

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지식물 유전자원 기능의 신속검증 시스템 구축에 관한 연구” 과제의 위탁연구 “세포 기반 및 형질전환체를 이용한 극지식물 유전자원 기능 검증에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2018. 4.

(본과제) 총괄연구책임자 : 이 형 석

위탁연구기관명 : 덕성여자대학교

위탁연구책임자 : 이 호 림

위탁참여연구원 : 차 옥 경

위탁참여연구원 : 전 예 슬

위탁참여연구원 : 김 현 지



# 요 약 문

## I. 제목

세포 기반 및 형질전환체를 이용한 극지식물 유전자원 기능 검증

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

극심한 저온 및 건조와 같은 환경에서 서식하는 극지식물의 유용 유전자원 연구를 통해 다양한 스트레스에 대한 저항성 및 환경 적응 기작을 분자 수준에서 규명할 수 있을 것이다. 그러나 극지식물을 이용한 분자 수준에서의 연구 과정에는 아직 기술적 제약이 존재하기 때문에, 극지식물 유전자원에 대한 신속한 기능 검증을 위해서는 새로운 연구 접근방법과 전략이 개발되어야 할 필요가 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서 극지식물 원형질체 세포를 분리하는 방법을 확립하고, 이를 이용한 세포 기반 분석 방법을 제시하려 한다. 아울러 모델 식물 애기장대를 이용하여 극지식물 유전자들을 도입한 형질전환체를 제작하여 다양한 스트레스에 대한 저항성 기능 검증을 수행하려 한다.

## IV. 연구개발결과

남극개미자리, 남극좁새풀, 그린란드 고추냉이, 북극황새냉이, 그리고 북극점나도나물 등의 식물을 이용하여 반복적이고, 신뢰할만한 원형질체 세포 분리 방법 조건을 다양한 관련 인자를 조절하는 연구를 통해 확립하였다. 분리된 원형질체를 이용하여 세포 기반 유전자 발현 분석 방법을 개발하였고, 이를 이용하여 스트레스 관련 인자로 선발된 6종의 남극개미자리 유전자들의 단백질 발현과 세포 내 위치를 결정하였다. 그리고 6종의 유전자들이 도입된 애기장대 형질전환체를 제작하여 스트레스에 대한 기능 검증을 수행하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

극지식물 원형질체 세포를 이용한 분석 시스템은 다양한 극지식물 유전자들에 대한 단백질 수준에서의 상호작용, 세포 내 발현 위치, 표적 유전자 발현 등과 같은 유전자 기능 검증 과정에 활용할 수 있다. 또한, 애기장대를 이용한 형질전환체 분석 기법을 이용해 극지 유전자원의 개체 수준에서의 신속한 유전자 기능 검증에 활용할 수 있다.

# S U M M A R Y

## I. Title

Functional study of arctic/antarctic plant genes using cell-based assay and transgenic plants

## II. Purpose and Necessity of R&D

Plants that grow in the arctic/antarctic can inhabit and survive in an extremely stressful environment through inherently established unique genomic, physiological and developmental characteristics. Therefore, it is important to obtain biological evidence of the genes involved in the molecular and biochemical mechanisms of the adaptation in the arctic/antarctic environment. However, because the reproductive allocation to seed production of polar plants is very low in the natural site and in the *in vitro* incubation, a reliable genetic approach to decipher the biological functions of polar plant genes has not yet been applied, indicating that a novel approach is needed to study the function of polar plant genes.

## III. Contents and Extent of R&D

In this study, we optimized a method of mesophyll protoplast isolation from fully differentiated leaves of arctic/antarctic plants and evaluated a transient gene expression system using *Colobanthus quitensis* protoplasts as an alternative, powerful tool for emerging research needs on rapidly expanding genomics information from Antarctic plants. We also examined the biological functions of six genes involved in low temperature resistance through transgenic studies in *Arabidopsis thaliana*.

## IV. R&D Results

Using isolated protoplasts, we transfected *C. quitensis* genes and showed protein expression and the subcellular localization. We made several transgenic lines through the introduction of *C. quitensis* genes into *A. thaliana*. Some of transgenic lines showed stress resistance phenotype.

## V. Application Plans of R&D Results

A versatile cell system via DNA transfection established from arctic/antarctic plants will be useful for molecular and cellular studies, such as the subcellular localization of proteins, protein-protein interactions, transcriptional activities, signal transduction and gene silencing, to systematically determined functional characteristics of genes of interest.

# 목 차

제 1 장 서론 .....	6
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	8
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	9
제 1 절 극지식물 세포 기반 검증 시스템 구축 .....	9
제 2 절 애기장대 형질전환체 제작을 통한 극지식물 유전자원 기능 검증 .....	17
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	27
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	30
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	31
제 7 장 참고문헌 .....	32

## 제 1 장 서론

### 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

생태계 안에서의 다양한 생물 종들의 성장과 번식과정에는 빛, 온도 및 건조 등과 같은 환경적 스트레스가 매우 중요한 요인으로 작용한다. 실제 지구의 온도가 꾸준히 상승하고 있는 환경변화는 전 세계적인 작물 재배 지역의 축소를 일으킴으로써 식량 및 유용작물의 생산량을 감소시키고 때에 따라 멸종에 이르는 현상이 발생하고 있다. 그러므로 미래에 다가올 환경변화에 대응하기 위해서는 극심한 자연 환경에서 진화적으로 적응하며 생존하고 있는 극지 식물들의 유전자원을 연구함으로써 분자 수준에서의 환경 적응성 메커니즘을 규명하고 이를 유용작물 개발에 활용할 필요가 있다.

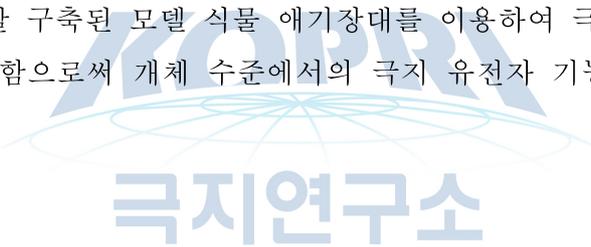
극심한 저온, 강한 자외선 그리고 낮은 일조량 등의 극한 환경에서 생존하는 극지 식물 중에서 남극의 식물상은 다른 곳보다 좀 더 특이한 점을 보인다. 다양한 식물상이 분포하고 있는 북극(Arctic)과 아남극(Sub-Antarctic) 지역과는 달리 남극(Antarctic) 지역에는 유일하게 남극좁새풀 (*Deschamsia antarctica*)과 남극개미자리(*Colobanthus quitensis*)라는 두 종의 현화식물만이 생존하고 있다 (Billing & Mooney 1968; Smith 2003; Parnikoza et al., 2011). 그러므로 두 종의 경우 진화적으로 남극의 극심한 환경에서 생존할 수 있었던 분자 수준에서의 환경 적응 메커니즘이 확립되어 지속해 왔을 것으로 판단된다 (Wullschleger et al., 2015).

현재 극지식물에 관한 연구는 생태학적, 생리학적 연구가 주를 이루고 있고 분자 수준에서의 접근방법을 이용한 연구가 활발히 시도되는 시작단계이다. 문제는 분자 수준에서의 연구를 위해 필요한 유전자 기능 검증을 위한 연구방법 상에 제한이 있다는 것이다. 기본적으로 유전자 기능 연구를 위해서는 유전학적 연구 접근방법이 사용된다. 이를 위해서는 식물 세대에 걸친 연구가 가능해야 하는데, 극지 식물의 경우 자연계에서나 배양기 내에서 종자 형성을 위한 에너지 분배(allocation)가 저해되어 있어 (Convey 1996), 종자 생산 자체가 용이하지 않은 점이 있다. 그러므로 이를 바탕으로 하는 유전학적 연구 접근방법에 한계점을 가지고 있어 보인다. 또한, 아직 극지식물을 이용한 조직배양 방법이 확립되어 있지 않아서 형질전환체 제작을 통한 유전자 기능 검증 과정에 어려움이 있는 상황이다.

최근 들어 next generation sequencing(NGS) 실험의 수월성 때문에 극지식물을

포함한 다양한 식물 종으로부터 많은 양의 유전체 정보가 축적되고 있다. 이 과정에서 새롭게 발견된 다량의 유전자원 연구를 통한 극지식물의 분자 수준에서의 환경 적응성 연구를 위해서는 유전자에 대한 신속하고 다각적인 기능 검증이 필요하다고 판단된다. 식물체 수준에서의 유전자 기능 검증을 위해서, 현재 zinc-finger nucleases, transcription activator-like effector nuclease (TALENs), 그리고 CRISPR-Cas9과 같은 발전된 genome editing 기술이 적용되고 있다. 그러나 이를 위해서는 위에서 언급했듯이 기본적인 유전학적 연구 접근방법이 구축되어 있거나 혹은 조직배양 체계가 확립되어 있어야 한다. 그러므로 현재 상황에서 극지식물로부터 파생되는 유용 유전자원의 기능 분석을 위해서는 새로운 연구 접근방법이 개발될 필요가 있다고 사료된다.

이에 본 연구에서는 남극개미자리 식물을 중심으로 극지식물의 원형질체 세포 (mesophyll protoplast)를 분리하여 극지 유전자를 도입하여 그 기능을 신속하게 분석할 수 있는 세포 기반 유전자 발현 시스템을 구축하려 한다. 또한, 유전학적 연구 접근방법이 잘 구축된 모델 식물 애기장대를 이용하여 극지 유전자를 도입한 형질전환체를 제작함으로써 개체 수준에서의 극지 유전자 기능 검증 시스템을 구축하고자 한다.



ARI  
극지연구소

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### □ Next-generation sequencing을 이용한 극지식물 유전체 정보 구축

국내 극지연구소를 중심으로 다양한 극지식물들에 대한 다양한 genomics 연구가 진행되고 있음. 이 중 남극개미자리 식물을 이용하여 저온 스트레스에 대해 반응하는 전사체 지도가 RNA seq. 연구방법을 통해 구축되었음. 이 결과를 이용하여 남극개미자리 식물 유전자원 중에서 저온 스트레스에 대한 저항성을 보이는 유전자들을 선별하였고, 본 연구를 통해 기능 검증을 수행하려고 함.

### □ 원형질체 세포를 이용한 세포 기반 연구

다양한 식물 종의 유전자원 기능 검증 과정에서의 제한적 요인은 비단 극지식물에 국한되어 있는 것이 아님. 모델 식물 중 이외에 기초적인 유전학적 연구 접근방법이 구축되지 않은 다양한 작물들 역시 유전자 기능 검증 과정에서 어려운 점이 존재함. 특히 조직배양 체계마저도 구축되지 않았을 때는 유전자 기능 검증이 실질적으로 불가능하다고 판단됨. 이에 식물 원형질체 세포를 이용하여 유전자 도입을 통한 세포 기반 연구방법이 이용되고 있음.

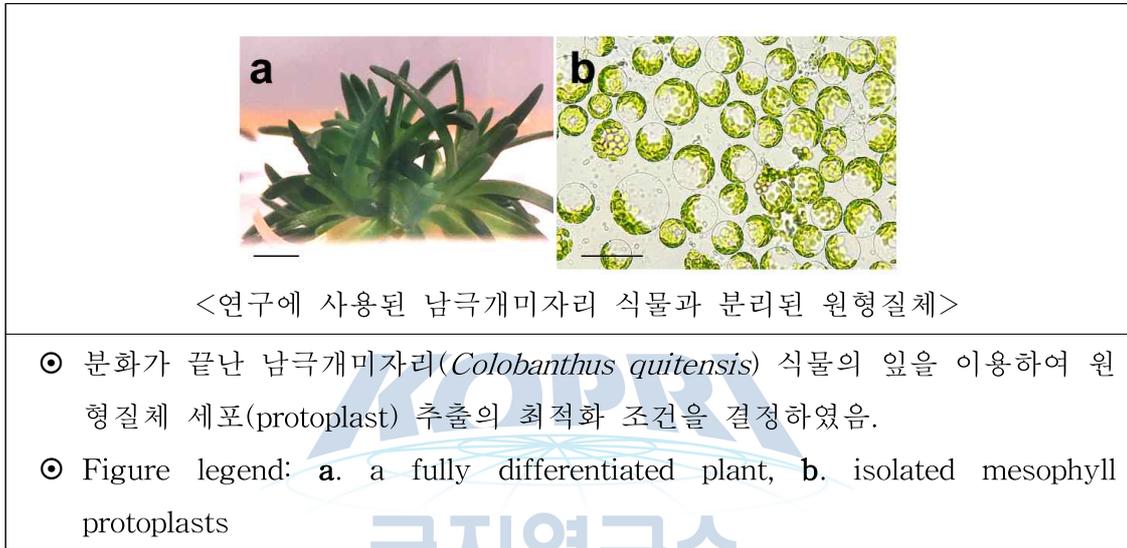
토마토 뿌리 정단에서 최초로 원형질체 세포가 분리된 이래로 (Cocking 1960) 원형질체 세포를 이용한 유전자 발현 분석 시스템은 애기장대 및 옥수수과 같은 모델 식물들의 잎을 이용한 추출방법이 구축되어왔음 (Sheen 2001; Yoo et al., 2007). 이러한 원형질체 세포(mesophyll protoplast)에 DNA를 도입함으로써 유전자 발현을 통한, 단백질-단백질 상호작용, 단백질의 세포 내 발현 위치, 신호전달 그리고 전사 활성과 같은 분석을 할 수 있음. 이러한 세포 기반 유전자 분석 방법을 이용하여 최근 유전학적 연구 접근방법이 잘 적용되지 않는 포플러(*Populus euphratica*), 당근(*Daucus carota*), 오일팜(*Elaeis guineensis*) 그리고 건초(*Panicum virgatum*) 등과 같은 다양한 식물 종들로부터 원형질체 세포를 분리하여 유전자 발현 분석을 하는 방법 등이 개발되고 있음 (Burriss et al., 2016). 그러므로 신속한 유전자 기능 검증을 위해 새로운 접근방법이 요구되는 극지식물에서 세포 기반 유전자 분석 방법을 구축하려 함.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

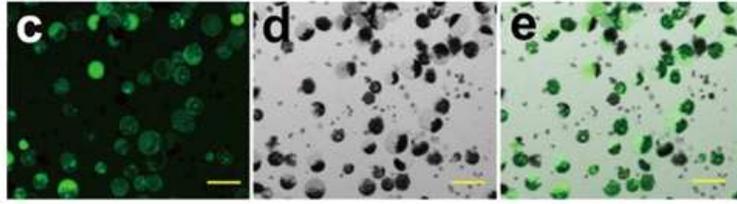
### ■ 제 1 절 극지식물 세포 기반 검증 시스템 구축

- 세부목표 1\_극지식물 세포에 최적화된 추출방법 확립

#### 결과 1



## 결과 2



<극개미자리 원형질체 세포의 생존력 검사>

- ⊙ 세포 추출 조건을 확립한 뒤, 이러한 방법으로부터 분리된 세포의 생존력 (viability)을 fluorescein diacetate staining을 통해 결정하였음. 약 90%의 생존력을 보였음.
- ⊙ Figure legend: **c.** fluorescein diacetate staining, **d.** bright field, **e.** merged images



### 결과 3

**Table I.** Effects of important parameters such as enzyme cocktails, mannitol and pH in the protoplast yield isolated from leaves of *Colobanthus quitensis*. SD means standard deviation ( $n = 7-9$ ) and \*\*\* indicates significant difference (one-way ANOVA test,  $p < 0.001$ ). ns, not significant.

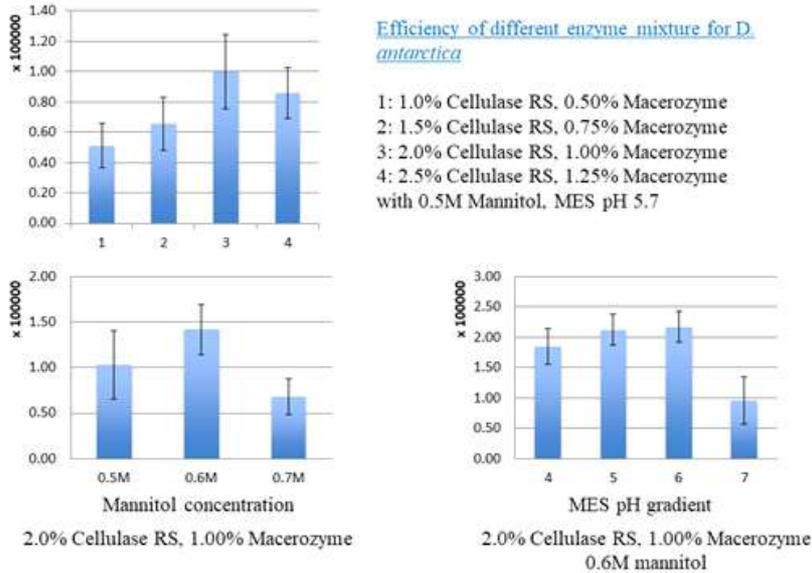
No	Cellulase	Macerozyme	Viscozyme	Mannitol	pH	Protoplast yield	$p$
	RS (%)	R10 (%)	(%)	(M)		(mean $\pm$ SD/gFW)	
1	1.5	0.3	–	0.5	5.7	$3.6 \pm 1.9 \times 10^3$	ns
2	2.0	0.6	–	0.5	5.7	$7.7 \pm 2.9 \times 10^3$	ns
3	3.0	1.2	–	0.5	5.7	$1.2 \pm 0.4 \times 10^4$	***
4	3.0	1.2	1.5	0.5	5.7	$5.8 \pm 0.8 \times 10^5$	***
5	3.0	1.2	1.5	0.4	5.7	$4.6 \pm 0.3 \times 10^5$	***
6	3.0	1.2	1.5	0.6	5.7	$3.2 \pm 0.5 \times 10^5$	***
7	3.0	1.2	1.5	0.7	5.7	$2.6 \pm 0.2 \times 10^5$	***
8	3.0	1.2	1.5	0.5	4.0	$8.7 \pm 0.5 \times 10^5$	***
9	3.0	1.2	1.5	0.5	5.0	$5.2 \pm 0.6 \times 10^5$	***
10	3.0	1.2	1.5	0.5	6.0	$4.2 \pm 0.3 \times 10^5$	***
11	3.0	1.2	1.5	0.5	7.0	$1.7 \pm 0.2 \times 10^5$	***

<다양한 조건 변화에 따른 남극개미자리 원형질체 세포 분리 수득률>

- ⊙ 세포 분리의 중요 요인에 해당하는 enzyme cocktail, mannitol, pH 등의 여러 조건을 다양하게 적용하여 최적화된 추출 방법상의 조건을 결정하고 안정적인 수득률(yield)을 확보하였음.
- ⊙ Enzyme cocktail로 기존의 잘 알려져 있던 cellulase RS, macerozyme R10 이외에 새롭게 Viscozyme을 추가로 이용하여  $5.8 \pm 0.8 \times 10^5$  protoplasts/gFW (gram of fresh weight) 수준의 수득률을 확보하였음 (Table 1, No 1—4).
- ⊙ 이후 추가적으로 osmotic stabilizer인 mannitol의 여러 농도를 조사하여 그 중에서 0.5 M 조건에서 (Table 1, No 4—7) 그리고 acidic pH 4.0 조건에서 (Table 1, No 8—11) 가장 높은  $8.7 \pm 0.5 \times 10^5$  protoplasts/gFW 수준의 수득률을 확보할 수 있었음 (Table 1, No 8).

결과 4

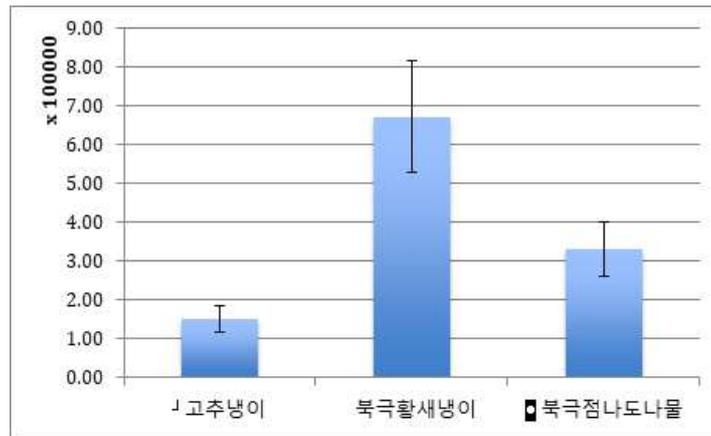
Conditions in *Deschampsia antarctica* (남극좁새풀)



<다양한 조건 변화에 따른 남극좁새풀 원형질체 세포 분리 수득률>

- ⊙ 남극좁새풀(*Deschampsia antarctica*)은 단자엽식물이므로 모델 식물인 벼 (rice) 원형질체 분리 방법 (Zhang et al., 2011)을 기본으로 하여 실험을 수행하였음.
- ⊙ Enzyme cocktail의 구성 성분에 해당하는 cellulase RS, macerozyme R10, mannitol, 그리고 MES pH gradient의 다양한 조건을 적용하여 원형질체 세포를 분리하였음.
- ⊙ 최종적인 결과로, 2.0% Cellulase RS, 1.0% Macerozyme R10, 0.6M Mannitol, 10mM MES pH 6.0의 조건에서 6시간 동안 식물 조직 절편을 처리했을 때, 약  $2 \times 10^5$  protoplasts/ gFW 수준의 수득률을 확보할 수 있었음.
- ⊙ 가장 중요한 팁은 식물 자르고 enzyme cocktail solution에 넣었을 때, 떠 있는 식물 조직 절편들이 solution 속에 완벽하게 잠기게 loop 등을 이용하여 가라앉히는 것임. 이후 1시간에 한 번씩 끝을 자른 pipette tip으로 10여 차례 pipetting을 조심스럽게 해주면 조직으로부터 원형질체 세포의 분리를 도울 수 있음.

## 결과 5

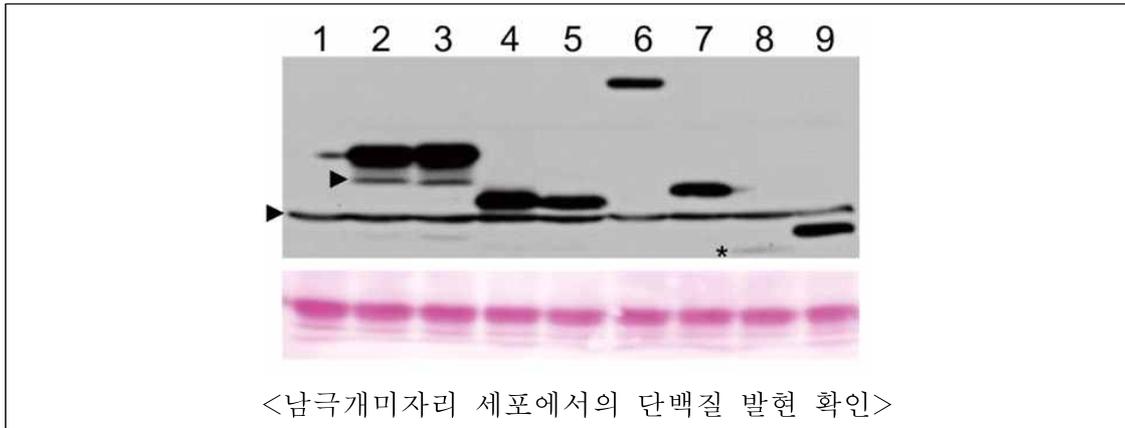


<Universal method를 이용한 그린란드 고추냉이, 북극황새냉이, 북극점나도나물 식물에서의 원형질체 세포 분리 수득률>

- ⊙ 남극현화식물 이외에 그린란드 고추냉이, 북극황새냉이, 북극점나도나물을 대상으로 원형질체 세포 분리를 시도하였음.
- ⊙ 상기 식물들은 모두 쌍자엽이기 때문에 모델 식물인 애기장대(*Arabidopsis*) 원형질체 분리 방법 (Yoo et al., 2007)을 기본으로 하여 실험을 수행하였음.
- ⊙ 그린란드 고추냉이는 입도 크고 두껍지만 부드러워 기존의 1.5% Cellulase R10, 0.3% Macerozyme R10, 0.4 M Mannitol 조건에서 쉽게 세포벽이 녹고 추출 시간도 단축되나 분리된 원형질체 세포가 상대적으로 크기 때문에 상기 농도의 enzyme과 삼투압이 적합하지 않아 세포가 깨지는 경우가 많이 관찰되었음.
- ⊙ 북극황새냉이 그리고 북극점나도나물의 경우에는 위와 같은 enzyme cocktail 조건에서 세포벽이 녹지 않아 분리된 원형질체 세포가 완벽한 둥근 형태를 보이지 않았음.
- ⊙ 그래서 이런 문제를 해결하기 위해 추가적인 enzyme 으로 Viscozyme(Sigma, Catalog No. V2010)을 사용하여 극지식물에 적용되는 일반적인 추출방법을 구축하였음.
- ⊙ Universal method for polar plants: 1.0% Cellulose R10, 0.2% Macerozyme R10, 1.0% Viscozyme, 0.5M Mannitol, 20 mM MES pH 5.7, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM β - mercaptoethanol, 0.1% BSA
- ⊙ 위 조건을 이용하여 세 종의 식물에서 2~4시간 정도의 enzyme cocktail 처리를 통하여 1.5~6.7 x 10<sup>5</sup> protoplasts/ gFW 수준의 수득률을 확보할 수 있었음.

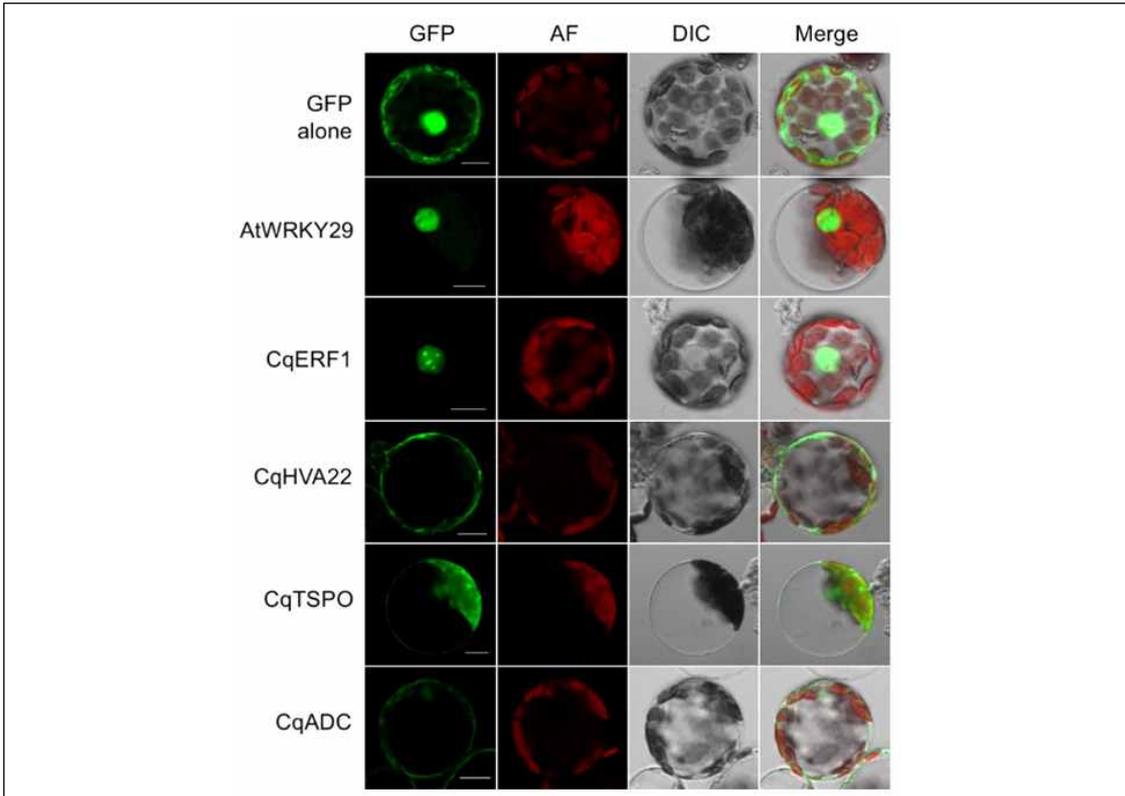
□ 세부목표 2\_DNA 도입 벡터 및 조건 확립

결과 6



- ⊙ 남극개미자리 원형질체 세포를 이용하여 PEG-CaCl<sub>2</sub>-mediated DNA transfection을 수행하였음.
- ⊙ DNA transfection을 위한 고순도의 plasmid DNA는 CsCl-gradient ultracentrifuge를 이용하여 분리하였음.
- ⊙ DNA transfection 후, 상온상태에서 6시간 incubation 시킨 뒤, 원형질체 세포들을 수집하였음.
- ⊙ 도입된 유전자의 단백질 발현은 western blot analysis를 수행하였음. 이때, 유전자들은 HA epitope으로 tagging되었기 때문에 anti-HA-antibody로 발현된 단백질 양을 확인하였음.
- ⊙ Lane 2, 3과 lane 4, 5번은 각각 variant이기는 하지만 같은 *CqMKK6*와 *CqNPK1* 유전자를 transfection 시킨 것임. 이 결과는 reproducible, reliable 한 세포 기반 분석 방법임을 보여주고 있음.
- ⊙ 다양한 유전자들에 따라 다양한 단백질 stability를 보여주고 있으므로, 단백질량이 기반이 되는 다양한 생화학적 분석이 가능할 것으로 보임.
- ⊙ Figure legend: lane 1: Control; lane 2: Cq\_MKK6-HA; lane 3: Cq\_MKK6a-HA; lane 4: Cq\_NPK1-KD; lane 5: Cq\_NPK1-KM; lane 6: Cq\_ADC; lane 7: Cq\_ERF1; lane 8: Cq\_HVA22; lane 9: Cq\_TSPO

## 결과 7



<남극개미자리 세포에서의 단백질 subcellular localization 결정>

- ⊙ 세포 기반 분석에 있어서 가장 대표적인 연구방법은 발현 단백질의 subcellular localization을 결정하는 것임.
- ⊙ 다양한 *Colobanthus* orthologous 유전자들을 GFP와 fusion 시켜서 남극개미자리 원형질체 세포에서 발현시켰음.
- ⊙ Control로써 GFP alone은 세포막, 세포질 그리고 핵에서의 발현 위치를 보였고, 애기장대 전사인자인 AtWRKY29은 핵에서의 뚜렷한 발현 위치를 볼 수 있었음 (Asai et al., 2002).
- ⊙ 단백질들은 *35S-CaMV* 프로모터를 이용하여 발현시킨 것이기 때문에 (Chiu et al., 1996; Yoo et al., 2007), 남극개미자리 세포에서 모델 식물에서 일반적으로 통용되는 다양한 발현 벡터의 사용이 가능할 것으로 보임.
- ⊙ 남극개미자리 유전자인 *CqERF1*은 핵에서 발현되며 전사인자로 작동하는 것으로 보임. 이때, 핵 안에서 작은 speckle들이 보이는데, 이는 핵 안에서도 splicing regulator들이 위치한 특정 구획에서 작동할 가능성을 보여주고 있음 (Reddy et al., 2012).
- ⊙ 다른 남극개미자리 orthologous 유전자들인 *CqHVA22* (Guo & Ho, 2008),

*CqTSPO* (Hachez et al., 2014) 그리고 *CqADC* (Fu et al., 2017)의 경우에는 애기장대 유전자들의 기존 보고와 같이 세포막 혹은 세포질에서 발현되는 양상을 보여주고 있음. 애기장대에서 HVA22와 TSPO는 세포질 내 골지와 같은 소기관에서 작동하는 것으로 알려져 있음. 필요에 따라 세포내 소기관 marker를 이용한 정확한 위치 파악이 필요해 보임. ADC의 경우는 최근에 애기장대 세포의 세포질과 엽록체에 위치하는 것으로 보고되었으나, 남극개미자리 세포에서는 주로 세포질에 위치하는 것으로 보임.

◎



## ■ 제 2 절 애기장대 형질전환체 제작을 통한 극지식물 유전자원 기능 검증

□ 세부목표 1\_유전체 분석을 통한 스트레스 내성에 관련된 유전자 선발

### 결과 8

Name	Arabidopsis (AGI)	Contig No. in <i>C. quitensis</i>	Description
<i>CqNPK</i>	ANP1 and ANP2, Nicotiana protein kinase 1 (NPK1)	Contig_19538	
<i>CqMKK6</i>	At5g56580	Contig_46660	
<i>CqTSPO</i>	Tryptophan-rich sensory protein (At2g47770)	Contig_23283	benzodiazepine receptor-related family protein
<i>CqHVA22</i>	AtHVA22E (At5g50720)	Contig_30198	HVA22 d isoform 3
<i>CqERF1</i>	AtERF-1 encodes a member of the ERF subfamily B-3 of ERF/AP2 TF (At4g17500)	Contig_14494	af245119_1ap2-related transcription factor
<i>CqADC</i>	Arginine decarboxylase (AtADC) (At4g34710)	Contig_1381	

<선발된 6종의 남극개미자리 유전자들>

- ⊙ 애기장대에서 다양한 스트레스 신호전달의 중추 역할을 담당하는 MAPK 신호인자에 대해 남극개미자리 orthologous 유전자들을 선발하여 그 기능을 검증하려고 함 (Kovtun et al., 2000; Xie et al., 2012).
- ⊙ *CqNPK1* 유전자는 *MAP Kinase Kinase Kinase(MKMKK)*로서 애기장대의 *ANP1*과 *ANP2* orthologous 유전자임. 애기장대 *ANP1/2*는 담배의 *NPK1*에 해당함으로써 담배 *NPK1*과 유사한 orthologous 유전자를 남극개미자리 transcriptome data로부터 확보함 (Contig\_19538). *NPK1*과 같은 *MKMKK* 단백질은 autoinhibitory activity가 있어서 wild-type 단백질은 상태는 신호가 없는 조건에서는 활성이 없음. 따라서 활성이 있는 형질전환체를 만들기 위해 autoinhibitory activity를 제거한 *CqNPK1*의 kinase domain만을 클로닝하여 이용하였음 (*CqNPK1-KD*). 이에 대한 negative control로 kinase activity가 제거된 inactive kinase domain을 가진 *NPK1-KM* 역시 제작되었음.
- ⊙ *CqMKK6* 유전자는 *MAP Kinase Kinase(MKK)*로서 스트레스와 밀접하게 관련된 애기장대 *MKK4*에 해당하는 orthologous 유전자를 최초에는 분리하려 하였음. 그러나 이와 가장 유사한 남극개미자리 orthologous *Cq\_Contig\_3973*가 full length의 유전자 서열 정보를 가지고 있지 못해 다음으로 유사한 *Cq\_Contig\_46660*을 선택하여 클로닝하였음. 그러나, 이

contig\_46660은 애기장대 MKKs들과의 phylogenetic tree 분석 과정에서 MKK4가 아닌 MKK6와 약 82% sequence identity를 보일만큼 높은 유사성을 보여 CqMKK6로 명명하였음. 형질전환체 기능 분석을 위해 wild-type version의 CqMKK6와 active form인 CqMKK6a로 클로닝 하였음.

- ◎ 나머지 CqTSPO, CqHVA22, CqERF1, CqADC는 모두 극지연구소의 남극 개미자리 transcriptome data에서 저온 스트레스에 의해 전사체 발현이 증가하는 중요 유전자들을 선발하여 클로닝 하였음.



## 결과 9

Constructs	Cloning	Expression test in protoplasts
HBT-CqNPK1-KD-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqNPK1-KD-GFP	Cloning 중	
HBT-CqNPK1-KM-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqMKK6-WT-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqMKK6-WT-GFP	Cloning 중	
HBT-CqMKK6a-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqTSPO-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqTSPO-GFP	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-Pp3C7-HA	Cloning 중	
HBT-Pp3C7-GFP	Cloning 중	
HBT-CqAP2-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqAP2-GFP	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqHVA22-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqHVA22-GFP	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqADC-HA	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)
HBT-CqADC-GFP	Cloning 완료	Confirmed in protoplasts (A, C)

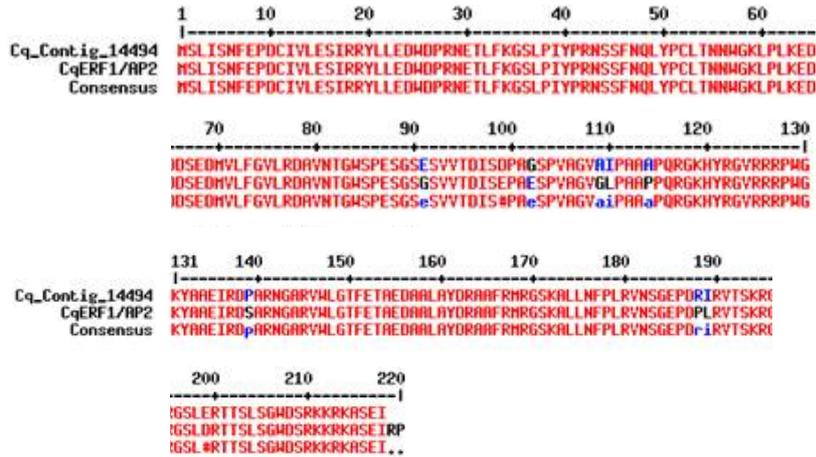
A: *Arabidopsis thaliana*, C: *Colobanthus quitensis*

<남극개미자리 유전자들의 transient expression vector로의 클로닝 현황>

- ⊙ 선발된 6종의 유전자들을 원형질체 세포에서 발현시키기 위해 모델 식물 애기장대에서 transient expression system으로 사용되는 pHBT vector에 클로닝 하였음 (Yoo et al., 2007).

극지연구소

결과 10

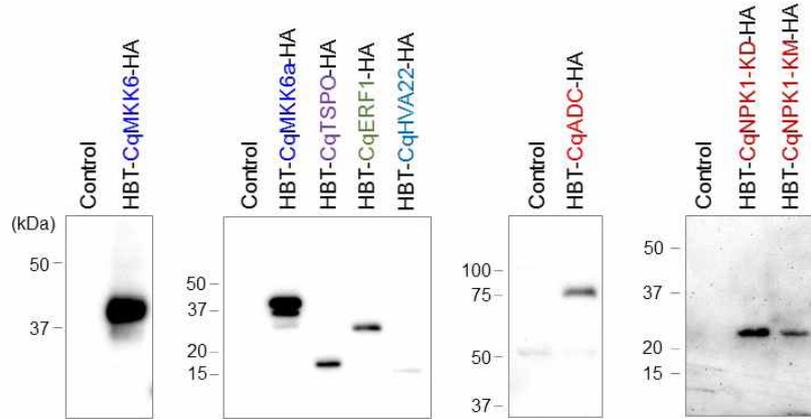


<남극개미자리 Transcriptome data와 실제 클로닝한 CqERF1 유전자 사이의  
염기서열 비교>

- ⊙ 이때, *CqERF1*과 *CqADC* 유전자들은 극지연구소의 transcriptome data와는 달리 염기서열에 변화가 있었음. 따라서 이 결과를 통해 1) transcriptome data의 정확성을 높일 필요가 있고, 2) 실제 남극개미자리 genome에 유사한 다른 homologous gene이 있을 가능성이 있음을 알 수 있었음.

극지연구소

## 결과 11



<남극개미자리 유전자들의 단백질 발현을 애기장대 세포에서 확인>

- ⊙ 선발된 유전자 모두는 원형질체 세포에서 발현시킬 수 있는 transient expression vector에 클로닝하여 단백질 발현을 확인하였음.
- ⊙ 오랜 시간이 소요되는 형질전환체 제작에 앞서 이용될 construct의 단백질 발현 여부를 애기장대 원형질체 세포를 이용하여 선제적으로 확인하였음.



□ 세부목표 2\_선발된 유전자에 대한 애기장대 형질전환체 제작 및 선별

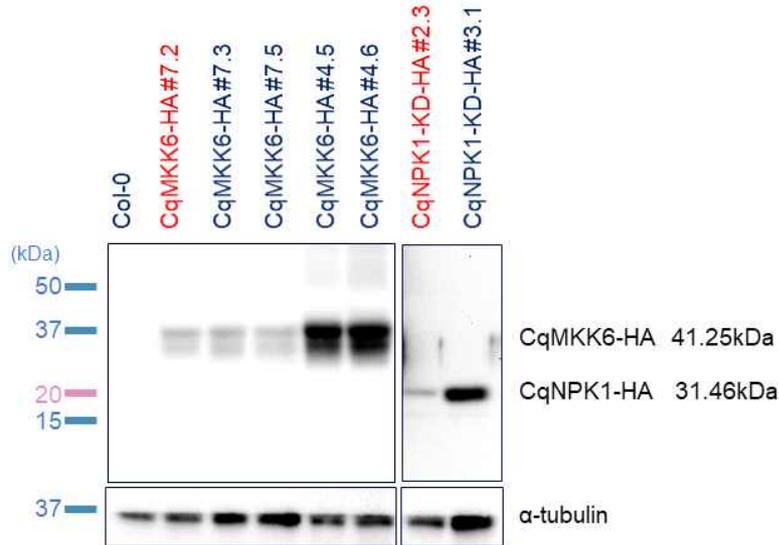
결과 12

Constructs	Cloning	T0 pools	T1 plants	T2 plants	Stress Test
pCB302-CqNPK1-KD-HA	Cloning 완료	0	10 lines	4 lines	진행중
pCB302-CqNPK1-KD-GFP	Cloning 완료	0	5 lines	3 lines	진행중
pCB302-CqNPK1-KM-HA	Cloning 완료				
pCB302-CqNPK1-KM-GFP	Cloning 완료	0	12 lines		
pCB302-CqMKK6-HA	Cloning 완료	0	21 lines	3 lines	진행중
pCB302-CqMKK6-GFP	Cloning 완료	0	10 lines		
pCB302-CqMKK6a-HA	Cloning 완료	0	1 line	1 line	진행중
pCB302-CqMKK6a-GFP	Cloning 완료	0	11 lines		
pCB302-TSPO-HA	Cloning 완료				
pCB302-TSPO-GFP	Cloning 완료	0	10 lines		
pCB302-Pp3C7-HA	Cloning 중				
pCB302-Pp3C7-GFP	Cloning 중				
pCB302-CqAP2-HA	Cloning 중				
pCB302-CqAP2-GFP	Cloning 완료	0			
pCB302-CqHVA22-like-HA	Cloning 중				
pCB302-CqHVA22-like-GFP	Cloning 완료	0			
pCB302-CqADC-HA	Cloning 완료				
pCB302-CqADC-GFP	Cloning 완료				

<남극개미자리 유전자들의 형질전환체 제작 현황>

- ⊙ 애기장대 및 남극개미자리 원형질체 세포에서 단백질 발현 및 subcellular localization 등이 확인된 6종 유전자에 대해서 애기장대에 형질전환을 시킬 수 있는 pCB302 binary vector로 클로닝 하였음.
- ⊙ 이때, NPK1과 MKK6는 각각 기능분석을 위한 variant들을 추가하였고, tag 으로 HA와 GFP를 사용하여, 유전자는 6종이지만, 실제 진행하고 있는 형질 전환체는 모두 16종임.
- ⊙ 위 표에서 볼 수 있듯이 6종 유전자에 대한 T0 seed pools들은 모두 확보 하였음.
- ⊙ 현재 *CqNPK1*과 *CqMKK6*에 대해서는 homozygous line이 선발되었고, *CqTSPO*는 T3 lines들에서 homozygote를 선발하는 중임.
- ⊙ *CqHVA22*, *CqADC*, 그리고 *CqERF1*은 T2 selection 중에 있음.

결과 13

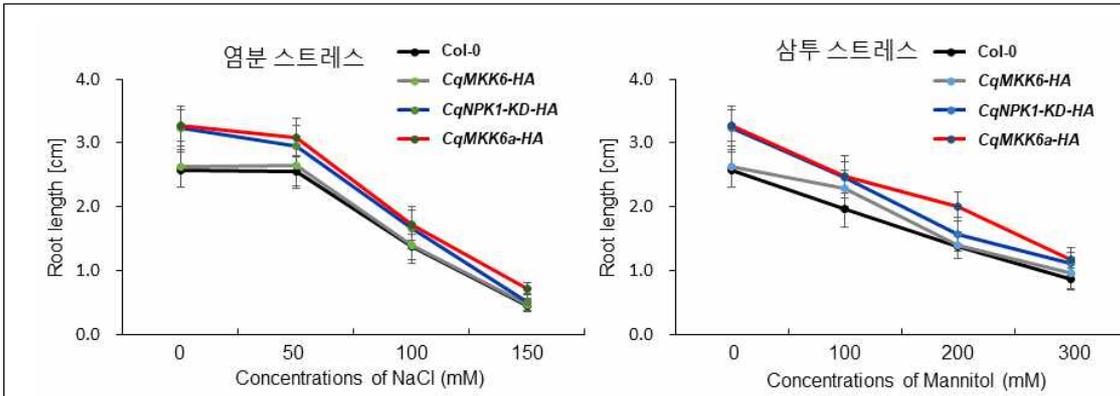


<Western blot analysis를 이용한 형질전환체 내 단백질 발현 검증>

- ⊙ 이미 애기장대 및 남극개미자리 원형질체 세포 수준에서 6종 유전자의 단백질 발현 유무를 확인하였으나, 형질전환체 내에서의 단백질 발현 역시 western blot analysis를 통하여 확인하였음.
- ⊙ 위의 결과는 예를 들어, *CqMKK6*와 *CqNPK1* 유전자의 independent transgenic lines들에서의 단백질 발현 차이를 보여주고 있음.
- ⊙ 형질전환체 선발에 있어서, 높은 단백질 발현을 보이며 T-DNA 도입과정에서 single copy로 삽입되어 T2 segregation 과정에서 제초제 Basta에 대한 3:1 ratio를 보이는 line들을 위주로 선발하였음.

□ 세부목표 3\_형질전환체를 이용한 표현형 분석

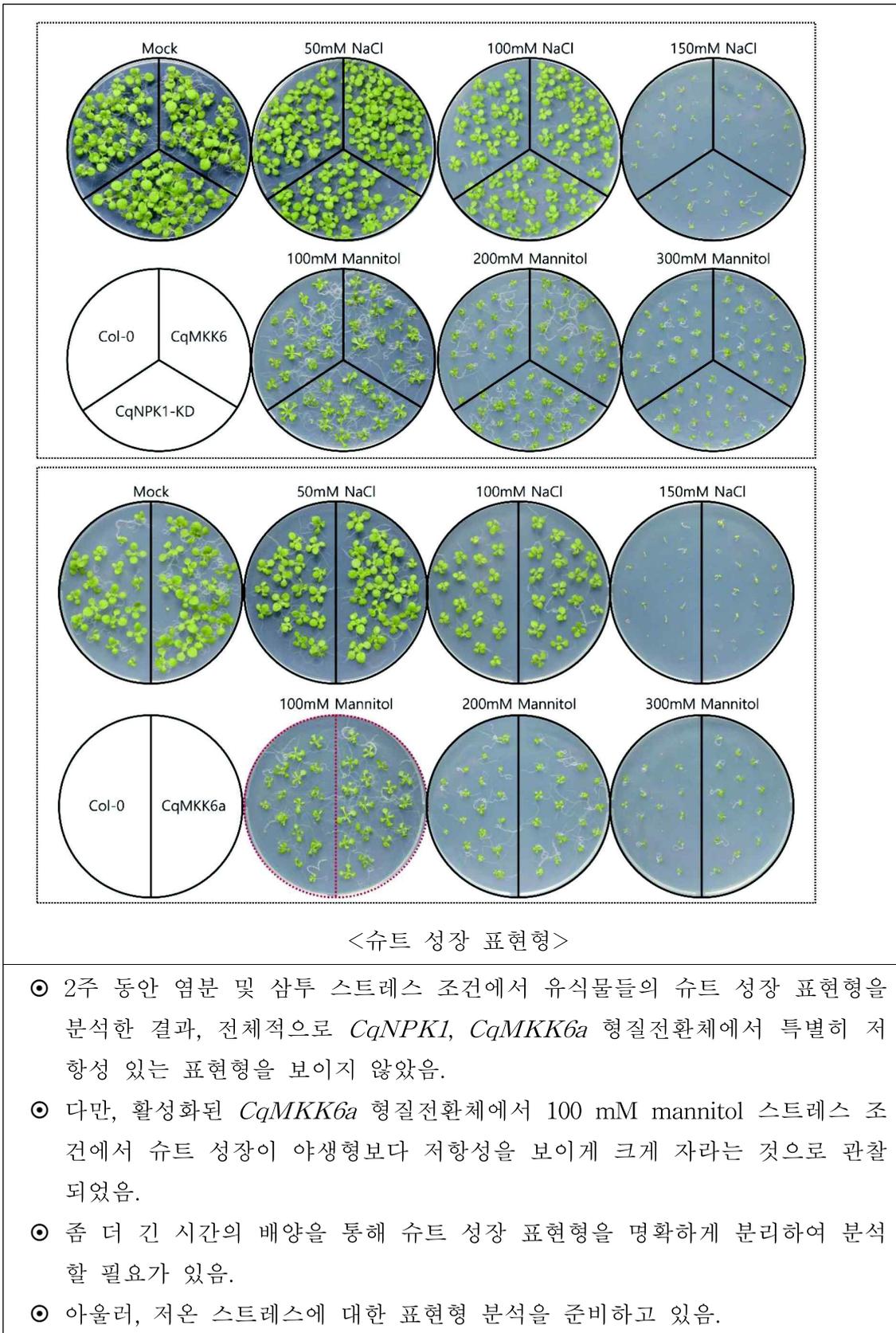
결과 14



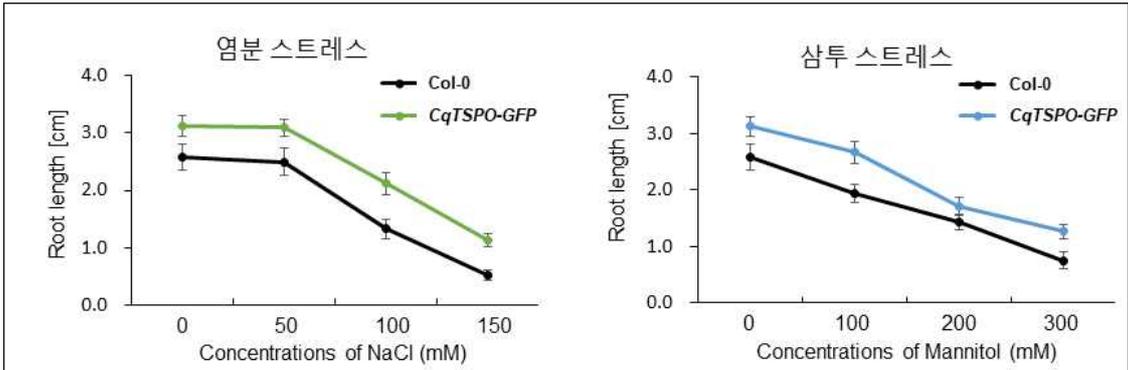
<염분 및 삼투 스트레스에 대한 *CqNPK1-KD*, *CqMKK6*, 그리고 *CqMKK6a* 형질전환체의 뿌리 성장 표현형>

- 우선 염분 및 삼투에 대한 스트레스 반응 표현형을 비교 분석하였음.
- 기본적으로 *CqNPK1*과 *CqMKK6a* 형질전환체의 뿌리 발달이 야생형에 비해 증가해 있음을 볼 수 있었음. 이러한 표현형이 transgenic line 상의 효과일 수도 있겠으나, 다른 *CqMKK6*의 경우는 야생형과 비슷한 뿌리 발달을 보이는 것으로 보아, 이러한 스트레스 조건이 없는 수준에서의 뿌리 발달 향상은 *CqNPK1*과 *CqMKK6* 유전자 기능에 의한 변화라고 볼 수 있음.
- *CqMKK6a*는 *CqMKK6*의 활성화된 형태로 *CqMKK6*는 *CqMKK6a*의 음성적 대조구라 볼 수 있음.
- *CqNPK1* 역시 활성화된 형태의 *CqNPK1-KD* 상태로 제작된 형질전환체이기 때문에, 이미 NPK1 유전자 기능이 활성화되어 있는 상태로 볼 수 있음.
- 결과적으로 염분 스트레스의 경우, 50 mM NaCl의 조건을 포함해서 전반적으로 스트레스에 대해 저항성이 있는 표현형을 보이고 있음.
- 삼투 스트레스에 대한 표현형은 mannitol 처리를 통하여 분석하였음.
- 이 역시 *CqNPK1*과 *CqMKK6a* 형질전환체의 스트레스가 없는 조건에서 향상되었던 뿌리 발달 표현형이 삼투 스트레스 전반에 걸쳐 야생형 및 *CqMKK6* 형질전환체에 비해 저항성 있는 표현형을 보여주고 있음. 특히 *CqMKK6a*의 경우, 전반적으로 저항성있는 표현형을 보이는 반면, *CqNPK1*의 경우는 100 mM mannitol 스트레스 조건에서 가장 명확한 저항성을 보이고 이상의 농도에서는 그 효과가 감소하는 것을 볼 수 있었음.
- 결론적으로, *CqNPK1*과 *CqMKK6* 유전자의 역할은 다양한 스트레스에 대한 저항성을 뿌리 발달 과정에서 보이고 있음.

결과 15



## 결과 16



<염분 및 삼투 스트레스에 대한 *CqTSPO* 형질전환체의 뿌리 성장 표현형>

- ⊙ 남극개미자리 전사체 분석과정에서, 저온 스트레스 저항성 유전자로 선발된 *CqTSPO*의 경우, 염분과 삼투 스트레스에 대한 뿌리 발달 저항성 표현형을 보여주었음.
- ⊙ 다만, *CqTSPO*의 경우에는 아직 homozygous line이 선발된 상태가 아니라서, T2 generation pool로 표현형 분석을 수행하였음. 그러나, 저항성 표현형을 보이는 ratio가 basta 저항성 ratio와 유사한 것으로 보아 *CqTSPO* 유전자 기능에 의한 것으로 예측할 수 있음. 이는 *CqTSPO* 유전자 기능이 저온 이외에도 다양한 스트레스 저항성 효과가 있음을 보여주고 있음.
- ⊙ 이후 *CqHVA22*, *CqADC*, *CqERF1* 형질전환체에 대해서 염분 및 삼투 스트레스에 대한 뿌리 및 슈트 성장 표현형을 추가적으로 분석할 예정임.
- ⊙ 아울러 모든 형질전환체에 대한 저온 스트레스 저항성 표현형을 분석할 예정임.

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지식물 세포 기반 검증 시스템 구축	1-1 세포 추출 조건 및 방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊙ 남극개미자리 원형질체 세포 추출 (protoplast isolation) 최적화를 위해, Celluase RS, Macerozyme, 그리고 Viscozyme과 같은 적절한 digestive enzyme cocktail 농도 및 비율 조건을 결정함.</li> <li>⊙ Cellulase enzyme의 optimal pH를 결정함.</li> <li>⊙ 원형질체 세포 추출 과정의 중요 parameter에 해당하는 osmotic stabilizer mannitol의 적절한 농도를 결정함.</li> <li>⊙ 남극개미자리 원형질체 추출방법 확립을 바탕으로, 남극곰새풀 및 북극식물들의 원형질체 분리 조건을 확립하였음.</li> </ul>	100%
	1-2 DNA 도입 벡터 및 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊙ 남극개미자리 잎 조직으로부터 분리한 원형질체 세포를 이용하여 <i>35S promoter</i>를 이용한 다양한 남극개미자리 유전자를 <b>PEG-CaCl<sub>2</sub>-mediated DNA transfection</b> 방법을 확립함.</li> <li>⊙ 도입된 유전자들의 단백질 발현을 western blot analysis를 통하여 확인함.</li> <li>⊙ 발현된 단백질들의 세포 내 위치를 GFP fusion을 통하여 결정함.</li> </ul>	100%
2. 애기장대 형질 전환체 제작을 통한 극지식물 유전자원	2-1 유전체 분석을 통한 스트레스 내성에 관련된 유전자	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊙ 기존의 보고를 통하여 스트레스 반응 및 저항성 인자로서의 역할이 보고된 MAPK cascade 신호분자들의 남극개미자리 ortholog 유전자들을 선발함 (MAPKKK로써 <b><i>NPK1</i></b> 그리고 MAPKK로써 <b><i>MKK6</i></b>).</li> <li>⊙ 남극개미자리 유전체 정보에서 저온</li> </ul>	100%

기능 검증		선발	스트레스 조건에서 발현이 증가하는 4종의 스트레스 반응 유전자를 선발함 ( <i>CqTSPO</i> , <i>CqHVA22</i> , <i>CqADC</i> , <i>CqERF1</i> ).	
	2-2	6종의 선발 유전자에 대한 애기장대 형질전환 체 제작 및 선별	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊙ 상기한 6가지 유전자들에 대한 다양한 plasmid DNA를 제작함.</li> <li>⊙ 원형질체 세포에서 transient expression을 시킬 수 있는 6종의 plasmid DNA를 제작하였음. 이를 이용하여 우선적으로 제작한 plasmid DNA로부터 정상적인 단백질이 생성되는지를 애기장대, 남극개미자리 원형질체 세포에서 western blot analysis를 통하여 확인하였음.</li> <li>⊙ 애기장대 형질전환 시킬 수 있는 6종의 plasmid DNA를 모두 제작하였음. 이때 NPK와 MKK6는 각각 결과 해석 과정에서의 정확성을 위해 2종의 variant plasmid DNA를 추가적으로 제작하였음.</li> <li>⊙ <b>6종에 대한 애기장대로의 형질전환을 모두 수행하여 T0 seed pools들을 확보</b>하였음.</li> <li>⊙ 현재 <u><i>CqNPK1</i>과 <i>CqMKK6</i>에 대해서는 homozygous line이 선발되었고, <i>CqTSPO</i>는 T3 lines들에서 homozygote를 선발하는 중임.</u></li> <li>⊙ 나머지 <u><i>CqHVA22</i>, <i>CqADC</i>, 그리고 <i>CqERF1</i>은 T2 selection 중에 있음.</u></li> </ul>	80%
	2-3	표현형 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊙ 현재 선발되고 있는 형질전환체들을 이용하여 western blot analysis를 통해 식물체 수준에서의 단백질 발현을 확인하였음.</li> <li>⊙ 선발된 homozygous lines들을 이용하여 염(100, 150, 200 mM NaCl), 삼투 (100, 200 mM mannitol),</li> </ul>	80%

			그리고 저온 (-10℃) 스트레스에 대한 표현형 분석 중에 있음.	
--	--	--	---	--



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### □ 원형질체 세포 기반 극지식물 유전자 기능 분석

- 극지 유전자원의 기능 검증에 있어서 모델 식물을 이용한 heterologous transient expression system을 이용하는 것이 아니라, 극지식물 자체에서 세포를 분리하여 기능을 검증하는 방법을 사용함으로써 different genetic background에 의해 발생할 수 있는 부정확한 결과를 미연에 방지할 수 있음. 예를 들어 본 연구에서 분석되었던 ERF1 단백질의 세포 내 발현 위치 경우, 남극개미자리 CqERF1 단백질은 애기장대 AtERF1 단백질과 달리 핵에서 splicing regulator가 모여있는 nuclear speckles들을 보여주고 있음 (Reddy et al., 2012; Cheng et al., 2013). 유전적 배경에 따라 다른 세포 내 발현 위치를 보임으로써 heterologous analysis가 부정확한 결과를 보여줄 가능성이 있음. 그러므로 다양한 ‘omics’ 연구를 통하여 발생하는 유전자원에 대한 기능검증을 해당하는 극지식물로부터 추출된 세포를 기반으로 분석하는 연구에 본 연구 결과가 활용될 것으로 기대함.

### □ 세포 기반 전사인자 발현을 통한 환경 스트레스 반응 전사체 지도 제작

- 다양한 ‘omics’ 연구를 통하여 선발된 유전자원 중에서 저온 스트레스에 대해 반응하는 여러 유전자의 전사를 통합적으로 조절하는 전사인자(transcription factor)들이 있을 것으로 사료됨.
- 이러한 전사인자들을 원형질체 세포에서 과발현 시켜 새롭게 유도되는 전사체 지도를 작성하는 추가 연구가 필요하다고 사료됨.
- 전사인자 발현을 통한 전사체 분석을 통하여 저온 스트레스에 대응하는 유전자들의 전사를 통합적으로 분석하여, 반응 지도를 작성하고, 그 과정에서 통합적으로 스트레스 반응 유전자 발현을 유도하는 전사인자를 규명하게 된다면 이를 형질전환체 제작을 통하여 기능을 검증하려 함. 이러한 연구로 스트레스에 대한 통합적 기능이 검증된다면 저온 스트레스 저항성 작물 개발에 적용할 수 있을 것으로 기대함.

### □ 연구성과 활용

- 남극개미자리를 이용하여 원형질체 분리 및 유전자 발현 분석 방법에 관한 연구 결과를 ‘Antarctic Science’에 투고하여 리뷰 중이고, 특허출원도 준비하고 있음.
- 형질전환체를 이용한 표현형 분석이 완료된 뒤, 결과에 대한 논문 투고 예정.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### □ 극지식물에서의 원형질체 세포 추출 방법

- 본 연구를 위한 문헌 조사과정에서 육상 현화식물은 아니지만, 극지에서 생존하는 해조류(Antarctic sea ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L)에 대한 원형질체 세포 추출방법이 보고된 바가 있다는 정보를 수집하였음 (Liu et al., 2006).
- 특이한 점은, 남극 해조류의 원형질체 세포를 추출하기 위해서는 기존의 다른 식물 종들에 적용되었던 세포벽 분해 효소의 농도가 더 높게 처리되어야 한다는 것이었음. 이러한 정보를 기반으로 남극개미자리의 원형질체 세포 분리과정에서는 높은 세포벽 분해 효소 농도 처리뿐만 아니라 추가적인 분해 효소가 적용되어야 한다는 것을 알 수 있었음.



## 제 7 장 참고문헌

1. ASAI, T., TENA, G., PLOTNIKOVA, J., WILLMANN, M.R., CHIU, W.L., GOMEZ-GOMEZ, L., BOLLER, T., AUSUBEL, F.M. & SHEEN, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**, 977–983.
2. BILLINGS, W.D. & MOONEY, H.A. 1968. The ecology of arctic and alpine plants. *Biological Reviews*, **43**, 481 - 529.
3. BURRIS, K.P., DLUGOSZ, E.M., COLLINS, A.G., STEWART JR, C.N. & LENAGHAN, S.C. 2016. Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Cell Reports*, **35**, 693 - 704.
4. CHENG, M.C., LIAO, P.M., KUO, W.W. & LIN, T.P. 2013. The *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiology*, **162**, 1566–1582.
5. CHIU, W.L., NIWA, Y., ZENG, W., HIRANO, T., KOBAYASHI, H. & SHEEN, J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, **6**, 325–330.
6. COCKING, E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, **187**, 962 - 963.
7. CONVEY, P. 1996. Reproduction of Antarctic flowering plants. *Antarctic Science*, **8**, 127–134.
8. Fu, Y., Guo, C. Wu, H. & Chen, C. 2017. Arginine decarboxylase ADC2 enhances salt tolerance through increasing ROS scavenging enzyme activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, **83**, 253–263.
9. GUO, W.J. & HO, T.H.D. 2008. An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. *Plant Physiology*, **147**, 1710–1722.
10. HACHEZ, C., VELJANOVSKI, V., REINHARDT, H., GUILLAUMOT, D., VANHEE, C., CHAUMONT, F. & BATOKO, H. 2014. The *Arabidopsis* abiotic stress-induced TSPO-related protein reduces cell-surface expression of the aquaporin PIP2;7 through protein-protein interactions and autophagic degradation. *Plant Cell*, **26**, 4974–4990.

11. KOVTUN, Y., CHIU, W.L., TENA, G. & SHEEN, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of United State of America*, **97**, 2940—2945.
12. LIU, S., LIU, C., HUANG, X, CHAI, Y. & CONG, B. 2006. Optimization of parameters for isolation of protoplasts from the Antarctic sea ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Journal of Applied Phycology*, **18**, 783 - 786.
13. PARNIKOZA, I., KOZERETSKA, I. & KUNAKH, V. 2011. Vascular plants of the maritime Antarctic: Origin and adaptation. *American Journal of Plant Sciences*, **2**, 381—395.
14. REDDY, A.S.N., DAY, I.S., GÖHRING, J. & BARTA, A. 2012. Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. *Plant Physiology*, **158**, 67—77.
15. SHEEN, J. 2001. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, **127**, 1466 - 1475.
16. SMITH, R.I.L. 2003. The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. In HUISKES, A.H.L., GIESKES, W.W.C., ROCEMA, J., SCHORNO, R.M.L., VAN DER VIES, S.M. & WOLFF, W.J., eds. *Antarctic biology in a global context*. The Netherlands: Backhuys, 234—239.
17. WULLSCHLEGER, S.D., BREEN, A.L., IVERSEN, C.M., OLSON, M.S., NÄSHOLM, T., GANETEG, U., WALLENSTEIN, M.D., WESTON, D.J. 2015. Genomics in a changing arctic: critical questions await the molecular ecologist. *Molecular Ecology*, **24**, 2301—2309.
18. XIE, G., KATO, H. & IMAI, R. 2012. Biochemical identification of the OsMKK6 - OsMPK3 signalling pathway for chilling tolerance in rice. *Biochemical Journal*, **443**, 95—102.
19. YOO, S.D., CHO, Y.H. & SHEEN, J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, **2**, 1565—1572.