

## 작물유전체 기능연구사업

공변세포의 신호전달과 기공운동에 관여하는 단백질과 유전자의  
동정 및 기능규명

Identification and functional characterization of proteins and  
genes that participate in guard cell signaling and stomatal  
movements

포항공과대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 과학기술부와 농촌진흥청이 지원하는 작물유전체기능연구사업단 “ 공변세포의 신호전달과 기공운동에 관여하는 단백질과 유전자의 동정 및 기능규명 ”과제 (과제번호 CG1513)의 단계보고서로 제출합니다.

2004. 8. 31

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 이 상 열 교수님

연 구 원 : 전 병 옥

” : 심 동 환

” : 최 윤 정

: 김 기 현

협동연구기관명 : 포항공과대학교

협동연구책임자 : 이 영 숙

보고서 초록

과제관리번호	CG1513	해당단계 연구기간	2003.07.01- 2004.06.30	단계 구분	(3단계) / (1단계)
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	작물유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	공변세포의 신호전달과 기공운동에 관여하는 단백질과 유전자의 동정 및 기능 규명			
연구책임자	이 영 숙	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부 : 1 명 외부 : 4 명	해당단계 연구비	정부 40,000 천원 기업: 천원 계: 40,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	포항공과대학교 생명과학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>우리는 지난 3년간 연구를 통하여 공변세포의 기공운동에 관여하는 유전자들을 찾아냈고, 이들이 어떻게 공변세포내 신호전달에 관여하는지 연구하였다. 지금까지의 연구결과를 요약하면 다음과 같다. 첫째 PI3K와 PI4K의 산물인, PI3P와 PI4P가 공변세포의 기공운동에 필수적임을 알았다. 이들 두 인지질은 앱시스산에 의해 기공이 닫힐 때, 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도를 높이는 과정에 관여함으로써 기공 닫힘 운동에 기여한다는 것을 밝혔으며, PI3P는 PI4P와는 다르게 앱시스산에 의해 기공이 닫힐 때, 활성산소의 생성단계에도 관여하는 것을 발견하였다. 두 번째, PI3P는 공변세포의 actin filament의 상태에 큰 영향을 주는 것을 알아내었다. PI3P가 부족한 상황에서 actin filament는 끊어지고 더 뻑뻑해지며, 앱시스산을 넣어도 actin depolymerization이 잘 되지 않는 것을 볼 때, PI3P가 actin dynamics에 매우 중요한 요소임을 알았다. 셋째, PI4,5P2는 음이온 채널을 억제함으로써 빛에 의한 기공 열림 운동을 촉진함을 알아내었다. 넷째, Rop2 small G protein은 RIC7과 상호작용을 함으로써 공변세포의 기공운동을 억제시키는 조절자 역할을 하는 것을 밝혔다.</p> <p>우리는 이와 같은 결과를 통해서 우리는 Rop2, PI3K, PI4K, PI4,5PK가 액틴을 경유하거나 또는 다른 매개체 (Ca<sup>2+</sup>, ROS)를 통해 기공운동의 조절에 중요한 역할을 한다는 사실을 알아 내었다.</p>					30
색인어 (각 5개 이상)	한 글	공변세포, 기공운동, 액틴, 앱시스산, 인지질			
	영 어	guard cell, stomata, actin, ABA, phospholipid			

# 요 약 문

## I. 제 목

공변세포의 신호전달과 기공운동에 관여하는 단백질과 유전자의 동정 및 기능 규명

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

공변세포의 신호전달 과정을 밝힌다. 특히, 공변세포에 발현되는 액틴조절 단백질, 액틴 결합단백질의 유전 정보를 구축하고, 아직 미발표되거나 식물의 고유한 actin-interacting protein의 유전자를 찾아서 공변세포의 기능과 actin cytoskeleton에 어떠한 역할을 하는지 규명한다. 이러한 결과를 응용하여, 공변세포의 반응 형태를 변화시킨 여러 가지 유용한 형질전환 식물체를 만들어 내는 기술을 개발하는 것을 목표로 한다.

### 2. 연구개발의 필요성

공변세포는 환경조건을 매우 민감하게 인지하여 반응하는 정밀한 신호전달체계를 갖추고 있으며, 식물의 신호전달 연구에 가장 널리 쓰이는 모델 system이다.

공변세포의 신호전달을 이해하면, 그 지식을 농업생산량 증가와 산업, 환경분야 등에 이용할 수 있는 신기능 식물을 만드는 데에도 이용할 수 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표 및 범위
1차년도 (2001)	공변세포 액틴의 역할과 조절기작 연구 - 공변세포의 신호전달과정에서 Rop2, PI3K, PI4K, PI4P5K의 역할을 이해하고 이들 단백질과 액틴의 관계를 자세히 분석.
2차년도 (2002)	공변세포 신호전달에 관여하는 단백질의 탐색 및 유전자 동정 - 공변세포의 신호전달과정에서 RIC7과 PI4P5K의 역할을 규명
3차년도 (2003)	공변세포의 신호전달에 관여하는 단백질의 기능 분석 -RIC1, RIC7, PI3K의 공변세포의 신호전달 과정에서 기능을 규명 -공변세포에서 빛 신호전달에 기여하는 PI4P-5-kinase 유전자의 동정 -공변세포의 새로운 신호전달 물질 발견

#### IV. 연구개발결과

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	공변세포의 신호전달과정에서 Rop2의 역할을 이해하고 이들 단백질과 액틴의 관계를 자세히 분석한다.	Rop2가 활성화되면 기공이 열리는 운동과 닫히는 운동이 모두 억제되는 것을 발견함. 액틴과는 너무 밀접한 관련이 되어 있어 구분이 어려움.	95%
2	공변세포의 신호전달과정에서 PI3K, PI4K, PI4P5K의 역할을 이해하고 이들 단백질과 액틴의 관계를 자세히 분석한다.	기공이 닫히는 운동에 PI3P, PI4P, PI4,5P2가 필수적임을 밝힘. 이들 중에서 액틴의 구조에 영향을 주는 것은 PI3P임을 밝힘.	95%
3	공변세포의 신호전달과정에서 PI3K 와 ROS (Reactive Oxygen Species) 의 관계를 이해한다.	공변세포가 엡시스산에 의해 기공을 닫을 때, PI3P가 있어야 ROS가 형성되어 기공을 닫을 수 있음을 밝힘.	100%
4	RIC7과 Rop2와의 관련성과 이것이 기공운동에 미치는 영향에 대한 연구	RIC7과 활성화된 Rop2는 colocalization 되어 있으며, RIC7 Knock-out line에서 빛에 의한 기공운동이 증가함. 이들이 기공이 너무 많이 열려 물을 잃어버리는 것을 방지한다는 것을 알아냄.	90%
5	공변세포에서 PI4P5K의 역할을 이해	PI4P5K는 빛이 있을 때 활성화되어 음이온 채널을 억제하여 기공이 열리게 함을 밝힘.	90%
6	공변세포의 새로운 신호전달 물질 발견	RIC1, RIC7, RIC4, 등, Rop-interacting protein들이 기공운동에 영향을 주는 것을 알아냄. 이들의 작용기작을 알아내는 방법으로서, 결합 단백질을 찾기위해 Tap taq을 붙여서 애기장대에 형질전환시켰음.	100%

## V. 연구개발결과의 활용계획

가. 기공운동이 변화된 여러 가지 형질전환 식물의 개발

경제·산업적 측면에 기술한 여러 측면을 고려하여 여러 가지 형질전환 식물을 만든다. 예를 들면, 물이 부족할 때 기공이 빨리, 더 완전히 닫히는 식물, 기공을 통한 증산작용이 더 향상된 식물, 기공이 열리는 시기가 변화된 식물, 등이다.

나. 우리나라 식물 biotechnology 기술 향상 도모

Website, seminar 등을 통해 국내 학자들에게 이 연구결과의 지식과 특허, 정보 등을 무상으로 제공하여, 국내 plant biotechnology의 기술 향상을 도모한다.

다. 특허

유용한 유전자와 형질전환 식물, 물질들을 특허를 낸다. 국내외 기업에 기술이전을 추진한다. 유전자를 판매하거나 licensing fee를 기대할 수 있다.

# S U M M A R Y

## (영 문 요 약 문)

Guard cells regulate stomatal apertures, and thereby regulate gas exchange of plants. When guard cells swell and open stomata, CO<sub>2</sub> can enter into the leaves and be fixed into carbohydrates, while water is lost through the open pore. Since both photosynthesis and transpiration are critically important functions with potential applications, understanding of the signal transduction processes of guard cells can contribute to production of plants with new, improved functions for industrial, agricultural and environmental applications.

We have conducted research on signal transduction of guard cells and published these results in the *Plant Cell and Plant Physiology*. We are also preparing new publications to report our recent results. These results can be summarized as follows. First, we found that PI3P and PI4P, the products of PI3K and PI4K, respectively, are necessary for normal stomatal movements. Second, PI3P is important for generation of ROS (Reactive Oxygen Species) upon ABA treatment. Third, PI4,5P<sub>2</sub> accelerates light-induced stomatal opening movement via inhibition of anion channel activity. We identified a PI4P5K gene that is highly likely to produce PI4,5P<sub>2</sub> in guard cells and thereby regulates stomatal opening. Fourth, we found a regulatory role of Rop2 small G protein in stomatal movement.

Based on these results, we suggest that PI3P, PI4P, PI4,5P<sub>2</sub> and Rop2 as modulators/participants in signal transduction processes in stomatal guard cells.

# C O N T E N T S

(영 문 목 차)

- 1 The Object of Research
- 2 The Present state of the technology
- 3 Result
- 4 Achievement and Contribution
- 5 Application Plan
- 6 References



## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구 개발의 필요성

- 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

### 가. 기술적 측면

식물은 기공을 통해서 이산화탄소를 받아들여 광합성을 하고, 기공을 통해서 물을 잃는 증산작용을 한다. 기공을 열어야 탄수화물을 합성할 수 있지만, 기공을 열면 동시에 물을 잃기 때문에 기공을 잘 조절하는 것이 식물의 생존에 매우 중요하다. 우리는 식물이 자극을 인지하여 기공을 움직이는 과정에 관해 국제적인 수준의 knowhow를 가지고 있다. 이것을 잘 이용하여 가뭄에 더 잘 견디는 식물이나, 증산을 더 잘하여 펌프의 구실을 할 수 있는 식물 등 새로운 작물들을 개발한다면 국제경쟁력이 있을 것이다.

### 나. 경제·산업적 측면

농업은 여러 산업과 경제에 원자재를 제공하는 가장 근본적이며, 중요한 분야이다. 그런데 농작물의 생산량에 가장 큰 영향을 주는 것이 물 공급이다. 최근에 물부족 현상이 전세계적으로 심각해지고 있으며, 전세계 담수의 65%를 식물이 소비한다는 점을 보면, 가뭄에 잘 견디고 물을 경제적으로 쓰는 식물을 개발하는 것은 농업과 산업에 큰 영향을 미칠 수 있다.

### 다. 사회·문화적 측면

우리나라의 과학기술이 어떤 분야에서라도 세계적인 수준에 있다는 것은 자랑스러운 일이며, 다른 인접 분야의 발전에도 긍정적인 영향을 줄 수 있다. 우리 실험실은 공변세포의 신호전달 분야에서 그동안 확고한 업적을 쌓아 국제적인 인지를 받고 있다. 계속 지원을 받는다면, 앞으로도 우리나라의 기초과학적 수준의 향상에 기여할 수 있을 것이다.

## 2. 연구개발의 목표

### 가. 과제의 최종 목표

공변세포의 신호전달 과정을 밝힌다. 특히, 공변세포에 발현되는 액틴조절 단백질, 액틴 결합단백질의 유전 정보를 구축하고, 아직 미발표되거나 식물의 고유한 actin-interacting protein의 유전자를 찾아서 공변세포의 기능과 actin cytoskeleton에 어떠한 역할을 하는지 규명한다. 이러한 결과를 응용하여, 공변세포의 반응 형태를 변화시킨 여러 가지 유용한 형질전환 식물체를 만들어 내는 기술을 개발하는 것을 목표로 한다.

나. 과제의 1단계 목표

공변세포의 신호전달에 관여하는 단백질, 유전자를 찾아서, 그들의 기능을 밝힌다.

참고: 원 계획서에는 공변세포의 신호전달과정에서 actin과 interact하는 분자들을 주요 연구대상으로 하였으나, 2차년도부터는 actin과의 상호작용에 관계없이 공변세포의 신호전달에 관여하는 모든 새로운 분자들을 대상으로 하였다.

다. 연구의 세부목표

구 분	연구개발 목표 및 범위
1차년도 (2001)	공변세포 액틴의 역할과 조절기작 연구 - 공변세포의 신호전달과정에서 Rop2, PI3K, PI4K, PI4P5K의 역할을 이해하고 이들 단백질과 액틴의 관계를 자세히 분석.
2차년도 (2002)	공변세포 신호전달에 관여하는 단백질의 탐색 및 유전자 동정 - 공변세포의 신호전달과정에서 RIC7과 PI4P5K의 역할을 규명
3차년도 (2003)	공변세포의 신호전달에 관여하는 단백질의 기능 분석 -RIC1, RIC7, PI3K의 공변세포의 신호전달 과정에서 기능을 규명 -공변세포에서 빛 신호전달에 기여하는 PI4P-5-kinase 유전자의 동정 -공변세포의 새로운 신호전달 물질 발견

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

공변세포는 식물의 잎 표면에 위치하여 잎 내부와 외부간의 가스교환을 조절한다. 공변세포가 기공을 열면 이산화탄소가 잎 안으로 들어가서 광합성이 될 수 있고, 식물체내의 수분이 공기 중으로 손실된다. 식물이 물을 잃는 것은 생존에 치명적인 결과를 가져올 수 있으므로, 기공은 수분이 충분하고 광합성이 잘 이루어질 수 있는 조건에서만 열려야 한다. 이러한 중요한 조절기능을 수행해야 하기 때문에 공변세포는 환경조건을 매우 민감하게 인지하여 반응을 하는 고도로 정밀한 신호전달체계를 갖추고 있으며, 식물의 신호전달 연구에 가장 널리 쓰이는 모델 system이다. 공변세포와 기공에 관한 연구는 기초지식을 얻는데 그치지 않고, 여러 가지 응용으로 연결될 수 있다. 공변세포의 신호전달을 이해하면, 그 지식을 농업생산량을 증가시키는 방법과 산업, 환경분야 등에 이용할 수 있는 신기능 식물을 만드는 데에도 이용할 수 있기 때문이다.

본 실험실에서 공변세포의 신호전달에 관하여 10여년간을 연구하고 있는데, 특히 actin filament가 공변세포의 신호전달에 참여한다는 새로운 사실을 발견하고 관련된 결과들을 권위 있는 국제학술지에 계속 발표하여, 이 분야에서 세계적으로 앞서가는 위치를 차지하고 있다. 이러한 우리의 결과들에 의해 식물세포에서의 actin의 역할에 관한 개념이 바뀌게 되었다. 종래에는 actin이 세포의 골격을 이루어 식물세포의 형태를 결정하는 것으로 알려져 있었는데, 우리는 이것이 매우 빠르게 변화하며, 세포의 신호전달에 참여한다는 것을 보인 것이다.

우리는 공변세포에서 actin cytoskeleton의 세포내 기능과 조절 기작을 수년간 연구하여, 공변세포의 actin cytoskeleton의 구조와 배열이 여러 환경요인에 반응해서 빠르게 변하고, 이런 변화는 이온수송체의 활성을 조절하고, 결과적으로는 기공운동이 효과적으로 일어나도록 작용한다는 것을 밝혔다 (Hwang et al, 2001). 본 연구실이 식물 actin cytoskeleton 연구에서 계속해서 선도적인 위치에 서기 위해서는 본 연구과제를 통한 새로운 유전자와 돌연변이 식물체의 확보가 필수적이다. 공변세포는 다양한 외부신호에 반응하여 actin cytoskeleton을 빠르게 재배치하므로, 다른 세포들에 비해 훨씬 더 다양한 종류의 액틴 조절 단백질을 발현할 것으로 기대되고, 따라서 actin regulator를 찾는 목적에 더 유리한 세포일 것이다. 지금까지 식물에서 actin을 연구하는 다른 연구자들의 접근 방법은, 알려진 몇몇 actin-binding protein들의 염기 서열을 바탕으로 식물의 actin-binding protein의 유전자를 찾아서 다루기 용이한 세포에서 형질의 변화를 보는 방식이었다. ADF, profilin, fimbrin, villin-유사 단백질이 이 경우이다 (McCurdy and Kim, 1998; Gibbon and Staiger, 2000; Klahre et al., 2000; Dong et al., 2001). 그러나 식물의 신호전달 물질은 동물과 많은 부분에서 유사하지만, Rop이나 actin, ABI의 경우처럼 식물 고유의 특징을 지닌 것들도 발견된다 (McElroy et al., 1990; McLean et al., 1990; McDowell et al., 1996; Leung

et al., 1997; Zheng and Yang, 2000).

Rop small G protein은 RHO 계열의 단백질로, 공변세포에서 세가지 종류가 발견됨이 밝혀졌고 (Bishoff et al, 2000), 화분관의 actin cytoskeleton을 조절한다는 결과가 있었다 (Zheng and Yang, 2000). 특히 AtRac1은 actin cytoskeleton을 통하여 공변세포의 기공운동에 영향을 주고 있음이 밝혀졌다.

또한 식물에서는 밝혀지지 않았지만, PI3P, PI4P, PI4,5P2와 같은 인지질들이 동물에서와 같이 actin cytoskeleton의 재배열을 통하여(Barbara Belisle and Arie Abo, 2000) 공변세포의 기공운동에 관여할 가능성도 배제 할 수 없다. 본 실험실에서는 실험을 통하여 이러한 인지질들이 actin cytoskeleton을 통하여 공변세포의 기공운동에 영향을 주고 있음을 밝혔다.

우리 실험실에서 공변세포의 신호전달 분야에 매년 1-2편의 논문을 세계적으로 권위있는 국제학술지에 발표하고 있다. 이러한 실적은 이 분야에서 세계 최고의 실험실들인 Schroeder, Assmann의 실험실에 비해서는 떨어지지만, 기타 다른 기공을 연구하는 실험실에 비해서는 크게 뒤떨어지지 않는다.

그러나 최근 미국의 많은 실험실에서 기공운동에 관련된 정보를 특허를 받고 있으며, 이런 특허는 가뭄에 잘 견디는 식물의 개발에 기여할 수 있다는 유용성을 목적으로 한 경우가 많다. 공변세포는 식물의 신호전달에서 가장 널리 쓰이는 model system이므로 많은 연구자들이 공변세포를 대상으로 연구를 수행하고 있으며, actin 또한 세포의 운동, 형태조절, 신호전달에 핵심적인 역할을 하는 단백질이므로, 많은 연구자들이 근자에 더욱 관심을 가지는 분야이다. 그러므로 이 분야의 경쟁은 앞으로 훨씬 더 치열해질 것이다. 우리가 현재 이 분야에서 차지하고 있는 비교우위를 유지하기 위해서는 상당한 노력과 투자가 필요하다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1. 접근방법

가. 유사성을 바탕으로 한 유전자 cloning

(1) 공변세포 의 mRNA 분리: Arabidopsis의 rosette 잎을 갈아서 표피층을 mesh로 걸러 낸다. 여기에서 plant mRNA purification kit (QIAGEN)을 사용하여 mRNA를 분리한다. 또는, 표피층을 완충액에 띄우고, 액시스산이나 고염, cold shock, heat shock등을 처리한 다음 같은 방법으로 mRNA를 분리한다. 공변세포외의 표피세포는 조직을 가는 속도와 힘을 조절하고, 완충액의 pH를 산성으로 조정하여 최대한 제거한다.

(2) cDNA library 제작: cDNA library construction kit (Stratagene)를 사용하여 cDNA를 제작한다.

(3) cDNA library screening: cDNA library에서 plasmid DNA를 분리하고 PCR template로 사용한다. Rop, PIK, PIPK와 알려진 actin-binding domain을 가진 유전자의 conserved sequence를 대상으로 degenerate PCR을 하여 원하는 유전자의 cDNA가 있는지 조사한다. 그리고 library를 screening하여 유전자를 얻고 기능을 동정한다.

나. Yeast two hybrid

앞에서 기술한 방법으로 얻은 공변세포의 mRNA를 사용하여 yeast two hybrid용 library를 제작한다(QIAGEN). Arabidopsis의 vegetative actin의 전체 coding region으로 bait용 vector를 제작하고, actin과 결합하는 cDNA를 선별한다. 염기서열을 분석하여 유전자의 기능을 동정하고, 이미 알려진 것은 제외하고 나머지의 경우 cDNA library를 사용하여 전체 유전자를 cloning한다.

다. 공변세포 특이적인 유전자 및 promoter screening

(1) mRNA 분리: 위 1항에서와 같이 공변세포의 mRNA를 분리하고, 엽육조직의 mRNA는 다음과 같이 분리한다. Arabidopsis rosette 잎들을 갈아서 성근 mesh로 걸러서 표피층을 제거한다. 220 micron mesh로 걸러 mesophyll 조직을 얻어서 mRNA 분리에 이용한다.

(2) DNA microarray: 분리한 mRNA sample들로 Arabidopsis Functional Genomics Consortium (AFGC)에 microarray를 의뢰한다. 엽육조직과 비교하여 발현이 높은 유전자를 선별한다. 액시스산의 처리나 스트레스 상황에서 변하는 발현 양상도 비교하여 특정 조건에서 공변세포에서 발현되는 유전자의 정보도 얻는다.

(3) DNA microarray 결과 선별한 유전자들의 염기서열정보를 바탕으로 기능을 예측하고, cDNA를 cloning한다. RNA blotting을 실시하여 공변세포에서 많이

발현하는지 확인한 다음, genomic DNA library에서 Promoter region을 포함한 전체 유전자를 cloning한다.

(4) Promoter study: Promoter-GUS/GFP를 제작하여 arabidopsis를 형질전환한다. 형질전환체에서 유전자의 발현을 전체 발달 단계별로 그리고 조직별로 분석한다.

라. Actin cytoskeleton과 기공운동에 미치는 영향 조사 (in vivo study)

(1) Particle bombardment: 골라낸 유전자가 식물 actin cytoskeleton을 조절하는지 single cell level에서 조사한다. 후보 유전자를 35S promoter에 붙여 식물세포 발현 vector에 cloning한다. GFP-talin과 같이 bombardment 방법을 사용하여 양파의 상피 세포와 잠두의 abaxial epidermis에 transient expression 시키고, 하루에서 삼일 정도 후 표피를 벗겨서 형광의 분포를 관찰한다. Deconvolution fluorescence microscope와 confocal microscope를 사용하여 형광 사진을 얻고, GFP-talin만을 발현시킨 세포에서의 actin 구조와 비교 분석한다. Latrunculin, cytochalasin, jasplakinolide, phalloidin에 대한 actin의 민감성도 비교한다.

(2) 기공운동 조사: Soluble GFP와 같이 잠두의 공변세포에 bombardment 방법으로 발현시킨 다음, 빛이나 앱시스산에 대한 기공의 반응이 GFP만 발현시킨 대조구와 차이가 있는지 조사한다. 또한 기공운동을 조절할 가능성이 높은 유전자는 GFP/RFP와 같은 형광 단백질과 합성하여 공변세포에 발현시키고, 세포내에서 어디에 분포하는지 조사한다. Actin이나 주요 신호전달물질과의 colocalization도 조사한다 (그림 1).

마. 기공운동 돌연변이체 선별

(1) Infra-red video thermography: 여러 종류의 arabidopsis mutant 종자 (EMS, fast neutron-irradiated, T-DNA tagged mutant lines)를 소독해서 agar plate에 분주한다. 춘화처리를 한 다음 growth room (24도, 16-h photoperiod)에서 키운다. 본잎이 두 장 이상 나왔을 때, 빛, 식물 호르몬, 온도 변화, salt 처리 등의 자극에 대한 기공운동을 조사한다. 기공을 통한 증산 작용의 결과 잎 표면의 온도가 조절되는데, 기공운동이 촉진되거나 감소하면, 잎 표면 온도가 영향을 받는다. 적외선 감지법 (Infra-red video thermography)으로 잎 표면 온도를 야생종과 비교한다. 각 처리구에서 야생종과 비교하여 잎의 온도가 올라가거나 낮은 돌연변이체를 선별한다. Mutant 종자들은 Arabidopsis Stock Center와 biotech company에서 구입하여 실험할 계획이며, 만족스럽지 못하면 직접 제작한다. 마찬가지로 실험을 벼(*Oryza sativa*)의 T-DNA tagged line에서도 실시한다.

(2) 기공운동에 이상이 발생한 돌연변이체에서 여러 가지 자극들에 대한 기공운동의 양식을 분석하여 기존의 알려진 돌연변이들과 비교한다. 또한 성장이나 발달 상태를 야생종과 비교하여 기공운동 외에 다른 심각한 돌연변이 표현형이

있는지 조사한다. 분석결과를 바탕으로 다음 단계로 진행한다.

(3) 유전자 cloning: T-DNA based mutant의 경우는 flanking sequence를 분석하고, DNA sequence database와 비교 분석하여 가능성 있는 유전자를 골라낸다. EMS/fast neutron irradiated mutant의 경우는 표현형을 분석하여 대상 유전자에 대한 정보를 얻고, 동일한 돌연변이가 알려져 있는지 조사한다. 또한 recombinant inbred line과 PCR-based polymorphism analysis를 바탕으로 map-based cloning을 실시하여 후보 유전자를 cloning한다. 얻은 유전자는 가능한 아미노산 서열을 분석해서 기능을 추측하고, 식물체에서의 발현 분포 조사와 과다발현이나 발현억제 때의 표현형 분석을 통하여 기능을 알아낸다.

## 2. 연구내용 및 결과

우리는 지난 3년간 연구를 통하여 공변세포의 기공운동에 관여하는 유전자들을 찾아냈고, 이들이 어떻게 공변세포내 신호전달에 관여하는지 연구하였다. 지금까지의 연구결과는 다음과 같다.

가. PI3K와 PI4K의 산물인, PI3P와 PI4P가 공변세포의 기공운동에 역할에 관하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

① PI3K, PI4K 억제제로 알려진 wortmannin과 LY294002는 빛에 의한 기공열림운동을 촉진하였고, 앱시스산에 의한 기공의 닫힘 운동을 억제하였다(그림2).

② Wortmannin과 LY294002는 공변세포 내의 PI3K, PI4K의 활성을 억제하였다. 하지만, wortmannin은 공변세포내 PI4P5K의 활성을 억제하였던 반면, LY294002는 억제하지 않았다(그림 3, 4).

③ PI3P와 PI4P에 특이적으로 결합하는 단백질인 GFP:EBD와 GFP:FAPP1PH의 잠두의 공변세포내 과다발현은 암상태와 빛이 있는 조건에서 기공의 크기를 증가시켰으며, 앱시스산에 의한 기공닫힘운동을 억제하였다(그림 5, 6).

④ Wortmannin과 LY294002는 앱시스산에 의해 유도되는  $Ca^{2+}$ 의 증가를 억제하였다(그림 7).

위와 같은 사실들을 종합해 보면, 이들 두 인지질은 앱시스산에 의해 기공이 닫힐 때, 세포내  $Ca^{2+}$ 농도를 높이는 과정에 관여함으로써 기공 닫힘 운동에 기여한다는 것을 밝혔으며, PI3P는 PI4P와는 다르게 앱시스산에 의해 기공이 닫힐 때, 활성산소의 생성단계에도 관여하는 것을 발견하였다.

나. PI3P는 공변세포의 actin filament의 상태에 큰 영향을 주는 것을 알아내었다. PI3P가 부족한 상황에서 actin filament는 굽어지고 더 뻣뻣해지며, 앱시스산을 넣어도 actin depolymerization이 잘 되지 않는 것을 볼 때, PI3P가 actin dynamics에 매우 중요한 요소임을 알았다(그림 8).

다. 기공운동에서 PI4,5P2의 역할에 대하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

① PI4,5P2는 공변세포의 anion channel이 시간에 따라 활성화 되는 것을



억제하였다(그림 9).

② PI4,5P2를 잠두의 공변세포에 처리하면 기공의 열림 운동이 촉진되었다(그림 10).

③ 애기장대에서 PI4P를 PI4,5P2로 전환하는 *AtPIP1K1*과 높은 유사성을 가진 유전자 *At3g56960*가 T-DNA 삽입으로 인해 knock-out된 식물의 경우 기공의 열림 운동이 지연되었다(그림11).

이상의 결과를 바탕으로 우리가 세운 가설은 빛이 공변세포의 PI4P-5-kinase를 활성화시켜서 PI4,5P2를 생성시키며, 이것이 anion channel의 활성을 감소시켜서 기공이 닫히는 것을 방해하여 기공이 결과적으로는 열게 된다는 것이다.

라. Rho-small G protein의 member들은 세포내 신호전달 과정에서 switch 역할을 하고, 식물과 동물세포에서 actin cytoskeleton의 조절자로 알려져 있다. 이전의 연구결과에서 *AtRac1* (*Rop6At*)는 arabidopsis에서 앱시스산에 의한 기공 닫힘 운동과 actin reorganization에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 여러 식물세포에 공히 발현되는 *Rop2*가 공변세포의 기공운동에 어떠한 역할을 수행하는지 알아보았다.

① *Rop2*가 공변세포에 발현되는지 확인한 결과, 전체 잎 (주로 엽육세포) 뿐만 아니라 공변세포에서도 발현되는 것을 확인하였다(그림 12).

② CA(constitutively active)-*Rop2* 와 DN(dominant negative)-*Rop2*를 과다 발현시키면 애기장대의 기공 운동이 변화하였다.

㉠ 빛에 의한 기공열림운동의 속도는, DN-*Rop2* 돌연변이체가 가장 빠르며, 다음으로 wild type, CA-*Rop2* 순으로 나타났다(그림 13).

㉡ 앱시스산에 의한 기공닫힘운동의 속도는, DN-*Rop2* 돌연변이체가 가장 빠르며, 다음으로 wild type, CA-*Rop2* 순으로 나타났다(그림 14).

③ *Rop2*의 공변세포 내 위치를 조사한 결과, *Rop2*의 활성화된 형태인 CA-*Rop2*는 주로 세포막에 존재하였으며, 비활성화된 형태인 DN-*Rop2*는 주로 세포질에 존재하였다(그림 15). 또한, GFP-*Rop2*는 빛에 의해 세포막으로 이동하였고, 앱시스산에 의해 다시 세포질로 이동하였다(그림 16).

④ *Rop2*는 actin의 재배열에는 영향을 미치지 않았다(그림 17).

⑤ GFP-RIC7을 잠두의 공변세포에 과다발현한 후 RIC7의 위치를 관찰하였다 (그림 18).

㉢ 암처리시에 RIC7은 핵과 세포질에 위치하였다.

㉣ 빛을 주었을 때, 핵과 세포질에 있던 RIC7이 주로 세포막으로 이동하였다.

㉤ 다시 암처리시 세포막과 세포질에 있던 RIC7이 핵과 세포질로 이동하였다.

이러한 일련의 결과는 이전에 본 실험실에서 밝힌 신호의존적 *Rop2*의 위치변화와 유사하였다.

⑥ GFP-RIC7을 과다발현하는 공변세포의 경우 빛에 의한 기공의 열림운

동이 억제 되었다. 그러나, 암처리에 의한 기공의 닫힘에는 영향이 없었다(그림 19).

⑦ GFP-RIC7의 위치는 RFP-CA (constitutive active) Rop2와 함께 과다발현 시키면 주로 세포질에 위치하였다. 그러나, RFP-DN (dominant negative) Rop2와 함께 과다발현 시키면 GFP-RIC7은 주로 핵과 세포질에 위치하였다(그림 20).

이러한 결과들을 종합해 볼 때, Rop2 small G protein은 RIC7과 상호작용을 함으로써 공변세포의 기공운동을 억제시키는 조절자 역할하고 있음을 알 수 있다.

우리는 이와 같은 결과를 통해서 우리는 Rop2, PI3K, PI4K, PI4,5PK가 액틴을 경유하거나 또는 다른 매개체 (Ca<sup>2+</sup>, ROS)를 통해 기공운동의 조절에 중요한 역할을 한다는 사실을 알아 내었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 목표 달성도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	공변세포의 신호전달과정에서 Rop2의 역할을 이해하고 이들 단백질과 액틴의 관계를 자세히 분석한다.	Rop2가 활성화되면 기공이 열리는 운동과 닫히는 운동이 모두 억제되는 것을 발견함. 액틴과는 너무 밀접한 관련이 되어 있어 구분이 어려움.	95%
2	공변세포의 신호전달과정에서 PI3K, PI4K, PI4P5K의 역할을 이해하고 이들 단백질과 액틴의 관계를 자세히 분석한다.	기공이 닫히는 운동에 PI3P, PI4P, PI4,5P2가 필수적임을 밝힘. 이들 중에서 액틴의 구조에 영향을 주는 것은 PI3P임을 밝힘.	95%
3	공변세포의 신호전달과정에서 PI3K 와 ROS (Reactive Oxygen Species) 의 관계를 이해한다.	공변세포가 엡시스산에 의해 기공을 닫을 때, PI3P가 있어야 ROS가 형성되어 기공을 닫을 수 있음을 밝힘.	100%
4	RIC7과 Rop2와의 관련성과 이것이 기공운동에 미치는 영향에 대한 연구	RIC7과 활성화된 Rop2는 colocalization 되어 있으며, RIC7 Knock-out line에서 빛에 의한 기공운동이 증가함. 이들이 기공이 너무 많이 열려 물을 잃어버리는 것을 방지한다는 것을 알아냄.	100%
5	공변세포에서 PI4P5K의 역할을 이해	PI4P5K는 빛이 있을 때 활성화되어 음이온 채널을 억제하여 기공이 열리게 함을 밝힘.	100%
6	공변세포의 새로운 신호전달 물질 발견	RIC1, RIC7, RIC4, 등, Rop-interacting protein들이 기공운동에 영향을 주는 것을 알아냄. 이들의 작용기작을 알아내는 방법으로서, 결합 단백질을 찾기위해 Tap taq을 붙여서 애기장대에 형질전환시켰음.	100%

## 2. 기대성과

### 가. 기술적 측면

식물이 여러 가지 환경조건의 변화를 인지하고 반응하는 과정을 이해하는 것은 가장 기초적인 생물학적 문제이다. 그러나 이것은 기초에만 그치지 않고, 여러 가지로 응용될 수 있다. 공변세포의 신호전달을 이해하는 것은 식물세포의 신호전달을 이해하는 model로 중요할 뿐만 아니라, 농업생산량을 증가시키는 목적과 산업, 환경분야 등에 이용할 수 있는 신기능 식물을 만드는 데에도 이용할 수 있기 때문이다. 이 과제는 특히 다음의 점에서 기술적인 진전을 이룩할 것이다.

첫째, 식물에서 아직 액틴 결합단백질을 대규모로 찾는 실험을 진행한 적이 없다. 동물의 actin binding protein과의 유사성을 가진 actin regulator에 더해, 식물 고유의 actin regulator를 찾는다면, 식물의 actin cytoskeleton의 이해가 크게 진보할 것이다.

둘째, 공변세포는 알려진 대부분의 자극들에 반응하여 신호전달연구의 주요한 system으로 이용되고 있다. 따라서 공변세포의 신호전달물질 연구는 식물체 전반에의 신호전달 현상에 대한 이해로 연결된다.

### 나. 경제·산업적 측면

공변세포는 기공을 이루고, 기공은 광합성을 위한 이산화탄소를 흡수하는 통로이며 식물체내의 수분이 외부로 나가는 통로이기도 하다. 기공운동의 신호전달 과정을 체계적으로 조사하고 그 정보를 분석하면, 생산성이 향상된 식물체 개발에 바탕이 된다. 신호전달 과정을 약간 조작하는 것으로 여러 가지로 유용한 식물의 개발이 가능하다. 가뭄(Drought) 관련 신호전달 체계를 강화하여, 수분이 부족할 때 기공이 빠르게 완전히 닫도록 하면, 가뭄에 내성을 지닌 작물, 염도가 높은 척박한 환경에서 생존 가능한 작물을 개발할 수 있다.

기공은 병원균의 침입 통로이기도 하다. 병원균이 침입하자면 먼저 기공이 열려 있어야 하며, 그 시기 또한 중요하다. 빛이나 하루의 시간 흐름에 따른 기공의 열림을 조금 늦추거나, 습도가 높을 때 잘 닫도록 해주면 병원균에 의한 감염비율을 낮출 수 있을 것이다.

기공의 열림을 촉진시킨 식물체의 경우는 환경적 측면에서 쓰임새가 기대된다. 오염된 곳을 식물을 이용하여 정화할 때, 오염물질을 식물체가 많이 흡수하도록 만들기 위해서는 기공을 통한 증산작용이 활발해야 한다. 이런 목적을 위해서는 공변세포에 특이적인 유전자가 필요하다. 이를 확보하면, 상당한 경제적인 가치를 기대할 수 있다.

여러 생물학 분야에서 actin antagonists와 actin binding molecules들이 실험적 도구로 사용되고 있다. 압 전이 억제연구에도 actin cytoskeleton이 주요한

부분을 차지한다. 새로운 actin interacting molecule을 알아내면, 개선된 액틴  
염색방법과 액틴 변형 물질을 개발할 가능성이 있고, 이것은 직접 경제적인 이  
득으로 연결될 수 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 기공운동이 변화된 여러 가지 형질전환 식물의 개발

위의 경제·산업적 측면에 기술한 여러 측면을 고려하여 여러 가지 형질전환  
식물을 만든다. 예를 들면, 물이 부족할 때 기공이 빨리, 더 완전히 닫히는 식  
물, 기공을 통한 증산작용이 더 향상된 식물, 기공이 열리는 시기가 변화된 식  
물, 등이다.

### 2. 우리나라 식물 biotechnology 기술 향상 도모

Website, seminar 등을 통해 국내 학자들에게 이 연구결과의 지식과 특허, 정보  
등을 무상으로 제공하여, 국내 plant biotechnology의 기술 향상을 도모한다.

### 3. 특허

유용한 유전자와 형질전환 식물, 물질들을 특허를 낸다. 국내외 기업에 기술이  
전을 추진한다. 유전자를 판매하거나 licensing fee를 기대할 수 있다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Barbara Belisle and Arie Abo. 2000. N-Formyl Peptide Receptor Ligation Induces Rac-dependent Actin Reorganization through G $\beta\gamma$  Subunits and Class Ia Phosphoinositide 3-Kinases. *J. Biol. Chem.*, 275: 26225 - 26232.
2. B G McLean, S Eubanks, and R B Meagher. 1990. Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *Plant Cell*, 2: 335 - 344.
3. David R. Kovar, Bryan C. Gibbon, David W. McCurdy, Christopher J. Staiger. 2001. Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta*, 213 (3):390-395.
4. David W. McCurdy and Misook Kim. 1998. Molecular cloning of a novel fimbrin-like cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 36: 23-31.
5. Friedrich Bischoff, Lars Vahlkamp, Arthur Molendijk and Klaus Palme. 2000. Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 42: 515-530.
6. Jae-Ung Hwang, Youngsook Lee. 2001. ABA-induced actin reorganization in guard cells of *Commelina communis* is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*, 125, 2120-2128.
7. Ji-Yul Jung, Yong-Woo Kim, June M. Kwak, Jae-Ung Hwang, Jared Young, Julian I. Schroeder, Inhwan Hwang, and Youngsook Lee. 2002. Phosphatidylinositol 3-and 4-Phosphate are Required for Normal Stomatal Movements. *Plant Cell*, 14, 2399-2412.
8. John M. McDowell, Shurong Huang, Elizabeth C. McKinney, Yong-Qiang An and Richard B. Meaghe. 1996. Structure and Evolution of the Actin Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 142: 587-602.
9. Kiyoub Park, Ji-Yul Jung, Jumok Park, Jae-Ung Hwang, Yong-Woo Kim, Inhwan Hwang, and Youngsook Lee. 2003. Roles of PI 3-kinase in ROS generation during ABA-induced stomatal closing. *Plant Physiology*, 132: 92-98.
10. Leung J, Merlot S, Giraudat J. 1997. The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode redundant protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 9: 759-771
11. Makoto Kanzaki, Megumi Furukawa, William Raab, and Jeffrey E. Pessin. 2004. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Regulates

- Adipocyte Actin Dynamics and GLUT4 Vesicle Recycling. *J. Biol. Chem.*, 279: 30622 - 30633
12. Soon-Ok Eun, Youngsook Lee. 1997. Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiology*, 115, 1491-1498.
  13. Ulrich Klahre, Evelyne Friederich, Benedikt Kost, Daniel Louvard, and Nam-Hai Chua. 2000. Villin-Like Actin-Binding Proteins Are Expressed Ubiquitously in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122: 35-48
  14. Zhi-Liang Zheng and Zhenbiao Yang. 2000. The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Molecular Biology*, 44: 1-9.

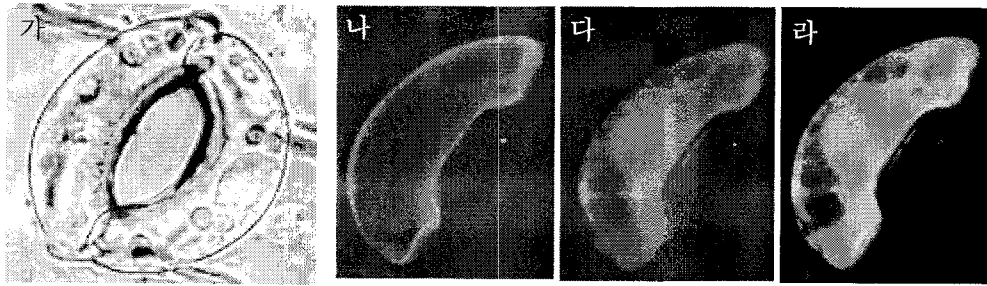


그림 1. 신호전달물질의 유전자와 형광으로 표지된 액틴결합단백질의 유전자를 동시에 bombard하여 잠두의 공변세포에 같이 발현시켜서, 그 신호전달 물질이 공변세포의 액틴구조에 미치는 영향을 알아볼 수 있다. 살아있는 잠두(*V. faba*)의 공변세포에 PI 4,5-P<sub>2</sub>에 특이적으로 결합하는 RFP:PLCδ1PH와 액틴에 결합하는 GFP-talin의 유전자를 동시 발현시킨 뒤, 24시간 후에 빛에 의한 기공열림 운동을 관찰한 결과이다. (가) 두 유전자가 동시발현된 공변세포(왼쪽)의 광학현미경 사진. (나) RFP:PLCδ1PH의 위치를 보여주는 형광사진. (다) GFP-talin의 위치를 보여주는 형광사진. (라) (나)와 (다)를 겹쳐놓은 사진.

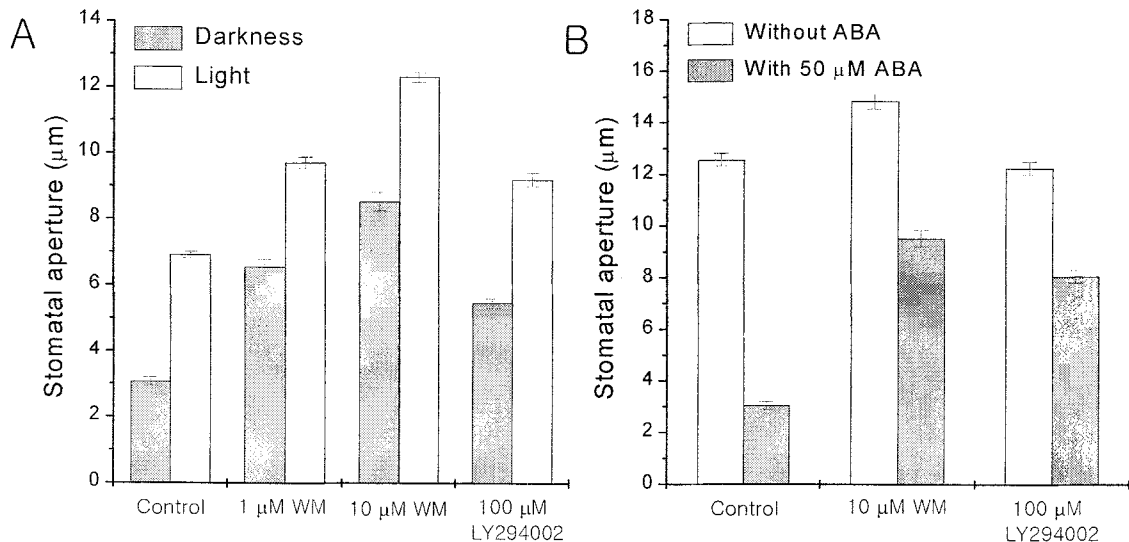


그림 2. 잠두에서 기공운동에 대한 WM과 LY294002의 효과.

(A) 빛에 의한 기공열림운동 실험, 억제제가 들어 있는 버퍼에 잠두의 잎을 띄우고 3시간동안 빛을 준 후 기공의 크기를 측정하였다.

(B) 앱시스산에 의한 기공 닫힘운동 실험, 앱시스산을 처리하기 전 30분 동안 억제제를 전처리 한 후, 앱시스산을 잎이 놓여 있는 버퍼에 처리하고 1시간 뒤에 기공의 크기를 관찰하였다.



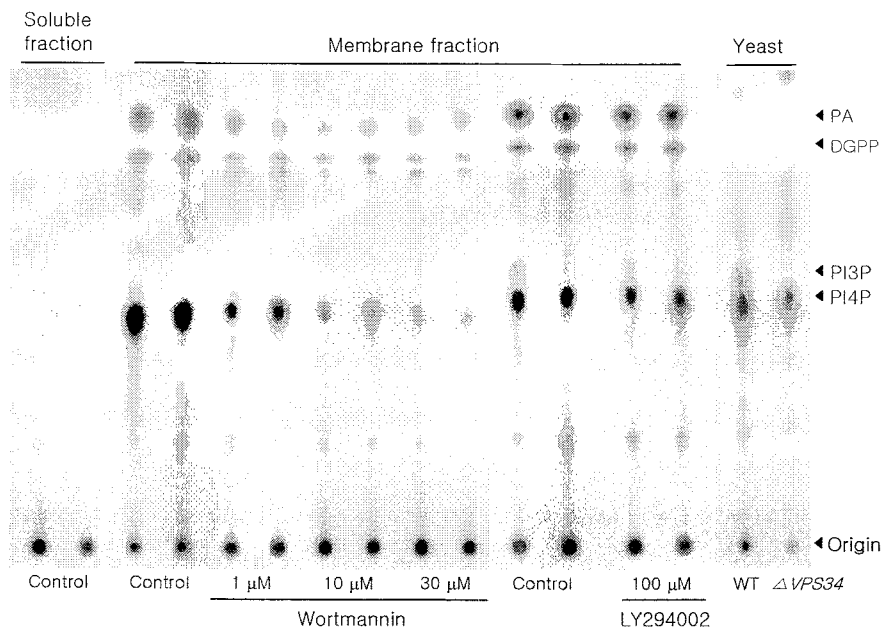


그림 3. 잠두의 공변세포에서 PI3K와 PI4K의 활성화에 대한 WM과 LY294002의 효과. 억제제를 처리한 공변세포의 membrane 부분의 단백질을 추출한 뒤, PI 혹은 PI4P를 기질로 넣고 동위원소가 표지된 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP를 넣어 주어 반응시키면 kinase에 의해 inositol을 포함하는 인지질들이 생성된다. 동위원소가 표지된 인지질들을 추출하여, TLC 방법으로 분리하고 x-ray film에 감광하여 kinase activity를 측정한다.

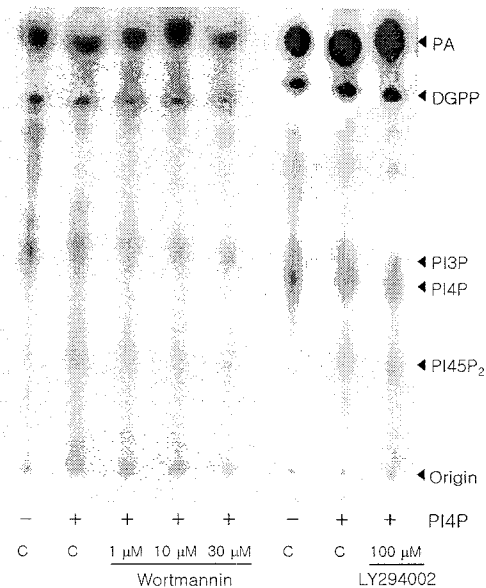


그림 4. 잠두의 공변세포에서 PI4P5K의 활성화에 대한 WM과 LY294002의 효과.

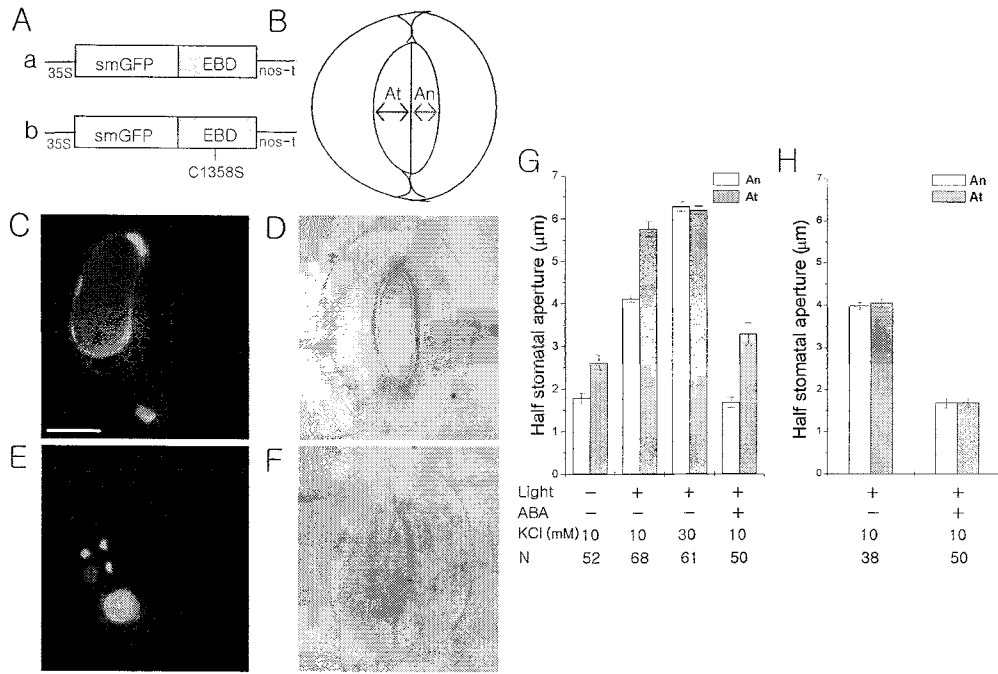


그림 5. 잠두에서 GFP-EBD를 과발현시켰을 때, 기공운동에 주는 영향.

GFP:EBD를 잠두의 공변세포에 bombardment기법을 이용하여 transient expression을 시킨 뒤, 36시간 후에 외부자극을 처리하여 기공의 운동을 관찰하였다.

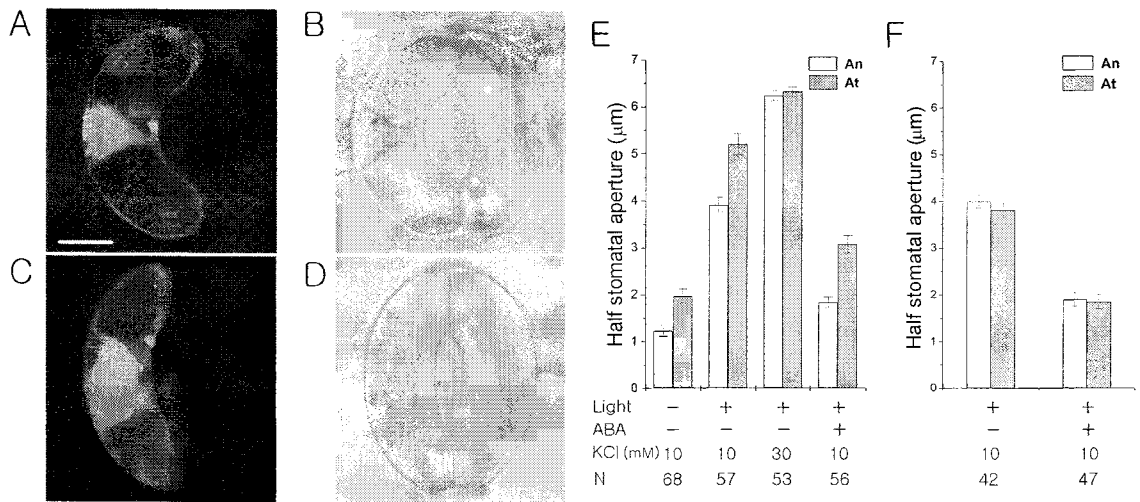


그림 6. 잠두에서 GFP-FAPP1PH를 과발현시켰을 때, 기공운동에 주는 영향.

GFP-FAPP1PH를 잠두의 공변세포에 bombardment기법을 이용하여 transient expression을 시킨 뒤, 36시간 후에 외부자극을 처리하여 기공의 운동을 관찰하였다.

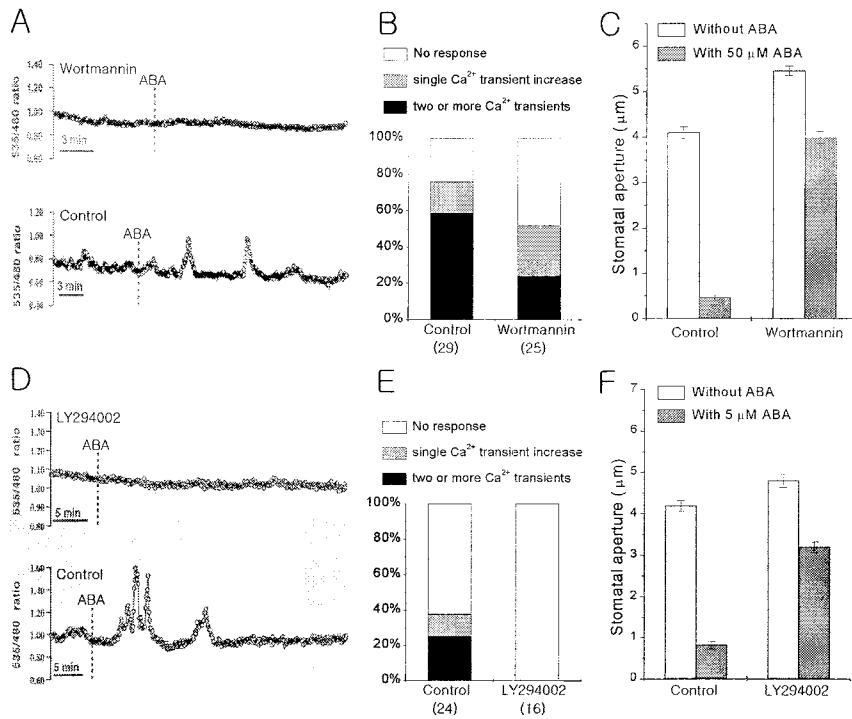


그림 7. 애기장대 공변세포에서 앱시스산에 의해 유도되는 칼슘증가에 대한 WM과 LY294002의 효과. Ca<sup>2+</sup> indicator인 yellow cameleon 2.1이 형질전환된 애기장대의 공변세포에 억제제를 처리한 후, 앱시스산을 처리시 Ca<sup>2+</sup>의 농도 변화를 confocal 현미경으로 관찰하였다.

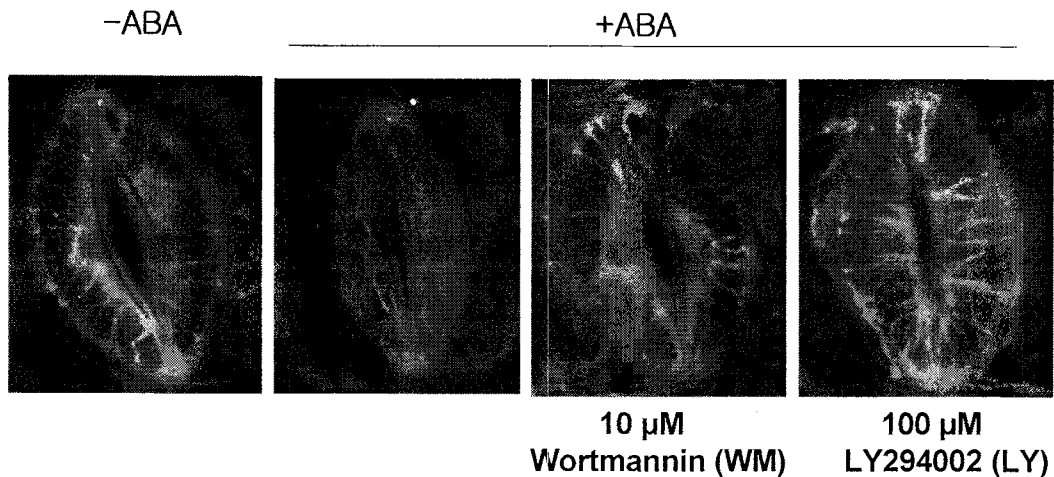


그림 8. PI3K를 저해하는 Wortmannin이나 LY294002는 앱시스산에 의해 공변세포의 액틴이 분해되고 중으로 배치하는 것을 억제하였다. 즉, 앱시스산을 처리한 공변세포에서도 이 저해제가 있으면, 액틴이 분해되거나 재배치되지 않았다.

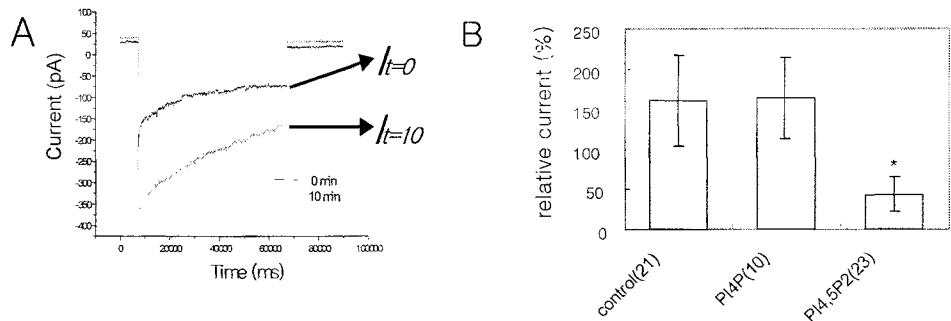


그림 9. 잠두 공변세포에서 음이온 채널 활성화에 대한 PI4,5P2의 효과.

잠두의 잎에서 공변세포의 원형질체를 분리하여 patch clamp 기술을 이용하여 whole cell configuration 상태에서 전류를 측정하여 음이온 채널의 활성을 측정하였다 ( $I_{t=0}$  in Figure 4A). 초기값을 측정한 후 5분이 지나서 PI4P 또는 PI4,5P2를 원형질체에 흘려주어 5분 동안 처리해 주고, 다시 전류를 측정하였다 ( $I_{t=10}$  in Figure 4A). 초기값과 처리 후 값을 비교하여 상대적인 전류변화량을 조사하였다 (Figure 4B).

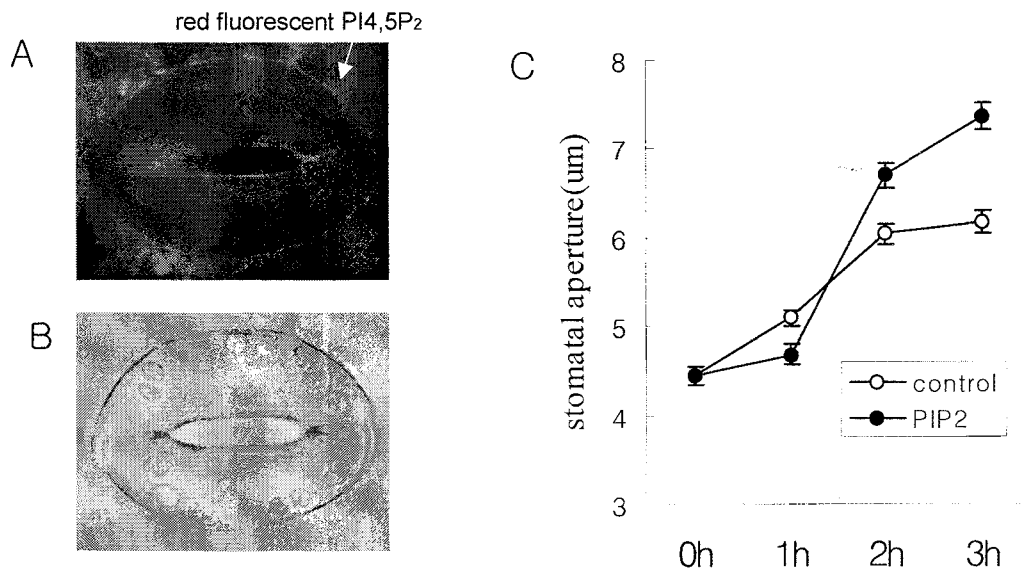


그림 10. PI4,5P2는 잠두에서 기공 열림을 촉진한다.

광주기의 시작시점에서 잠두의 잎을 따서 암처리를 시작하여 생체리듬에 의한 기공의 열림운동을 관찰하였다. 이때, PI4,5P2 처리구의 경우 형광물질로 표지된 PI4,5P2를 carrier와 함께 공변세포에 처리하여 세포 안으로 PI4,5P2가 들어가게 하였다. 1시간 간격으로 기공크기를 측정하였다.

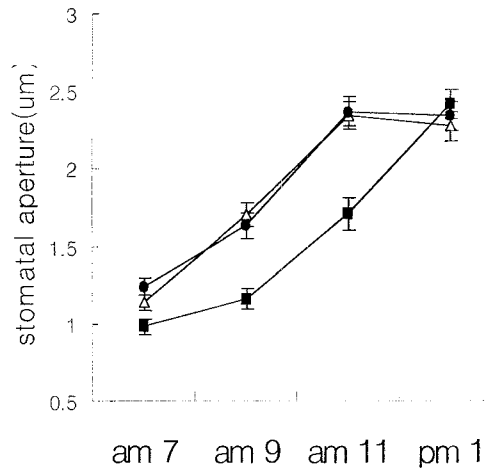


그림 11. 애기장대에서 PI4P를 PI4,5P2로 전환하는 *AtPIP1K1*과 높은 유사성을 가진 유전자 *At3g56960*가 T-DNA 삽입으로 인해 knock-out된 식물에서의 기공의 열림 운동. 온실에서 wild type과 *AtPIP1K1* (애기장대에서 PI4P를 PI4,5P2로 전환하는 단백질의 유전자)과 유사한 염기서열을 가진 *At3g56960*, *At2g26420*의 knock-out 돌연변이체 (각각 line 1, line 4로 명시) 애기장대 식물들을 키우고, 광주기에 따른 기공 열림 운동을 관찰하였다.

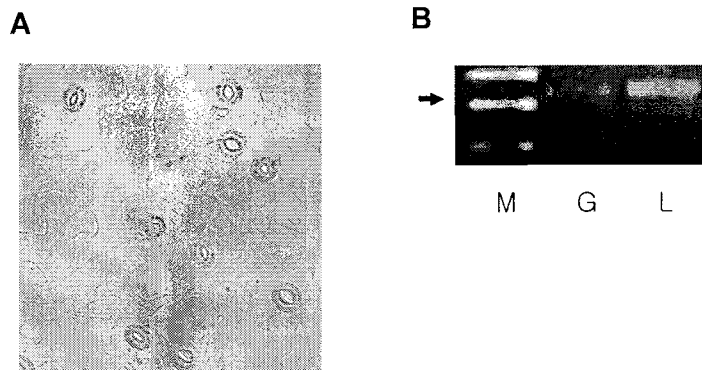


그림 12. 애기장대 공변세포에서 Rop2 small G protein의 발현.

A. *rop2 promoter::GUS* test

B. RT-PCR, G; guard cell, L; leaf

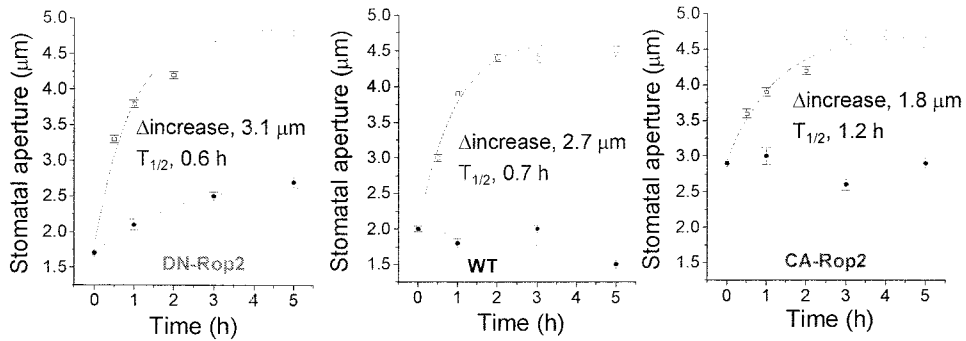


그림 13. Rop2 transgenic Arabidopsis에서 빛에 의한 기공 열림 비교.

CA-Rop2 mutant와 DN-Rop2 mutant를 agrobacterium을 이용하여 애기장대에 형질전환시킨 후, 각각의 mutant와 wild type 에서 빛에 의한 기공운동의 변화를 조사하였다.

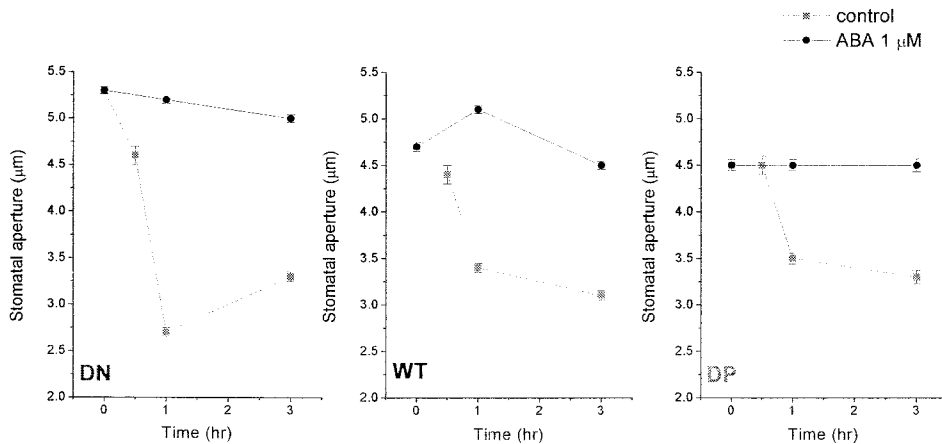


그림 14. Rop2 transgenic Arabidopsis에서 앱시스 산에 의한 기공 닫힘 비교.

CA-Rop2 mutant와 DN-Rop2 mutant를 agrobacterium을 이용하여 애기장대에 형질전환시킨 후, 각각의 mutant와 wild type 에서 앱시스 산에 의한 기공운동의 변화를 조사하였다.

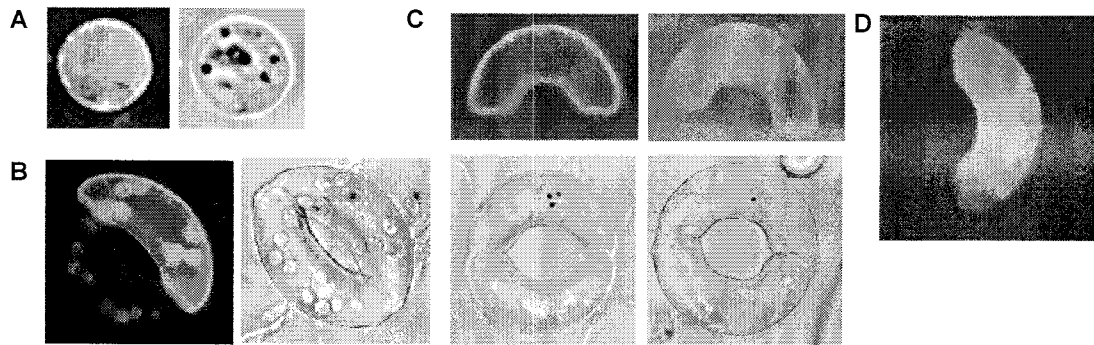


그림 15. 애기장대와 잠두의 공변세포에서 GFP-Rop2At 또는 RFP-mutant Rop2At의 세포내 위치관찰. GFP-Rop2, GFP-CA-Rop2, GFP-DN-Rop2를 잠두의 공변세포에 bombardment 형질전환기법을 이용하여 transient expression을 시킨 다음, 24시간 정도 후에 형질전환된 기공의 운동을 관찰하였다.

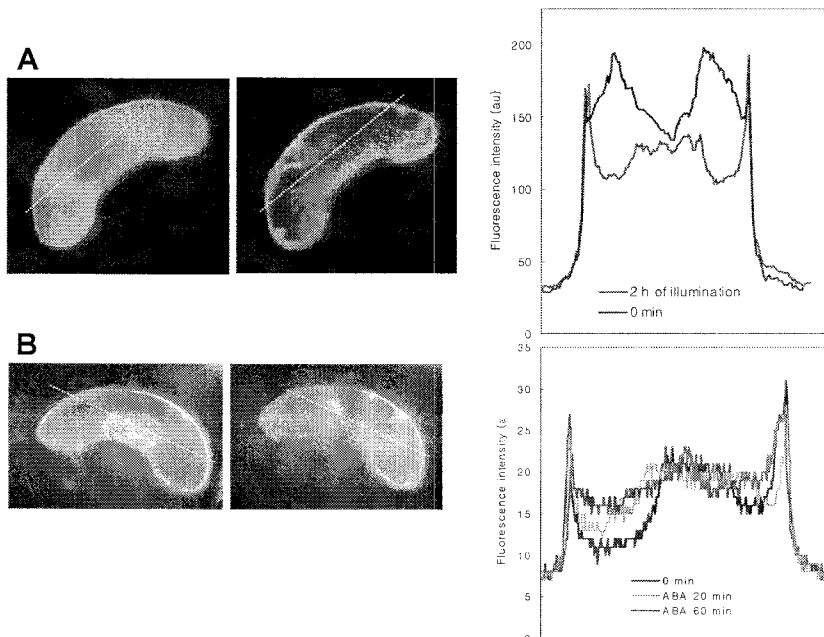


그림 16. 잠두에 GFP-Rop2 과발현 후, 자극에 의한 위치 변화 관찰.

- A. 빛에 의한 Rop2의 위치변화.
- B. ABA에 의한 Rop2의 위치변화.

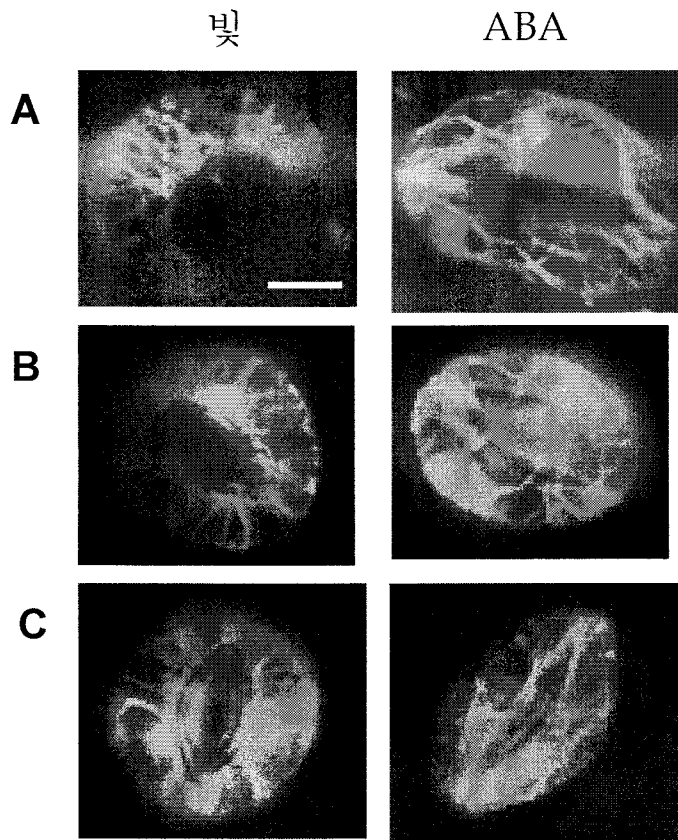


그림 17. wild type 과 Rop2 돌연변이 애기장대 공변세포에서 actin filament.

CA-Rop2, DN-Rop2 유전자와 actin binding protein인 GFP-Talin 유전자를 bombardment 기법을 이용하여 한 공변세포에 동시에 발현시킨 다음, 빛과 앱시스산과 같은 외부자극에 의한 공변세포내 액틴의 변화를 조사하였다.

A: Wild type, B: CA-Rop2 mutant, C: DN-Rop2 mutant

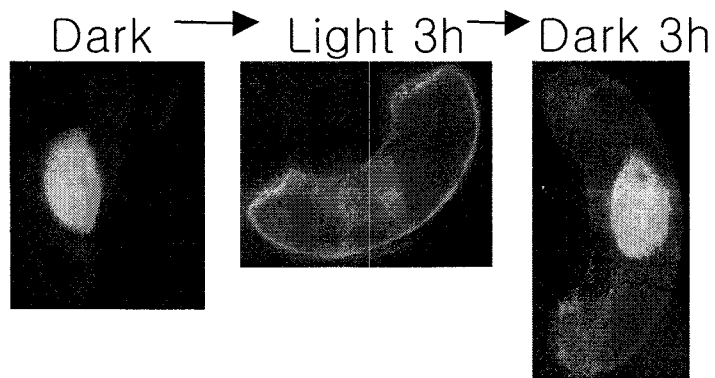


그림 18. 잠두에서 빛에 의한 GFP-RIC7의 위치 변화.



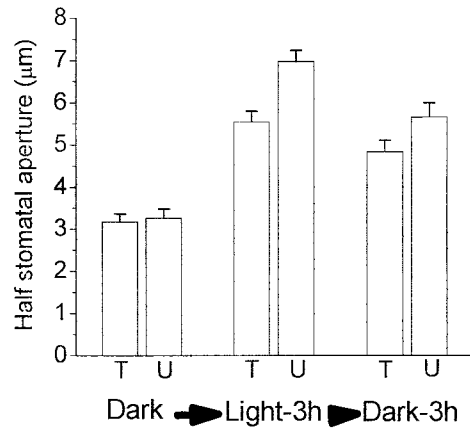
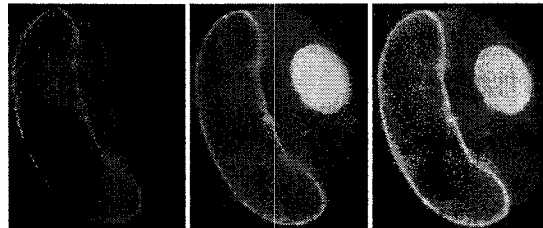


그림 19. GFP-RIC7의 과발현시킨 잠두의 공변세포에서 암 처리와 빛 처리에 의한 기공 운동 관찰. 잠두의 공변세포에 GFP-RIC7을 bombardment 기법을 이용하여 transient expression을 시킨 뒤, 18시간 뒤 기공크기를 측정하였다. 빛을 3시간 처리하여 bombardment된 세포와 되지 않은 세포의 half aperture를 측정하여 비교하였다. 여기에 다시 암처리를 3시간 하여 기공이 닫게 유도한 후 기공크기를 측정하였다.

A



B

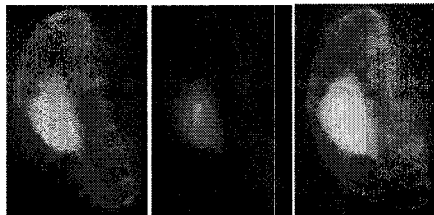


그림 20. 잠두의 공변세포에 Rop2와 RIC7을 같이 발현하여 위치 관찰  
 잠두의 공변세포에 GFP-RIC7과 RFP-CARop2 (A)/RFP-DNRop2 (B)를 bombardment를 이용하여 transient expression시켰다.