유식물 발달과정에서 브라시노스테로이드와 앱시스산 신호전달의 상호작용 연구

김혜민 · 홍정의 · 조용구 · 강권규 · 류호진

Interplay between Brassinosteroid and ABA signaling during early seedling development

Hyemin Kim · Jeongeui Hong · Yong-Gu Cho · Kwon Kyoo Kang · Hojin Ryu

Received: 23 August 2017 / Revised: 25 August 2017 / Accepted: 28 August 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Brassinosteroid (BR), a plant steroid hormone, plays a critical role in the growth and developmental processes through its canonical signaling and crosstalk with various internal and external signaling pathways. Recent studies have revealed the essential interplay mechanisms between BR and ABA during seed germination and early seedling establishment. However, molecular mechanisms for this important signaling crosstalk are largely unknown. To understand the crosstalk between BR-mediated signaling pathways and ABA functions during early seedling development, we carried out a comparative genome-wide transcriptome analysis with an Agilent *Arabidopsis* 4 x 44K oligo chip. We selected and compared the expression patterns of ABA response genes in ABA-insensitive *bes1-D* mutant with wild type seedlings on which ABA was exogenously applied. As a result, we identified 2,353 significant differentially expressed genes (DEGs) in ABA-treated *bes1-D* and wild type seedlings. GO enrichment analysis revealed that ABA signaling, response,

and metabolism were critically down-regulated by BR-activated signaling pathways. In addition, the genome-wide transcriptome analysis data revealed that BR-regulated signaling pathways were tightly connected to diverse signal cues including abiotic/biotic stress, auxin, ROS etc. In this study, we newly identified the molecular mechanisms of BR-mediated repression of ABA signaling outputs. Also, our data suggest that interplay among diverse signaling pathways is critical for the adaptive response of the plant to various environmental factors.

Keywords Brassinosteroid, ABA, Plant stress tolerance, Plant Hormones, Early seedling development

서 언

식물의 생활사 중에서 종자발아과정과 유식물 발달 단계가 외부환경에 대한 위험성이 가장 크기 때문에 생장 및 발육에 있어서 가장 중요하다. 식물 종자는 적합한 발아조건을 외부에서 주어진다면 유아 및 유근의 활력이 생겨 유식물로 생장한다. 이러한 발아 및 유식물의 발달을 조절하는 생리적기작은 ABA, 지베렐린, 브라시노스테로이드 등의 식물생장조절물질의 신호전달과정 및 광과의 복잡한 상호작용을 통해 일으키는 것으로 알려져 있다(Choudhary et al. 2012; Ryu et al. 2014). 최근 Ryu 등(2014)의 연구에서 종자발아와 유식물의 발달과정에서 브라시노스테로이드 신호전달이 ABA 신호전달의 강도를 직접적으로 억제하면서 발아 및 shoot 발달을 촉진시킨다고 하였다(Ryu et al. 2014). 종자 발아시 환경적인 요인과 식물의 내재적인 요소가 적당하지 않을 시점에서는 ABA의 합성과 활성이 높게 유지되어 발아를 억제하고 있는 것으로 잘 알려져 있다(참고문헌). 신호강도가 높아진 ABA

[†]These authors equally contributed to this work.

H. Kim[†], J. Hong[†], H. Ryu (✉)
충북대학교 자연과학대학 생물학과
(Department of Biology, Chungbuk National University,
Cheongju, 28644, Korea)
e-mail: hjryu96@chungbuk.ac.kr

Y. G. Cho (✉)
충북대학교 농업생명환경대학 식물자원환경화학부
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju, 28644, Korea)
e-mail: ygcho@cbnu.ac.kr

K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Hankyong National University,
Ansung, Gyeonggi-do 17579, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

는 전사인자 ABI3 (*ABA Insensitive 3*)의 활성을 높이고, ABI3는 직접적으로 ABI5 (*ABA Insensitive 5*)의 발현을 증가시킴으로써 발아억제에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2016; Ryu et al. 2014). 특히 ABI3와 ABI5는 종자발아를 촉진하는 지베렐린 신호전달과 합성을 직, 간접적으로 억제하는 것으로 보고되었다(Lopez-Molina et al. 2002).

브라시노스테로이드는 스테로이드 계통의 식물호르몬으로 생장과발육에 관련된 다양한프로그램에 중요하게 작용한다. 많은 연구자들은 브라시노스테로이드가 식물의 양적생장, 개화조절, 관다발 형성, 2차 분화, 광형태형성 및 각종 스트레스 저항성에 증진된다고 하였다(Kim and Wang 2010; Kutschera and Wang 2012; Ryu et al. 2010; Wang et al. 2012). 브라시노스테로이드 신호는 생체막에 존재하는 수용체 복합체인 BRI1/BAK1에 의해 인식이 되며 최종적으로 전사인자인 BES1과 BZR1의 탈인산화 및 핵으로 이동을 촉진하면서 다양한 생리반응에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다고 알려졌다(Choudhary et al. 2012; He et al. 2002; Li and Chory 1997; Li et al. 2002; Wang et al. 2012). 이들 전사인자 BES1과 BZR1은 전사조절 억제 복합체인 TPL-HDA19과 핵에서 결합하여 다양한 브라시노스테로이드 신호전달에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다고 보고하였다(Oh et al. 2014; Ryu et al. 2014). 특히 BES1-TPL-HDA19 전사억제 복합체는 직접적으로 ABI3 유전자의 프로모터부위의 히스톤 탈아세틸화를 유도하여 ABI3의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다(Ryu et al. 2014). 최근 보고에서 이들 전사인자 BES1의 활성형 돌연변이인 *bes1-D*에서는 ABA에 대한 다양한 생리적 반응들이 잘 일어나지 않는다고 하였다(Kim et al. 2016; Ryu et al. 2014). 그러나 단순히 활성화된 BES1에 의한 ABI3 발현의 억제 이외에 어떠한 신호전달 네트워크가 조절이 되어 브라시노스테로이드와 ABA 신호전달의 상호작용에 대해서는 알려진 것이 거의 없는 실정이다. 최근 식물 분자생리학적 연구들은 브라시노스테로이드와 다양한 환경스트레스 및 병 저항성에 매우 밀접한 연관관계가 있음을 보고하고 있다(Divi and Krishna 2009; Divi et al. 2010; Gendron and Wang 2007; Kagale et al. 2007). 즉 활성화된 브라시노스테로이드 신호전달과 ABA 신호전달의 상호작용 네트워크 분석은 식물이 발아와 유식물단계에서 어떻게 외부 환경변화에 적절히 대처하는지에 대한 중요한 단서를 제공할 것으로 기대하고 있다. Microarray 및 Next Generation Sequencing (NGS)을 기반으로 한 총 전사체 발현 양상 분석은 다양한 신호전달체계들의 시스템적인 분석을 활용하고 이해할 수 있다(Harnsomburana et al. 2011; Lee et al. 2015).

따라서 본 연구에서는 모델식물 애기장대 *bes1-D* 돌연변이체와 야생형 En-2에 ABA 처리 후, microarray 분석을 통해 전사체 발현패턴을 살펴보았다. 브라시노스테로이드 활성이 일어난 상태에서 ABA 처리에 따른 다양한 발현 차이를

보인 2,353개 유전자들을 동정하고, 이들 유전자들의 Gene Ontology 분석을 통해 다양한 ABA 신호전달 및 합성에 관여하는 유전자들이 브라시노스테로이드 신호전달 경로에 의해 하향 조절되는 것으로 확인되었다. 따라서 종자발아와 유식물 발달단계에서 브라시노스테로이드 신호전달이 어떻게 ABA 반응을 억제하게 되는지에 대해 전사체레벨에서 해석하고 다양한 외부환경 요인에 대한 식물의 반응에 대해 분자적 접근에 대해 고찰하였다.

재료 및 방법

식물 생장 및 Total RNA 분리, cDNA 합성 및 qRT-PCR

본 연구를 위해 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형 ecotype En-2와 EMS 돌연변이 유도원을 통해 동정된 브라시노스테로이드 활성 돌연변이 *bes1-D* 식물(Yin et al. 2002)을 B5액체 배지에 파종 후 5일된 유식물을 실험에 사용하였다. 준비된 유식물에 1 μ M 농도의 ABA를 1시간 처리 후 샘플링을 하였다. Total RNA 분리는 Total RNA extraction kit (Intron Biotech, Korea)를 이용하여 제공된 실험 방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA는 MS 3000 Nano-drop (Bio-red, USA)으로 농도를 측정하여 공시하였다. Total RNA를 이용하여 Microarray 분석에 이용하였다. Real-time quantitative PCR을 수행하기 위해 Oligo (dT) primer를 사용한 cDNA를 합성하였다. cDNA는 1st strand synthesis KIT (Enzynomics, Korea)를 이용하여 합성하였다. Total RNA의 2 μ g을 이용하였으며, 합성 조건은 50°C에서 60분 동안 반응시킨 후 1분간 얼음에 냉각시켜 first strand cDNA 합성을 완성하였다. qRT-PCR 분석은 cDNA를 사용하여 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Applied Biosystem, USA)를 사용하여 Quant Studio 3 (Applied Biosystem, USA) 장비를 사용하여 장치에서 권장하는 방법에 의해 수행하였다. Threshold cycle (Ct) 값에 의한 발현량 분석은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 으로 계산하였으며, $\Delta\Delta Ct$ 은 처리식물체의(Ct target gene - Ct actin gene) - 대조식물체의(Ct target gene - Ct actin gene)에 의해 계산하여 수치화하였다 (Livak and Schmittgen 2001).

ABA처리 및 발아율 검정

ABA처리에 따른 발아율을 조사하기 위해 En-2, *bes1-D*, *dwf4-D*, Col-0, *bzr1-D* 종자를 소독하여 0.5 μ M 농도의 ABA가 첨부된 B5 배지에 100개의 종자를 심어 발아율을 측정하였다. 독립적으로 3번의 실험을 통해 얻은 결과를 이용하여 통계처리를 하였다.

Microarray 분석 및 raw data 등록

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형 En-2, *bes1-D* 식물에

ABA를 처리에 따른 전사체분석을 위해 1시간 동안 ABA를 처리한 식물들을 독립적으로 3반복씩 수행하여 총 6종류의 식물 샘플에서 RNA를 추출한 후, microarray 분석을 수행하였다. ABA를 처리하지 않은 En-2와 *bes1-D* 샘플의 마이크로어레이 분석은 선행연구(Kim et al. 2016)의 결과를 활용하였다. 타겟 probes와 hybridization은 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology, USA)을 사용하였으며, Microarray 분석을 위한 chip은 상용화 되고 있는 Agilent Arabidopsis 4 x 44K Oligo microarray를 사용하여 hybridization 후, image quantification은 GenePix Pro 4.0을 사용하였고, LOWESS 프로그램을 이용하여 각 spot의 normalization을 수행하였다. 분석 프로그램은 Agilent GeneSpringGX 7.3을 사용하였으며, Hybridization은 각각 3 반복으로 수행되었다. Microarray 분석 데이터 및 raw data는 농업생명공학정보센터(NABIC, <http://nabic.rda.go.kr/>, 등록번호: NC-0204-000001)에 등록되었음.

Gene Ontology (GO) 분석

Microarray 분석을 통해 얻어진 2,353개의 DEGs ($p < 0.05$, 1.5 fold change)으로부터 주요 생물학적 기능을 분석하기 위해 GO enrichment 분석을 수행하였다(Ashburner et al. 2000). Gene Ontology Consortium website (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>)에서 제공하는 프로그램을 이용하여 biological process, molecular function 및 cellular component에 해당하는 카테고리를 분리하였다(Supek et al. 2011). GO-Slim 카테고리는 TAIR database (<https://www.arabidopsis.org>)에서 제공되는 데이터를 이용하였다. 유전자의 이름은 TAIR database를 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

브라시노스테로이드 신호전달에 의한 ABA 활성도의 억제 가 두 전사인자 BES1과 BZR1 경로를 통해 이루어졌는지 확인하기 위해 애기장대 En-2, *bes1-D* 계통(Yin et al. 2002) 및 Col-0, *bzr1-1D*, *dwf4-D* (Wang et al. 2002) 계통을 이용하여 ABA 처리에 따른 발아율을 조사하였다(Fig. 1). 브라시노스테로이드 합성이 증대되어 신호전달이 활성화되고 있는 *dwf4-D* 식물체의 경우, 야생형 Col-0에 비해 발아율이 현저히 증가되는 것을 확인하였다. ABA가 포함된 배지에 종자 치상 후, 2일째에 *dwf4-D* 식물체는 31% 이상의 발아가 진행되었으며, 3일째 97% 발아율을 보였다(Fig. 1A, 1B). 이러한 특징은 브라시노스테로이드 합성의 증대에 의한 신호전달 활성강도의 증가에 의해 종자발아 억제호르몬인 ABA의 반응성이 현저히 감소됨을 의미한다. 브라시노스테로이드 전사인자 활성이 강하게 나타나는 돌연변이체 *bes1-D*의 경우 야생형 En-2에 비해 종자 치상 후, 3일부터 현저하게 발아율

A

B

Fig. 1 ABA-insensitive phenotypes in seed germination and early seedling establishment of BR-activated *dwf4-D* and *bes1-D*. A. Col-0, En-2, *bes1-D*, *bzr1-1D*, and *dwf4-D* mutant seeds were germinated on 1/2 B5 agar plates containing 0.5 μ M of ABA for 6 days (A) and the germinated seeds (radicle emergence) were counted (B). More than 100 seeds were analyzed in each independent experiment ($n=3$). Error bars indicate $\pm$ S.E

이 높게 나타났다. En-2의 경우 약 52%의 발아율이 3일째 보였으며, *bes1-D*의 경우 72%가 발아되었다(Fig. 1B). 그러나 BES1과 상동성이 높은 BZR1의 활성형 돌연변이체인 *bzr1-1D*의 경우 ABA에 의해 발아가 억제되어 3일째 야생형 75%에 비해 12%로 현저하게 떨어졌다(Fig. 1A, 1B). 또한 ABA에 의해 억제되는 유식물의 발달이 *bes1-D*와 *dwf4-D* 식물체에서는 완벽하게 회복되었다(Fig. 1A). 이들 결과로부터 브라시노스테로이드 신호전달과정상의 최하위 전사인자 BES1 경로를 통해 특이적으로 ABA 활성이 억제되고 있는 두 호르몬의 상호작용이 일어났다고 할 수 있다. 또한 종자발아과정 및 유식물 발달과정에서 *bzr1-1D*의 ABA에 대한 민감한 반응은 브라시노스테로이드 합성 및 억제가 그 원인으로 생각할 수 있다(Vriet et al. 2012; Wang et al. 2012). 본 실험 결과로부터 브라시노스테로이드 신호전달에 의해 활성화되는 BES1 전사인자는 다양한 유전자의 발현을 조절하여 ABA 활성도를 억제한다고 할 수 있다. BES1에 의해서 조절되는 전사체 발현패턴을 조사하기 위해 microarray 분석을 실시하였다. 브라시노스테로이드 활성이 있는 *bes1-D*와 야생형 En-2 유

Fig. 2 Gain-of-function *bes1-D* mutant is differentially regulated in stress and ABA-related genes. **A.** Venn diagram illustrating the number of genes, which were differentially expressed in *bes1-D* (blue) and En-2 (yellow) and commonly expressed (green). **B.** GO enrichment analysis of the identified DEGs

식물에 ABA를 처리 후, RNA를 추출하여 Microarray로 분석한 결과 통계적으로 유의성이 나타나는 *p*-value가 0.05 이하와 1.5배 이상의 발현량 차이를 보이는 유전자는 총 2,353개의 DEG를 추출하였다. En-2에서 발현 차이를 보이는 유전자의 수는 총 1,621개였고, *bes1-D*에서 발현차이를 보이는 유전자는 총 1,511개 이었다. 그 중 공통적으로 발현차이를 나타낸 유전자는 총 779개였다(Fig. 2A). 이들 779 유전자들로부터 주요 생물학적 기능을 분석하기 위해 GO enrichment analysis 분석을 수행하였다. GO 분석을 통해 브라시노스테로이드 신호전달에 의해 조절되는 네트워크와 이들 신호에 의해 특이적으로 조절되는 ABA 활성억제 기작을 확인하기 위해 총 5가지로 구분을 지어 그 특성을 조사하였다(Fig. 2B). 먼저 En-2와 *bes1-D*에서 ABA 처리에 따라 공통으로 증가되는 유전자들은 ABA, 지질 등 2차 대사산물 합성과 신호전달에 관여하는 유전자들로 나타났다. ABA 처리에 따른 En-2와 *bes1-D* 돌연변이체에서 특이적으로 발현량이 증가(Pattern 2, 3)되거나 감소(Pattern 4, 5)되는 패턴은 Fig. 2B에 나타났다. 야생형 En-2에서 특이적으로 발현차이를 보이는 유전자들은 Myb 계통의 전사인자와 ABA 신호전달 및 non-coding RNA 및 방어에 관련된 유전자들이었다. 그러나 특이적으로 ABA 신호전달에 중요하게 작용하고 있는 PP2C 등의 조절인자가 *bes1-D* 식물체에서 발현량이 현저하게 증가되었다(Fig. 2B, Pattern 3). 반대로 ABA 처리 후, *bes1-D*에서 특이적으로 감소하는 유전자들은 ROS와 auxin 합성에 관련된 유전자들과 ABA 신호전달, 특히 ABF 관련 유전자들이 발현량이 현저하게 감소하였다. 이들 결과로부터 ABA 처리에 따라 특정한 유전자들이 *bes1-D* 돌연변이체에서 발현이 증가 또는 감소됨으로써, 종자 발아 및 유식물 발달과정에서 ABA에 대한 반응성을 낮춘다고 시사한다.

이를 확인하기 위해 각 패턴별 특이성을 보이는 Gene

Ontology에 포함된 유전자들을 추출하여 표시하였다(Fig. 3A). 이러한 유전자들은 *ABFs*, *ABI5*, *PP2C*, *Myb*, *PYR* 등 ABA 신호 전달에 관여하는 유전자들이 대거 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 발현패턴에 차이를 보이는 유전자들 중에서 *bes1-D* 돌연변이체에서 ABA 처리시, 그 발현량이 감소 또는 증가되는 유전자들만을 추출하였다(Fig. 3B). 이들 유전자들은 ABA 반응성 유전자들(*SPTASE11*, *SKOR*, *ERD14*, *AtMYB74/112*, *ANAC072*, *OCP3*, *BLH1*, *AKT2*, *COR13*)이었다. 이들 유전자들은 ABA 처리 후에도 *bes1-D*에서 특이적으로 감소하는 양상을 보여주었다. 즉 ABA에 대한 반응이 *bes1-D*에서 감소되는 현상과 일치하였다. 이렇게 *bes1-D*에서 ABA의 반응성이 약해진 이유는 ABA 수용체인 *PYR1*, *PYL7*과 신호전달 매개체인 *ATCDPK2*, *SnRK2* 등의 발현이 동시에 약하게 나타나면서 정상적인 신호전달이 일어나지 않은 것으로 생각된다. 이외에도 다양한 전사인자들 *ATWRKY40*, *ATERF48*, *RAB18* 등의 발현 또한 약하게 나타남으로써 다양한 ABA 반응성 관련 유전자들의 발현량을 정상적으로 조절하지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 즉 브라시노스테로이드 신호전달의 활성화는 전사인자 *BES1*의 탈인산화 및 핵으로의 이동을 통해 다양한 ABA 대사 및 신호전달에 관여하는 유전자들의 발현을 억제하는 것으로 판단된다. 이러한 결과 전체적인 ABA 신호전달의 활성이 약해지면서 종자의 발아 및 유식물의 발달을 촉진시키는 것으로 예측된다. 전사인자의 활성도가 항상 증가되어져 있는 *bes1-D* 유식물에서 ABA 신호전달의 활성이 실제로 약하게 나타나는지 여부를 마이크로어레이와 Real-time q-PCR을 통해 확인하였다(Fig. 4). 식물 종자의 발아와 유식물의 발달 시 비생물학적 스트레스 환경이 주어지게 되면 ABA의 합성이 증가되고, 신호전달의 활성이 증대되면서 전사인자 *ABI3*, *ABI4*의 활성도 증가와 그 하위 전사조절인자 *ABI5*, *ABF1-4* (*ABFs*)의 발현이 급격하게

Fig. 3 Microarray investigation of various genes in the wild type: BR-activating *bes1-D* seedlings in the presence of ABA. **A.** Representative DEGs in both wild type (En-2) and *bes1-D* seedlings in the absence (Kim et al. 2016) or presence of ABA. **B.** List of DEGs which were involved in the ABA response, signaling, and BR biosynthetic pathways.

Fig. 4 Expression pattern of ABA-related transcription factors in En-2 and *bes1-D* seedlings in the presence or absence of ABA. **A.** Gene expression levels of ABA-related transcription factors in the microarray. **B.** Real-time quantitative RT-PCR analysis of the expression levels of ABA-related genes identified in Fig. 4A (n=3). Error bars indicate $\pm$ S.E

증대되는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2016; Lopez-Molina et al. 2002; Ryu et al. 2014). Fig. 4A에서 볼 수 있듯이 마이크로어레이 결과에서 ABA 신호전달의 주요 전사인자 *ABI3*와 *ABI4*의 발현이 처리하지 않은 샘플에 비해 약 2배정도 증가하였

고, 이들에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려진 하위 전사인자 *ABI5*, *ABFs*들은 3 ~ 15배 정도 증가되어져 있음을 확인하였다(Fig. 4A). 그러나 *bes1-D*에서의 ABA 처리에 따른 이들 *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *ABFs*들의 발현은 약 1 ~ 8 배정도로 야생

형 En-2에서 나타나는 발현량의 변화에 비해 확연히 적게 나타남을 알 수 있었다. 이들 *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *ABFs*들의 발현은 ABA 반응성과 직접적인 연관성이 있기 때문에, real time quantitative PCR을 통해 이들 발현량의 변화를 조사하고 마이크로어레이 분석결과와 비교분석 하였다(Fig. 4B). RT-PCR을 통해 확인된 이들 유전자들의 발현양상은 microarray 분석을 통해 확인된 발현 양상과 비슷하게 나타남을 확인 할 수 있었다. ABA 처리시 En-2에서 *ABI4*의 발현이 증가되는 것이 확인되지 않았지만, 약 1.5배 정도의 *ABI3* 발현 증가와 그 하위 *ABI5*, *ABFs*들의 발현증가가 확인되었다(Fig 4B). 마이크로어레이 분석결과와 비슷하게 *bes1-D* 유식물에서 ABA 처리전 또는 처리후에 따른 이들 전사인자들의 발현량이 현저히 감소되어 있음을 확인 할 수 있었다. 특히 *ABI3-ABI5* 두 전사인자의 조절기작은 식물의 발아와 유식물 발달에 있어서 매우 중요한 ABA 신호전달 매개체 이다 (Lopez-Molina et al. 2002). 또한 최근 연구에서 *ABI5*와 기능적으로 유사한 *ABFs* 유전자들의 기능학적 연구를 통해 종자의 발아에서부터 배의 형성 및 발달단계까지 이들 유전자들의 전사 및 번역 후 조절이 ABA에 의해 조절되는 다양한 식물 발달 프로그램에 매우 중요하게 작용하고 있음을 보고 하고 있다 (Lopez-Molina et al. 2002; Ryu et al, 2014). 이들 결과들은 브라시노스테로이드 신호전달의 활성이 식물의 발아와 유식물의 발달을 억제하고 있는 ABA반응성을 직접적으로 낮추고 있음을 의미한다.

시공간적으로 가해지는 전방위적 환경변화에 대처하기 위해 생명체들은 다양한 신호전달을 통합시켜 가장 효율적으로 외부 환경변화에 반응을 보이는 것으로 알려져 있다. 최근 컴퓨터를 이용한 시스템 생물학은 빅데이터 처리를 통해 다양한 환경변화에 대처하는 생명현상을 이해하는데 많은 도움을 주고 있다(Harnsomburana et al. 2011; Lee et al. 2015). 특히 총 전사체 분석을 통해 얻어진 많은 양의 유전자들의 발현패턴의 변화를 시공간적 변화에 맞게 분석하고, 이를 통해 새로운 생명현상의 모형을 발견할 수 있는 생명공학기술기법들 많이 보고하였다(Serin et al. 2016). 본 연구는 최근 발달하고 있는 시스템 생물학적 연구기법 중 microarray 분석을 통해 ABA에 대한 반응성에 변화가 발생한 돌연변이체에서 일어나는 유전자들의 발현 양상을 조사하고, 기능학적 분류를 통해 유전자들의 그룹을 형성할 수 있는 gene enrichment analysis 기법이 ontology 분석을 통해 그 원인을 분석하였다. 이러한 연구기법을 통해 브라시노스테로이드 신호전달이 활성화되어 있는 *bes1-D* 식물체의 경우 ABA 신호전달에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 직간접적으로 억제함으로써 정상적인 ABA 반응성을 보이지 못하게 하고 있다는 사실을 구명하였다. 식물의 단일 호르몬 또는 신호전달 체계가 어떻게 발생 및 발달을 조절하는지에 대한 이해는 많은 연구를 통해 이뤄지고 있다. 하지만 최근 연구는 이들 단일 체계들이 어떠한 상호작용을 이루고 있고, 이들 신호전달

네트워크는 최종적으로 어떻게 핵에서 유전자들의 발현을 조절하고 있는지에 대한 이해가 없이는 복잡하게 얽혀져 있는 생명현상을 이해하는데 많은 장애가 있음을 확인하고 있다(Rhee et al, 2006; Serin et al. 2016). 향후 본 연구를 통해 분석한 연구기법을 통해 최근 발달하고 있는 차세대유전체분석 기술(NGS)를 통해 얻어지는 빅데이터를 분석하고, 이러한 지식을 통합적으로 활용함으로써 다양한 생명체들이 어떻게 환경적인 변화와 내재적 신호전달의 통합을 이룰 수 있는지를 확인함으로써 복잡한 생명현상을 좀더 빠르고 정확하게 이해할 수 있으리라 사료된다.

적 요

식물의 유일한 활성 스테로이드 호르몬인 Brassinosteroid (BR)는 다양한 내재적 또는 외부 신호 전달 경로와의 통합적인 결합을 통해 식물의 생장 및 발달 과정에서 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 식물학 연구들은 종자의 발아와 초기 발달과정에서 BR과 ABA 사이의 필수적인 상호작용 메커니즘이 존재하고 있음을 보고하고 있다. 하지만 이들 두 호르몬의 중요한 신호전달 상호작용에 대한 분자 메커니즘은 거의 알려지지 않았다. 식물의 초기 발달과정에서 BR에 의해 매개되는 ABA 신호전달과의 기능학적, 생물학적 상호작용 네트워크를 이해하기 위해 Agilent Arabidopsis 4x 44K 올리고 칩을 사용하여 비교 전사체 분석을 수행하였다. ABA에 반응하지 않는 *bes1-D* 돌연변이체에서의 ABA 처리에 따른 다양한 유전자의 발현 패턴을 야생형 식물과 비교 분석하였다. 그 결과 발현의 변화가 발생하는 유전자(DEGs) 2,353 개를 확인하였다. GO 분석을 통해 ABA 신호전달 및 대사에 관여하는 유전자들이 BR 신호전달 경로에 의해 하향 조절되는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라, BR 신호전달 경로는 다양한 비생물학적/생물학적 스트레스, 옥신 및 ROS 등 다양한 신호전달 체계와 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. 본 연구를 통해 BR 신호전달의 활성화는 ABA 신호전달에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 억제함을 확인하였다. 또한 본 연구는 다양한 신호 경로 사이의 상호작용이 다양한 환경요인에 대한 식물의 적응 반응에 중요하게 작용할 수 있음을 보여주고 있다.

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 국가농업 R&D 어젠다 연구사업(세부과제명: 과수 주요 병해의 현장 진단 및 생물학적 방제법 개발, 세부과제번호: PJ011917)과 한국연구재단 기초연구실 지원사업(NRF-2015R1A4A1041869)에 의해 이루어진 것임.

References

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT and others (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-9
- Choudhary SP, Yu JQ, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2012) Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends Plant Sci* 17:594-605
- Divi UK, Krishna P (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *N Biotechnol* 26:131-6
- Divi UK, Rahman T, Krishna P (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol* 10:151
- Gendron JM, Wang ZY (2007) Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10:436-41
- Harnsomburana J, Green JM, Barb AS, Schaeffer M, Vincent L, Shyu CR (2011) Computable visually observed phenotype ontological framework for plants. *BMC Bioinformatics* 12:260
- He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10185-90
- Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P (2007) Brassinosteroid confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses. *Planta* 225: 353-64
- Kim H, Moon S, Bae W, Won K, Kim YK, Kang KK, Ryu H (2016) Massive identification of key genes involved in pathogen defense and multi-stress tolerance by using microarray and Network analysis. *J. Plant Biotech.* 43:347-358
- Kutschera U, Wang ZY (2012) Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *J Exp Bot* 63:3511-22
- Lee T, Kim H, Lee I (2015a) Network-assisted crop systems genetics: network inference and integrative analysis. *Curr Opin Plant Biol* 24:61-70
- Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90:929-38
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-22
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402-408
- Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* 32:317-328
- Oh E, Zhu JY, Ryu H, Hwang I, Wang ZY (2014) TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. *Nat Commun* 5:4140
- Rhee SY, Dickerson J, Xu D (2006) Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annu Rev Plant Biol* 57:335-60
- Ryu H, Cho H, Bae W, Hwang I (2014) Control of early seedling development by BES1/TPL/HDA19-mediated epigenetic regulation of ABI3. *Nat Commun* 5:4138
- Ryu H, Cho H, Kim K, Hwang I (2010a) Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol Cells* 29:283-90
- Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 19:2749-62
- Shin SY, Chung H, Kim SY, Nam KH (2016) BRI1-EMS-suppressor 1 gain-of-function mutant shows higher susceptibility to necrotrophic fungal infection. *Biochem Biophys Res Commun* 470:864-9
- Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 6:e21800
- Vriet C, Russinova E, Reuzeau C (2012) Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* 24:842-57
- Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY (2012) Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet* 46:701-24
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T and others (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2:505-13
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109:181-91