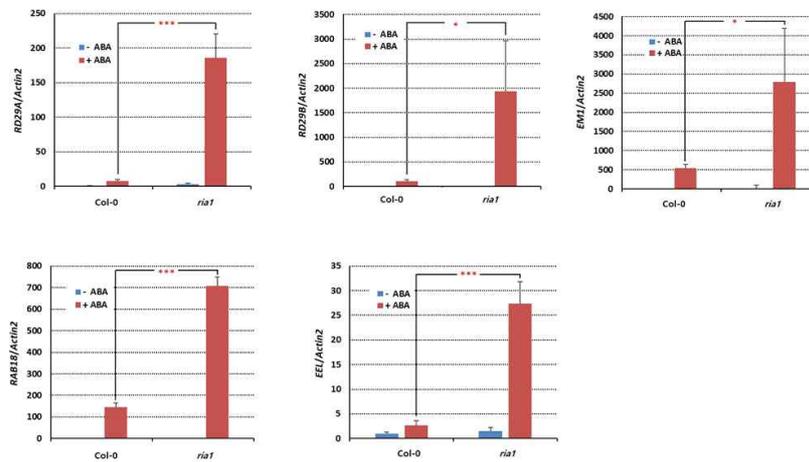


그림 12. *ria1*-specific 유전자 발현에 대한 validation

(9) RIA1 단백질의 기질 동정

- ▷ Yeast two hybrid 스크리닝을 통한 기질 규명
- ▷ RIA1을 bait로 사용하여 탐색작업 수행 후 약 50여개의 positive RIA1-interacting clone을 확보(그림 13)

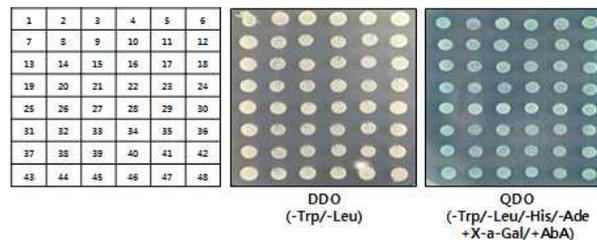


그림 13. RIA1-interacting protein 동정을 위한 Y2H 스크리닝 결과의 예

- ▷ RIA1 단백질이 앱시스산/물부족 스트레스 반응의 음성 조절자인 동시에 단백질 분해에 관여하는 E3 ligase임에 근거할 때, 기질 후보 단백질은 앱시스산/물부족 스트레스 반응

의 양성 조절자일 것으로 사료됨. 이에 해당 후보 기질 유전자의 T-DNA 삽입 돌연변이체를 Arabidopsis Biological Research Center (ABRC)로부터 획득한 후 앱시스산에 대해 감소된 감수성/물부족 스트레스에 감소된 저항성을 보이는 개체를 탐색하는 작업을 진행함으로써 기질 단백질 선별 효율성을 높이고자 함(Table 2).

Table 2. RIA1 기질 후보자의 대표적인 기능 소실 돌연변이체 확보

AGI	Gene symbol	T-DNA line
AT3G18165	MOS4	SALK_147574
AT1G14370	APK2A	SALK_002370C
		SALK_149140
AT2G34070	TBL37	SALK_013861C
AT2G26250	KCS10	SALK_015616
AT3G62750	BGLU8	CS832624
AT4G36870	BLH2	SALK_009120C
AT1G12360	KEU	SALK_138210

- ▷ RIA1 및 기질 후보 단백질을 사용한 *in vivo*, *in vitro* ubiquitination assay를 수행할 예정
- ▷ 기질 후보군을 야생종과 *ria1*에 도입 후, 이러한 기질 후보 단백질들이 CHX 처리 이후 두 식물에서 분해되는 속도를 조사, 비교함으로써 RIA1을 통한 기질 단백질 안정성 조절 여부를 검증할 예정

2. RIA1 비 orthologue 유전자(*OsRIA1*)의 비 형질전환체에 대한 내건성 형질 탐색 및 애기장대 기질 유전자 비 작물 도입을 통한 형질전환체 제작

(1) *AtRIA1*의 비 orthologue 선별

- ▷ TIGR BLAST search 결과, RIA1은 다양한 식물 종(*Arabidopsis*, tobacco, tomato, rice, maize)에서 아미노산 서열상 잘 보존되어 있는 단백질로 존재함(그림 14). 이는 RIA1 단백질이 종간 유사한 기능을 보일 가능성이 높음을 암시함. 본 연구에서는 rice의 *RIA1* orthologue를 대상으로 연구를 진행함.
- ▷ TIGR BLAST search 결과 비의 LOC_Os03g22830이 *AtRIA1*과 가장 높은 상동성(50% identity, 65% similarity)을 보이는 orthologue임을 확인하고 해당 유전자를 *OsRIA1*으로 명명함(그림 15).

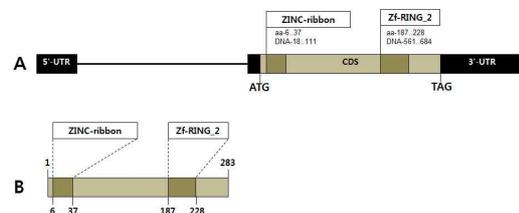
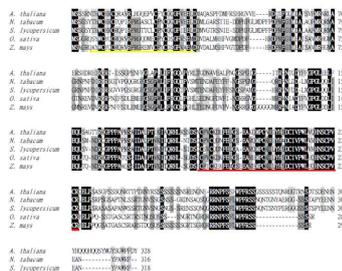


그림 14. RIA1 orthologue간의 amino acid alignment

그림 15. *OsRIA1*의 구조

(2) *OsRIA1*의 발현량 조절을 통한 애기장대 형질전환체 제작 및 내건성 탐색

- ▷ *OsRIA1* 유전자를 애기장대 *ria1*으로 도입 후 과발현시킨 cross-complementation line

제작

- *ria1*에서 관찰되던 수분소실을 감소가, 해당 형질전환체에서 야생종 수준으로 회복하거나 오히려 증가하는 양상을 보임(그림 16).
: *OsRIA1*이 *AtRIA1*과 기능적 유사성을 보임을 확인
- 상기 과정을 통해 *OsRIA1*이 벼에서 유사한 내건성 기능을 보일 수 있음을 간접적으로 확인할 수 있음.

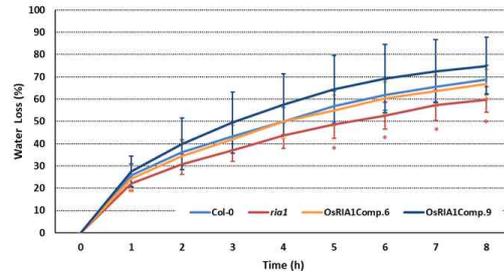


그림 16. *OsRIA1* cross-complementation line에서 관찰되는 수분소실율의 증가

(3) *OsRIA1*의 발현량 조절을 통한 벼 형질전환체 제작 및 내건성 탐색

▷ *OsRIA1*의 RNAi, 과다 발현 형질전환체를 벼에서 제작(그림 17)

- rice (Dongjin) 유묘의 하배축으로부터 callus 유도 후 상기 construct가 도입된 *Agrobacterium*과 coculture 수행 → 1st, 2nd antibiotics selection을 거쳐 regeneration 과정 수행(그림 18)

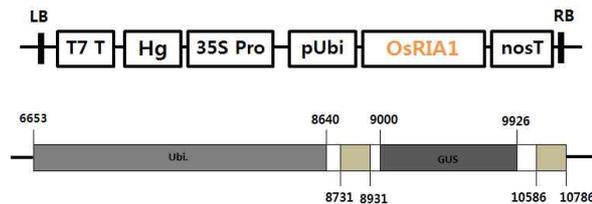
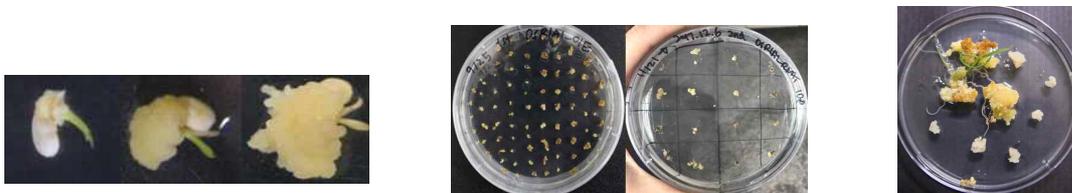


그림 17. *OsRIA1* 과발현체 및 RNAi 라인 제작을 위한 construct 제작



Callus induction → **1st, 2nd antibiotics selection** → **Regeneration**

그림 18. *OsRIA1*의 발현량 조절을 통한 벼 형질전환체 제작 과정

▷ 8개의 *OsRIA1* 과발현체 및 12개의 *OsRIA1* RNAi 라인 확보

▷ *OsRIA1* 발현 억제 라인의 내건성 마커 유전자 발현 양상 탐색(그림 19)

- *OsRIA1* 발현 억제 라인에서 3종류 내건성 마커 유전자(*OsLEA*, *OsRab16D*,

OsNECD4)의 상향 조절 확인

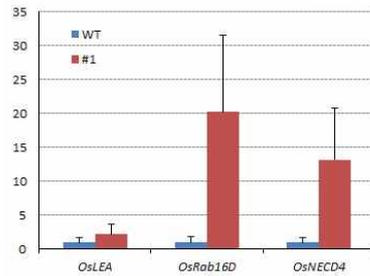


그림 19. *OsRIA1* 발현 억제 라인에서 3종류 내건성 마커 유전자의 발현 양상

- *RIA1*이 애기장대와 벼에서 유사한 내건성 기능을 수행하는 것으로 예상됨. 이는 다양한 식물종 내에 존재하는 상동 유전자가 공통적으로 내건성 과정에 관여할 가능성이 높음을 암시함.

▷ 확보된 *OsRIA1* 과발현체/*OsRIA1* RNAi 라인을 대상으로 내건성 탐색

- 확보된 대상 형질 전환체의 세대 진전 및 증식을 통해 발현량의 변화가 일정한 안정화된 라인 구축

: intergenic에 single copy로 삽입된 라인들을 확인

: 도입형질이 고정된 우수계통을 각각 2계통 이상 선별

- 대상 형질 전환체와 야생종을 대상으로 수분 소실율, 물부족 스트레스하에서의 생존률, 기공의 직경 등을 탐색함으로써 내건성의 증진 여부를 구체화, 수치화할 계획

▷ 확보된 *OsRIA1* 과발현체/*OsRIA1* RNAi 라인을 대상으로 생산성 탐색

- 대상 형질 전환체와 야생종을 대상으로 height, panicle의 무게 및 길이, spikelet의 개수, filling rate 등을 탐색함으로써 생산성의 증진 여부를 구체화, 수치화할 계획

▷ 상기 탐색을 통해 확보된 내건성/생산성 증진 유용 자원은 향후 특허 출원/등록의 연구성과 산출에 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

- 상기 연구로부터 산출된 내건성 관련 유전자원은 향후 내건성 유용 작물 산출에 농업적, 산업적으로 응용될 수 있을 것으로 기대되며, 경작 가능 지역 확충을 통한 유용 작물의 생산성 향상에 활용될 수 있을 것으로 사료됨. 이에 경제적으로 높은 잠재적 가치를 보유하고 있는 것으로 예상되며, 관련 산업 발전을 위한 높은 잠재적 기여도를 보유하고 있는 것으로 기대됨.

■ 연구개발 추진전략·방법 및 추진체계

▷ 'RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한 내건성 식물 개발'의 연구목표를 달성하기 위하여, 본 연구는 크게 2단계의 추진체계 및 총 12개의 세부단계로 구성됨.

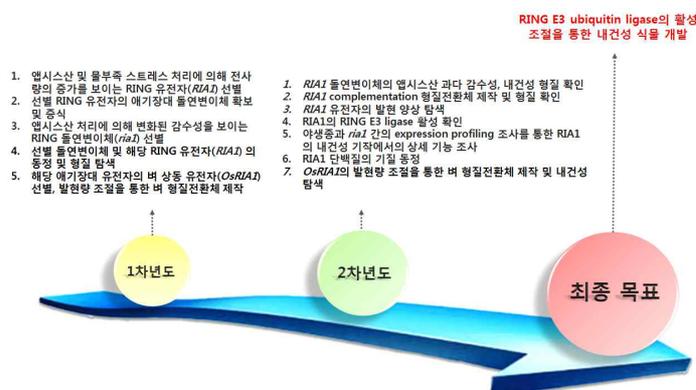
1. 내건성 증진에 관련된 유용 애기장대 유전자, 돌연변이 선별 및 해당 유전자의 생체내 상세 기능 규명
 - (1) 앱시스산/물부족 스트레스에 의해 전사량의 증가를 보이는 RING 유전자 선별
 - (2) 해당 선별 RING 유전자의 돌연변이체 확보 및 증식
 - (3) 해당 돌연변이체 중 앱시스산 처리에 의해 변화된 감수성을 보이는 돌연변이체 선별

- (4) *RIA1* complementation 형질전환체 제작
 - (5) *RIA1* 돌연변이체의 엡시스산 과다 감수성, 내건성 형질 확인
 - (6) *RIA1* 유전자의 발현 양상 탐색
 - (7) *RIA1*의 RING E3 ligase 활성 확인
 - (8) 야생종과 *ria1* 간의 expression profiling 조사를 통한 *RIA1*의 내건성 기작에서의 상세 기능 조사
 - (9) *RIA1* 단백질의 기질 동정
2. *RIA1* 비 orthologue 유전자(*OsRIA1*)의 비 형질전환체에 대한 내건성 형질 탐색 및 애기장대 기질 유전자 비 작물 도입을 통한 형질전환체 제작
- (1) *AtRIA1*의 비 orthologue 선별
 - (2) *OsRIA1*의 발현량 조절을 통한 애기장대 형질전환체 제작 및 내건성 탐색
 - (3) *OsRIA1*의 발현량 조절을 통한 비 형질전환체 제작 및 내건성 탐색
- ▷ 연구 목표의 성공적 수행을 위하여 국내외 다양한 연구 기관과 공조함.
- Single subunit ubiquitin E3 ligase 연구와 관련하여 국내 최고의 이론적 지식과 기술적 노하우를 보유하고 있는 연세대학교의 김우택 교수 연구팀으로부터 자문을 구함.
 - E3 ubiquitin ligase의 환경 스트레스 연관성과 관련하여 이론적 지식과 기술적 노하우를 보유하고 있는 북경대학교의 Dr. Xing Wang Deng 연구팀으로부터 자문을 구함.
 - 비 형질전환체 제작, 형질 분석 및 비 육종에 이론적 지식과 기술적 노하우를 보유하고 있는 한림대학교의 정동훈 교수 연구팀으로부터 비 형질 전환의 효율성 증가 및 비 육종에 대한 노하우를 얻고 연구 공조를 진행함.
- ▷ 상기 관련 연구팀과의 지속적 교류 및 관련 학회 참석을 통한 연구정보 업데이트를 통해 연구의 질적 향상을 꾀함.

<연구개발 추진체계>

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	RING E3 ubiquitin ligase의 활성 조절을 통한 내건성 식물 개발	주관연구책임자 (이재훈)외 총 4명

<연구 추진을 위한 전체 모식도>



■ 사용된 연구 방법 및 재료는 다음과 같음

- ▷ 대상 식물로 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, Col-0)와 벼(*Oryza sativa* cv. Dongjin)을 사용함.
- ▷ 연구방법
 - 돌연변이체 분리 : genotyping을 통한 homozygous mutant 분리
 - 형질전환체 제작
 - : 애기장대 RIA1의 기능 소실 형질 검증을 위한 complementation line, 벼 RIA1의 내건성 기능 검증을 위한 cross-complementation line, RNAi line, overexpression line 등을 제작
 - 내건성 검증
 - : 앱시스산 매개 내건성과의 관련 여부 검증을 위해 앱시스산 감수성을 받아올, 자엽 성장률로 확인
 - : 기공 개폐도, 수분 소실율, 물부족 스트레스에 대한 생존률 등을 탐색함으로써 내건성 검증
 - 발현 양상 탐색
 - : 스트레스, 호르몬 처리 및 조직에 따른 RIA1 유전자 발현 양상을 탐색, 벼에서의 내건성 마커 유전자 발현 양상 탐색 등을 위하여 RIA1 특이적인 primer를 제작 후 quantitative RT-PCR 방법을 활용함.
 - E3 ligase 활성 확인
 - : RIA1의 RING E3 ligase로서의 활성여부를 탐색하기 위해 대장균으로부터 발현, 정제된 RIA1, E1, E2 재조합 단백질을 제작 후 *in vitro* ubiquitination assay 수행. ubiquitin antibody를 통해 autoubiquitination된 RIA1 단백질의 존재를 확인
 - 야생종과 *rial* 간의 expression profiling 조사
 - : *rial* 특이적인 expression profile을 확보하기 위해 앱시스산이 처리된 야생종과 *rial* 유묘를 대상으로 RNA를 분리한후 이를 microarray 분석에 활용
 - RIA1 단백질 기질 탐색
 - : RIA1-interacting protein 선별을 위해 RIA1을 bait로 제작 후 애기장대 cDNA library를 대상으로 yeast two hybrid screening 과정을 수행

■ 산출된 주요 연구개발성과는 아래와 같음.

- ▷ 본 연구 과제 수행동안 3편의 사사된 논문게재 성과를 산출함.
 - (1) 2016년(게재연도), UV-B signal transduction pathway in *Arabidopsis* (논문명), Jae-Hoon Lee (저자명), Journal of Plant Biology (학술지명), 59권 3호, 국제, SCIE
 - (2) 2017년(게재연도), DHU1 negatively regulates UV-B signaling via its direct interaction with COP1 and RUP1 (논문명), Sang-Hoon Kim, Hani Kim, Sungran Chung, Jae-Hoon Lee (저자명), Biochemical and biophysical research communications (학술지명), 491권 2호, 국제, SCI
 - (3) 2017년(게재연도), Characterization and comparative expression analysis of CUL1 genes in rice (논문명), Sang Hoon Kim, Og Geum Woo, Hyunsoo Jang,

Jae Hoon Lee (저자명), Genes and Genomics (학술지명), 40권 3호, 국제, SCIE

▷ 본 연구 과제 수행동안 5건의 학술발표, 4건의 연구인력양성 성과를 추가로 산출함.

- *RIA1* 발현량 조절을 통한 벼 형질전환체의 내건성/생산성 검증 후 해당 벼/애기장대 유전자와 관련된 학술발표(논문게재) 및 국제 PCT 특허 등을 추진하여 성과를 확산할 계획임.
- 벼에서의 *RIA1* 기능 소실 돌연변이체의 경우, 우수 형질의 안정화 및 극대화를 위하여 진행 중인 RNAi 방식의 접근과 병렬적으로 CRISPR/CAS9 시스템 등의 유전자 편집 기술을 통한 해당 형질전환체의 제작을 향후 시행하고자 함.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 연구목표 및 달성도

세부 연구 목표	달성도(%)	비고
앱시스산/물부족 스트레스에 의해 전사량의 증가를 보이는 RING 유전자 선별	100	- 총 44종의 애기장대 RING 유전자가 앱시스산, 물부족 스트레스에 의해 상향조절됨을 AVT를 통해 확인
해당 선별 RING 유전자의 돌연변이체 확보 및 증식	100	- 44종의 유전자에 해당하는 T-DNA 삽입 돌연변이체를 Arabidopsis Biological Research Center (ABRC)로부터 확보, 증식하고 이들의 앱시스산 감수성을 추적
해당 돌연변이체 중 앱시스산 처리에 의해 변화된 감수성을 보이는 돌연변이체 선별	100	- 한 종류 유전자의 T-DNA 삽입 돌연변이체가 앱시스산에 의해 증가된 감수성을 보임을 확인하고 본 유전자를 <i>RIA1</i> (<i>RING Induced by ABA1</i>)이라 명명
<i>RIA1</i> complementation 형질전환체 제작	100	- <i>ria1</i> 에서 관찰된 형질이 부가적인 위치로 삽입된 T-DNA로부터의 효과일 가능성을 배제하기 위해 <i>ria1</i> 내 <i>RIA1</i> 유전자가 과발현되는 complementation line을 제작
<i>RIA1</i> 돌연변이체의 앱시스산 과다 감수성, 내건성 형질 확인	100	- <i>ria1</i> 의 앱시스산 과다감수성을 자엽 성장률, 발아율을 통해 확인. Complementation line을 통해 검증 - <i>ria1</i> 의 내건성 증진 형질을 기공 개폐도, 수분 소실율, 수분 스트레스시의 생존도를 통해 확인. Complementation line을 통해 검증
<i>RIA1</i> 유전자의 발현 양상 탐색	100	- 호르몬 처리, 앱시스산 관련 스트레스 처리에 따른 <i>RIA1</i> 발현량 탐색 - 조직별 <i>RIA1</i> 발현량 탐색
RIA1의 RING E3 ligase 활성 확인	100	- <i>in vitro</i> ubiquitin assay를 통해 RIA1이 RING E3 ligase로서 기능함을 검증
야생종과 <i>ria1</i> 간의 expression profiling 조사를 통한 RIA1의 내건성 기작에서의 상세 기능 조사	100	- Microarray 분석법을 통해, RIA1의 기능 소실로 인해 2배 이상 증가되는 1956 종의 유전자를 확보 - RIA1의 기능 소실로 인해 상향 조절된 유전자의 다수가 앱시스산에 의해 상향 조절됨을 AVT를 통해 확인 - 리스트에 해당되는 다수 유전자의 validation Q-PCR 실험을 통해 데이터의 재연성을 확인
RIA1 단백질의 기질 동정	80	- Yeast two hybrid 스크리닝을 통해 약 50여개의 positive RIA1-interacting clone을 확보 - 해당 후보 기질 유전자의 T-DNA 삽입 돌연변이체를 획득한 후, 앱시스산에 대해 감소된 감수성/물부족 스트레스에 감소된 저항성을 보이는 개체를 탐색
<i>AtRIA1</i> 의 비 orthologue 선별	100	- <i>AtRIA1</i> 과 가장 높은 상동성을 보유한 1종의 비 유전자를 선별하고 이를 <i>OsRIA1</i> 으로 명명
<i>OsRIA1</i> 의 발현량 조절을 통한 애기장대 형질전환체 제작 및 내건성 탐색	100	- <i>OsRIA1</i> 유전자를 애기장대 <i>ria1</i> 으로 도입 후 과발현시킨 cross-complementation line 제작 - 해당 형질전환체가 야생종 수준 이상의 형질 회복률을 보임을 확인함으로써, <i>OsRIA1</i> 이 <i>AtRIA1</i> 과 기능적 유사성을 보임을 확인
<i>OsRIA1</i> 의 발현량 조절을 통한 비 형질전환체 제작 및 내건성 탐색	60	- <i>OsRIA1</i> 의 RNAi, 과다 발현 형질전환체를 비에서 제작 - <i>OsRIA1</i> 발현 억제 라인에서 3종류 내건성 마커 유전자의 상향 조절 확인

3-2. 성과목표 달성도

성과목표	특허출원	SCI 논문	비 SCI 논문	학술발표	인력양성	평가방법
가중치	20	50	20	5	5	
1년차 성과목표			1	1	1	
1년차 산출성과		1		3	3	증빙자료
2년차 성과목표	1	1		1	1	
2년차 산출성과		2		2	3	증빙자료
최종목표	1	1	1	2	2	
최종성과		3		5	4	증빙자료
달성율(%)	0	300	0	250	200	

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 본 연구과제의 수행 기간이 2년인 관계로, 본 연구에서 제작한 벼 형질전환체의 안정적인 라인을 구축하기 위해서는 다소의 추가적인 시간이 요구됨.
- 이에 성과 목표였던 특허 출원의 경우 연구종료기간내에 성과를 산출하지 못함. 상기 벼 형질전환체가 내건성 증가 형질을 보임에 근거할 때, 본 연구에서 동정, 제작된 해당 유전자와 형질전환체는 향후 유용 유전자원으로 활용될 가치가 매우 높을 것으로 사료됨.
- 이에 상기 *RIA1* 유전자 발현량이 조절된 벼 형질전환체 내건성 형질의 구체적인 분석 및 해당 유용 유전자의 기타 유용 작물로의 적용 등과 관련된 후속연구가 요구됨.
- 해당 연구의 신속하고 효율적인 수행을 통해 조속한 시간내에 목표한 특허 출원 및 나아가 특허 등록이 가능할 것으로 사료되며, 이는 기술이전 및 제품화 등으로 확대되어 실용화 추진을 위한 이론적, 기술적 토대로 활용될 수 있을 것이라 사료됨.

3-4. 관련분야 기여도

가. 학문 분야의 지식 업데이트

- ▷ 유비쿼터네이션 조절 기작/물부족 스트레스 신호 전달 기작과 관련된 지식의 업데이트에 기여
- ▷ 타연구자들의 연구 수행을 위한 지식적 배경과 피교육자들의 지적 기반 강화

나. 유용 유전 자원 산출을 통한 연관 산업 분야로의 적용

- ▷ 본 연구 과제 수행을 통한 내건성 작물 산출은 농업 분야에 적용되어 농가의 수익 창출에 기여할 수 있음.

4. 연구개발성과의 활용 계획 등

가. 추가연구로의 활용

- ▷ 본 연구과제의 수행 기간(2년)은 완성도 높은 연구 결과를 산출하기에는 시간적 제약이 있음.
- ▷ 특히 유용 유전자의 발현량이 조절된 벼 형질전환체의 안정적인 라인을 구축하기 위해서는 보다 long-term project에 해당 하는 연구의 수행이 요구됨. 이에 연구기간 종료 후 2차년도 기간까지 최종적인 내건성 작물 개발을 실현하고, 이를 기반으로 국내외 특허 출원 및 향후 제품화를 추진할 계획임.
- ▷ 상기 유용 유전자의 세부 작용 기작에 대한 보다 상세한 이해와 해당 벼 형질 전환체의 구체적인 내건성 형질에 대한 이해가 후속 연구 과정동안 요구됨. 이러한 연구는 보다 구체화된 내건성 유용 작물의 제작 및 상용화를 위해 필수적일 것으로 사료됨.
- ▷ 해당 유전 자원과 기존에 알려진 유비퀴티네이션 매개 내건성 유전자원간의 유전적 조합을 통해 한층 기능이 강화된 내건성 유용 식물을 제작할 수 있을 것으로 기대됨.
- ▷ 해당 유전자원은 애기장대와 벼에서 유사한 내건성 기능을 수행하는 것으로 사료됨. 이는 다양한 식물종 내에 존재하는 상동 유전자가 공통적으로 내건성 과정에 관여할 가능성이 높음을 암시함. 해당 단백질이 다양한 유용 작물 내 상동성이 매우 높은 orthologue를 보유하고 있음에 의거할 때, 벼뿐만 아니라 다양한 유용 작물들의 내건성 강화에도 기여할 수 있을 것으로 사료됨. 해당 연구를 후속 연구 과정동안 수행하고자 함.

나. 타연구로의 활용

- ▷ 유비퀴티네이션이 진핵생물에 공통적으로 존재하는 조절 기작이며, RING E3 ligase 기능이 진핵생물 내에서 동일함을 감안할 때, 해당 RING 유전자 및 기질의 동물 상동 유전자 발굴을 통한 기능 연구는 의학 분야 관련의 생물학적 지식 강화 및 응용에도 활용될 수 있음.

참고문헌

- Brugière N, Zhang W, Xu Q, Scolaro EJ, Lu C, Kahsay RY, Kise R, Trecker L, Williams RW, Hakimi S, Niu X, Lafitte R, Habben JE (2017) Overexpression of RING domain E3 ligase ZmXericol confers drought tolerance through regulation of ABA homeostasis. *Plant Physiol.* 175:1350-1369.
- Ding S, Zhang B, Qin F (2015) Arabidopsis RZFP34/CHYR1, a ubiquitin E3 ligase, regulates stomatal movement and drought tolerance via SnRK2.6-mediated phosphorylation. *Plant Cell* 27:3228-3244.
- Gao T, Wu Y, Zhang Y, Liu L, Ning Y, Wang D, Tong H, Chen S, Chu C, Xie Q (2011) OsSDIR1 overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Mol Biol.* 76:145-156.
- Gao W, Liu W, Zhao M, Li WX (2015) NERF encodes a RING E3 ligase important for drought resistance and enhances the expression of its antisense gene NFYA5 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 43:607-617.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24:1695 - 1708.
- Joo H, Lim CW, Han SW, Lee SC (2017) The pepper RING Finger E3 ligase, CaDIR1, regulates the drought stress response via ABA-mediated signaling. *Front Plant Sci.* 8:690.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weini S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50:347-363.
- Kim SJ, Kim WT (2013) Suppression of Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligase AtATL78 increases tolerance to cold stress and decreases tolerance to drought stress. *FEBS Lett.* 587:2584-2590.
- Lim CW, Baek W, Lee SC (2017) The Pepper RING-Type E3 ligase CaAIRF1 regulates ABA and drought signaling via CaADIP1 protein phosphatase degradation. *Plant Physiol.* 173:2323-2339.
- Lim SD, Lee C, Jang CS (2014) The rice RING E3 ligase, OsCTR1, inhibits trafficking to the chloroplasts of OsCP12 and OsRP1, and its overexpression confers drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 37:1097-1113.
- Seo KI, Song E, Chung S, Lee JH (2012) Roles of various cullin-RING E3 ligases involved in hormonal and stress responses in plants. *Journal of Plant Biol.* 55:421-428.
- Suh JY, Kim SJ, Oh TR, Cho SK, Yang SW, Kim WT (2016) Arabidopsis Tóxicos en Levadura 78 (AtATL78) mediates ABA-dependent ROS signaling in response to drought stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 469:8-14.

- Wang Z, Tian X, Zhao Q, Liu Z, Li X, Ren Y, Tang J, Fang J, Xu Q, Bu Q. (2017) The E3 ligase DROUGHT HYPERSENSITIVE negatively regulates cuticular wax biosynthesis by promoting the degradation of transcription factor ROC4 in rice. *Plant Cell* [Epub ahead of print]
- Zhang H, Cui F, Wu Y, Lou L, Liu L, Tian M, Ning Y, Shu K, Tang S, Xie Q (2015) The RING finger ubiquitin E3 ligase SDIR1 targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for degradation to modulate the salt stress response and ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 27:214-227.
- Zhang Y, Yang C, Li Y, Zheng N, Chen H, Zhao Q, Gao T, Guo H, Xie Q (2007) SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 19:1912-1929.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.